



ФИЗИКА ЖИЗНЕННЫХ ПРОЦЕССОВ

**ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»
ГЛАВНАЯ РЕДАКЦИЯ
ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ
МОСКВА 1977**

Л. А. БЛЮМЕНФЕЛЬД

**ПРОБЛЕМЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ
ФИЗИКИ**

**ИЗДАНИЕ ВТОРОЕ,
ИСПРАВЛЕННОЕ И ДОПОЛНЕННОЕ**

**ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»
ГЛАВНАЯ РЕДАКЦИЯ
ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ
МОСКВА 1977**

57.04

Б 71

УДК 577.3

Проблемы биологической физики. Б л о м е н ф е л ь д Л. А.
Изд. 2-е, испр. и доп., М., Главная редакция физико-математической литературы изд-ва «Наука», 1977, 336 стр.

В книге рассматриваются те проблемы теоретической биологии, которые можно пытаться изучать на основе методов и принципов физики. Детально анализируется ряд важнейших проблем современной биофизики: упорядоченность биологических систем и «осмысленность» этой упорядоченности; основы статистической физики систем, характеризующихся принципиальной кинетической неравновесностью; физика конформационных изменений биомакромолекул; физика ферментативного катализа; физика процессов внутриклеточного электронного переноса; физика биоэнергетических процессов. В качестве примеров, иллюстрирующих физические принципы подхода к решению фундаментальных биофизических проблем, рассмотрены такие процессы, как фотосинтез, тканевое дыхание, мышечное сокращение и т. д.

Табл. 6, иллюстраций 48, библиография 576 назв.

Лев Александрович Бломенфельд

ПРОБЛЕМЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ

М., 1977 г., 336 стр. с илл.

Редактор *Т. Г. Коряшева*

Техн. редактор *С. Я. Шкляр*

Корректор *Н. Б. Румянцева*

Сдано в набор 20.07.1977 г. Подписано к печати 28.11.1977 г. Бумага 84×108¹/₃₂.
Физ. печ. л. 10,5. Условн. печ. л. 17,64. Уч.-изд. л. 18,42. Тираж 6500 экз.
Т-20747. Цена книги 1 р. 40 к. Заказ № 2669

Издательство «Наука» Главная редакция физико-математической литературы
117071, Москва, В-71, Ленинский проспект, 15

2-я типография издательства «Наука», 121099 Москва, Г-99, Шубинский пер., 10

21005-175
Б $\frac{053(02)-77}{122-78}$

© Главная редакция
физико-математической литературы
издательства «Наука», 1974,
с изменениями и дополнениями 1977

Предисловие ко второму изданию	7
Из предисловия к первому изданию	7
Глава 1. Введение	9
§ 1.1. Что такое биофизика?	9
§ 1.2. Компоненты клетки и их отличительные особенности	14
§ 1.3. Задачи книги	17
Глава 2. Упорядоченность биологических структур	19
§ 2.1. Действительно ли они столь упорядочены?	19
§ 2.2. Энтропия и информация	20
§ 2.3. Сколько «стоит» биологическая упорядоченность?	25
§ 2.4. Смысл биологической упорядоченности	27
§ 2.5. Необходимость механических деталей	32
§ 2.6. Проблемы	33
Глава 3. Неравновесная термодинамика и биологическая физика	34
§ 3.1. Открытые системы	34
§ 3.2. Феноменологические соотношения	36
§ 3.3. Стационарные состояния	40
§ 3.4. Диссипативные структуры	44
§ 3.5. Колебательные процессы в химии и биохимии	48
§ 3.6. Проблемы	51
Глава 4. О статистической физике биополимеров	52
§ 4.1. Где начинается механика?	52
§ 4.2. Статистическая физика однонитового гомополимера	54
§ 4.3. О статистической неравновесности биополимерных структур на разных уровнях организации	67
§ 4.4. О некоторых свойствах биополимерных структур, вытекающих из их статистико-физического описания	70
Глава 5. Конформационные и конфигурационные изменения биополимеров	73
§ 5.1. Введение	73
§ 5.2. Денатурация биополимеров	74
§ 5.3. О реальности различий между энергией и энтальпией активации	96

§ 5.4.	Некоторые реакции с участием белков	97
§ 5.5.	О компенсационном эффекте	117
§ 5.6.	Анализ применимости уравнений Вант-Гоффа и Аррениуса и теории активированного комплекса к реакциям с участием биополимеров	120
§ 5.7.	О спонтанных конформационных колебаниях белковых макромолекул	131
§ 5.8.	Заключение	132
Глава 6.	Физика ферментативного катализа	134
§ 6.1.	Введение	134
§ 6.2.	Существующие объяснения ферментативной активности	135
§ 6.3.	Конформационные изменения — обязательный этап ферментативного процесса	149
§ 6.4.	Влияние температуры на ферменты и на активационные параметры ферментативных реакций	152
§ 6.5.	Физика элементарного акта ферментативного катализа	159
§ 6.6.	Динамическая модель действия фермента аспаратаминотрансферазы	172
§ 6.7.	Заключение	179
Глава 7.	Физика электронного переноса в биологических системах	181
§ 7.1.	Введение	181
§ 7.2.	Свободные радикалы и ион-радикалы в биохимических реакциях	183
§ 7.3.	Цепи электронного переноса в мембранах митохондрий и хлоропластов	199
§ 7.4.	Реакции электронного переноса и полупроводниковые представления в биологической физике	221
§ 7.5.	О туннельных механизмах переноса электронов между компонентами ЦЭТ	231
Глава 8.	Физика трансформации и аккумуляции энергии в клетке	240
§ 8.1.	Введение	240
§ 8.2.	Проблема АТФ	242
§ 8.3.	Субстратное фосфорилирование	257
§ 8.4.	Мембранное фосфорилирование: термодинамические аспекты	264
§ 8.5.	Мембранное фосфорилирование: существующие теоретические представления	277
§ 8.6.	Некоторые физические аспекты трансформации энергии в клетке как релаксационного процесса	290
	Заключение	302
	Литература	305

ПРЕДИСЛОВИЕ КО ВТОРОМУ ИЗДАНИЮ

После выхода в свет первого издания этой монографии она неоднократно обсуждалась в публичных и частных дискуссиях. Оказалось, что многие положения, казавшиеся мне очевидными, должны быть изложены значительно более детально. Некоторые приведенные экспериментальные данные устарели, появились новые работы. Все это заставило внести в книгу ряд изменений, особенно в главы 4, 5 и 6. Эти изменения, однако, не коснулись основного содержания монографии и логики рассуждений.

В настоящем издании изменена система литературных ссылок, которые теперь распределены по отдельным главам.

Я искренне признателен сотрудникам кафедры биофизики физического факультета МГУ, Института биофизики АН СССР, Института химической физики АН СССР и всем коллегам, дружеская критика которых помогла мне увидеть недостатки моего труда и в меру сил их исправить.

ИЗ ПРЕДИСЛОВИЯ К ПЕРВОМУ ИЗДАНИЮ

Эта книга написана в значительной степени по мотивам курса «Проблема современной биофизики», читаемого автором на кафедре биофизики физического факультета МГУ. Слушателями этого курса являются студенты и аспиранты кафедры, т. е. люди, обладающие достаточно хорошей подготовкой как в области физики, так и в области биологии. Хотя я и попытался при написании книги сделать ее доступной более широкому кругу читателей, т. е. физикам, не знающим как следует биологии, и биологам, не знающим как следует физики, но я не вполне уверен в том, что мне это удалось.

Книга эта не является ни учебником, ни систематическим изложением области науки. Мне кажется, что в современной биологической физике, т. е. в той области биологии, которой занимаются люди, имеющие фундаментальное физическое или физико-химическое образование, за последние годы получено столько конкретных ответов, что вполне настало время поставить хотя бы несколько общих вопросов. Эта книга и посвящена постановке таких вопросов, выбор которых в значительной степени определяется вкусом и интересами автора.

Хотя в книге, как это можно видеть из оглавления, рассмотрен ряд проблем биологической физики, все они представляют собой, по существу, различные стороны одной, и, с моей точки зрения, наиболее интересной, проблемы, а именно соотношения статистики и механики в биологических системах. Я думаю, что эта проблема одинаково актуальна как для современной физики, так и для современной биологии. Широкие исследования биологических объектов на макромолекулярном уровне впервые заставили физиков рассматривать системы, не допускающие раздельного статистического или механического описания. Монография и посвящена, собственно, анализу следствий, вытекающих из этого утверждения.

Многие главы этой рукописи прочли некоторые мои сотрудники и друзья, замечания которых были весьма полезны при переделках текста. Особенно я благодарен В. И. Пасечнику, критически прочитавшему почти всю рукопись, а также С. Э. Шнолю, А. П. Пурмалю, А. Л. Бучаченко, Э. К. Рууге, А. Ф. Ванину, В. И. Дещеревскому и Ф. И. Атаулаханову. Длительные обсуждения с Д. С. Чернавским многих проблем, затронутых в этой книге, способствовали формулировке ряда концепций.

Пользуюсь случаем выразить благодарность Н. П. Кирпичниковой и А. И. Климову за помощь в изготовлении рисунков. «Биологическое мировоззрение» автора складывалось в результате многолетнего общения и бесед с Николаем Владимировичем Тимофеевым-Ресовским. Я хочу выразить Николаю Владимировичу глубокую признательность за все, чему научился от него в Миассово, на Можайском море, в Обнинске и в Москве.

Л. А. Блюменфельд

§ 1.1. ЧТО ТАКОЕ БИОФИЗИКА!

В этой книге речь будет идти об основных проблемах, стоящих перед биологической физикой. Вероятно, начать надо с некоторых замечаний общего характера, касающихся предмета этой науки.

Термин «биофизика» получил в наши дни широкое распространение. Во многих странах мира издаются журналы под этим названием, существуют институты и кафедры биофизики, есть ученые, называющие себя биофизиками. Однако само название этой науки может привести и часто приводит к недоразумениям. Существует ли «биологическая физика», т. е. особая физика живой материи, отличная от физики, законы которой изучают школьники и студенты? Ответ на этот вопрос является в известной степени «символом веры», который не может быть в наше время строго обоснован, но тем не менее должен быть выяснен для себя каждым, кто тратит или собирается тратить свое время на изучение живого.

Поэтому, забегаая несколько вперед, я начну с того, что сформулирую свой ответ, свой символ веры, который в дальнейшем постараюсь обосновать, хотя, повторяю, вполне строго сделать это нельзя. *Для полного описания и понимания строения и функционирования всех существующих биологических систем в принципе вполне достаточно известных нам основных законов физики* *).

Следует подчеркнуть два обстоятельства. Первое состоит в том, что речь идет об *основных* законах физики. Ситуация здесь точно та же, что и при описании структуры и функционирования сложных механических или радио-

*) Здесь не были упомянуты химические законы, так как они в принципе также не требуют для своего обоснования новых физических постулатов.

технических схем. Законы поведения этих схем могут быть достаточно сложны и специфичны, однако никому не приходит в голову искать новые физические законы для описания, например, свойств данной конкретной схемы телевизора. Эти свойства могут подчиняться вполне определенным и сложным закономерностям, но они могут быть до конца поняты и выведены логически на основе физических принципов, по которым работают элементы схемы, и знания *конструкции, организации* схем. Для описания каждой новой, отличающейся по своему поведению и конструкции схемы нет необходимости создавать новую физику.

Второе важное обстоятельство заключается в том, что изучаемые биологические системы считаются априори заданными, существующими. Это означает, что в рамках сформулированного выше символа веры биофизика пока не в состоянии решить проблемы химической и биологической эволюции, которые привели к возникновению живой материи. Ведь именно теория биологической эволюции, основы которой были заложены Дарвином, и является главным содержанием биологии — науки о живом.

Вместе с тем тот факт, что существующие биологические системы возникли в результате длительной химической и биологической эволюции, полностью определяет те физические и химические механизмы и особенности структуры биологических объектов, которые будут обсуждаться в этой книге.

Таким образом, вероятно, наиболее правильным было бы определить биологическую физику как ту часть биологической науки, в которой можно сегодня работать, основываясь на принципах и методологии физики, т. е., другими словами, которой могут плодотворно заниматься исследователи, имеющие фундаментальное физическое образование. Ясно, что пока еще биофизика — лишь небольшая часть всей биологии. По оптимистическому мнению автора, эта часть будет со временем непрерывно возрастать, асимптотически приближаясь к целому. *Сегодня биофизика есть часть биологии, имеющая дело с физическими принципами построения и функционирования некоторых сравнительно простых биологических систем, но рассматривающая их как нечто данное и не занимающаяся непосредственно вопросом их возникновения и эволюции.*

Теперь следует уточнить, что подразумевается под «...*пониманием* строения и функционирования всех существующих... систем...».

Когда ученый утверждает, что он понимает химические свойства бензола, это означает возможность для него хотя бы в принципе пройти логически весь путь от основных постулатов квантовой механики, электродинамики и статистической физики до объяснения реакционной способности и других химических характеристик сложного образования, состоящего из 6 ядер углерода, 6 протонов и 42 электронов, пространственно организованных в молекулу бензола. Практически этот путь никто не проходит (а в связи с огромными математическими трудностями его сейчас и нельзя пройти, не допуская грубых приближений), однако никто не сомневается в том, что здесь не возникнет необходимости введения новых принципиальных физических постулатов, не вытекающих из сравнительно небольшого числа уже имеющихся. Конечно, на этом пути формулируется множество законов химии, и некоторые из них достигают огромной обобщающей силы (например, периодический закон Д. И. Менделеева), однако в каждом случае можно пройти тот же путь, не вводя новых постулатов.

Следует подчеркнуть, что путь от основных постулатов до конкретных объяснений в большинстве случаев проходить не только не нужно, но и вредно. Это означало бы сознательный отказ от использования огромного количества химических закономерностей, сформулированных в результате исследований многих поколений ученых и составляющих в конечном счете содержание химической науки. На уже набивший оскомину и в значительной степени потерявший смысл вопрос о том, можно ли свести химические законы к физическим, следует, вероятно, отвечать так: в принципе можно, но, как правило, не нужно!

Естественно, наука знает и другие ситуации. Понимание электрических и магнитных явлений невозможно на основе механики без введения новых постулатов, являющихся обобщением опыта и логически не вытекающих из законов механики. Введение новых постулатов, по-видимому, всегда связано с введением новых мировых постоянных (в рассматриваемом примере — с введением постоянной c). При переходе от макрофизических законов

к микрофизическим приходится вводить постулаты квантовой механики, и появляется новая мировая постоянная *) h .

Символ веры, о котором говорилось выше, заключается, собственно, в убеждении, что, как и в химии, в биофизике для понимания закономерностей строения и функционирования биологических систем не придется вводить новые постулаты и новые мировые постоянные.

Вместе с тем, как уже было отмечено выше, основные физические и химические закономерности процессов, протекающих в биологических системах, ни в коем случае не исчерпывают биологии. В основе биологии лежит учение о биологической эволюции. Это не означает, конечно, что для понимания биологической эволюции потребуются новые физические постулаты. В конечном счете первичным событием эволюционного процесса является конвариантная редубликация, т. е. самовоспроизведение биополимерного комплекса, несущего генетическую информацию, с воспроизведением структурных вариантов, возникших в результате случайных мутаций [3].

По-видимому, биофизическая теория биологической эволюции должна будет исходить из факта существования в любой единице живой материи четкого различия между фенотипом и генотипом, т. е. между самим организмом, взаимодействующим с внешней средой, и заложенной в нем инструкцией для его построения, которая почти не подвержена непосредственно влиянию внешних условий.

Главная особенность процесса биологической эволюции заключается в том, что элементарные акты изменения наследственных признаков, мутации, происходят только в генотипе, тогда как изменения внешней среды могут приводить только к ненаследуемым изменениям фенотипа. Связь между фенотипическими и генотипическими изменениями, т. е. в значительной мере обусловливаемое внешней средой последовательное изменение генотипа, реализуется по открытому Дарвином механизму естественного отбора. Собственно, эволюционирует генотип, а проявляется эта эволюция в форме изменений фенотипа.

*) О двух типах физических теорий, требующих и не требующих введения новых постулатов и мировых постоянных, см. [1, 2].

При построении теории биологической эволюции можно, конечно, в принципе оставить в стороне вопрос о механизме реализации инструкции, записанной в генотипе, о способе превращений изменений генотипа в изменения фенотипа, т. е. вопрос о механизме онтогенеза. Современные математические теории биологической эволюции так и делают. Учитывая уровень наших знаний, это, по-видимому, правильный путь. Однако разделение проблем эволюции и онтогенеза сводит решение первой проблемы к математическим построениям и оставляет некоторое чувство неудовлетворенности.

Многим исследователям, увлеченным достижениями молекулярной биологии последних лет, кажется, что развитие биохимии нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов, выяснение механизмов репликации ДНК фагов, биосинтеза и регуляции синтеза белка неуклонно ведут нас к истинному пониманию механизмов онтогенеза и элементарных наследуемых изменений фенотипа. Следует помнить, однако, что до сих пор в этой области биологии все выясненное нами на молекулярном уровне относится только к механизмам наследуемых изменений белковых молекул. Длинный путь от белка до признака еще даже не разведан, а без его прохождения истинное понимание и объяснение эволюционного процесса невозможно. Я полагаю, что решение этой важнейшей задачи современного естествознания требует прежде всего появления новых идей и представлений. К сожалению, они, по-видимому, будут принадлежать пока к той части биологии, которая еще не стала биофизикой.

О попытках термодинамического подхода к проблемам биологической эволюции речь будет в следующей главе.

Между ситуациями в биофизике и в химии имеется еще одно весьма существенное различие. Химик обычно знает логический «путь» от структуры своего объекта (молекулы или молекул) к его химическим свойствам, и затруднения, возникающие на этом пути, носят, как правило, технический характер.

Биофизик в большинстве случаев логического пути от структуры к функциям, от структуры к свойствам не знает. Он твердо убежден лишь в том, что такой путь существует.

§ 1.2. КОМПОНЕНТЫ КЛЕТКИ И ИХ ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ

До сих пор мы говорили о «биологических системах», «живой материи» и т. п., не уточняя, о каких, собственно, объектах идет речь. Деление на живое и неживое в биологии проведено весьма условно. Большинство биологов считает, что живое начинается с клетки. При рассмотрении биофизических проблем нам здесь редко придется выходить за пределы клетки. Поэтому мы примем этот условный критерий и, если специально не оговаривается иное, под терминами «биологическая система», «живая материя» и т. п. будем подразумевать просто клетку.

Прежде всего необходимо подчеркнуть, что в клетке содержатся те же элементы периодической системы, что и в объектах мертвой природы. Никаких химических элементов, присущих только живому, не существует. Если рассмотреть элементарные низкомолекулярные единицы, из которых в конечном счете состоит всякая клетка, — аминокислоты белков, нуклеотиды нуклеиновых кислот, мономеры полисахаридов, коферменты и т. д., то окажется, что здесь тоже нет принципиально новых соединений, нет новых блоков, используемых только в живых системах. Точно такие же или весьма похожие соединения синтезируют и исследуют химики, имеющие дело с явно неживыми объектами.

При более детальном анализе этих низкомолекулярных «кирпичиков» выясняется ряд интересных общих закономерностей. Хотя эти закономерности и не являются специфическими именно для живой материи, тем не менее они могут заставить задуматься о том, не кроется ли в «подборе» свойств этих элементарных блоков нечто весьма существенное для функций живых систем.

Наиболее важные низкомолекулярные компоненты клетки — нуклеотиды, порфирины, флавины, хиноны, некоторые аминокислоты, каротиноиды и т. д. — обладают рядом общих свойств. Они характеризуются сравнительно низкой энергией электронного возбуждения, низким потенциалом ионизации и высоким *) сродством к элек-

*) Низкими и высокими по сравнению с большинством органических соединений.

трону, высокой электронной поляризуемостью. Короче, дело обстоит так, как будто все эти активные химические группы предназначены для участия в процессах, требующих переноса электронов.

При рассмотрении структур элементарных низкомолекулярных блоков, из которых построена клетка, следует обратить внимание на еще одну интересную особенность. Одни и те же химические структуры принимают участие в самых различных процессах. Никотиноамададениндинуклеотид (НАД) и никотиноамададениндинуклеотидфосфат (НАДФ), выполняющие в клетке функцию переносчиков водорода, построены из азотистых оснований, остатка пятичленного сахара (рибозы) и остатка фосфорной кислоты. Аденозинтрифосфорная кислота (АТФ), выполняющая функцию хранителя и источника энергии для основных внутриклеточных процессов, также состоит из азотистого основания, фосфорных остатков и рибозы. Мономеры нуклеиновых кислот, предназначенных для хранения и передачи наследственной информации и обеспечивающих биосинтез белков, построены из таких же блоков. Эта «бедность воображения» природы поражает. Если бы химику понадобилось синтезировать специальное соединение, переносящее водород, он, возможно, сделал бы его иным. Создается впечатление, что природа использовала для самых разнообразных целей те материалы, которые имелись под рукой. С этой точки зрения никакой особой уникальности в конкретной химии низкомолекулярных компонент клетки не существует. Вероятно, в принципе можно было бы построить живое и из других низкомолекулярных блоков. Уникальность химии живого только в том, что она уже реализована и закреплена миллиардами лет химической и биологической эволюции.

Часто приходится слышать утверждение, что дело совсем не в специфическом химическом составе, а в уникальности последовательности расположения мономеров в цепных молекулах нуклеиновых кислот и белков. Известный смысл в этом утверждении есть. Мы знаем, например, что последовательность нуклеотидов в молекулах всех существующих ДНК фиксирована, и порядок чередования этих мономеров определяет построение всех белков клетки и практически все свойства одноклеточного и, вероятно, многоклеточного организма. Следует ли отсюда,

однако, что только эти существующие уникальные последовательности совместимы с жизнью?

Произведем весьма элементарный расчет вероятности спонтанного возникновения хотя бы одной из существующих сейчас на Земле последовательностей мономеров в молекуле ДНК. В результате расчета мы получим верхнюю границу этой вероятности, так как все приближения, которые мы будем делать, могут только завышать искомую величину.

Итак, предположим, что существующие в наши дни последовательности нуклеотидов уникальны не в том смысле, что именно они закрепились в результате химической и биологической эволюции, а уникальны химически, т. е. именно они обеспечивают совместимые с жизнью характеристики биологических систем. Каково число таких последовательностей? Пусть слой биосферы на поверхности Земли имеет толщину 1 км и весь заполнен молекулами ДНК с молекулярным весом 10^6 и плотностью 1. Количество молекул ДНК в биосфере будет тогда порядка 10^{41} . Пусть все молекулы ДНК имеют различные последовательности нуклеотидов, т. е., по нашему предположению, число уникальных, совместимых с жизнью последовательностей равно 10^{41} . Общее число возможных последовательностей в двунитевой молекуле ДНК с молекулярным весом 10^6 (число нуклеотидов в одной нити примерно равно 1500), состоящей из четырех различных типов нуклеотидов, составляет $4^{1500} \sim 10^{900}$. Пусть в течение всего времени существования Земли ($\sim 10^{10}$ лет, или $3 \cdot 10^{17}$ сек) каждую 10^{-8} сек на каждом квадратном нанометре земной поверхности (поверхность земного шара порядка 10^{32} км²) успевает произойти одна «проба» — синтез полинуклеотида с одной из возможных последовательностей. Вероятность того, что при этом хоть один раз образуется молекула ДНК с уникальной последовательностью нуклеотидов из числа 10^{41} существующих, составляет $3 \cdot 10^{17} \cdot 10^8 \cdot 10^{32} \cdot 10^{41} \cdot 10^{-900} \sim 10^{-800}$.

С первого взгляда может показаться, что в расчете заложено требование одномоментной полимеризации 1500 нуклеотидов. Это не так. Точно такой же результат получится, если синтез будет проходить по любому механизму и растянется во времени с постепенным возрастанием молекулярного веса (естественно, время на одну «пробу»

при этом увеличится, а искомая вероятность уменьшится). Необходимо лишь, чтобы между последовательностями нуклеотидов вдоль цепи не было существенной корреляции. На основании того, что сегодня известно о последовательностях нуклеотидов в ДНК и аминокислот в белках, можно утверждать, что последнее требование выполняется.

Результат расчета допускает два взаимоисключающих вывода: 1. Возникновение жизни невозможно. 2. Предположение о химической уникальности существующих последовательностей неверно.

Первый вывод, очевидно, ошибочен.

Можно думать, следовательно, что реализованные в живой природе последовательности мономеров в биополимерах отличаются от других возможных только тем, что они существуют, а по своим химическим и физическим свойствам сами по себе не уникальны.

Таким образом, уникальность строения биополимеров лежит в плане биологическом. Они *стали* единственно возможными лишь в результате длительной биологической эволюции. По-видимому, химическое строение низкомолекулярных компонент клетки и биополимеров должно было удовлетворять лишь сравнительно небольшому числу общих требований, а результат (т. е. живая материя) мало зависел от конкретной химической структуры и физических характеристик, случайно реализованных на ранних этапах эволюции. В принципе могли бы быть и другие строительные блоки и другие последовательности!

§ 1.3. ЗАДАЧИ КНИГИ

Как уже было сказано, книга эта посвящена основным проблемам, стоящим перед биологической физикой. Биологические системы будут рассматриваться как нечто данное, возникшее в результате эволюционного процесса. Речь будет идти не только о более или менее решенных и совсем нерешенных проблемах (последних — подавляющее большинство), встающих перед физиком, изучающим живые системы, но и о проблемах ложных, о вопросах, которые при ближайшем рассмотрении оказываются лишены смысла, хотя им и уделяется много места в литературе.

Следующие три главы будут посвящены термодинамическим вопросам, по поводу которых существует множество противоречивых мнений. Вывод, к которому мы придем на основании анализа экспериментальных данных и теоретических построений, заключается в том, что биологические системы и их компоненты (начиная с важнейших биополимеров) являются механико-статистическими машинами. Механичность их обеспечивает достаточно большие времена релаксации, необходимые для всех существенных внутриклеточных процессов, а статистичность — высокую степень надежности.

В последующих главах будут рассмотрены физические аспекты конформационных и конфигурационных изменений макромолекул, ферментативного катализа, процессов электронного переноса и трансформации энергии, определяющих, с точки зрения автора, большинство процессов, происходящих в живой клетке. Выбор конкретных примеров полностью обусловлен знаниями и личными интересами автора. То обстоятельство, что в книге почти не затронуты процессы биосинтеза белка и молекулярной генетики, безусловно заслуживает осуждения. В качестве единственного оправдания можно заметить, что количество обзоров, популярных статей и монографий, посвященных этой области молекулярной биологии, уже близко к уровню насыщения.

УПОРЯДОЧЕННОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ СТРУКТУР**§ 2.1. ДЕЙСТВИТЕЛЬНО ЛИ ОНИ СТОЛЬ УПОРЯДОЧЕННЫ!**

Почти во всякой книге, посвященной теоретическим вопросам биологии и биофизики, можно встретить утверждение об удивительной упорядоченности биологических структур, проявляющейся на всех уровнях организации — от макромолекулы до организма. Одна из основных идей блестящей книги Шредингера «Что такое жизнь с точки зрения физики?» [1], сыгравшей столь большую роль в становлении современной биофизики в сороковых годах нашего века, заключается в том, что живые системы «питаются отрицательной энтропией». Рассуждения об «антиэнтропийных тенденциях живого» — вплоть до утверждений об «антиэнтропийном характере биологической эволюции» — становятся общим местом не только у биологов и философов, но и у некоторых физиков.

Действительно, когда ученый наблюдает биологические структуры и процессы (клеточное деление, морфогенез), его удивляет их пространственная и временная упорядоченность. Однако удивление есть категория эмоциональная. Для утверждения, что упорядоченность одной системы выше упорядоченности другой, нужно эти упорядоченности измерить. В распоряжении физики пока имеется лишь одна величина, измеряющая степень упорядоченности объекта, — его энтропия. В задачу настоящей главы входит поэтому сравнение энтропий систем живой и мертвой природы, оценка изменений энтропии, связанных с возникновением биологической организации.

Эти сравнения и оценки приведут нас к выводу о том, что согласно физическим критериям никакой исключительно высокой степени упорядоченности биологические системы не обладают, что никаких «антиэнтропийных тенденций» у живой материи нет. Поэтому необходимо будет выяснить, какое объективное содержание заключено в

смутных представлениях об особой упорядоченности живых систем. При этом возникает весьма тонкий вопрос о смысле упорядоченности, рассмотрению которого и будет посвящена вторая часть данной главы.

§ 2.2. ЭНТРОПИЯ И ИНФОРМАЦИЯ

«Я бросил игральный кубик пять раз, и каждый раз выпадало два очка». «Из колоды, содержащей 32 карты, я наугад вытащил одну карту, которая оказалась дамой пик». «Вчера в Москве шел дождь». В каком из этих трех сообщений содержится больше информации?

Проблема оценки абсолютного количества информации, содержащейся в сообщении, была решена в 1949 г. [2]. Как известно, количество информации I определяется формулой *)

$$I = \log_2(P_1/P), \quad (2.1)$$

где P — априорная вероятность некоторого события (вероятность до получения сообщения) и P_1 — его вероятность после получения сообщения. Для простоты будем считать, что все сообщения достоверны и однозначны, т. е. что $P_1 = 1$. Тогда

$$I = -\log_2 P. \quad (2.2)$$

В качестве единицы I принимается количество информации в достоверном сообщении о событии, априорная вероятность которого равна $1/2$. Эта единица количества информации получила название *бит* (от английского binary digits).

В первом примере $P = (1/6)^5 = 1/7776$, а $I = \log_2 7776 = 12,9$ бит. Во втором примере $I = -\log_2 (1/32) = 5$ бит. Для оценки количества информации, содержащегося в третьем сообщении, необходимо знать априорную вероятность дождливой погоды в Москве. По данным многолетней статистики, в районе Москвы в среднем бывает 170 дождливых дней в году. Таким образом, $I = -\log_2 170/365 \approx 1,1$ бит.

За 20 лет до появления работ Шеннона анализом информации занимался венгерский физик Сциллард в свя-

*) Эта формула справедлива для упрощенной ситуации, когда может произойти $1/P$ равновероятных событий.

зи с решением одного термодинамического парадокса, сформулированного Максвеллом в 1871 г. [3]. Смысл парадокса Максвелла заключается в следующем. Имеется изолированная система, состоящая из разделенного перегородкой на две части резервуара с газом, дверцы в перегородке и «демона» — существа или автомата, наделенного способностью видеть отдельные молекулы газа и отличать быстрые молекулы от медленных (рис. 2.1). Демон открывает дверцу только в том случае, если к ней

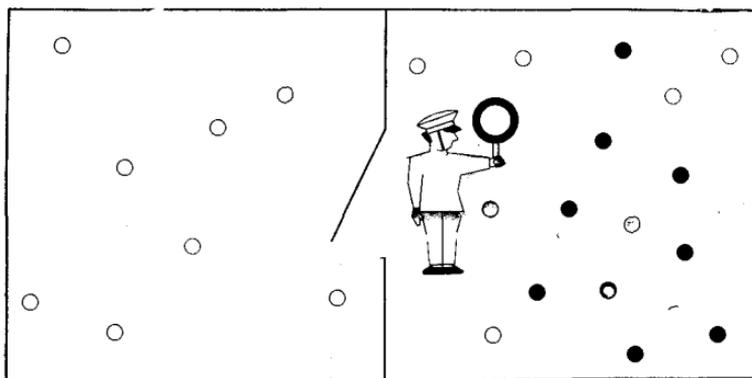


Рис. 2.1. Демон Максвелла.

справа подлетает быстрая молекула. Деятельность демона приведет к тому, что газ в левой части резервуара будет нагреваться, а в правой — остывать. Таким образом, в изолированной системе тепло будет переходить от холодного тела к горячему и энтропия будет понижаться, в противоречии со вторым законом термодинамики.

Над разрешением этого парадокса билось несколько поколений физиков. Однако только Сциллард [4], рассматривая один из упрощенных вариантов парадокса Максвелла (в сосуде с поршнем находится лишь одна молекула газа), обратил особое внимание на необходимость получения информации о молекулах и открыл связь между информацией и термодинамическими характеристиками. В дальнейшем большой вклад в понимание существа этой связи внесли Димерс [5, 6], Ротштейн [7, 8] и Бриллюэн [9].

Решение парадокса Максвелла, по Бриллюэну, состоит в следующем. Демон может видеть молекулы только в том случае, если он (или часть устройства, называемого демоном) не находится в термодинамическом равновесии с остальной системой. В противном случае внутри резервуара демон может видеть лишь излучение абсолютно черного тела, интенсивность и спектр которого зависят только от температуры. Поэтому демон должен быть снабжен фонариком с лампочкой, температура нити накаливания которой должна отличаться от температуры системы (демону придется освещать молекулы!). Тщательный анализ показывает, что операции, связанные с получением информации, обязательно приведут к повышению энтропии системы по крайней мере (в идеальном случае) на ту же величину, на которую ее может понизить демон, используя эту информацию.

Многие авторы, рассматривающие подобные проблемы (особенно применительно к биологии), пользуются термином *негэнтропия*, понимая под ним просто энтропию с обратным знаком. Трудно понять смысл этого. Не все ли равно, говорить ли о повышении негэнтропии или о понижении энтропии? В конце концов, негэнтропия есть не что иное, как H -функция Больцмана. Однако в силу исторических причин перед этой функцией ставят знак минус и называют ее энтропией. Не видно разумных причин, заставляющих снова изменить знак и ввести новое название.

Отмеченное выше соотношение между энтропией и информацией было сформулировано Бриллюэном в виде так называемого *негэнтропийного принципа информации*.

а) Информацию можно превращать в понижение энтропии системы, и обратно (это значит, что информацию можно использовать для понижения энтропии системы, а понижение энтропии — для получения информации). В идеале при обратимом протекании соответствующих процессов такие превращения в принципе могут происходить без потерь.

б) В процессе любого эксперимента, повышающего наше знание системы (дающего о системе информацию), энтропия системы или ее окружения увеличивается. Это увеличение равно (для обратимых процессов) или превышает (для необратимых процессов) понижение энтропии системы за счет полученной информации.

Связь между энтропией и информацией надо понимать следующим образом. Пусть задано макросостояние некоторой системы, т. е. заданы с определенной степенью точности такие параметры, как объем, давление, температура, химический состав, внешние магнитные, электрические и гравитационные поля и т. д. Для каждого макросостояния системы имеется набор микросостояний (в микросостоянии с точностью, допускаемой принципом неопределенности, прецизированы состояния всех частиц, из которых состоит система). Пусть число микросостояний, соответствующих данному макросостоянию, равно W (для любой макросистемы при температуре выше абсолютного нуля это число огромно). W носит название термодинамической вероятности или статистического веса системы. Все W микросостояний, соответствующих данному макросостоянию, имеют одинаковую априорную вероятность. Знать, в каком из микросостояний находится система, — значит знать о системе все. Попробуем рассчитать, какое количество информации необходимо получить о системе, находящейся в данном макросостоянии, чтобы однозначно определить ее микросостояние. Иначе говоря, какого количества информации недостает для полного описания системы в заданном макросостоянии?

Пусть мы провели серию экспериментов и определили микросостояние *). До опыта априорная вероятность того, что система находилась в данном микросостоянии, была равна $1/W$, а после опыта стала равной 1. Полученное количество информации согласно (2.2) составляет

$$I = -\log_2 (1/W) = \log_2 W. \quad (2.3)$$

Вместе с тем по формуле Планка — Больцмана энтропия системы, характеризующейся термодинамической вероятностью W , равна

$$S = k \ln W, \quad (2.4)$$

где k , равное $1,38 \cdot 10^{-16}$ эрг·град⁻¹, или $3,31 \cdot 10^{-24}$ энтропийных единиц ($1 \text{ э. е.} = 1 \text{ кал} \cdot \text{град}^{-1}$), — постоянная Больцмана.

Легко видеть, что формулы (2.3) и (2.4) совпадают с точностью до постоянного размерного множителя. Таким

*) На самом деле сделать этого нельзя.

образом, энтропия системы есть не что иное, как количество информации, недостающее для ее полного описания. Величины I и S существенно идентичны. Ситуация здесь точно та же, что и в случае полной энергии частицы и ее массы, связанных соотношением $E = mc^2$ с постоянным множителем c^2 , или энергии кванта излучения и частоты этого излучения, связанных постоянным множителем h ($E = h\nu$). Чтобы перейти от количества информации, выраженного в битах, к энтропии в энтропийных единицах, необходимо перейти от логарифма при основании 2 к натуральному логарифму и умножить его на k . Таким образом,

$$S \text{ (э. е.)} = 2,3 \cdot 10^{-24} \cdot I \text{ (бит)}. \quad (2.5)$$

У некоторых ученых приведенные выше рассуждения вызывают опасения. Им кажется, что признание эквивалентности энтропии и информации, недостающей для полного описания системы, может привести к признанию зависимости объективной физической характеристики, энтропии, от субъективного фактора — полноты нашего знания системы. Эти опасения основаны на недоразумении. Степень неопределенности микросостояния при заданном макросостоянии системы есть характеристика вполне объективная. Она повышается, например, с ростом температуры в связи с увеличением числа возможных микросостояний. Если исследователь пожелает понизить энтропию системы, поставив эксперименты с целью уменьшения числа возможных микросостояний (повысив, например, точность измерения макропараметра), то согласно принципу Бриллюэна возмущения, вносимые им в систему в процессе измерения, приведут к повышению ее энтропии на величину, по крайней мере не меньшую, чем то понижение энтропии системы, которое возникает в результате получения дополнительной информации о состоянии системы.

Интересно отметить, что для макросистемы любое мыслимое повышение точности измерения макропараметра приведет к ничтожно малому понижению энтропии за счет полученной дополнительной информации. Рассмотрим простой пример. Изменение энтропии одного грамма воды при испарении составляет $\approx 1,8$ э. е. при 40°C . Сделаем макросостояние более определенным, повысив

точность измерения температуры с $\pm 10^\circ \text{C}$ до $\pm 10^{-6}^\circ \text{C}$. С хорошим приближением можно считать, что число возможных микросостояний пропорционально температурному интервалу. Поэтому результатом более точного измерения температуры явится уменьшение числа возможных микросостояний в $20/2 \cdot 10^{-6} = 10^7$ раз. Недостающая до полного описания системы информация понизится на $\log_2 10^7 \approx 23,3 \text{ бит}$, а энтропия — всего на $\sim 5 \cdot 10^{-23} \text{ э. е.}$, т. е. на ничтожную долю от измеряемой величины!

Еще одно замечание. Строго говоря, понятия энтропии и термодинамической вероятности имеют смысл только для равновесных состояний. Поэтому численным значениям энтропии в случае биологических систем следует придавать тот же смысл, который придается им в неравновесной термодинамике (см. гл. 3).

§ 2.3. СКОЛЬКО «СТОИТ» БИОЛОГИЧЕСКАЯ УПОРЯДОЧЕННОСТЬ:

Многие химические процессы, протекающие в клетке, сопровождаются существенными изменениями энтропии (как повышением, так и понижением). Эти изменения ничем не отличаются от соответствующих изменений, происходящих в ходе обычных химических реакций, ничего специфически биологического не характеризуют и нас, естественно, интересовать здесь не будут. В настоящем параграфе будут вычислены изменения энтропии за счет существенно «биологической» упорядоченности, под которой мы будем понимать: 1) упорядоченность построения многоклеточного организма из клеток; 2) упорядоченность построения клеток из биополимеров; 3) упорядоченность построения белков и нуклеиновых кислот (мы ограничимся ДНК) из соответствующих мономеров. Расчеты эти сугубо приближенны, однако они смогут ответить на основной интересующий нас вопрос: существуют ли термодинамические критерии степени биологической упорядоченности?

1. Упорядоченность построения многоклеточного организма из клеток. В теле человека насчитывается порядка 10^{13} клеток. Пусть среди них нет ни одной пары одинаковых клеток и ни одну пару нельзя поменять местами. Это означает, что относительное расположение клеток уникально. Количество информации, необходимое для

построения такой единственной структуры из $(10^{13})!$ возможных $I = \log_2(10^{13}!) \sim 10^{13} \log_2 10^{13} \sim 4 \cdot 10^{14}$ бит. Таким образом, понижение энтропии при построении организма человека за счет упорядоченности этого типа составит $\Delta S = 2 \cdot 10^{-24} \cdot 4 \cdot 10^{14} \sim 10^{-9}$ э. е.

2. Упорядоченность построения клетки из биополимеров. Количество молекул биополимеров (белков, нуклеиновых кислот, фосфолипидов и др.) в клетке составляет в среднем 10^8 . Постулируем снова, что все молекулы разные, а их относительное расположение — единственное. Тогда количество информации, необходимое для построения одной клетки из готовых полимеров, равно

$$I = \log_2(10^8!) \sim 10^8 \log_2 10^8 \approx 2,6 \cdot 10^9 \text{ бит},$$

а для всех клеток в организме человека оно составляет $2,6 \cdot 10^{22}$ бит, что соответствует понижению энтропии на $\Delta S = 6 \cdot 10^{-2}$ э. е. (в эту величину входит ΔS построения организма из клеток, вычисленная выше).

3. Упорядоченность построения белков и ДНК из мономеров. Организм взрослого человека содержит около 7 кг белков и около 150 г ДНК, что соответствует $3 \cdot 10^{25}$ аминокислотных и $3 \cdot 10^{23}$ нуклеотидных остатков. Для создания единственной последовательности из $20^{3 \cdot 10^{25}}$ возможных для белка необходимо примерно $1,3 \cdot 10^{26}$ бит информации. В случае ДНК необходимо примерно $6 \cdot 10^{23}$ бит. В пересчет на энтропию получаем для белков и ДНК приблизительно 300 и 1,4 э. е. соответственно (в эти величины уже вошли вычисленные выше ΔS образования организма из клеток и построения клеток из биополимеров).

Таким образом, упорядоченность биологической организации человеческого тела не превышает 301,5 э. е., причем подавляющий вклад в эту упорядоченность вносит упорядоченное распределение аминокислотных остатков в молекулах белков. Такое понижение энтропии при возникновении сложнейшей биологической организации — человеческого тела — с легкостью компенсируется тривиальнейшими физическими и химическими процессами. Так, например, повышение энтропии на 300 э. е. обеспечивается испарением 170 см^3 воды или окислением 900 г глюкозы.

Вышеприведенные оценки показывают, что возникновение и усложнение биологической организации термоди-

намически происходит практически «бесплатно». Энтропия совокупности 10^{13} различных одноклеточных организмов почти не отличается от энтропии человека, состоящего из 10^{13} клеток.

Все разговоры об «антиэнтропийных тенденциях» биологической эволюции, об исключительной упорядоченности живой материи основаны на явном недоразумении. Согласно термодинамическим критериям любая биологическая система упорядочена не больше, чем кусок горной породы того же веса.

§ 2.4. СМЫСЛ БИОЛОГИЧЕСКОЙ УПОРЯДОЧЕННОСТИ

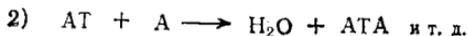
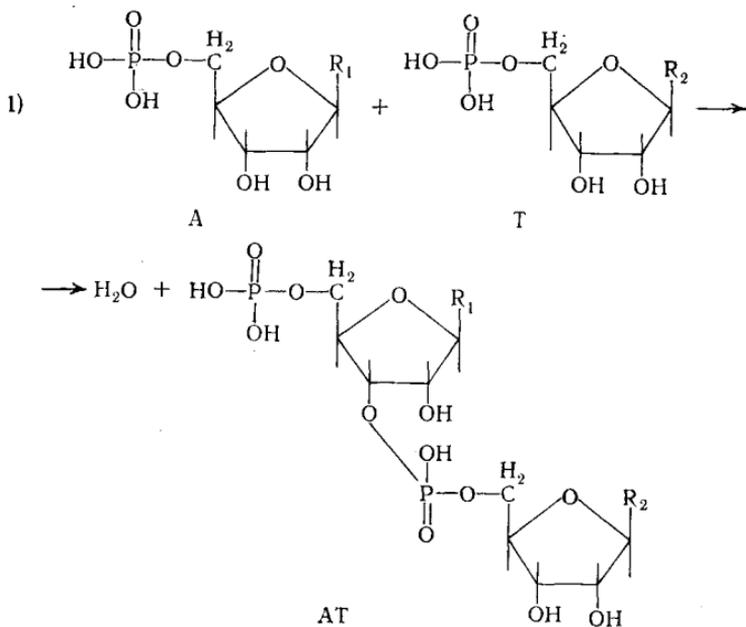
Хотя рассуждения и расчеты, приведенные в предыдущем параграфе, вряд ли можно оспорить, они тем не менее составляют ощущение некоторой неудовлетворенности. Трудно избавиться от сознания, что где-то кроется обман: ведь без всяких расчетов совершенно очевидна поразительная упорядоченность биологических структур и процессов! Если физика утверждает, что эта упорядоченность «ничего не стоит», то хочется сказать: тем хуже для физики! Интуитивно чувствуется, что биологические структуры обладают особой, качественно отличной упорядоченностью, измерять которую в энтропийных единицах, конечно, можно, но многого для понимания специфики живой материи при этом ожидать не стоит.

Как нетрудно видеть, в основе нашего интуитивного ощущения особой упорядоченности биологических структур лежит то обстоятельство, что эта упорядоченность *осмысленна*. Упорядоченность живой материи, информация, в ней содержащаяся, *имеют смысл*. Смысл есть понятие телеологическое — осмысленно то, что имеет цель. Мышечные, нервные и другие клетки сердца расположены упорядоченно *для того*, чтобы сердце могло функционировать именно так, а не иначе. Молекулы различных белков и фосфолипидов в мембранах митохондрий расположены упорядоченно *для того*, чтобы в этих мембранах могли с высокой эффективностью протекать процессы электронного транспорта и аккумуляции энергии. Аминокислотные остатки в молекуле γ -глобулина расположены упорядоченно *для того*, чтобы этот белок обладал специфической иммунологической активностью.

Попробуем разобраться в том, что такое смысл биологической упорядоченности, какими характеристиками должны обладать системы, упорядоченность которых имеет смысл.

Насколько мне известно, впервые четко поставил эти вопросы и попытался на них ответить Кастлер в своей небольшой и чрезвычайно содержательной монографии «Возникновение биологической организации» [10]. Здесь мы используем принципы подхода Кастлера к поставленной проблеме и некоторые из приводимых им примеров.

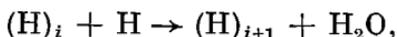
Пусть в некотором обширном водном резервуаре растворено большое количество нуклеотидов — мономеров, из которых состоит дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). В растворе присутствуют четыре сорта нуклеотидов: дезоксиаденозин-5'-фосфат (А), дезоксигуанозин-5'-фосфат (Г), дезоксицитидин-5'-фосфат (Ц) и дезокситимидин-5'-фосфат (Т). Между молекулами нуклеотидов могут идти реакции поликонденсации, приводящие к образованию ди-, три- и других полинуклеотидов (однонитевые полимеры), например:



Здесь R_1 и R_2 — адениновый и тиминный остатки соответственно.

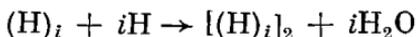
Скорость гидролиза фосфодиэфирных связей, образующихся при поликонденсации, значительно больше скорости их образования, в связи с чем равновесие в этой системе реакций будет сдвинуто в сторону мономеров. Мгновенная концентрация ди-, три- и других полимеров будет невелика и тем меньше, чем длиннее цепочка.

Пусть константы скорости реакций

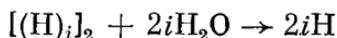


где H — любой из четырех нуклеотидов, не зависят от длины цепочки (т. е. от i) и от сорта нуклеотидов, между которыми образуется связь. Пусть, кроме того, концентрации всех нуклеотидов (A , G , C и T) одинаковы. Тогда небольшое число полимерных нитей разной длины, которые будут всегда существовать в растворе в динамическом равновесии с огромным избытком мономеров, должно иметь совершенно случайные последовательности нуклеотидов, и априорные вероятности всех последовательностей будут одинаковы. Если условия равенства констант скоростей и концентраций не выполняются, то некоторые последовательности будут реализовываться чаще других и в системе будет существовать какое-то распределение априорных вероятностей последовательностей. Однако и в этом случае та или иная реализующаяся последовательность, та или иная возникающая в результате обратимой поликонденсации упорядоченность лишены смысла.

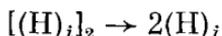
Усложним несколько нашу систему. Пусть кроме процессов поликонденсации и гидролиза фосфодиэфирных связей (т. е. кроме процессов синтеза и распада однонитчатых полимеров) может в принципе идти также матричный синтез путем сорбции на полимерной нити комплементарных нуклеотидов и образования фосфодиэфирных связей между уже сорбированными на полимерной нити нуклеотидами. Последовательность нуклеотидов в новой нити полностью определяется их последовательностью в исходном однонитчатом полимере: против A всегда стоит T , против G — C , что определяется стереохимией соответствующих нуклеотидов. Возникающий в результате такого матричного синтеза



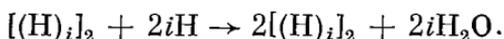
двунитевой полимер неизмеримо стабильнее однонитевого. Он практически не гидролизует. Скорость гидролиза



гораздо меньше скорости диссоциации (расплетания)



и скорости редубликации по матричному механизму



Первая двунитевая молекула образуется в этой системе в результате чисто случайного и весьма маловероятного процесса: на одной из однонитевых полимерных молекул успевает пройти матричный синтез до того, как она подвергнется гидролизу. Последовательность нуклеотидов в этой однонитевой молекуле могла быть любой. Однако после того, как двунитевая структура образовалась, ситуация в системе резко изменилась. Последовательность нуклеотидов, реализованная в таком *долгоживущем* двунитевом полимере, приобрела смысл. Смысл этот заключается просто в том, что данная последовательность в двунитевой стабильной и способной к редубликации молекуле *существует*, а другие возможные последовательности — нет. Благодаря перечисленным выше особенностям двунитевой структуры в системе будет быстро возрастет концентрация однонитевых полимеров именно с такой, теперь уже *особой* последовательностью. Эти однонитевые полинуклеотиды теперь находятся в динамическом равновесии не только с мономерами, но и со стабильными двунитевыми структурами с той же последовательностью нуклеотидов. Концентрация двунитевых полимеров будет возрастет за счет мономеров благодаря редубликации. Случайно образованные однонитевые полимеры с «хорошей», «осмысленной» последовательностью имеют большие шансы «выжить», образовав стабильные структуры с элементарными полимерными молекулами, а однонитевые полимеры с «плохой», «бессмысленной» последовательностью почти наверное подвергнутся гидролизу. Случайные небольшие отклонения от «правильной» последовательности, не уменьшающие заметно стабильности двунитевых структур, будут также редублицироваться и дадут начало

самостоятельным системам, конкурирующим с исходной за наличные запасы мономерных нуклеотидов.

Таким образом, благодаря *запоминанию случайного выбора* в приведенном гипотетическом примере возникла упорядоченность, имеющая смысл, возникла система, способная создавать осмысленную информацию. Теперь можно спросить: *для чего* полимеры в этой системе имеют такую последовательность нуклеотидов? — и получить ответ: для того, чтобы они могли существовать, так как при этой последовательности у них максимальные шансы «выжить». По своим физическим характеристикам молекулы полимеров с такой последовательностью могут ничем не отличаться от других. Она имеет смысл просто потому, что случайно возникла система самовоспроизводящихся полимеров с этой последовательностью. Таким образом, смысл некоторой упорядоченности есть категория биологическая, т. е. определяемая всей историей возникновения данной упорядоченности, ее эволюцией. Не следует думать, что в понятии «смысл» есть нечто мистическое, не подчиняющееся физическим законам. В принципе все свойства объектов, имеющих смысл, можно логически вывести из их физических характеристик при условии знания их истории, эволюции.

Как уже было сказано в гл. 1, автор считает, что проблема эволюции не относится пока к области биофизики.

Приведенный выше пример стабильной самовоспроизводящейся системы нуклеиновых кислот ни в коем случае не претендует на то, чтобы его связывали с происхождением жизни на Земле. Это просто попытка продемонстрировать наиболее существенные характеристики процесса создания осмысленной упорядоченности на примере биополимеров с использованием некоторых хорошо известных их свойств.

Кастлер приводит и другой пример возникновения осмысленной упорядоченности. Пусть имеется сейф с замком; код для его открывания состоит из трех цифр. Есть набор цифр от 0 до 9 и устройство случайного выбора, позволяющее отобрать из набора тройку цифр. Выберем с помощью этого устройства три цифры и введем их в виде кода в замок сейфа. До такой операции любые мыслимые последовательности из трех цифр ничем друг от друга не отличались: все они не имели смысла. Введение случайно

отобранной тройки цифр в замок сейфа сделало эту последовательность осмысленной. Смысл ее заключается просто в том, что данная последовательность позволяет открыть сейф, а другие — нет.

Легко видеть, что этот пример в принципе ничем не отличается от примера с нуклеиновыми кислотами. В обоих случаях осмысленная упорядоченность, новая осмысленная информация, создается способом запоминания случайного выбора. Речь идет именно о *создании* новой информации, а не об извлечении ее из шумов. До того, как полимер со случайной последовательностью нуклеотидов образовал стабильную двунитевую структуру, или до того, как случайная последовательность трех цифр была введена в замок сейфа, информации о том, что именно эти последовательности «лучше» других (одна — тем, что приобрела способность к длительному существованию и самовоспроизведению, другая — тем, что приобрела способность открывать сейф), просто не существовало. В упорядоченность был вложен смысл, информация была создана, сотворена. В результате этой процедуры непредсказуемое превратилось в неизбежное. По мысли композитора Пьера Буле, превращение непредсказуемого в неизбежное есть творчество [10]. Возможно, в основе любого творчества лежит, в конце концов, принцип запоминания случайного выбора.

Способность создавать новую информацию, придавать смысл упорядоченности, есть, по-видимому, обязательное свойство живой материи. Всякое определение условно и ограничено, но я не могу удержаться от следующей формулировки. Живыми называются самовоспроизводящиеся системы, способные к созданию информации, прямо или косвенно влияющей на их самовоспроизведение.

§ 2.5. НЕОБХОДИМОСТЬ МЕХАНИЧЕСКИХ ДЕТАЛЕЙ

Системы, способные к созданию осмысленной упорядоченности, примеры которых были приведены в предыдущем параграфе, обладают одним общим свойством. Они содержат осмысленные компоненты, конструкции, времена жизни которых превышают время одного цикла работы системы. В случае системы нуклеиновых кислот это означает, что стабильная компонента, двунитевой поли-

мер, не расплетется и не гидролизуеться до того, как произойдет редубликация, а во втором примере, — что замок сейфа не разрушится после введения кода до того, как будет испытана хотя бы одна тройка цифр.

По-видимому, это требование присутствия долгоживущих, медленно релаксирующих образований (конструкций) обязательно для живой материи. Нельзя построить биологическую систему, используя только газовую фазу!

На протяжении всей книги, рассматривая физические аспекты самых различных биологических процессов, мы все время будем сталкиваться с тем, что центральную роль в этих процессах играют медленно релаксирующие механические компоненты — конструкции.

§ 2.6. ПРОБЛЕМЫ

Подытоживая содержание этой главы, можно утверждать, что проблемы, возникающие при рассмотрении упорядоченности биологических структур, ее создания и эволюции, не лежат в области физики *). Не существует термодинамических аспектов биологической эволюции, так же как не существует особой «биологической термодинамики».

В последние годы при рассмотрении вопросов теоретической биологии стало модным пользоваться аппаратом теории информации. До настоящего времени, однако, большинство работ с применением теории информации в биологии носит тривиальный характер — хорошо известные факты и положения переводят на другой язык. Для биологических систем, систем с осмысленной упорядоченностью, определяющим становится не количество, а качество, ценность информации. Создание формального аппарата теории информации, учитывающего ее качество, явилось бы важным шагом в развитии теоретической биологии. Я не вполне уверен в осуществимости этого шага.

*) Если не считать, конечно, что к области физики относятся все явления в природе.

НЕРАВНОВЕСНАЯ ТЕРМОДИНАМИКА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИКА

§ 3.1. ОТКРЫТЫЕ СИСТЕМЫ

Биологические объекты представляют собой термодинамически открытые системы, способные обмениваться с окружающей средой энергией и веществом. Это тривиальное утверждение повторяется за последние три десятилетия настолько часто, что восприимчивый читатель или слушатель начинает вкладывать в него более глубокий (хотя и не очень четкий) смысл, чем тот, который в нем действительно содержится.

Обычная термодинамика строго применима лишь к состоящим из огромного числа частиц изолированным системам в состоянии термодинамического равновесия. Только для таких систем имеют строгий физический смысл важнейшие термодинамические величины — температура и энтропия. Собственно говоря, это было ясно еще Больцману, а вполне строго показано Хинчиным в прекрасной и, к сожалению, малоизвестной монографии «Математические основания статистической механики» [1]. Поэтому вполне справедлива часто высказываемая мысль о том, что обычная термодинамика является по существу термостатикой.

Поскольку полностью изолированных систем в природе не существует, необходимо четко понимать, какой смысл вкладывается в термодинамические величины, когда они используются для описания реальных систем. Понятиями равновесной термодинамики можно пользоваться в тех случаях, когда речь идет о временах, достаточно больших, чтобы взаимодействия между компонентами системы успели приблизить ее к локальному статистическому равновесию, и достаточно малых, чтобы можно было пренебречь «медленными» взаимодействиями системы с окружающей средой (подробнее об этом см. в [2]) и медленными изменениями степени кинетической неравновесности (см. гл. 4).

В любых клетках и многоклеточных организмах идет множество процессов, удовлетворяющих сформулированному выше требованию. Это главным образом химические превращения при условии, что нас интересуют только характеристики начальных и конечных состояний в процессе, более или менее разумно выделенном из множества связанных и одновременно протекающих реакций. В этом смысле применение равновесной термодинамики к живым системам столь же законно (или столь же незаконно), как и к мертвым.

Однако при исследовании живой и мертвой природы встречаются ситуации, когда взаимодействием системы с внешним миром нельзя сколько-нибудь обоснованно пренебречь. Для описания явлений, происходящих в таких системах, существует наука, получившая название термодинамики необратимых процессов или неравновесной термодинамики. Строго говоря, теория сделана только для «не слишком неравновесных» систем. Эта теория оказывается весьма полезной при рассмотрении ряда явлений в живой и мертвой природе, причем никакой спецификой соответствующие явления в биологических системах не отличаются.

Первые попытки создания неравновесной термодинамики относятся к середине прошлого века и связаны с изучением ряда термоэлектрических явлений. Однако основные уравнения теории были строго получены только в 1931 г. Онзагером [3, 4]. Дальнейшее развитие неравновесной термодинамики связано с именами Казимира, Мейкснера и Пригожина.

По-видимому, первые представления о принципиальной неравновесности живой материи были изложены в работах Бауэра [5] и Гурвича [6] в двадцатых и тридцатых годах нашего века. «Устойчиво неравновесные системы» Бауэра и «молекулярные констелляции» Гурвича, в сущности, весьма близки к понятию стационарных состояний, поддерживаемых в удалении от равновесия за счет постоянных внешних термодинамических сил (онзагеровская неравновесная термодинамика), и даже к понятию диссипативных структур, введенному в работах Пригожина.

В этой главе излагаются основы неравновесной термодинамики в области выполнимости линейных феномено-

логических соотношений (см., например, [7—9]). В конце главы будут изложены некоторые результаты, полученные в последних работах Пригожина с сотрудниками по диссипативным структурам вдали от равновесия. В связи с ними необходимо будет коснуться колебательных режимов в химических и биологических процессах. Анализ соответствующих работ позволит высказать сомнения в продуктивности и обоснованности общего термодинамического подхода к поведению систем вдали от равновесия.

§ 3.2. ФЕНОМЕНОЛОГИЧЕСКИЕ СООТНОШЕНИЯ

При рассмотрении любого необратимого процесса в макроскопической системе можно выделить два типа величин, характеризующих этот процесс. Так, например, в явлении теплопроводности такими величинами служат поток тепла Q и вызывающий его градиент температуры $\text{grad } T$. В случае электропроводности поток количества электричества (сила тока I) пропорционален градиенту потенциала $\text{grad } V$ (закон Ома). Закон Фика связывает поток диффундирующего вещества с градиентом концентрации. В случае химической реакции поток превращающегося вещества (т. е. скорость реакции v) обусловлен химическим сродством $A = \sum_i \nu_i \mu_i$, где ν_i и μ_i — стехиометрический коэффициент и химический потенциал i -й компоненты соответственно, а произведения $\nu_i \mu_i$ для исходных и конечных продуктов реакции входят в сумму с разными знаками.

Градиенты концентрации, температуры, потенциала, химическое сродство и т. д., вызывающие в системе перенос вещества, теплоты, заряда, химическое превращение и т. д., получили общее название *термодинамических сил* или просто *сил* и обозначаются, как правило, символами X или Y . Величины второго типа называют *термодинамическими потоками* или просто *потоками* и обозначают обычно символом J . Мы видели, что законы перечисленных выше необратимых процессов сводятся к пропорциональности между потоками и соответствующими силами:

$$J_i = L_{ii} X_i, \quad (3.1)$$

где L_{ii} — феноменологические коэффициенты (теплопроводности, электропроводности, диффузии и т. д.).

В общем случае любая сила способна вызывать любой поток. Так, $\text{grad } T$ может приводить к возникновению не только потока тепла, но и потока вещества (термодиффузия). Поэтому линейные феноменологические соотношения следует записать в форме

$$J_i = \sum_{k=1}^n L_{ik} X_k. \quad (3.2)$$

Теперь перейдем к теореме Онзагера о соотношениях взаимности, которые лежат в основе неравновесной термодинамики. Для того чтобы четко сформулировать содержание теоремы (мы ограничимся рассмотрением физического смысла теоремы и допущений, делаемых при ее доказательстве), необходимо принять во внимание существование двух различных типов термодинамических сил, обозначаемых в дальнейшем X и Y . В целях упрощения мы исключим из рассмотрения системы, находящиеся во внешнем магнитном поле.

Пусть дана изолированная система, состояние которой (и, следовательно, имеющиеся термодинамические силы) определяется параметрами следующих двух типов: A_1, A_2, \dots, A_n , являющихся четными функциями скоростей, входящих в систему частиц (например, локальные энергии, концентрации), и B_1, B_2, \dots, B_m , являющихся соответствующими нечетными функциями (например, локальные градиенты скоростей). Пусть отклонения этих параметров от равновесных значений A_i^0 и B_i^0 равны

$$\alpha_i = A_i - A_i^0, \quad \beta_i = B_i - B_i^0. \quad (3.3)$$

Отклонение ΔS энтропии от равновесного (максимального значения *) можно в первом приближении записать в форме квадратичной функции:

$$\Delta S = -1/2 \sum_{i, k=1}^n g_{ik} \alpha_k \alpha_i - 1/2 \sum_{i, k=1}^m h_{ik} \beta_k \beta_i, \quad (3.4)$$

*) Речь идет о величине ΔS на единицу объема системы, т. е. в общем случае о локальных значениях ΔS .

где

$$g_{ik} = \frac{\partial^2 \Delta S}{\partial \alpha_i \partial \alpha_k}, \quad h_{ik} = \frac{\partial^2 \Delta S}{\partial \beta_i \partial \beta_k}.$$

Термодинамические потоки должны, очевидно, определяться скоростью изменения параметров A и B , а термодинамические силы — отклонениями этих параметров от равновесных значений. Введем термодинамические потоки в форме

$$\left. \begin{aligned} J &= \frac{d\alpha_i}{dt}, \quad i = 1, 2, \dots, n, \\ I &= \frac{d\beta_i}{dt}, \quad i = 1, 2, \dots, m, \end{aligned} \right\} \quad (3.5)$$

а термодинамические силы — в виде

$$\left. \begin{aligned} X_i &\equiv \frac{\partial \Delta S}{\partial \alpha_i} = - \sum_{k=1}^n g_{ik} \alpha_k, \quad i = 1, 2, \dots, n, \\ Y_i &\equiv \frac{\partial \Delta S}{\partial \beta_i} = - \sum_{k=1}^m h_{ik} \beta_k, \quad i = 1, 2, \dots, m. \end{aligned} \right\} \quad (3.6)$$

Потоки и силы связаны линейными феноменологическими соотношениями типа (3.2), феноменологические коэффициенты L_{ik} удовлетворяют соотношениям взаимности Онзагера:

$$\left. \begin{aligned} L_{ik}^{(\alpha\alpha)} &= L_{ki}^{(\alpha\alpha)} \quad (i, k = 1, 2, \dots, n), \\ L_{ik}^{(\alpha\beta)} &= -L_{ki}^{(\beta\alpha)} \quad (i = 1, 2, \dots, n; k = 1, 2, \dots, m), \\ L_{ik}^{(\beta\beta)} &= L_{ki}^{(\beta\beta)} \quad (i, k = 1, 2, \dots, m). \end{aligned} \right\} \quad (3.7)$$

При доказательстве теоремы Онзагера (т. е. при выводе соотношений (3.7)) используется постулат о микроскопической обратимости, т. е. об инвариантности уравнения движения каждой частицы относительно изменения знака времени. Кроме того, при доказательстве приходится постулировать линейную связь между скоростью затухания флуктуации α_i экстенсивного параметра A_i и величиной флуктуации

$$\frac{d\alpha_i}{dt} = M\alpha_i. \quad (3.8)$$

Этот постулат означает, что флуктуации достаточно малы. Таким образом, соотношения взаимности (3.7) справедливы лишь для систем, сравнительно близких к равновесию.

Большое значение в неравновесной термодинамике имеет величина, обозначаемая σ и называемая *производством энтропии*. Эта величина имеет смысл скорости изменения энтропии в единице объема системы в результате протекания необратимых процессов. Следует специально подчеркнуть, что речь идет не обо всем изменении энтропии системы, а лишь о той части этого изменения, которая обусловлена происходящими в системе необратимыми процессами. Для открытых систем скорость полного изменения энтропии dS/dt делится на две части:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{d_e S}{dt} + \frac{d_i S}{dt}, \quad (3.9)$$

где $d_e S/dt$ — поток энтропии, обусловленный обменом веществом и энергией *между системой и окружающей средой*, а $\frac{d_i S}{dt} \equiv P = \int \sigma dV$ — полное производство энтропии за счет необратимых процессов *внутри* системы.

Как уже было сказано, производство энтропии σ есть возникновение энтропии в системе на единицу объема в единицу времени, т. е. интенсивность источника энтропии в системе. Если перейти к локальным формулировкам не только для $d_i S/dt$, но и для остальных членов (3.9), получим следующие выражения для второго закона термодинамики в случае открытых систем:

$$\frac{d\rho s}{dt} = -\operatorname{div} \mathbf{J}_{s, \text{полн}} + \sigma, \quad (3.10)$$

$$\sigma \geq 0. \quad (3.11)$$

Здесь s — энтропия на единицу массы, ρ — плотность (ρs — энтропия на единицу объема), $\mathbf{J}_{s, \text{полн}}$ — полный поток энтропии через единицу поверхности в единицу времени. Соотношение (3.10) есть уравнение баланса энтропии в открытой системе при наличии источника энтропии с интенсивностью σ , удовлетворяющей (3.11). Для изолированных систем $\mathbf{J}_s = 0$ и (3.10) и (3.11) превращаются в обычную формулировку второго закона термодинамики.

При выводе (3.10) и (3.11) фактически постулируется, что закон $d_i S \geq 0$ выполняется и для бесконечно малых частей системы. Это выполняется тем строже, чем менее неравновесна система. Чем дальше система от равновесия, тем больше вероятность локальных флуктуаций энтропии, противоречащих (3.11).

Из (3.4) получаем

$$\sigma = \frac{d\Delta S}{dt} = - \sum_{i, k=1}^n g_{ik} \alpha_k \frac{da_i}{dt} - \sum_{i, k=1}^m h_{ik} \beta_k \frac{d\beta_i}{dt}. \quad (3.12)$$

Подставив в (3.9) формулы (3.5) и (3.6), находим

$$\sigma = \sum_{i=1}^n J_i X_i + \sum_{i=1}^m I_i Y_i. \quad (3.13)$$

Производство энтропии оказывается билинейной функцией сопряженных потоков и сил. Уравнение (3.13) позволяет найти правильные выражения для необратимых термодинамических потоков и сил.

§ 3.3. СТАЦИОНАРНЫЕ СОСТОЯНИЯ

Рассмотрим открытую систему, характеризующуюся n независимыми силами *), которые по (3.2) приводят к возникновению n потоков

$$J_i = \sum_{k=1}^n L_{ik} X_k \quad (i = 1, 2, \dots, n).$$

Производство энтропии σ равно тогда

$$\sigma = \sum_{i=1}^n J_i X_i. \quad (3.13')$$

Это означает, что единица объема системы рассеивает в единицу времени энергию, равную $T\sigma$. Подставив (3.2) в (3.13') и учитывая (3.11), получим

$$\sigma = \sum_{i, k=1}^n L_{ik} X_i X_k \geq 0. \quad (3.14)$$

*) Для простоты мы не делим силы на два типа, как выше, а обозначаем их одним символом X .

Пусть благодаря взаимодействию с окружающей средой j сил из n поддерживаются постоянными (например, подводя тепло к границам системы, можно поддерживать постоянным температурный градиент). Найдём состояние, при котором σ минимально. Для этого надо найти экстремум σ по остальным $n - j$ силам, которые не поддерживаются постоянными; имеем

$$\frac{\partial \sigma}{\partial X_i} = 0 \quad (i = j + 1, j + 2, \dots, n); \quad (3.15)$$

учитывая (3.14), получим

$$\sum_{k=1}^n (L_{ik} + L_{ki}) X_k = 0 \quad (i = j + 1, j + 2, \dots, n). \quad (3.16)$$

Согласно соотношению взаимности Онзагера

$$L_{ik} = L_{ki}, \quad (3.17)$$

и (3.16) принимает вид

$$2 \sum_{k=1}^n L_{ik} X_k = 0 \quad (i = j + 1, j + 2, \dots, n). \quad (3.18)$$

Здесь сумма есть не что иное, как J_i (см. (3.2)). Поэтому в искомом состоянии с минимальным производством энтропии

$$J_i = 0 \quad (i = j + 1, j + 2, \dots, n). \quad (3.19)$$

Таким образом, если система характеризуется n независимыми силами X_1, X_2, \dots, X_n , из которых j сил поддерживаются постоянными ($X_1, X_2, \dots, X_j = \text{const}$), то в состоянии с минимальным производством энтропии σ потоки с $i = j + 1, \dots, n$ исчезают.

Эта теорема была доказана Пригожиным и получила его имя. В состоянии с минимальным производством энтропии все силы постоянны: X_1, X_2, \dots, X_j поддерживаются постоянными (но произвольными), а X_{j+1}, \dots, X_n являются корнями $n - j$ линейных уравнений (3.18) с $n - j$ неизвестными. Такое состояние носит название стационарного состояния j -го порядка. Если j равно нулю, то в состоянии с минимальным производством энтропии исчезают все потоки и все силы, а σ соответственно становится равным нулю. Таким образом, стационарное

состояние нулевого порядка есть состояние термодинамического равновесия.

Посмотрим теперь, как будет вести себя система, выведенная из стационарного состояния j -го порядка с минимальным производством энтропии. Мы будем снабжать все символы сил и потоков в стационарном состоянии правым верхним индексом нуль. Пусть m — одно из чисел $j + 1, j + 2, \dots, n$, т. е. сила X_m не поддерживается постоянной извне. Прибавим к ней δX_m , а остальные силы оставим без изменения:

$$X_m = X_m^0 + \delta X_m \quad (j + 1 \leq m \leq n), \quad (3.20)$$

$$X_j = X_j^0 \quad (j = 1, 2, \dots, m - 1, m + 1, \dots, n). \quad (3.21)$$

Очевидно, новое значение потока J_m станет равным

$$J_m = J_m^0 + L_{mm}\delta X_m,$$

а поскольку по теореме Пригожина $J_m^0 = 0$, то

$$J_m = L_{mm}\delta X_m. \quad (3.22)$$

Вычислим σ после наложения возмущения δX_m :

$$\begin{aligned} \sigma &= \sum_{i=1}^n J_i X_i = \\ &= \sum_{i,j=1}^n L_{ij} X_i^0 X_j^0 + \sum_{i=1}^n (L_{im} + L_{mi}) X_i \delta X_m + L_{mm} (\delta X_m)^2. \end{aligned} \quad (3.23)$$

Здесь первая сумма равна σ^0 , а вторая тождественно равна нулю (надо вынести δX_m за знак суммы и воспользоваться соотношением взаимности; эта сумма оказывается равной $2\delta X_m J_m^0$, а по теореме Пригожина $J_m^0 = 0$). Поэтому

$$\sigma = \sigma^0 + L_{mm} (\delta X_m)^2. \quad (3.24)$$

Поскольку σ^0 — минимальное производство энтропии, имеем

$$L_{mm} (\delta X_m)^2 > 0 \quad (3.25)$$

и (см. (3.22))

$$J_m \delta X_m > 0. \quad (3.26)$$

Последнее неравенство формулирует принцип Ле Шателье для неравновесных стационарных состояний. Действительно, возмущение δX_m приводит к возникновению потока J_m того же знака, т. е. уменьшающего возмущение. Так, например, повышение $\text{grad}T$ должно привести к появлению теплового потока по градиенту температуры, уменьшающего этот градиент. Итак, система, выведенная из стационарного состояния с минимальным производством энтропии, самопроизвольно возвращается в это состояние.

Как ясно из изложенного, в основе существующей неравновесной термодинамики лежат линейные феноменологические уравнения и соотношения взаимности Онзагера. Отсюда следует, что полученные выводы справедливы лишь для систем, находящихся не очень далеко от равновесия. Только для таких систем более или менее обосновано использование обычных термодинамических параметров и функций, только для них вместо устойчивого равновесного состояния обычной термодинамики появляются устойчивые стационарные состояния, а вместо стремящихся к постоянным и экстремальным значениям термодинамических потенциалов и энтропии появляется новая величина — производство энтропии, — стремящаяся при данных условиях к фиксированному минимальному значению. В области своей применимости неравновесная термодинамика очень полезна. Методы подхода и представления неравновесной термодинамики особенно пригодны при изучении самых разных явлений переноса, в том числе и в биологических системах.

Любые разговоры о специфическом неподчинении биологических систем законам равновесной и неравновесной термодинамики, весьма распространившиеся за последние годы, основаны на недоразумении. В тех случаях, когда речь идет о процессах перехода между состояниями, которые на интересующих нас промежутках времени можно с хорошим приближением считать равновесными, или о практически равновесных частях систем, живое прекрасно подчиняется законам равновесной термодинамики. В тех случаях, когда отклонение от состояния равновесия сравнительно невелико (онзагеровская область), живая материя и процессы, в ней происходящие, подчиняются законам неравновесной термодинамики. В тех же случаях,

когда речь идет о процессах, связанных со значительным удалением от равновесия, термодинамические критерии становятся лишенными смысла в равной степени для мертвой и живой природы.

§ 3.4. ДИССИПАТИВНЫЕ СТРУКТУРЫ

В последние годы появились работы Пригожина с сотрудниками, посвященные попыткам построения термодинамики систем, далеких от равновесия, для которых не выполняются феноменологические соотношения (3.2) и условия (3.7). Авторы получили некоторые общие результаты и использовали их для описания ряда биохимических процессов. В данном параграфе излагаются полученные результаты, обсуждается их значение и оцениваются перспективы развития этого направления. В нашем изложении за основу взяты статьи Глансдорфа и Пригожина [10] и Пригожина [11].

В макроскопической физике существуют два типа структур: равновесные и диссипативные. Примером равновесной структуры, которая устойчива без обмена веществом и энергией с окружающей средой, может служить кристалл. Упорядоченность равновесной структуры зависит от температуры: чем ниже температура, тем больше вклад внутренней энергии U в гельмгольцевскую свободную энергию:

$$F = U - TS. \quad (3.27)$$

Благодаря этому становятся возможными все более упорядоченные равновесные структуры, отвечающие малым значениям энтропии.

Равновесное состояние данной системы при данных значениях параметров однозначно: оно не зависит от истории системы. Состояние системы определяется рядом параметров, приращения которых носят характер полных дифференциалов; существуют потенциалы, принимающие в равновесии экстремальные значения. Иными словами, равновесное состояние устойчиво. При не слишком большом отклонении от этого состояния система самопроизвольно в него возвращается.

Диссипативные структуры могут существовать только за счет обмена энергией и веществом с окружающей сре-

дой. Рассеяние поступающей извне энергии обеспечивает поддержание упорядоченной структуры с энтропией, меньшей равновесной. В предыдущем параграфе было показано, что в области выполнения линейных феноменологических соотношений между потоками и силами и онзагеровских соотношений взаимности (т. е. не слишком далеко от равновесия) диссипативные структуры представляют собой стационарные состояния открытых систем. Вместо энтропии и свободной энергии равновесных систем появляется производство энтропии σ , приращение которого имеет характер полного дифференциала. При незначительном отклонении от стационарного состояния в результате флуктуации избыточное производство энтропии $\delta\sigma$ всегда положительно, благодаря чему стационарные состояния устойчивы (принцип Ле Шателье; см. (3.26)).

При большом удалении системы от равновесия, при возрастании «напряжения» в системе, могут возникнуть диссипативные структуры другого типа, связанные с появлением механического движения. В качестве примера рассмотрим проблему Бенара в гидродинамике. Если равномерно подогревать снизу слой жидкости, то установится градиент температуры и, следовательно, градиент плотности, направленный против силы тяжести. Это неравновесное стационарное состояние (диссипативная структура первого типа) устойчиво, пока $\text{grad}T$ не превышает определенной величины, а затем система скачком переходит в состояние с конвекционным макроскопическим движением жидкости. При значениях $\text{grad}T$, бóльших критического для диссипативной структуры первого типа, величина $\delta \int \delta\sigma$ становится отрицательной, и в результате сколь угодно малой флуктуации происходит скачкообразный переход. В диссипативных структурах второго типа часть понижения энтропии системы по сравнению с равновесным значением обусловлена кинетической энергией движущейся жидкости:

$$\Delta S = - E_{\text{кин}}/T. \quad (3.28)$$

Таким образом, появление диссипативных структур второго типа связано с возникновением неустойчивости стационарного состояния, т. е. находится вне области справедливости теоремы о минимуме производства энтропии. Вместе с тем возникающая структура может характе-

ризоваться минимальным значением некоторой величины, являющейся полным дифференциалом и имеющей смысл обобщенного произведения энтропии. Это оказывается справедливым, например, для проблемы Бенара.

Приращение произведения энтропии можно разделить на две части:

$$d\sigma = d_x\sigma + d_y\sigma, \quad (3.29)$$

где

$$d_x\sigma = \sum_i J_i dX_i, \quad d_y\sigma = \sum_i X_i dJ_i \quad (3.30)$$

(см. (3.13), (3.13')). Полное производство энтропии равно

$$P = \int \sigma dV, \quad (3.31)$$

и по аналогии с (3.29)

$$dP = d_xP + d_yP. \quad (3.32)$$

Глансдорф и Пригожин показали, что часть производства энтропии стремится к минимуму даже в отсутствие линейной связи*) между потоками J_i и силами X_i , т. е.

$$d_xP = \int dV \sum_i J_i dX_i \leq 0. \quad (3.33)$$

При наличии макроскопических механических процессов, т. е. для диссипативных структур второго типа, вводится величина

$$d\Phi = \int dV \sum_i J'_i dX'_i \leq 0, \quad (3.34)$$

где в потоках J'_i и силах X'_i учтены также механические процессы. В случае проблемы Бенара показано, что $d\Phi$ является полным дифференциалом, (3.34) можно интегрировать и система характеризуется экстремальным значением некоторого потенциала.

Однако для диссипативных структур второго типа выделение параметра, имеющего характер полного дифференциала, не всегда возможно. Диссипативные структуры второго типа могут существовать и при химических реакциях, а именно при колебательных химических процес-

*) В линейной области $d_xP = d_yP = 1/2 dP$ и возникает обычное стационарное состояние с $dP \leq 0$.

сах, когда в макрообъеме открытой системы концентрации некоторых реагентов и скорости некоторых реакций периодически изменяются. Было показано, что для химических открытых систем вдали от равновесия в общем случае не существует величины типа (3.34), являющейся полным дифференциалом. Это означает, что вдали от равновесия в общем случае нет величины типа производства энтропии (в онзагеровской области неравновесной термодинамики) или типа свободной энергии (для закрытых систем), имеющей характер потенциала и определяющей состояние системы. По существу, отсюда следует, что для таких систем термодинамический подход бессмыслен. Действительно, соответствующие задачи решаются методами гидродинамики и химической кинетики, а введение не очень четко определенных «локальных потенциалов» и попытки распространить термодинамический подход за пределы области выполнимости соотношений Онзагера не дали ощутимых нетривиальных результатов в применении к конкретным системам.

Недавно Кайзер и Фокс [12] рассмотрели условие Глансдорфа и Пригожина устойчивости стационарных состояний для открытой системы химических реакций. Подробный анализ, основанный на строгом критерии устойчивости функций по Ляпунову, показал, что критерий Глансдорфа — Пригожина (т. е. требование минимального значения второй производной энтропии) теряет для этих систем смысл вдали от равновесия. Авторы приходят к заключению, что этот критерий «работает» только вблизи от полного термодинамического равновесия. Рассмотрение устойчивости состояний вдали от равновесия требует не только термодинамического, но и кинетического подхода.

Возвращаясь к диссипативным структурам первого и второго типов, уместно задать вопрос об их значении в биологии. Оставляя пока в стороне вопрос о роли колебательных химических процессов в биологической регуляции, я не могу не высказать сомнения в перспективности всего этого направления неравновесной термодинамики (естественно, речь идет только о биологии). Конечно, можно сказать, что структура любой живой системы (от клетки до многоклеточного организма) поддерживается в конечном счете вследствие притока извне вещества и

энергии. В таком смысле живые системы представляют собой диссипативные структуры. Ничего большего из этого утверждения извлечь нельзя.

Макроскопическая осмысленная упорядоченность биологических структур возникает не в результате того, что некоторые параметры системы превышают критические значения. Эти структуры строятся по программе, как сложные архитектурные сооружения, с использованием созданной за многие миллиарды лет химической и биологической эволюции осмысленной информации. Естественно, живые структуры неравновесны на всех уровнях организации, и во время жизни их неравновесность поддерживается за счет диссипации поступающей извне энергии и вещества. Точно так же можно сказать, что станок поддерживается в неравновесном состоянии регулярной смазкой, заменой изношенных деталей и т. д. Однако в основном биологические системы, возникающие по заданной программе, стабилизированы *кинетически*: переход в равновесное состояние, разрушение уже существующей конструкции требует преодоления большого потенциального барьера.

§ 3.5. КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ХИМИИ И БИОХИМИИ

Есть древняя легенда. У ворот города стражники останавливали путников и спрашивали: «Зачем вы сюда пришли?» Отвечающих правду закалывали, а лгущих вешали. Нашелся умный человек, который ответил: «Я пришел сюда, чтобы меня повесили!» И начался колебательный процесс. Если он сказал правду, его надо заколоть, но тогда окажется, что он солгал, и его надо повесить, но тогда окажется, что он сказал правду... Стражники колебались между двумя решениями, не принимая ни одного из них. В этом парадоксе, как и во многих аналогичных, вывод из утверждения противоречит утверждению.

Механизм возникновения колебательных химических реакций весьма близок к изложенному. Для того чтобы в результате химических реакций в открытой системе могли происходить незатухающие колебания концентраций промежуточных соединений, необходимо, чтобы в результате одного из этапов процесса появлялись вещества, ин-

гибирующие стадии, предшествующие их появлению. Надо, чтобы результат процесса противоречил процессу, нужна отрицательная обратная связь *).

Вопрос о существовании гомогенных колебательных химических систем (в которых колебательный режим обусловлен только особенностями химических реакций) имеет длительную историю. Теоретические предсказания Лотка [13—15], Вольтерра [16] и Франк-Каменецкого [17, 18] долгое время оставались без экспериментального подтверждения. По-видимому, первым наблюдал колебательную химическую реакцию Белоусов [19]. Однако полное и строгое экспериментальное доказательство существования целого класса колебательных окислительно-восстановительных гомогенных химических реакций и их количественное исследование были впервые проведены Жаботинским с сотрудниками [20—26]. Они впервые изучили также пространственные эффекты в автоколебательных химических системах, возникающие в тех случаях, когда диффузионные и конвекционные усредняющие процессы идут медленнее химических. Полученные ими в двумерной системе бегущие концентрационные волны, которые приводят к возникновению причудливых динамических пространственных структур, возможно, окажутся полезными при рассмотрении ряда важных биофизических вопросов (вопросов распространения возбуждения, регуляции).

Области значений параметров, при которых в системе реакций, включающих стадии отрицательной и положительной обратной связи, должны возникнуть автоколебательные режимы, настолько велики, что в сложных схемах ферментативных внутриклеточных процессов просто обязаны наблюдаться автоколебания. Действительно, в последние годы колебательные биохимические реакции стали предметом многочисленных исследований, как теоретических, так и экспериментальных. Среди наиболее важных работ следует отметить [27—34]. Экспериментально колебательные биохимические процессы впервые наблюдались в работах [35, 36]. Первые систематические экспериментальные исследования колебательных био-

*) Конечно, для реализации устойчивого колебательного процесса нужна не только отрицательная, но и положительная обратная связь.

химических внутриклеточных процессов были выполнены Чансом с сотрудниками [37—39]. По-видимому, нельзя сомневаться в том, что в клетке могут идти колебательные процессы, имеющие чисто химическую природу. Эти процессы могут играть важную регуляторную роль, так как они легко перестраиваются на новые режимы при незначительном изменении некоторых ключевых параметров. Вряд ли в настоящее время можно что-нибудь сказать сверх этого. Вероятно, такой «химико-кинетический» подход вполне разумен при рассмотрении сложных схем типа схем Жакоба и Моно (см. [40]), гликолиза [41] и т. д., но лишь до тех пор, пока мы не интересуемся физическими механизмами элементарных стадий этих схем.

Здесь уместно сказать несколько слов по поводу весьма часто цитируемой монографии Гудвина «Временная организация клетки» [42]. Автор построил так называемую «таландическую» *) статистическую механику и термодинамику, в основе которых лежит представление о системе химических осцилляторов, определяющей поведение клетки. «Таландическая температура», например, служит мерой отклонения системы от покоящегося стационарного состояния в результате биохимических колебаний. Чем ниже таландическая температура, тем меньше амплитуда колебаний, тем более «линейно» поведение системы. При построении таландической статистической механики, микроскопическими переменными (играющими роль координат и импульсов в обычной статистике) служат концентрации биохимических компонент. Теория Гудвина остроумна и красива. Мне представляется, однако, что идеи, лежащие в ее основе, не вполне адекватны объекту. Я не думаю, что колебательная химическая кинетика, какую бы роль ни играли периодические химические процессы в регуляции метаболизма и биосинтеза, могла бы служить основой для построения общей теории клетки. Пока остается неясным, что нового (кроме языка) дает подход Гудвина для описания и понимания свойств клетки. Возможно, разработанный им остов теории является своего рода «заготовкой впрок» и будет еще использован после появления нового физического содержания **).

*) От греческого *ταλυνδισ* — колебание.

**) См. также обсуждение теории Гудвина в цитированной выше статье [2].

§ 3.6. ПРОБЛЕМЫ

При рассмотрении многих важных биологических процессов в клетке и организме необходимо пользоваться онзагеровской неравновесной термодинамикой. Никаких специфических термодинамических проблем, связанных с особенностями биологических объектов, при этом не возникает. Распространение термодинамики за пределы выполнимости соотношений взаимности приводит, как правило, к тому, что она перестает быть термодинамикой (т. е. теряются все преимущества общего термодинамического подхода), а превращается в химическую кинетику, гидродинамику и другие хорошо известные области науки. Даже если бы удалось построить последовательную термодинамику для области, лежащей за пределами выполнимости линейных феноменологических соотношений (что пока не сделано), вряд ли, по мнению автора, это имело бы существенное значение для понимания особенностей строения и функционирования биологических систем.

О СТАТИСТИЧЕСКОЙ ФИЗИКЕ БИОПОЛИМЕРОВ**§ 4.1. ГДЕ НАЧИНАЕТСЯ МЕХАНИКА!**

Выше неоднократно подчеркивалось, что биологические системы представляют собой конструкции, т. е. структуры, *построенные для выполнения определенных функций* *). Если бы для описания клетки нам пришлось выбирать между двумя крайними моделями — часовым механизмом и гомогенной химической реакцией в газовой фазе, — выбор был бы однозначен: клетка несравненно ближе к часовому механизму, чем к чисто статистической системе. В чем принципиальное различие физики статистических и физики механических систем? Для ответа на этот вопрос рассмотрим работу машины, для функционирования которой необходимы оба типа систем. В качестве такой машины можно выбрать, например, двигатель внутреннего сгорания. С одной стороны, для описания свойств смеси бензина и воздуха и закономерностей протекания соответствующих химических реакций после их инициирования требуется статистический подход. Существенными характеристиками этого рабочего тела двигателя являются такие макроскопические параметры, как температура и давление. Для их определения необходимо статистическое рассмотрение, усреднение по всему фазовому пространству, учет (статистический) огромного числа степеней свободы молекул, атомов, ионов, радикалов, составляющих газовую смесь. Работа других компонент двигателя: цилиндра, поршня, клапанов, устройства для поджога смеси и т. д. — требует для своего описания совершенно другого подхода — механического. Эти компоненты двигателя, вообще говоря, также состоят из множества атомов и характеризуются огромным числом степеней

*) О необходимости телеологического подхода к биологии см. стр. 27.

свободы; однако для каждой из них имеется немного (а может быть, и одна) механических степеней свободы, полностью определяемых конструкцией системы *). Причина появления таких выделенных степеней свободы заключается в том, что для механических систем разрешены лишь сравнительно немногие области фазового пространства, сравнительно небольшое число возможных микросостояний. Следует четко понимать, что это происходит не потому, что некоторые области фазового пространства отвечают повышенной энергии. Они недостижимы кинетически, так как отделены большим кинетическим барьером от областей фазового пространства, заданных жесткими связями системы, т. е. ее конструкцией. Так, например, точка фазового пространства, соответствующая нахождению атомов поршня вне цилиндра, может не отличаться по энергии от точки, отвечающей нормальному положению поршня. Однако, если двигатель собран правильно, можно вообще не рассматривать первую фазовую точку, так как для ее достижения необходимо разрушить либо поршень, либо цилиндр, а это может произойти лишь через время, неизмеримо превышающее характерное время функционирования механической системы. Конструкция характеризуется строго ограниченным множеством разрешенных точек фазового пространства, использует ничтожную часть гиббсовского канонического ансамбля и в этом смысле существенно неравновесна. Однако эта неравновесность принципиально отличается от неравновесности открытых систем, рассмотренной в предыдущей главе и обусловленной непрерывной диссипацией поступающей извне энергии. В отличие от такой *термодинамической неравновесности*, неравновесность конструкций имеет *кинетическую* природу и обусловлена тем, что мы рассматриваем системы на протяжении интервалов времени, значительно меньших тех, которые требуются для релаксации к истинному статистическому равновесию. Конструкции «заморожены» в неравновесном, т. е. упорядоченном, состоянии. В гл. 1 мы видели, что упорядоченность биологических конструкций осмысленна. Смысл этот возникает в процессе биологической эволюции. Здесь

*) Появление механических степеней свободы превращает конструкцию в машину.

мы не будем касаться вопроса о смысле биологических структур, т. е. не будем рассматривать способы их функционирования. На наиболее простых примерах мы постараемся выяснить, к каким следствиям приводит их кинетическая неравновесность.

Не подлежит сомнению, что клетка ближе к конструкции, чем к статистической системе. Возникает законный вопрос: на каком уровне организации начинается существенная конструкция, где к чистой статистике примешивается механика?

Насколько я знаю, впервые было четко сказано, что это происходит уже на уровне отдельных макромолекул биополимеров, в статье Хургина, Чернавского и Шноля [1]. В гл. 6 мы еще вернемся к ней при рассмотрении физических аспектов ферментативного катализа. Мы увидим, что с некоторыми положениями авторов трудно согласиться. Однако принципиальное значение этой работы очевидно.

Начало количественного описания биополимерных структур как частично неравновесных систем (в указанном выше кинетическом смысле) было положено Лифшицем [2, 3]. Следующий параграф настоящей главы целиком посвящен изложению этих статей *).

§ 4.2. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ФИЗИКА ОДНОНИТЕВОГО ГОМОПОЛИМЕРА

Начнем рассмотрение с длинной гибкой полимерной цепочки, состоящей из N одинаковых мономерных звеньев. Число N достаточно велико, чтобы цепь можно было считать статистической системой, а ее возможные конфигурационные состояния — макроскопическими фазами этой системы. Мономеры соединены друг с другом прочными ковалентными связями, энергия которых E^0 настолько велика, что частоты их разрыва $\omega \sim \exp(-E^0/kT)$ удовлетворяют неравенству

$$\omega\tau \ll 1, \quad (4.1)$$

где τ — характерное время конфигурационной релаксации полимерной цепи. Неравенство (4.1) означает, что пер-

*) Весьма близкий подход к статистической механике полимерной цепи лежит в основе работ Эдвардса [4]. Изложение и обсуждение этих работ можно найти в недавнем обзоре Фрида [5].

вичная структура полимерной цепи стабилизирована кинетически и корреляционные соотношения между положениями соседних звеньев действуют постоянно. Фактически из (4.1) следует, что на интересующих нас временах порядка τ система неравновесна и обладает линейной памятью.

Учет линейной памяти приводит к нетривиальным следствиям даже при анализе свойств свободной нити (когда отсутствуют боковые вторичные связи). Как известно (см., например, [6]), такая нить при достаточно большом N из-за флуктуаций ее геометрии, вызванных изгибом, сворачивается в клубок радиусом порядка $R_N = a \sqrt{N}$, где a — величина порядка расстояния между соседними звеньями. Наличие линейной памяти выражается в том, что в конфигурационном пространстве функция распределения $Z_{\text{своб}}$ представляется в виде произведения функций корреляции $g_j = g(\mathbf{x}_j, \mathbf{x}_{j+1})$ между соседними звеньями:

$$Z_{\text{своб}}(\mathbf{x}_1, \dots, \mathbf{x}_N) = \prod_j g_j. \quad (4.2)$$

Определяя функцию корреляции через разность векторов:

$$g_j = g(\mathbf{x}_{j+1} - \mathbf{x}_j) = g(\mathbf{y}_j), \quad \int g d^3\mathbf{y} = 1, \quad (4.3)$$

где \mathbf{x}_j ($j = 1, 2, \dots, N$) — обобщенные координаты звеньев цепи, Лифшиц вводит плотность звеньев в точке с координатой \mathbf{x} :

$$n(\mathbf{x}) = \sum_{j=1}^N \delta(\mathbf{x} - \mathbf{x}_j), \quad (4.4)$$

и рассчитывает корреляцию плотности, т. е. величину, связывающую изменение плотности в одной точке пространства, занятого клубком, с изменением плотности в другой его точке. Оказывается, радиус корреляции того же порядка, что и размер клубка. Это означает, что плотность клубка нельзя считать термодинамической характеристикой системы: невозможно получить постоянное среднее значение плотности, проводя усреднение по всему клубку. Флуктуации плотности в разных точках клубка не независимы, и усреднение необходимо проводить по времени,

а не по пространству. Вследствие корреляции плотностей (т. е. в конечном счете вследствие наличия линейной памяти, вносящей ограничения в разрешаемые области фазового пространства) в клубке должны происходить макроскопические пульсации с характерным временем

$$\tau \propto N^2 \quad (4.5)$$

и с амплитудой пульсации того же порядка величины, что и сама плотность.

Полученный результат существенно связан с приближением свободной гибкой нити и с пренебрежением всеми взаимодействиями, кроме главных, обуславливающих линейную память. На самом же деле объемными взаимодействиями между удаленными (вдоль главной цепочки) друг от друга мономерными звеньями, сближенными в результате изгиба, пренебрегать нельзя. Эти боковые связи в значительной мере определяют результирующую конфигурацию макромолекулы. Кроме того, существенным может оказаться взаимодействие полимерной нити с окружающей средой, например с растворителем. Наличие на поверхности клубка гидрофобных звеньев полимерной цепи, разрушающих водородно-связанную структуру воды, приводит к так называемому гидрофобному взаимодействию, сжимающему клубок. Поэтому в качестве следующего приближения Лифшиц рассматривает клубок, образованный гомополимерной гибкой нитью, во внешнем сжимающем потенциальном поле $u(x)$. Этот этап необходим для последующего учета объемного взаимодействия.

Теперь каждое звено характеризуется энергией, определяемой положением данного звена в пространстве. Обозначим энергию (в единицах T) звена, расположенного в точке x , через

$$\varphi(x) = u(x)/T. \quad (4.6)$$

Энергия всей системы, находящейся в точке Γ пространства конфигураций (т. е. с заданными координатами x_j всех звеньев *)), равна

$$\mathcal{E} = \sum_{j=1}^N \varphi(x_j) = \int n(x) \varphi(x) d^3x. \quad (4.7)$$

*) Для упрощения принято, что состояние звена полностью определяется его координатой, т. е. не учитываются возможные различия в ориентации звена.

Свободная энергия $F(x)$ (в единицах T) системы в поле, отсчитываемая от уровня свободного клубка, может быть записана в виде

$$F_1/T \equiv F \equiv F(\varphi) - F(0) = -\ln Z_N, \quad (4.8)$$

где F_1 — свободная энергия в обычных единицах, а статистическая сумма Z_N учитывает как наличие внешнего поля, так и существование линейной памяти, т. е.

$$\left. \begin{aligned} Z_N &= \int \exp \left\{ - \sum \varphi(x_j) \right\} \prod_j g(\bar{y}_j) d\Gamma, \\ d\Gamma &= \prod_j d^3x_j = \prod_j d^3y_j. \end{aligned} \right\} \quad (4.9)$$

Ниже приведены очевидные выражения для равновесной плотности звеньев $\bar{n}(x_j)$, энергии E (в единицах T) и энтропии S системы:

$$\bar{n}(x_j) = \frac{\delta F}{\delta \varphi}, \quad (4.10)$$

$$\begin{aligned} E = \frac{\mathcal{E}_1}{T} &\equiv E\{\varphi\} - E\{0\} = \int \varphi(x) \bar{n}(x) d^3x = \\ &= \int \varphi(x) \frac{\delta F}{\delta \varphi} d^3x, \end{aligned} \quad (4.11)$$

$$S = S\{\varphi\} - S\{0\} = E - F = \int \varphi(x) \bar{n}(x) d^3x - F, \quad (4.12)$$

где \mathcal{E}_1 — энергия в обычных единицах. При достаточно больших N вычисление Z_N сводится в конце концов *) к решению уравнения

$$\int g(x - x') \Psi(x') d^3x' = \exp(\varphi - \lambda) \Psi(x), \quad (4.13)$$

где Ψ — функция, определяемая равенством

$$\Psi^2(x) = \frac{n(x)}{N} \exp[-\varphi(x)] \equiv \rho(x) \exp[-\varphi(x)], \quad (4.14)$$

$\rho(x)$ — плотность звеньев в точке x в расчете на одно звено, λ — энергетический параметр системы, весьма просто связанный с ее свободной энергией:

$$Z_N \approx \exp(-\lambda N), \quad (4.15)$$

$$F = N\lambda = N\lambda\{\varphi\}. \quad (4.16)$$

*) Подробные выкладки здесь и далее см. в [2].

Если функция $\varphi(x)$ достаточно плавна, т. е. мало меняется на расстояниях порядка интервала между звеньями, а корреляционную функцию $g(x)$ можно считать сферически симметричной, то (4.13) превращается в

$$a^2 \Delta \Psi + (1 - \exp(\varphi - \lambda)) \Psi = 0. \quad (4.17)$$

Решения этого уравнения, т. е. вид «собственных функций» Ψ и допустимые «собственные значения» λ , зависят от вида $\varphi(x)$. Если поле исчезает на бесконечности, т. е. $\varphi(\infty) = 0$, а в области клубка $\varphi(x)$ образует достаточно глубокую потенциальную яму, чтобы «удержать» его в виде плотной глобулы, появляются дискретные собственные значения λ . При данном потенциальном поле $u(x)$ это происходит при температурах ниже некоторой критической температуры θ_K . При более высоких температурах квантования свободной энергии нет и λ имеет сплошной спектр. Граница непрерывного спектра проходит при $\lambda_K = 0$. Если яма достаточно широка, то уровень основного состояния находится вблизи дна ямы, т. е.

$$|\varphi(x) - \lambda| \ll 1. \quad (4.18)$$

Тогда вместо (4.17) можно написать уравнение

$$a^2 \Delta \Psi + (\lambda - \varphi) \Psi = 0, \quad (4.19)$$

формально идентичное стационарному уравнению Шредингера.

Это уравнение можно решить для различных конкретных случаев. Так, например, для глубокой сферически симметричной ямы $\varphi(r) = \varphi_0 + 1/2 \alpha r^2$ получаем основной уровень при

$$\lambda = \varphi_0 + 3/2 \alpha^{3/2}. \quad (4.20)$$

При $T > \theta_K$ нет дискретных уровней, а при понижении температуры появляется первый дискретный уровень $\lambda_K = \lambda \{ \varphi_K \} = \lambda \{ u(x)/\theta_K \}$. При T , близких к θ_K , имеем

$$\lambda \left\{ \frac{u}{T} \right\} - \lambda \left\{ \frac{u}{\theta_K} \right\} \sim (T - \theta_K)^2. \quad (4.21)$$

Таким образом, в точке θ_K реализуется фазовый переход второго рода

$$\frac{F_T}{N} = \lambda_T = \begin{cases} A(T - \theta_K)^2, & T < \theta_K, \\ 0, & T > \theta_K \end{cases} \quad (4.22)$$

(здесь F_T совпадает с F_1).

Анализ корреляции флуктуаций плотности показывает, что при $T < \theta_K$, когда яма достаточна для удержания клубка, плотность $\rho(x) \propto \Psi^2 \exp \phi$ становится термодинамической величиной и усреднение ее по пространству снова приобретает смысл.

В реальной макромолекуле кроме взаимодействия между соседними звеньями, которое учитывается заданием корреляции g_j , существует дополнительное объемное взаимодействие \mathcal{U} между далекими участками цепи, подошедшими друг к другу в результате изгиба. Энергию системы можно в этом случае представить в виде суммы энергий попарного взаимодействия u_{ik} между сближившимися звеньями:

$$\mathcal{U}(x_1, \dots, x_N) = 1/2 \sum u_{ik}; \quad u_{ik} = \mathcal{U}(x_i - x_k). \quad (4.23)$$

В общем случае при наличии объемного взаимодействия \mathcal{U} и внешнего потенциального поля ϕ получают уравнения, аналогичные (4.13), (4.17) и (4.19), но вместо $\phi(x)$ в них следует подставить зависящее от плотности n эффективное самосогласованное поле $\Phi(n, x)$:

$$\Phi(n, x) = \phi(x) + \mu_0(n) - \ln n, \quad (4.24)$$

где $\mu_0(n)$ — химический потенциал звена в системе с локальной плотностью n .

Несколько слов об использовании химического потенциала [7]. Все особенности статистики полимерных цепей определяются тем, что за счет линейной памяти мономеры оказываются скоррелированными на расстояниях $r_{\text{корр}}$ ($r_{\text{корр}} \gg a$). Поэтому распределение плотности в глобуле не локально. Однако в первом приближении (по параметру $a/r_{\text{корр}}$) объемное взаимодействие можно описать, вводя эффективный химический потенциал $\mu^*[n(x)] = \mu(n, T) - T \ln n$, где $\mu(n, T)$ — химический потенциал

той же совокупности разорванных звеньев, с тем же объемным взаимодействием и с плотностью n и температурой T . Таким образом, химический потенциал вводится так же, как и в конденсированной фазе без линейной памяти, поскольку в системе с линейной памятью выделяется объем, где локальные расстояния между взаимодействующими звеньями много меньше, чем расстояния между этими звеньями вдоль цепи (модель «взаимодействующие бусинки на гибкой нити»).

Влияние растворителя на распределение плотности может быть учтено зависимостью эффективного химического потенциала $\mu^*(n)$ от состояния растворителя. Так, например, $\mu^*(n)$ зависит от давления P в растворителе. В основном эта зависимость обусловлена тем, что при образовании плотной глобулы объем растворителя изменяется на величину ΔV (растворитель вытесняется звеньями полимера, так как молекулы растворителя не могут проникать в плотную глобулу). Поэтому при образовании глобулы цепь производит работу $P \Delta V$. В этом случае состояние полимерной цепи определяется не минимумом свободной энергии Гельмгольца, а минимумом свободной энергии Гиббса (термодинамического потенциала): $G\{n\} = F(n) + P \Delta V$.

В выражениях для эффективного химического потенциала и эффективного самосогласованного поля (4.24) появятся новые члены, отражающие состояние растворителя (давление, рН и т. д.).

Если внешнее поле отсутствует и в правой части (4.24) исчезает первое слагаемое, то превращение клубка в глобулу может все же произойти за счет сил объемного притяжения. Для предотвращения неограниченного сжатия необходимо учитывать силы отталкивания, действующие на атомных расстояниях. В этом случае глобула образует нечто вроде двухфазной системы с плотным ядром, играющим роль конденсированной фазы, и «газовой» периферией, где поле объемного взаимодействия недостаточно для создания глобулы и цепочка удерживается только основными связями.

В дальнейшем энергетические характеристики системы будут записываться обычным способом, учитывающим явно температурную зависимость, т. е. вместо F мы будем писать F/T , а вместо $\mu_0 - \mu_0(n, T)/T$.

Напишем теперь уравнение состояния двухфазной сферически симметричной глобулы при $\varphi(x) = 0$:

$$\left. \begin{aligned} \int g(x-x') \Psi(x') d^3 x' &= \Psi(x) \exp[\Phi(n) - \lambda], & (a) \\ \Psi^2 &= n \exp[\lambda - \Phi(n)], & (б) \\ \Phi(n) &= \mu_0(n, T)/T - \ln n; n = n(r), & (в) \\ n(\infty) &= \Psi(\infty) = 0, & (г) \end{aligned} \right\} (4.25)$$

и условие нормировки, которое в случае образования глобулы фиксирует значение λ :

$$4\pi \int n(r) r^2 dr = N. \quad (4.26)$$

Если плотность n мала («газовая» фаза), то, как известно из обычной термодинамики, химический потенциал зависит от n следующим образом:

$$\mu_0/T = \ln n + \alpha(T)n, \quad (4.27)$$

причем функция $\alpha(T)$ положительна при высоких и отрицательна при низких температурах. Для конденсированной фазы (большие значения n) Φ имеет при некотором n_m минимум $\Phi_{\text{мин}}$, вблизи которого Φ квадратично зависит от $(n - n_m)$. Таким образом, самосогласованное поле $\Phi(n)$, обусловленное объемным взаимодействием, будет следующим образом зависеть от плотности:

$$\Phi(n) = \begin{cases} \alpha(T)n, & \alpha(T)n \ll 1, \\ \Phi_{\text{мин}} + \gamma(n - n_m)^2, & |n - n_m| \ll n_m. \end{cases} \quad (4.28)$$

Типичный вид функций $\Phi(n)$ представлен на рис. 4.1.

Для больших глобул решение (4.25) означает следующее: практически вся масса глобулы сосредоточена в плотном ядре с почти постоянной плотностью n_0 ($4/3\pi R^3 n_0 \approx N$). Переходной слой и «газообразная» периферия весьма тонки ($\delta R \ll R$). Для каждой из фаз по обе стороны тонкого переходного слоя (4.25) можно записать по аналогии с (4.17) в виде

$$a^2 \frac{d^2 \Psi}{dx^2} = \Psi (\exp[\Phi(n) - \lambda] - 1), \quad \Psi^2 = n \exp[\lambda - \Phi(n)], \quad (4.29)$$

где $x = r - R$, n теперь функция от x , а граничные условия для конденсированной (I) и «газообразной» (II) фаз

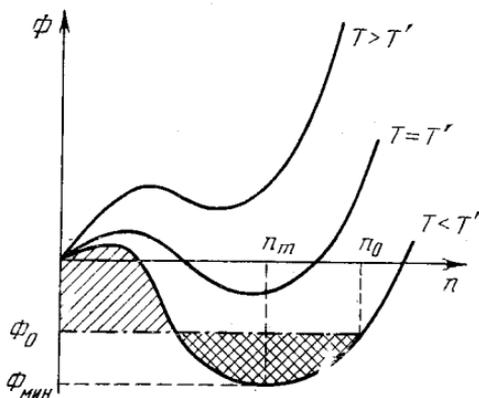


Рис. 4.1. Типичный вид функций $\Phi(n)$ (по [2]).
 T' — температура, при которой энергия плотной глобулы равна энергии свободного клубка. Горизонтальная штрих-пунктирная линия для функции $\Phi(n)$ при $T < T'$ проводится так, чтобы заштрихованные площади были одинаковы.

формулируются следующим образом:

$$\left. \begin{aligned} \text{Фаза I } n(-\infty) &= n_0, \\ \Psi^2(-\infty) &= \Psi_0^2 = n_0 \exp(\lambda - \Phi_0), \\ \text{Фаза II } n(\infty) &= \Psi^2(\infty)' = 0; \end{aligned} \right\} \quad (4.30)$$

$n(-\infty)$ означает плотность звеньев внутри глобулы *) вдали от ее границ, т. е. при $r \ll R$.

Из (4.29) и (4.30) сразу получаем

$$\lambda = \Phi(n_0) \equiv \Phi_0, \quad \Psi_0^2 = n_0. \quad (4.31)$$

Вдали от границы фаз решения (4.25) представляют собой экспоненциальные функции

$$\left. \begin{aligned} n(x) &\sim n_0 \exp(v_1 x) \quad (x \rightarrow -\infty), \\ n(x) &\sim \exp(v_2 x) \quad (x \rightarrow \infty), \end{aligned} \right\} \quad (4.32)$$

где v_1 и v_2 — некоторые функции от n_0 . Лифшиц находит n_0 , сшивая решения Ψ_1 и Ψ_2 точного уравнения (4.25), а не его дифференциальной формы (4.29), верной только

*) Конечно, x , равное $r - R$, не может быть меньше $-R$.

вдали от границы фаз. В каждой точке должно выполняться термодинамическое неравенство (см. (4.25, в))

$$\frac{1}{T} \frac{\partial \mu_0}{\partial n} = \frac{\partial \Phi}{\partial n} + \frac{1}{n} > 0, \quad (4.33)$$

а плотная глобула должна быть термодинамически выгоднее рыхлого клубка, т. е.

$$\int_0^{n_0} \Phi(n) dn < 0. \quad (4.34)$$

Первый интеграл от (4.29) с учетом (4.30) и (4.31) равен

$$a^2 \left(\frac{d\Psi}{dx} \right)^2 = \begin{cases} \int_0^n (\Phi - \Phi_0) dn - g(n) & (\text{фаза I}), \\ \int_{n_0}^n (\Phi - \Phi_0) dn - g(n) & (\text{фаза II}), \end{cases} \quad (4.35)$$

где

$$g(n) = n [(\exp(\Phi - \Phi_0) - 1) - (\Phi - \Phi_0)].$$

Правые части (4.35) различаются на величину $\int_0^{n_0} (\Phi - \Phi_0) dn$.

Следовательно, чтобы решение (4.29) было непрерывным, должно удовлетворяться равенство

$$\int_0^{n_0} (\Phi - \Phi_0) dn = \int_0^{n_0} \Phi(n) dn - n_0 \Phi(n_0) = 0. \quad (4.36)$$

Отсюда (см. (4.34))

$$\Phi_0 \equiv \Phi(n_0) < 0. \quad (4.37)$$

Уравнение (4.36) определяет n_0 . Существует какая-то температура T' , ниже которой начинают выполняться (4.34), (4.36) и (4.37). Эта температура определяется уравнениями

$$\Phi(n_0, T') = 0, \quad \int_0^{n_0} \Phi(n, T') dn = 0. \quad (4.38)$$

Кроме того, во всей области значений плотности от 0 до n_0 должно выполняться (4.33), т. е. температура T долж-

на быть выше критической ($T > T_k$). Здесь слово «критическая» имеет обычный смысл: это температурная граница существования непрерывного перехода от «газа» к «жидкости». Из рис. 4.1 ясно, как находить n_0 по кривым $\Phi(n)$, пользуясь (4.36).

Итак, для достаточно длинного гомополимера с объемным взаимодействием могут реализоваться следующие ситуации:

$$1) T' > T_k.$$

1а) $T > T'$. Уравнение состояния (4.25) не имеет решения для двухфазной системы. Глобула не образуется. Система ведет себя как свободная нить без объемного взаимодействия.

1б) $T_k < T \leq T'$. При $T = T'$ образуется глобула. При этом возникает дополнительная свободная энергия, которая при $T < T'$ равна $F/TV = n_0^* \Phi(n_0)$. Выполняется (4.36). Переход при $T = T'$ есть фазовый переход первого рода.

1в) $T \leq T_k$. При $T = T_k$ между двумя фазами системы возникает скачок плотности (фазовый переход второго рода). Тем не менее условие (4.36) в центре ядра выполняется.

$$2) T' < T_k.$$

$$2а) T > T'. \text{ Аналогично (1а).}$$

2б) $T \leq T'$. При $T = T'$ в результате фазового перехода первого рода образуется глобула со скачком плотности между плотным ядром и «газообразной» периферией.

Предыдущее изложение было главным образом основано на первой статье Лифшица [2]. В работах [3, 7] Лифшиц и Гросберг получили ряд новых существенных результатов. Была рассмотрена возможность образования глобул без «газообразной» периферии, проанализированы случаи больших и малых глобул, учтено влияние растворителя. Ниже будут вкратце изложены наиболее важные из полученных результатов.

При уменьшении температуры плотность звеньев в «газообразной» периферии падает аналогично тому, как это имеет место в случае плотности пара над жидкой каплей. Однако в случае полимерной цепи система главных связей не позволяет плотности стать слишком малой. Поэтому при достаточно низкой температуре даже очень длинная цепь будет образовывать глобулу без «газообразной» пе-

риферии. Таким образом, возможны три различных фазовых состояния полимерной цепи: клубок, глобула с «газообразной» периферией, глобула без периферии. Эти три состояния схематически изображены на рис. 4.2. Детальный анализ термодинамики этих состояний и переходов

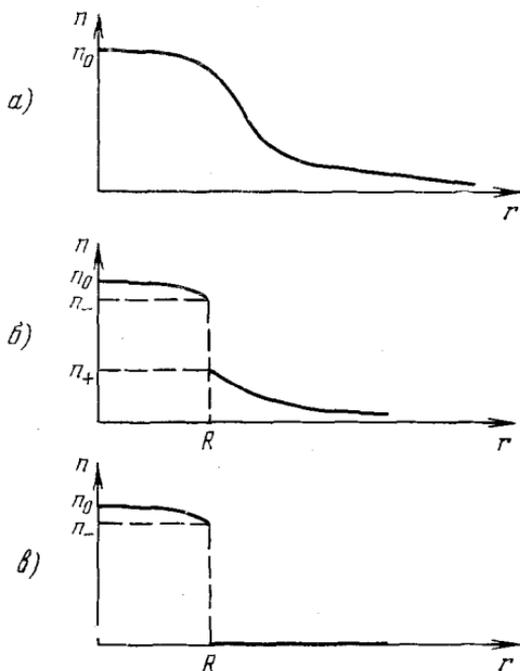


Рис. 4.2. Распределение плотности по радиусу в глобуле.

- а) Глобула с «газообразной» периферией при температуре, превышающей критическую температуру системы разорванных звеньев, $T > T_K$; б) глобула с «газообразной» периферией при $T < T_K$; в) глобула без периферии. ρ_- и ρ_+ — плотности на внутренней и внешней сторонах границы плотной глобулы, соответственно.

между ними проведен на уже упомянутой выше модели «взаимодействующие бусинки на гибкой нити». Рассмотрены случаи предельно большой глобулы (объем плотного ядра глобулы $V_0 = 4/3\pi R^3$ значительно превышает корреляционный объем, $V_0 \gg r_{\text{корр}}^3$). Основные результаты отражены на фазовой диаграмме (рис. 4.3). Для большой глобулы (N достаточно велико) переход клубок — глобула

с «газообразной» периферией реализуется как фазовый переход первого рода (кривая AB). Вблизи фазового перехода, когда $0 < \tau \equiv T' - T \ll T'$ (T' — температура перехода при данном N), свободная энергия зависит от τ линейно. Если $T' > T_k$, то при переходе через температуру T_k (жирный пунтир на фазовой диаграмме) поверхностный слой глобулы испытывает фазовый переход второго

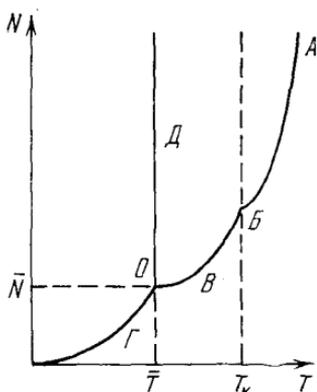


Рис. 4.3. Фазовая диаграмма при постоянном P для модели «взаимодействующие бусинки на гибкой нити». Буквами A, B, B, G, D обозначены участки линий. Линия DOG отделяет область глобулы без периферии, линия $ABBOA$ — глобулы с «газообразной» периферией, линия $ABBOG$ — клубка.

рода, в результате которого распределение плотности на границе раздела глобула — периферия становится разрывным (ср. рис. 4.2, б).

Для достаточно малой глобулы $T_k > T'$ и реализуется только фазовое превращение первого рода: клубок — глобула с «газообразной» периферией (линия B на диаграмме).

В том случае, если система главных связей не позволяет удовлетворить требованию непрерывности локального химического потенциала на границе ядра глобулы, образуется глобула без периферии. Для предельно малой цепи плотная глобула образуется всегда без периферии в результате фазового перехода первого рода (линия G на диаграмме). Для малых и больших глобул с периферией

при понижении температуры реализуется фазовый переход первого рода, в результате которого «газообразная» периферия «прячется» в глобуле (линия D на диаграмме). Тройная точка $O(\bar{N}, \bar{T})$ определяется тем, что в этой точке свободные энергии глобул обоих типов исчезают. Можно показать, что $\bar{T} < T_k$.

В работе [7] исследовано влияние внешнего давления на вид фазовой диаграммы. При достаточно низких температурах всегда образуется глобула без «газообразной» периферии.

Очевидное развитие модели, рассмотренной в изложенных работах, должно заключаться в учете корреляции не только координат мономерных звеньев, но и их ориентации. И, конечно, принципиальным шагом вперед было рассмотрение гетерополимеров, обладающих, кроме линейной, и информационной памятью. Звено характеризуется не только координатой или ориентацией, но и сортом мономера. Однако сделанный в этих работах первый шаг по созданию статистической теории биополимеров, учитывающей их важную характеристику — наличие линейной памяти, — уже привел к интересным и нетривиальным результатам, которые, вероятно, останутся и в более полной теории.

§ 4.3. О СТАТИСТИЧЕСКОЙ НЕРАВНОВЕСНОСТИ БИОПОЛИМЕРНЫХ СТРУКТУР НА РАЗНЫХ УРОВНЯХ ОРГАНИЗАЦИИ

При рассмотрении однопольного гомополимера в предыдущем параграфе мы считали, что кинетическая неравновесность, память, ограничивается фиксацией каждого мономерного звена на своем месте вдоль цепи. Если бы речь шла о гетерополимере, можно было бы сказать, что память относится только к первичной структуре. С учетом ограничений, налагаемых сильными связями вдоль цепи, образование клубка или плотной глобулы с фиксированным квантованным значением свободной энергии или возникновение двухфазной структуры с конденсированной сердцевинной и «газообразной» пульсирующей периферией приводит, согласно представлениям, изложенным в предыдущем параграфе, к равновесному состоянию системы. Таким образом, в этом приближении вторичная и третичная структуры биополимеров равновесны и однозначно определяются (при $T < T'$) заданной кинетически неравновесной первичной структурой.

По-видимому, однако, не всегда неравновесность ограничивается уровнем первичной структуры. Реальные белковые молекулы с достаточно большим числом аминокислотных остатков, способных осуществлять огромное число различных попарных объемных взаимодействий, возможно, обладают множеством близлежащих уровней свободной энергии, соответствующих различным вариантам

замыкания вторичных связей и отделенных друг от друга большими потенциальными барьерами. В этом случае совпадение единственной реализующейся осмысленной (т. е. характеризующейся данными ферментативной, иммунологической и т. п. активностями) системы со структурой, отвечающей абсолютному минимуму свободной энергии системы при заданной аминокислотной последовательности, практически невероятно. По-видимому, начиная с некоторой длины цепи, нативная и абсолютно равновесная структуры перестают совпадать.

Сказанное выше не означает, что вторичная и третичная структуры биополимеров в клетке не определяются их генетически обусловленной первичной последовательностью. При заданных кинетических механизмах биосинтеза первичная последовательность однозначно определяет вторичную и третичную структуры, которые, однако, могут и не быть равновесными в указанном выше смысле. Действительно, постулируем наиболее принятую сейчас схему биосинтеза белковых макромолекул в рибосомах, где аминокислотные остатки, приносимые РНК-переносчиками, последовательно соединяются друг с другом пептидными связями согласно программе, заложенной в информационной РНК, а образующаяся полипептидная цепочка постепенно выталкивается из рибосомы в цитоплазму. При достаточно большой длине растущей полипептидной цепочки, закрепленной с одного конца в рибосоме, возникнет ситуация, когда должен произойти фазовый переход первого рода из свободного клубка в плотную глобулу. При этом не обязательно будет реализован самый нижний из дискретных уровней свободной энергии, соответствующих цепочке данной длины и данного состава. Вначале может возникнуть менее выгодная, но кинетически более доступная конформация, которая затем медленно релаксирует к равновесной конформации, соответствующей низшему дискретному уровню свободной энергии, если рост цепи на этом закончится и готовая белковая молекула оторвется от рибосомы. Если же рост цепи будет продолжаться, то упаковка новых ее участков будет определяться уже имеющимся «ядром». Через некоторое время для выросшей, более длинной цепочки конформация первоначально образовавшейся плотной глобулы (ее вторичная и третичная структуры) может стать совершенно

неравновесной. Низшему уровню свободной энергии выросшей полипептидной цепочки соответствовала бы совершенно другая конформация тех ее первых участков, из которых была построена раньше плотная глобула. Однако переход в новую конформацию может быть кинетически невозможным. Такой переход потребовал бы либо разрыва основной цепочки, либо разрушения всей глобулы с последовательным (в строго заданном порядке) разрывом множества вторичных связей. Таким образом, в достаточно больших молекулах биополимеров «жесткая» память может быть сосредоточена не только в первичной, но и во вторичной и даже в третичной структурах. Однако при заданных механизмах и временах синтеза биополимеров кинетическая неравновесность вторичной и третичной структур не противоречит тому, что они полностью определяются первичной последовательностью мономеров, т. е. запрограммированы генетически.

В связи со сказанным выше вопрос о том, полностью ли равновесны (при заданной неравновесной первичной последовательности) вторичная и третичная структуры биополимеров, не представляется мне очень важным. В реальных условиях эта проблема может вообще не иметь смысла. Функционирование наиболее важных биополимеров связано с постоянно идущими микрохимическими изменениями: присоединением и отщеплением низкомолекулярных соединений, ионизацией кислотных и основных групп, изменением количества сорбируемых ионов и т. п. Любое из этих локальных изменений вызывает изменение эффективного поля Φ , т. е. может привести к превращению равновесной конформации в неравновесную. Не так уж важно, является ли данная конформация абсолютно равновесной или она равновесна лишь локально, т. е. обладает наинизшей свободной энергией по сравнению с некоторым набором геометрически соседних возможных конформаций. Мы увидим далее, что наиболее существен вопрос о временах и характере процесса *релаксации* системы в новое равновесное (или локально равновесное) состояние после быстрого изменения эффективного поля Φ .

Обсуждение аналогичных проблем можно найти в докладе Лифшица на IV Международном биофизическом конгрессе [8].

§ 4.4. О НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВАХ БИОПОЛИМЕРНЫХ СТРУКТУР, ВЫТЕКАЮЩИХ ИЗ ИХ СТАТИСТИКО-ФИЗИЧЕСКОГО ОПИСАНИЯ

Итак, наиболее важной характеристикой биополимеров можно считать наличие жесткой памяти, т. е. кинетической неравновесности на уровне первичной, а у достаточно больших молекул — вторичной и, возможно, третичной структур. Согласно изложенной выше теории Лифшица, жесткая линейная память и объемное взаимодействие должны приводить к появлению дискретных уровней свободной энергии возникающей плотной глобулы.

В случае гетерополимеров каждому такому дискретному уровню должна, по-видимому, соответствовать определенная конформация, т. е. определенный способ образования вторичных связей (водородных связей, дисульфидных мостиков, ионных пар) между удаленными по главной цепочке аминокислотными остатками, который определяет вторичную и третичную структуры макромолекулы *).

Наличие таких дискретных конформационных уровней, отделенных потенциальными и энтропийными барьерами от других конформационных состояний, генетическая обусловленность первичной структуры и постоянство кинетических механизмов биосинтеза приводят к изумительной *воспроизводимости* биополимеров. Действительно, молекулярные функции распределения, например, одинаковых (т. е. соответствующих одному гену) белков по самым различным характеристикам чрезвычайно узки, значительно уже функций распределения любых известных синтетических полимеров. Эта воспроизводимость обеспечивает функциональную специфичность биополимеров (ферментативную, иммунологическую и т. п.), весьма существенную для живых систем.

*) Слово *конформация* в литературе часто употребляется в различных смыслах. В этой книге термин «конформация» будет применяться только для обозначения состояния макромолекулы с фиксированной схемой вторичных связей. Конформационными будут называться переходы и изменения, связанные с изменением этой схемы. Геометрическая форма молекулы, определяющая расстояния между не соединенными вторичными связями мономерами, которая может изменяться в пределах одной конформации, будет называться *конфигурацией*, а соответствующие изменения — *конфигурационными*.

Вместе с тем при незначительных локальных (например, образование дополнительной связи с небольшой молекулой или ионом) или общих (например, небольшое изменение температуры) возмущениях, недостаточных для перевода молекулы в новое конформационное состояние (т. е. для изменения схемы замыкания вторичных связей, определяющих объемные взаимодействия), может сравнительно сильно измениться геометрия, конфигурация, молекул. В этом отношении свойства больших молекул, обладающих вторичной и третичной структурой, резко отличаются от свойств малых молекул. Минимум свободной энергии при неизменной конформации может в случае биополимеров достигаться при несколько ином расположении не связанных вторичными связями мономеров. Этому способствует возможность поворотов вокруг ординарных связей главной цепи, а также не очень строгие требования, предъявляемые к линейности водородных связей, и т. д.

Ажурная структура биополимера напоминает сложную проволочную конструкцию, которую может «повести» при изменении температуры или возникновении небольших локальных напряжений. Эту особенность больших ценных молекул со вторичной или третичной структурой следует иметь в виду при рассмотрении их химических взаимодействий друг с другом и с малыми молекулами.

При достаточно сильных возмущениях можно ожидать истинных конформационных переходов с разрывом одних и замыканием новых вторичных связей. Если дискретные уровни свободной энергии лежат достаточно близко и отделены друг от друга сравнительно низкими энергетическим или энтропийным барьерами *), то можно ожидать возникновения конформационных колебаний релаксационной природы. Иногда эти переходы и колебания могут не затрагивать всю молекулу, а носить более или менее локальный характер.

При рассмотрении всех явлений, связанных с изменениями конфигурации и конформации биополимеров,

*) Малость энтропийного барьера означает, что для перехода из одного состояния в другое требуется изменить последовательно сравнительно небольшое число слабых связей или что этот переход может реализоваться многими способами.

следует помнить, что эти структуры, как было показано выше, представляют собой в значительной степени механические системы с жесткой памятью на различных уровнях организации, с целыми областями фазового пространства, недостижимыми без разрушения структуры. Поэтому можно ожидать существования немногих выделенных степеней свободы и движение частей системы во время конформационных и конфигурационных переходов должно быть по преимуществу *механическим*. В случае чисто релаксационных конформационных переходов после быстрых возмущений к состоянию нового частичного равновесия можно ожидать весьма больших характеристических времен этих процессов.

Все перечисленные свойства биополимерных структур должны решающим образом влиять на их функционирование.

КОНФОРМАЦИОННЫЕ И КОНФИГУРАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ БИОПОЛИМЕРОВ

§ 5.1. ВВЕДЕНИЕ

В конце предыдущей главы мы увидели, к каким следствиям может привести то обстоятельство, что важнейшие биополимеры представляют собой существенно кинетически неравновесные структуры с памятью на различных уровнях организации и с выделенными степенями свободы, т. е. в значительной степени являются «машинами». В таких системах для отображения их истинного движения в пространстве и времени требуется учитывать значительно меньше степеней свободы, чем в принципе необходимо для их полного описания. Следует четко отдавать себе отчет в том, что существуют две причины такого «механического поведения» макромолекул биополимеров: их большие размеры и возможность образования большого количества вторичных связей, достаточно сильных, чтобы фиксировать различные конформации (дискретные уровни свободной энергии по Лифшицу [1]), и достаточно слабых, чтобы допускать конфигурационные и конформационные переходы под действием различных возмущений.

Именно способность к конформационным переходам, способность к движению с участием выделенных механических степеней свободы, является важнейшим свойством биополимеров, в значительной мере определяющим их функционирование. Исследованиям таких переходов было в последние годы посвящено большое число работ, в основном экспериментального характера. Однако при анализе своих экспериментальных данных большинство авторов не учитывает отмеченные в гл. 4 принципиальные особенности биологически важных макромолекулярных структур. Поэтому в настоящей главе будут не только рассмотрены экспериментальные результаты исследований конформационных и конфигурационных изменений биополимеров, но и заново проанализированы эти результаты (за исключением данных, непосредственно относящихся к

ферментативному катализу, которые разбираются в следующей главе).

Наибольшее количество имеющихся в литературе работ посвящено изучению так называемой денатурации биополимеров. Этот термин не имеет строго определенного смысла и употребляется для обозначения самых различных изменений свойств макромолекул под влиянием самых различных воздействий. При рассмотрении термодинамических и кинетических характеристик различных денатурационных процессов возникает общая проблема применимости понятий и уравнений, используемых в физической химии малых молекул, для описания процессов, в которых принимают участие макромолекулы биополимеров. Речь идет о применимости закона действующих масс, уравнений Вант-Гоффа, Аррениуса и теории активированного комплекса. Ввиду важности этого вопроса, для многих проблем, обсуждаемых в настоящей книге, он будет подробно исследован уже здесь, хотя основные следствия из нашего рассмотрения (относящиеся к кинетике и механизму ферментативных реакций и механизмам трансформации энергии в клетке) будут использованы потом.

Весьма большое внимание будет уделено термодинамическим и кинетическим аспектам конформационных и конфигурационных изменений белка, наблюдаемых при локальных химических возмущениях (образование комплекса с малыми молекулами и ионами, отдача и присоединение электрона и т. п.).

§ 5.2. ДЕНАТУРАЦИЯ БИОПОЛИМЕРОВ

Денатурации белков посвящено огромное количество оригинальных и обзорных работ, глав в учебниках. Нет никакой возможности даже перечислить основные экспериментальные результаты и теоретические представления. Пожалуй, в этом даже нет необходимости, так как по мере усовершенствования физических методов исследования становится все более очевидным, что, в сущности, нет единого денатурационного процесса, характеристики и механизм которого следует установить. Вероятно, единственной общей чертой всех эффектов, сопровождающих то, что называют денатурацией, являются значительные изменения конформации макромолекул, происходящие в

узкой области значений внешних параметров (температура, рН, гидростатическое давление и т. д.). В этом смысле можно говорить о большой степени кооперативности денатурационных изменений, напоминающих иногда фазовые переходы. Часто, вероятно, они и являются фазовыми переходами (глобула — клубок), рассмотренными в предыдущей главе.

Наиболее подробно как экспериментально, так и теоретически изучено плавление или переход спираль — клубок в ДНК. В списке литературы приведены основные работы по этой теме [2—8]. Следует обратить особое внимание на серию работ Лазуркина, Франк-Каменецкого и Трифонова, которые внесли, вероятно, наиболее существенный вклад в создание последовательной концепции и в выяснение детального механизма плавления двухспиральной нити ДНК. В случае денатурации белков работ такого типа не существует и, по-видимому, существовать не может. Точнее говоря, детальный механизм плавления, конформационного перехода каждого белка определяется специфической конформацией его макромолекулы, и в этом смысле механизмов и теорий должно быть столько, сколько существует различных белков. В какой-то степени общий подход возможен только после создания статистической физики систем с памятью на разных уровнях организации. Начало создания такой теории положено работами Лифшица, рассмотренными в предыдущей главе.

На протяжении многих лет при анализе денатурационных процессов чаще всего пользовались примитивным термодинамическим подходом, рассматривая денатурацию как обычную мономолекулярную химическую реакцию, в которой вещество А (нативная форма биополимера) превращается в вещество В (денатурированная форма). Предполагалось, что это превращение можно в принципе провести обратимо и при фиксированном значении внешних параметров (температура, рН, концентрация денатурирующего агента и т. д.) всегда достигается истинно равновесное соотношение между концентрациями А и В. Этого считалось достаточно, чтобы для описания денатурационного процесса применять законы действующих масс и уравнение изотермы реакции Вант-Гоффа. При обработке результатов кинетических исследований, естественно, пользовались уравнением Аррениуса, представлениями теории

абсолютных скоростей реакции и вычисляли обычными способами энергии и энтропии активации процессов. Лишь в самое последнее время в связи с развитием техники высокочувствительной микрокалориметрии начали непосредственно измерять тепловые эффекты денатурационных процессов (как, впрочем, и ряда реакций комплексообразования малых молекул с белками и реакций ассоциации макромолекул). Сравнение результатов равновесных и термодинамических измерений заставляет усомниться в законности первых. Впрочем, многие результаты равновесных исследований вызывают и сами по себе скептическое отношение. Действительно, определяемые по уравнению Вант-Гоффа тепловые эффекты и энтропии превращений (ΔH и ΔS) иногда чувствительны к методу регистрации денатурационных изменений (изменения растворимости, спектра поглощения, вязкости, оптического вращения, ферментативной активности, устойчивости к протеолизу, доступности различных химических групп), к способу проведения денатурации (тепло, добавление кислоты, добавление мочевины и других денатурирующих агентов), к незначительным изменениям солевого состава среды. Примеры этому можно найти во всех монографиях и обзорах, посвященных термодинамическим аспектам денатурации белков (см., например, [9]).

Аналогичная ситуация характерна и для активационных параметров — энергии ΔE_a и энтропии ΔS_a активации. Рассмотрим несколько примеров, иллюстрирующих определение термодинамических параметров денатурации равновесными и термодинамическими (прямыми) методами, а также определение активационных параметров по кинетическим измерениям.

Кислотная денатурация ферригемоглобина. Прямое измерение теплового эффекта этой реакции [10] было проведено при температурах 15 и 25° С. При 15° С в интервале рН 3,51—3,19 константа скорости реакции меняется от 0,031 до 0,130 мин⁻¹, а тепловой эффект процесса $\Delta H = -76 \pm 1,6$ ккал/моль. При 25° С в интервале рН 3,79—3,40 константа скорости реакции меняется от 0,029 до 0,350 мин⁻¹, а тепловой эффект меняет знак и становится равным $+10,0 \pm 0,3$ ккал/моль (положительный тепловой эффект соответствует поглощению тепла в ходе процесса). Если учесть, что при денатурации происходит свя-

зывание протонов (одинакового их числа при обеих температурах), и внести поправку на энергию, необходимую для извлечения протонов из среды (эта энергия равна нулю при 25° и +12,5 ккал/моль при 15° С), то различие между тепловыми эффектами при 15° и 25° станет еще значительнее:

$$\Delta H^{15} = -88,5 \text{ ккал/моль}, \Delta H^{25} = +10,0 \text{ ккал/моль}. \quad (5.1)$$

Таким образом, при повышении температуры на 10° тепловой эффект процесса возрастает почти на 100 ккал/моль, меняя свой знак. Это формально соответствует повышению теплоемкости при денатурации на $\Delta c_p = +9850 \text{ кал} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{град}^{-1}$ (при 20° С). Близкие величины были получены и при исследовании денатурации сывороточного альбумина [11].

С чем может быть связана такая сильная температурная зависимость теплового эффекта? В принципе ее можно объяснить двумя способами. Во-первых, этот результат может полностью определяться законом Кирхгоффа, т. е. различием теплоемкостей нативного и денатурированного состояний (тогда приведенная выше величина Δc_p имеет реальный физический смысл и не может считаться формальной). Изменение теплоемкости может быть, например, связано с тем, что в денатурированном состоянии на поверхность выходят гидрофобные группы и увеличивается энергия гидрофобного взаимодействия с растворителем. Альтернативой приведенному объяснению является предположение, согласно которому при разных температурах под влиянием кислоты наблюдаются по существу различные процессы. Это означает, что либо начальная, либо конечная структуры меняются с температурой, причем их изменения сопровождаются поглощением или выделением тепла. Такое предположение эквивалентно представлению о том, что при каждой температуре происходит другая реакция кислотной денатурации со своим тепловым эффектом. В чем принципиальное различие этих двух возможных объяснений? В первом случае изменение теплового эффекта с температурой ($\partial \Delta H / \partial T$) определяется различием теплоемкостей начального и конечного состояний (Δc_p). В рассматриваемом примере

$$\frac{\partial \Delta H}{\partial T} = \Delta c_p = 9850 \text{ кал} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{град}^{-1}. \quad (5.2)$$

Все структурные изменения в системе при этом происходят только в результате реакции денатурации (при данной постановке опыта вследствие изменения рН при фиксированной температуре, а при другой — вследствие, например, изменения температуры при фиксированном значении рН). Изменение температуры само по себе не приводит к каким-либо изменениям характеристик исходного и конечного состояний. В этом случае должно выполняться очевидное термодинамическое соотношение

$$\frac{\partial \Delta H}{\partial T} = T \frac{\partial \Delta S}{\partial T}, \quad (5.3)$$

связывающее температурный коэффициент теплового эффекта с температурным коэффициентом изменения энтропии системы в результате протекания реакции.

Если правильно второе объяснение, то при разных температурах идут, собственно говоря, разные реакции и соотношение (5.3) не должно выполняться. Ведь тогда в ΔH и ΔS должны входить величины $\Delta H'$ и $\Delta S'$, характеризующие процессы перестройки, происходящие с исходными (или конечными) соединениями под действием температуры и не связанные между собой термодинамическим соотношением типа (5.3). Пусть, например, при некоторой температуре T_1 процесс кислотной денатурации сопровождается изменением энтальпии на $\Delta H(T_1)$ и энтропии на $\Delta S(T_1)$. Проведем теперь тот же процесс при большей температуре T_2 . Конечно, закон Кирхгоффа будет выполняться и величины ΔH и ΔS изменятся за счет конечной величины Δc_p . Однако если структура исходной молекулы изменилась, т. е. произошло превращение под действием нагревания, которое характеризуется своими параметрами $\Delta H'$ и $\Delta S'$, то наблюдаемые термодинамические параметры кислотной денатурации станут равными $\Delta H(T_2) - \Delta H'$ и $\Delta S(T_2) - \Delta S'$ (для простоты принято, что структура конечного, денатурированного состояния практически не меняется с температурой). Поскольку $\Delta H'$ и $\Delta S'$ не связаны соотношением (5.3), а определяются конкретной структурой белка, то и для наблюдаемых параметров кислотной денатурации $\Delta H - \Delta H'$ и $\Delta S - \Delta S'$ соотношение (5.3) не будет выполняться. Если второе объяснение правильно, то структура исследуемого белка должна в области комнатных температур претерпевать изменения, су-

щественно влияющие на путь реакции кислотной денатурации.

Исследование того же процесса кислотной денатурации равновесными методами дало совершенно другие результаты. Определяя константу равновесия K денатурации спектрофотометрически (при денатурации изменяется спектр поглощения ферригемоглобина в видимой области спектра), Штейнхард и Цайзер [12, 13], пользуясь уравнениями Вант-Гоффа

$$K = \exp\left(\frac{\Delta S}{R}\right) \exp\left(-\frac{\Delta H}{RT}\right), \quad (5.4)$$

$$\frac{d \ln K}{d(1/T)} = -\frac{\Delta H}{R}, \quad (5.5)$$

нашли, что график зависимости $\ln K$ от $1/T$ имеет два прямолинейных участка с изломом при $15,5^\circ \text{C}$. В интервале температур от $0,2$ до $15,5^\circ \text{C}$ тепловой эффект оказался равным 32 ккал/моль , а в интервале температур от $15,5$ до 25°C — практически равным нулю.

Несовпадение результатов равновесных и прямых термодинамических измерений представляется весьма странным, если допустить, что температурная зависимость теплового эффекта полностью определяется различием теплоемкостей начального и конечного состояний, т. е. законом Кирхгоффа. С первого взгляда может показаться, что при определении теплового эффекта с помощью равновесных измерений (т. е. по тангенсу угла наклона кривой в координатах $\ln K$ и $1/T$) предполагают постоянство величин ΔH и ΔS . Однако это не так. Действительно, пусть ΔH и ΔS не зависят от температуры. Тогда из (5.4) имеем

$$\frac{dK}{dT} = K \frac{\Delta H}{RT^2}, \quad (5.6)$$

что эквивалентно соотношению (5.5).

Если ΔH и ΔS зависят от температуры, то

$$\frac{dK}{dT} = K \left(\frac{\Delta H}{RT^2} - \frac{1}{RT} \frac{\partial \Delta H}{\partial T} + \frac{1}{R} \frac{\partial \Delta S}{\partial T} \right). \quad (5.7)$$

Выполнение термодинамического соотношения (5.3) автоматически превращает (5.7) в (5.6). Таким образом, в формуле (5.5) не заложено требование температурной независимости изменений энтальпии и энтропии в ходе

исследуемого процесса, а заложено предположение, что эти изменения подчиняются (5.3). В частности, при выполнении закона Кирхгоффа, т. е. когда

$$\Delta H = \Delta H^0 + \Delta c_p T, \quad \Delta S = \Delta S^0 + \Delta c_p \ln T \quad (5.8)$$

и температурная зависимость энтальпии и энтропии превращения определяется только разностью теплоемкостей начального и конечного состояний, применение уравнения Вант-Гоффа должно давать истинные значения ΔH .

Наблюдаемые существенные расхождения результатов калориметрических и равновесных измерений, различающихся не только по величине, но и по знаку изменения ΔH с температурой, не поддаются примитивной интерпретации.

Форест и Стюртевант [10] объясняют отличие своих результатов от значений, полученных с помощью равновесных методов, предполагая, что кислотная денатурация ферригемоглобина протекает в две стадии, одна из которых не регистрируется спектрофотометрически. Пусть K_1 и K_2 — константы равновесия этих двух стадий, а ΔH_1 и ΔH_2 — соответствующие истинные (измеряемые калориметрически) молярные тепловые эффекты:



В качестве первого случая рассмотрим следующую ситуацию. Пусть спектрофотометрически регистрируется только второй переход, а спектральные характеристики А и В неразличимы (исследователь даже не подозревает о наличии промежуточного состояния В).

Пусть b_e и c_e — истинные равновесные концентрации В и С, a_0 — суммарная концентрация белка. Тогда в нашем случае спектрофотометрическое измерение даст для кажущейся константы равновесия

$$K_{\text{каж}}^{(1)} = \frac{c_e}{a_0 - c_e}. \quad (5.10)$$

Подставив сюда

$$K_1 = \frac{b_e}{a_0 - b_e - c_e}, \quad K_2 = \frac{c_e}{b_e}, \quad (5.11)$$

получим

$$K_{\text{каж}}^{(1)} = \frac{K_1 K_2}{1 + K_1}. \quad (5.12)$$

Учитывая, что, по Вант-Гоффу,

$$\frac{dK}{dT} = K \frac{\Delta H}{RT^2}, \quad (5.6)$$

после несложных преобразований находим

$$\Delta H_{\text{каж}}^{(1)} = \Delta H_2 + \frac{\Delta H_1}{1 + K_1}. \quad (5.13)$$

Вторая возможная ситуация заключается в том, что регистрируется только первый переход, а спектральные характеристики В и С неотличимы *). Тогда

$$K_{\text{каж}}^{(2)} = \frac{b_e + c_e}{a_0 - b_e - c_e} = K_1 + K_1 K_2 \quad (5.14)$$

и

$$\Delta H_{\text{каж}}^{(2)} = \Delta H_1 + \frac{K_2}{1 + K_2} \Delta H_2. \quad (5.15)$$

Рассчитаем теперь получаемое в результате термохимических измерений истинное значение энтальпии денатурации.

Пусть до начала процесса был 1 моль формы А, а в конце образовались равновесные количества b_e формы В и c_e формы С. Это означает, что превращению 1 (с молярным тепловым эффектом ΔH_1) подверглось $b_e + c_e$ молей формы А, а затем c_e молей образовавшейся формы испытало превращение 2 (с молярным тепловым эффектом ΔH_2). Отсюда

$$\Delta H_{\text{ист}} = (b_e + c_e)\Delta H_1 + c_e\Delta H_2.$$

Из (5.14), полагая $a_0 = 1$, получим

$$b_e = \frac{K_1}{1 + K_1 + K_1 K_2}, \quad c_e = \frac{K_1 K_2}{1 + K_1 + K_1 K_2},$$

*) В оригинальной работе Фореста и Стюртеванта [10] ошибочно рассматривается нереальная ситуация, когда неотличимы характеристики А и С, т. е. конечный продукт денатурации неотличим по рассматриваемому свойству (в данном случае спектрофотометрически) от исходного нативного белка. Для кислотной денатурации гемоглобина (да, по-видимому, и во всех других случаях) это явно не так: ведь тогда практически доведенную до конца денатурацию нельзя было бы зарегистрировать.

откуда

$$\Delta H_{\text{ист}} = \frac{K_1(1 + K_2) \Delta H_1 + K_1 K_2 \Delta H_2}{1 + K_1 + K_1 K_2}. \quad (5.16)$$

Если процесс идет почти до конца, т. е. если $K_1, K_2 \gg 1$, то, естественно,

$$\Delta H_{\text{ист}} = \Delta H_1 + \Delta H_2, \quad (5.17)$$

$$\Delta H_{\text{каж}}^{(1)} = \Delta H_2, \quad \Delta H_{\text{каж}}^{(2)} = \Delta H_1 + \Delta H_2. \quad (5.18)$$

Таким образом, если при измерениях реализуют сильно сдвинутое вправо равновесие, то при осуществлении первой ситуации при расчете по Вант-Гоффу измеряемой величиной является тепловой эффект второй стадии (сопровождающейся изменением свойства, по которому ведется регистрация), а при осуществлении второй ситуации должны получить истинное значение энтальпии процесса. При определении константы равновесия для расчета вант-гоффовской энтальпии работают в широкой области соотношений концентрацией денатурированного и нативного белка (меняя степень денатурации с помощью рН или температуры), в том числе и при сильно сдвинутом вправо денатурационном равновесии. Поэтому вторая ситуация, при которой регистрируется только первый переход в (5.9), по-видимому, противоречит экспериментальным данным и может не обсуждаться. Действительно, калориметрически измеренное и вант-гоффовское значения энтальпии не только резко отличаются друг от друга, но при изменении температуры даже смещаются в разные стороны. Остается рассмотреть ситуацию, при которой первая стадия в (5.9) не регистрируется, хотя сопровождается тепловым эффектом. Если равновесие сильно сдвинуто в сторону денатурированного состояния, то найденная по температурной зависимости кажущаяся энтальпия процесса, согласно (5.18), должна равняться истинной энтальпии второй стадии. Таким образом, в этом случае

$$\Delta H_1^{25} = +10 \text{ ккал/моль}, \quad \Delta H_2^{25} = 0, \quad (5.19a)$$

$$\Delta H_1^{15} = -120,5 \text{ ккал/моль}, \quad \Delta H_2^{15} = +32 \text{ ккал/моль}. \quad (5.19b)$$

Если же измерять температурную зависимость кажущейся константы равновесия $K_{\text{каж}}$ в условиях, когда последняя

близка к единице (т. е. при таких значениях рН, при которых концентрации денатурированной и неденатурированной форм сравнимы), то нетрудно показать, что экспериментальные данные по $\Delta H_{\text{наж}}$ и $\Delta H_{\text{ист}}$ ($\Delta H_{\text{ист}}$ равна при калориметрических измерениях $\Delta H_1 + \Delta H_2$) удовлетворяются лишь при

$$\begin{aligned}\Delta H_1^{25} &= 10 (1 + 1/K_1) \text{ ккал/моль,} \\ \Delta H_2^{25} &= -10/K_1 \text{ ккал/моль,}\end{aligned}\quad (5.20a)$$

$$\begin{aligned}\Delta H_1^{15} &= -120,5 (1 + 1/K_1) \text{ ккал/моль,} \\ \Delta H_2^{15} &= 32 + 120,5/K_1 \text{ ккал/моль.}\end{aligned}\quad (5.20b)$$

Уравнения (5.19) и (5.20) совместны, если при обеих температурах $K_1 \rightarrow \infty$, т. е. если равновесие $A \rightleftharpoons B$ в (5.9) полностью сдвинуто вправо. Это кажется совершенно невероятным, если вспомнить, что тепловые эффекты такого процесса должны иметь разные знаки и отличаться примерно на 130 ккал/моль (см. (5.19)). Итак, разбиение реакции кислотной денатурации ферригемоглобина на две стадии не может объяснить резких расхождений между результатами калориметрических и равновесных измерений. Возникают сомнения в безоговорочной применимости уравнения Вант-Гоффа к рассмотрению денатурации белков.

Вероятно, наиболее важным результатом проанализированных выше исследований является доказательство того, что изменение температуры в физиологической области приводит к значительным структурным перестройкам молекулы, сопровождающимся изменением ее теплосодержания. Об этом свидетельствует резкое изменение значения измеренного термохимически теплового эффекта реакции в узком интервале температур, от 15 до 25° С.

Прямое экспериментальное доказательство существования структурных перестроек глобулярных белков при изменении температуры в физиологической области дали калориметрические исследования тепловой денатурации.

Тепловая денатурация белков. Среди многочисленных типов денатурации тепловая занимает особое место, поскольку для определения термодинамических параметров процесса измеряют зависимость степени превращения от температуры, т. е. от того фактора, изменение которого и приводит к исследуемому превращению. Это обстоя-

тельство необходимо иметь в виду при обсуждении термодинамических аспектов тепловой денатурации белков. Пожалуй, наиболее существенные результаты были достигнуты при использовании микрокалориметрического метода и при сравнении полученных данных с результатами равновесных исследований. Ввиду важности этого вопроса

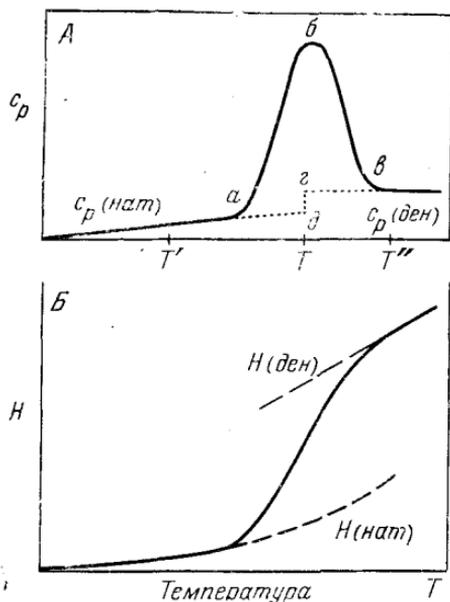


Рис. 5.1. Типичные дифференциальные (А) и интегральные (Б) калориметрические кривые химотрипсиногена в области тепловой денатурации (по [14]).

ниже будут подробно рассмотрены две работы по термодинамике тепловой денатурации глобулярных белков, выполненные в двух ведущих лабораториях мира. Начнем с результатов изучения обратной тепловой денатурации химотрипсиногена, проведенного Джексоном и Брандтсом [14]. Калориметрическое исследование сводится к измерению парциальной теплоемкости c_p белка в зависимости от температуры. Типичная дифференциальная калориметрическая кривая изображена на рис. 5.1, А. На рис. 5.1, Б показана интегральная форма той же кривой; сплошная линия на рис. 5.1, Б передает зависимость парциальной энтальпии H белка в растворе от температуры. Для нативного химотрипсиногена c_p (нат) равно $0,40 \text{ кал} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{град}^{-1}$ при 20°C и характеризуется сильной температурной зависимостью: повышение температуры на 1° увеличивает c_p на $0,7\%$. Это изменение теплоемкости с температурой не вызвано изменением взаимодействия с растворителем, а представляет собой свойство самой макромолекулы белка, так как сохраняется и для безводного химотрипсиногена. У безводного химотрипсиногена теплоемкость на 30% меньше, чем в растворе, но ее температурный коэффи-

циент ниже будут подробно рассмотрены две работы по термодинамике тепловой денатурации глобулярных белков, выполненные в двух ведущих лабораториях мира. Начнем с результатов изучения обратной тепловой денатурации химотрипсиногена, проведенного Джексоном и Брандтсом [14]. Калориметрическое исследование сводится к измерению парциальной теплоемкости c_p белка в зависимости от температуры. Типичная дифференциальная калориметрическая кривая изображена на рис. 5.1, А. На рис. 5.1, Б показана интегральная форма той же кривой; сплошная

циент остается практически неизменным (0,6% вместо 0,7%). При приближении к температуре денатурации рост c_p с температурой ускоряется, теплоемкость проходит через максимум и затем падает почти до исходной величины. Теплоемкость денатурированного химотрипсिनогена c_p (ден) характеризуется значительно меньшим температурным коэффициентом, чем теплоемкость нативного белка. Авторы рассчитывают изменение энтальпии в результате денатурации по формуле

$$\Delta H_{\text{кал}}^{\text{ден}}(T) = \int_{T'}^{T''} c_p dT - \int_{T'}^T c_p(\text{нат}) dT - \int_T^{T''} c_p(\text{ден}) dT, \quad (5.21)$$

т. е. приравнивают энтальпию перехода площади, ограниченной *абвгда*. Для проведения этой процедуры придется экстраполировать величины c_p (нат) и c_p (ден) в область перехода, в результате чего возникает денатурационный скачок теплоемкости δg (см. рис. 5.1, А). Такая процедура не вполне однозначна. Мы увидим далее, что другие авторы, экстраполируя c_p (нат) для того же белка, получили $\Delta c_p = 0$. Разделение всего температурного интервала на две области эквивалентно определению денатурации как перехода между двумя макроскопическими состояниями — нативным и денатурированным. Нативное состояние существует при всех температурах ниже начала «главного» денатурационного перехода (точка *a* на рис. 5.1, А), определяемого как область сильного изменения различных физических свойств, а денатурированное состояние существует при всех температурах выше этого перехода. Температурная зависимость c_p внутри областей, соответствующих нативному или денатурированному состояниям, трактуется как характеристика состояния, а не как его изменение, независимо от того, происходит ли изменение теплоемкости с температурой в результате обычного термического возбуждения внутренних степеней свободы макромолекулы или вследствие конформационных переходов, сопровождающихся поглощением тепла или изменением взаимодействия белка с растворителем (см. ниже § 5.6). При таком определении исходного и конечного состояний макромолекулы, между которыми происходит денатурационный переход, энтальпии перехода, измеряемые непосредственно калориметрически (по пло-

щадя *абвегда* на рис. 5.1, А), должны не слишком отличаться от вант-гоффовских равновесных значений $\Delta H_{\text{ВГ}}^{\text{ден}}$; последние находят по тому же графику зависимости константы равновесия K от температуры с использованием формулы (5.6), причем K принимается равным отношению соответствующих площадей под кривой рис. 5.1, А. Результаты измерений $\Delta H_{\text{кал}}^{\text{ден}}$ и $\Delta H_{\text{ВГ}}^{\text{ден}}$ для денатурации химотрипсиногена при разных рН приведены в табл. 5.1.

Рассчитанные значения константы равновесия в вант-гоффовских координатах ($\ln K$ и $1/T$) не ложатся на прямую, что, естественно, следует из неравенства нулю Δc_p . Приведенные в таблице значения $\Delta H_{\text{ВГ}}^{\text{ден}}$ относятся к температуре, соответствующей максимуму c_p на рис. 5.1, А.

Таблица 5.1

рН	$T, ^\circ\text{C}$	$\Delta H_{\text{кал}}^{\text{ден}}$, ккал·моль ⁻¹	Δc_p , ккал·моль ⁻¹ ·град ⁻¹	$\Delta H_{\text{ВГ}}^{\text{ден}}$, ккал·моль ⁻¹
1,95	40,6	103	4200	94
2,03	42,0	102	3300	98
2,08	42,0	99	3900	98
2,59	48,0	126	3200	126
2,99	53,9	145	2800	133
3,02	54,2	135	2800	134

Как видно из табл. 5.1, имеется достаточно хорошее совпадение между калориметрическими и равновесными значениями $\Delta H^{\text{ден}}$. Скачок Δc_p при температуре перехода авторы объясняют конформационным изменением белка (выходом гидрофобных групп на поверхность глобулы) при денатурации, тогда как не менее существенные изменения c_p (нат) в области низких температур не считаются изменением состояния молекулы.

Полученное таким способом совпадение $\Delta H_{\text{кал}}^{\text{ден}}$ и $\Delta H_{\text{ВГ}}^{\text{ден}}$ авторы считают свидетельством в пользу одноступенчатого характера денатурационного процесса.

Пожалуй, наиболее интересным результатом проведенных исследований является доказательство наличия существенных изменений теплоемкости нативного белка в физиологической области температур задолго до регистрации главного денатурационного процесса. Эти измене-

ния c_p (обнаруженные, кстати, многими авторами у всех изученных белков) наблюдаются в широких температурных интервалах и происходят весьма плавно: никаких скачкообразных предденатурационных изменений c_p никогда не отмечается.

Тепловая денатурация химотрипсиногена (и некоторых других белков) была изучена также калориметрически

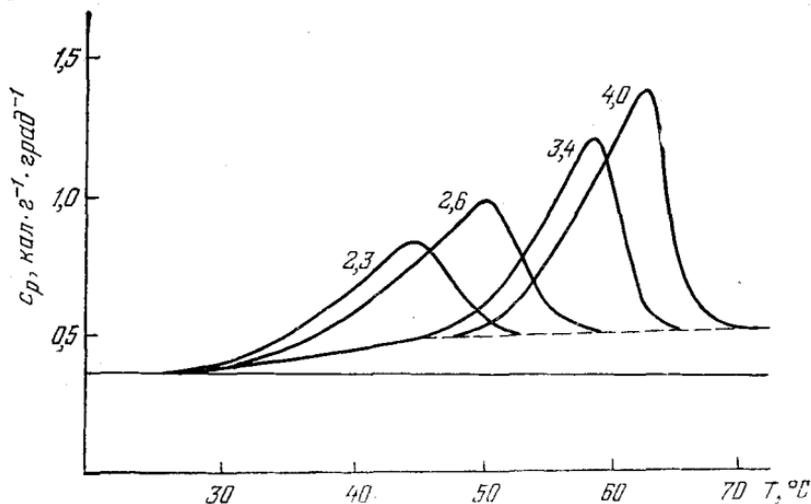


Рис. 5.2. Калориметрические кривые химотрипсиногена при различных рН (по [15]).
Числа у кривых указывают значения рН.

Приваловым, Хечилашвили и Атанасовым [15]. Применяемая ими методика исследования и их экспериментальные кривые практически не отличались от только что рассмотренных. Однако обрабатывали эти кривые авторы другим способом. На рис. 5.2 показаны типичные калориметрические записи для нескольких значений рН. Парциальная теплоемкость химотрипсиногена при 20° С оказалась равной 0,4 $\text{кал} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{град}^{-1}$, как и в предыдущей работе. Однако, по мнению Привалова с сотрудниками, c_p (нат) не меняется до 28° С, после чего повышается при всех исследованных значениях рН. Авторы относят наблюдаемые изменения теплоемкости к двум стадиям: предденатурационной и денатурационной. Разделение на две стадии получают и в том случае, когда за изменениями белка сле-

дят по температурным изменениям экстинкции ϵ при 2820 Å (рис. 5.3). Точное разделение на стадии проводится так, чтобы результаты спектрофотометрических измерений для второй денатурационной стадии ложились (в вант-гоффовских координатах) на одну прямую. Таким образом,

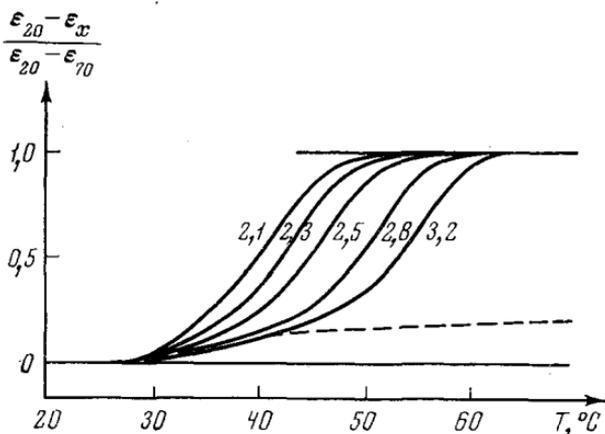


Рис. 5.3. Зависимость экстинкции при 2820 Å раствора химотрипсиногена от температуры при разных значениях рН (по [15]).

постулируется независимость $\Delta N_{\text{ВГ}}^{\text{ден}}$ от температуры (в отличие от предположения, сделанного в предыдущей работе). Авторы постулируют также, что теплоемкость меняется только в ходе первой, предденатурационной, стадии (пунктир на рис. 5.2) и, следовательно, денатурационный скачок теплоемкости в этом случае отсутствует. Рассчитанные при таком предположении калориметрические значения энтальпии денатурации $\Delta N_{\text{кал}}^{\text{ден}}$ весьма близки к равновесным (табл. 5.2).

Таблица 5.2

рН	$\Delta N_{\text{ВГ}}^{\text{ден}}$, ккал·моль ⁻¹	$\Delta N_{\text{кал}}^{\text{ден}}$, ккал·моль ⁻¹	$\Delta N_{\text{кал}}^0$, ккал·моль ⁻¹
2,3	75	78	105
2,6	100	102	140
2,8	105	110	155
3,4	132	130	182
4,0	143	140	200
5,0	145	148	207

Можно сделать и другое предположение о температурном ходе истинной теплоемкости, например, считать, что c_p изменяется только при второй, денатурационной, стадии процесса или на протяжении обеих стадий пропорционально поглощенному теплу. В последнем случае получают значения суммарной энтальпии процесса $\Delta H_{\text{кал}}^0$, приведенные в четвертом столбце табл. 5.2. Вычитая из $\Delta H_{\text{кал}}^0$ соответствующее значение $\Delta H_{\text{ВГ}}^{\text{ден}}$, можно оценить тепло, поглощенное в первой, предденатурационной, стадии ($30-60$ ккал·моль⁻¹). Полученные значения недостаточно точно совпадают с оценками теплового эффекта первой стадии, сделанными в соответствии с уравнением Вант-Гоффа по крутизне перехода. Конечно, оценки эти недостоверны: первая и вторая стадии частично перекрываются, а выделение денатурационной стадии постулированием независимости ее энтальпии от температуры вряд ли достаточно обосновано. Тем не менее авторы считают возможным принять, что изменение c_p происходит только в предденатурационной стадии. Ввиду того, что на нее частично налагается вторая стадия, авторам не удается выделить площадь, соответствующую поглощенному теплу. На основании этого они приходят к несколько странному выводу о том, что в предденатурационной стадии тепло вообще не поглощается и не выделяется, а происходит только изменение теплоемкости. Вряд ли, однако, столь сильные изменения теплоемкости с температурой могут обуславливаться только термическим возбуждением внутримолекулярных степеней свободы. Сами авторы полагают, что изменения теплоемкости в основном связаны с изменением числа контактов гидрофобных групп белка с растворителем (напомним, что именно таким способом Джексон и Брандтс объясняли постулированный ими скачок c_p при денатурации). Если непредвзято отнестись к экспериментальным данным, то можно прийти к следующей картине процесса. При увеличении температуры (начиная с комнатной) наблюдаются значительно большие изменения теплосодержания белка в растворе, чем можно было бы ожидать, исходя из тривиального повышения теплоемкости за счет термического возбуждения внутримолекулярных степеней свободы. Начиная с некоторой области температур, изменения энтальпии становятся более интенсивными, а затем снова

замедляются. Изменения энтальпии системы в предденатурационной стадии по порядку величины сравнимы с денатурационными изменениями.

Так или иначе, и те и другие изменения сопровождаются изменениями структуры макромолекулы (что, в частности, отражается и на ее взаимодействии с растворителем). Может быть, предденатурационная стадия соответствует конфигурационным изменениям, а денатурационная — конформационным переходам (см. сноску на стр. 70). В более поздних работах Привалов [16—19] вновь возвращается к калориметрическим измерениям предденатурационных изменений и тепловой денатурации глобулярных белков и приводит соответствующие данные для лизоцима, химотрипсина, химотрипсиногена, миоглобина, цитохрома *c* и рибонуклеазы. По сравнению с рассмотренной выше работой [15] имеются некоторые незначительные изменения, относящиеся как к самим экспериментальным данным, так и к их трактовке. В средней точке денатурации появляется скачок теплоемкости, как в работе Джексона и Брандтса [14]. Линейное возрастание c_p с температурой наблюдается, начиная с низших использованных в работе температур (20°C). Автор считает, что изменения, происходящие в белке при нагревании, можно разделить на две качественно различные стадии: стадию линейного возрастания теплоемкости и стадию интенсивного поглощения тепла. Изменение энтальпии во второй, денатурационной, стадии (как всегда, деление единой кривой на части, соответствующие двум стадиям, вносит некоторый, хотя и незначительный, произвол в количественные оценки) практически совпадает во всех случаях с равновесным значением, вычисленным в соответствии с уравнением Вант-Гоффа по форме калориметрической кривой.

Рассматривая предденатурационную стадию, Привалов приходит к важному выводу о том, что ее нельзя интерпретировать как тривиальное изменение теплоемкости с температурой. Исследуя изменения спектра поглощения в предденатурационном и денатурационном интервалах температур, автор обращает внимание на существование четко выраженных изобестических точек в предденатурационном интервале (от 20 до 65°C при $\text{pH } 3,0$). На основании этого можно прийти к выводу о сосуществовании в данном

интервале температур двух конформационных состояний, переходящих друг в друга. Однако не исключена и возможность ряда последовательных переходов. Действительно, не каждый конформационный переход должен обязательно приводить к изменению спектра поглощения гема.

С первого взгляда может показаться, что существует принципиальное расхождение между рассмотренными выше данными по кислотной и тепловой денатурации белков. Мы видели, что при кислотной денатурации ферригемоглобина калориметрический и равновесный (вант-гоффовский) тепловые эффекты процесса резко отличались друг от друга. В то же время для тепловой денатурации удается получить вполне удовлетворительное согласие между калориметрическими и равновесными значениями энтальпии процесса путем незначительной «подгонки» (более или менее произвольного разделения на стадии или произвольной экстраполяции изменений c_p (нат) в область денатурационного перехода). Однако это расхождение результатов двух типов экспериментов вполне понятно. Мы видели, что в случае кислотной денатурации не выполняется термодинамическое условие (5.3) и уравнение Вант-Гоффа неприменимо. Нарушение условия (5.3) связано в свою очередь с тем, что с изменением температуры происходит постепенная структурная перестройка макромолекулы, меняется ее энтальпия, т. е., по существу, проходит химическое превращение, характеризующееся определенными значениями ΔH и ΔS , не связанными между собой соотношением (5.3). Поэтому, если исследовать кислотную денатурацию при разных температурах, то в результирующую зависимость измеряемого теплового эффекта от температуры внесет вклад не только разница теплоемкостей нативного и денатурированного белка (если она есть), но и изменение теплосодержания нативного белка (и, возможно, пути денатурационного процесса) за счет его структурной перестройки с температурой. В результате суммарный тепловой эффект кислотной денатурации будет зависеть от температуры, не подчиняясь соотношению (5.3), уравнение Вант-Гоффа не будет выполняться, и равновесные измерения ΔH и ΔS теряют смысл.

Мы увидим далее, к каким ошибкам может привести в этом случае подстановка экспериментальных данных в уравнение Вант-Гоффа.

Вместе с тем, если температура используется не только для построения вант-гоффовской анаморфозы, но является параметром, изменение которого и вызывает изучаемый процесс, ситуация становится совершенно другой. В этом случае (тепловая денатурация) при изменении температуры происходит само превращение, а начальные условия выбираются одинаковыми для калориметрического и равновесного измерений. Выбор той области изменений параметра, которую следует считать соответствующей изучаемому переходу, и производится в значительной мере так, чтобы выполнялось соотношение (5.3). Поэтому всегда возможно выделение той части перехода, для которой совпадают калориметрические и равновесные измерения, при условии, что весь переход происходит достаточно симметрично относительно температуры. Если тем или иным способом относить все изменения исходного и конечного состояний, не позволяющие сопоставлять калориметрические и равновесные данные, к собственным характеристикам этих макроскопических состояний, было бы странно, если бы *не удалось* подобрать часть превращения, для которой такое сопоставление можно провести (см. также § 5.6).

Как уже отмечалось, главным результатом калориметрических исследований тепловой денатурации глобулярных белков следует считать твердое установление постепенных предденатурационных изменений в широкой области физиологических температур. Следует отметить, что калориметрические данные свидетельствуют о монотонности во всех изученных белках изменения термодинамических параметров в широком температурном интервале.

К выводу о заметных структурных перестройках белков при сравнительно низких температурах можно прийти в результате анализа многочисленных экспериментов, выполненных самыми различными методами. Соответствующие данные и литературные ссылки можно найти, например, в широко известных монографиях [20, 21]. Следует отметить, что большое число примеров относится к резкому изменению активационных параметров ферментативных реакций в узком интервале температур (изломы на аррениусовских анаморфозах). Эти результаты будут более подробно рассмотрены далее. В монографии [20] приведены также данные по изменению других физических характе-

ристик (степень поляризации флуоресценции, константа скорости затухания фотохемилюминесценции, квантовый выход фотоинактивации, положение максимума в спектре флуоресценции) белков в интервале температур 10—40° С. Наблюдаемые кривые в участках перехода, как правило, весьма пологи, и говорить о совпадении точек перехода при исследовании одного белка разными методами можно только с большой натяжкой. Однако сомнений в том, что в изученном интервале температур в белковых макромолекулах происходят какие-то структурные перестройки, возникнуть не может.

Калориметрические исследования процессов денатурации белков [22—24] также показали сильные изменения истинного теплового эффекта с температурой, которые можно трактовать как свидетельство о существенных тепловых перестройках макромолекул и вне денатурационной области.

О кинетике денатурационных процессов. Измерению кинетических параметров денатурации белков посвящено огромное количество работ. Для обработки результатов кинетических исследований (как и всегда при изучении скоростей биохимических процессов) почти все авторы этих работ прибегают к уравнению Аррениуса

$$\kappa = A \exp(-\Delta E_a/RT) \quad (5.22)$$

и основному уравнению теории активированного комплекса (теории Эйринга — Поляни)

$$\kappa = (kT/h) \exp(\Delta S_a/R) \exp(-\Delta E_a/RT), \quad (5.23)$$

где κ — константа скорости реакции, ΔE_a — энергия или энтальпия активации *), ΔS_a — энтропия активации, k — постоянная Больцмана, h — постоянная Планка, R — газовая постоянная.

Предполагая, что температурная зависимость константы скорости практически полностью обусловлена экспоненциальным сомножителем в (5.22), находят ΔE_a и A , а затем из (5.23) вычисляют ΔS_a .

*) Некоторые авторы делают различие между энергией ΔE_a и энтальпией ΔH_a активации, полагая $\Delta H_a = \Delta E_a - RT$. Величина ΔS_a в (5.23) увеличивается на R . Можно показать, что это различие основано на недоразумении (см. § 5.3).

Таким образом, основными параметрами, по величине которых судят о механизме и кинетических особенностях денатурационного процесса (а также многих других биохимических процессов); оказываются ΔE_a и ΔS_a . Получая большие положительные значения ΔS_a , говорят о «хаотизации» системы в активированном состоянии, оценивают относительную роль энергетических и энтропийных факторов в протекании процесса и т. д.

Следует четко понимать, что применение уравнений типа (5.22) и (5.23) основано на представлении о существовании активированного состояния, *находящегося в равновесии* с исходным. Величина ΔE_a должна иметь смысл теплового эффекта реакции перехода системы из исходного в активированное состояние. Мы видели уже, что при определении тепловых эффектов денатурационных процессов из равновесных измерений с использованием уравнения Вант-Гоффа (в этом смысле полностью идентичного уравнению Аррениуса (5.22)) могут получаться величины, не имеющие ничего общего с истинными. Однако, когда речь идет о термодинамических параметрах, всегда возможно непосредственное калориметрическое измерение интересующих нас тепловых эффектов. Для кинетических активационных параметров такой возможности нет, что заставляет относиться с осторожностью к полученным по Аррениусу значениям и к физическому смыслу этих параметров. Рассмотрение имеющихся литературных данных усиливает нашу подозрительность. Приведем лишь один пример.

Окунуки [25] провел кинетическое исследование денатурации кристаллической α -амилазы из *Bacillus subtilis* под действием различных денатурирующих агентов. Мерой степени денатурации служила скорость ферментативного гидролиза белка протеиназой, выделенной из той же культуры (денатурация приводит к ускорению протеинолиза). Кинетические кривые денатурации хорошо описывались уравнениями для реакции первого порядка. Температурная зависимость констант скоростей подчинялась уравнению Аррениуса. Результаты приведены в табл. 5.3 (значения k и ΔF_a относятся к 50° С; рН равнялось 8,0, а при денатурации кислотой 4,5).

Как мы видим, при разных способах денатурации реально наблюдаемая скорость процесса меняется не более

Таблица 5.3

Денатурирующий агент	k , сек ⁻¹	ΔF_a , ккал·моль ⁻¹	ΔH_a , ккал·моль ⁻¹	ΔS_a , э. е.
6M мочевины	$1,73 \cdot 10^{-4}$	24,6	32,8	25,4
То же + 0,05M CaCl ₂	$3,95 \cdot 10^{-5}$	25,5	32,8	22,4
Тепло	$1,12 \cdot 10^{-5}$	26,4	67,6	127,5
То же + 0,05M CaCl ₂	$4,18 \cdot 10^{-7}$	28,4	67,6	121,5
Кислота	$7,07 \cdot 10^{-4}$	23,7	39,5	49,5
То же + 0,05M CaCl ₂	$5,10 \cdot 10^{-5}$	25,4	39,5	43,7

чем на 3 порядка, что соответствует изменению однозначно связанной с константой скорости величины ΔF_a (свободной энергии активации) не более чем на 4,7 ккал/моль. Вместе с тем вычисляемые с помощью уравнений (5.22), (5.23) величины ΔH_a и ΔS_a меняются на 34,8 ккал/моль и 105,1 э. е. соответственно, что отвечает изменению экспоненциального и предэкспоненциального сомножителей в уравнении (5.22) на 24 порядка. Колоссальная величина этих изменений, которую нельзя проверить никакими прямыми методами измерения, весьма подозрительна.

В ряде работ были измерены скорости конформационных изменений, сопровождающих денатурацию белков после внезапного прекращения действия агента, вызвавшего денатурацию. Эти внутримолекулярные превращения оказались довольно медленными. Так, например, за конформационными изменениями кислотной денатурированной стафилококковой нуклеазы, вызванными внезапным доведением pH до нейтральных значений, следили по изменению интенсивности триптофановой флуоресценции [26]. Конформационные изменения протекают в две последовательные стадии: быстрая с $\tau_{1/2} \approx 0,055$ сек, не зависящая от температуры, и медленная, ускоряющаяся при повышении температуры ($\tau_{1/2}$ уменьшается от 0,60 до 0,15 сек при повышении температуры от 13 до 38° С). По-видимому, в результате первой стадии белок переходит не в исходное, а в другое, кинетически более доступное состояние, затем медленно релаксирующее к исходному.

Для ряда ферментов, за денатурацией которых следили оптическими методами, а также по восстановлению ферментативной активности, Тейпель и Кошланд [27, 28] обнаружили еще более медленные процессы (первая

стадия, сопровождавшаяся существенными структурными изменениями, длилась 1 мин, а вторая стадия, при которой происходило восстановление активности, но структурные изменения были незначительны, требовала на два порядка больше времени).

§ 5.3. О РЕАЛЬНОСТИ РАЗЛИЧИЙ МЕЖДУ ЭНЕРГИЕЙ И ЭНТАЛЬПИЕЙ АКТИВАЦИИ

Во многих монографиях и обзорах, излагающих теорию абсолютных скоростей реакций (см., например, [29, 30]), выводится формула, в которую превращается уравнение Эйринга — Поляни при замене энтальпии активации ΔH_a , фигурирующей в теории, на так называемую «экспериментальную» энергию активации $\Delta E_{\text{эксп}}$, определяемую по Аррениусу. Оказывается, что в этом случае вместо

$$\kappa = \frac{kT}{h} \exp\left(\frac{\Delta S_a}{R}\right) \exp\left(-\frac{\Delta H_a}{RT}\right) \quad (5.24)$$

следует писать *)

$$\kappa = e \frac{kT}{h} \exp\left(\frac{\Delta S_a}{R}\right) \exp\left(-\frac{\Delta E_{\text{эксп}}}{RT}\right). \quad (5.25)$$

Повторим вывод (5.25), содержащийся в цитированных работах. Экспериментальная энергия активации определяется по температурной зависимости константы скорости реакции с помощью эмпирического уравнения Аррениуса

$$\kappa = A \exp\left(-\frac{\Delta E_{\text{эксп}}}{RT}\right), \quad (5.26)$$

$$\frac{d \ln \kappa}{dT} = \frac{\Delta E_{\text{эксп}}}{RT^2}. \quad (5.27)$$

Вместе с тем из (5.24) следует, что

$$\frac{d \ln \kappa}{dT} = \frac{1}{T} + \frac{\Delta H_a}{RT^2}. \quad (5.28)$$

*) Иногда указывают, что (5.25) справедливо лишь для мономолекулярных газовых реакций и для всех реакций в конденсированной фазе, где образование активированного комплекса не сопровождается изменением удельного объема. В других случаях вместо множителя e могут стоять e^2 , e^3 и т. д. Мы ограничимся здесь рассмотрением наиболее простого случая, т. е. (5.25).

Сопоставляя (5.27) и (5.28), находим

$$\Delta H_a = \Delta E_{\text{эксп}} - RT. \quad (5.29)$$

Подставляя (5.29) в (5.24), получаем (5.25).

Попробуем выяснить смысл отдельных этапов вывода. В теоретическом уравнении (5.24) ΔH_a и ΔS_a — постоянные*) величины, значения которых для конкретной системы можно в принципе вычислить. В эмпирическом уравнении (5.26) A и $\Delta E_{\text{эксп}}$ считаются постоянными. Ясно, что ни при каких значениях *постоянных* ΔH_a , ΔS_a , A и $\Delta E_{\text{эксп}}$ кривые, описываемые уравнениями (5.24) и (5.26), совпасть не могут. Приравнивание друг к другу уравнений (5.27) и (5.28) имеет следующий очевидный смысл. Для данных значений двух независимых величин $\Delta E_{\text{эксп}}$ и ΔH_a находят температуру, при которой одинаковы наклоны графиков (5.24) и (5.26), построенных в координатах $\lg \kappa$ и $1/T$.

Таким образом, (5.29) есть уравнение для нахождения температуры, при которой логарифмические анаморфозы кривых (5.24) и (5.26) имеют одинаковый наклон.

Подстановка (5.29) в (5.24) с T в качестве переменной величины лишена физического смысла.

Когда экспериментатор обрабатывает результаты кинетических исследований с помощью теории активированного комплекса (т. е. вычисляет ΔS_a), подставляя в (5.24) $\Delta E_{\text{эксп}}$ вместо ΔH_a , он молчаливо предполагает, что активационный барьер равен энтальпии процесса превращения исходных продуктов в активированный комплекс, а температурная зависимость предэкспоненциального множителя не проявляется из-за узости температурного интервала и разброса экспериментальных данных. Другого смысла использование аррениусовской энергии активации в формулах теории активированного комплекса не имеет.

§ 5.4. НЕКОТОРЫЕ РЕАКЦИИ С УЧАСТИЕМ БЕЛКОВ

В последние годы появились надежные калориметрические данные, относящиеся к образованию комплексов глобулярных белков с низкомолекулярными соединениями и другими белками и также свидетельствующие о структур-

*) Или зависящие от температуры, но связанные соотношением (5.3). Никаких принципиальных изменений в последующие рассуждения это не вносит.

ных изменениях в области низких температур. Рассмотрим несколько примеров.

Адамс и Вейсс [31] провели калориметрическое исследование реакции между гемоглобином и гаптоглобином — глобулярным белком (молекулярный вес 85 000), повышающим пероксидазную активность гемоглобина. Энтальпии комплексообразования ΔH при температурах 4, 20 и 37° С оказались равными +7,2, —29,7 и —70,2 ккал/моль соответственно*). Величина наблюдаемого эффекта соответствует тем температурным зависимостям, которые регистрируются при денатурации белков, но знак эффекта противоположен — при понижении температуры энтальпия превращения становится положительной. Авторы объясняют этот результат, как и в случае денатурации, различием между теплоемкостями начального и конечного состояний, обусловленным изменением числа контактов между гидрофобными группами и растворителем. Для объяснения другого знака эффекта им приходится предположить, что в ассоциате гидрофобные группы еще глубже запряты в глобулу, т. е. в этом отношении ассоциат более нативен, чем исходные макромолекулы.

Еще в 1966 г. Кларк [33] определил температурную зависимость константы равновесия этой реакции по тушению флуоресценции при титровании гаптоглобина гемоглобином. В интервале от 5 до 30° С константа равновесия практически не зависела от температуры. Таким образом, применение уравнения Вант-Гоффа дает для этой реакции $\Delta H = 0 \pm 2$ ккал/моль, т. е. величину, не имеющую ничего общего с истинной, калориметрически измеренной энтальпией реакции.

Имеется ряд работ, посвященных калориметрии процесса связывания ингибиторов с некоторыми глобулярными белками-ферментами. Шао и Стюртевант [34] измерили тепловые эффекты связывания индола, N-ацетил-d-триптофана и профлавина с α -химотрипсином и получили при рН 7,8 и температуре 25° С соответственно —25,2; —19,0 и —11,3 ккал/моль. В то же время константа равновесия реакции N-ацетил-d-триптофана с α -химотрипсином при рН 7,9 и 5° С [35] практически совпадает с ее

*) Недавно эти измерения были повторены [32]. Реакция оказалась более сложной, чем это предполагали Адамс и Вейсс, но основные количественные результаты остались теми же.

константой равновесия при рН 7,9 и 25° С [36], что дает, по Вант-Гоффу, нулевую энтальпию превращения. Вместе с тем Япель [37] измерил температурную зависимость констант равновесия реакции индола и N-ацетил-*d*-триптофана с α -химотрипсином при рН 8,0 и получил, по Вант-Гоффу, для ΔH значения — 22,6 и 9,8 ккал/моль соответственно. Таким образом, равновесные измерения различных авторов с использованием уравнения Вант-Гоффа и в данном случае дают неправильные и не совпадающие между собой результаты. Шао и Стюртевант приходят к выводу о том, что значительная часть тепловых эффектов, регистрируемых калориметрически при связывании ингибиторов с химотрипсином, обусловлена конформационными изменениями белка.

Этот вывод подтверждается систематическими исследованиями термодинамических параметров взаимодействия ингибиторов с α -химотрипсином, проведенными Шао в широком диапазоне условий [38]. Во всех случаях зарегистрированы конформационные изменения белка в результате связывания ингибитора, причем эти изменения тем сильнее, чем больше ферментативная активность (при рН 7,8 наблюдаются значительно более существенные конформационные изменения, чем при рН 5,6). Присоединение ингибитора сопровождается изменением числа протонов, связанных с белком, что может рассматриваться как дополнительное свидетельство в пользу конформационных изменений. Это освобождение протонов сильно зависит от температуры и даже переходит в их поглощение при 25° С.

Аналогичные эффекты были найдены Гинцем, Шао и Стюртевантом [39] при калориметрическом изучении связывания ингибитора гекситол-1,6-дифосфата с ферментом альдолазой. Рассмотрим эту работу более подробно. При связывании ингибитора увеличивается протонизация белка (число протонов, связанных одной молекулой белка, возрастает при всех исследованных температурах на $1,4 \pm \pm 0,2$ в результате образования комплекса с ингибитором при насыщающих концентрациях последнего). Авторы ввели поправку на теплоту, необходимую для извлечения этих протонов из буфера, и определили энтропию связывания ΔH , ингибитора при его насыщающих концентрациях, когда каждая молекула белка в среднем связы-

вают 2,7 молекулы ингибитора. Измерения показали сильную линейную зависимость ΔH_b от температуры (табл. 5.4).

Таблица 5.4

$T, ^\circ K$	278	283	288	293	298	303	308	313	318
$\Delta H_b,$ ккал/моль	23,3	17,8	12,3	6,8	1,3	-4,3	-9,8	-15,3	-20,8
$\Delta G_b^0,$ ккал/моль	-5,91	-6,38	-6,75	-7,03	-7,23	-7,31	-7,32	-7,23	-7,05
$\Delta S_b^0, \text{ э. е.}$	104,8	85,2	65,9	47,0	28,4	10,1	-7,9	-25,6	-43,1
$\lg K_b$	4,62	4,90	5,10	5,22	5,30	5,25	5,16	5,00	4,88

Авторы, как обычно, объясняют эту зависимость изменением теплоемкости белка при связывании ингибитора и находят $\Delta c_p = -410 \text{ ккал} \cdot \text{град}^{-1}$ на моль связанного ингибитора. Далее производится следующая измерительная и расчетная процедура. С помощью калориметрического титрования определяют константу равновесия связывания ингибитора I ферментом E при 25° C:

$$K_b = \frac{[EI]}{\{[E_s] - [EI]\} \{[I_0] - [EI]\}}. \quad (5.30)$$

Затем по формуле

$$\Delta G_b^0 = -RT \ln K_b \quad (5.31)$$

находят стандартную свободную энергию связывания при 25° C. Потом с помощью уравнения Гиббса — Гельмгольца

$$\frac{\Delta G_b^{0(1)}}{T_1} - \frac{\Delta G_b^{0(2)}}{T_2} = \Delta H'_b \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) - \Delta c_p \ln \frac{T_1}{T_2}, \quad (5.32)$$

где

$$\Delta H'_b = \Delta H_b - \Delta c_p T \approx 328,9 \text{ ккал/моль}, \quad (5.33)$$

вычисляют значения ΔG_b^0 при других температурах. После этого с помощью стандартного термодинамического соотношения

$$\Delta S_b^0 = \frac{\Delta H_b - \Delta G_b^0}{T} \quad (5.34)$$

рассчитывают величины ΔS_b^0 при разных температурах. Величины ΔG_b^0 , ΔS_b^0 и вычисленные по уравнению (5.31) величины K_b также приведены в табл. 5.4. Рассмотрим подробнее процедуру и результаты этого расчета. Итак, прямой эксперимент показал, что тепловой эффект связывания низкомолекулярного ингибитора с белком сильно зависит от температуры. В расчете принимается, что вся эта зависимость обусловлена существованием *постоянной* разности Δc_p теплоемкостей исходного состояния (2,7 молекулы свободного ингибитора + свободный белок) и конечного состояния (комплекс). Таким образом, на этой стадии расчета постулируется, что Δc_p не зависит от температуры и все структурные перестройки, происходящие

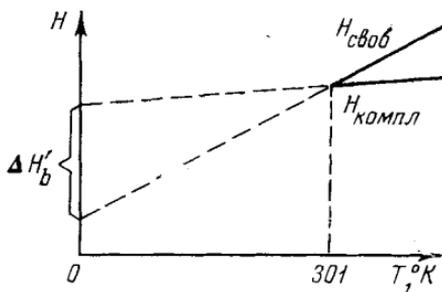


Рис. 5.4. К нахождению величины $\Delta H'_b$.

в системе, обусловлены только связыванием ингибитора. Экстраполированное к абсолютному нулю температуры значение энтальпии перехода ΔH_b оказывается неправдоподобно большим. Процедуру нахождения этой величины иллюстрирует рис. 5.4, на котором представлена постулированная зависимость от температуры теплодержаний исходных ($H_{\text{своб}}$) и конечных ($H_{\text{компл}}$) продуктов реакций. Следует отметить, что абсолютный наклон прямых $H(T)$ произволен. Эксперимент и расчет фиксируют только Δc_p , т. е. угол между двумя прямыми.

Для нахождения ΔS_b^0 можно было бы обойтись и без уравнения (5.32). Если единственной причиной температурной зависимости энтальпии превращения является постоянная разность Δc_p , то, определив из уравнений (5.30), (5.31) и (5.34) значение ΔS_b^0 при 25° С (при которой была экспериментально определена константа равновесия), можно, воспользовавшись формулой (5.8), сразу найти ΔS_b^0 для любой другой температуры:

$$\Delta S_b^{0(1)} - \Delta S_b^{0(2)} = \Delta c_p \ln (T_1/T_2). \quad (5.35)$$

Естественно, результаты были бы теми же. Таким образом, в основу расчета положены два постулата: выполнение условия (5.3) и независимость Δc_p от температуры. Учитывая все сказанное выше о практически всегда обнаруживаемых перестройках глобулярных белков при физиологических температурах, следует отметить, что выполнение обоих постулатов представляется весьма сомнительным. С помощью этих расчетов авторы получают значения констант равновесия для комплексообразования при разных температурах (см. табл. 5.4). Естественно, найденные значения не ложатся на прямую в координатах $\lg K_b$ и $1/T$ и, более того, K_b имеет максимум при 25°C (т. е. при той единственной температуре, при которой эта величина была действительно измерена). Было бы интересно получить непосредственно значения K_b и при остальных температурах.

Эта работа была столь подробно рассмотрена лишь в качестве примера. Аналогичные результаты были получены и при изучении других систем, например, при образовании комплекса между коферментом никотинамидадениндинуклеотидом (НАД) и ферментом глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой [40]. Обработка полученных данных была проведена с помощью той же процедуры, что и в рассмотренной выше работе (равновесные измерения проведены путем регистрации тушения триптофановой флуоресценции белка при комплексообразовании), за тем исключением, что величина K_b непосредственно измерялась при тех же температурах. Были получены следующие значения:

$T, ^\circ\text{K}$	278,2	298,2	313,2
$K_b, \text{моль}^{-1}$	$6,55 \cdot 10^5$	$2,36 \cdot 10^5$	$1,05 \cdot 10^5$

Прямые калориметрические измерения дали при этих температурах приведенные ниже величины ΔH_b (в ккал на 1 моль связанного НАД).

$T, ^\circ\text{K}$	278	298	313
ΔH_b	-1,9	-12,4	-20,1
ΔS_b°	+19,9	-16,8	-41,6

Значения ΔS° были рассчитаны с помощью тех же равновесных формул, что и в предыдущей работе, т. е. в пред-

положении о выполнении обоих сформулированных выше постулатов и, следовательно, о применимости уравнения Вант-Гоффа.

Вместе с тем расчет по уравнению Вант-Гоффа на основе данных о K_b дает для всего изученного интервала температур $\Delta H_b = -9,0 \pm 1,0$ ккал на 1 моль НАД, что резко отличается от истинных калориметрических значений ΔH_b (и от $\Delta H'_b$, вычисляемого по уравнению (5.33) и равного 143,08 ккал на 1 моль НАД). Это расхождение заставляет серьезно сомневаться в выполнении постулатов, на которых основано применение равновесных методов и проводимых авторами расчетов.

То обстоятельство, что любые локальные микрохимические изменения белковой макромолекулы (присоединение низкомолекулярного лиганда, окисление или восстановление иона переходного металла в активном центре и т. п.) способны приводить к существенным конформационным или конфигурационным перестройкам биополимера, можно считать в настоящее время твердо установленным. Об этом косвенно свидетельствуют многочисленные работы по влиянию таких локальных изменений на физические характеристики (дисперсия оптического вращения, вязкость, растворимость, седиментационные константы и т. п.), на устойчивость к действию протеолитических ферментов и денатурирующих агентов. Нет возможности привести все литературные ссылки (см., например, [25, 41—42]). За последние годы были получены более прямые доказательства эффектов этого типа благодаря широкому применению методов флуоресцентных и спиновых меток и парамагнитного зонда. Было, в частности, твердо установлено, что присоединение субстрата к активному центру фермента может существенно изменить окружение метки, присоединенной в другом месте белковой глобулы (см., например, [43]).

В работе [44] получены весьма красивые результаты по конформационным переходам, индуцируемым присоединением ингибиторов (мономера, димера и тримера *N*-ацетилглюкозамина) к лизоциму. Исследование проведено методом протонного магнитного резонанса (ПМР) с высоким разрешением на частоте 270 Мгц. На этой частоте удается разрешить и идентифицировать сигналы ПМР алифатических и ароматических протонов отдельных

аминокислотных остатков. Анализ положений и ширины сигналов ПМР показал, что присоединение ингибитора сопровождается существенными смещениями аминокислотных остатков, локализованных в разных участках полипептидной цепочки. Присоединение ингибитора не только меняет конформацию молекулы лизоцима, но и меняет ее конформационную подвижность: частота спонтанных общих и локальных конформационных перестроек белка после присоединения ингибитора уменьшается. Кстати, скорости мономолекулярных конформационных переходов, следующих за бимолекулярной реакцией присоединения ингибитора, значительно ниже скорости последней. Эти перестройки длятся единицы и десятки миллисекунд. Поэтому за время одного конформационного превращения макромолекула должна испытывать множество элементарных актов присоединения и отщепления низкомолекулярного ингибитора. Мы еще вернемся ниже к этой особенности реакций с участием белков.

Недавно появилось несколько замечательных исследований, в которых структурные изменения были непосредственно зарегистрированы прямым рентгеноструктурным анализом. Речь идет о работах Перутца по структурным изменениям гемоглобина при присоединении кислорода к железу гема и о работах Диккерсона и др. о структурных изменениях, сопровождающих окисление и восстановление железа в геме цитохрома с.

Оксигенация гемоглобина. Изменения геометрии молекулы гемоглобина и электронной структуры ее железопорфириновых активных центров (гемов), сопровождающие присоединение молекулярного кислорода к атомам железа гемов (оксигенацию), уже много десятков лет привлекали внимание исследователей. Эти изменения имеют прямое отношение к функционированию гемоглобина, к его способности переносить большие количества молекулярного кислорода при данной разнице парциальных давлений O_2 между альвеолами легких и тканевыми капиллярами. Действительно, как мы увидим далее, именно специфические конформационные изменения белка при оксигенации приводят к кооперативности процесса связывания кислорода и к специфической S-образной форме кривой диссоциации, что обеспечивает значительно большее количество переносимого гемоглобином кислорода,

чем то, которое могло бы быть перенесено при классической лэнгмюровской кривой диссоциации (рис. 5.5). Поэтому исследование строения и динамических характеристик гемоглобина связано с решением едва ли не важнейшей научной проблемы нашего времени: *выяснением механизма целесообразного поведения биологических систем на молекулярном уровне*. Обзор истории вопроса и различных аспектов теоретических и экспериментальных исследований гемоглобина можно найти в ряде статей и монографий (см., например, [45, 46]). В 1970 г. появились две статьи Перутца, основанные на собственных рентгеноструктурных работах и на некоторых литературных данных, где в общих чертах выяснены основные этапы изменения геометрии молекулы гемоглобина, следующие за актами присоединения кислорода к четырем гемам в четырех субъединицах этого сложного белка [47, 48].

Ниже излагаются главные выводы, к которым пришел Перутц.

Молекула дезоксигемоглобина отличается от молекулы оксигемоглобина как третичной структурой всех четырех субъединиц, так и четвертичной структурой, т. е. способом упаковки двух α - и двух β -субъединиц в единую глобулу. Оксигенация начинается с присоединения молекулы O_2 к железу одной из α -субъединиц (точная последовательность оксигенации отдельных единиц гема неизвестна и не так уж важна для понимания сути дела). В α -субъединицах полость между спиральными участками, в которой помещается кольцо гема, достаточно широка, и молекула кислорода может присоединиться к железу гема практически безактивационно. В результате образования связи кислород — железо последнее переходит из высокоспинового состояния с координационным числом

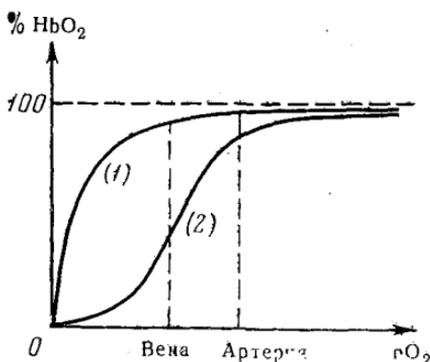


Рис. 5.5. Гиперболическая (1) и S-образная (2) кривые оксигенации гемоглобина.

5 в гексакоординированное низкоспиновое состояние. При этом атом железа, находившийся на расстоянии 0,75 Å от плоскости порфиринового кольца, смещается и в оксигемоглобине уже располагается в этой плоскости. Одновременно образуется более прочная связь с атомом азота соседнего гистидинового остатка, расстояние которого от плоскости порфиринового кольца уменьшается на 0,75—0,95 Å *). Эти смещения «запускают» дальнейшие конформационные превращения третичной и четвертичной структуры молекулы, которые были детально рассмотрены Перутцом. Происходящие конформационные превращения приводят к тому, что один из спиральных участков пептидной цепи перемещается к центру глобулы и выталкивает тирозиновый остаток из полости, где он ранее находился. При этом рвутся два солевых мостика между α_1 - и α_2 -субъединицами. Та же процедура происходит после оксигенации α_2 -субъединицы, причем рвутся еще два солевых мостика. Разрыв мостиков сопровождается диссоциацией протонов (эффект Бора). Таким образом, после оксигенации двух α -субъединиц четыре из шести солевых мостиков, определяющих четвертичную структуру дезоксигемоглобина, оказываются разорванными, что облегчает разрыв остальных двух мостиков ($\alpha_1\beta_2$ и $\alpha_2\beta_1$). Тетрамер принимает оксиконфигурацию, причем разрываются солевые мостики, связывавшие β -субъединицы с находившейся между ними молекулой 2,3-дифосфоглицерата, которая теперь освобождается. Таким образом, на этой стадии макромолекула имеет смешанную форму: четвертичная структура уже приняла оксиформу, а третичная структура β -субъединиц еще осталась прежней, но теперь уже напряженной. Это обстоятельство и приводит фактически к облегчению присоединения следующих молекул кислорода, т. е. к кооперативности эффекта и к S-образности кривой диссоциации (конечно, если бы мы начали с оксигенации β -субъединиц, результат был бы тот же).

*) Измерение расстояния между гистидином и порфириновым кольцом при оксигенации гемоглобина было впервые предсказано еще в 1952 г. [45, 49] на основе косвенных данных и существовавшей в то время модели. В 1966 г. Хорд [50] предсказал, что в результате оксигенации должно происходить смещение атома железа относительно порфиринового кольца.

Затем молекулы кислорода присоединяются к атомам железа β -субъединиц. Здесь происходят те же события, вызывающие изменение третичной структуры белковых глобул (смещение атомов железа в плоскость порфириновых колец, уменьшение расстояния между последними и гистидиновыми остатками, перемещение некоторых спиралей и освобождение тирозиновых остатков из соответствующих полостей). Единственное отличие заключается в том, что в β -субъединицах полости гема недостаточно широки для беспрепятственного вхождения кислорода, и для осуществления первой стадии процесса необходимо наступление подходящей тепловой флуктуации структуры, и, следовательно, первая стадия не может быть безактивной.

Трудно переоценить значение этих исследований Перутца, изложенных здесь весьма конспективно. Я настоятельно рекомендую читателю прочесть его статьи в оригинале. Прослеживание безупречной логики автора, разбор прекрасно составленных структурных схем доставляют истинное эстетическое наслаждение (см. также [51—53]).

Весьма интересен вопрос о кинетике описанных выше конформационных изменений. Для его решения можно воспользоваться тем обстоятельством, что при облучении окси- или карбоксигемоглобина светом видимой области спектра происходит диссоциация молекул O_2 или CO . Начальные стадии перехода $HbO_2 \rightarrow Hb$ были прослежены в работе [54]. Мощная лазерная вспышка приводила к практически мгновенной диссоциации всего кислорода (в случае оксигемоглобина) или всей окиси углерода (в случае карбоксигемоглобина). Основные изменения оптической плотности, возникающие в результате диссоциации, заканчиваются быстрее, чем за 10^{-9} сек (временное разрешение прибора). Однако по своим спектральным характеристикам восстановленный гемоглобин, образовавшийся в результате отщепления O_2 (или CO) за время, меньшее 10^{-9} сек (после вспышки), слегка отличается от обычного равновесного гемоглобина: изменения оптической плотности слишком велики. Превращение в «истинный» спектр гемоглобина требует времени порядка 10^{-7} сек, после чего спектр уже не меняется. Это не означает, однако, что через 10^{-7} сек закончились все измене-

ния гемоглобина после «мгновенного» отщепления лиганда (O_2 или CO). Проведя опыты с фотодиссоциацией карбоксигемоглобина при рН 9,0, Гиббсон [55] установил, что гемоглобин, образовавшийся через $2 \cdot 10^{-5}$ сек после вспышки, значительно быстрее (на порядок) присоединяет кислород, чем обычный гемоглобин. Кинетика перехода «быстрого» гемоглобина в «нормальный» удовлетворяет уравнению первого порядка с константой скорости около 200 сек^{-1} , т. е. переход длится несколько миллисекунд. Переход этот не сопровождается спектральными изменениями в видимой области. Можно думать, что быстрые изменения после вспышки, сопутствующие диссоциации лиганда, происходят только в самой протетической группе и ее непосредственном окружении. Гем становится восстановленным, а конформация всей остальной макромолекулы остается «оксигенированной», так как соответствующий конформационный переход требует значительно больше времени, чем изменение электронной структуры гема. К сожалению, при нейтральных рН эти результаты воспроизвести не удалось.

Различие равновесных конформационных состояний макромолекулы, соответствующих различным состояниям активного центра, проявляется не только в структурном отношении, но и в изменении кинетических характеристик этих состояний, в частности в их лабильности, способности к спонтанным флуктуациям структуры. Как было показано еще в 1966 г. [56, 57], именно такие «конформационные колебания» (периодические обратимые изменения структуры), как правило, определяют скорость изотопного обмена атомов водорода в белках. Энглендер и Ролф [58] показали недавно, что при оксигенации структура гемоглобина заметно лабильзуется и новые большие сегменты макромолекулы, содержащие около 30 атомов водорода, начинают принимать активное участие в спонтанных «дыхательных» движениях.

Отмеченные выше особенности кинетики реакций гемоглобина с CO , а именно сравнительно медленные структурные изменения значительной части белковой глобулы после вызванных присоединением или отщеплением лиганда быстрых изменений активного центра, по-видимому, являются общими характеристиками реакций с участием белков. В результате первого элементарного акта возни-

кает неравновесное состояние, в котором уже произошли локальные изменения вблизи реакционного центра, а основная часть макромолекулы сохранила прежнюю конформацию. Недавно такие неравновесные состояния были экспериментально обнаружены и идентифицированы для некоторых белков, в том числе для реакции электронного восстановления ферригемоглобина [59, 60]. Восстановление проводилось термализованными электронами, возникающими при гамма-облучении твердых растворов ферригемоглобина в водно-этиленгликолевой смеси при 77° К. В этих условиях возможно только восстановление железа и небольшие локальные структурные изменения вблизи активного центра, а исходная конформация всей белковой глобулы оказывается кинетически стабилизированной («замороженной»). В результате возникает устойчивое при 77° К неравновесное состояние гемоглобина: восстановленный активный центр и «окисленная» конформация. Восстановленный гем оказывается при этом в низкоспиновом состоянии (каким он никогда не бывает в равновесных условиях) и характеризуется «цитохромоподобным» спектром поглощения.

При повышении температуры и размораживании матрицы растворителя молекула релаксирует и превращается в обычный восстановленный гемоглобин. Эти эффекты не обусловлены четвертичной структурой, так как наблюдаются и для ферритмиоглобина. Почти такие же неравновесные промежуточные состояния (разумеется, кинетически нестабильные) удалось зарегистрировать и при проведении электронного восстановления ферригемоглобина при комнатной температуре в водных растворах методом импульсного радиолиза [61].

Эти и другие результаты, свидетельствующие о сравнительно медленном протекании процессов конформационной перестройки белков, сопровождающей реакции с их участием, и о появлении регистрируемых концентраций существенно неравновесных промежуточных конформационных состояний, заставляют отнестись с осторожностью к некоторым общепринятым представлениям.

В течение многих лет гемоглобин служил излюбленной моделью, иллюстрирующей аллостерическое взаимодействие в белках, реализующееся через конформационные изменения макромолекулы. Кинетические схемы, описы-

вающие эти превращения, всегда оперируют с неизменными, конформационно равновесными молекулами белка (конформерами) и объясняют изменения свойств системы только изменениями относительных концентраций таких конформеров. Этот постулат лежит в основе всех моделей кооперативных свойств гемоглобина, начиная с формальной кинетической схемы Эдера [62] и кончая моделью «генерализованных концертных переходов» Огаты и Мак-Коннела [63]. Последняя модель по существу идентична модели Моне, Уаймана и Шанже [64], за тем исключением, что в ней учтена неэквивалентность α - и β -субъединиц. Как известно, в работе [64] постулируется существование двух типов равновесных конформеров, T и R , характеризующихся соответственно низким и высоким сродством к кислороду (или к CO). Присоединение кислорода индуцирует сдвиг равновесия $T \rightleftharpoons R$ вправо, что и обуславливает кооперативные свойства гемоглобина. Аналогичный «равновесный» подход лежит в основе модели последовательного присоединения [65].

Эксперименты по исследованию связывания гемоглобина CO методом ЯМР высокого разрешения [66] показали, что в процессе связывания лиганда появляются состояния белка, которые не могут быть описаны равновесием между конформерами. К аналогичному выводу пришли авторы работ [67—71], в которых изучали кинетику переходов между равновесными (в темноте) и стационарными (на свету) состояниями системы гемоглобин — CO в широком диапазоне степеней насыщения, концентраций гемоглобина и интенсивностей света. Было показано, что полученные результаты принципиально нельзя объяснить в рамках любых схем, учитывающих только равновесные формы молекул белка с их измеренными в условиях равновесия характеристиками реакции с лигандом. Во время перехода между равновесными или стационарными состояниями возникают конформационно неравновесные (не успевшие отрелаксировать) молекулы белка с отличающимися кинетическими характеристиками.

Окисление и восстановление цитохрома с. Большой интерес вызвали результаты рентгеноструктурного исследования ферро- и феррицитохрома с, опубликованные Дикерсоном с соавторами [72, 73] в 1971 г. В этих работах сравнивали феррицитохром с из сердца лошади с ферро-

цитохромом *c* из сердца тунца и обнаружили большие структурные различия. Недавно авторы отказались от этих результатов и направили в печать статьи [74, 75], в которых сравнение структур ферри- и ферроцитохрома *c* из сердца тунца приводит к выводу об отсутствии скольконибудь заметных структурных различий между молекулами в двух окислительно-восстановительных состояниях. Тем не менее имеет смысл рассмотреть результаты работ [72, 73]. Сформулированные в них мысли о возможных механизмах переноса электронов через молекулу цитохрома стимулировали плодотворную дискуссию и до сих пор сохранили свое значение независимо от того, правильны они или нет.

Цитохром *c* в мембранах митохондрий осуществляет функцию переноса электрона от цитохромредуктазного (комплекс III по Грину) к цитохромоксидазному ферментному комплексу (комплекс IV). Этот белок с молекулярным весом около 12 300 представляет собой полипептидную цепочку из 104 аминокислотных остатков без дисульфидных мостиков. Одна из стереопроекций структурной схемы ферритоцитохрома *c* по [73] представлена на рис. 5.6. Гем связан с белком ковалентно: тиоэфирными связями с цистеиновыми остатками 14 и 17 и через атом железа, пятое координационное место которого занято атомом азота имидазола гистидина 18, а шестое — атомом серы метионина 80. Кольцо имидазола гистидина 18 фиксируется также через атом N, образующий водородную связь с СОО-группой пролина 30. Фиксация гема в его «пещере» внутри глобулы осуществляется также двумя карбоксильными группами пропионовокислых остатков гема: одна из этих групп образует своими атомами кислорода две водородные связи с тирозином 48 и триптофаном 59, а другая выведена на поверхность молекулы к полярной среде. Как можно видеть из схемы, молекула состоит из двух половинок. Остатки 1—47 располагаются на рис. 5.6 и 5.7 справа от пещеры гема, остатки 48—91 — слева, а остатки 92—104 образуют как бы застёжку портфеля (через верх слева направо). Два последних звена полипептидной цепочки 103 и 104, по-видимому, не строго фиксированы и обладают свободой движения. Единственный отрезок полипептидной цепочки, образующий точную α -спираль, — это участок 91—101. Общая структур-

нокислотных остатков; предположительно, он осуществляет связь с цитохромоксидазой.

При восстановлении феррицитохрома *c*, т. е. при переносе электрона на атом железа, глобула претерпевает

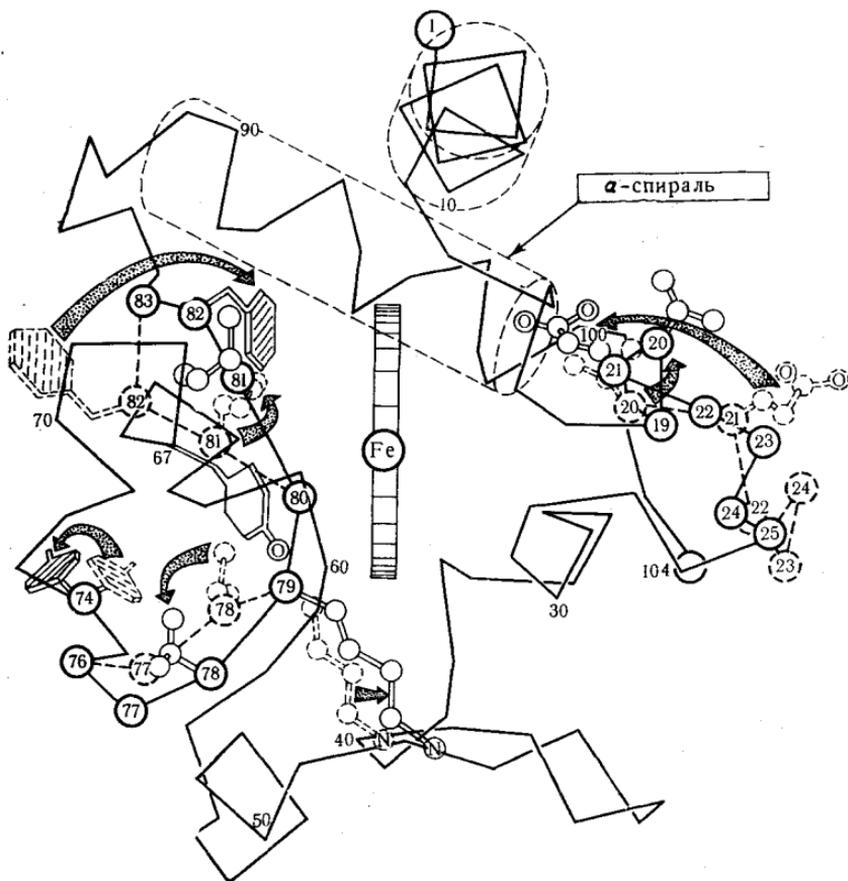


Рис. 5.7. Основные структурные изменения при восстановлении феррицитохрома *c* (по [73]).

сильные конформационные изменения (рис. 5.7). Эти изменения не затрагивают только 21 аминокислотный остаток из 104 — так называемый скелет молекулы, образуемый N-концевой спиралью (остатки 1—11), участком от 12-го до 18-го остатка, небольшим участком вблизи C-конца и самим гемом. Ниже перечислены наиболее существенные

изменения, происходящие при восстановлении. Самым сильным смещениям подвергаются звенья полипептидной цепочки от 77-го до 83-го остатка. Это своего рода «активный центр» цепочки, который содержит эволюционно инвариантные аминокислоты. В молекуле феррицитохрома фенилаланин 82 смещен далеко влево к периферии молекулы и оставляет отверстие, ведущее в левую верхнюю часть пещеры гема, открытым. В ферроцитохроме фенилаланин передвинут к пещере гема и блокирует отверстие. Одновременно соседнее звено, изолейцин 81, боковая группа которого была в феррицитохроме на поверхности глобулы, поворачивается и теперь выступает в растворитель. В результате изменяются также положения остатков 77—79.

В феррицитохроме цепочка 55—75 образует петлю, окружающую гидрофобную, недоступную растворителю область (левый канал), где находятся ароматические кольца аминокислотных остатков тирозина 74, триптофана 59 и тирозина 67, которые расположены параллельно и образуют, предположительно, *электронную тропу* для переноса электрона от цитохромредуктазы на атом S метионина 80 и на атом железа гема. Тирозин 67 фиксирован водородной связью, идущей к остатку треонина 78. Однако в процессе восстановления феррицитохрома эта водородная связь разрывается, плоскость кольца тирозина 74 поворачивается примерно на 60° , так что оно становится почти перпендикулярным к поверхности глобулы (в ферриформе кольцо было практически параллельным поверхности); кроме того, смещается вся близлежащая полипептидная цепочка *).

В правом канале (остатки 19—25) также происходят перемещения, закрывающие этот канал.

Таким образом, конформация феррицитохрома оказывается значительно более плотной и «закрытой», чем конформация ферриформы.

Как уже было сказано выше, эта интерпретация результатов рентгеноструктурного исследования была дана

*) Электронная тропа при этом, естественно, разрушается. Возможно, однако, тропы и не играют существенной роли в процессе электронного переноса, реализующегося по туннельному механизму (см. гл. 7).

на основе изучения кристаллов феррицитохрома *s* из сердца лошади и ферроцитохрома *s* из сердца тунца [72, 73]. Сравнивая структуры ферри- и ферроцитохрома *s* из сердца тунца, те же авторы пришли к выводу об отсутствии сколько-нибудь существенных конформационных или конфигурационных изменений, сопровождающих восстановление феррицитохрома *s* [74, 75]. Этот вывод вызывает удивление. Многочисленные исследования феррицитохрома *s* и его восстановления в растворе свидетельствуют в пользу значительных структурных изменений (см., например, обзор [76]).

В работе [77] изучена зависимость скорости изотопного обмена водородов в молекуле цитохрома *s* от состояния окисления железа гема. Показано, что при окислении число атомов водорода, способных к быстрому обмену, существенно возрастает. В соответствии со сказанным выше, это указывает не только на то, что структура феррицитохрома более открыта, но и на большую лабильность феррицитохрома, на большую амплитуду флуктуационных колебаний белковой глобулы.

Следует иметь в виду, что практически все исследования в растворе проведены с цитохромом *s* из сердца лошади. В нашей лаборатории было показано, что величины структурных изменений в области активного центра, сопровождающих электронное восстановление феррицитохрома *s*, меняются в широких пределах в зависимости от источника цитохрома *s* [78]. Возможно, что цитохром *s* тунца (или даже всех холоднокровных) характеризуется особенно незначительными структурными изменениями при окислительно-восстановительных превращениях. Возможно также, что изменения, регистрируемые при сравнении кристаллических образцов, существенно отличаются от изменений происходящих в растворе.

Представление о скорости конформационных изменений цитохрома *s* при восстановлении можно получить на основании результатов интересной работы [79], в которой изучалась кинетика изменения спектра феррицитохрома *s* при его превращении в ферроформу под действием гидратированных электронов, образующихся при импульсном радиоллизе. Восстановление железа заканчивается быстрее, чем за 10^{-6} сек, однако спектр продукта отличается от спектра обычного восстановленного цитохрома *s*.

Дальнейшие изменения спектра вплоть до полного его совпадения с обычным происходят в результате медленного мономолекулярного процесса с $k \approx 8,5 \text{ сек}^{-1}$, т. е. длятся сотни миллисекунд. Вопрос о том, успевают ли пройти эти конформационные перестройки при нормальном функционировании цитохрома *c*, остается, естественно, открытым. Еще медленнее происходят конформационные изменения при гидратации цитохрома *c* [80].

Недавно конформационно неравновесные состояния цитохрома *c*, возникающие в ходе реакций с его участием, были детально изучены в нашей лаборатории. При низкотемпературном восстановлении феррицитохрома *c* в твердой матрице термолизованными электронами были зафиксированы промежуточные состояния (активный центр восстановлен, большая часть глобулы — в «окисленной» конформации) [78]. То обстоятельство, что в водной среде при комнатной температуре восстановление цитохрома *c* обычными химическими агентами протекает через аналогичные конформационно неравновесные состояния, было доказано исследованием образования комплекса между цитохромом *c* и окисью углерода [81]. Равновесный феррицитохром *c* не связывает CO, так как комплекс может образоваться только с восстановленным гемом. Равновесный ферроцитохром также практически не связывает CO, по-видимому, в связи с тем, что «закрытая» конформация белка не дает возможности молекуле CO приблизиться к железу. В то же время, если проводить восстановление в присутствии CO, то комплекс легко образуется. Цитохром связывает CO в промежуточном конформационном состоянии, когда железо уже восстановлено, а конформация глобулы еще не успела измениться. Этим же методом было показано, что в условиях динамического окислительно-восстановительного равновесия в растворе конформационные переходы между равновесными окисленными и восстановленными формами цитохрома *c* практически не происходят (не успевают произойти).

Промежуточные конформационно неравновесные состояния феррицитохрома *c* были зарегистрированы также и после скачкообразных изменений рН или ионной силы раствора [82, 83].

§ 5.5. О КОМПЕНСАЦИОННОМ ЭФФЕКТЕ

Уже в течение многих лет в исследованиях, посвященных термодинамике и кинетике процессов в конденсированной фазе (главным образом в растворах), обсуждается явление, получившее название *компенсационного эффекта*. Особенно отчетливо этот эффект наблюдается в процессах, в которых принимают участие макромолекулы биополимеров (денатурация, комплексообразование, инактивация, ферментативный катализ). В данном параграфе, где будут суммированы основные экспериментальные факты, относящиеся к компенсационному эффекту, и в следующем, где я попытаюсь проанализировать и установить физический смысл параметров, определяемых при термодинамических и кинетических исследованиях таких процессов, речь будет идти о биополимерах. Однако я полагаю, что все выводы, которые будут сделаны, справедливы и в тех случаях, когда компенсационный эффект наблюдается при реакциях низкомолекулярных соединений.

Феноменологически термодинамический компенсационный эффект заключается в существовании линейной зависимости между изменениями энтальпии ΔH_i и изменениями энтропии ΔS_i в ряду родственных изотермически протекающих процессов и выражается соотношением

$$\Delta H_i = \alpha + T_c \Delta S_i \quad (i = 1, 2, \dots), \quad (5.36)$$

где i фиксирует данное превращение в ряду, а α и T_c — постоянные. Константа α есть, очевидно, не что иное, как свободная энергия любого из процессов данного ряда при температуре $T = T_c$, а постоянная T_c имеет размерность температуры и называется обычно *температурой компенсации*. Таким образом, в данном ряду превращений все процессы характеризуются одинаковыми значениями константы равновесия $K = \exp(-\alpha/RT_c)$ при одной и той же температуре $T = T_c$. Графики компенсационного эффекта строят либо в координатах ΔH_i и ΔS_i (рис. 5.8, а), либо в координатах $\Delta \Delta H_i$ и $\Delta \Delta S_i$ (рис. 5.8, б), где символы $\Delta \Delta H_i$ и $\Delta \Delta S_i$ обозначают разности между ΔH_i и ΔS_i и соответствующими величинами для одного из членов данного ряда превращений, который выбран в качестве стандарта. Обычно стандартным считают процесс с наименьшими

значениями ΔH_i и ΔS_i . Второй способ представления отвечает уравнению

$$\Delta\Delta H_i = T_c \Delta\Delta S_i. \quad (5.37)$$

Совершенно аналогично формулируется и кинетический компенсационный эффект. В этом случае энтальпия, энтропия и свободная энергия процесса заменяются энтальпией,

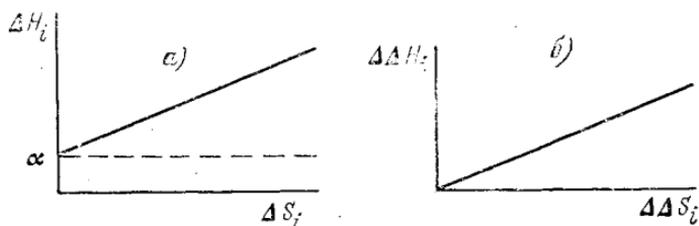


Рис. 5.8. Два способа представления компенсационного эффекта.

или энергией *), ΔE_{ai} активации, энтропией активации ΔS_{ai} и свободной энергией активации ΔF_{ai} . Для кинетического компенсационного эффекта имеем

$$\Delta E_{ai} = \alpha + T_c \Delta S_{ai} \quad (i = 1, 2, \dots), \quad (5.38)$$

а вместо константы равновесия следует говорить о константе скорости процесса, которая в данном ряду должна быть постоянной при $T = T_c$. Подборку существующих экспериментальных данных по термодинамическому и кинетическому компенсационным эффектам, их анализ и рассмотрение различного рода теорий этих эффектов можно найти, например, в превосходных обзорах [84, 85].

Существует несколько приемов построения ряда для получения компенсационного эффекта, т. е. методов выбора пар значений ΔH_i , ΔS_i для построения компенсационных графиков типа приведенных на рис. 5.8, а и 5.8, б. Первый прием заключается в закономерном изменении химического строения одного из реагентов с тем, чтобы получить гомологичный ряд однотипных химических процессов, второй — в закономерном изменении среды протекания реакции (изменение рН, концентрации электролитов, добавка этанола в водную среду и т. п.).

*) См. § 5.3.

Все описанные в литературе случаи компенсационного эффекта можно разбить на два типа. К первому типу относятся эффекты, для которых постоянная T_c близка к температуре проведения опыта (так называемый *полный компенсационный эффект*). Типичный пример такого рода иллюстрируют подобранные Лихтенштейном и Сухоруквым данные по кинетике и термодинамике денатурации белков и по кинетике ферментативных реакций [84, 86]. В этих случаях величины T_c были весьма близки к температурам измерения, которые в свою очередь могут варьировать только в узких пределах уже благодаря специфике объектов. Точки ложатся на компенсационные графики с большим разбросом, а реально измеряемые (без расчетов с применением уравнений типа Вант-Гоффа и Аррениуса) константы равновесия или скорости реакции не слишком отличаются друг от друга (если бы они различались сильнее, то при используемой стандартной технике их просто нельзя было бы измерить). При этих условиях компенсационного эффекта не может не быть *). Речь ведь идет просто о том, что имеется набор близких по величине значений, например констант равновесий K_i , которые представляются в виде произведения двух сомножителей:

$$K_i = \exp(\Delta S_i/R) \exp(-\Delta H_i/RT). \quad (5.39)$$

Легко понять, что, как бы ни производить разбиение на сомножители, если их произведения должны быть близки друг к другу, а температуры измерения не слишком сильно различаются, то должно удовлетворяться соотношение (5.36).

В этом случае истинная проблема заключается не в природе компенсации, а в том, почему похожие процессы с близкими значениями реально измеряемых констант равновесия или скоростей могут столь сильно различаться по значениям величин ΔH и ΔS (или ΔH_a и ΔS_a), рассчитываемых по уравнениям Вант-Гоффа или Аррениуса. А различия между ними могут быть весьма велики (на сотни килокалорий и сотни энтропийных единиц).

Примеры второго типа иллюстрируют весьма точные измерения, дающие компенсационные графики с малым

*) Это соображение было высказано И. В. Березиным,

разбросом точек и значения T_c , явно не совпадающие с температурой измерения. Много примеров этого типа приведено в уже цитированном обзоре [85]. Можно указать, например, на работы Битлстона с соавторами по термодинамике связывания различных лигандов с гемоглобинами, выделенными из крови различных животных [87—91].

Следует полностью отдавать себе отчет в том, что при получении данных для построения компенсационных графиков исследователь обязательно использует уравнения типа Вант-Гоффа или Аррениуса и, следовательно, принимает справедливость всех постулатов, на которых они основаны. В случае кинетического компенсационного эффекта исследователь вообще лишен другого пути нахождения значений ΔS_{ai} и ΔE_{ai} . В случае термодинамического компенсационного эффекта положение иное: в последнее время появилась возможность прямого калориметрического измерения ΔH_i . Однако для нахождения ΔS_i исследователь все равно вынужден прибегать к расчету, основанному на допущении справедливости уравнения Вант-Гоффа и, следовательно, равновесного термодинамического соотношения (5.3).

Мы не будем здесь рассматривать существующих теоретических представлений о природе компенсационного эффекта. Интересующийся этим вопросом читатель может обратиться к уже цитированным выше обзорам. Из изложенного выше, вероятно, ясно, что я придерживаюсь следующей точки зрения: компенсационного эффекта, как физического явления вообще не существует, и он появляется вследствие неправильного применения некоторых уравнений равновесной термодинамики.

§ 5.6. АНАЛИЗ ПРИМЕНИМОСТИ УРАВНЕНИЙ ВАНТ-ГОФФА И АРРЕНИУСА И ТЕОРИИ АКТИВИЗИРОВАННОГО КОМПЛЕКСА К РЕАКЦИЯМ С УЧАСТИЕМ БИОПОЛИМЕРОВ

Удобно отделить обсуждение термодинамических параметров от обсуждения кинетических. Мы начнем с термодинамических. Суммируем основные выводы, которые можно сделать из проведенного в данной главе рассмотрения экспериментальных данных.

1. Структура глобулярных белков в растворах в области температур ниже температуры денатурационного превращения ($0-40^{\circ}\text{C}$) меняется с изменением температуры. Эти изменения могут сопровождаться поглощением тепла.

2. Образование комплексов низкомолекулярных соединений с белками и другие локальные микрохимические возмущения приводят, как правило, к значительным макроструктурным перестройкам белковых глобул.

3. Измеряемые калориметрически тепловые эффекты реакций, происходящих с участием белков (денатурация, комплексообразование), характеризуются сильной температурной зависимостью (вплоть до изменения знака теплового эффекта при сравнительно малых изменениях температуры).

4. Определяемые на основании равновесных измерений (с помощью уравнения Вант-Гоффа) тепловые эффекты реакций, происходящих с участием белков, как правило, слабо зависят от температуры, если не считать наблюдающихся иногда скачкообразных изменений вычисляемых значений ΔH при определенной температуре (изломы на анаморфозах в координатах $\lg K$ и $1/T$). Равновесные значения ΔH иногда резко отличаются от истинных, измеренных калориметрически.

5. В том случае, когда агентом, вызывающим белковое превращение, служит изменение температуры (например, тепловая денатурация), расчеты с помощью уравнения Вант-Гоффа дают значения энтальпии превращения, близкие к истинным.

Рассмотрим вопрос о температурной зависимости истинных тепловых эффектов. Принятое в литературе объяснение этой зависимости разницей теплоемкостей исходного и конечного состояний не выдерживает критики. Действительно, если принять его, то легко подсчитать, что, например, собственный, не обусловленный разницей теплоемкостей (т. е. при 0°K) тепловой эффект реакции связывания НАД с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой должен был бы равняться 143 ккал/моль , а ингибитора гекситол-1,6-дифосфата с альдолазой (см. § 5.4) — примерно 330 ккал/моль . Для кислотной денатурации ферригемоглобина эта величина составляет около — 2900 ккал/моль . Абсурдность полученных значений очевидна. Сведение

наблюдаемой температурной зависимости к закону Кирхгофа автоматически означает допущение справедливости термодинамического соотношения (5.3), что, как уже было показано выше, должно приводить к совпадению равновесных и калориметрически измеренных значений энтальпии превращения, чего не наблюдается. Таким образом, по-видимому, справедливо второе объяснение температурной зависимости энтальпий процессов с участием биополимеров, данное выше (см. § 5.2).

Рассмотрим теперь, как происходит некая реакция с участием белка. Пусть при некоторой фиксированной температуре T_1 добавлен агент, индуцирующий реакцию (например, низкомолекулярное соединение, образующее комплекс с белком, или кислота, его денатурирующая, и т. д.). Произойдет реакция, сопровождающаяся, как правило, существенной структурной перестройкой белка. Можно думать, что точка зрения Шао и Стюртеванта, согласно которой калориметрически измеренные энтальпии связывания ингибиторов с α -химотрипсином в основном отражают конформационные изменения белка, справедлива для большинства белковых реакций. Проведем теперь превращение под действием того же агента при другой температуре T_2 . Переход к другой температуре приведет к изменению структуры белка *). И не только к изменению его стационарной структуры, не только, выражаясь химическим языком, к изомеризации белка. Изменение исходной конструкции белка может привести к изменению возможных путей его превращения под действием агента, вызывающего исследуемую нами реакцию. Оно может привести к исчезновению одних и к появлению других, новых механических степеней свободы. Части белковой конструкции после возмущения начнут по-другому двигаться, релаксируя к новому квазиравновесному состоянию. Таким образом, по существу, при температурах T_1 и T_2 реагируют разные соединения и они испытывают различные превращения. Как уже было сказано, в этом случае температурные зависимости энтальпии и энтропии превращения не подчиняются уравнению (5.3).

*) В принципе этого может и не произойти, но эксперимент показывает, что в большинстве случаев в области температур 5—50° С, в которой обычно проводят все биохимические исследования, структурные перестройки происходят.

Что же, собственно, измеряет исследователь с помощью равновесных методов, определяя «константу равновесия» *) при разных температурах? Он определяет не столько температурную зависимость «константы равновесия», сколько температурную зависимость исходных состояний и путей реакций. Найденные им с помощью уравнения Вант-Гоффа величины ΔH и ΔS во всяком случае не являются энтальпиями и энтропиями каких-либо превращений, так как они получены в предположении справедливости постулата (5.3), который в действительности неверен, и для рассматриваемых процессов вообще не имеют четкого физического смысла. Точнее говоря, этот смысл можно было бы в них вложить (свой для каждого конкретного процесса), если бы были известны *все* конформационные, конфигурационные и энтальпийные изменения, вызываемые в биополимере изменением температуры и исследуемым реагентом. Однако в таком случае знание равновесных значений ΔH и ΔS нам уже было бы не нужно.

Сама по себе экспоненциальная зависимость измеренной константы равновесия от температуры, т. е. формальное выполнение уравнения Вант-Гоффа даже в случае постоянных значений ΔH и ΔS , ни о чем не говорит. Существует весьма мало сложных процессов, ход которых в узком интервале значений параметров нельзя было бы описать экспоненциальной функцией.

Несколько иная ситуация возникает в том случае, когда вызывающим изменения агентом является температура, как, например, в работах Привалова по исследованию тепловой денатурации [92]. Рассмотрим эту процедуру несколько более подробно. Температура превращения при тепловой денатурации данного белка определяется ионной силой и рН. Измерения при разных температурах представляют собой, по существу, измерения при разных значениях μ и рН. Калориметрически измеряемый тепловой эффект денатурации есть разность энтальпий системы при температурах ниже начала и выше конца перехода. Превращение занимает сравнительно широкий темпера-

*) Слова «константа равновесия» взяты в кавычки не только потому, что речь идет о квазиравновесных в смысле Лифшица (см. гл. 4) системах о жесткой памяти, но и потому, что эта память, т. е. конструкция системы, меняется с температурой.

турный интервал (5—10° С); поэтому под температурой перехода понимают обычно середину этого интервала, если переход достаточно симметричен. Если переход недостаточно симметричен, то его «симметризуют», относя часть перехода к предденатурационным изменениям или экстраполируя соответствующую базисную линию с нормальным ходом теплоемкостей в область перехода (см. § 5.2). Определение констант равновесия в этом случае сводится к оценке резкости перехода в интервале температур, когда единственным происходящим структурным переходом и является денатурация. Если структурный переход симметричен, то он происходит точно так же, как если бы превращение реализовалось при фиксированной температуре, соответствующей 50% превращения. Поэтому, как правильно пишет Привалов, совпадение результатов равновесного и калориметрического измерений означает лишь, что при тепловой денатурации происходит лишь один структурный переход типа фазового превращения (мы сделали все, чтобы исключить влияние других структурных изменений!). В этих условиях можно вычислять энтропию перехода по классической формуле

$$\Delta S = \Delta H/T, \quad (5.40)$$

где T — температура перехода в указанном выше смысле.

Вряд ли, однако, исследователь имеет основание говорить о температурной зависимости энтальпии и энтропии процесса, меняя состав растворителя (например, его рН) и таким образом несколько смещая температуру перехода. В данном случае изменение рН (или μ), как и изменение температуры в предыдущих примерах, вызывает изменения макроструктуры белка в исходном состоянии. По существу, измерения, проведенные при двух разных температурах T_1 и T_2 , относятся к разным системам и разным процессам. Для каждой температуры выполняются соотношения (5.40), но изменения величин ΔH и ΔS при переходе от одной температуры превращения к другой отражают не температурную зависимость этих параметров, а сложные изменения конструкции системы и пути реакции при изменении количества связанных протонов и температуры. Если возмущения невелики и регистрируемые температуры перехода мало отличаются друг от дру-

га, т. е.

$$|T_1 - T_2| \ll T_1, \quad (5.44)$$

то применение уравнения (5.40) автоматически приведет к соотношению *)

$$\Delta\Delta H_i \approx T\Delta\Delta S_i, \quad (5.42)$$

что формально эквивалентно уравнению (5.37) для компенсационного эффекта с температурой компенсации T_c , близкой к температурам переходов T .

Таким образом, отмечаемая иногда при исследованиях этого типа корреляция между величинами $\Delta\Delta H_i$ и $\Delta\Delta S_i$ носит тривиальный характер и не имеет отношения к компенсационному эффекту, о котором шла речь в предыдущем параграфе.

Перейдем теперь к вопросу о применимости уравнений Аррениуса и теории активированного комплекса. Как уже отмечалось ранее, использование этих уравнений эквивалентно допущению наличия термодинамического равновесия между состоянием активированного комплекса на вершине активационного барьера и исходным состоянием системы, а также допущению выполнимости термодинамического соотношения (5.3), которое для кинетических активационных барьеров можно записать в виде

$$\frac{\partial \Delta E_a}{\partial T} = T \frac{\partial \Delta S_a}{\partial T}. \quad (5.43)$$

Ясно, что всю аргументацию, которая свидетельствовала о нарушении этих постулатов при изучении термодинамики процессов с участием белков равновесными методами, можно перенести и на кинетические исследования. Однако в случае термодинамических параметров всегда есть возможность прямого измерения теплот реакций. В случае активационных параметров такой возможности нет. Поэтому к рассчитываемым значениям активационных параметров следует относиться с большой осторожностью. При изменении температуры разница теплосодержаний системы на вершине активационного барьера и в исходном состоянии может меняться не только за счет

*) С точностью до члена меньшего порядка малости $\Delta H_1 (T_2 - T_1)/T$.

конечной разности теплоемкостей системы в этих двух состояниях, но и за счет изменения самого барьера, изменения пути реакции.

Как мы видели на нескольких примерах в настоящей главе (и увидим в следующей при рассмотрении деталей механизмов ферментативных процессов), поведение глобулярного белка в ходе реакции с его участием напоминает скорее работу механической машины, чем протекание гомогенной химической реакции в газовой фазе. В этом случае небольшие изменения конструкции с температурой могут привести к изменению активационного барьера и пути реакции без соответствующего (по уравнению (5.43)) изменения энтропии активации.

Действительно, как ведет себя активационный барьер часового механизма с различными коэффициентами теплового расширения деталей? Ясно, что его изменение с температурой будет нетермодинамическим и будет полностью определяться конструкцией механизма. Например, при низкой температуре зубцы двух шестеренок могут плохо зацепляться и скорость будет мала. При некотором повышении температуры зубцы начнут лучше подходить друг к другу и скорость возрастет. При еще большей температуре соответствие вновь исчезнет (шестеренки «заклинит») и скорость уменьшится. При попытке описать последний этап с помощью соотношения типа Аррениуса мы получили бы отрицательную энергию активации.

Рассмотрим в качестве примера реакцию образования комплекса между глобулярным белком и низкомолекулярным лигандом, который связывается по двум группам, принадлежащим на белке двум разным аминокислотным остаткам, сближенным в результате свертывания полипептидной цепочки во вторичную и третичную структуры. Такая ситуация вполне стандартна. Пусть регистрация процесса производится методом, безразличным к последующим (после связывания), релаксационным конформационным изменениям белка. Даже при этом, казалось бы, соответствующим классическому ходу процесса условия истинный активационный барьер процесса связывания (т. е. первого этапа превращения системы при комплексообразовании) может существенно зависеть от температуры. Действительно, изменение температуры (в тех пределах, в которых она меняется в биохимических исследованиях)

практически не влияет на геометрию низкомолекулярного лиганда, но может изменить конфигурацию белковой глобулы и расстояние между точками связывания на белке. Вследствие чрезвычайно резкой зависимости энергии химического взаимодействия от расстояния это приведет к заметному изменению активационного барьера даже при сравнительно малом изменении конфигурации, практически не влияющем на энтропию системы.

Естественно, аналогичная ситуация может возникнуть и при связывании лиганда по одной точке, например, вследствие стерических затруднений.

Посмотрим, к каким следствиям может привести в этом случае использование «классических» уравнений (5.22) и (5.23) для обработки экспериментальных данных.

Итак, мы будем считать, что истинный активационный барьер ΔE_a может слегка изменяться с температурой без соответствующего (по уравнению (5.43)) изменения *) истинной энтропии активации ΔS_a . В температурном интервале, в котором обычно проводятся исследования кинетики ферментативных реакций, любую слабую зависимость можно аппроксимировать линейной:

$$\Delta E_a = \Delta E_a^0 + bT, \quad (5.44)$$

где ΔE_a^0 и b — постоянные. Подставив (5.44) в (5.22) и (5.23), получим

$$\begin{aligned} k &= A \exp(-b/R) \exp(-\Delta E_a^0/RT) = \\ &= \frac{kT}{h} \exp\left(\frac{\Delta S_a - b}{R}\right) \exp\left(-\frac{\Delta E_a^0}{RT}\right). \end{aligned} \quad (5.45)$$

Таким образом, экспериментальная кривая будет спрямляться в аррениусовских координатах, но измеряться будут не истинные активационные параметры ΔE_a и ΔS_a , а эффективные величины $\Delta E_a^0 = \Delta E_a - bT$ и $\Delta S_a^0 = \Delta S_a - b$, которые могут сильно отличаться от истинных. Из (5.44) ясно, что измеряемая величина ΔE_a^0 получается в результате экстраполяции слабой температурной зависимости истинной энергии активации к 0°K

*) Еще в 1960 г. подобное предположение сделали Воеводский с сотрудниками [93] для объяснения компенсационного эффекта, наблюдавшегося при изучении кинетики рекомбинации свободных радикалов в твердой фазе.

(рис. 5.9). Если, например, истинная энергия активации меняется при повышении температуры от 20 до 30° С на 1 ккал/моль, то измеряемая величина будет отличаться от истинной примерно на 30 ккал/моль, что соответствует изменению экспоненциального множителя на 22 порядка.

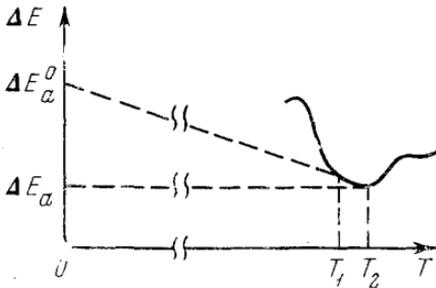


Рис. 5.9. Измеряемая ΔE_a^0 и истинная ΔE_a энергии активации.

Пользуясь уравнением Аррениуса, мы в этом случае не можем не только определить истинную энергию активации, но и сказать с уверенностью, ошибаемся ли мы или нет.

Подставим в (5.44) вместо b разность $\Delta S_a - \Delta S_a^0$. После преобразования получаем

$$\Delta E_a^0 = \Delta E_a - T\Delta S_a + T\Delta S_a^0 = \Delta F_a + T\Delta S_a^0. \quad (5.46)$$

Таким образом, если истинные активационные параметры (однозначно определяющие скорость реакции) при изменении условий меняются мало, а измерения ведутся при близких температурах, то при использовании уравнения Аррениуса энергия и энтропия активации связаны линейным соотношением (5.38), причем постоянные α и T_c равны соответственно свободной энергии активации процесса и температуре измерения.

Соображения такого типа могут объяснить возникновение компенсационного эффекта с $T_c \approx T$, а также огромный диапазон изменений величин измеряемых параметров на компенсационных графиках. Посмотрим теперь, как можно объяснить возникновение компенсационного эффекта второго типа с $T_c \neq T$, если не удовлетвориться утверждением общего характера о том, что используемые для построения компенсационных графиков данные получены в результате неправильного применения уравнений, основанных на невыполняющихся постулатах.

Рассмотрим кинетику некоторого процесса с участием биополимера. Пусть при неких фиксированных условиях (рН, состав растворителя и т. п.) истинные активационные параметры (нам неизвестные) равны ΔE_{a1} и ΔS_{a1} . Слегка

изменим эти условия. Теперь в ситуациях 2, 3, . . . , i , , n , строго говоря, уже идут реакции других соединений по другому пути. Однако если изменения условий незначительны (а именно так и подбираются компенсационные ряды), то истинные параметры ΔE_{ai} и ΔS_{ai} изменяются незначительно. В этом случае всегда можно приближенно считать, что изменения параметров связаны линейным соотношением

$$\Delta \Delta E_{ai} = T_c \Delta \Delta S_{ai}, \quad (5.47)$$

где T_c — некоторая постоянная, имеющая размерность температуры, причем точное ее значение зависит в принципе от конструкции системы и типа вносимых изменений.

При данной температуре T имеем

$$\Delta E_{ai} = \Delta E_{a1} + \Delta \Delta E_{ai}, \quad \Delta S_{ai} = \Delta S_{a1} + \Delta \Delta S_{ai}. \quad (5.48)$$

Истинная свободная энергия активации ΔF_{ai} равна

$$\begin{aligned} \Delta F_{ai} &= \Delta E_{ai} - T \Delta S_{ai} = \\ &= \Delta E_{a1} + \Delta \Delta E_{ai} - T \Delta S_{a1} - T \Delta \Delta S_{ai}. \end{aligned} \quad (5.49)$$

Если $T = T_c$, то, учитывая (5.47), находим

$$\begin{aligned} \Delta F_{ai} &= \Delta E_{ai} - T_c \Delta S_{ai} = \Delta E_{a1} - T_c \Delta S_{a1} = \text{const} \\ &(i = 1, 2, \dots, n). \end{aligned} \quad (5.50)$$

Таким образом, если выполняется равенство (5.47), приближенно справедливое при малых изменениях условий протекания исследуемой реакции, то должна существовать температура $T = T_c$, при которой все n реакций имеют одинаковую истинную свободную энергию активации, т. е. одинаковую скорость, равную

$$k = \frac{kT_c}{h} \exp\left(-\frac{\Delta F_{ai}}{RT_c}\right). \quad (5.51)$$

Все сказанное выше относилось к неизвестным нам истинным активационным параметрам, испытывающим чрезвычайно малые изменения в ряду 1, 2, . . . , i , . . . , n . Однако компенсационный парадокс заключается не в существовании линейной зависимости между малыми изменениями ΔE_a и ΔS_a в ряду гомологичных превращений,

но в огромности интервала «наблюдаемых» значений активационных параметров в таком ряду. Следует помнить, что при исследовании температурной зависимости скорости каждой реакции и при использовании для расчетов уравнений (5.22) и (5.23) мы, как было уже сказано, получаем не истинные параметры ΔE_{ai} и ΔS_{ai} , а не имеющие четкого физического смысла величины ΔE_{ai}^0 и ΔS_{ai}^0 . Повторяя рассуждения, приведенные выше (см. стр. 128), находим, что и для этих величин справедливо компенсационное уравнение

$$\Delta E_{ai}^0 = \Delta F_a^0 + T_c \Delta S_{ai}^0 \quad (i = 1, 2, \dots, n), \quad (5.52)$$

где постоянная ΔF_a^0 есть истинная свободная энергия активации любой из n реакций при температуре компенсации.

Таким образом, компенсационный эффект может регистрироваться в тех случаях, когда возмущения, вносимые при переходе от одной реакции к другой, малы и когда не выполняется соотношение (5.43) и, следовательно, применение уравнения Аррениуса и теории активированного комплекса теряет смысл. Аналогичные рассуждения можно в принципе провести и для термодинамического компенсационного эффекта.

Изложенное выше не может, конечно, рассматриваться как теория компенсационного эффекта. Приведенные рассуждения позволяют понять, как могут возникнуть зависимости типа (5.36) и (5.38), связывающие параметры, не имеющие того физического смысла, который в них обычно вкладывают. Как уже было сказано, в рамках развиваемых здесь представлений компенсационного эффекта вообще не существует. Можно утверждать даже, что его обнаружение при использовании для обработки результатов эксперимента уравнений типа Вант-Гоффа или Аррениуса есть более или менее однозначное указание на то, что эти уравнения применять нельзя и получаемые параметры не имеют четкого физического смысла. Более того, наблюдаемые часто на «аррениусовских» и «вант-гоффовских» анаморфозах резкие изломы не могут рассматриваться как доказательство того, что именно при этой температуре произошла структурная перестройка. Конфигурационные изменения макромолекулы могут проис-

ходить постепенно в каком-то интервале температур, а при температуре излома скачком может измениться величина b в уравнении (5.44) (например, в связи с прохождением меняющегося с температурой расстояния между центрами связывания на макромолекуле через значение, соответствующее расстоянию между центрами связывания на низкомолекулярном лиганде). Интерпретировать этот скачок можно только в том случае, когда известны детально конструкция системы и ее изменения с температурой в ходе исследуемого процесса.

Я полагаю, что все сказанное выше может быть отнесено и ко многим химическим процессам в конденсированной фазе, идущим без участия биополимеров. Роль макромолекулы могут в этих случаях играть, например, структурированные образования типа сольватных оболочек.

§ 5.7. О СПОНТАННЫХ КОНФОРМАЦИОННЫХ КОЛЕБАНИЯХ БЕЛКОВЫХ МАКРОМОЛЕКУЛ

В предыдущей главе было отмечено, что при соблюдении некоторых условий в белковых макромолекулах должны наблюдаться спонтанные переходы между близкими конформациями или конфигурациями. В последнее время в литературе появились сообщения об исследованиях нескольких типов, в которых, возможно, удалось наблюдать такие конформационные колебания. Прежде всего следует упомянуть ведущиеся уже более 15 лет чрезвычайно интересные работы Шноля и др. [94—103]. В их работах представлены доказательства того, что для свежеприготовленных растворов и гелей белков актомиозинового комплекса такие характеристики, как ферментативная активность, количество доступных определению поверхностных S—H-групп, сорбционная способность по отношению к некоторым красителям, испытывают колебательные изменения с частотой, не превышающей 10 *гц*. Аналогичные наблюдения были сделаны Четвериковой на креатинкиназе [101—103]. Обобщение этих работ можно найти в [104]. Авторы считают, что их результаты свидетельствуют о существовании спонтанных конформационных изменений макромолекул исследуемых белков. Наиболее загадочной особенностью этих колебаний является их большая или меньшая синхронность в макрообъеме

(иначе их нельзя было бы зарегистрировать применяемыми методами). Никакой более или менее обоснованный механизм возникновения синхронных колебаний пока не предложен.

Имеются исследования второго типа, где некоторые особенности спектров протонного резонанса ряда белков и полипептидов интерпретируются как свидетельство наличия конформационных колебаний с частотой от десятков герц (рибонуклеаза) до десятков килогерц (некоторые полипептиды) [105—107]. Такая интерпретация основана на эффективном усреднении локальных магнитных полей на определенных ядрах водорода при конформационных колебаниях. Нельзя не упомянуть также о старых работах Линдерштрём-Ланга [108], в которых было показано, что быстрый дейтерообмен водородов пептидных связей внутренних частей глобулы косвенно свидетельствует в пользу конформационных колебаний (флуктуаций) (см. также [56, 57]).

Мы не будем подробно останавливаться на работах, посвященных конформационным и конфигурационным колебаниям белковых глобул. Скажем только, что, если соответствующие данные и их интерпретация подтвердятся, они откроют новую, исключительно важную страницу в развитии биологической физики.

§ 5.8. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Материалы этой главы позволяют следующим образом сформулировать задачи, стоящие перед исследователями, изучающими конформационные и конфигурационные изменения биополимеров.

а) Измерение тепловых эффектов возможно большего числа реакций биополимеров прямыми калориметрическими методами. Выяснение природы изменений эффективных теплоемкостей белков с температурой.

б) Прямая регистрация структурных изменений макромолекул в ходе реакций с их участием.

в) Прямая регистрация структурных изменений макромолекул с температурой.

г) Экспериментальное разделение быстрых и медленных (релаксационных) стадий таких превращений.

д) Создание теории, которая даст в руки исследователя методы интерпретации экспериментальных данных взамен неприменимых в данном случае термодинамических и кинетических методов, разработанных для гомогенных газовых реакций.

Конечно, все, перечисленное выше, значительно труднее выполнить, чем проводить измерения температурных зависимостей констант равновесия и скоростей, строить логарифмические анаморфозы и интерпретировать результаты в терминах упорядочения или разупорядочения системы в зависимости от знака рассчитываемой величины ΔS .

ФИЗИКА ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

§ 6.1. ВВЕДЕНИЕ

Едва ли не важнейшей функцией белков является их каталитическая, ферментативная, функция. Не имеет никакого смысла давать здесь сколько-нибудь полный обзор установленных экспериментальных фактов, найденных эмпирических закономерностей и предложенных теорий, относящихся к ферментативному катализу. В литературе уже существует огромное (может быть, даже избыточное) количество монографий и обзоров, посвященных этому вопросу. Некоторые из них приведены в списке литературы [1—5].

Как мы знаем, все известные ферменты представляют собой белки и для функционирования фермента нужна вся белковая глобула *); это позволяет предположить, что все, сказанное в предыдущей главе об особенностях процессов с участием биополимеров, может оказаться справедливым и для катализируемых ферментами химических реакций. Действительно, представления о важной роли конформационной лабильности белков, например в регуляторных механизмах ферментативного катализа, за последние годы перешли из категории «этого не может быть» в категорию «это тривиально», довольно поспешно пройдя стадию экспериментального и теоретического анализа.

В настоящей главе будет предпринята попытка проанализировать следствия, к которым приводит распространение на ферментативные процессы выводов, полученных в предыдущей главе в результате рассмотрения термодинамики и кинетики конформационных и конфигурационных превращений белков. Глава строится по следующему плану. Вначале будут изложены общие принципы

*) Известные экспериментальные результаты, согласно которым активность некоторых ферментов сохраняется при их фрагментации [6, 7], оказались ошибочными [8, 9].

существующих теоретических подходов к объяснению высокой эффективности биокатализаторов и других особенностей их действия. Затем будут приведены экспериментальные данные, доказывающие необходимость распространения на ферментативные реакции выводов, сделанных в предыдущей главе. Механичность, «машинность» работы ферментов будет продемонстрирована на примере нескольких более или менее хорошо изученных ферментативных процессов. Конец главы будет посвящен формулировке новых представлений о физике, лежащей в основе элементарного акта ферментативного процесса.

§ 6.2. СУЩЕСТВУЮЩИЕ ОБЪЯСНЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Прежде всего несколько слов об одном распространенном среди биохимиков заблуждении. Многие считают, что существуют некие общие теории химического катализа, но их применение к ферментативным реакциям затруднено ввиду сложности биохимических процессов и биологических катализаторов. Эта ошибочная точка зрения основана на неоправданном преклонении биохимиков перед могуществом классической физической химии. К сожалению, сколько-нибудь последовательной общей теории катализа не существует.

Имеется огромный экспериментальный материал, свидетельствующий о том, что во многих случаях в ферментативных реакциях можно проследить известные эмпирические и полуэмпирические закономерности, установленные при изучении гомогенного катализа в растворах. Речь идет о кислотно-основном катализе, катализе ионами и комплексами металлов и т. п. (см., например, обзор в [1]). В гомогенном катализе, по существу, исследователь имеет дело с проблемой кинетики реакций в жидкой фазе. Катализатор при этом — просто один из реагентов, образующий промежуточное соединение с исходными продуктами и позволяющий суммарной реакции пройти по другому пути. Физическая теория кинетики жидкофазных реакций еще не создана. Таким образом, обычный гомогенный химический катализ никакими преимуществами (в смысле теоретической базы) перед ферментативным не обладает.

Что касается гетерогенного катализа, то положение с теорией здесь, по-видимому, значительно хуже, чем в ферментативном катализе. Прежде всего, это связано с тем, что в случае ферментативного катализа гораздо легче поставить чистый и воспроизводимый эксперимент. Сколь бы сложны ни были катализаторы, сколь осторожным ни надо быть при их препаративном выделении, они, в конце концов, представляют собой макромолекулы, синтезируемые в клетках матричным способом практически однозначно. Поэтому воспроизводимость работы выделенных ферментов, как правило, значительно лучше воспроизводимости действия твердых катализаторов небиологического происхождения, тонкие детали структуры которых, определяющие их активность (дефекты поверхности и т. п.), почти невозможно повторить.

Прежде чем говорить об объяснениях ферментативного катализа, необходимо более точно сформулировать, что, собственно, надо объяснить, т. е. что понимается под словами «фермент ускоряет химическую реакцию». Недостаточно сказать, что надо сравнивать скорость исследуемой ферментативной реакции со скоростью той же реакции в гомогенном растворе без фермента. Ведь та же реакция без фермента может просто не идти. Большинство ферментативных процессов представляет собой последовательность нескольких реакций с несколькими *стабильными* промежуточными продуктами. Могло бы, например, оказаться, что смоделировать в отсутствие фермента такой путь суммарной реакции невозможно. К счастью, по-видимому, это, как правило, не так. Косовер ввел очень удобное понятие *конгруэнтной модельной системы*, т. е. системы, в которой без фермента реализуется та же суммарная реакция через те же стабильные промежуточные продукты [10]. Это могут быть промежуточные продукты взаимодействия молекул субстратов между собой, или субстратов с ионами (например, H^+), или субстратов с каталитическими группами.

В дальнейшем, когда речь пойдет о степени активности фермента, об ускорении реакции, всегда подразумевается, что сравнение производится с конгруэнтной модельной системой.

У ферментативной системы и конгруэнтной модельной системы совпадают пути реакций, фиксируемые стабиль-

ными (в принципе выделяемыми) промежуточными продуктами. Что касается путей реакций в ходе отдельных стадий, то они, как правило, не известны ни для ферментативной, ни для модельной систем. Эти пути безусловно не совпадают — в противном случае каталитический эффект был бы невозможен.

Все великое множество имеющихся в литературе точек зрения на природу исключительно высокой каталитической активности ферментов можно разделить на четыре группы. В основе этих типов теоретических подходов соответственно лежат следующие утверждения:

1. Комплексообразование с ферментом концентрирует и взаимно ориентирует реагирующие частицы (молекулы субстратов, каталитические группы), увеличивая, таким образом, число эффективных столкновений. Это означает повышение предэкспоненциального множителя в уравнении Аррениуса или, что то же самое, повышение энтропии активации ΔS_a в уравнениях теории активированного комплекса.

2. Образование фермент-субстратного комплекса снижает энергию активации ΔE_a реакции. Это происходит за счет изменения распределения электронной плотности в молекуле субстрата, за счет ее насильственной деформации при образовании комплекса и т. д.

3. В фермент-субстратном комплексе более вероятны большие флуктуации тепловой энергии на некоторых колебательных степенях свободы, на некоторых связях. Фермент, таким образом, как бы собирает тепловую энергию, направляя ее на связь, подвергающуюся химическому превращению.

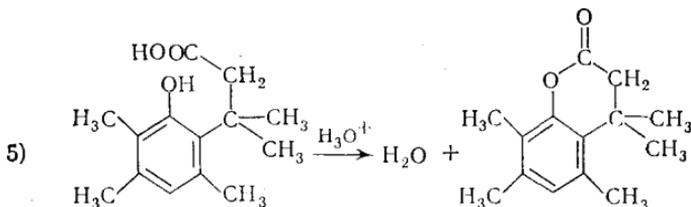
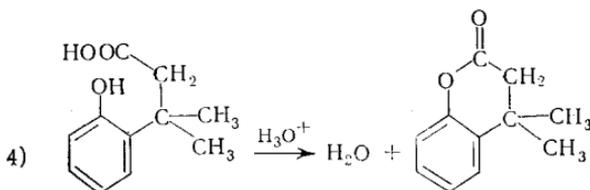
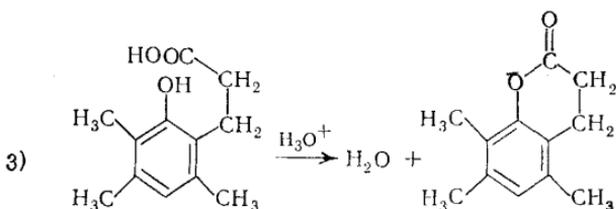
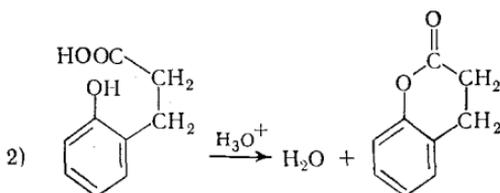
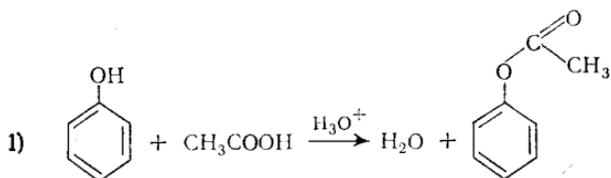
4. Энергия, выделяющаяся при сорбции субстрата на ферменте (при образовании фермент-субстратного комплекса), или при протекании одной из стадий сложной ферментативной реакции, или в ходе превращения в одностадийной ферментативной реакции, не рассеивается в виде тепла, а рекуперируется и используется для преодоления активационных барьеров следующих стадий или элементарных актов.

Рассмотрим подробнее эти варианты объяснений. Первые два варианта — наиболее естественные, классические. Действительно, если константа скорости реакции представляется в виде произведения двух множителей

(энтропийного и энергетического) и она возрастает при переходе от некатализируемого процесса к ферментативному, то при этом обязательно должен увеличиться хотя бы один из двух сомножителей. Итак, начнем с энтропийного сомножителя.

1. *Фермент повышает энтропию активации.* Этот вариант объяснения подробно обсуждается в ряде работ (см., например, [11]). Смысл предполагаемых эффектов заключается в следующем. В конгруэнтной модельной системе протекание реакции требует сближения субстратов между собой, субстратов с ионами, субстратов с каталитическими группами (если такие есть), а также соответствующей ориентации реагирующих частиц друг относительно друга. Согласно теории активированного комплекса элементарная стадия реакции идет однозначно по пути с наименьшим активационным барьером, что предполагает вполне фиксированную структуру переходного состояния. Эти эффекты (сближение, ориентация и т. д.) обуславливают поэтому значительный отрицательный вклад в энтропию активации для модельной системы. Если комплексообразование с ферментом приводит к нужной исходной ориентации субстратов друг относительно друга и относительно каталитических групп фермента, то в фермент-субстратном комплексе энтропия системы уже понижена. Поэтому энтропия активации процесса повышается и реакция ускоряется. Концентрирование реагентов в результате комплексообразования не всегда приводит к ускорению реакции. Если один из реагентов присутствует в избытке (например, вода при гидролитических процессах), то вследствие локализации реакции в сравнительно немногочисленных комплексах (концентрация фермента всегда мала) процесс может даже замедлиться. Однако ориентационные эффекты всегда должны быть выгодны. Расчетная величина ускорения реакции за счет таких энтропийных эффектов может быть в принципе сколь угодно велика, так как она определяется тем диапазоном телесных углов между взаимодействующими частицами, который исследователь *считает* допустимым для оптимального протекания процесса. Чем меньше этот диапазон, т. е. чем точнее фермент должен фиксировать в пространстве реагенты друг относительно друга, тем больше результирующее ускорение процесса. Кошланд

в оценочных расчетах [11, 12] приходит к выводу, что такие энтропийные эффекты могут привести к увеличению скорости реакции на 18 порядков и внести, таким образом, основной вклад в суммарное каталитическое действие фермента.



Недавно появилась весьма интересная работа Мильстина и Кона [13], цель которой состояла в прямой

экспериментальной проверке возможности столь больших эффектов фиксации взаимного расположения реагирующих групп (т. е. резкого ограничения поступательных и вращательных степеней свободы). В работе исследована кинетика катализируемых кислотой реакций образования сложного эфира. Сравнивали между собой пять процессов, схемы которых приведены выше.

В ряду 1—5 последовательно все больше фиксируется относительное расположение и ориентация гидроксильной и карбоксильной групп, между которыми в результате реакции образуется сложноэфирная связь. Реакция 1 бимолекулярна, и исходные ориентации практически ничем не ограничены. В мономолекулярных реакциях 2—5 свобода движений реагирующих групп последовательно ограничивается возрастающими стерическими затруднениями. В табл. 6.1 приведены значения измеренных термодинамических и кинетических параметров реакций: константы равновесия K , стандартной свободной энергии реакции ΔF^0 и эффективной константы скорости при кислотном катализе $k_{H_3O^+}$.

Таблица 6.1

Номер реакции	K	ΔF^0 , ккал/моль	$k_{H_3O^+}$
1	$3,8 \cdot 10^{-6}$	7390	$\sim 10^{-10}$ моль ⁻¹ ·сек ⁻¹
2	0,04	1980	$5,94 \cdot 10^{-6}$ сек ⁻¹
3	0,62	290	$6,22 \cdot 10^{-6}$ сек ⁻¹
4	25,67	-1950	$2,62 \cdot 10^{-2}$ сек ⁻¹
5	> 99	< -2770	$5,9 \cdot 10^5$ сек ⁻¹

Таким образом, переход от бимолекулярной к мономолекулярной реакции и дальнейшие ограничения степеней свободы реагирующих групп приводят в конце концов к повышению скорости реакции более чем на 15 порядков (это утверждение верно, если концентрации реагентов в бимолекулярной реакции не превышают 1 M).

С первого взгляда может показаться, что приведенные результаты действительно подтверждают возможность резкого ускорения ферментативной реакции за счет энтропийных факторов и могут служить экспериментальным доказательством правильности первого варианта теорети-

ческого объяснения ферментативного катализа. Однако самое простое рассуждение показывает, что это не так. Действительно, реакция 5, например, с которой сравнивается реакция 1, есть реакция нового, *уже полученного* соединения. Если речь идет о ферментативном, каталитическом, процессе, необходимо рассмотреть все его стадии, начиная с образования фермент-субстратного комплекса с заданной фиксированной взаимной ориентацией реагентов и кончая выходом продуктов реакции в гомогенную фазу, в раствор. Легко понять, что образование фермент-субстратного комплекса должно в этом случае сопровождаться понижением энтропии системы по крайней мере на ту же величину, на которую повышается энтропия активации изучаемой реакции. Чтобы получить требуемое Кошландом увеличение скорости реакции на 18 порядков, при образовании фермент-субстратного комплекса, энтропия должна понизиться по крайней мере на $18 \cdot 2 \cdot 2,3 = 83$ э.е. Для того чтобы этот комплекс мог образоваться при комнатной температуре, энергия связи в нем должна быть никак не меньше, чем $83 \cdot 300 \approx \approx 24\,000$ кал/моль.

В чем физический смысл ускорения реакции при «правильной» исходной ориентации реагирующих молекул? Очевидно, в том, что при той же температуре большее число столкновений оказывается эффективным. Собственно, все объяснение по первому варианту предполагает выполнение основных постулатов классической химической кинетики газовых реакций. Поэтому следует считать, что движение реагирующих молекул друг относительно друга, движение вдоль координаты реакции есть тепловое движение. Наличие обязательной, как мы только что видели, прочной связи с ферментом, эффективно замораживающей все поступательные и вращательные степени свободы, не может, однако, не сказаться на энергии активации процесса. Если продолжать считать, что и в фермент-субстратном комплексе химическому превращению подвергается субстрат, то движению вдоль координаты реакции должна мешать прочная связь субстрата с ферментом. Кроме того, завершение каталитического процесса требует разрыва связи между продуктами реакции и ферментом, который должен вернуться в исходное состояние. Если связь фермент — субстрат не меняется в ходе

химического превращения, то необходимо учесть возможность того, что этап диссоциации комплекса фермент — продукт окажется лимитирующей стадией всего процесса. Если же энергия связи с ферментом уменьшается в ходе превращения субстрат — продукт, то, следовательно, химическое превращение субстрата сопровождается повышением энергии системы, на что частично должна тратиться энергия, выделяющаяся при реакции. Возникает вопрос о механизме такой трансформации энергии без рассеяния ее в тепло. Этот вопрос относится, собственно, уже к четвертому варианту объяснения. Таким образом, оставаясь в рамках традиционной химической кинетики, трудно удовлетвориться в качестве объяснения ферментативного катализа утверждением «фермент повышает энтропию активации реакции», так как само по себе это повышение не обязательно приводит к увеличению скорости катализируемого процесса. Следует отметить, что, по существу, аналогичные соображения были высказаны еще Ламри [14]. Итак, резюмируя, можно утверждать, что специфичность связывания субстрата ферментом, приводящая к уникальному взаимному расположению и ориентации реагирующих групп, необходима для протекания ферментативного процесса, но сама по себе не может объяснить повышения скорости ферментативной реакции по сравнению со скоростью той же реакции в конгруэнтной модельной системе.

2. *Фермент понижает энергию активации.* Этот вариант объяснения, пожалуй, наиболее распространен. Причина его популярности заключается в том, что, как отмечает Ламри в только что цитированной работе, измерения температурной зависимости скоростей ферментативных реакций обычно дают пониженные значения энергии активации по сравнению с аналогичными неферментативными процессами. Как, однако, следует из предыдущей главы (и будет подтверждено здесь), определение энергии активации по Аррениусу в случае ферментативных реакций обычно лишено смысла. Поэтому имеющиеся экспериментальные данные нельзя, вообще говоря, рассматривать как обоснование правильности этого варианта объяснения.

В конечном счете все предполагаемые механизмы снижения активационного барьера в ферментативном ката-

лизе сводятся к двум эффектам: а) перераспределению электронной плотности в молекуле субстрата за счет взаимодействия с различными группами фермента (ион-дипольные, диполь-дипольные взаимодействия, водородные связи и т. п.) и б) «концертному» действию различных каталитических групп фермента, в результате которого реакция, идущая без фермента через несколько разделенных

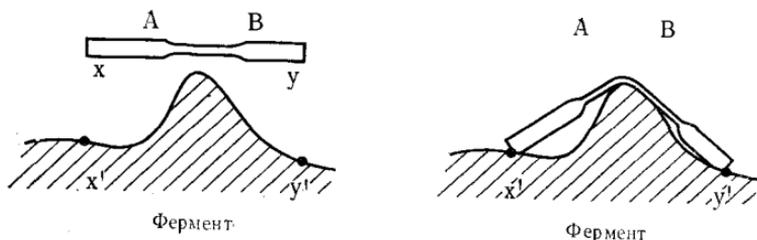


Рис. 6.1. Модель «дыбы».

во времени стадий, на ферменте проходит через одно активированное состояние с пониженной энергией. Естественно, оба объяснения остаются чисто словесными до тех пор, пока не указаны конкретные взаимодействия, структура данного фермент-субстратного комплекса и относительные перемещения его частей при движении системы вдоль координаты реакции.

Конечно, перераспределение электронной плотности в молекуле субстрата при взаимодействии с ферментом действительно происходит и изменяет реакционную способность субстрата. В этом отношении существующие представления о механизмах ферментативного катализа не добавляют ничего нового к тем словам, которые обычно пишут в работах, посвященных любому катализу химических реакций. Схемы конкретных процессов и соответствующие рассуждения можно найти в цитированных выше обзорах.

В последние годы в литературе широко обсуждается еще один механизм снижения энергии активации при ферментативном катализе, так называемый механизм «дыбы», предложенный Эйрингом, Ламри и Спайксом еще в 1954 г. [15]. Сущность этого механизма ясна из рис. 6.1. Образование фермент-субстратного комплекса приводит к деформации субстрата, к растяжению одной из связей

в его молекуле и к соответствующему снижению энергии активации ее разрыва.

Рассмотрим этот механизм несколько подробнее. Понижение активационного барьера разрыва связи $A - B$, очевидно, обусловлено в данном случае повышением исходной энергии связи $A - B$ при ее растяжении, которое в свою очередь компенсируется энергией сорбции субстрата на ферменте. После окончания реакции, т. е. после разрыва связи $A - B$, пространственные затруднения исчезают, благодаря чему энергия сорбции продуктов реакции должна стать *больше* энергии сорбции исходного субстрата. Для того чтобы процесс был каталитическим, фермент должен вернуться в исходное состояние, т. е. продукты реакции должны десорбироваться. Учитывая отмеченное выше увеличение энергии связи продуктов реакции с ферментом, можно опасаться, что повышение энергии активации десорбции продуктов (повышение примерно на такую же величину, на которую уменьшилась энергия связи $A - B$) сделает десорбцию лимитирующей стадией всего процесса. Поэтому без конкретного рассмотрения механизма всех стадий процесса в каждом конкретном случае механизм «дыбы» не может считаться объяснением понижения энергии активации при ферментативном катализе.

Как энтропийный, так и энергетический варианты истолкования повышенной скорости ферментативных реакций предполагают существование уникального структурного соответствия между субстратом и ферментом. Этим в литературе объясняют исключительно высокую специфичность действия ферментов. Раньше структурное соответствие считали статическим (гипотеза «ключа и замка»). В 1958 г. Кошланд сформулировал теорию *индуцированного соответствия* [12, 16], согласно которой структурное соответствие возникает в результате индуцированных субстратом конформационных изменений молекулы фермента. Его теория была важным этапом развития теоретических представлений в энзимологии, так как подчеркивала необходимость конформационных превращений фермента при взаимодействии с субстратом, которые, как мы видели в предыдущей главе и увидим в этой, действительно всегда происходят. Однако теория индуцированного соответствия не меняет положения с рассмотренными

выше двумя вариантами объяснения ферментативной активности. Индуцированные субстратом конформационные превращения фермента в рамках этой теории заканчиваются с образованием структурно специфического фермент-субстратного комплекса и не имеют прямого отношения к самому элементарному акту химической реакции молекулы субстрата *).

3. *Фермент повышает вероятность полезной флуктуации энергии.* Этот вариант объяснения был предложен в 1950 г. Мельвин-Хьюзом [19]. Он основан на известной работе Гиншельвуда по теории мономолекулярных реакций в газовой фазе при низких давлениях [20, 21].

Как известно, при высоких давлениях газа элементарный акт химического превращения, например разрыва i -й связи, происходит в тех молекулах, для которых средняя энергия *данной* колебательной степени свободы, соответствующей валентному колебанию i -й связи, ε_i больше или равна активационному барьеру разрыва E_a , т. е.

$$\varepsilon_i \geq E_a. \quad (6.1)$$

Если давление газа мало, т. е. частота столкновений невелика, то акт реакции может произойти и при выполнении более мягкого условия:

$$\sum_i \varepsilon_i \geq E_a, \quad (6.2)$$

т. е. в реакцию вступят молекулы, *полная* колебательная энергия которых больше или равна активационному барьеру. Такое условие оказывается достаточным потому, что при низкой частоте столкновений в «энергизированной» молекуле может успеть реализоваться флуктуация колебательной энергии, собирающая последнюю на одной i -й степени свободы. Естественно, что при данной температуре число молекул, удовлетворяющих условию (6.2), значительно больше числа молекул, удовлетворяющих условию (6.1). В пределе (при достаточно низких давлениях) условие (6.2) эквивалентно понижению эффективной измеряемой энергии активации реакции E'_a по сравнению

*) Об обязательности конформационных превращений фермента при индуцируемых субстратом изменениях электронной плотности см. также [17, 18].

с энергией активационного барьера E_a :

$$E'_a = E_a - (S - 1) RT, \quad (6.3)$$

где $2S$ — число квадратичных членов (кинетической и потенциальной энергии), необходимых для однозначного определения энергии молекулы.

Теория Гиншельвуда — Касселя была подвергнута детальному разбору и критическому анализу в работе [22], но здесь вряд ли стоит подробно останавливаться на ее критике. В самом деле, как ясно из изложенного, теория основана на предположении о том, что избыток колебательной энергии молекулы может не успеть диссипировать в результате столкновения с другими молекулами, т. е. теория «работает» только для газовых реакций при низких давлениях. В случае же ферментативных процессов, происходящих в конденсированных средах, предположения, положенные в основу этой теории, заведомо не выполняются.

4. *Рекуперация энергии.* По-видимому, первым упомянул о возможности процессов, получивших затем наименование *рекуперации энергии*, Бауэр в своей замечательной книге «Теоретическая биология», опубликованной в 1935 г. [23]. Бауэр считал, что в клетке макромолекулы белков находятся в особом деформированном состоянии. Во время ферментативной реакции белки переходят в равновесное состояние, а выделяющаяся при этом энергия используется на преодоление активационного барьера катализируемой реакции. Энергия, освобождающаяся в результате самой реакции, в свою очередь не диссипирует, а возвращает молекулу белка в исходное деформированное напряженное состояние. Следует признать, что смелость и глубина гипотезы Бауэра поразительны (напомню, что она была высказана в 1935 г., когда еще и речи не было о конформационных изменениях белков). Последующие авторы немного добавили к концепции Бауэра (если не считать терминологии).

Термин «рекуперация энергии» ввел Кобозев в 1960 г. [24], говоря о возможном физическом смысле предложенного им же так называемого *эффекта агрегации* [25], т. е. неспецифического влияния большого размера молекулы катализатора на скорость катализируемой реак-

дии. Согласно Кобозеву, роль макромолекулы белка в ферментативном катализе заключается в том, что с ее помощью реализуется использование энергии, выделяющейся в ходе реакции, для активации каталитического центра.

Более конкретный физический механизм рекуперации энергии при ферментативном катализе был предложен в работе Хургина, Чернавского и Шноля [26]. В ней высказывается предположение, что освобождающаяся в ходе катализируемой реакции энергия запасается в макромолекуле фермента в форме упругой деформации и сохраняется в этом виде вплоть до начала следующего каталитического акта. Весьма приблизительные расчеты, проведенные авторами и исходящие из представления о молекуле белка как об упругом твердом теле, показали, что возможно запасание достаточного количества энергии (порядка 10 ккал/моль) и распространение области упругой деформации на всю глобулу (примерно на 50 \AA). Естественно, расчет такого типа ничего не доказывает и ничто не опровергает.

Наиболее важным в цитируемой работе было разделение степеней свободы макромолекулы на обычные и «конструктивные» (механические) и постулирование медленности диссипации энергии, заключенной в этих выделенных степенях свободы.

Те же идеи были развиты в дальнейшем Чернавским и Хургиным в их выступлениях на V Международном симпозиуме по химии природных соединений в июне 1970 г. в Риге. Авторы пришли к выводу, что для одностадийных ферментативных процессов (особенно если функция фермента состоит в снижении энтропийной части активационного барьера) нет необходимости в рекуперации энергии. Для многостадийных же ферментативных процессов запасание и рекуперация энергии необходимы для постадийного изменения структуры, т. е. для создания оптимальной структуры при переходе от одной стадии процесса к другой.

Источниками энергии, запасаемой ферментом, могут быть сорбция субстрата на ферменте, экзоэнергетические стадии самого ферментативного процесса.

Весьма четко описал общий механизм ферментативного катализа, основанный на представлении о рекуперации

энергии, Шноль [27]. Он пишет: «Конформация свободной молекулы фермента отличается от конформации белка в фермент-субстратном комплексе. Макромолекула белка *устроена* так, что после того, как первый акт превращения субстрата осуществился (после случайной тепловой флуктуации), выделяющаяся энергия переводит молекулы фермента в особое неравновесное состояние — в состояние термодинамически невыгодной конформации, в котором по кинетическим причинам (большой активационный барьер) макромолекула может находиться достаточно большое время (вообще, по-видимому, такая форма сохранения неравновесности может быть очень долгоживущей).

Неравновесная макромолекула может перейти в новое вероятное состояние лишь при контакте с субстратом. Получается забавный, но вполне реальный парадокс: субстрат *катализирует* переход фермента в равновесное состояние. Зато сам субстрат претерпевает необходимые превращения, активационный барьер которых понижается за счет *конформационной* энергии макромолекулы фермента».

Достоинства этого варианта объяснения ферментативной активности очевидны. Конформационные изменения оказываются необходимыми на всех стадиях катализируемых превращений. Однако изложенные теоретические представления обладают двумя весьма существенными недостатками.

Во-первых, остается абсолютно неясным физический механизм, по которому *локальный* микрохимический акт направленно индуцирует переход всей *макромолекулы* белка в деформированное состояние с повышенной конформационной энергией. Ничего, кроме утверждения «молекула белка устроена так, что...», этот вариант объяснения пока не дает.

Во-вторых, непонятен механизм срабатывания энергии, запасенной в виде упругой деформации всей конформационно измененной макромолекулы; рассматривая фермент как конструкцию, как машину с выделенными степенями свободы, авторы не задаются вопросом, какой смысл в данном случае приобретает понятие энергии активации, величину которой должна понизить эта запасенная энергия (см. также [28, 29]).

§ 6.3. КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ — ОБЯЗАТЕЛЬНЫЙ ЭТАП ФЕРМЕНТАТИВНОГО ПРОЦЕССА

В гл. 5 были приведены многочисленные данные, свидетельствующие о том, что локальные химические изменения в белках, обусловленные, например, изменением заряда активной группы (окислительно-восстановительные процессы), присоединением низкомолекулярного соединения и т. п., вызывают, как правило, конформационные изменения, затрагивающие всю макромолекулу. Поскольку образование фермент-субстратного комплекса является необходимым этапом любого ферментативного процесса, можно думать, что при ферментативном катализе всегда наступают изменения конформации макромолекулы фермента. В настоящее время можно утверждать, что это положение экспериментально доказано. Мы рассмотрим ниже несколько примеров, иллюстрирующих сказанное.

Естественно, приведенные в § 5.6 результаты рентгеноструктурных исследований, свидетельствующие о существенных конформационных изменениях белка, сопровождающих функционирование «почетных ферментов» — гемоглобина и цитохрома *c*, также могут рассматриваться как подтверждение сформулированного выше тезиса.

Кайне и Сьюлтер [30] подробно изучили влияние комплексообразования с субстратом, связывания активирующих катионов и повышения температуры на состояние макромолекулы белка одного из важнейших ферментов — пируваткиназы. Эффекты, вызываемые всеми этими воздействиями, были качественно одинаковыми. Конформационные изменения регистрировали с помощью дифференциальных спектров поглощения в области 2800—3000 Å. Наблюдавшиеся изменения формы спектров свидетельствовали о резких изменениях в окружении некоторых ароматических хроматофоров, например триптофана, а именно о переходе от водного к гидрофобному окружению. По-видимому, нет никакого сомнения в том, что присоединение субстрата (пирувата), активирующих катионов и изменение температуры приводят к однотипным значительным конформационным изменениям глобулы пируваткиназы.

Весьма интересные данные о конформационных изменениях этого же фермента под действием субстрата

были получены Ройбенем и Кайне [31] с помощью метода ЯМР на ядре стабильного естественного изотопа таллия Tl^{205} (ядерный спин $1/2$). В работе изучался комплекс пируваткиназы с ионами Tl^+ и Mn^{2+} (оба иона являются активаторами фермента). Параметры регистрируемого спектра ЯМР Tl^{205} позволяют определить расстояние между ионом Tl^+ и парамагнитным ионом Mn^{2+} , связанными разными группами белка. Для исходного белка это расстояние оказывается равным 8,2 Å. Присоединение субстрата (фосфофенолпирувата) уменьшает расстояние между ними почти вдвое (до 4,9 Å). Это однозначно свидетельствует о существенных конформационных изменениях белка, сопровождающих связывание фосфофенолпирувата.

Серия важных исследований конформационных превращений фермента аспартаттранскарбамилазы (АТКА) была выполнена Хаммесом с сотрудниками (см., например, [32]). АТКА катализирует образование карбамил- α -аспартата из α -аспартата и карбамилфосфата на первом этапе биосинтеза пиримидинов. Фермент характеризуется четвертичной структурой и состоит из шести каталитических субъединиц (молекулярный вес каждой 33 000) и шести регуляторных субъединиц (молекулярный вес каждой 17 000). Молекулы субстратов взаимодействуют только с каталитическими субъединицами. Молекулы активатора (АТФ) и ингибитора (ЦТФ, Вг-ЦТФ) связываются только регуляторными субъединицами, в результате чего соответствующим образом меняется активность каталитических субъединиц фермента. Авторы [32] исследовали кинетику различных переходов нативного фермента и отдельных субъединиц из одного конформационного состояния в другое под действием молекул субстратов, активатора и ингибитора в различных сочетаниях. Регистрацию проводили с помощью дифференциальных спектров поглощения в ультрафиолетовой области, в работе применяли кинетические релаксационные методы. Были обнаружены различные типы конформационных превращений длительностью от сотен микросекунд до десятков миллисекунд. Быстрые конформационные переходы связаны с каталитическими, а медленные — с регуляторными процессами.

Интересные результаты были получены также при исследовании одного из самых распространенных фермен-

тов — d-глицеральдегид-3-фосфогидрогеназы (ГАФД), которая катализирует процесс окислительного фосфорилирования d-глицеральдегид-3-фосфата до 1,3-дифосфоглицериновой кислоты с НАД⁺ в качестве кофермента. Молекула фермента состоит из четырех субъединиц. Методом спиновых меток Бальтазар [33] показал, что комплексообразование с коферментом приводит к конформационным изменениям белка в области активного центра (см. также [34]).

Более подробно процесс образования комплекса между ферментом ГАФД и коферментом НАД⁺ был изучен Киршером с сотрудниками [35, 36]. Авторы исследовали дифференциальные спектры поглощения (в области 3000—5000 Å) растворов фермента в присутствии НАД⁺ при разных температурах и кинетику перехода от одного состояния в другое при мгновенном изменении температуры (метод температурного скачка с мертвым временем около $2 \cdot 10^{-6}$ сек). Обращает на себя внимание резкая зависимость спектра от температуры между 3 и 40° С без изобестической точки. Это может свидетельствовать о постепенном изменении окружения хромофора при повышении температуры за счет конформационной перестройки белковой глобулы. Действительно, методом температурного скачка обнаружен быстрый мономолекулярный релаксационный процесс ($\tau < 10^{-5}$ сек), связанный не со смещением равновесия между ферментом и коферментом при изменении температуры, а с перестройкой окружения хромофорной группы активного центра. Релаксационные процессы, обусловленные конформационными изменениями фермента за счет диссоциации или присоединения кофермента при мгновенном изменении температуры, более медленны (τ от 0,1 до 3 сек в зависимости от концентрации кофермента). Методом остановленного потока удалось установить, что комплексообразование с НАД⁺ происходит в две стадии: за быстрой бимолекулярной стадией ($k \sim 10^5$ моль⁻¹·сек⁻¹) следует медленная мономолекулярная релаксационная стадия ($k \sim 0,3$ сек⁻¹).

Существенные результаты были за последние годы получены методом спиновых и флуоресцентных меток. Хорошие обзоры этих работ можно найти у Лихтенштейна [37—39]. Сущность метода спиновых меток, природа информации, извлекаемой из изменений пара-

метров сигнала ЭПР метки при изменении состояния среды, ее окружающей, обсуждаются в специальных исследованиях [40—46]. Интересные конкретные данные были получены в работах [47, 48]. В глутаматаспартат-трансаминазе при воздействии на активный центр специфических субстратов и ингибиторов конформационные изменения регистрируются по изменению спектра ЭПР метки, локализованной на расстоянии 16—18 Å от активного центра. Особенно важны результаты, полученные тем же методом при исследовании действия специфических ингибиторов на лизоцим — сравнительно простой фермент без четвертичной структуры. Изучены также конформационные изменения миозина во время ферментативного гидролиза АТФ [49—54]. С помощью спиновой метки, присоединенной к S-1-тиоловой группе белка на расстоянии более 6 Å от активного центра, было установлено, что в процессе ферментативного гидролиза конформационное состояние молекул миозина отличается как от свободного миозина, так и от равновесного комплекса миозина с продуктом реакции АДФ.

§ 6.4. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ФЕРМЕНТЫ И НА АКТИВАЦИОННЫЕ ПАРАМЕТРЫ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Все результаты предыдущей главы, относящиеся к влиянию температуры на конформацию белков, к неприменимости уравнения Аррениуса для процессов с участием белков, к отсутствию физического смысла активационных параметров этих процессов, к так называемому компенсационному эффекту, сохраняют полную силу и при рассмотрении ферментативных реакций. Ряд экспериментальных данных гл. 5 по температурной зависимости теплот взаимодействия белков с низкомолекулярными веществами, свидетельствовавших о постепенной перестройке структуры белка и об изменении пути реакции с изменением температуры, непосредственно относился к процессам взаимодействия ферментов (химотрипсин, альдолаза и др.) с ингибиторами. В этом параграфе будут более подробно рассмотрены данные по активационным параметрам ферментативных реакций и их зависимости от температуры, рН, ионной силы и т. д.

Общие закономерности активационных параметров ферментативных реакций подробно обсуждены в работе автора [55]. Незначительные изменения фермента, вызванные, например, изменением солевого состава растворителя или переходом от одного изозима к другому, могут привести к резким смещениям значений ΔE_a и ΔS_a (определяемых по Аррениусу), которые, однако, не сопровождаются существенными изменениями скорости реакции. Так, например, лактатдегидрогеназа (ЛДГ) сердечной мышцы лягушки представлена тремя изозимами: *AAAA*, *BVAA* и *BBBB* (молекула фермента с четвертичной структурой состоит из четырех субъединиц двух возможных типов *A* и *B*). ЛДГ скелетной мышцы лягушки представляет собой чистый изозим *AAAA*. Скорости каталитического превращения почти одинаковы для ЛДГ сердечной и скелетной мышц, отличаясь лишь примерно в 10 раз (свободные энергии активации ΔF_a равны 22,8 и 24,1 ккал/моль соответственно). Однако энергия активации ΔE_a для этих препаратов равны 59,1 и 29,5 ккал/моль, а ΔS_a — 109 и 15,9 э. е. соответственно. При переходе от ЛДГ сердечной к ЛДГ скелетной мышцы в аррениусовском выражении для константы скорости экспоненциальный сомножитель возрастает примерно в 10^{21} раз, а предэкспоненциальный сомножитель уменьшается приблизительно в 10^{20} раз. Трудно представить себе физические механизмы, ответственные за столь большие изменения активационных параметров одинаковых процессов, почти не отличающихся по единственной непосредственно измеряемой характеристике — скорости реакции [56].

Существенные изменения активационных параметров с практическим сохранением скорости процесса для одного и того же фермента часто наблюдаются при смене субстратов. Так, например, бимолекулярная константа скорости образования фермент-субстратного комплекса для химотрипсина равна $6,6 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$ (при pH 7,8, 25° С, с метилгидроциннаматом в качестве субстрата). При переходе к другому субстрату — метил-d-β-фениллактату в тех же условиях эта константа равна $4,0 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$, т. е. скорость реакции становится меньше приблизительно в 1,6 раза. Вместе с тем определенный по Аррениусу предэкспоненциальный множитель при этом уменьшается,

а экспоненциальный возрастает на 5—6 порядков (см. [57]). Таких примеров можно привести множество.

Особенно большое внимание уделено в литературе температурной зависимости активационных параметров. Наиболее часто обсуждается ситуация, когда активационные параметры испытывают при определенных значениях температуры скачкообразные изменения (изломы на аррениусовских анаморфозах). Соответствующий материал собран во многих обзорах и оригинальных публикациях (см., например, [38, 55, 58, 59]). По существу, речь идет о тех же эффектах, что были отмечены выше: некоторое воздействие сравнительно слабо влияет на скорость реакции, но сильно — на измеряемые по Аррениусу активационные параметры. В литературе существуют три типа объяснений этих изломов. Объяснения первого типа сводятся к тому, что на самом деле никаких резких изменений истинных активационных параметров нет и ферментативные процессы подчиняются уравнению Аррениуса с одной энергией активации (см., например, [57]). Могут происходить достаточно плавные изменения эффективных активационных параметров, связанные с тем, что исследователь измеряет не истинную константу скорости элементарной стадии, а суммарную скорость процесса, определяемую различными элементарными равновесиями и скоростями, что может привести к самой причудливой температурной зависимости наблюдаемых активационных параметров. Этот тип объяснения сейчас редко встречается в литературе, так как было выполнено большое число исследований, в которых измеряли температурную зависимость скоростей отдельных стадий ферментативного процесса и получали однозначные доказательства наличия достаточно резких (на протяжении 2—3° С) изменений активационных параметров. В качестве примера можно привести работу Тальского и Мюллера [60], в которой детально (с интервалами около 0,5° С) определялись температурные зависимости как суммарной скорости гидролиза цитидин-2',3'-монофосфата рибонуклеазой, так и константы комплексообразования субстрат — фермент. Было обнаружено, что изломы на аррениусовских анаморфозах на самом деле представляют собой непрерывные переходы сложной формы, занимающие от 1,5 до 3° С.

Одно время было весьма распространено мнение, что изломы на аррениусовских анаморфозах свидетельствуют о протекании исследуемой реакции в две последовательные стадии с разными энергиями активации, причем каждая стадия лимитирует измеряемую скорость процесса в своей области температур выше или ниже точки перехода (см., например, [61]). Отметим, что достаточно резкий переход может наблюдаться лишь в том случае, если энергии активации двух стадий отличаются более чем на 16 ккал/моль [62, 63], а это в большинстве случаев не реализуется. Кроме того, ясно, что при таком объяснении стадия с большей энергией активации должна лимитировать скорость процесса в области низких температур, а стадия с меньшей энергией активации — в области высоких температур. Это действительно часто наблюдается. Так, например, фермент гипоксантинфосфорибозилтрансфераза, который катализирует перенос фосфорибозильного остатка с 5-фосфорибозилпирофосфата на гипоксантин, дает четко выраженный излом на аррениусовской анаморфозе при 23° С. В области низких температур $\Delta E_a = 51,0$ ккал/моль, а при большей температуре $\Delta E_a = 13,1$ ккал/моль, что соответствует скачкообразному увеличению экспоненциального сомножителя (и уменьшению предэкспоненциального) в выражении для константы скорости примерно на 28 порядков (см. [64]). Вместе с тем встречаются и прямо противоположные ситуации. Так, весьма близкий фермент инозинмонофосфатпирофосфатфосфорибозилтрансфераза дрожжей [65] дает излом на аррениусовской анаморфозе при 19° С. В этом случае, однако, в области низких температур $\Delta E_a = 5,7$ ккал/моль, а при температуре, большей 19° С, повышается до 11,3 ккал/моль, что соответствует понижению экспоненциального и увеличению предэкспоненциального сомножителей более чем на 4 порядка.

Наиболее распространена сейчас третья гипотеза; согласно этой гипотезе изменение активационных параметров процесса с температурой происходит вследствие конформационного перехода макромолекулы фермента, которая может существовать в двух формах, обладающих разными свойствами, в том числе различными значениями ΔE_a катализируемой ферментом реакции. Так, например, в работе [66] обнаружено, что аррениусовская анаморфо-

за для оксидазы d-аминокислот испытывает (в случае окисления d-аланина) излом при 14°C ; при большей температуре $\Delta E_a = 10,3$ ккал/моль, при меньшей $\Delta E_a = 16,9$ ккал/моль. В этой же области температур (между 10 и 20°C) наблюдается изменение седиментационной константы, оптической плотности в ультрафиолетовой области спектра и интенсивности триптофановой флуоресценции. Следует отметить, что изменения в ультрафиолетовых спектрах поглощения носят в этом случае непрерывный характер и ΔD представляют собой линейную функцию от температуры без изломов. Температурную же зависимость флуоресценции триптофана действительно можно интерпретировать как переход молекул из одной конформации в другую, одна из которых стабильна при температуре, меньшей 10°C , а другая — при температуре, большей 20°C . Авторы оценили энтальпию перехода и нашли $\Delta H \approx 78$ ккал/моль. Если строить аррениусовскую анаморфозу не для аланина, а для d-метионина, то изменение активационных параметров регистрируется не при 14 , а при 24°C . Приведенные данные не позволяют усомниться в том, что в исследованном интервале температур действительно происходят некие структурные изменения фермента. Однако нет никаких однозначных доказательств того, что переход происходит именно в точке излома аррениусовской анаморфозы. Создается впечатление, что положение перехода зависит от способа регистрации.

Аналогичным образом интерпретировали Лерер и Баркер [67] результаты своего исследования кинетики расщепления фруктозодифосфата ферментом альдолазой.

Они измеряли температурные зависимости термодинамических параметров суммарной реакции (по константе равновесия катализируемой реакции), образования комплекса субстрат — фермент (по константе Михаэлиса), а также активационных параметров (по $V_{\text{макс}}$). Аррениусовская анаморфоза лучше всего аппроксимируется двумя прямыми, пересекающимися при 25°C . Эта температура и принята за температуру, при которой происходит переход между двумя «конформерами». Анаморфоза практически одинаково хорошо описывает экспериментальные данные если принять для энтальпии этого конформационного перехода любое значение от 10 до 1000 ккал/моль. В табл. 6.2 приведены результаты измерений свободной

энергии ΔF , энтальпии ΔH и энтропии ΔS исследованных процессов при температурах ниже и выше температуры конформационного перехода.

Таблица 6.2

	Суммарная реакция		Комплексообразование		Активация	
	ниже (21,2° С)	выше (30° С)	ниже (20° С)	выше (31,9° С)	ниже (20° С)	выше (31,9° С)
	температуры конформационного перехода					
ΔF , ккал/моль	6,5	6,4	-7,2	-7,4	15,4	15,5
ΔH , ккал/моль	14,30	10,6	11,5	-13,8	18,2	13,4
ΔS , э. е.	26,5	13,8	63,8	-20,9	9,2	-7,3

Из табл. 6.2 видно, что если судить по единственным непосредственно измеряемым величинам — свободным энергиям превращения или активации, то практически никакого перехода не наблюдается. Различие между конформерами возникает только в результате использования уравнений Вант-Гоффа или Аррениуса.

Иногда для объяснения экспериментальных данных не хватает двух конформеров. Так, например, аррениусовские анаморфозы для реакции синтеза из АДФ и глюкозы АТФ и глюкозо-1-фосфата, катализируемой ферментом пирофосфорилазой, выделенной из *Rhodospirillum rubrum*, в присутствии и в отсутствие активатора (пируват) имеют весьма сложный вид [68]. Без пирувата кривая температурной зависимости спрямляется в аррениусовских координатах для температур ниже 26° С. Для этих температур измеряемая энтальпия активации равна 14,2 ккал/моль. При повышении температуры анаморфоza перестает быть прямолинейной, измеряемая энтальпия активации быстро падает, становясь при 32° С практически равной нулю, а выше 38° С отрицательной величиной. В присутствии пирувата энтальпия активации остается постоянной (11,2 ккал/моль) вплоть до 32° С и становится равной нулю лишь при 52° С. Эти результаты

удается объяснить, если постулировать существование трех конформеров, между которыми возможны обратимые переходы: двух «низкотемпературных» и одного «высокотемпературного».

В работе [53] изучена температурная зависимость спектров ЭПР спин-меченого миозина и его комплекса с АДФ в интервале от -2 до $+37^\circ\text{C}$. Измеряли время корреляции ($\tau_{\text{корр}}$) спин-метки, ковалентно связанной с SH-группами миозина. Было обнаружено, что при связывании АДФ структура белка в окрестности спин-метки становится более рыхлой. Кроме того, характер изменений $\tau_{\text{корр}}$ с температурой допускает двойное объяснение. 1. При изменении температуры происходят более или менее непрерывные структурные изменения белковой матрицы, и для каждой температуры в среднем существует своя конформация молекул миозина. 2. В растворе при каждой температуре существуют несколько вполне определенных форм белка, равновесие между которыми смещается с изменением температуры. Для описания изменений $\tau_{\text{корр}}$ от -2 до $+37^\circ\text{C}$ в этом случае пришлось бы предположить, что в растворе находятся в равновесии при каждой температуре по крайней мере пять структурных форм фермента.

Авторы склоняются в пользу первого предположения.

Из всего материала, изложенного в этой и предыдущей главах, ясно, что температурные аномалии ферментативных реакций возникают в результате незаконного применения уравнения Вант-Гоффа и Аррениуса при обработке экспериментальных данных. В области температур, значительно меньших температуры, при которой происходит разупорядочивание, денатурация белковой молекулы, при любом изменении температуры происходит большая или меньшая перестройка белковой глобулы. По-видимому, обычно такая перестройка затрагивает конфигурацию, а не конформацию глобулы (см. § 4.4). С повышением температуры глобулу слегка «ведет», как проволочную конструкцию. В § 5.6 подробно разобрано, к каким следствиям это может привести при обработке экспериментальных данных по кинетике процессов с участием белков обычными методами газовой кинетики. Все сказанное в § 5.6 в полной мере относится и к ферментативным процессам.

Может возникнуть вопрос: не противоречит ли утверждение об обычно плавных, постепенных изменениях конфигураций глобул с температурой многочисленным экспериментальным данным, свидетельствующим о часто наблюдаемых внезапных изменениях с температурой физических свойств исследуемых систем: интенсивности флуоресценции метки или «собственной» аминокислоты, времени корреляции спиновых меток и т. д.? Это противоречие кажущееся. Во всех случаях наличие таких скачкообразных изменений связано с изменением взаимодействия низкомолекулярного индикатора с окружающими его группами белковой глобулы. С изменением температуры расположение белковых групп постепенно меняется, а размеры низкомолекулярного индикатора остаются практически постоянными. Расстояние между индикатором и белковыми группами меняется с температурой постепенно, но вследствие экспоненциального короткодействующего характера межмолекулярных сил взаимодействие резко меняется при прохождении белка через определенную конфигурацию, соответствующую определенной температуре. Таким образом, наблюдаемые скачки безусловно свидетельствуют о том, что в исследуемой области температур происходят какие-то конфигурационные изменения белковой глобулы (может быть, и непрерывные), но точное положение этих скачков характеризует скорее метод регистрации, чем сам белок.

§ 6.5. ФИЗИКА ЭЛЕМЕНТАРНОГО АКТА ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА [69]

Подведем некоторые итоги. Анализ данных, приведенных в двух последних главах, заставил нас прийти к следующему выводу: при протекании ферментативной реакции макромолекула фермента претерпевает обязательные для выполнения своей функции изменения конструкции — конформационные превращения. Мы убедились в том, что измеряемые, вернее, рассчитываемые с помощью уравнений Аррениуса и теории активированного комплекса активационные параметры ферментативных реакций (даже относящиеся к отдельным химическим стадиям многостадийного процесса), как правило, лишены того смысла, который они имеют для классических газовых реакций,

а возможно, и вообще лишены физического смысла. Тем не менее в своем анализе мы явно или неявно исходили из того, что какие-то *истинные* активационные параметры ΔE_a и ΔS_a ферментативной реакции существуют, только мы не умеем их измерять. На чем основано это предположение о существовании истинных активационных параметров? Мы видели, что формальное подчинение температурной зависимости скорости реакции уравнению Аррениуса не может служить обоснованием какой-либо теории. Предположение о существовании истинных ΔE_a и ΔS_a основано только на привычке интерпретировать результаты кинетических измерений с помощью уравнений типа Аррениуса. По-видимому, никаких других обоснований этого постулата не существует.

Что означает принятие такого постулата? Оно означает допущение правильности следующей общей картины протекания химического превращения. При данной температуре существует определенный путь реакции, соответствующий данному, наименьшему из возможных значению активационного барьера ΔE_a . Скорость реакции определяется числом молекул, энергия которых достаточна для преодоления этого активационного барьера. Изменение скорости с температурой происходит по двум причинам: 1) может измениться *) активационный барьер, и 2) с ростом температуры растет количество богатых энергией молекул.

Фактически эти две причины температурной зависимости относятся к *разным процессам*. Изменение активационного барьера связано с конформационными или конфигурационными превращениями макромолекулы, а рост числа богатых энергией молекул относится к молекулам субстрата, претерпевающим химическое превращение. Таким образом, постулат о существовании истинных энергий и энтропий активации основан в конечном счете на отделении химической реакции субстрата от конформационного превращения фермент-субстратного макромолекулярного комплекса. В ряде случаев это разделение и, следовательно, вся картина справедливы и для реакций белков. Однако, как правило, в свете всего приведенного

*) Даже не термодинамически, т. е. не удовлетворяя условию (5.3).

в этой главе материала такое разделение вряд ли можно считать законным. Химическое превращение субстрата, сопровождающееся разрывом связей или образованием новых связей или и тем и другим, происходит одновременно с конформационным превращением всего макромолекулярного фермент-субстратного комплекса.

Сформулируем теперь новую концепцию элементарного акта в ферментативном катализе. Эта концепция основана на постулате, согласно которому *конформационное изменение субстрат-ферментного комплекса, следующее за присоединением субстрата к активному центру фермента, носит характер релаксации и включает в себя, кроме разрыва старых и образования новых вторичных связей в макромолекуле белка, также химические изменения субстрата, превращающие его молекулу в молекулу или молекулы продукта. Элементарный акт ферментативной реакции заключается в конформационном изменении макромолекулы (фермент-субстратного комплекса), и скорость превращения субстрат — продукт определяется скоростью этого конформационного изменения.*

Прежде чем рассматривать общую схему ферментативного процесса в рамках предлагаемой концепции, обсудим вопрос о смысле утверждения о *релаксационном* характере конформационных изменений. Можно представить следующую последовательность событий, происходящих после локального мгновенного изменения в активном центре (изменение заряда, присоединение молекулы субстрата или ингибитора и т. д.). Наиболее сильные изменения электронной структуры и геометрии активного центра и субстрата происходят за время колебательной релаксации ($\tau \sim 10^{-12} - 10^{-13}$ сек). По-видимому, именно они в основном обуславливали наблюдавшиеся в работе [70] изменения оптической плотности при фотодиссоциации оксигемоглобина под действием лазерных вспышек (см. выше § 5.4). Запаздывание этих изменений относительно вспышки не удалось зарегистрировать при временном разрешении порядка 10^{-9} сек. Как уже было сказано, такие практически мгновенно реализующиеся изменения затрагивают только молекулу субстрата и непосредственно контактирующие с ней в фермент-субстратном комплексе атомные группы активного центра. Таким образом, после окончания релаксации колебательных

степеней свободы активного центра возникает следующая ситуация. Субстрат и его ближайшее окружение находятся в новом локально равновесном состоянии, а остальная часть макромолекулярного комплекса остается неизменной. Возникает стерическое напряжение.

Релаксация к новой равновесной конформации всей макромолекулы должна происходить в два этапа. Прежде всего должны возникнуть изменения, не требующие модификации способа замыкания вторичных связей в макромолекуле (т. е. изменения, названные в гл. 4 конфигурационными и затрагивающие конфигурацию макромолекулы вблизи активного центра, но не ее общую конформацию). Эти изменения требуют согласованного движения ряда атомных групп и происходят поэтому значительно медленнее первичных изменений в активном центре. Как правило, изменения участков макромолекулы вблизи активного центра должны в свою очередь вызывать изменения электронных характеристик последнего. По-видимому, небольшие дополнительные изменения оптической плотности в спектре гема, наблюдавшиеся в уже цитированной выше работе [70] через 10^{-7} — 10^{-8} сек после фотодиссоциации, отражают именно вторичные процессы этого типа.

Дальнейшие изменения макромолекулы связаны с релаксацией к новому конформационному состоянию, появившемуся или ставшему кинетически доступным в результате происшедших локальных микрохимических изменений.

В ходе такой релаксации фермент-субстратного комплекса, которая может длиться миллисекунды и более, и реализуется, согласно сформулированному выше постулату, катализируемое химическое превращение (см. § 5.4) *).

Рассмотрим на основе предложенного нами постулата абстрактную схему ферментативного процесса. Пусть катализируемая реакция заключается в разрыве одной из связей молекулы А — В, состоящей из двух атомных групп А и В, которые в результате реакции превращаются в отдельные молекулы:



*) О временах перестройки макромолекул см. также [71].

Пусть такое превращение одной молекулы сопровождается в данных условиях (температура, состав среды и т. д.) понижением полной энергии системы на ΔU_0 .

Реакция (6.4) может включать в себя не только разрыв связи А—В, но и присоединение, например, протона и

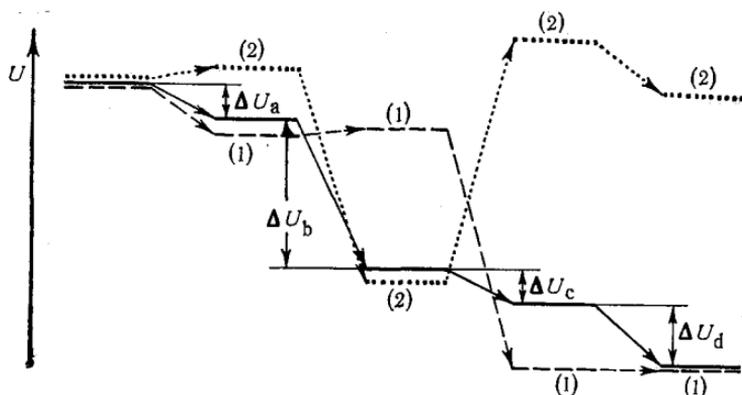


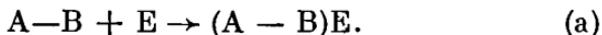
Рис. 6.2. Схема энергетических изменений на разных стадиях ферментативного катализа.

Сплошные линии — полная система (субстрат + фермент); пунктир — подсистема (1) (субстрат + активный центр); точечный пунктир — подсистема (2) (остальной фермент). Шкалы энергии для всех систем произвольны.

иона гидроксила к группам А и В (если речь идет о реакции гидролиза). Эти изменения, так же как и изменения сольватации, вносят свой вклад в ΔU_0 . При изучении энергетики различных стадий такой схематической ферментативной реакции мы в дальнейшем будем также рассматривать только изменения энергии системы, сопровождающие превращения *одной* молекулы (макромолекулярного комплекса). Именно поэтому везде будет идти речь о *полной* энергии системы, а не о ее свободной энергии (подробнее см. гл. 8).

Проведем теперь этот процесс каталитически с участием специфического фермента Е. Реакция, естественно, распадается на следующие стадии (рис. 6.2).

а) Образование специфического фермент-субстратного комплекса:



Эта быстрая стадия реакции представляет собой обычный химический процесс, и то обстоятельство, что один из реагентов, E , является макромолекулой, никак не сказывается на его протекании. Можно считать, что квазиравновесие стадии a устанавливается при неизменной конфигурации большей части молекулы белка. В этом смысле данная стадия проходит неадиабатически *). Конформация E становится неравновесной, так как возникает новое кинетически достижимое конформационное состояние фермент-субстратного комплекса с более низкой энергией. Таким образом, малая часть комплекса $(A-B)E$ вблизи активного центра с электронной и геометрической структурой, претерпевшей небольшие изменения в результате присоединения субстрата, является квазиравновесной, а основная часть $(A-B)E$, конформационная релаксация которой протекает медленно, стала неравновесной. Пусть полная энергия системы *понижается* в результате стадии a на ΔU_a . Эту величину можно формально разделить на две части:

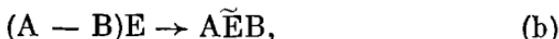
$$\Delta U_a = \Delta U_a^{(1)} + \Delta U_a^{(2)}, \quad (6.5)$$

где $\Delta U_a^{(1)}$ — изменение энергии быстро релаксировавшей и изменившей конфигурацию части комплекса вблизи активного центра, а $\Delta U_a^{(2)}$ — изменение энергии основной части молекулы, не успевшей испытать конформационное превращение. Очевидно, $\Delta U_a^{(2)} > 0$, так как неизменная конформация стала неравновесной и в областях, примыкающих уже к измененному активному центру, должны возникнуть напряжения. Поскольку было принято, что

*) Здесь и в дальнейшем термины «адиабатический» и «неадиабатический» употребляются в том смысле, какой они имеют в механике. Пусть рассматриваемую систему можно разделить на две подсистемы так, чтобы идущий в системе суммарный процесс тоже можно было разделить на два процесса, один из которых (процесс 1) представляет собой возмущение, инициирующее процесс 2. Пусть характерные времена процессов 1 и 2 равны τ_1 и τ_2 соответственно. Тогда процесс 1 называется неадиабатическим, если $\tau_1 < \tau_2$, и адиабатическим, если $\tau_1 \geq \tau_2$.

полная энергия в результате стадии а понижается ($\Delta U_a < 0$), то отсюда следует, что $|\Delta U_a^{(1)}| > |\Delta U_a|$ и $\Delta U_a^{(1)} < 0$.

б) Медленная релаксация фермент-субстратного комплекса к новому равновесию и превращение субстрат—продукт:



где \tilde{E} — новое конформационное состояние фермента. Химические изменения субстрата реализуются как часть конформационного изменения макромолекулярного комплекса. Поскольку стадия б имеет релаксационный характер, энергия системы понижается ($\Delta U_b < 0$). Чисто формально можно снова выделить часть $\Delta U_b^{(1)}$, относящуюся к субстрату и непосредственно примыкающим к нему областям активного центра, и часть $\Delta U_b^{(2)}$, относящуюся к остальной части макромолекулы. Знак $\Delta U_b^{(1)}$ зависит от конкретной природы химических превращений субстрата и структуры активного центра. Пусть (для определенности) $\Delta U_b^{(1)} > 0$. Тогда $\Delta U_b^{(2)} < 0$ и $|\Delta U_b^{(2)}| > |\Delta U_b^{(1)}|$. Поскольку именно на стадии б реализуется химическое превращение субстрата, она и является элементарным актом ферментативной реакции.

с) Распад комплекса фермент — продукт:



Подобно стадии а, эта стадия представляет обычное химическое превращение с быстрыми локальными изменениями в области активного центра и сольватационными изменениями продуктов реакции, переходящих в объем. Фермент остается в конформационном состоянии \tilde{E} , которое становится неравновесным и напряженным. Пусть $\Delta U_c < 0$. Тогда, очевидно,

$$\Delta U_c^{(1)} < 0, \quad \Delta U_c^{(2)} > 0, \quad |\Delta U_c^{(1)}| > |\Delta U_c^{(2)}|.$$

Поскольку в результате прохождения стадий а, б и с молекула фермента снова стала свободной, но конформационно неравновесной, очевидно, что

$$\Delta U_a^{(2)} + \Delta U_b^{(2)} + \Delta U_c^{(2)} > 0. \quad (6.6)$$

Это отражено на рис. 6.2.

d) Медленная конформационная релаксация фермента к исходному равновесному состоянию свободной макромолекулы:



При этом $\Delta U_d = \Delta U_d^{(2)} < 0$, $\Delta U_d^{(1)} = 0$. Очевидно, что

$$\Delta U_a + \Delta U_b + \Delta U_c + \Delta U_d = \Delta U_0. \quad (6.7)$$

Быстрые химические стадии а и с, протекающие неадиабатически относительно медленных конформационных изменений макромолекулы, могут идти и с небольшим повышением энергии системы. При статистическом рассмотрении каталитического процесса в макрообъеме это отразится на квазиравновесной концентрации комплексов $(A - B)E$ и $A\tilde{E}B$. По-видимому, однако, скорость процесса в большинстве случаев лимитируют медленные релаксационные стадии b и d. Естественно, в конкретных ферментных системах могут реализоваться более сложные случаи, когда после первой релаксации, не сопровождающейся химическим превращением субстрата или кофактора, к ферменту присоединяется вторая молекула субстрата или кофактора, после чего снова происходит конформационное изменение, уже ведущее к химическим превращениям. Соответствующая модификация схемы не представляет труда *).

Перейдем к кинетическим аспектам проблемы. В рамках развиваемых в этой книге представлений скорость химического превращения субстрата совпадает со скоростью конформационной релаксации фермент-субстратного комплекса (стадия b), т. е. со скоростью движения системы по пути, определяемому выделенными механическими степенями свободы, которые заданы конструкцией макромолекулы **). В процессе релаксации энергия системы в целом непрерывно понижается. Можно, конечно,

*) Об электронно-конформационных взаимодействиях и их возможной роли в ферментативном катализе см. также [3, 17].

***) Это не исключает возможности ситуации, при которой скорость образования свободного продукта определяется стадией d. Предложенная схема, конечно, идеализирована. Если константа связывания продукта с \tilde{E} больше, чем с E, то скорость появления свободного продукта может лимитироваться релаксационной стадией d.

формально выделить смещения атомов, непосредственно ответственные за изменения конфигурации молекулы субстрата, за ее химическое превращение, и утверждать, что одновременно происходящие изменения в других частях макромолекулы приводят к понижению эффективного активационного барьера этого превращения. Именно наличие выделенных механических степеней свободы позволяет рассматривать смещения, происходящие в удаленных друг от друга областях макромолекулы, как совершающиеся в один акт, причем нет никакого смысла пользоваться понятиями энергии и энтропии активации, что делается в теории активированного комплекса. Как было сказано выше, термодинамическое условие (5.43) в данном случае не выполняется. В тех сравнительно узких температурных пределах, в которых обычно проводятся кинетические исследования ферментативных процессов, зависимость скорости от температуры может достаточно хорошо описываться экспоненциальной функцией. Однако мы уже видели выше, к каким ошибкам может привести формальное применение уравнений типа Аррениуса для определения активационных параметров ферментативной реакции. По существу, никаких активационных параметров в обычном химическом смысле этого понятия в данном случае просто нет. При изменении температуры скорость релаксационной стадии b изменяется не потому, что изменяется число молекул с энергией, достаточной для преодоления некоего активационного барьера, а потому, что изменяется исходная конформация макромолекулы, а следовательно, путь и скорость ее последующей релаксации *). Кроме того, изменение исходной конформации макромолекулы может привести к уменьшению числа молекул субстрата, которым на стадии a удастся образовать «правильный» фермент-субстратный комплекс, т. е. комплекс, конформационная релаксация которого сопровождается химическим превращением субстрат — продукт. Вероятно, в большинстве случаев конкурентный ингибитор отличается от субстрата именно тем, что индуцированное им конформационное превращение не затрагивает химических связей ингиби-

*) Конечно, сама скорость релаксации должна зависеть от температуры, но, по-видимому, эта зависимость практически никогда не является лимитирующей.

тора. В этом смысле можно сказать, что вдали от температурного оптимума некоторые молекулы субстрата ведут себя как молекулы конкурентного ингибитора. Во всяком случае температурная зависимость скорости ферментативной реакции по обе стороны температурного оптимума объясняется только одной причиной, а именно *изменениями конфигурации* белковой глобулы с температурой. Безусловно, не исключена возможность того, что лимитируют скорость суммарного процесса не релаксационные стадии *b* и *d*, а химические *a* и *c*. Однако такие случаи, вероятно, являются исключением, а не правилом.

Эти соображения допускают экспериментальную проверку. Можно думать, что конформационные и конфигурационные изменения белка под действием таких неспецифических агентов, как температура и pH, протекают еще медленнее, чем специфические изменения, индуцируемые субстратом. В этом случае может возникнуть ситуация, при которой скорость ферментативного процесса при «новой» температуре (pH) будет соответствовать «старой» температуре (pH). Такие явления были действительно обнаружены для ферментативных реакций гидролиза АТФ миозином и мочевины уреазой [73]. В этой работе было показано, что с температурой или pH меняется не только конформационное состояние, но и путь конформационной релаксации фермента во время каталитического акта. Было установлено, что для исследованных процессов температурная зависимость скорости ферментативной реакции определяется не изменением числа молекул, способных преодолеть активационный барьер, а изменением исходного состояния и пути конформационной релаксации фермент-субстратного комплекса.

Кроме того, роль релаксационных стадий велика и по другой причине. Энергия, которая может освобождаться в результате протекания быстрых химических стадий, как правило, рассеивается в тепло. Лишь медленные релаксационные стадии могут быть использованы для проведения полезной работы при мышечном сокращении или для обеспечения эндотермических процессов (подробнее см. гл. 8).

Рассмотренная в этой главе новая релаксационная концепция ферментативного катализа является, по существу, одним из возможных вариантов общей схемы белок—

машина. Эта схема допускает и более традиционный подход [74], согласно которому кинетически неравновесное состояние системы после образования фермент-субстратного комплекса и локализация энергии на выделенных степенях свободы используются для снижения активационного барьера.

Релаксационная концепция и традиционный подход имеют одну общую черту: механизмы прямой и обратной реакции должны быть существенно различны. Это означает, что обе схемы могут работать только вдали от состояния химического равновесия между субстратом и продуктом. В противном случае наличие фермента должно влиять на равновесие, что противоречит законам равновесной термодинамики.

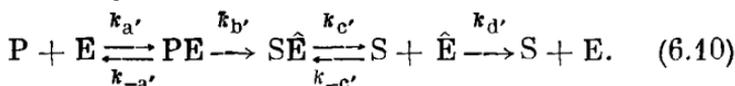
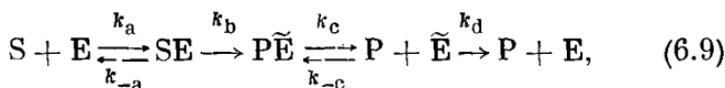
Именно эти соображения лежат в основе критики, которой подверглась релаксационная концепция в [75]. Совершенно ясно, что такая критика с тем же правом может быть отнесена к любому варианту схемы белок — машина, в том числе и к схеме «дыбы» [15].

Во всех случаях, когда фермент работает как механическое устройство, механизмы реакций вдали от состояния термодинамического равновесия и близ него должны быть различны.

Рассмотрим с этой точки зрения предложенную здесь релаксационную концепцию. Как ясно из изложенного выше, ферментативный катализ химического превращения



где S — субстрат, а P — продукт, вдали от химического равновесия осуществляется согласно схемам

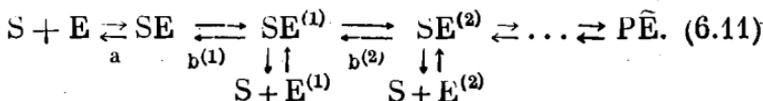


Прямая реакция описывается схемой (6.9), обратная — схемой (6.10). Как уже подчеркивалось выше, элементарные акты быстрых стадий a , c , a' и c' протекают и соответствующие квазиравновесия устанавливаются при

неизменных конформациях белка. Релаксационные стадии b , d , b' и d' можно описать двумя способами. Переход системы к новому конформационному состоянию после присоединения субстрата (или диссоциации продукта) к активному центру можно рассматривать как механическое движение вдоль выделенной степени свободы под действием силы, возникающей на границе между отрелаксировавшей и неотрелаксировавшей областями фермент-субстратного комплекса. Это движение включает в себя превращение субстрата в продукт (или продукта в субстрат для обратной реакции). Константа скорости такой стадии, например k_b , не является истинной константой скорости определенной химической реакции. Ее значение зависит от концентрации субстрата, отношения концентраций субстрата и продукта (т. е. от степени отклонения от химического равновесия $S \rightleftharpoons P$). В самом деле, благодаря относительной медленности релаксационной стадии b элементарные акты стадии a могут происходить и во время релаксации, которая протекает, таким образом, не под действием некоей постоянной силы, а под влиянием последовательных толчков. Если концентрация субстрата очень мала, то толчки происходят редко, фермент успевает между ними вернуться к исходной конформации и результирующая скорость релаксации уменьшается. Аналогичным образом на стадию b будет действовать приближение к химическому равновесию из-за повышения концентрации продукта. Таким образом, необратимость стадии b (как и других релаксационных стадий) обусловлена только тем фактом, что система $S-P$ далека от термодинамического равновесия. Циклические конформационные превращения фермента ($E \rightarrow \tilde{E} \rightarrow E$) обеспечиваются энергией превращения $S \rightarrow P$ вдали от химического равновесия.

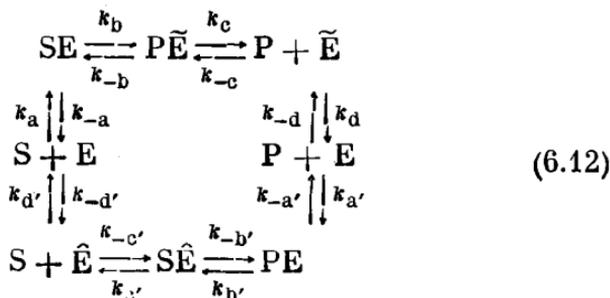
Процесс конформационной релаксации можно описать и другим способом, а именно как последовательность многих элементарных актов (повороты вокруг простых связей, изменения валентных углов, разрыв и образование водородных связей и т. д.). Каждый из этих актов обратим, но процесс в целом необратим, если система $S-P$ не находится в состоянии химического равновесия. Путь конформационной релаксации полностью определяется конструкцией системы. Оба способа описания, по

существо, идентичны и приводят к одинаковым следствиям. В рамках второго способа релаксационную стадию \tilde{b} можно представить в виде



Естественно, результирующая константа k_b представляет собой сугубо эффективную величину.

Если концентрация продукта P превышает равновесное значение, то процесс протекает в обратном направлении, через другие неравновесные конформационные состояния (см. (6.10)), но все вышеприведенные рассуждения остаются в силе. В условиях химического равновесия все стадии становятся обратимыми и схемы (6.9) и (6.10) объединяются:

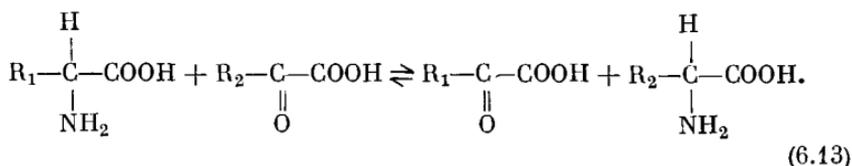


Отношения концентраций свободных S и P в равновесии не зависят от присутствия фермента. В то же время значения констант скоростей «механических» стадий, включающих конформационные изменения (т. е. $k_b, k_{-b}, k_d, k_{-d}, k_{b'}, k_{-b'}, k_{d'}, k_{-d'}$), должны уменьшаться по мере приближения системы к химическому равновесию. Для настоящих механических систем равновесие означает покой. Для таких систем, как макромолекулы белка, можно ожидать заметного замедления релаксационных стадий. Действительно, в работе [76] было показано, что в условиях динамического окислительно-восстановительного равновесия не удается зарегистрировать конформационных переходов между равновесными формами окисленного и восстановленного цитохрома c . Можно думать, что для большинства ферментативных процессов при

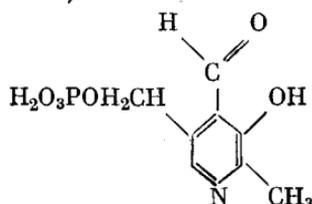
приближении системы к условиям химического равновесия релаксационные (и вообще «машинные») механизмы катализа перестают быть эффективными и заменяются обычными химическими реакциями субстрата с каталитическими группами активного центра, не требующими конформационных изменений и возникновения напряженных кинетических неравновесных состояний, которые направленно толкают систему вдоль координаты реакции. Хорошо известно, что в клетке большинство ферментативных процессов реализуется в условиях, далеких от химического равновесия (для данной реакции), и преимущества «машинных» механизмов могут быть использованы в полной мере.

§ 6.6. ДИНАМИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТА АСПАРТАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ

За последние годы выполнено много исследований, посвященных выяснению деталей механизма ряда конкретных ферментативных процессов. Чем больше мы узнаем, тем очевиднее становится механичность, машинность, работы ферментативных конструкций. В настоящем параграфе будут рассмотрены результаты подобных исследований одного из наиболее хорошо изученных ферментативных процессов — переаминирования α -аминокислот, открытого еще в 1937 г. Браунштейном и Крицман [77]:

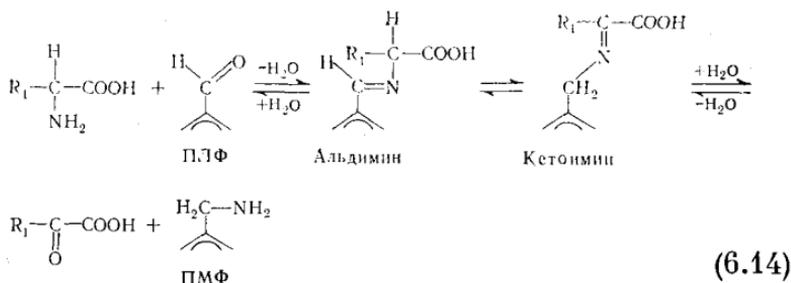


Эту реакцию катализируют аминотрансферазы с пиридоксальфосфатом (ПЛФ)



в качестве кофермента. Существенные результаты, проясняющие механизм действия одного из таких пиридоксальных ферментов — аспартатаминотрансферазы (ААТ), были получены в нескольких ведущих лабораториях: у Браунштейна, Снелла, Хаммеса и др. Наше изложение здесь основано на прекрасном обзоре Иванова и Карпейского [78], работы которых внесли определяющий вклад в создание модели. Даже если в отдельные детали будущие исследования и внесут некоторые исправления, можно не сомневаться в правильности общей картины действия фермента, возникающей на основе проведенного изучения.

В модельной конгруэнтной реакции ПЛФ играет роль временного акцептора аминогруппы, превращаясь в первых стадиях реакции через альдимин и кетоимин в пиридоксаминофосфат (ПМФ):



Затем ПМФ, взаимодействуя с соответствующей кетокислотой $\text{R}_2-\text{C}-\text{COOH}$, претерпевает те же превращения



в обратном направлении и образует ПЛФ и аминокислоту, ААТ катализирует реакцию (6.14) между аспарагиновой и α -кетоглутаровой кислотами. Белок состоит из двух одинаковых субъединиц молекулярным весом по 45 000. В исходном состоянии, когда кофермент находится в форме ПЛФ, он образует альдиминную двойную связь с ϵ - NH_2 -группой одного из лизиновых остатков ААТ (рис. 6.3). Однако в связывании белка с ПЛФ принимает участие не только карбонильная группа последнего. Было показано, что все заместители пиридинового кольца взаимодействуют с теми или иными белковыми группами. Существенную роль в связывании кофермента играет,

по-видимому, фосфатная группа, находящаяся в форме однозарядного аниона и взаимодействующая с одной из катионных групп белка. Атом азота пиридинового кольца ПЛФ акцептирует протон, по-видимому, от ОН-группы тирозинового остатка белка и становится положительно заряженным (гибридизация sp^2). Образовавшийся таким

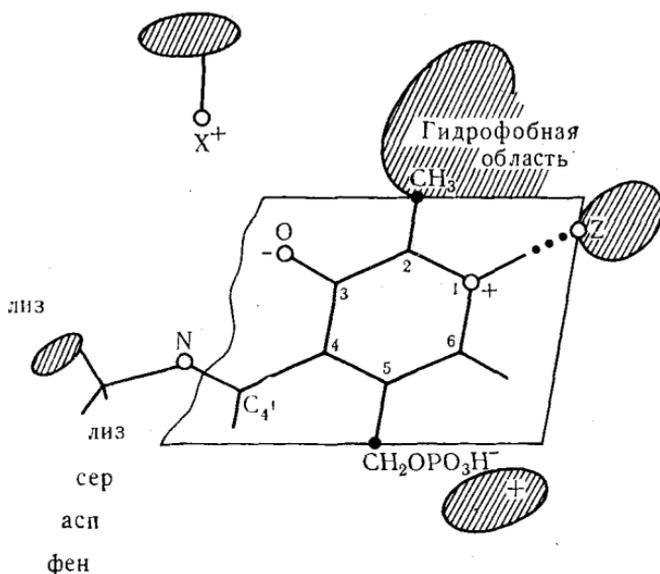


Рис. 6.3. Пиридоксальфосфат в активном центре аспаратамино трансферазы (по [78]).
Заштрихованные области соответствуют белку — апоферменту.

образом иминный азот взаимодействует с отрицательно заряженным кислородом (Z) тирозинового остатка (сильная водородная связь).

Имеются убедительные доказательства существования заметного ван-дер-ваальсовского взаимодействия метильной группы ПЛФ с гидрофобным участком апофермента. На основании сильного понижения pK_K оксигруппы ПЛФ в комплексе с ААТ по сравнению с pK_K той же группы в свободном ПЛФ (pK_K 6,2 вместо 10,5), которое нельзя объяснить только за счет протонирования атома N кольца, можно прийти к выводу, что вблизи оксигруппы находится положительно заряженная группа апофермента X⁺. Возможно, этой группой является лизиновый остаток (см.

рис. 6.3). Таким образом, в равновесном стабильном комплексе кофермента ПЛФ с ферментом взаимодействия осуществляются с помощью всех способных к связыванию групп ПЛФ («многоточечное связывание», однозначно фиксирующее ПЛФ на белке). Если исходными реагентами являются свободные ПЛФ и апофермент, то комплексообразование приводит к такому конформационному изменению белка, которое позволяет возникнуть всем вышеперечисленным связям и одновременно химически модифицирует кофермент (образование альдиминной ковалентной связи и перенос протона к атому азота пиридинового кольца).

Проследим теперь за отдельными стадиями ферментативной реакции (6.13), начиная от свободного фермент-субстратного комплекса (1 на рис. 6.4).

Субстрат α -аминокислота (1-аспарагиновая кислота) образует ионный (аминогруппа свободной аминокислоты протонизована, а карбонильная ионизована при физиологических значениях pH) комплекс 2. Противоионом для аминогруппы субстрата служит отрицательно заряженная оксигруппа ПЛФ, а для карбонильной группы — один из катионных центров белка. Следующим этапом должно быть нуклеофильное присоединение аминогруппы субстрата к двойной внутренней альдиминной связи $C=N$, соединяющей карбонильную группу ПЛФ с лизиновым остатком апофермента. Для образования этой связи необходимо выполнение двух условий: а) аминогруппа должна перейти из заряженной ($-NH_3^+$) в нейтральную ($-NH_2$) форму, и б) расстояние между атомом азота аминогруппы и атомом углерода альдиминной связи $C=N$ должно уменьшиться от 3,5 Å (сумма ван-дер-ваальсовских радиусов C и N) до 1,5 Å. Условие а) реализуется благодаря изменениям рК NH_3^+ -группы субстрата и оксигруппы ПЛФ при комплексообразовании. Иванов и Карпейский показывают, что в фермент-субстратном комплексе должен произойти перенос протона от $-NH_3^+$ -группы субстрата на $-O^-$ -группу ПЛФ (3 на рис. 6.4). Исследование с помощью молекулярных моделей показало, что условие б) выполняется, если повернуть кофермент вокруг оси, образованной группами $-CH_3$ и фосфата, фиксированными апоферментом (рис. 6.5). Для этого поворота нужно,

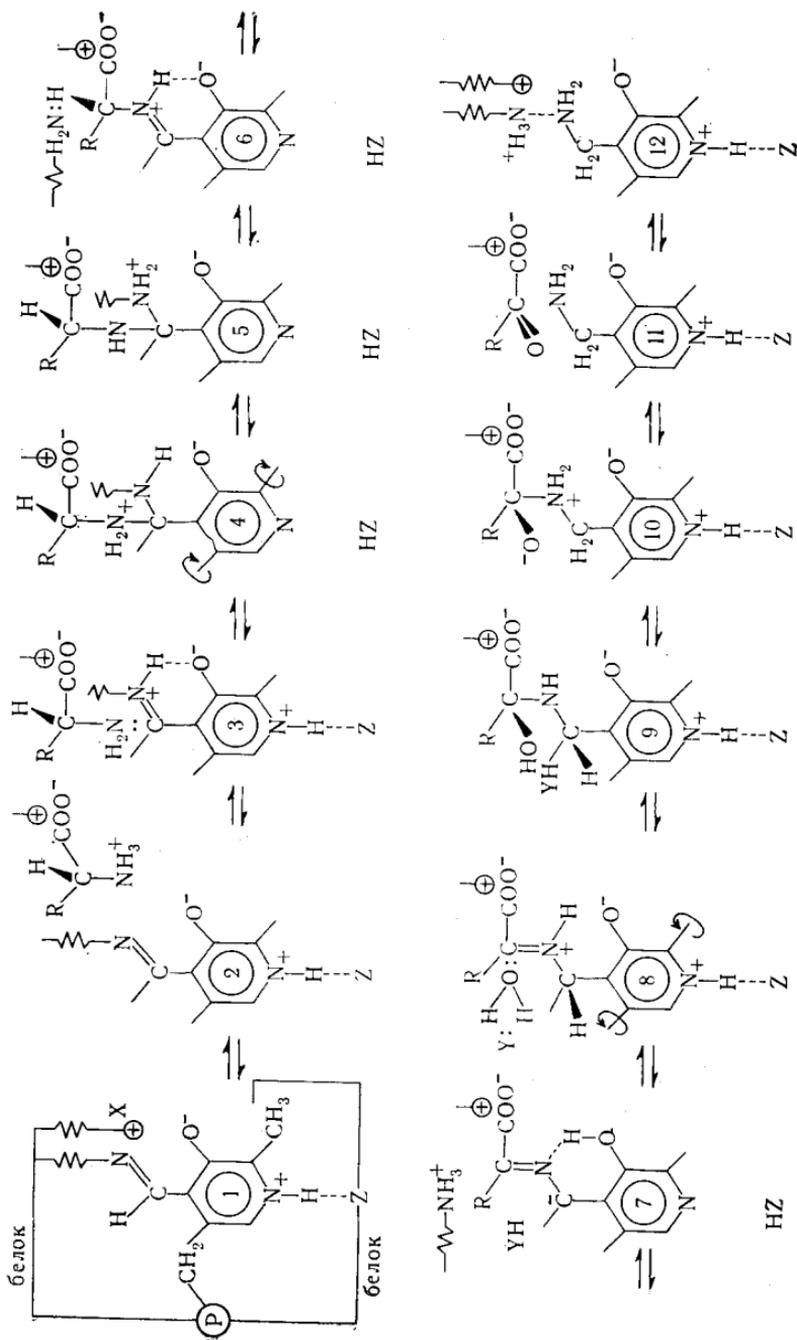


Рис. 6.4. Схема химических стадий первого этапа ферментативного переаминирования (по [78]).

чтобы разорвались связи ПЛФ с белком через атом азота пиридинового кольца и через оксигруппу. Последняя связь уже разорвана вследствие протонизации группы $-O^-$ (см. условие *a*). Протонизация должна привести, кроме того, к понижению основности атома азота кольца и, следовательно, к разрыву его водородной связи. Связь ПЛФ с лизином апофермента, однако, должна остаться,

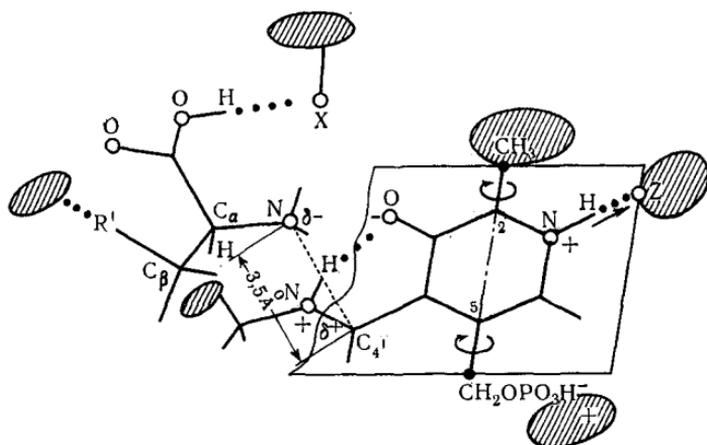


Рис. 6.5. Пространственная структура фермент-субстратного комплекса 3 (см. рис. 6.4) (по [78]).

Стрелки указывают направления поворота и смещений при переходе к 4. Заштрихованы участки, относящиеся к апоферменту.

превратившись в процессе нуклеофильного замещения из двойной в одинарную. Вероятно, именно конформационное релаксационное изменение, вызванное образованием первоначального комплекса с субстратом, приводит к соответствующему смещению лизинового остатка и, следовательно, к повороту плоскости кольца ПЛФ вокруг оси метил — фосфат *). Все химические изменения, в том числе нуклеофильное присоединение субстрата, происходят в процессе этого конформационного превращения (4 на рис. 6.4).

Затем должна образоваться двойная альдиминная связь между карбонильным углеродом ПЛФ и аминогруппой субстрата с одновременным разрывом оставшейся

*) Это не обсуждается в обзоре Иванова и Карпейского.

одинарной связи между этим углеродом и аминогруппой лизина (5 и 6 на рис. 6.4). Возможно, конечно, что в ферментативном процессе последние две стадии реализуются в ходе конформационного превращения белка без фиксации состояний 5 и 6. Таким образом, образование альдими-на приводит к возникновению свободной аминогруппы лизинового остатка апофермента в непосредственной близости от связи $C_{\alpha}-H$. Это способствует превращению

альдиминной] группировки] $\text{>C}=\overset{+}{\text{N}}\begin{matrix} \swarrow C_{\alpha} \\ \searrow H \end{matrix}$ в кетоиминную

$\text{>C}-\overset{-}{\text{N}}=C_{\alpha}$ с передачей протона на лизиновый остаток

и образованием карбаниона (7 на рис. 6.4). По всей вероятности, именно взаимодействие с лизином приводит к конформационному превращению, которое в свою очередь вызывает обратный поворот плоскости кольца кофермента вокруг оси метил — фосфат (это также не обсуждалось Ивановым и Карпейским). В результате карбанион сближается с протондонорной группировкой YH апофермента (вероятно, YH представляет собой имидазол гистидинового остатка), передающей протон на C^{-} карбаниона (8, 9 на рис. 6.4). Одновременно восстанавливается фиксация кофермента на белке остальными связями. Остальные стадии (состояния 10—12), приводящие в конце концов к отделению кетокислоты и образованию ПМФ, очевидны из рис. 6.4. Вероятно, аминогруппа ПМФ поддерживается в нейтральной форме с низким значением pK (что необходимо для протекания второй половины процесса, начинающейся с взаимодействия ПМФ со вторым субстратом — α -кетокислотой) благодаря присутствию поблизости от нее сильных катионных групп апофермента, в том числе $-NH_3^{+}$ -группы лизинового остатка (12 на рис. 6.4). Стадии второй половины процесса повторяют в обратной последовательности стадии первой его половины.

В обзоре Иванова и Карпейского, на основе которого был рассмотрен механизм ферментативного переаминирования, приведены не только более подробные описания структурных изменений, сопровождающих каждую стадию, но и экспериментальные факты, подтверждающие изложенные представления.

Отметим, что две основные стадии процесса — нуклеофильное присоединение субстрата с образованием ковалентной связи и альдимин-кетиминная таутомеризация, идущая через стадию карбаниона *), реализуются благодаря вполне определенным конформационным превращениям макромолекулы, обеспечивающим с исключительной точностью необходимые изменения ориентации отдельных групп и расстояний между ними. Именно эти механические стадии не позволяют подходить к описанию и объяснению ферментативного процесса с позиций классической газовой химической кинетики.

§ 6.7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой главе предложены новые представления о физических механизмах элементарных актов в ферментативном катализе. Из изложенного ясно, что проблема создания количественной физической теории ферментативного катализа сводится к созданию количественной теории кинетики конформационной релаксации белковых макромолекул и их комплексов. Работа в этом направлении практически еще не начата.

Следует помнить, что количественная физическая теория (даже если она будет создана) не может заменить существующие и в настоящее время широко используемые (с моей точки зрения — необоснованно) полуколичественные эмпирические подходы, основанные в конечном счете на уравнении Аррениуса и теории активированного комплекса. Экспериментаторам необходимы простые соотношения типа уравнения Аррениуса; кроме того, нужно найти параметры, характеризующие кинетику процесса и имеющие явный физический смысл. Поэтому еще более важной задачей, нежели создание количественной физической теории конформационной релаксации белков, является формулировка новых полуэмпирических соотношений и выбор новых параметров, которые, с одной стороны, помогут классифицировать и систематизировать результаты экспериментальных исследований и позволят ставить кинетические эксперименты более осмысленно,

*) Именно эта стадия лимитирует скорость всего процесса переминирования.

чем это делается теперь, а с другой — будут хоть до какой-то степени правильно отражать физическую природу процессов, протекающих при ферментативном катализе биохимических реакций.

Вероятно, для создания таких полуэмпирических соотношений необходимы экспериментальные исследования кинетики ферментативных процессов, главным образом, релаксационными методами, позволяющими характеризовать реагирующую систему в неравновесных конформациях после мгновенного изменения условий (рН, температуры и т. д.).

Работы подобного типа сейчас проводятся на различных ферментах.

ФИЗИКА ЭЛЕКТРОННОГО ПЕРЕНОСА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

§ 7.1. ВВЕДЕНИЕ

К числу проблем, решение которых, с одной стороны, имеет достаточно общее значение для понимания функционирования биологических систем и механизма важных биологических процессов, а с другой — доступно биологической физике уже сегодня, относится проблема физических механизмов электронного переноса в биологических структурах и процессах. Эта проблема представляет не только самостоятельный интерес. С ней тесно связана более общая проблема механизмов преобразования и аккумуляции энергии в биологических системах, которой будет посвящена следующая глава книги.

Электронный транспорт между окислительно-восстановительными переносчиками, вмонтированными в мембраны внутриклеточных структур, интенсивно исследуется уже давно во многих лабораториях мира. Здесь будут рассмотрены физические аспекты переноса электрона между закрепленными центрами. Основой нашего рассмотрения будут служить экспериментальные данные по структуре и функционированию цепей электронного переноса в мембранах митохондрий, хлоропластов зеленых растений и в хроматофорах фотосинтезирующих бактерий. Именно эти цепи электронного переноса играют наибольшую роль в таких важных процессах, как тканевое дыхание, фотосинтез.

Рассмотрение гипотетических физических механизмов электронного переноса в перечисленных выше биологических системах потребует подробного анализа возможности квантовомеханического туннелирования.

Однако акты электронного переноса происходят не только в цепях электронного транспорта. Еще работы Михаэлиса, относящиеся к концу двадцатых годов нашего века, и особенно развитие и распространение в биологии

метода электронного парамагнитного резонанса со всей очевидностью показали, что перенос электрона, сопровождающийся образованием свободных радикалов и ион-радикалов, является обязательным этапом многих биохимических реакций. Поэтому вопросу возникновения и гибели свободно-радикальных состояний в биохимических процессах и роли этих состояний будет посвящен специальный параграф. Особенно большое внимание будет уделено специфическим проблемам, возникающим при анализе свободно-радикальных процессов, реализующихся на начальных этапах световых стадий фотосинтеза (окисление воды и выделение кислорода) и на конечных этапах тканевого дыхания (утилизация молекулярного кислорода и образование воды). Механизмы этих противоположно направленных процессов, требующих накопления высокоактивных промежуточных продуктов в нескольких последовательных актах электронного переноса, остаются до сих пор совершенно неясными.

Здесь мы сознательно опускаем рассмотрение огромного количества работ, посвященных роли свободно-радикальных состояний и процессов при радиационных поражениях и других патологических состояниях. Полагаю, что имеющийся обширный экспериментальный материал еще слишком запутан, чтобы стать предметом биофизического анализа.

Электронному транспорту в фотосинтезе и, возможно, в тканевом дыхании предшествуют процессы образования и разделения зарядов. В случае фотосинтетических систем речь идет о процессах распада нейтральных возбужденных электронных состояний молекул пигмента на электроны и дырки, локализующиеся на химически активных центрах структуры.

В течение ряда лет в научной литературе идет дискуссия о роли в этих процессах полупроводниковых и фотопроводниковых механизмов. Данной проблеме, а также обсуждению более общего вопроса о применимости концепций, выработанных в физике твердого тела, для описания биологических систем и процессов также будет посвящен специальный параграф.

Удобнее всего начать обсуждение с вопросов, связанных с участием свободно-радикальных и ион-радикальных состояний в биохимических реакциях.

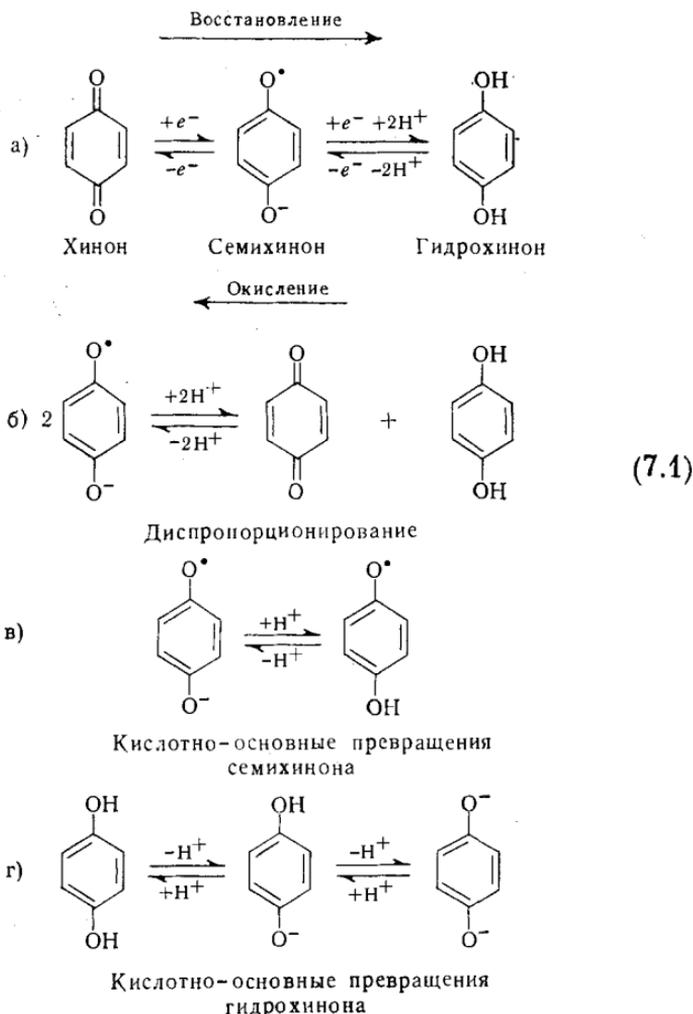
§ 7.2. СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ И ИОН-РАДИКАЛЫ В БИОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ

В 1929 г. Михаэлис [1], изучая окислительно-восстановительные реакции некоторых металлоорганических комплексов методом потенциометрического титрования, пришел к выводу, что процессы двухэлектронного окисления или восстановления лигандов в этих комплексах происходят ступенчато через две одноэлектронные стадии с образованием промежуточных полувосстановленных (полуокисленных) продуктов. Михаэлис высказал предположение, что эти промежуточные продукты, названные им семихинонами [2, 3], имеют характер свободных радикалов. Подобные промежуточные стадии были обнаружены также при протекании окислительно-восстановительных превращений ряда красителей и хиноидных соединений. Он считал, что одноэлектронные стадии являются обязательным этапом всех окислительно-восстановительных реакций, в том числе и биохимических. На модельных системах (красители, хиноны) с помощью спектральных и магнитометрических методов Михаэлис получил дополнительные свидетельства в пользу образования промежуточных полуокисленных или полувосстановленных продуктов типа свободных радикалов.

Первая экспериментальная работа, по-видимому, подтверждающая образование семихинонов в ходе биохимического процесса, принадлежит Хаасу, который обнаружил появление промежуточного окрашенного соединения (по правильному предположению автора — фермент-субстратного комплекса свободно-радикального типа) в процессе восстановления старого желтого фермента [4]. Затем Теорелл, Чанс и другие авторы провели целый ряд важных работ по изучению быстрых одноэлектронных стадий в окислительно-восстановительных ферментативных процессах (см. прекрасный обзор Чанса в сборнике «Свободные радикалы в биологических системах» [5]). Однако наиболее существенный, с моей точки зрения, шаг вперед был сделан в пионерской работе Коммонера, Таунсенда и Пейка [6], которые впервые зарегистрировали свободно-радикальные состояния в метаболизирующих тканях и клетках животного и растительного происхождения методом электронного парамагнитного

резонанса. Затем эти результаты были подтверждены другими авторами [7—9].

Возникновение семихинонов в процессе ступенчатого окисления или восстановления удобнее всего рассмотреть на примере взаимопревращения *p*-бензохинона и *p*-бензогидрохинона. Эти процессы можно записать следующим образом



Процесс (7.1а) представляет собой ступенчатое восстановление хинона (слева направо) и ступенчатое окисление

гидрохинона (справа налево), идущие через промежуточно образующийся семихинон в ион-радикальной форме. Для протекания реакции восстановления необходимо присутствие донора электронов, а для протекания реакции окисления — присутствие акцептора электронов, роль которого обычно играет молекулярный кислород. Прямую и обратную реакции диспропорционирования (7.1б) также необходимо учитывать в общей схеме взаимопревращений хинона и гидрохинона. Семихинон и гидрохинон могут находиться в различных состояниях ионизации в зависимости от рН среды (см. равновесия (7.1в), (7.1г)). Семихинон наиболее устойчив в форме ион-радикала, т. е. при высоких значениях рН среды. Поэтому, если процессы (7.1а) вести в щелочной области рН, то в водных системах удастся получить достаточно большие концентрации промежуточных свободно-радикальных продуктов, чтобы можно было зарегистрировать интенсивные сигналы ЭПР. Кинетические и равновесные константы процессов типа (7.1) были измерены в ряде работ (см., например, [10]). Исследования таких модельных окислительно-восстановительных систем методом ЭПР подробно описаны во многих монографиях и сборниках [11—14].

Естественно, что, когда в тканях и клетках животного и растительного происхождения были обнаружены парамагнитные центры, дающие сигналы ЭПР, характерные для органических свободных радикалов и ион-радикалов, прежде всего было высказано предположение о тождестве этих центров с семихинонами, образующимися в процессе ступенчатого окисления или восстановления многих биохимических соединений. Действительно, в цитоплазме и субклеточных структурах содержится множество биохимически активных веществ (витамины, коферменты и электронные переносчики типа нафтохинонов, флавинов, убихинона и др.), окисление и восстановление которых должно происходить ступенчато с образованием промежуточных свободно-радикальных продуктов. Вопрос этот, однако, оказался значительно сложнее. Проблемы возникновения, гибели, природы и роли в клетках парамагнитных частиц, дающих свободно-радикальный сигнал ЭПР, далеко не решены. В последние годы в большинстве лабораторий мира в основном изучаются спектры ЭПР внутриклеточных парамагнитных комплексов

металлов, играющих важную роль в процессах электронного транспорта и превращения энергии в мембранных структурах митохондрий и других органелл. К сожалению, значительно меньше появляется работ, посвященных выяснению физических и химических механизмов возникновения и функционирования свободно-радикальных парамагнитных центров в темновых внутриклеточных процессах, хотя эти механизмы могут иметь принципиальное биологическое значение. Рассмотрим основные факты, сюда относящиеся, и сформулируем нерешенные вопросы.

В работах, проведенных в конце пятидесятых и начале шестидесятых годов, исследовались, как правило, *лиофилизированные* ткани и клеточные суспензии, что было связано с недостаточной чувствительностью имевшихся спектрометров. Лиофилизацию биологических объектов проводят обычно следующим образом. Препарат быстро замораживают жидким азотом или твердой углекислотой, после чего удаляют воду возгонкой льда в вакууме. Считалось, что в получаемом таким способом сухом (содержание воды 1,5—2%) порошке фиксируется состояние (концентрации химических соединений, структуры макромолекул и надмолекулярных образований и т. п.), «захваченное» в момент замораживания. В лиофилизированных препаратах многие авторы наблюдали сигнал ЭПР в форме слегка асимметричного синглета с g -фактором, близким к 2,00, с расстоянием между точками максимального наклона $\Delta H_{\text{макс}} \approx 8$ гс и интегральной интенсивностью, соответствующей концентрации $\sim 10^{17}$ спин/г. По мере развития техники ЭПР-спектроскопии стали появляться исследования нелиофилизированных влажных препаратов тканей [15—17]. Оказалось, что в нативных нелиофилизированных препаратах также регистрируются свободно-радикальные сигналы ЭПР, однако всегда интегральная интенсивность последних (в аналогичных объектах) примерно на порядок меньше, а ширина в два раза больше ($\Delta H_{\text{макс}} \approx 14$ —16 гс).

Изменение концентрации свободно-радикальных состояний и формы их спектра ЭПР нельзя отнести за счет процесса замораживания: известно, что параметры сигналов ЭПР замороженных тканей не отличаются от соответствующих характеристик сигналов ЭПР свободно-радикальных центров в нативных препаратах [18, 19].

Таким образом, изменение этих параметров происходит, по-видимому, в результате лиофилизации препарата. В нашей лаборатории в течение ряда лет проводятся исследования, имеющие целью выяснение природы наблюдаемых изменений. Я остановлюсь на этих исследованиях подробнее. Они интересны не сами по себе, а в связи с теми вопросами, которые приходится ставить на основании полученных результатов и на которые пока нет окончательных ответов.

Основные факты, относящиеся к процессу лиофилизации, изложены в работах [20, 21]. Прежде всего, оказалось, что в лиофилизированных препаратах можно получить свободно-радикальные сигналы ЭПР, идентичные тем, которые наблюдаются в нативных или замороженных препаратах. Для этого необходимо, во-первых, строго соблюдать правила проведения лиофилизации, методика которой была разработана Четвериковым [22]. Основные требования заключаются в быстроте замораживания и в поддержании низкой температуры замороженного препарата до тех пор, пока содержание воды не станет меньше 4—5%. Во-вторых, нельзя допускать даже кратковременного контакта лиофилизованного препарата с атмосферной влагой (существенна изоляция именно от паров воды, а не от кислорода). В этих условиях лиофилизованные препараты дают свободно-радикальный сигнал ЭПР (его параметры: $g \doteq 2,0049$, $\Delta H_{\text{макс}} \approx 14,5$ гс), неотличимый от сигнала ЭПР нативных или замороженных препаратов тканей (рис. 7.1, кривые А и В). Даже кратковременный контакт с влажным воздухом приводит к возникновению на фоне этого «нативного» сигнала другого сигнала ЭПР ($g = 2,0057$, $\Delta H_{\text{макс}} \approx 8$ гс) в виде асимметричного синглета (рис. 7.1, кривая В). Интенсивность сигнала с $g = 2,0057$ растет с увеличением длительности контакта с влагой (рис. 7.2), после чего парамагнитные центры медленно и, в конце концов, необратимо гибнут. Эти процессы можно ускорить, повышая концентрацию паров воды и скорость их поступления в образец. Таким образом, свободно-радикальные парамагнитные центры, дающие в животных тканях узкий сигнал ЭПР с $\Delta H_{\text{макс}} \approx 8$ гс и $g = 2,0057$, возникают в результате контакта лиофилизованного препарата с влажным воздухом. Лيوфилизация, точнее, предварительное уменьшение содержания воды

в образце ниже уровня 15—20% является обязательным условием появления этих центров. То же можно наблюдать и на препаратах растительных тканей [23]. Итак, в качестве предварительного вывода можно утверждать, что обезвоживание в результате лиофилизации приводит к изменениям клеточных структур, вследствие которых

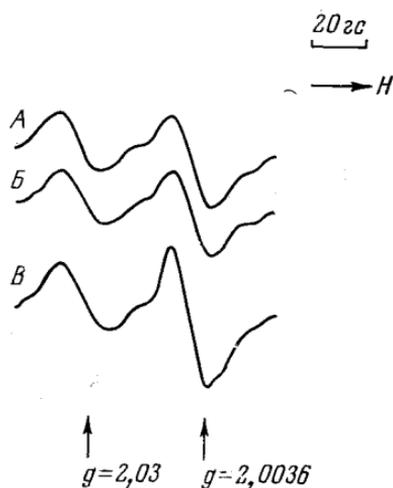


Рис. 7.1. Спектры ЭПР препарата печени крысы (по [21]).

А — замороженный препарат; Б — «правильно» лиофилизированный препарат; В — препарат Б после кратковременного контакта с влажным воздухом. Сигнал $g = 2,03$ принадлежит комплексу негеминового железа в митохондриях.

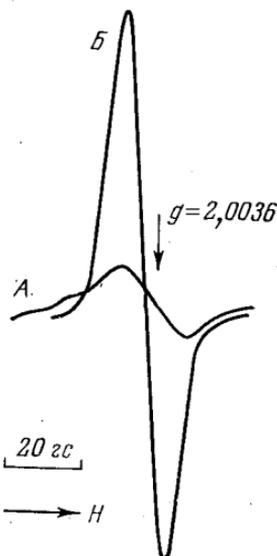


Рис. 7.2. Сигнал ЭПР «правильно» лиофилизованного препарата печени крысы до (А) и после (Б) 24-часового контакта с влажным воздухом (по [21]).

ступенчатому окислению и восстановлению с образованием промежуточных свободно-радикальных форм подвергаются значительно большие количества хиноидных соединений, чем в клетках, не поврежденных лиофилизацией. По-видимому, парамагнитные центры, ответственные за «нативный» сигнал с $g = 2,0049$, возникают главным образом в мембранах внутриклеточных органелл типа митохонд-

рий [24], а парамагнитные центры, дающие артефактный узкий сигнал лиофилизированных тканей с $g = 2,0057$, сосредоточены в основном в клеточной плазме [25].

Анализ данных, относящихся к артефактным свободно-радикальным центрам лиофилизированных препаратов, заставил поставить неожиданные и принципиальные биофизические проблемы, не решенные до настоящего времени.

Прежде всего следует отметить, что основные характеристики сигналов ЭПР лиофилизированных тканей удается воспроизвести на модели, адсорбируя ион-радикалы разных семихинонов на белковых подложках [26—29]. Белки избирательно сорбируют ион-радикалы семихинонов, смещая равновесие реакции (7.1) в сторону их образования, а сигналы ЭПР сорбированных ион-радикалов похожи на артефактный сигнал ЭПР лиофилизированных тканей. Важные результаты были получены с помощью так называемого пароструйного метода [30], позволяющего выдерживать препарат (ткань или сорбированные на белке модельные соединения) в заданной атмосфере со строго постоянным содержанием воды в препарате и окружающей среде. В течение долгого времени полагали, что как в тканях, так и в модельных системах семихиноны возникают и гибнут только в результате процесса (7.1а), идущего справа налево, т. е. в результате ступенчатого окисления полностью восстановленных переносчиков типа гидрохинонов, причем акцептором электронов (окислителем) является молекулярный кислород. Однако ряд фактов, полученных в уже цитированных выше работах [20, 21], не согласуется с этим выводом. Речь здесь идет о следующих фактах. При исследовании лиофилизованного препарата ткани пароструйным методом удалось установить, что если к газу-носителю (O_2) добавить пары органических растворителей, не содержащих воды (это требует специальных мер предосторожности), то наличие кислорода не приводит к возникновению артефактного сигнала ЭПР и вообще никак не влияет на изучаемые свойства препарата (рис. 7.3). Пропускание паров воды с инертным носителем (аргоном) вызывает возникновение и последующую необратимую гибель артефактных сигналов ЭПР, причем в атмосфере аргона она идет значительно быстрее, чем в атмосфере O_2 . В качестве примера на рис. 7.4 приведены две экспериментальные кривые.

Небольшой подъем нижней кривой, наблюдающийся при замене Ag на O_2 через 40 мин, происходит за счет изменения интенсивности нативного митохондриального сигнала ($\Delta H_{\text{макс}} \approx 14 \text{ гс}$). Некоторые детали кинетики возникновения и необратимой гибели артефактных парамагнитных

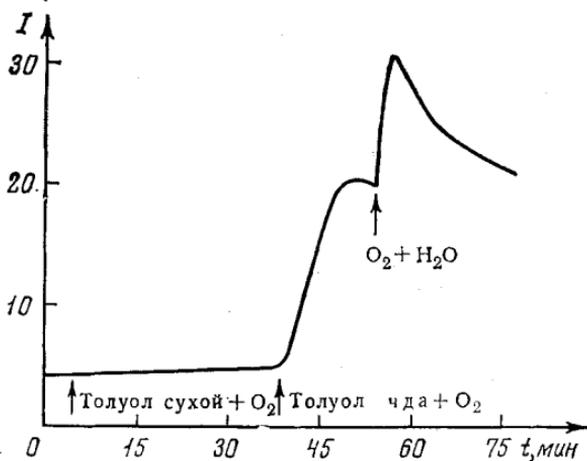


Рис. 7.3. Влияние примеси воды в толуоле на скорость возникновения артефактного сигнала ЭПР при изучении лиофилизованного препарата печени крысы пароструйным методом (по [20]).

центров в лиофилизованных тканях удается воспроизвести на модельной системе, состоящей из щелочной фильтровальной бумаги с адсорбированным на ней парабензохиноном (полностью окисленная форма). Как и в случае лиофилизованных тканей, O_2 сильно замедляет гибель семихинонов, вследствие чего максимум интенсивности сигнала ЭПР значительно выше при проведении опыта в атмосфере O_2 , чем в атмосфере Ar . Оказалось также, что возникновение артефактных парамагнитных центров в лиофилизованных препаратах тканей и их постепенная необратимая гибель происходят только в том случае, если содержание воды в препарате доведено в процессе лиофилизации до величины, меньшей 20%, т. е. если оно не превышает количества воды, жестко связываемого белковыми структурами клеток. Анализ имеющихся экспериментальных данных позволяет прийти к следующим выводам (см. например, [19]):

1. Артефактный сигнал лиофилизированных тканей обусловлен ион-радикалами семихинонов, возникающими не только в результате одноэлектронного окисления электронных доноров, но и вследствие одноэлектронного восстановления полностью окисленных форм хиноидных соединений в плазме клеток.

2. Одноэлектронное восстановление в этом случае сопровождается постепенной необратимой «гибелью» сигнала ЭПР.

3. Процессы возникновения и необратимой гибели ион-радикалов становятся возможными в результате каких-то деструктивных процессов, вызванных уменьшением содержания воды в клетках до 12—15%.

4. Одним из основных источников ион-радикалов этого типа является аскорбиновая кислота [31]. Параметры сигнала ЭПР анион-радикала аскорбиновой кислоты полностью совпадают с параметрами артефактного сигнала ЭПР лиофилизированных тканей.

Исследования, проведенные в нашей лаборатории в последнее время, показали, что на кинетические характеристики артефактного сигнала ЭПР определяющее влияние оказывает изменение окислительно-восстановительного потенциала среды при изменении содержания воды, вызванное изменением окислительной активности митохондрий и скорости диффузии кислорода.

Сформулированные выше выводы позволяют задать вопрос: что может служить донором электронов в процес-

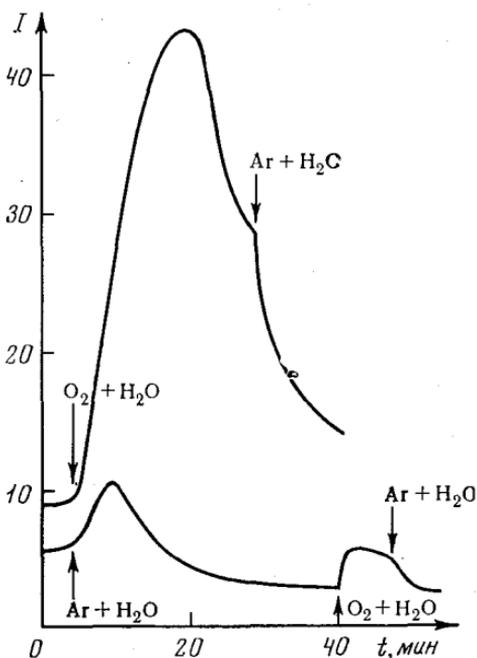
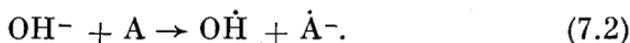


Рис. 7.4. Необратимая гибель артефактных свободных радикалов в лиофилизованном препарате печени крысы при пропускании паров воды с инертным носителем (по [20]).

сах восстановления полностью окисленных соединений в лиофилизированных тканях и модельных системах? В связи с этим следует рассмотреть серию исследований, посвященных процессам одноэлектронного переноса между водой и органическими электронными акцепторами в модельных системах.

Образование анион-радикалов при взаимодействии таких нуклеофильных агентов, как ион гидроксила, алкоксианионы и др., с органическими электронными акцепторами (хиноны, красители, нитросоединения, тетрацианэтилен, тетрацианхинодиметан и др.) установлено уже давно [10, 32—39].

С наиболее сильными электронными акцепторами (типа тетрацианэтилена) образование анион-радикалов удается наблюдать при взаимодействии акцепторов А с водой при нейтральных значениях рН. Однако в большинстве случаев приходится пользоваться щелочными растворами. Скорость реакции и достижимые концентрации анион-радикалов А⁻ (которые гибнут с большей или меньшей скоростью в результате вторичных процессов) растут с увеличением концентрации ОН⁻. Этот факт, а также то обстоятельство, что характеристики реакции одинаковы с самыми разными электронными акцепторами, позволили предположить, что первый акт процесса одноэлектронного переноса происходит по схеме [33]



Кинетические исследования не противоречили этой схеме [36, 40, 41]. Однако всегда можно было бы допустить существование конкретных химических реакций (особых для каждого типа А), в которых анион-радикалы возникают в результате вторичных процессов, наступающих после первичного нуклеофильного присоединения ОН⁻ к А [10, 42]. Критерием правильности предположения о наличии первичного акта одноэлектронного переноса (7.2) является обнаружение ОН-радикала.

В случае слабых электронных акцепторов образование анион-радикалов не наблюдается даже при очень высоких значениях рН. Однако этот процесс прекрасно идет при воздействии излучением с длинами волн, лежащими в области спектра поглощения акцептора. Специальные ис-

следования показали, что акцепторами электронов служат тогда молекулы А в электронно возбужденном триплетном состоянии [36]. Для таких состояний перенос электрона от иона гидроксила на молекулу А становится термодинамически выгодным, и если стадия (7.2) действительно реализуется, то ОН-радикал должен возникать в виде кинетически независимой частицы. И в самом деле, ОН-радикалы в таких системах были обнаружены химическими методами [43]. Кинетика их образования совпадала с кинетикой появления анион-радикалов \dot{A}^- , и использованным методом удавалось перехватить около 80% ОН-радикалов от теоретического выхода по схеме (7.2). Таким образом, в случае фотоиндуцированного процесса действительно происходит акт одноэлектронного переноса от иона OH^- на молекулу органического электронного акцептора.

Такая простая схема, однако, как правило, не проходит в случае темновых процессов. Перенос электрона от иона OH^- к акцептору оказывается обычно термодинамически невыгодным, и процесс (даже если учесть последующие выгодные реакции ОН-радикала) должен был бы идти настолько медленно, что его нельзя было бы зарегистрировать. Была предложена и экспериментально подтверждена схема, согласно которой в темновых процессах (если не считать случаев особо сильных акцепторов типа тетрацианхинодиметана) первый акт состоит из одновременно протекающих процессов переноса электрона от OH^- на А и фиксации возникающего ОН-радикала третьей частицей, которой может быть другая молекула акцептора, анион-радикала или любого органического соединения [44, 45]. Фиксация ОН-радикала происходит либо в результате присоединения по двойной связи, либо путем дегидрирования молекулы. Во всех случаях образуются активные свободные радикалы, испытывающие дальнейшие превращения, которые приводят в конце концов к необратимой гибели семихинонов и их предшественников. По-видимому, механизмы такого типа обуславливают образование продуктов нуклеофильного и электрофильного замещения и являются основой многих реакций в органической химии. Широкие исследования в этом направлении уже проводились и продолжают вестись в разных лабораториях [38, 46—48].

Предположение о том, что в лиофилизированных тканях одним из доноров электронов, отдающих электроны молекулам типа хинонов, также служит вода (или ион OH^- , что одно и то же), с первого взгляда кажется абсурдным. Ведь в модельных системах, в которых реализуется темновой одноэлектронный перенос между OH^- и А, приходится работать при значениях $\text{pH} > 9-10$, чтобы скорость процесса обеспечивала возможность его регистрации. Это условие обязательно выполняется всегда, когда в качестве моделей пользуются теми бензо- и нафтохинонами, флавинами и другими электронными акцепторами, которые имеются в клетке. Однако экспериментально показано, что в присутствии белков при физиологических значениях pH в растворе хинонов образуются семихинонные свободные радикалы [49] по механизму одноэлектронного переноса от ионов OH^- на молекулы хинона. Это может обуславливаться следующими причинами: локальным повышением эффективного значения pH на поверхности белковой глобулы, стабилизацией радикалов белком и переносом электрона между удаленными друг от друга частицами через связанную белком воду по механизму Гротгуса.

Добавка к лиофилизированным препаратам тканей хинонов приводит к возникновению под действием воды ион-радикалов этих хинонов. Закономерности этого процесса весьма напоминают закономерности процесса возникновения и гибели собственных артефактных свободно-радикальных центров в лиофилизированных препаратах.

Рассмотренные выше данные об актах одноэлектронного переноса между водой (ионом OH^-) и органическими электронными акцепторами, происходящих в модельных системах и «неправильно» лиофилизированных препаратах тканей, позволяют поставить вопрос о возможности существования аналогичных процессов в нативных биологических структурах. Иначе говоря, может ли вода (ионы OH^-) принимать участие в биохимических окислительно-восстановительных процессах как непосредственный реагент (донор электронов)? (Естественно, речь здесь идет не о реакции фотоокисления воды в фотосистеме II высших растений и зеленых водорослей.) Такое предположение было высказано в [50] на основании результатов, полученных при исследовании связи митохондриального

свободно-радикального сигнала ЭПР с окислительным фосфорилированием. На основании некоторых экспериментальных данных можно было высказать гипотезу (совершенно не доказанную), что в дыхательной цепи митохондрий половина электронов, поступающих через цитохромную систему на молекулярный кислород, приходит не от окисляемого субстрата, а от воды. Предположим на минуту, что это верно. Какова судьба ОН-радикалов, которые должны при этом возникать? Единственный способ избавиться от ОН-радикалов без вреда для клетки — заставить их образовывать кислород. Это означает, что они должны по крайней мере попарно попадать в «камеры», изолирующие их от органических структур клетки, и рекомбинировать с образованием перекиси водорода или подвергаться дальнейшему окислению до молекулярного кислорода, отдавая в цепь еще по одному электрону (и по протону в среду). В первом случае перекись водорода должна разлагаться каталазой *). При любом механизме перенос от воды четырех электронов приводит к выделению одной молекулы кислорода, т. е. точно компенсирует лишний O_2 , поглощаемый в результате переноса этих электронов на цитохромоксидазу.

Таким образом, изучая суммарное поглощение кислорода, нельзя доказать или отвергнуть это маловероятное предположение.

Однако в живой природе есть системы, в которых молекулы воды безусловно играют роль электронных доноров. Речь идет о процессах фотоокисления воды с выделением молекулярного кислорода в листьях зеленых растений и в одноклеточных водорослях. Как известно (см., например, [51]), эта реакция осуществляется в фотосистеме II, причем акцептором электрона служит, вероятно, ион-радикал хлорофилла $Chla_2^+$, образовавшийся в результате фотоионизации активного центра фотосистемы II. Электрон воды попадает в него не непосредственно, а через систему переносчиков, в число которых, по-видимому, входят ионы Mn^{2+} [52] и ионы Cl^- [53]. Собственно, никакой загадки само фотоокисление воды при фотосинтезе не представляет. Практически в любых модельных системах с кра-

*) Это объяснило бы повсеместное присутствие каталазы в клетках.

сителями и другими органическими электронными акцепторами возбуждение их светом приводит к фотоокислению воды. Средство к электрону возбужденной молекулы акцептора или образовавшегося в результате фотоионизации катион-радикала почти всегда достаточно велико, чтобы сделать перенос электрона от молекулы воды (или иона OH^-) термодинамически выгодным. Однако в модельных системах фотоокисление воды обычно не сопровождается выделением кислорода. Образующиеся в результате переноса электрона от воды радикалы OH^\cdot (или их ионные формы H_2O^+ или O^-) настолько химически активны, что моментально реагируют с другими химическими соединениями (в первую очередь с самими органическими электронными акцепторами), вызывая разнообразные и неконтролируемые химические превращения. Таким образом, загадочно не само фотоокисление воды, а механизм превращения OH -радикалов в молекулярный кислород. Вопрос можно сформулировать следующим образом: каким образом OH -радикалы, образуемые в результате фотоокисления воды в системе, содержащей огромные количества разнообразных органических соединений, превращаются в O_2 практически со 100%-ным выходом*)? Как защищается растительная клетка от OH -радикалов? У эволюционно более древних фотосинтетических организмов — фотосинтезирующих бактерий этой проблемы не существует. Их первичные доноры электронов дают при фотоокислении значительно менее активные свободные радикалы (например, сернистые), которые могут превращаться в конечные продукты (например, в свободную серу), не разрушая внутриклеточные соединения. У этих организмов имеется только одна фотосистема, и для переноса одного электрона от первичного донора к конечному ак-

*) В работе Вирке [54] приводятся рассуждения, согласно которым OH -радикальная модель фотоокисления воды при фотосинтезе несовместима с некоторыми данными по выделению O_2 при импульсном освещении. Следует сказать, что OH -радикальный механизм выделения O_2 является не одной из возможных, а единственной моделью. Как бы ни проходило фотоокисление воды, отрыв одного электрона от молекулы воды или от иона OH^- должен привести к возникновению OH -радикала или эквивалентной частицы (H_2O^+ , O^-). Другое дело, что этот радикал может существовать не в виде кинетически независимой частицы, а оказаться стабилизированным в «клетке» или в лигандной сфере иона металла.

акцептору на световой стадии фотосинтеза требуется поглощение только одного кванта. Когда в ходе биологической эволюции фотосинтезирующие организмы перешли от «дорогих» экзотических доноров к «дешевому» распространенному водному «топливу», произошла существенная перестройка фотосинтетического аппарата. Появилась фотосистема II, предназначенная специально для фоторазложения воды, и перенос одного электрона стал требовать поглощения двух световых квантов, что понизило к.п.д. процесса. Можно думать, что переход на двухквантовый механизм, обусловленный появлением фотосистемы II, был вызван не тем, что фотоокисление воды требует энергии большей, чем может дать квант, поглощаемый активным центром фотосистемы I, а главным образом тем, что потребовалось пространственно отделить место фотоокисления воды и образования активных ОН-радикалов от уязвимых химических компонент клетки. Трудность проблемы усугубляется тем, что для образования O_2 требуется по крайней мере два ОН-радикала, возникающие в непосредственной близости друг от друга, но не одновременно. (Молекула кислорода может образоваться либо из четырех молекул воды, отдающих акцептору по одному электрону, либо из двух молекул воды, отдающих последовательно по два электрона.) По всей вероятности, конструкция, обеспечивающая стабилизацию ОН-радикалов в фотосистеме II, содержит также ионы Mn^{2+} , присутствие которых обязательно для выделения O_2 .

«Изобретение» способа стабилизации ОН-радикалов, «разработка» соответствующей молекулярной конструкции, было одним из важнейших событий биологической эволюции на нашей планете. Помимо того, что оно привело к появлению молекулярного кислорода в атмосфере, это «открытие» сделало возможным возникновение аэробных организмов, использующих системы тканевого дыхания. Ведь терминальные стадии тканевого дыхания, в которых происходит восстановление O_2 до H_2O , — процесс, обратный окислению воды при фотосинтезе, — также обязаны проходить через этапы образования ОН-радикалов в той или иной форме. Первый этап восстановления O_2 — образование ион-радикала O_2^- (анион радикала HO_2^-). По-видимому, в тех случаях, когда молекулярный кислород восстанавливается, а универсальной конструкции

для стабилизации ОН-радикалов и превращения их в воду нет, роль этой конструкции выполняют специальные ферменты HO_2 -дисмутазы, широко распространенные среди анаэробных и аэробных организмов [55, 56]. Интересно отметить, что в активные центры таких ферментов входят ионы металлов Mn^{2+} (*E. Coli* [57]) или Cu^{2+} и Zn^{2+} (ткани млекопитающих [58]).

Едва ли не единственным лабораторным процессом, в котором окисление воды приводит к выделению стехиометрических количеств кислорода, является электролиз с использованием неокисляющегося анода. В таком случае образующиеся ОН-радикалы «ждут друг друга» и в конце концов дают молекулярный кислород. Напрашивающаяся аналогия легла в основу представлений об электролизном механизме разложения воды при фотосинтезе [59—61]. Были построены модельные фотобатареи с красителями — аналогами хлорофилла, дающими разность потенциалов, в принципе достаточную для электролиза воды [62]. Я полагаю, однако, что эти весьма важные в практическом отношении представления и работы не связаны непосредственно с истинной проблемой фотосинтетического выделения кислорода. Конечно, можно построить фотобатарею (на органических системах или на селеновых фотоэлементах — безразлично) и замкнуть ее полюсы через электроды электролизера. Проблема заключается не в том, как возникает энергия, необходимая для фоторазложения воды, а в том, как устроена конструкция, стабилизирующая ОН-радикалы и изолирующая их в химической системе, полной активных соединений. Никаких макроскопических пространственно изолированных электродов из благородного металла в клетке нет. Можно, конечно, называть «электродом» гипотетическую структуру из нескольких ионов металлов, захватывающую ОН-радикалы, но это не проясняет вопроса.

Красновскому и Брин [63] удалось наблюдать выделение кислорода при освещении электронного акцептора (феррицианида), сорбированного на поверхности ZnO в водной суспензии. Их эксперименты были повторены с органическими электронными акцепторами (типа хинонов) и показали (методом с использованием H_2O^{18}), что кислород выделяется в результате фоторазложения воды [64]. Таким образом, в этой модельной системе (конечно,

весьма далекой от фотосинтетических структур) образующиеся ОН-радикалы стабилизируются и дают O_2 в присутствии органических соединений, которые в принципе должны были бы их перехватывать. Возможно, изучение подобных моделей поможет в решении физико-химической загадки фотосинтетического образования молекулярного кислорода из воды.

Из материала, изложенного в настоящем параграфе, помимо всего прочего следует, что акты одноэлектронного переноса должны служить промежуточными стадиями во многих биохимических реакциях, которые обычно не относят к категории свободно-радикальных. (Нужно помнить, однако, что мгновенная концентрация свободно-радикальных и ион-радикальных состояний может оказаться при этом весьма малой и ее нельзя будет зарегистрировать.) Около 14 лет назад было высказано предположение [65], что в процессе окислительного фосфорилирования должна возникать промежуточная полувосстановленная ион-радикальная форма аденинового кольца, хотя фосфорилирование АДФ относится к реакциям кислотно-основного типа. В серии чрезвычайно интересных работ Каюшин и его сотрудники [66—68] показали, что в ходе обратной ферментативной реакции — гидролиза АДФ миозином — возникают промежуточные свободно-радикальные состояния, обусловленные, вероятно, актами одновалентного переноса.

§ 7.3. ЦЕПИ ЭЛЕКТРОННОГО ПЕРЕНОСА В МЕМБРАНАХ МИТОХОНДРИЙ И ХЛОРОПЛАСТОВ

Многие аспекты процессов электронного переноса между окислительно-восстановительными центрами, фиксированными в мембранах митохондрий и хлоропластов, нельзя обсуждать, не касаясь проблемы консервации энергии, освобождающейся при таком переносе, т. е. проблем окислительного и фотофосфорилирования. Эти вопросы будут детально рассмотрены в следующей главе. В настоящем параграфе речь будет идти о некоторых сторонах проблемы электронного транспорта, поддающихся анализу независимо от проблемы консервации энергии.

Несмотря на то (а может быть, и вследствие того), что число публикаций, посвященных переносу электронов

в субклеточных мембранных структурах, огромно и растет с каждым годом, число твердо установленных фактов и общепринятых представлений невелико. Мы начнем наше рассмотрение с цепи электронного транспорта (ЦЭТ) в митохондриях. По-видимому, ЦЭТ по основным своим характеристикам одинакова во всех клетках и во всех организмах. Под ЦЭТ мы будем понимать последовательность переносчиков и процессов, осуществляющих перенос электронов от НАД-Н или сукцината на молекулярный кислород.

Кофермент НАД (никотинамидадениндинуклеотид) — мобильный переносчик, ферментативно восстанавливающийся многими соединениями, в том числе компонентами цикла Кребса, кроме янтарной кислоты (сукцината), которая способна отдавать электроны в дыхательную цепь, не пользуясь посредничеством НАД. Суммарно реакцию восстановления можно записать следующим образом:



Специальными опытами с меченым водородом было показано, что в случае восстановления НАД⁺ этиловым спиртом при участии фермента алкогольдегидрогеназы атом водорода передается непосредственно от молекулы спирта молекуле НАД. Вероятно, так же обстоит дело и при взаимодействии НАД⁺ с другими субстратами. По-видимому, в дальнейших актах электронного переноса вдоль ЦЭТ протоны не передаются непосредственно, а (в тех случаях, когда это необходимо) уходят в воду или поступают из нее.

Реакция (7.3), вероятно, проходит через две одноэлектронные стадии, но стационарная концентрация промежуточных свободных радикалов НАД[•] (или НАД-Н[•]) настолько мала, что их пока не удалось обнаружить.

До сих пор мы даже точно не знаем состав ЦЭТ митохондрий. Различные школы придерживаются разных взглядов на участие некоторых компонент внутренней мембраны митохондрий в ЦЭТ, на последовательность переносчиков в ряде участков ЦЭТ. Мы не будем здесь рассматривать огромный экспериментальный (главным образом биохимический) материал, свидетельствующий в пользу различных точек зрения. Различия между ними несущественны

для постановки тех вопросов более общего характера, которые представляют биофизический интерес. Поэтому мы положим в основу изложения схему, рассматриваемую Чансом в одном из последних обзоров [69] (рис. 7.5).

Переносчики НАД-Н, флавопротеины (ФП) и убихинон (УХ) могут в принципе акцептировать и отдавать по два электрона: их полностью окисленные и полностью восстановленные формы отличаются друг от друга двумя электронными эквивалентами. Остальные компоненты ЦЭТ —

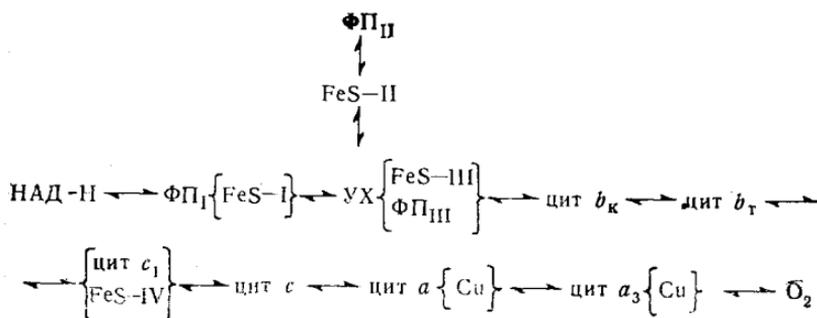
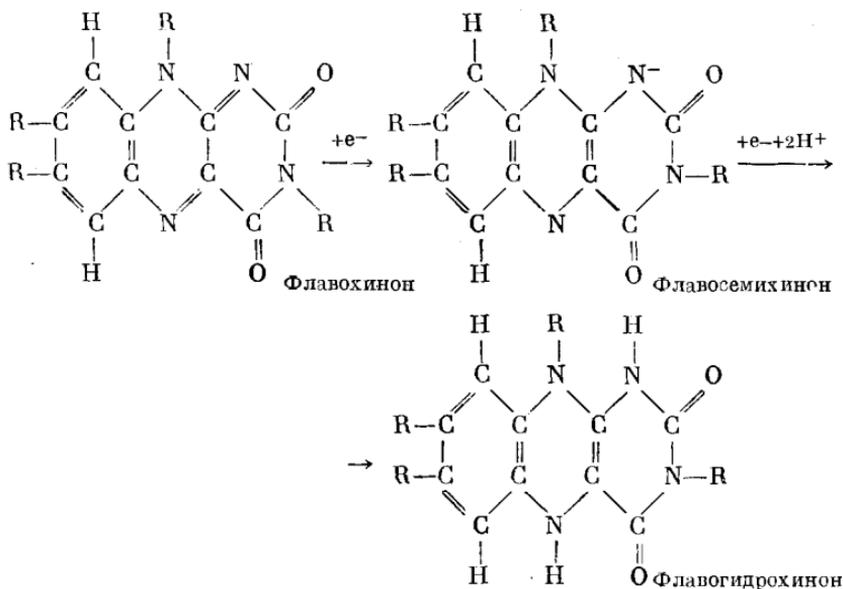


Рис. 7.5. Схема цепи электронного транспорта в митохондриях.

существенно одноэлектронные переносчики. Можно думать, что и переносчики первого типа, особенно флавопротеины и убихинон, работают в ЦЭТ как одноэлектронные переносчики, переходя от полностью восстановленной к полностью окисленной форме через промежуточное ион-радикальное семихинонное состояние (см. § 7.2) или претерпевая окислительно-восстановительные превращения только между семихинонной и одной из предельных форм. Так, например, флавопротеин, переносящий электрон от НАДФ-Н к цитохрому *c* в ЦЭТ микросом, функционирует, испытывая окислительно-восстановительные переходы между семихинонной и полностью восстановленной формами своего активного центра [70]. Рассмотрим последовательно переносчики, приведенные на рис. 7.5. Активным центром флавопротеина является флавинадениндинуклеотид (ФАД) — производное изоаллоксазина.

Ниже показан переход ФАД из хинонной формы в гидрохинонную:



В опытах с моделями и с изолированными флавопротеиновыми ферментами, не входящими в состав ЦЭТ, удалось установить, что флавосемихиноны, возникающие в результате ступенчатого окислительно-восстановительного превращения флавина, сильно взаимодействуют с металлами переменной валентности, прочно связанными с белком (см., например, [71—73]). Многие флавиновые ферменты содержат металлы переменной валентности. По-видимому и в ЦЭТ митохондрий флавопротеины связаны с железо-белками. Недаром полиферментные комплексы, возникающие при ультразвуковой фрагментации митохондриальных мембран и содержащие флавиновые ферменты, всегда содержат железо-белки (об этих так называемых «гриновских комплексах» см. ниже). Каталитические свойства очищенных флавопротеинов несколько отличаются от их свойств в неповрежденной ЦЭТ митохондрий. Небольшие изменения в методе экстракции (например, повышение температуры от 30 до 37° С) меняют способность фермента взаимодействовать с различными акцепторами. При извлечении флавопротеинов из ЦЭТ меня-

ется действие на них некоторых ингибиторов (см., например, [74]).

Комплексы белков с негемовым железом FeS (I, II, III, IV) являются обязательной компонентой ЦЭТ. Известно о них (вернее, об их роли в электронном транспорте) весьма мало, что объясняется техническими трудностями наблюдений изменений их окислительно-восстановительного состояния в неповрежденных мембранных структурах. Существенный прогресс начал намечаться лишь в самые последние годы в связи с развитием метода ЭПР. Стали известны некоторые данные о структуре активного центра этих переносчиков: оказалось, что атомы железа связаны с сульфгидрильными группами специфических белков. Все больше появляется косвенных экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что белковые комплексы негемового железа принимают участие в переносе электронов вдоль ЦЭТ и в процессах консервации энергии [75—79]. Как мы увидим ниже, аналогичный белок в хлоропластах, ферредоксин, действительно выполняет важные функции в ЦЭТ хлоропластов. В мембранах митохондрий центров с негемовым железом больше, чем активных центров цитохромов. Тем не менее в литературе, в экспериментальных и теоретических работах, до сих пор значительно больше внимания уделяют роли цитохромных ферментов, чем роли комплексов негемового железа. Именно отдельным конкретным цитохромам приписывается в ряде частных теорий функция трансформаторов энергии [69]. Я полагаю, что в основном это происходит потому, что научные исследования обычно ведут по принципу «ищи там, где светлее и легче». Четкие спектры поглощения цитохромов в видимой и ближней ультрафиолетовой областях, испытывающие легко регистрируемые изменения при окислительно-восстановительных превращениях пигментов, сильно облегчают их исследование. Нет никаких данных, свидетельствующих в пользу того, что белковые комплексы негемового железа играют меньшую роль в электронном транспорте, чем цитохромы. Хотя, конечно, все известные компоненты ЦЭТ несомненно работают как одноэлектронные переносчики, не исключено, что для правильного ее функционирования необходим перенос двух электронов по параллельным цепочкам переносчиков несколько разного состава [80]. Не следует забывать (см.

ниже), что, возможно, для синтеза одной молекулы АТФ через переносчик-преобразователь энергии ЦЭТ должно пройти два электрона. Железо-белки жестко связаны с различными участками ЦЭТ и могут в ряде пунктов играть роль таких параллельных переносчиков. Четкое доказательство того, что для работы преобразователя энергии, расположенного на участке ЦЭТ между НАД-Н и УХ, необходим железосерный белок, представлено в работе [81]*).

Флавопротеин ФП_{II} (сукциндегидрогеназа) реализует (по-видимому, с железосерным белком FeS-II) связь окислительно-восстановительной пары янтарная — фумаровая кислоты с главной ЦЭТ. Все сказанное об ФП_I можно отнести и к этому флавопротеину (и, конечно, к сильно флуоресцирующему флавопротеину ФП_{III}), образующему, по-видимому, окислительно-восстановительную пару с цитохромом b_k , но не входящему в ЦЭТ.

УХ (убихинон, или коэнзим Q), по некоторым предположениям (см., например, [84]), служит подвижным переносчиком, не фиксированным в структуре мембраны. Эти предположения основаны на том, что из митохондрий УХ экстрагируется органическими растворителями в низкомолекулярной форме, не связанной с белками и липопротеинами. Естественно, последнее обстоятельство нельзя считать сколько-нибудь убедительным доказательством. Мы видели уже в предыдущем параграфе, что УХ должен быть изолирован от воды в гидрофобных частях мембраны. Нет никаких оснований считать его менее или более подвижным в мембране, чем другие окислительно-восстановительные центры. Как мы увидим ниже, все кинетические данные свидетельствуют о том, что цитохром c является столь же структурно фиксированной компонентой ЦЭТ, как и другие цитохромы, хотя экстрагируется значительно легче, чем УХ. Кстати, нет полной уверенности в функциональной и структурной однородности убихинона митохондрий. В «разобщенных» митохондриях с максимальной

*) В последние годы новые важные результаты по структуре и функциям железосерных белков были получены при исследовании спектров ЭПР митохондрий, тканей и отдельных металлопротеинов при гелиевых температурах. Удалось идентифицировать новые индивидуальные белки, участвующие в процессах электронного переноса и трансформации энергии [82, 83].

скоростью электронного транспорта НАД-Н окисляется несколько скорее, чем УХ [85]. Возможно, что в переносе электронов вдоль ЦЭТ принимает участие лишь часть убихинона, молярное содержание которого в митохондриях значительно превышает содержание других переносчиков (см. [86]). Многие свойства УХ в митохондриях изменяются при переходе от неповрежденных органелл к продуктам их более или менее мягкого разрушения — различного типа субмитохондриальным частицам, весьма широко исследуемым в последние годы.

Цитохромы (b_k , b_t , c_1 , c , a , a_3) — это хромопротеиды, простетическими активными группами которых являются гемы, т. е. железопорфирины, различающиеся заместителями в порфириновом кольце. Цитохромы b_k и b_t содержат химически одинаковые протогемы — комплексы железа с протопорфирином IX. Деление на b_k и b_t обусловлено небольшими спектральными различиями, различиями в кинетике окислительно-восстановительных превращений и во влиянии разобчителей, антимицина А (ингибитор), АТФ и АДФ + Φ_n на соотношение между окисленными и восстановленными формами в стационарных состояниях митохондрий и на кинетику окислительно-восстановительных переходов [69, 80, 87]. Очень интересны приводимые Чансом данные, свидетельствующие о том, что состояние и функциональные характеристики цитохрома b_t существенно зависят от состояния соседнего переносчика — цитохрома c_1 .

Цитохром c_1 имеет ту же простетическую группу (гем c), что и подробно описанный в гл. 5 цитохром c , однако молекулярный вес белка, приходящийся на одну простетическую группу, равен 51 000, т. е. значительно больше, чем в случае цитохрома c . Неизвестно, из скольких таких единиц состоит «ансамбль» цитохрома c_1 в митохондриях. Экстрагируется этот цитохром в виде полимера с молекулярным весом около 360 000, т. е. полимера, состоящего примерно из семи функциональных единиц, но, поскольку при экстракции используют детергенты, последнее обстоятельство ни о чем не говорит.

Цитохром c как индивидуальный белок изучен значительно лучше других переносчиков (см. гл. 5). Легкость его экстракции гипотоническими солевыми растворами не может служить доказательством того, что он является

подвижным переносчиком, не фиксированным (в отличие от других цитохромов ЦЭТ) в структуре мембраны.

Уже давно известно, что для спектра нативной формы феррицитохрома *c* в растворе характерно наличие полосы поглощения при 6950 Å [88]. Эта полоса исчезает при термической обработке, при щелочных значениях pH, и ее исчезновение сопровождается потерей способности цитохрома *c* восстанавливаться аскорбиновой кислотой, гидрохиноном и другими восстановителями [89—91].

Наличие полосы при 6950 Å и способность к восстановлению связаны, по-видимому, с сохранением специфической нативной конформации (или конфигурации) феррицитохрома [92, 93]. Чанс с сотрудниками [94] показали, что в спектре цитохрома *c* митохондрий имеется полоса при 6950 Å, но она не исчезает при термической обработке, достаточной для ее исчезновения и инактивации феррицитохрома *c* в растворе. Этот результат свидетельствует о том, что взаимодействие с окружением цитохрома *c*, включенного в мембранную структуру ЦЭТ, стабилизирует его нативное конформационное состояние, влияет на способность молекулы к конформационным переходам. Ниже мы увидим, что к тому же выводу можно прийти и на основании кинетических данных.

Цитохромы *a*, *a*₃ и ионы меди образуют ферментный комплекс, названный цитохромоксидазой (в течение долгого времени ее считали одним белком). При выделении цитохромоксидазы из митохондрий и ее тщательной очистке получают ферментативно активный (т. е. способный окислять цитохром *c*) пентамер, состоящий из пяти мономерных белковых субъединиц с молекулярным весом 72 000 каждая. Такая субъединица содержит один гем *a*, один атом меди и один атом негемового железа [95, 96], но она ферментативно не активна. В выделенной цитохромоксидазе и ЦЭТ цитохромы *a* и *a*₃ различаются кинетически и спектроскопически, что, по-видимому, связано с различиями в их структурной упаковке и, следовательно, в конформации. В ЦЭТ отношение молярных концентраций цитохромов *a* и *a*₃ (по гемам) равно единице. Изолированная цитохромоксидаза не полностью эквивалентна соответствующему участку ЦЭТ, так как для нее характерны иные кинетические соотношения между цитохромами *a* и *a*₃ [97]. Ионы меди прочно связаны с белком ге-

мопротеинов и подвергаются окислительно-восстановительным превращениям при функционировании ЦЭТ [98, 99].

Прежде чем перейти к анализу термодинамических и кинетических данных по функционированию ЦЭТ, необходимо рассмотреть два общих вопроса. Первый вопрос формулируется следующим образом: можно ли во внутренней мембране митохондрий выделить конкретные фиксированные ЦЭТ? Иными словами, происходит ли электронный перенос в ЦЭТ между вполне определенными молекулами переносчиков или на разных ее участках цепи переноса могут разветвляться и, по существу, следует говорить о сетке, а не о цепочках электронного транспорта? В последнем случае стехиометрический состав ЦЭТ фиксирован лишь в среднем. В сущности, как и всякая крайняя формулировка вопроса в науке («или — или»), такая его постановка не допускает однозначного ответа: он зависит от конкретной задачи исследования, от характерных времен изучаемых процессов. Эта проблема обсуждалась на специальной и чрезвычайно интересной дискуссии на симпозиуме, посвященном оксидазам и родственным окислительно-восстановительным системам [100]. Выступая в дискуссии, Чанс представил убедительные доказательства того, что на участке ЦЭТ цитохром $c - O_2$ (включительно) разветвление цепей происходит, но со скоростями, на 2—3 порядка меньшими, чем перенос электронов вдоль цепей. Возможно, что на уровне УХ разветвление цепей идет с большей скоростью, а может быть, и в этом случае каждая ЦЭТ имеет свой структурно фиксированный резервуар убухинона, обслуживающий данную ЦЭТ значительно эффективнее, чем другие цепочки. Во всяком случае, пока мы рассматриваем кинетику переноса электронов вдоль цепочки цитохромов к кислороду (а может быть, и вдоль всей ЦЭТ от НАД-Н или сукцината к кислороду), мы вправе считать, что перенос происходит между определенными фиксированными переносчиками, и пренебрегать разветвлением цепей. В этом смысле можно говорить о существовании ЦЭТ как функциональных (а может быть, даже морфологических) субъединиц митохондриальных мембран. Отсюда не следует, что ЦЭТ не взаимодействуют друг с другом, т. е. что протекание процессов в одной ЦЭТ не зависит от состояния других ЦЭТ мембра-

ны. Более того, в следующей главе мы увидим, что содержащие ЦЭТ мембраны действительно обладают такими кооперативными свойствами, которые обуславливаются их конформационными изменениями.

Второй вопрос, в значительной степени связанный с первым, относится к реальности существования внутри ЦЭТ отдельных белково-липоидных полиферментных комплексов, своего рода субъединиц ЦЭТ.

Выше уже говорилось, что Грину с сотрудниками удалось фрагментировать мембраны митохондрий и получить олигоферментные комплексы четырех типов: комплекс I содержит ФП_I и FeS , комплекс II — ФП_{II} и FeS , комплекс III — цитохромы b , c_1 и FeS , а комплекс IV представляет собой цитохромоксидазу [84]. Кинетические характеристики переносчиков в комплексах отличаются от аналогичных свойств соответствующих переносчиков в митохондриях. В работе той же лаборатории [101] была показана необходимость присутствия особого, так называемого структурного, белка для нормального функционирования различных переносчиков. Следует сказать, что даже слабые воздействия на митохондрии, приводящие к образованию так называемых субмитохондриальных частиц (СМЧ), способных к контролируемому переносу электронов и окислительному фосфорилированию, вызывают изменения в кинетических характеристиках отдельных переносчиков — цитохромов b и убихинона [102]. Кроме того, в СМЧ иными оказываются не только структура самой мембраны (она вывернута наизнанку по сравнению с интактными митохондриями), но и структурные характеристики отдельных белковых переносчиков, например флуоресцирующего флавопротеина [103—105].

Возможность выделения гриновских комплексов свидетельствует лишь в пользу того, что переносчики, обладающие близкими значениями равновесных окислительно-восстановительных потенциалов и входящие в один комплекс, действительно являются соседями в ЦЭТ, как и предполагалось ранее на основании кинетических измерений, опытов с ингибиторами и т. д. Вряд ли можно говорить о предсуществовании в ЦЭТ морфологически выделенных образований, соответствующих этим комплексам. По-видимому, следует согласиться с мнением Скулачева, считающего, что «в известном смысле всю дыхательную цепь

можно было бы определить как один фермент НАД-Н-оксидазу, а отдельные дыхательные переносчики — как субъединицы различной степени агрегации, составляющие один фермент с очень сложной четвертичной структурой» [106].

Рассмотрим некоторые термодинамические характеристики ЦЭТ. В существующей научной литературе единственной основой такого рассмотрения являются значения нормальных окислительно-восстановительных потенциалов E_m^0 (mid-point potentials) переносчиков, входящих в состав ЦЭТ. Однако физический смысл этих величин не вполне ясен. Равновесные значения E_m^0 крайних компонент ЦЭТ, $\text{НАД}^+/\text{НАД-Н}$ и $1/2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$, равны -290 и $+800$ мв соответственно. Измеряемые значения потенциалов промежуточных переносчиков действительно попадают внутрь этого интервала. Однако при сравнении значений E_m^0 для изолированных переносчиков с их значениями для тех же переносчиков в интактных митохондриях или СМЧ, измеряемыми по отношению концентраций окисленных и восстановленных форм, обнаруживаются расхождения. Таким образом, само вхождение в ЦЭТ изменяет окислительно-восстановительные характеристики переносчиков. Более того, для ряда переносчиков эти характеристики зависят от состояний ЦЭТ, наличия ингибиторов, концентраций АТФ и АДФ, разобщителей [69, 80, 87, 97, 107, 108]. Под действием АТФ или разобщителей измеряемые величины E_m^0 таких переносчиков, как цитохромы a_3 и b_T , могут меняться на $100-300$ мв. Авторы цитированных выше работ считают подобные изменения E_m^0 свидетельством того, что данный переносчик служит одновременно преобразователем энергии в процессе окислительного фосфорилирования (подробное обсуждение см. ниже). Вряд ли, однако, величинам E_m^0 отдельных переносчиков, измеряемым по отношению концентраций их окисленных и восстановленных форм в функционирующей в разных условиях ЦЭТ, можно приписать тот смысл, который вкладывает в них классическая физическая химия. Дело здесь не только в том, что стационарное состояние ЦЭТ и стационарное значение отношений концентраций окисленных и восстановленных форм отдельных переносчиков могут значительно отличаться от равновесного состояния и соответ-

вующих равновесных характеристик (функционирующая ЦЭТ — открытая система). Существенно то, что степень *кинетической* неравновесности компонент ЦЭТ может зависеть от пути прихода системы к данному квазистационарному состоянию, и поэтому измеряемые окислительно-восстановительные потенциалы отдельных переносчиков вообще могут не быть термодинамическими величинами. Отношение концентраций окисленных и восстановленных форм переносчиков в данном квазистационарном состоянии может не равняться отношению эффективных констант скоростей реакций окисления и восстановления тех же переносчиков, измеряемому по необходимости на системе, выведенной из этого состояния.

Рассмотрим данные по скоростям электронного переноса между компонентами ЦЭТ митохондрий. Следует сказать, что разброс результатов, полученных разными авторами и даже одними и теми же авторами в разных публикациях, весьма велик. Это вполне понятно, так как кинетические характеристики необычайно чувствительны к состоянию митохондрий и добиться одинаковых условий практически невозможно. Тем не менее даже на основании существующих данных можно прийти к некоторым

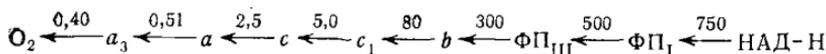


Рис. 7.6. Кинетическая схема окисления переносчиков ЦЭТ в митохондриях.

Числа у стрелок означают время полуокисления (в мсек) после подачи кислорода.

важным заключениям. Приведем несколько кинетических схем ЦЭТ, взятых из работ, выполненных в лаборатории Чанса. В обзорном докладе [109] дана кинетическая схема электронного переноса в ЦЭТ митохондрий (рис. 7.6) и указаны скорости окисления полностью восстановленных переносчиков в анаэробных митохондриях после дачи кислорода импульсным методом или методом остановленной струи.

Представление о разбросе кинетических параметров можно получить из рис. 7.7, где приведены более поздние данные той же лаборатории [110]. Здесь уже дифференци-

рованы цитохромы b_T и b_K и отдельно показаны результаты, найденные для разобщенной ЦЭТ (свободное окисление) и для фосфорилирующей ЦЭТ (сопряженное окисление). В данном случае числа на схеме означают полупериоды времени электронного переноса между соседними переносчиками в миллисекундах, инициированного в «анаэробных митохондриях» импульсным введением кислорода (а не периоды полупревращения в окисленную форму, отсчитываемые от момента введения кислорода, как на предыдущем рисунке).

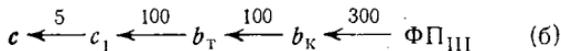
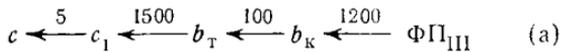


Рис. 7.7. Кинетическая схема окисления переносчиков ЦЭТ в сопряженных (а) и разобщенных (б) митохондриях.

Несколько замечаний по поводу приведенных данных. Прежде всего, наиболее быстрая реакция с участием цитохрома a_3 является процессом бимолекулярным, зависящим от концентрации добавляемого кислорода. По последним результатам той же лаборатории [97], в митохондриях сердечной мышцы голубя при концентрации O_2 , варьирующей от 4 до 48 μM , константа скорости второго порядка для реакции $O_2 + \text{цит } a_3$ равна $3 \cdot 10^7 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$ (период полупревращения при концентрации O_2 25 μM при 21° С составляет примерно $5 \cdot 10^{-4} \text{ сек}$). Скорость этой реакции слегка меняется (замедляется) при переходе от «разобщенных митохондрий» к «сопряженным». Для остальных реакций электронного переноса в ЦЭТ приводить значения констант скоростей бессмысленно. Формально в конкретных условиях эксперимента, например при запуске процесса в анаэробных митохондриях импульсным введением кислорода (или фотодиссоциацией комплекса цитохрома a_3 с СО в атмосфере кислорода), окисление отдельных переносчиков с хорошим приближением подчиняется кинетическим уравнениям первого порядка, и авторы часто рассчитывают константы скорости первого порядка, просто деля $\ln 2$ на период полупревращения, как это делается в кинетике газовых реак-

ций и реакций в растворах. Следует помнить, однако, что в случае реакций, происходящих не в статистическом ансамбле реагентов, а между фиксированными центрами, обязательно принадлежащими одной ЦЭТ, скорость процесса зависит не только от общего количества центров данного типа, но и от состояния соседних именно в тех ЦЭТ, которые содержат данные реакционно-способные центры. Скорость зависит в свою очередь не только от состояния ЦЭТ, но и от пути ее прихода в данное состояние, т. е. от истории системы. Поэтому, для того чтобы константы скорости имели тот же физический смысл, что и в обычной кинетике, необходимо почти необозримое количество условий. Для характеристики процесса лучше пользоваться непосредственно измеряемыми величинами типа периода полупревращения, не претендующими на какой-либо теоретический смысл.

Перенос электрона от цитохрома *a* к цитохрому *a*₃ происходит примерно на порядок медленнее, чем в обратном направлении (это справедливо для неповрежденных митохондрий; в изолированной цитохромоксидазе скорости процессов различаются не более чем вдвое).

Обращает внимание резкая зависимость скоростей переноса на некоторых участках ЦЭТ от сопряженного с электронным транспортом окислительного фосфорилирования (кстати, сравнение рис. 7.7 и рис. 7.6 заставляет прийти к заключению, что на последнем приведены данные для разобщенных митохондрий). Детальное исследование кинетики окисления цитохрома *b*_T показало, что на самом деле оно происходит весьма сложно и при некоторых условиях окислению цитохрома *b*_T после дачи O₂ в анаэробные митохондрии может предшествовать его временное дополнительное восстановление [69].

Сопоставление данных, показанных на рис. 7.6 и 7.7, с другими фактами, относящимися к функционированию ЦЭТ и отдельных переносчиков, приводит к ряду противоречий, пути разрешения которых не вполне ясны. Легко видеть, что при переносе электронов от НАД-Н (или сукцината) к кислороду после цитохрома *c* процессы переноса резко ускоряются (особенно сильно в случае сопряженных митохондрий). Это означает, что в стационарном состоянии митохондрий, когда кислорода достаточно и он не лимитирует скорость всего процесса, окисление

цитохромов должно происходить гораздо быстрее их восстановления (примерно на два порядка), и поэтому они должны находиться в практически полностью окисленном состоянии. К тому же выводу приходит Чанс, сравнивавший большую скорость окисления цитохрома *c* с его малым числом оборотов в стационарном состоянии дыхательного контроля (см. ниже гл. 8) фосфорилирующих митохондрий [111]. Число оборотов равно только 5 сек^{-1} , хотя в стационарном состоянии дыхательного контроля митохондрий значительная доля цитохрома *c* (около 15%) находится в восстановленном состоянии. Может быть, это означает, что скорости электронного переноса между компонентами цитохромной системы в стационарном состоянии ЦЭТ отличаются от этих скоростей в условиях, в которых были получены данные, приведенные на рис. 7.6 и 7.7, т. е. при взаимодействии кислорода с анаэробными митохондриями.

Раз уж речь зашла о цитохроме *c*, то нельзя не отметить, что противоречие возникает и при сравнении результатов, изображенных на рис. 7.6 и 7.7, с тем, что нам известно сегодня об окислительно-восстановительных превращениях изолированного цитохрома *c*. В гл. 5 и 6 мы видели, что окисление и восстановление цитохрома *c* сопровождаются существенными конформационными изменениями макромолекулы. Опыты Пехта и Фараджи [112] показали, что при восстановлении феррицитохрома *c* в растворе конформационные изменения, необходимые для достижения *равновесного* состояния ферроцитохрома *c*, длятся сотни миллисекунд. Вместе с тем из результатов, приведенных в настоящем параграфе, следует, что при взаимодействии кислорода с ЦЭТ анаэробных митохондрий цитохром *c* окисляется (перенос цит *c* → цит *a*) и затем восстанавливается (перенос цит c_1 → цит *c*) за несколько миллисекунд. Это противоречие можно устранить с помощью одного из двух допущений. Во-первых, возможно, что релаксационные конформационные переходы молекулы цитохрома *c* в мембранной структуре митохондрий происходят гораздо быстрее, чем в растворе. Такое допущение представляется мне весьма маловероятным. Гораздо более правдоподобно второе допущение, согласно которому при переносе электрона через цитохром *c* к кислороду в исходно анаэробных митохондриях в первые

моменты времени конформационные изменения макромолекулы просто не успевают произойти. Действительно, в анаэробных митохондриях ферроцитохром *c* находится в равновесной «восстановленной» конформации. После мгновенной дачи кислорода активный центр цитохрома *c* отдает электрон и окисляется за несколько миллисекунд, хотя конформация его белковой части остается «восстановленной». Перенос электрона от следующего переносчика (цитохрома c_1) также осуществляется за несколько миллисекунд, так что время жизни активного центра цитохрома c_1 в окисленном состоянии при последовательных актах электронного переноса к нему и от него недостаточно для реализации конформационного изменения. Так будет происходить до тех пор, пока не исчерпается резервуар быстрых переносчиков, стоящих по «восстановительную» сторону от цитохрома *c* (на рис. 7.6 и 7.7 цитохром c_1), после чего акты восстановления активного центра каждой его молекулы будут наступать так редко, что в промежутках между ними молекулы успевают отрелаксировать до равновесной «окисленной» конформации. Из опытов в растворе мы знаем, что такая релаксация сопровождается некоторыми спектральными изменениями, и, значит, высказанное выше предположение можно было бы в принципе проверить. Если оно верно, то это значит, что для акцептирования электрона от соседнего переносчика в ЦЭТ цитохром *c* не обязательно должен находиться в равновесной окисленной конформации. К сожалению, подобное утверждение связано с отказом от очень красивой идеи о специальном пути для электрона в окисленном цитохроме *c* от поверхности белковой глобулы до железа, проходящем через параллельно расположенные ароматические кольца тирозинов и триптофана (см. гл. 5). Правда, эта идея представляется мне слишком красивой, чтобы быть верной. В следующей главе вопрос о том, когда можно и когда нельзя ожидать реализации существенных конформационных переходов отдельных переносчиков ЦЭТ, будет рассмотрен более подробно *).

*) Следует отметить, что конформационные изменения цитохрома *c* в мембране могут протекать значительно медленнее, чем в растворе. Это было показано при исследовании кинетических характеристик цитохрома *c*, иммобилизованного на различных поверхностях [113].

На этом мы закончим пока рассмотрение процессов электронного переноса в ЦЭТ митохондрий и перейдем к анализу фотоиндуцированного транспорта электронов в хлоропластах и хроматофорах фотосинтезирующих организмов. Мы не будем здесь касаться вопроса о механизме первичного акта фотоиндуцированного разделения зарядов. Об этом речь пойдет в следующем параграфе. Собственно, перенос электронов между компонентами ЦЭТ хлоропластов и хроматофоров — такой же темновой процесс, как и электронный транспорт в митохондриях. Поглощение света обеспечивает лишь возникновение компонент ЦЭТ — доноров и акцепторов электронов с соответствующим образом расположенными электронными уровнями.

Несмотря на поистине огромное и все возрастающее число работ, посвященных процессам электронного транспорта в фотосинтетических системах, точный состав ЦЭТ, последовательность переносчиков и детали их кинетических характеристик остаются невыясненными и служат предметом дискуссии многочисленных школ. Мы не будем подробно останавливаться на большинстве этих вопросов. Для постановки проблем, обсуждаемых в данной книге, не так уж важно, например, расположен ли медьсодержащий белок пластоцианин перед, после или параллельно с цитохромом *f* в цепи переносчиков электронов от активного центра фотосистемы II к активному центру фотосистемы I в хлоропластах листьев зеленых растений. Вместе с тем некоторые особенности фотосинтетических систем, связанные с принципиальной возможностью запускать процессы электронного переноса вспышками света малой длительности, позволили установить ряд новых важных экспериментальных данных, но воспроизвести их на ЦЭТ митохондрий пока не удалось. Мы остановимся здесь главным образом на этих новых результатах, описав сначала сугубо схематически построение ЦЭТ хроматофоров фотосинтезирующих бактерий и хлоропластов зеленых водорослей и высших растений. Поэтому на рис. 7.8 и 7.9 показаны только те компоненты ЦЭТ, которые необходимы для понимания смысла обсуждаемых далее экспериментов.

На рис. 7.8 представлена схема ЦЭТ в хроматофорах серных бактерий, в которых (при нециклическом элект-

ронном транспорте) реализуется перенос электрона от донора — иона гидросульфида (HS^-) к акцептору — окисленной форме НАДФ (НАДФ $^+$). Особое внимание следует обратить на молекулу бактериохлорофилла Р 890, находящуюся в фотохимическом активном центре ЦЭТ. В возбужденном синглетном электронном состоянии эта

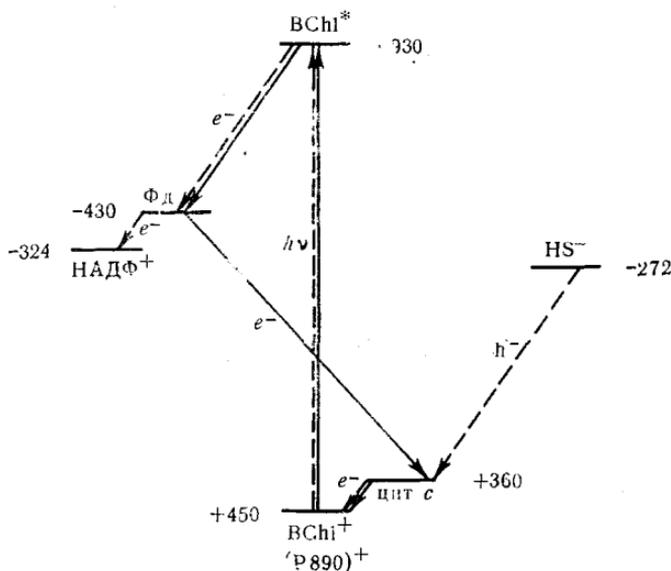


Рис. 7.8. Схема цепи электронного транспорта в хромофорах серных бактерий.

Числа у уровней означают равновесные значения окислительно-восстановительных потенциалов соответствующих центров в милливольтках. Сплошными стрелками указан путь циклического электронного транспорта.

молекула является хорошим донором электрона (ее формальный окислительно-восстановительный потенциал примерно равен -930 мВ). Поэтому в результате поглощения кванта света с длиной волны, не превышающей 9000 \AA , происходит разделение зарядов, и электрон переходит на первичный акцептор, пока еще неизвестной природы. По некоторым данным, таким акцептором служит пластохинон (см., например, [114]), по другим — железосерный белок типа показанного на рис. 7.8 ферредоксина (ФД) (см., [115]).

Вопрос о первичном электронном акцепторе будет дополнительно рассмотрен ниже. Ферредоксин безусловно

является переносчиком, расположенным в ЦЭТ между Р 890 и конечным акцептором НАДФ⁺. Образовавшийся в результате разделения зарядов положительно заряженный центр (Р 890)⁺ является хорошим окислителем (окислительно-восстановительный потенциал примерно равен

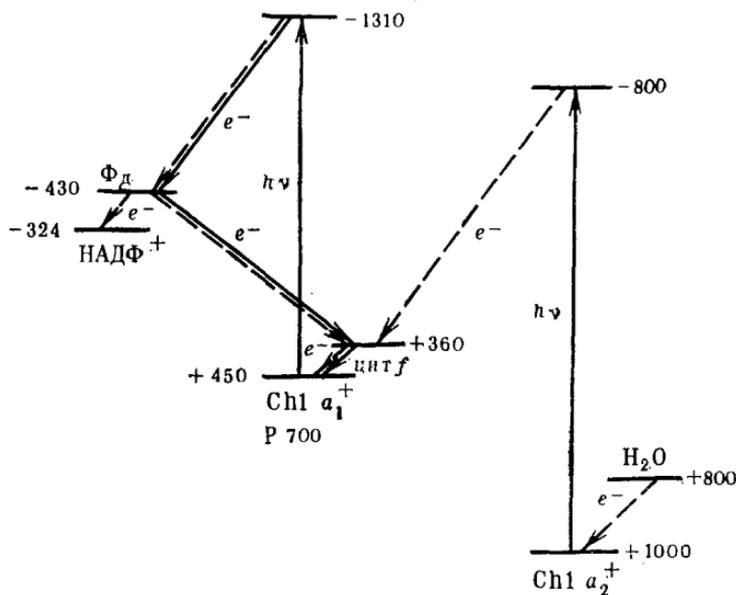


Рис. 7.9. Схема цепи электронного транспорта в хлоропластах высших растений.

Числа у уровней означают равновесные значения окислительно-восстановительных потенциалов соответствующих центров в милливольтях. Сплошными стрелками указан путь циклического транспорта.

450 мв) и через первичный донор — молекулу цитохрома с (по-видимому, образующую единый белковый комплекс с Р 890) забирает электрон от окисляемого субстрата (сернистые соединения). Таким образом, при нециклическом электронном транспорте квант света с энергией около 1,38 эв переносит электрон от субстрата на конечный акцептор, затрачивая на этот процесс около 0,05 эв. Остальная энергия кванта тратится на синтез АТФ (фотофосфорилирование, см. ниже) и рассеивается в виде тепла. При некоторых условиях (избыток НАДФ-Н, нехватка АТФ) электронный поток от ферредоксина может пойти через

специальную систему переносчиков к первичному донору — цитохрому *c* и снова на $(P\ 890)^+$ (*циклический электронный транспорт*). В последнем случае электроны движутся по замкнутому циклу, а энергия, выделяющаяся на стадиях, сопровождающихся повышением окислительно-восстановительного потенциала, расходуется только на образование АТФ и рассеивается в виде тепла.

ЦЭТ хлоропластов высших растений и зеленых водорослей (см. рис. 7.9) включает две фотосистемы (см. [51, 116]). Фотосистема I в принципе повторяет ЦЭТ хроматофоров бактерий, с той разницей, что в фотохимическом активном центре вместо бактериохлорофилла $P\ 890$ находится хлорофилл a_1 , имеющий длинноволновый максимум в спектре поглощения при $7000\ \text{\AA}$ ($P\ 700$) *), а первичным донором является цитохром *f*, который, впрочем, тоже относится к классу цитохромов *c*. Окисленный цитохром *f*, однако, при нециклическом электронном транспорте получает электрон не от субстрата (вода), а через цепочку переносчиков (не показанных на схеме) от первичного акцептора фотосистемы II; окисленный активный центр последней, хлорофилл a_2^+ , получает электрон через систему переносчиков от молекулы H_2O . Таким образом, при нециклическом электронном транспорте для переноса электрона от субстрата H_2O к конечному акцептору (НАДФ⁺) тратится два кванта света с суммарной энергией около $3,65\ \text{эв}$, из которой непосредственно на перенос используется примерно $1,12\ \text{эв}$, а остальное расходуется на синтез АТФ и рассеивается в виде тепла **).

ЦЭТ хлоропластов и хроматофоров — образования, по-видимому, не статистические, а (по крайней мере функционально, если не морфологически) изолированные. Пе-

*) Хотя все длины волн приводятся в ангстремах, в книге сохранены принятые в литературе обозначения $P700$, $P\ 890$ и т. д.

***) Недавно Кнафф и Арнон [117] предложили новую схему ЦЭТ хлоропластов. Основным отличием от обычной схемы является утверждение, согласно которому ферредоксины, стоящие на путях циклического и нециклического транспорта, — разные молекулы. Циклический электронный транспорт обеспечивается отдельной фотосистемой со своим набором переносчиков, не совпадающим с набором переносчиков двух световых реакций, обеспечивающих нециклический транспорт. Независимо от справедливости этой точки зрения, она не вносит ничего принципиально нового, что могло бы отразиться на физических аспектах проблемы.

ренос электронов между отдельными ЦЭТ реализуется, вероятно, только с помощью резервуара пластохинона, молярная концентрация которого примерно на порядок превышает концентрации других переносчиков [118].

Недавно при исследовании кинетики электронного переноса в ЦЭТ хлоропластов, индуцированного вспышками белого света микросекундной длительности, удалось показать существование двухэлектронного «затвора» в цепи переносчиков между двумя фотосистемами [119—121]. Этот затвор пропускает электроны только парами. Вероятно, роль такого затвора играют молекулы пластохинона, которые должны переносить электроны через гидрофобный слой мембраны тилакоида. Функционирование затвора основано на различиях растворимости пластохинона в разных окислительно-восстановительных системах (хинон, семихинон, гидрохинон) в гидрофобных и гидрофильных средах. Эти эксперименты также свидетельствуют о том, что взаимодействие молекул пластохинона, принадлежащих к разным ЦЭТ, происходит значительно медленнее, чем в случае молекул одной и той же ЦЭТ.

Как уже было сказано выше, возможность инициировать реакции переноса светом весьма благоприятна для кинетических исследований. Наиболее интересны результаты, полученные при изучении кинетики переноса на отдельных участках ЦЭТ в широком интервале температур. Еще в 1960 г. в лаборатории Чанса [122] было показано, что у фотосинтезирующих серных бактерий окисление цитохрома типа *c* происходит при поглощении света при температуре жидкого азота. Результаты первых исследований по темновому окислению цитохрома *f* после индуцированного светом окисления Р 700 в зеленых растениях были опубликованы в 1961 г. [123]. В 1963 г. [124] были получены кинетические данные, свидетельствующие о том, что перенос электрона от цитохрома *f* к центру (Р 700)⁺ происходит в ЦЭТ зеленых листьев при 77° К по крайней мере столь же эффективно, как и при комнатной температуре. Подробные исследования были проведены на хроматофорах серных бактерий [109, 125—131].

Для одного из штаммов серных бактерий были получены следующие кинетические данные по переносу электрона от цитохрома *c* к ВCh1⁺ после фотоокисления последнего лазерной вспышкой [127]. При комнатной температуре

период полупревращения $\tau_{1/2}$ равен $2 \cdot 10^{-6}$ сек. При понижении температуры $\tau_{1/2}$ растет, формально подчиняясь уравнению Аррениуса с энергией $E_a \approx 0,14$ эв. При 130°K $\tau_{1/2} \approx 2 \cdot 10^{-3}$ сек, при 100°K $\tau_{1/2} \approx 2,3 \cdot 10^{-3}$ сек, после чего период полупревращения остается практически постоянным вплоть до 4°K ($E_a < 2 \cdot 10^{-4}$ эв). Таким образом, весь температурный интервал от комнатной до гелиевой температур делится на две части: при температурах выше примерно 100°K скорость электронного переноса зависит от температуры, а при более низких не зависит от нее. Аналогичные результаты были получены Григоровым [129] для другого штамма серных бактерий. Период полупревращения при комнатной температуре составлял $1,5 \cdot 10^{-6}$ сек. Скорость переноса падала вплоть до температур, примерно равных 200°K ($E_a \approx 0,13$ эв), после чего оставалась практически постоянной вплоть до температуры жидкого азота. Интересны данные по температурной зависимости темнового восстановления фотooksисленного цитохрома *c* в том же штамме серных бактерий [130]. Восстановление проходит в две стадии, причем первая, быстрая стадия, по-видимому, обусловлена переносом электронов на цитохром *c* от фотовосстановленных переносчиков ЦЭТ. Скорость быстрой стадии обнаруживает сложную температурную зависимость. При понижении температуры от комнатной примерно до 230°K эта стадия замедляется приблизительно на два порядка, после чего вновь ускоряется, и в интервале температур 170 — 77°K ее скорость становится практически постоянной. Сравнительно медленное темновое восстановление фотooksисленного цитохрома *c*, слабо зависящее от температуры в интервале 295 — 77°K , было отмечено и при исследовании другого штамма серных бактерий [128].

Было обнаружено также, что некоторые реакции переноса электронов (окисление одного из цитохромов *b* и восстановление нового центра — пигмента Р 546) в фотосистеме II хлоропластов и зеленых листьев могут протекать при температуре жидкого азота [132].

Анализируя результаты изучения при гелиевых температурах фотоиндуцированных изменений сигнала ЭПР ферредоксина, содержащегося в фотосистеме I хлоропластов, Янг и Блумберг [133] пришли к заключению, что эти вторичные реакции электронного переноса с участием

ферредоксина могут протекать вплоть до температуры $1,5^{\circ}\text{K}$.

Таким образом, приведенные данные по реакциям электронного переноса в ЦЭТ митохондрий, хлоропластов и хромофоров свидетельствуют о том, что перенос происходит между центрами, жестко и специфическим образом фиксированными в мембранной структуре. Условия переноса существенно зависят от состояния мембраны. В ряде случаев (в основном для процессов, происходящих в непосредственной близости от активного центра фотосинтетических систем) удалось зарегистрировать реакции электронного переноса, скорость которых практически не зависит от температуры. Эти данные следует иметь в виду при обсуждении возможных физических механизмов электронного транспорта в мембранных структурах.

§ 7.4. РЕАКЦИИ ЭЛЕКТРОННОГО ПЕРЕНОСА И ПОЛУПРОВОДНИКОВЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ В БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКЕ

Когда развивается какая-либо новая область физики или уже существующая область становится более популярной, всегда появляются работы, посвященные исключительной важности данного направления физики для биологии. Эта тенденция весьма полезна, так как приводит в конечном счете к тщательному анализу новых физических аспектов структур и процессов в биологических системах. К сожалению, среди адептов, присоединяющихся к каждому такому новому течению, как правило, много физиков, не знакомых с биологическим материалом, и биологов, знающих физику на уровне популярных статей. Поэтому их работы часто вызывают раздражение как биологов, так и физиков. Для того чтобы выяснить, есть ли в очередном увлечении рациональное зерно, необходимо преодолеть это раздражение.

Весьма популярными в свое время были представления об исключительно большом значении в биологии полупроводниковых явлений. В 1938 г. известный физик Йордан [134] выступил с идеей о возможности истолкования многих важных биологических явлений, если допустить, что гигантские молекулы биополимеров обладают свойствами твердых тел, т. е. вследствие взаимодействия регулярно

расположенных молекулярных групп в них образуются энергетические зоны и становится возможной миграция энергии на большие расстояния. В качестве примера был рассмотрен в рамках такого предположения спектр действия фотоинактивации фермента уреазы, и были высказаны некоторые соображения о механизме мутаций и взаимодействиях генов.

В 1941 г. эта идея была подхвачена биологом Сцент-Дьердьи [135, 136], который впервые предположил, что белковые структуры также могут обладать полупроводниковыми свойствами, т. е. иметь зоны проводимости, по которым могут мигрировать электронные или дырочные заряды.

Что касается миграции энергии электронного возбуждения в белковых молекулах и их комплексах, то многочисленные экспериментальные данные, полученные за многие годы в самых различных лабораториях, не оставляют сомнений в ее существовании [137—141]. Механизм этой миграции в белковых системах может, по-видимому, считаться выясненным: перенос энергии электронного возбуждения в макромолекулах белка между ароматическими аминокислотными остатками или с участием небелковых хромофорных групп (адсорбированные красители, простетические группы сложных белков и т. п.) происходит по механизму резонансного безызлучательного переноса Вавилова — Фёрстера [142, 143]. Как известно, такой механизм отличается от механизма излучательного переноса энергии возбуждения тем, что в последнем случае перенос определяет компонента электрического поля системы, входящая в поток энергии, излучаемой молекулярным осциллятором, тогда как резонансный перенос происходит без участия испускаемых и поглощаемых квантов. По-видимому, несколько по-иному реализуется миграция энергии возбуждения в пигментных системах фотосинтетических организмов, но об этом речь пойдет ниже.

Рассмотрим теперь вопрос о возможности полупроводникового механизма миграции заряда в белковых структурах. Идея Сцент-Дьердьи о возможной важной роли этого механизма в важнейших биологических процессах была подвергнута критике в ряде работ [144, 145]. Наиболее существенное возражение заключалось в том, что для перехода электрона в зону проводимости таких насыщен-

ных систем, как белковые молекулы, требуется энергия около 3 эв , и поэтому при обычных температурах зона проводимости должна быть пустой.

В дальнейшем критики Сцент-Дьердьи в качестве основного аргумента ссылались на расчет Эванса и Гергели [146], которые примитивным методом молекулярных орбит (МО) вычислили положения общемолекулярных электронных уровней, возникающих за счет взаимодействия π -электронов различных пептидных групп через водородные связи $\text{>N—H} \cdots \text{O}=\text{C}<$, идущие поперек полипептидных цепочек. В рамках чрезвычайно приближенного расчета авторы показали, что при учете π -сопряжения без σ -связей через водородные мостики вместо дискретных уровней МО изолированных пептидных групп получаются чрезвычайно узкие ($\delta E < 0,2 \text{ эв}$) энергетические зоны. Расстояние нижнего свободного уровня (зоны) до высшего занятого уровня (зоны) снижается за счет учета взаимодействия через водородные связи от $4,46 \text{ эв}$ для изолированной пептидной группы до $3,05 \text{ эв}$ для бесконечно длинной полипептидной цепочки. Авторы приходят к выводу о существовании в белковых макромолекулах узких зон проводимости, направленных поперек главной полипептидной цепи. Эти зоны лежат слишком высоко, чтобы белки обладали полупроводниковыми свойствами в основном состоянии, но могут обеспечивать фотопроводимость белковых структур, причем узостью зоны проводимости авторы объясняют функциональную специфичность белков.

Эта работа стимулировала ряд важных исследований, однако сейчас трудно понять, как такие в достаточной степени примитивные и тривиальные расчеты могли в свое время рассматриваться как доказательство наличия или отсутствия полупроводниковых свойств белков. По существу, в методе МО проведен расчет *нейтральных* возбужденных состояний одномерного молекулярного кристалла, состоящего из пептидных групп с постулированным слабым их взаимодействием. Для получения тех качественных выводов, к которым приходят авторы, можно было бы и не делать никаких расчетов. Отсутствие низколежащих уровней электронных нейтральных возбуждений пептидных связей хорошо известно из спектров простых пептидов.

Постулирование *слабого* взаимодействия пептидных групп должно автоматически привести к появлению узких зон и незначительному понижению их энергии. К тому же выводу можно прийти, сравнивая оптические характеристики дипептидов и белков.

В примитивном методе МО, не учитывающем непосредственно межэлектронного взаимодействия и использующем неантисимметризованные волновые функции, вообще неизвестно, рассчитываются ли синглетные или триплетные электронные возбужденные состояния. Согласно некоторым соображениям [147], получаемые численные значения правильнее сопоставлять с положением триплетных возбужденных уровней. Во всяком случае, речь идет о расчетах нетоконесущих нейтральных возбужденных состояний системы, тогда как положение зоны проводимости молекулярных кристаллов определяется положением не нейтральной, а полярной ветви возбуждения [148—153]. Кроме того, даже если допустить совпадение уровней нейтральных и полярных возбуждений (нейтральных экситонов и экситонов переноса), результаты расчета относятся только к собственной полупроводимости, а реальные белковые структуры содержат огромное количество примесных центров (простетические группы, ионы металлов, ионизованные боковые группы и просто ароматические аминокислотные остатки). Таким образом, расчет Эванса и Гергели, даже если считать, что действительно вычисляется положение зоны проводимости, в лучшем случае свидетельствует об отсутствии собственной полупроводимости белковых структур, а не об отсутствии темновой полупроводимости, как таковой. На основании подобных соображений и некоторых экспериментальных данных по спектрам ЭПР биологических объектов (см. ниже) я в 1957 г. пришел к выводу о существовании темновой примесной полупроводимости белковых макромолекул и о важной роли этого свойства в протекании окислительно-восстановительных процессов [7]. В настоящее время я считаю эти представления ошибочными. В таких системах, как реальные белковые структуры с огромным количеством электронных и дырочных ловушек, расположенных (пространственно) вблизи зоны проводимости, невозможно движение носителей тока на сколько-нибудь значительные расстояния по обычному зонному механизму.

Кроме того, тщательное изучение биологических структур (мембран митохондрий и хлоропластов), в которых происходит темновой перенос электронных и дырочных зарядов на большие расстояния в процессе их функционирования, показало, что в привлечении полупроводниковых представлений просто нет никакой необходимости. Заряды в таких системах переходят от одного фиксированного центра (ловушки) к другому, задерживаясь на некоторых из них на времена, достаточные для протекания сложных химических превращений в ближайшем окружении ловушки. Расстояния между центрами в этих ЦЭТ варьируют, по-видимому, от единиц до нескольких десятков ангстрем, что вообще делает бессмысленным обращение к полупроводниковым представлениям. Вопрос о возможных механизмах такого переноса представляет большой интерес и будет подробно рассмотрен в следующем параграфе.

Несмотря на все сказанное выше, полупроводниковые свойства белков и более сложных биологических структур исследовались и продолжают исследоваться экспериментально. Весьма часто изучают электропроводность высушенных тем или иным способом белковых пленок и порошков (таблеток), комплексов белков и даже столь сложных систем, как хлоропласты. Вплоть до недавнего времени такие измерения проводили на постоянном токе или на сравнительно низких частотах [154—158]. Вряд ли их результаты имеют какое-либо биофизическое значение. То обстоятельство, что для всех исследованных объектов была обнаружена экспоненциальная температурная зависимость проводимости, ни о чем не говорит: такая зависимость характерна практически для всех органических материалов, даже для типичных диэлектриков. Проводимость подобных объектов и измеряемые энергии активации проводимости могут определяться весьма разнообразными механизмами: приэлектродными процессами, миграцией ионов, переносом заряда между упорядоченными участками с хорошей проводимостью и т. д. Эти механизмы подробно рассмотрены в специальных монографиях [153, 159—161].

В последние годы начаты исследования диэлектрических характеристик биологических объектов на частотах порядка 10^{10} гц [162—169]. Фактически измеряются дей-

ствительная (ϵ') и мнимая (ϵ'') части диэлектрической проницаемости. Идея, лежащая в основе этих экспериментов, заключается в том, что на таких высоких частотах межмолекулярные барьеры не играют существенной роли и измеряется непосредственно поляризуемость, определяемая свободными электронными и дырочными зарядами. К сожалению, до сих пор не создана строгая физическая теория наблюдаемых эффектов даже в наиболее чистом случае изменения диэлектрических характеристик под действием света («СВЧ-фотопроводимость»). По-видимому, более или менее обоснованно можно утверждать, что ориентационная поляризация не может давать существенный вклад в наблюдаемые сигналы [170]. Эффекты, получаемые в сложных биологических структурах, вероятно, обусловлены главным образом вторичными темновыми процессами (макроструктурная поляризация, ионные перемещения и т. п.) [171].

В 1957 г. автор [7] высказал предположение, что наблюдаемый в клетках и тканях узкий синглетный сигнал ЭПР свидетельствует о наличии делокализованных свободных электронов (или дырок) и может рассматриваться как доказательство полупроводниковых характеристик этих объектов. Аналогичным образом рассматривались данные по спектрам ЭПР γ -облученных нативных и денатурированных белков [8].

В настоящее время ошибочность таких представлений стала очевидной (см. § 7.2 и работы [172—175]).

В сложных биополимерных внутриклеточных структурах имеется, конечно, большое количество центров, обладающих донорными и акцепторными свойствами, участвующих в процессах, связанных с переносом электронов, и в принципе способных играть роль примесных центров. Однако реализация полупроводниковых механизмов в основных биологических процессах практически невозможна.

Вероятно, единственным исключением является первичный световой процесс в фотосинтетических системах. Как известно, в пигментных системах хлоропластов высших растений и хроматофоров бактерий основная масса хлорофилла осуществляет светособирающие функции. Возбуждение мигрирует по ансамблю упакованных молекул красителя, а фотохимический акт — образование окислен-

ной формы активного центра и восстановленной формы первичного донора — реализуется на активных центрах, концентрация которых мала по сравнению с концентрацией пигмента (см. § 7.3.).

Экспериментальные результаты, полученные в последние годы, свидетельствуют в пользу того, что светособирающая пигментная система представляет собой ансамбль упорядоченно расположенных молекул хлорофилла [176, 177]. Миграция энергии возбуждения в этом ансамбле осуществляется, по-видимому, не по резонансному, а по экситонному механизму, что свидетельствует о сравнительно сильном взаимодействии молекул [178]. При такой ситуации в принципе возможны два разных физических механизма процессов, предшествующих первой фотохимической реакции. 1) Разделение зарядов происходит только на активном центре, и в один акт образуется первичный окислитель (например, $(P\ 700)^+$) и первичный восстановитель (например, восстановленный ферредоксин). По молекулам пигментной системы мигрирует только нейтральное возбуждение. 2) Полупроводниковый механизм. Разделение зарядов с образованием свободных носителей или экситона переноса [148, 150] осуществляется не на активном центре, а на другом дефекте структуры. На фотохимическом активном центре (например, $P\ 700$) либо захватывается дырка (до этого мигрировавшая по пигментной системе), либо распадается экситон переноса с захватом дырки на $P\ 700$ и миграцией электрона по пигментной системе к первичному восстановителю. В рамки полупроводникового механизма укладывается также вариант с распадом нейтрального экситона на активном центре ($P\ 700$), захватом дырки и миграцией электрона к первичному акцептору, удаленному от $P\ 700$. Собственно, в основе полупроводниковой концепции лежит предположение о появлении в пигментной системе фотоиндуцированных носителей заряда. Физическая проблема и состоит в доказательстве или опровержении этого предположения.

В свое время одним из существенных возражений против гипотезы полупроводниковых механизмов первичных стадий фотосинтеза было обнаружение весьма низких квантовых выходов фотоэффекта в слоях хлорофилла [179, 180]. Однако недавно проведенные измерения фотопроводимости слоев хлорофилла *a* и *b* в режимах постоян-

ного и импульсного освещения [181, 182] показали ошибочность прежних результатов. Оказалось, что в максимуме фоточувствительности 7050 Å нижняя граница квантового выхода фотозффекта составляет не меньше 15—20% и свободные носители тока появляются не позже чем через 10^{-8} сек после начала освещения. Эти результаты означают, что образование носителей тока является одним из основных путей превращения поглощаемой хлорофиллом световой энергии и триплетные возбуждения, по-видимому, не могут играть роль промежуточных состояний.

Естественно, эти данные только снимают одно из возражений, но сами не могут служить доказательством того, что и в пигментной системе фотосинтезирующих организмов возможно образование свободных носителей с большим выходом: распад нейтрального экситона на активном центре с одновременным захватом электрона и дырки может полностью подавить полупроводниковый механизм. Если, однако, согласиться с тем, что разделение зарядов может происходить в самой пигментной матрице и, следовательно, первичными акцепторами служат сами молекулы хлорофилла, возникает естественный вопрос: почему в спектрах ЭПР проявляются только положительно заряженные парамагнитные центры ($P\ 700$)⁺, почему не видно сигнала от анион-радикальных состояний? (О различных типах фотоиндуцированных сигналов ЭПР в фотосинтетических системах см. [183, 184].)

Аналогичная проблема возникла в свое время при исследовании спектров ЭПР органических полупроводников с низкой проводимостью (полимеров с сопряженными связями, красителей, комплексов с переносом заряда). Было показано, что наблюдающиеся в таких системах сигналы ЭПР обусловлены ион-радикальными состояниями, возникающими в результате разделения зарядов и захвата электронов и дырок на дефектах структуры, играющих роль примесных центров [152]. Однако всегда наблюдались только сигналы ЭПР одного типа. Поиск второго центра, проведенный на одном из типичных полимерных органических полупроводников — полифенилацетилене [185], привел к следующему результату: при измерениях на весьма низких уровнях СВЧ-мощности ($< 10^{-5}$ вт), кроме обычного сигнала ЭПР с $\Delta H_{1/2} \approx 10$ гс (сигнал А), появляется второй сигнал (сигнал В с $\Delta H_{1/2} \approx 16$ гс), от-

носительная интегральная интенсивность которого растет по мере падения СВЧ-мощности и примерно при $5 \cdot 10^{-8}$ *вт* становится практически равной интегральной интенсивности сигнала *A*. Сигнал *B* обусловлен сильно насыщающимся парамагнитным центром (значения $T_1 \cdot T_2$ для центров *A* и *B* составляют $6 \cdot 10^{-11}$ и $3 \cdot 10^{-9}$ *сек*² соответственно *)). Специально поставленные эксперименты с добавками электронных доноров и акцепторов показали, что обычно наблюдаемый сигнал *A* обусловлен катион-радикальными, а легко насыщающийся сигнал *B* — анион-радикальными парамагнитными центрами. В дальнейшем аналогичные результаты были получены на других органических полупроводниках, в том числе на различных красителях [186].

Исследования такого типа еще не проводились на фотосинтетических системах; они могут оказаться весьма полезными для решения проблемы механизма первичного разделения зарядов и природы первичного электронного акцептора при фотосинтезе.

Не исключено, конечно, что пигментная матрица в фотосинтезирующих системах не похожа по своим свойствам на изученные органические полупроводники и возникающие катион- и анион-радикальные центры почти не отличаются друг от друга по характеристикам сигналов ЭПР (в том числе по параметрам насыщения). В этом случае в сигнал I (фотоиндуцированный сигнал ЭПР фотосистемы I хлоропластов) должны давать вклад сигналы не только от центров (P 700)⁺, но и от анион-радикальных состояний первичного акцептора (если допустить, что такими акцепторами служат отдельные молекулы хлорофилла или их ансамбли). В связи с этим возникает второй вопрос, не решенный до настоящего времени: сколько типов парамагнитных центров дают вклад в обычно наблюдаемый сигнал I?

Бейнерт и Кок еще в 1963 г. [187] провели тщательное сопоставление количества центров P 700 в фотосинтезирующих системах, определенного методом ЭПР, с их количеством, найденным спектральным методом. Они обнаружили, что число парамагнитных центров, дающих вклад в

*) Произведение продольного (T_1) и поперечного (T_2) времен релаксации парамагнитных центров определяет их насыщение СВЧ-мощностью.

сигнал ЭПР I, во всех случаях в 2—5 раз превышает число центров Р 700, подвергающихся фотоокислению *). Это заставляет предположить, что, кроме спектрально идентифицируемых центров (Р 700)⁺, за сигнал ЭПР I ответственны парамагнитные центры других типов, например анион-радикалы семипластохинонов, хотя g -фактор сигнала ЭПР семихинона должен был бы быть несколько смещен относительно наблюдаемого значения (как, например, g -фактор сигнала III в работе [184]).

Имеется довольно много косвенных данных, свидетельствующих о сложности фотоиндуцированного сигнала ЭПР I. Так, например, в 1969 г. Кафалиева и др. [189] пытались разделить фотоиндуцированные парамагнитные центры, ответственные за сигнал I в хлоропластах *Vicia faba*, по их релаксационным характеристикам. Был использован метод регистрации сигнала дисперсии в условиях быстрого прохождения при разных значениях амплитуды высокочастотной модуляции (H_m). По мере увеличения H_m амплитуда колоколообразного сигнала дисперсии проходит через максимум, положение которого зависит от T_1 и T_2 парамагнитного центра. При еще больших значениях H_m сигнал дисперсии расщепляется, причем характеристики этого расщепления также зависят от T_1 и T_2 . Исследование сигнала I при 77° К с суммарной интенсивностью, соответствовавшей $\sim 5 \cdot 10^{16}$ спин·см⁻³, показало, что в него дают вклад по крайней мере четыре типа парамагнитных центров, различающихся по своим релаксационным характеристикам.

Таким образом, вопрос о природе всех фотоиндуцированных парамагнитных центров, ответственных за сигнал ЭПР I в фотосинтезирующих системах, еще далеко не решен. Необходимы дальнейшие количественные исследования, особенно кинетические.

Из изложенного ясно также, что вопрос о возможной роли полупроводниковых механизмов в первичных стадиях фотоиндуцированного разделения зарядов в фотосинтезирующих системах (вероятно, это единственный важный биологический процесс, где можно подозревать участие полупроводниковых механизмов) также остается от-

*) Недавно появилась новая работа, авторы которой получили совпадение спектральных [и радиоспектроскопических измерений [188].

крытым. Здесь следует упомянуть и о серии работ по термолюминесценции фотосинтетиков, результаты которых свидетельствуют в пользу реальности полупроводникового механизма, хотя их и нельзя считать однозначным доказательством [190, 191].

§ 7.5. О ТУННЕЛЬНЫХ МЕХАНИЗМАХ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ МЕЖДУ КОМПОНЕНТАМИ ЦЭТ

В § 7.3 были обсуждены экспериментальные данные, указывающие, что темновой перенос электронов между некоторыми соседними компонентами ЦЭТ хлоропластов и хроматофоров может происходить с заметной скоростью даже при 4°K , причем последняя практически не зависит от температуры в довольно широком интервале в области низких температур. Эти результаты, естественно, наводят на мысль о квантовомеханическом туннелировании между соседними носителями в ЦЭТ. Впервые такое предположение высказали, по-видимому, Де Во и Чанс [126], анализируя полученные ими данные о постоянстве скорости переноса электрона от цитохрома на бактериохлорофилл в интервале температур от 130 до 30°K (впоследствии до 4°K). Выше 130°K , однако, скорость реакции зависит от температуры.

Считая, что при неизменных характеристиках барьера данный эффект исключает туннельный механизм переноса при температурах выше 130°K , авторы сделали попытку объяснить наблюдаемую температурную зависимость тепловым расширением потенциального барьера. Эта попытка оказалась неудачной, так как собственные оценки привели авторов [126] к необходимости принять совершенно нереальное значение высоты барьера (4 кэВ). Поэтому в цитируемой выше работе Де Во и Чанс рассматривают экспериментально полученную температурную кривую как результат наложения двух процессов: теплового (надбарьерного) переноса и туннельного переноса, не зависящего от температуры и определяющего его кинетику при низких температурах. Такое объяснение также представляется маловероятным (см. [129]). При этой трактовке высота барьера должна равняться энергии активации электронного переноса в высокотемпературной области, т. е. всего $0,14\text{ эВ}$. Для согласования резуль-

татов измерений в области низких и высоких температур приходится принять, что ширина барьера примерно равна 75 Å. Диаметр молекулы цитохрома не превышает 36 Å, что делает существование столь низкого и широкого барьера по меньшей мере сомнительным.

Уже в 1967 г. Чанс и его сотрудники предложили новое объяснение тех же экспериментальных данных [127]. Основой их объяснения является предположение о том, что процесс окисления цитохрома с переносом электрона на фотоокисленный активный центр (катион бактериохлорофилла) во всей исследованной области температур (от 300 до 4,5° К) проходит по туннельному механизму, но с различных уровней, находящихся в термическом равновесии (например, они постулировали существование одного возбужденного уровня туннелирования, лежащего на 0,14 эв выше основного).

В 1968 г. Гутман [192] показал, что при разумной высоте барьера 1 эв и ширине 21—28 Å туннелирование обеспечивает более высокую скорость электронного транспорта, чем надбарьерный перенос даже при температурах, превышающих комнатную. Подробное теоретическое исследование возможности туннельного транспорта электронов между компонентами ЦЭТ было выполнено в работах Григорова и Чернавского [129, 131]. Дальнейшее изложение следует этим работам (см. также [193]) и носит качественный характер. Более строгие количественные оценки и выводы можно найти в цитированных выше работах.

Следует сразу отметить, что сама концепция туннельного переноса электрона применима только в квазиклассическом приближении, т. е. в тех случаях, когда барьер достаточно высок и, значит, его характеристики мало зависят от присутствия или отсутствия переносимого электрона. Последнее обстоятельство подчеркнуто в критическом выступлении Остерхоффа и Купермана [194] при обсуждении доклада Чанса. Однако для электронного транспорта в ЦЭТ эти условия выполняются. Центры, между которыми переносится электрон, представляют собой достаточно глубокие электронные ловушки (глубиной не менее 1 эв), отделенные друг от друга многими атомами и атомными группами, связанными между собой ковалентными и ван-дер-ваальсовскими связями и содержащими множество электронов, занимающих все доступные ло-

кальные энергетические уровни. Таким образом, наличие или отсутствие переносимого электрона практически не влияет на параметры барьера и ловушек. Взаимным влиянием ловушек (активных центров переносчиков) также можно пренебречь, так как эксперимент показывает, что электронные спектры поглощения переносчиков непосредственно не зависят от электронного состояния соседей. Поэтому в нулевом приближении можно считать, что в каждой ловушке переносимый электрон движется в самоогласованном поле ядер и других электронов, аппроксимировать это поле стабильной (если не считать колебаний атомных групп и конформационных изменений) потенциальной ямой и рассматривать уровни только одного лишнего (приходящего или уходящего) электрона. Более того, можно ограничиться рассмотрением только основного электронного уровня ямы, так как возбужденные электронные уровни активных центров переносчиков лежат обычно значительно выше основных. Поэтому вполне законно говорить в этом случае о локализации электрона, т. е. считать состояние локализованного в одной из потенциальных ям электрона стационарным, а присутствие соседней ямы — слабым возмущением. Можно пользоваться такими понятиями, как прозрачность барьера, частота столкновений электрона со стенкой барьера и т. п.

Итак, рассмотрим задачу о переносе электрона между двумя соседними компонентами ЦЭТ, обладающими сформулированными выше характеристиками, т. е. задачу о переносе электрона между основными электронными уровнями двух потенциальных ям: левой (л) и правой (п).

Для конкретности примем *), что $E_{л}^0 > E_{п}^0$ и перенос идет слева направо (в исходный момент времени электрон локализован в левой яме — левый переносчик восстановлен, а правая яма пуста — правый переносчик окислен). Известная формула для частоты туннельного переноса (в случае прямоугольного барьера)

$$w = w_0 \exp \left(- \frac{2L}{\hbar} \sqrt{2m(u - E^0)} \right), \quad (7.4)$$

где w_0 — частота столкновений электрона со стенкой барьера, L — ширина барьера, u — высота барьера, счи-

*) Верхний индекс нуль означает чисто электронное состояние.

тая от дна ямы, E^0 — уровень энергии электрона и m — масса электрона, в данном случае неприменима: она верна лишь для систем с непрерывным спектром правой (пустой) ямы. Григоров [129] рассмотрел в общем виде задачу о туннельном переносе электрона между ямами с дискретными спектрами типа изображенных на рис. 7.10.

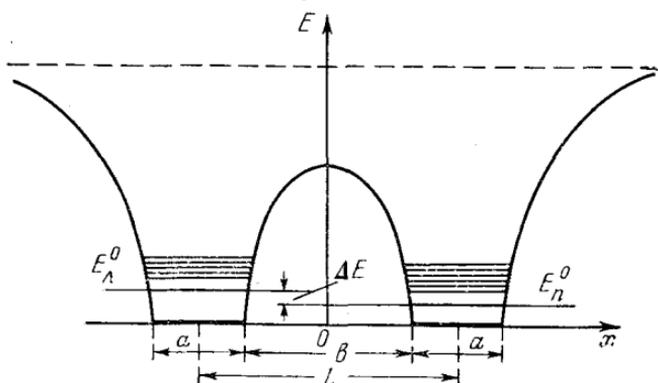


Рис. 7.10. Аппроксимация двух соседних переносчиков ЦЭТ потенциальными ямами, имеющими дискретные спектры.

Группы уровней выше E_L^0 и E_n^0 — колебательные подуровни основного электронного состояния (по [129]).[†]

В случае дискретных спектров при рассмотрении туннельного переноса возникает проблема баланса энергии, если $E_L^0 \neq E_n^0$. Выше мы говорили, что левая и правая ямы практически не взаимодействуют. Слово «практически» означает, что смещение уровней E_L^0 и E_n^0 за счет взаимодействия значительно меньше глубины ямы. Смещение уровней максимально при точном резонансе, когда $E_L^0 = E_n^0$. В этом случае имеет место, собственно, не смещение, а резонансное расщепление ΔE_r , равное

$$\Delta E_r = E^0 \exp\left(-\frac{L}{\hbar} \sqrt{2m(u - E^0)}\right). \quad (7.5)$$

Если разность уровней в левой и правой ямах $\Delta E = E_L^0 - E_n^0$ меньше или равна ΔE_r , то проблемы баланса энергии не возникает. В системе происходят квантовомеханические колебания. Электрон, находившийся первоначально в левой яме, за время $\tau_r = \hbar/\Delta E_r$ переходит

в правую яму, затем через то же время возвращается в левую и т. д. [195]. В среднем по времени электронная плотность равномерно распределена между двумя ямами.

Подставив в уравнение (7.5) разумные значения параметров компонент ЦЭТ, легко убедиться, что $\Delta E_r \sim \sim 10^{-6} \div 10^{-4}$ эв. Трудно представить, чтобы электронные уровни различных переносчиков совпадали с такой точностью (напомним, что для удовлетворения баланса энергии требуется, чтобы $\Delta E = E_d^0 - E_n^0 \leq \Delta E_r$). Если же $\Delta E > \Delta E_r$ и условия резонанса не выполнены, то туннельный перенос может произойти только в том случае, если одновременно реализуется некоторый процесс, компенсирующий энергетический разбаланс.

Туннелирование может в принципе сопровождаться индуцированными молекулярными колебаниями и другими процессами, способными непосредственно «откачивать» избыток энергии. С первого взгляда может показаться, что если учитывать все возможные молекулярные колебания, то энергетический спектр должен быть почти сплошным. Действительно, даже для такой сравнительно простой молекулы, как бензол, плотность колебательных уровней равна около 10^4 эв⁻¹ [196], а в более сложных молекулах она еще выше. Однако огромное большинство этих уровней оказывается комбинированным: почти каждое результирующее колебательное состояние можно представить в виде суперпозиции многих нормальных колебаний. Перенос электрона способен возбудить не любые колебательные степени свободы, а только те, которые «сильно сопряжены» с перемещением заряда. Перенос электрона из левой ямы в правую ведет к изменению равновесных положений соседних заряженных групп и, следовательно, к изменению соответствующих колебательных частот. Степень сопряжения колебательной степени свободы с электронным переносом в первом приближении пропорциональна относительному сдвигу равновесного положения заряженных групп. Поэтому тип спектра (его непрерывность или дискретность) полностью определяется природой групп, непосредственно примыкающих к акцептору или донору электрона (последние фактически образуют правую и левую ямы).

Поскольку, как мы видели выше, в интересующих нас системах ΔE_r очень мало, можно считать, что всегда

$\Delta E \gg \Delta E_T$. В принципе имеются три типа физических процессов, которые могут сделать возможным в этом случае туннельный перенос электрона: 1) рождение фононов; 2) передача энергии колебательным степеням свободы, когда большое число нормальных колебаний сильно сопряжено с переносом электрона; 3) передача энергии колебательным степеням свободы, когда с переносом электрона сильно сопряжены лишь немногие специфические степени свободы.

Решение задачи для туннельных переходов, сопровождающихся рождением и поглощением фононов, было проведено Григоровым [129] с помощью обычных методов квантовой теории излучения. Был получен следующий очевидный результат: этот механизм может играть сколь угодно существенную роль в том случае, когда длина волны фонона имеет порядок размера потенциальной ямы, что для рассматриваемых систем соответствует величинам $\Delta E \leq 10^{-3} \text{эВ}$, т. е. отвечает уже обсужденному варианту случайного резонанса уровней.

Возбуждение нормальных колебаний при процессе типа 2) возможно тогда, когда окружение ямы содержит большое число заряженных или полярных групп, что имеет место, например, при переносе электрона между ионами переменной валентности в растворах электролитов (см., например, [197—199]). Фактически процесс типа 2) сводится к поляризации среды и напоминает образование полярона. Ситуация полностью аналогична случаю сплошного спектра, и туннелирование может происходить при любой разнице между E_d и E_n . Избыток энергии ΔE в этом случае, как и при процессе типа 1), диссипирует.

Электронные ловушки компонент ЦЭТ встроены в белково-липидные мембраны и не контактируют непосредственно с водной электролитной средой клетки. Поэтому процессы типа 2) вряд ли играют важную роль в биологическом электронном транспорте. Вероятно, определяющее значение имеют процессы типа 3), когда потенциальные ямы отделены от ионной среды неполярной оболочкой и вблизи места локализации переносимого электрона может находиться только небольшое число заряженных групп. Лишь немногие нормальные колебания в этом случае могут быть сопряжены с электронным переносом, и колебательный спектр должен считаться дискретным.

Возможны два различных механизма передачи энергии, освобождающейся при электронном переносе, колебательным степеням свободы: возбуждение колебательного кванта в правой яме в результате переноса электрона и термическое возбуждение изменения колебательной частоты до переноса электрона.

Вероятность первого процесса не зависит от температуры, вероятность второго пропорциональна вероятности термического возбуждения данного колебательного кванта до переноса электрона и поэтому должна экспоненциально зависеть от температуры. Естественно, первый процесс должен преобладать при низких, а второй — при высоких температурах.

Условие баланса энергии для первого процесса имеет вид

$$\Delta E = \hbar\omega_K = E_K, \quad (7.6)$$

а для второго — вид

$$\Delta E = \Delta E_K = \hbar\Delta\omega_K. \quad (7.7)$$

Здесь ω_K — частота возбуждаемого колебательного кванта, а $\Delta\omega_K = \omega_K - \omega'_K$ — разность между «новой» ω_K и «старой» ω'_K колебательными частотами. Спектральные данные показывают, что для молекул, аналогичных активным центрам переносчиков ЦЭТ,

$$E_K \sim \Delta E_K \sim 0,1 \text{ эв}. \quad (7.8)$$

Время жизни колебательных возбужденных состояний молекул составляет $10^{-12} - 10^{-13}$ сек. За это время колебательное возбуждение затухает, отдавая энергию фононам. Для неопределенности энергии колебательного кванта имеем поэтому $\Gamma \sim 10^{-2} - 10^{-3}$ эв, и для соблюдения баланса энергии не требуется точного выполнения условий (7.6) и (7.7). Если бы для переноса было необходимо строгое их выполнение, то вероятность переноса была бы пропорциональна $\delta(\Delta E, E_K)$ или $\delta(\Delta E, \Delta E_K)$. Теперь же вместо δ -функций появляются множители

$$\frac{\Gamma}{(\Delta E - E_K)^2 + \Gamma^2} \quad \text{или} \quad \frac{\Gamma}{(\Delta E - \Delta E_K)^2 + \Gamma^2} \quad (7.9)$$

(см. [129]). Эти множители максимальны в условиях резонанса, т. е. при выполнении (7.6) и (7.7).

Таким образом, можно ожидать, что туннельный перенос электрона между соседними компонентами ЦЭТ будет эффективен в тех случаях, когда разность энергий их основных электронных уровней составит примерно $0,1 \pm 0,1$ эв. В работах [129, 131] показано, что теория, развитая на основании изложенных представлений, способна вполне удовлетворительно описать известные экспериментальные данные по кинетике электронного переноса между соседними центрами ЦЭТ при высоких и низких температурах. При выборе разумных характеристик компонент ЦЭТ туннельный механизм переноса электрона обеспечивает несравненно более высокую скорость переноса, чем надбарьерный, которым поэтому можно пренебречь.

Принятие туннельного механизма переноса электронов в качестве основного при рассмотрении функционирования ЦЭТ мембранных структур митохондрий и хлоропластов не исключает возможности диффузионного сближения ряда переносчиков до расстояний, при которых становится реальным туннельный перенос.

Разность электронных уровней соседних переносчиков в принципе должна быть близка к разности их окислительно-восстановительных потенциалов. Для многих участков ЦЭТ требования (7.6), (7.7) и (7.8) удовлетворяются. Однако иногда эта разность значительно превышает $0,1$ эв. Так, например, на участках ЦЭТ, на которых реализуется сопряжение электронного переноса с фосфорилированием (см. ниже гл. 8), ΔE должна превышать $0,5$ эв. При такой ее величине туннельный перенос (как и надбарьерный) становится маловероятным и не может обеспечить наблюдаемых скоростей электронного транспорта. Следует помнить, однако, что значения окислительно-восстановительных потенциалов макромолекул переносчиков относятся к энергиям системы в равновесном состоянии. Но, как мы видели в гл. 5, равновесные конформации переносчика в присутствии электрона (активный центр восстановлен) и в его отсутствие (активный центр окислен) могут сильно отличаться друг от друга и переход между двумя конформациями происходит сравнительно медленно. Таким образом, после переноса электрона большая часть молекулы акцептора окажется в неравновесной конформации, которая медленно релаксирует к равновесной. В этом

случае условием туннельного переноса является не совпадение (с точностью до $0,1 \text{ эв}$) электронных уровней восстановленного донора и восстановленного акцептора в их равновесных конформациях, а наличие соответственно расположенного электронного уровня акцептора в окисленной конформации. Энергия, освобождающаяся при туннелировании, всегда диссипирует, но энергия, медленно освобождающаяся при релаксационном переходе в новое конформационное состояние, может использоваться. (Подробнее см. ниже, в гл. 8.)

Не следует думать, что все проблемы, возникающие при рассмотрении физических механизмов электронного переноса в биологических структурах, в принципе уже решены. Более или менее точные кинетические данные в широком интервале температур получены лишь для нескольких конкретных процессов переноса в фотосинтезирующих объектах (в основном в бактериях). Теория еще далека от совершенства: она носит качественный характер, а грубость количественных оценок не позволяет относиться к ним с полным доверием.

О противоречивости многих экспериментальных кинетических и термодинамических результатов исследований ЦЭТ митохондрий уже шла речь в § 7.3. Короче говоря, эта область биологической физики представляет собой благодарное поле деятельности для ученых самых различных специальностей, от теоретической физики до биологической химии.

ФИЗИКА ТРАНСФОРМАЦИИ И АККУМУЛЯЦИИ ЭНЕРГИИ В КЛЕТКЕ

§ 8.1. ВВЕДЕНИЕ

Проблема трансформации и аккумуляции энергии в клетке — одна из центральных проблем биологической физики — имеет множество аспектов. Первоначальными источниками энергии для всех существующих на Земле живых организмов служат либо солнечный свет (для растений и фотосинтезирующих бактерий), либо энергия, выделяющаяся при химических превращениях (главным образом при окислении) ряда веществ — пищи. Эта энергия трансформируется, аккумулируется и затем используется для обеспечения многочисленных процессов, связанных с жизнедеятельностью. В их число входят: синтез новых низко- и высокомолекулярных соединений, создание неравновесного распределения ионов и других низкомолекулярных частиц в гетерогенных тканевых и внутриклеточных структурах, механическое движение, свечение и т. д. Со времени пионерской работы Липманна [1] начало распространяться и постепенно стало почти общепринятым представление о том, что универсальным «хранителем энергии», универсальной энергетической «разменной монетой» в биологических системах служат молекулы аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), причем гидролитическое отщепление от них концевой фосфорной группы с образованием молекул аденозиндифосфорной кислоты (АДФ) и неорганического ортофосфата в водной среде сопровождается довольно значительным понижением энергии системы. Если это действительно так, то центральным пунктом проблемы трансформации и аккумуляции энергии в биологии является вопрос о механизме синтеза АТФ из АДФ и неорганического фосфата (P_H) за счет указанных выше первоначальных источников энергии. В последние годы, однако, на страницах ряда журналов вновь разгорелась оживленная дискуссия по поводу того, можно ли считать АТФ хранителем энергии. Дискуссия часто

носит терминологический и несколько наивный характер, но, несмотря на это (а может быть, именно поэтому), ее анализ может оказаться весьма полезным для постановки некоторых принципиальных вопросов. В § 8.2 при рассмотрении понятия макроэргической связи, а также физического смысла утверждений типа «энергия запасается в форме макроэргических сложноэфирных связей с повышенным значением свободной энергии гидролиза» и «полезная работа осуществляется за счет энергии, освобождающейся при гидролизе АТФ» мы остановимся и на материалах этой дискуссии.

При чтении многих монографий и обзоров, посвященных механизму образования АТФ, может сложиться впечатление, что процессы субстратного фосфорилирования, т. е. синтеза АТФ в ходе отдельных ферментативных реакций при гликолизе, в принципе понятны (хотя иногда и не хватает знаний конкретных химических деталей) и главной загадкой остаются механизмы образования АТФ в мембранных структурах, т. е. процессы окислительного или фотосинтетического фосфорилирования. Одна из существующих концепций фосфорилирования в мембранах — химическая концепция — утверждает, что решение проблемы заключается в нахождении конкретных промежуточных фосфорилированных продуктов в конкретных пунктах сопряжения, т. е. в сведении задачи о фосфорилировании в мембране к «уже решенной и вполне понятной» задаче о механизме субстратного фосфорилирования. Однако внимательное рассмотрение показывает, что физические принципы сопряжения энергодонорной и энергоакцепторной реакций при субстратном фосфорилировании ничуть не более и не менее понятны, чем соответствующие принципы для фосфорилирования в мембранах.

Поэтому в § 8.3 будут представлены экспериментальные данные, относящиеся к проблеме субстратного фосфорилирования, и обсуждены возможные физические механизмы этого процесса. В § 8.4 будут приведены основные данные по синтезу АТФ в мембранных структурах митохондрий и хлоропластов, а в § 8.5 — рассмотрены существующие теоретические представления о механизме этого процесса. Наконец, в § 8.6 будет сформулирован возможный новый подход к проблеме трансформации и аккумуляции энергии в клетке.

§ 8.2. ПРОБЛЕМА АТФ

Во всех учебниках биохимии, в многочисленных монографиях и обзорах подробно рассказывается о роли АТФ в химических превращениях веществ при биоэнергетических процессах в клетке. Если попытаться суммировать все, что говорится по этому поводу, то можно сформулировать следующие, практически общепринятые утверждения.

1. Внутриклеточные химические процессы, идущие с понижением энергии (обычно говорят: с понижением свободной энергии), обеспечивают синтез АТФ из АДФ и ортофосфорной кислоты:

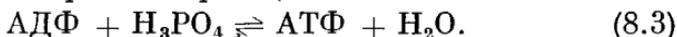


2. Процессы, идущие с повышением энергии, происходят за счет гидролиза АТФ *):



Не имеет смысла приводить здесь конкретные примеры, доказывающие эти утверждения. Их можно найти в ряде обстоятельных монографий (см., например, [2, 3]) и в прекрасной подборке оригинальных статей в сборнике, изданном Калькарсом [4].

По поводу реакций (8.1) и (8.2) следует сделать несколько замечаний. Легко видеть, что реакция синтеза АТФ (8.1) представляет собой обращение реакции гидролиза АТФ (8.2). Тем не менее они записаны отдельно, а не в форме одной обратимой реакции:



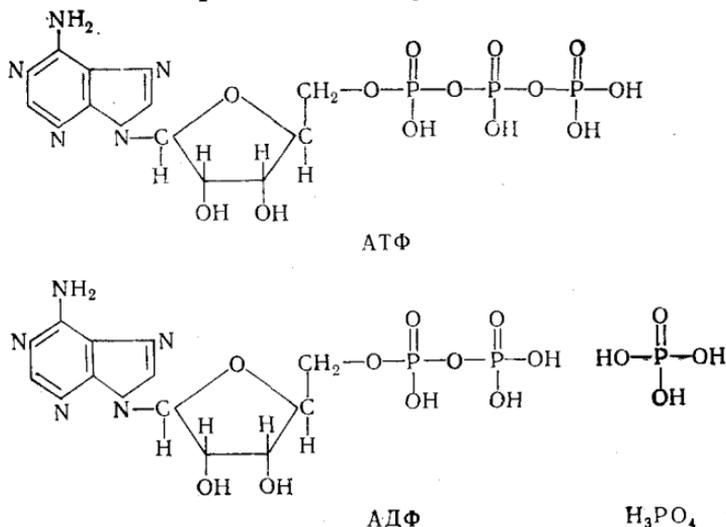
Это сделано не потому, что процессы (8.1) и (8.2) в принципе необратимы. В каждом конкретном случае фермент (или ферменты), ускоряющий реакцию (8.1), в равной мере, естественно, ускоряет и реакцию (8.2), однако конденсация (8.1) и гидролиз (8.2), как правило, локализованы в разных местах и катализируются в клетке разными ферментами, при разных локальных концентрациях ионов, существенно влияющих на скорости реакций. Поэтому

*) Вообще говоря, в ряде процессов гидролизу может подвергаться не конечная макроэргическая связь в АТФ, а макроэргическая связь, гидролиз которой приводит к образованию аденозинмонофосфорной кислоты (АМФ) и пиррофосфорной кислоты: $\text{АТФ} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{АМФ} + \text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$. Существование двух путей гидролиза АТФ, вероятно, играет важную биохимическую роль [5], но не вносит никаких изменений в последующее рассмотрение. Поэтому в дальнейшем мы не будем касаться этого вопроса.

в целой клетке идет, по существу, множество различных реакций (8.1) и множество различных реакций (8.2), для каждой из которых можно написать свое уравнение (8.3). Стрелки в (8.1) и в (8.2) отражают не то обстоятельство, что эти реакции необратимы, а то, что они реализуются в условиях, когда в каждом конкретном случае локальное исходное состояние системы (АТФ, АДФ, H_3PO_4 и H_2O) сдвинуто влево от равновесного.

Второе замечание также касается условности формы записи уравнений (8.1) — (8.3). Каждая из компонент, участвующих в этих реакциях, может находиться в различных состояниях ионизации. Ограничимся пока рассмотрением термодинамических аспектов проблемы. Иными словами, временно забудем о существовании различных конкретных механизмов, связанных с различиями ферментов, катализирующих процессы (8.1) и (8.2), и локальных условий протекания последних, а будем обсуждать некое конкретное равновесие (8.3), положение которого принципе не зависит от наличия фермента *). Учитывая вышесказанное, запись (8.3) можно понимать двояко.

В первом случае АДФ, АТФ и H_3PO_4 означают соответствующие нейтральные молекулы, т. е.



*) При условии, конечно, применимости понятий равновесной термодинамики. Вопрос об их применимости в данном случае будет рассмотрен ниже.

В этом случае (8.3) относится к одному из множества частных химических равновесий, устанавливающихся в системе АТФ, АДФ, Φ_n в водной среде, а соответствующая измеряемая константа равновесия реакции гидролиза

$$K = \frac{a_{\text{АДФ}} \cdot a_{\text{H}_3\text{PO}_4}}{a_{\text{АТФ}}} \quad (8.4)$$

является истинной константой равновесия данной частной реакции. В (8.4) символом a_i обозначена активность соединения i в водной фазе в равновесии. Константа K , естественно, относится к процессу (8.3), при котором исходные и конечные продукты растворены в одной и той же водной среде (одинакового ионного состава), и не зависит от пути реакции. Как обычно, с K однозначно связана стандартная свободная энергия процесса

$$\Delta F^0 = -RT \ln K, \quad (8.5)$$

являющаяся функцией температуры и ионной силы.

Во втором случае символы АДФ, АТФ и H_3PO_4 означают все состояния ионизации соответствующих молекул (а иногда и их соли с ионами Mg^{2+} , Ca^{2+} и т. д.). Тогда величина

$$K_{\text{набл}} = \frac{a_{\text{АДФ}} \cdot a_{\text{H}_3\text{PO}_4}}{a_{\text{АТФ}}} \quad (8.6)$$

не является истинной константой равновесия какой-либо частной реакции, а сложным образом выражается через истинные константы разных частных реакций. Равным образом, величина

$$\Delta F^0_{\text{набл}} = -RT \ln K_{\text{набл}} \quad (8.7)$$

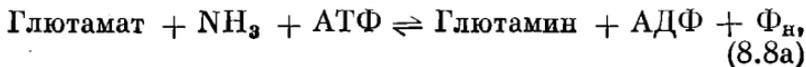
имеет смысл изменения свободной энергии системы при единичных суммарных активностях всех форм АТФ, АДФ и неорганического фосфата в среде, причем это изменение рассчитано на 1 моль гидролизующейся АТФ во всех имеющихся состояниях. Величина (8.7) зависит от температуры, ионной силы, рН и ионного состава среды.

В данной главе (если специально не оговаривается обратное) константу равновесия процесса (8.3), а также стандартную свободную энергию гидролиза АТФ мы всегда будем понимать во втором смысле, т. е. иметь дело с эф-

фективными наблюдаемыми величинами. В какой мере последние отвечают энергетике реальных процессов в клетке, будет ясно из дальнейшего, однако если какие-либо равновесные термодинамические характеристики реакций (8.1) и (8.2) и имеют непосредственное, прямое отношение к биоэнергетике, то это только эффективные величины.

Непосредственное измерение значений (8.6) и (8.7) весьма затруднительно, так как равновесие в процессе (8.3) практически полностью сдвинуто влево и $K_{\text{набл}}$ превышает 10^5 и, следовательно, при любых разумных концентрациях АДФ и ортофосфата равновесие устанавливается при исчезающе малых количествах АТФ. Поэтому обычно величины (8.6) и (8.7) находят косвенным путем, измеряя константы равновесия нескольких процессов, алгебраическая сумма которых дает процесс (8.3). При таких расчетах предполагается, что измеряются истинные равновесные, а не стационарные состояния, а это накладывает ограничения на характерные времена процессов (см. § 3.1). Кроме того, допускается применимость закона действующих масс ко всем рассматриваемым реакциям, что, в соответствии с гл. 5, требует отсутствия белков в конечных и начальных продуктах.

Наиболее полные данные представлены в двух последних работах [6, 7]. В обеих работах использованы данные по равновесию ферментативного синтеза глутамина из глутамата и аммиака с участием АТФ и ферментативного гидролиза глутамина:



Очевидно, для интересующей нас величины получим $K_{\text{набл}} = K_a \cdot K_b$, где K_a и K_b — константы равновесия реакций (8.8a) и (8.8b) соответственно.

Альберти [8, 9] использовал результаты, найденные в работе [10], и построил контурные диаграммы для $\Delta F_{\text{набл}}^0$ гидролиза АТФ как функции рН и рMg. В уже цитированной работе [6] Шикама распространил эти расчеты на системы с различными концентрациями ионов Ca^{2+} .

В недавно опубликованном детальном исследовании Розинг и Слейтер [7] пересмотрели ранее полученные результаты. С помощью прямых тщательно выполненных измерений они показали, что использованное во всех предыдущих расчетах значение K_a завышено примерно в 5 раз. Они исправили также величину константы устойчивости комплекса ионов Mg^{2+} с глютаматом, входящую в расчет, учли связывание ионов K^+ , АТФ, АДФ и Φ_n , а также ввели поправки на коэффициенты активности реагентов. По-видимому, полученные ими численные значения термодинамических параметров обратимого гидролиза АТФ наиболее надежны из всех известных в настоящее время.

При физиологических условиях концентрации АТФ и АДФ можно принять приблизительно равными друг другу, а концентрацию Φ_n — порядка 10^{-2} — 10^{-3} М. Поэтому реальные абсолютные значения ΔF гидролиза (или синтеза) одного моля АТФ в клетке должны быть больше стандартных величин ΔF^0 .

Как правило, абсолютные значения стандартных свободных энергий гидролиза эфиров ортофосфорной кислоты меньше величин, приведенных в [7] для реакции (8.3). Так, ΔF^0 гидролиза глюкозо-6-фосфата составляет всего 3 ккал/моль. Однако существуют и промежуточные случаи (см., например, [11]), так что деление органических фосфорных эфиров на богатые и бедные энергией, на макроэрги и микроэрги, в известной мере условно. Тем не менее то обстоятельство, что АТФ и АДФ относятся к классу фосфорных эфиров с повышенным (по сравнению с большинством) абсолютным значением свободной энергии гидролиза, имеет прямое отношение к функционированию этих соединений, а поэтому я считаю термины «макроэрг» и «макроэргическая связь» вполне оправданными. В упоминавшейся выше дискуссии концепции макроэргических связей (или соединений), а также представления о том, что АТФ является хранителем энергии в клетке, были подвергнуты ожесточенной критике главным образом в работах Бэнкс и Вернона [11—15]. Все критические высказывания подробно обсуждались в статьях [16—19]. В этой дискуссии были затронуты некоторые принципиальные вопросы биоэнергетики.

Прежде всего о понятии *макроэргическая связь*. Мы будем вести обсуждение, пользуясь обычной термодинамической терминологией, а именно понятиями свободной энергии и энтропии. Вопрос о законности такой терминологии в конкретных случаях будет рассмотрен ниже. Еще в первой критической статье Гиллеспи, Моу и Вернон [12] утверждали, что термины «макроэргическая связь» или «богатая энергией связь» лишены смысла, так как, во-первых, речь идет не о более сильных, а о более слабых связях (реакция гидролиза сопровождается понижением, а не повышением свободной энергии), а во-вторых, ΔF^0 — стандартное изменение свободной энергии — относится не к связи, а к процессу. Рассуждения подобного типа довольно широко распространены в литературе (см., например, [20, 21]). Мне они представляются ложными. Физический смысл понятия «богатое энергией соединение» заключается в следующем: для данной системы в данном состоянии (например, АТФ в водной среде) существует в принципе кинетически доступное состояние ($АДФ + \Phi_n$ в водной среде), характеризующееся более низким уровнем свободной энергии. Изменение энергии при переходе от первого состояния ко второму больше среднего изменения для известного ряда аналогичных процессов. Начиная с Липманна, никто не вкладывал в понятие макроэргичности другого содержания. Утверждение о запасании энергии в АТФ ничем не отличается от утверждения, что энергия запасена в поднятом грузе и может быть использована при его переходе на более низкий по высоте, кинетически доступный уровень, или о том, что энергия запасена в смеси $2H_2 + O_2$ и может быть использована, если создать условия для перехода смеси в новое, в принципе кинетически доступное состояние ($2H_2O$) с более низким уровнем свободной энергии (например, если инициировать цепную реакцию горения водорода повышением температуры). Кинетическая устойчивость АТФ (в отсутствие соответствующих ферментов), груза (пока под ним есть твердая опора) и смеси водорода с кислородом (пока температура при данном давлении не достигла первого предела воспламенения) не имеет никакого отношения к существу дела. Конечно, отнесение энергии системы к одной связи (макроэргическая связь) условно и имеет только тот смысл, что в процессе

перехода от состояния с повышенной свободной энергией в состояние с более низкой свободной энергией гидролизу подвергается именно данная связь. Никто из серьезных исследователей никогда и не вкладывал в это отнесение другого смысла. Понятие «энергия связи» в химических соединениях всегда более или менее условно. Так, например, изменение энергии при реакции образования метильного радикала из метана $\text{CH}_4 \rightarrow \text{CH}_3 + \text{H} \cdot$ часто называют энергией связи С—Н, хотя в ходе этого процесса не только рвется двухэлектронная связь С—Н, но и происходит перестройка всего остатка молекулы с изменением распределения электронной плотности, валентных углов и межъядерных расстояний.

Можно в принципе дать другое определение энергии связи С—Н в метане, а именно считать ее равной одной четверти энергии, выделяющейся при синтезе молекулы CH_4 в газовой фазе *) в результате протекания гипотетической реакции между атомами С и Н: $\text{C} + 4\text{H} \rightarrow \text{CH}_4$. Естественно, величина энергии связи С—Н будет в этом случае отличаться от измеренной по первому способу.

Таким образом, терминологическая часть критики представлений современной биоэнергетики, содержащаяся в цитированных выше работах Бэнкс, Вернона и др., не представляется серьезной. Любое утверждение и термин могут привести к недоразумениям, если их неправильно понимать. Физики прекрасно пользуются термином «сила тока», не заботясь о том, что эта сила не имеет никакого отношения к силе в ньютоновском смысле.

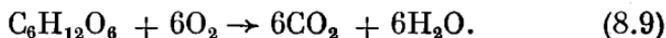
При рассмотрении понятия макроэргических фосфорноэфирных связей можно поставить вопрос о причинах их макроэргичности, т. е. о причинах того, что абсолютная величина свободной энергии гидролиза этих связей больше среднего значения для близких по структуре соединений. Ответу на такой вопрос посвящено довольно много работ (см. [21—23]).

Ни сама проблема, ни ее решение не представляют сколько-нибудь принципиальными. С одной стороны,

*) Определить энергию этого процесса можно, например, термодинамически, подобрав соответствующий цикл Гесса.

проблема эта ничем не отличается от огромного количества аналогичных задач структурной химии, а с другой — отличия в несколько *ккал/моль* в энергиях превращений столь сложных молекул не поддаются достоверной оценке в рамках существующих приближенных квантовомеханических методов расчета многоэлектронных и многоцентровых систем. Поэтому выяснение путем расчета причин макроэргичности, во-первых, неинтересно, а во-вторых, пока невозможно.

Довольно много места в критике основных представлений биоэнергетики, содержащейся в статьях [11—13], уделено следующим рассуждениям: реакции (8.1) и (8.2) «на самом деле» в клетке не идут, и поэтому нельзя говорить, что энергия, освобождающаяся в ходе какого-то другого процесса, запасается в результате протекания реакции (8.1), а энергия, освобождающаяся в ходе реакции (8.2), обеспечивает протекание некоего эндэргонического процесса (например, мышечного сокращения). Смысл критики заключается в том, что истинный механизм процесса, как правило, неизвестен и выделение стадий (8.1) или (8.2) условно. Это совершенно справедливо, но не имеет отношения к делу. Рассмотрим следующий пример. Пусть в некоторой совокупности клеток в водной среде окисляется 1 *моль* глюкозы:



Это уравнение не описывает какую-либо элементарную химическую реакцию, действительно протекающую в клетке. Оно представляет собой условную запись, означающую следующее: сложный суммарный процесс окисления глюкозы в клетке, идущий через множество стадий с участием самых различных низко- и высокомолекулярных соединений, можно провести так, что в конечном счете исчезновению каждой молекулы глюкозы будет соответствовать исчезновение 6 молекул кислорода и образование 6 молекул двуокиси углерода и 6 молекул воды. До начала процесса в водной фазе была первая система: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$, после его окончания — вторая система: $6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$. Если клетки находятся в стационарной фазе развития, то после окончания процесса они останутся неизменными. С достаточной степенью точности процесс можно считать изотермическим и изохорическим.

Поэтому максимальная полезная работа, которую в принципе может совершить система в результате превращения (8.9), должна равняться разности свободных гельмгольцевских энергий первой и второй систем в водной среде *), т. е. $\Delta F = F_1 - F_2$. Как известно, в водной среде в стандартных условиях $\Delta F^0 \approx 680$ ккал/моль.

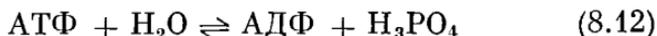
Вместе с тем окисление 1 моля глюкозы в клетке можно в принципе провести в таких условиях, чтобы единственным суммарным химическим процессом (кроме (8.9)) был процесс образования 36 молей АТФ из АДФ и Φ_n по схеме (8.1), сопровождающийся повышением свободной энергии на 324 ккал/моль; будем считать, что ΔF гидролиза одного моля АТФ составляет в клетке около 9 ккал/моль.

В данном случае к.п.д. процесса будет равен примерно 48%. Можно сказать, что энергия, ранее запасенная в системе $C_6H_{12}O_6 + 6O_2$, теперь частично перешла в систему АТФ + H_2O , причем только эта недиссипировавшая часть энергии может в принципе использоваться для совершения полезной работы.

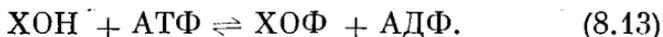
В работе [13] Бэнкс утверждает, что в большинстве случаев бессмысленно говорить о реализации некоторого эндэргонического процесса за счет энергии гидролиза АТФ. В числе прочих она рассматривает процесс синтеза



Обычно его представляют в виде суммы реакций



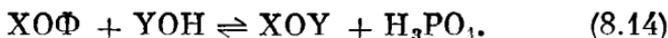
и говорят, что эндэргоническая реакция (8.11) протекает за счет экзэргонической реакции (8.12). Однако, подчеркивает Бэнкс, гидролиз АТФ «на самом деле» в системе не идет, а АТФ, по-видимому, играет роль фосфорилирующего агента, т. е.



Конечный продукт XOY образуется, вероятно, в результате

*) Вопрос о законности использования понятий равновесной термодинамики в этом случае будет рассмотрен ниже.

реакции



Таким образом, процесс (8.10) можно с большим правом представить в виде суммы реакций (8.13) и (8.14), чем в виде суммы (8.11) и (8.12). Непонятно, отмечает Бэнкс, зачем пользоваться для объяснения энергетики процесса реакцией (8.12), которая при правильном функционировании АТФ не происходит?

Как ни логичны с первого взгляда эти рассуждения, они неправильны. Прежде всего, реакции (8.13) и (8.14) столь же мало отражают действительность, как и реакции (8.11) и (8.12). Детали механизма суммарного процесса (8.10) неизвестны, но он во всяком случае идет через множество промежуточных стадий, в которых принимают участие молекулы фермента, испытывающие при этом химические и конформационные превращения. Однако до тех пор, пока работает приближение равновесной термодинамики, т. е. до тех пор, пока свободная энергия является функцией состояния, а ее изменение не зависит от пути процесса, энергетика суммарной реакции не зависит от ее механизма. Это означает, что процесс (8.10) можно с *одинаковым правом* разбивать на какие угодно стадии, лишь бы их алгебраическая сумма давала (8.10). Выделение стадии (8.11) вполне естественно: в результате суммарного процесса (8.10) происходит конденсация остатков X и Y с образованием ХОУ, которая сама по себе требует затраты энергии. Мы видим, однако, что суммарный процесс (8.10) энергетически выгоден, так как при таком выборе первой стадии дополнительной обязательно становится стадия (8.12), отвечающая значительному понижению свободной энергии. Таким образом, если спросить, почему в результате суммарного процесса (8.10) может реализоваться энергетически невыгодная конденсация X и Y с образованием ХОУ, то единственным правильным (в рамках равновесной термодинамики) ответом будет: потому, что «дополнительной» (до суммарного процесса) стадией в этом случае является энергетически выгодный гидролиз АТФ. Выбор обратимого гидролиза АТФ (т. е. реакции (8.12)) в качестве обязательной стадии при термодинамическом рассмотрении биохимических процессов оправдан именно тем, что она оказывается универ-

сальной и удобной при анализе самых различных процессов — от конденсации типа (8.10) до мышечного сокращения и активного транспорта. В этом выборе и заключается значение первой работы Липманна [1], который заложил основы классификации и рассмотрения с единой точки зрения огромного количества внутриклеточных реакций и превратил, таким образом, необозримый хаос разрозненных фактов в стройное здание современной биохимии. Объективной предпосылкой удачности подобного выбора является, конечно, то обстоятельство, что АТФ — участник (т. е. входит в число исходных или конечных продуктов) множества различных биохимических реакций.

Естественно, сильная сторона термодинамического рассмотрения, его общность и универсальность, становится одновременно и причиной его ограниченности. Термодинамика может лишь запретить или разрешить некоторый суммарный процесс, но не предсказать кинетическую возможность его реализации. Термодинамическое рассмотрение не может дать деталей механизма того или иного процесса именно потому, что оно основано на представлении о потенциалах, не зависящих от пути.

Вполне достаточно того, что термодинамический подход позволил сформулировать идеи, лежащие в основе современной классификации биохимических реакций, и делать выводы о принципиальной возможности или невозможности тех или иных внутриклеточных процессов. Отказываться от выбора гидролиза АТФ (см. (8.12)) в качестве биоэнергетического «стандарта» неразумно не только потому, что любой мыслимый стандарт столь же далек от реальности (или столь же близок к ней), но и потому, что АТФ участвует почти во всех химических внутриклеточных реакциях.

Рассмотрим теперь вопрос о применимости законов равновесной термодинамики к системам, далеким от истинного термодинамического равновесия. По этому поводу авторы работ [11—13] рассуждают следующим образом. В клетке никогда не реализуются равновесия для процессов типа (8.9) или (8.12), формально соответствующих большим численным значениям изменения стандартной свободной энергии. Так, например, для «константы равновесия» реакции окисления глюкозы

($\Delta F^0 \approx 680$ ккал/моль) имеем

$$K = \frac{a_{\text{CO}_2}^6}{a_{\text{O}_2}^6 \cdot a_{\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6}} \approx 10^{195} \text{ моль}^{-1},$$

где a_i — активность i -й компоненты реакции. При любых мыслимых условиях равновесие может установиться лишь после окисления практически всей глюкозы. Поэтому в клетке окисление глюкозы происходит в условиях, далеких не только от равновесия, но и от условий, при которых выполняются онзагеровские соотношения. Таким образом, понятия равновесной термодинамики, в том числе и понятие свободной энергии как функции, определяющей максимальную полезную работу, которую может произвести система, становятся лишними смысла.

Это рассуждение ошибочно. Если бы оно было верно, то законы равновесной термодинамики нельзя было бы применить, например, при рассмотрении электрохимических процессов, в частности при выводе формулы Нернста для э.д.с. гальванического элемента. Действительно, в элементе Даниэля, например, реализуется суммарный химический процесс $\text{Zn} + \text{Cu}^{2+} \rightleftharpoons \text{Cu} + \text{Zn}^{2+}$ с $\Delta F^0 \approx \approx 25$ ккал/моль, что соответствует значению константы равновесия $K \approx 2 \cdot 10^{18}$.

Это означает, что истинное термодинамическое равновесие установится тогда, когда концентрация ионов Zn^{2+} примерно в 10^{18} раз превысит концентрацию ионов Cu^{2+} , т. е. тогда, когда практически весь металлический цинковый электрод растворится, а медь осядет в виде металла на медном электроде. Тем не менее, как хорошо известно, при рассмотрении термодинамики электрохимических процессов с успехом пользуются формулами равновесной термодинамики. Дело в том, что в данном случае неравновесность носит кинетический характер: концентрации ионов Cu^{2+} и Zn^{2+} меняются в системе чрезвычайно медленно по сравнению со временем установления равновесного распределения по всем остальным степеням свободы (см. также гл. 3). Поэтому можно считать, что все процессы в системе протекают обратимо при фиксированных значениях концентраций Zn^{2+} и Cu^{2+} , играющих роль параметров. Совершенно то же можно сказать и о внутриклеточных процессах типа (8.9) и (8.12). Более того, наличие

медленно релаксирующих к равновесию степеней свободы является обязательным условием использования движения системы с участием этих степеней свободы для совершения полезной работы.

Рассмотрим простой пример изотермического расширения идеального газа в пустоту. В тепловом резервуаре находится цилиндр, снабженный герметичной перегородкой, делящей цилиндр на два объема V_1 и V_2 . Перегородка может выдвигаться; трением мы пренебрегаем, материал стенок считаем несжимаемым. До начала эксперимента в объеме V_1 содержится газ под давлением p_1 , удовлетворяющим условию теплового равновесия ($p_1 V_1 = nRT$, где n — число молей газа), в объеме V_2 — вакуум. Выдвинем перегородку, т. е. дадим газу возможность увеличить объем до $V_1 + V_2$. Поскольку газ идеален, процесс является изотермическим, обмена теплом с резервуаром в данном случае нет. В новом состоянии объем газа составляет $V_1 + V_2$ и давление $p_2 = p_1 V_1 / (V_1 + V_2)$. Внутренняя энергия системы не изменилась, так как газ считается идеальным, температура осталась той же, а перегородка была передвинута горизонтально. Энтропия системы увеличилась на $nR \ln (V_1 + V_2) / V_1$. Хотя свободная энергия системы понизилась на $nRT \ln (V_1 + V_2) / V_1$ (связанная энергия), полезная работа совершена не была.

Проведем теперь тот же процесс изотермического расширения другим способом, изменив конструкцию устройства. Вместо перегородки установим поршень, который для простоты считаем невесомым, и пренебрегаем его трением со стенками. На поршне установлен груз с такой массой M_1 , что

$$gM_1/A = p_1 = nRT/V_1,$$

где g — ускорение силы тяжести, A — поверхность поршня. Заменяем (мгновенно) груз M_1 на меньший груз M_2 ($gM_2/A = p_2 = nRT/(V_1 + V_2)$). Система выйдет из равновесия, газ изотермически (теперь уже из-за обмена теплом с резервуаром) расширится, и поршень в конце концов поднимется на h и займет новое равновесное положение. Как и в первом случае, в новом состоянии газ будет иметь температуру T , объем $V_1 + V_2$ и давление p_2 . Однако внутренняя энергия всей системы повысилась на $\Delta U = M_2 gh$, так как в результате процесса входящий в систему груз M_2

был поднят на высоту h . Если же не включать в систему груз M_2 , то можно сказать, что система произвела полезную работу M_2gh . Количество тепла, полученное от резервуара и равное

$$Q = M_2gh,$$

пошло на совершение полезной работы. Мы провели процесс не оптимальным образом, так как мгновенно уменьшили груз, заменив M_1 на M_2 .

Если уменьшать груз постепенно, ожидая каждый раз установления равновесия, то система сможет забрать от резервуара и превратить в полезную работу большее количество тепла, равное в пределе при достаточно медленном уменьшении груза (от M_1 до M_2)

$$nRT \ln (M_1/M_2) \equiv nRT \ln [(V_1 + V_2)/V_1].$$

Чем, в сущности, отличается второй способ проведения процесса от первого? Если не включать в систему поднимаемый груз, то исходное и конечное состояния системы в обоих случаях идентичны. Однако в первом случае понижение свободной энергии не использовано. Во втором случае полученное тепло использовано для совершения полезной работы (поднятия груза). Это произошло благодаря изменению конструкции системы. Появилась возможность возбудить степень свободы, которая чрезвычайно медленно обменивается энергией с другими степенями свободы системы. Кроме того, движение с участием этой степени свободы происходит настолько медленно, что в каждый момент времени успевает установиться равновесное распределение энергии по всем остальным степеням свободы.

В нашем случае такая выделенная степень свободы соответствует механическому движению поршня с грузом вдоль оси цилиндра. Эта механическая степень свободы практически не взаимодействует с другими степенями свободы системы, и энергия (потенциальная энергия поднятого груза) может храниться в системе сколь угодно долго (пока груз или поршень не разрушатся). Механизм возбуждения выделенной степени свободы также вполне ясен. Возможность возбуждения определяется конструкцией устройства и тем, что поршень и груз представляют собой твердые тела с жесткими связями между их атомами.

Во всех случаях, когда энергия запасается в форме, способной превращаться в полезную работу, речь всегда идет о возбуждении медленно релаксирующих степеней свободы системы. В этом смысле «молекулярные машины» ничем не отличаются от обычных *). Аккумуляция энергии, освобождающейся при окислении глюкозы, в форме АТФ означает возбуждение медленно релаксирующей степени свободы, соответствующей химическому превращению (8.3) (молекула АТФ устойчива, система $\text{АТФ} + \text{H}_2\text{O}$ отделена от системы $\text{АДФ} + \text{H}_3\text{PO}_4$ высоким кинетическим барьером). Истинная проблема заключается в конкретном механизме возбуждения медленно релаксирующих степеней свободы. Эти механизмы, определяющие процессы внутриклеточной трансформации энергии, будут рассмотрены ниже.

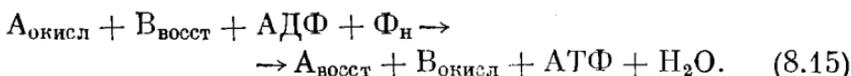
Несколько слов по поводу употребления терминов «свободная энергия» и «полная энергия» при анализе биоэнергетических превращений. Почти все химические процессы в живой клетке протекают в гетерогенной среде. Испытывающие химические превращения низкомолекулярные соединения или активные группы биополимеров в значительной степени лишены свободы перемещений, так как более или менее жестко фиксированы макромолекулярными или мембранными структурами. Поэтому при рассмотрении деталей конкретных механизмов и их энергетики следует в качестве статистических систем принимать отдельные макромолекулы или макромолекулярные комплексы, а состояниями считать различные конформации и конфигурации этих единиц (как было сделано в гл. 4 при рассмотрении статистической термодинамики биополимеров). Поскольку, как правило, превращения энергии в отдельных элементарных внутриклеточных процессах осуществляются в результате движения системы с участием медленно релаксирующих механических степеней свободы, следует пользоваться в таких случаях понятием полной энергии системы, включая в эту энергию параметрически задаваемые энергии взаимодействия со средой.

*) Эти вопросы подробно рассмотрены в статьях Мак-Клара [19, 24]. Он подчеркивает отличие «сохраняемой» (stored) энергии от энергии, легко рассеивающейся в тепло.

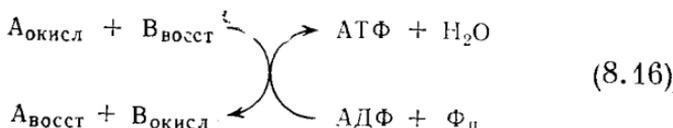
Вместе с тем при рассмотрении суммарных химических превращений, когда можно принять, что исходные и конечные продукты реакции (или группы реакций) находятся в одинаковых условиях, следует, как ясно из изложенного выше, пользоваться понятиями и формулами равновесной термодинамики.

§ 8.3. СУБСТРАТНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

Итак, можно считать АТФ основным энергетическим аккумулятором в клетке. Поэтому физические проблемы биоэнергетики в значительной степени сводятся к проблеме механизма синтеза АТФ из АДФ и фосфата. Практически все процессы, в результате которых в клетке образуется АТФ, можно схематически представить в виде

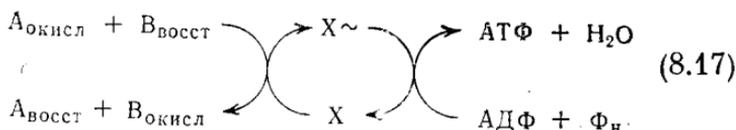


Еще раз следует подчеркнуть, что такая запись представляет собой лишь схему «брутто-процесса», а не уравнение действительно происходящей элементарной химической реакции. Принято изображать (8.15) в форме двух сопряженных реакций [3]:



Смысл этой записи заключается в том, что процесс (8.15) разбивается на два, один из них, окислительно-восстановительный, идет с понижением, а второй, конденсационный, — с повышением энергии системы. Такое разбиение на стадии предполагает, что окислительно-восстановительная реакция сопряжена с кислотно-основной реакцией и делает последнюю термодинамически возможной. Схема (8.16) — не только форма записи. Дело в том, что два процесса, составляющих (8.16), удается разобщить, т. е. провести окислительно-восстановительный процесс, не сопровождаемый образованием АТФ. В этом случае освобождаемая в ходе окислительно-восстановительной реакции энергия рассеивается в виде

тепла. Обычно считают [3], что между окислительно-восстановительной стадией и синтезом происходит дополнительный процесс образования «первичного макроэрга», который и обеспечивает сопряжение двух стадий (8.16); оно записывается следующим образом:



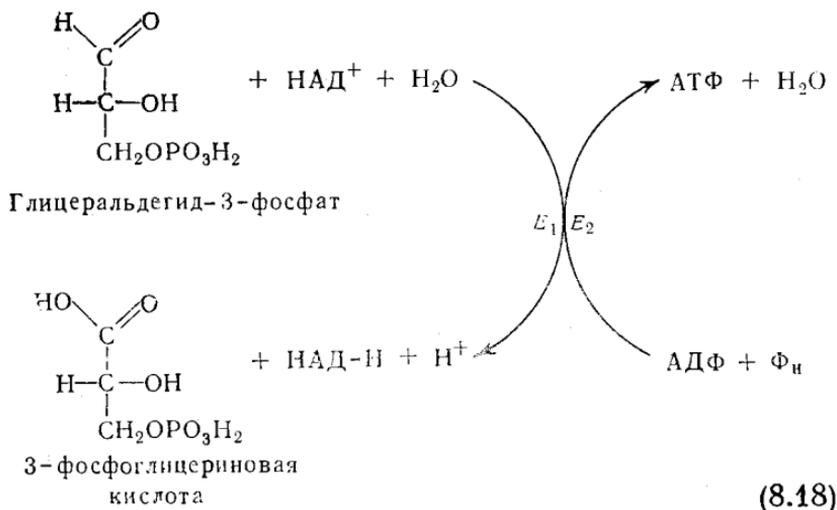
Здесь символ X может означать химическое соединение, способное к превращению в форму с повышенной свободной энергией ($X \rightarrow X \sim$), например, в результате перегруппировки или образования новой химической связи. Этот символ может также означать мембрану, переходящую в новое напряженное состояние (например, в результате конформационного перехода или создания разности концентраций водородных ионов по обе стороны мембраны).

Как уже было сказано в § 8.1, существует два основных типа процессов, в ходе которых синтезируется АТФ: субстратное фосфорилирование и мембранное фосфорилирование. Первый процесс ведут изолированные ферменты, главным образом гликолитические, а мембранное фосфорилирование происходит в организованных мембранных полиферментных структурах (ЦЭТ) митохондрий (окислительное фосфорилирование) и хлоропластов (фотосинтетическое фосфорилирование). В данном параграфе речь будет идти о субстратном фосфорилировании.

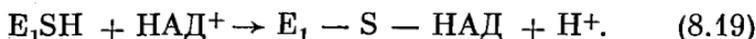
В качестве примера рассмотрим реакцию окисления глицеральдегид-3-фосфата коферментом НАД⁺, катализируемую ферментом глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой (в дальнейшем для краткости мы будем обозначать его через E_1). В присутствии другого фермента — фосфоглицераткиназы (E_2) происходит сопряженный с этим процессом синтез АТФ. Суммарный процесс можно изобразить как на схеме (8.18).

Этот сложный суммарный процесс идет через ряд стадий. Чтобы понять смысл физических проблем, возникающих при его анализе, необходимо рассмотреть эти стадии подробнее. Детальное описание экспериментального ма-

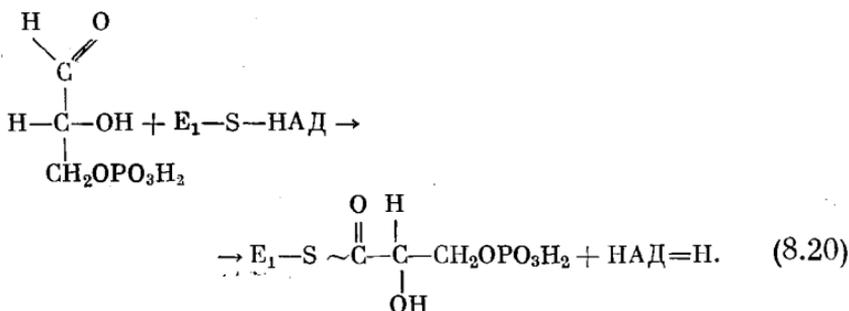
териала и ссылки на соответствующие оригинальные работы можно найти в прекрасной монографии Рэкера [2].



Кофермент НАД^+ образует прочный комплекс с E_1 (по-видимому, через атом S одной из сульфгидрильных групп белка):

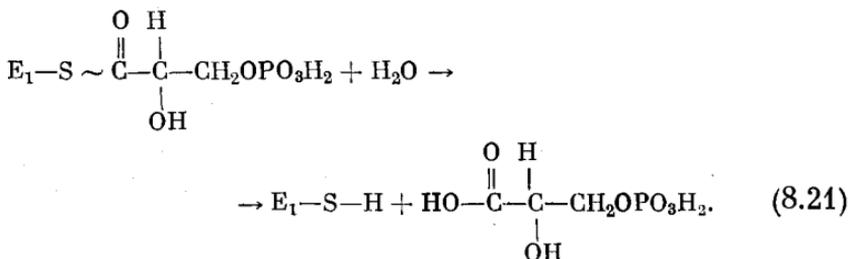


Субстрат (глицеральдегид-3-фосфат) взаимодействует с комплексом, восстанавливает НАД^+ и замещает НАД-Н , образуя при этом химическое соединение с ферментом (ацилфермент):

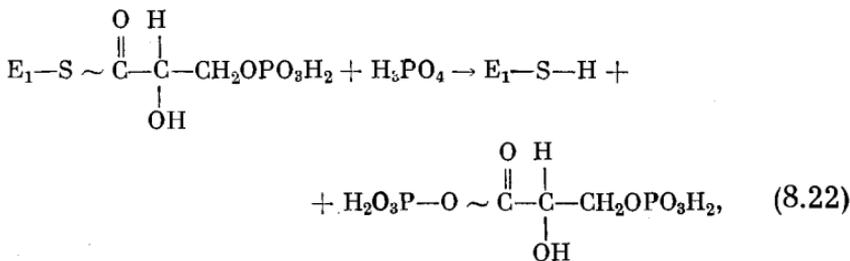


В ацилферменте субстрат уже окислен. В водной среде ацилфермент подвергается медленному гидролизу, обра-

зую один из конечных продуктов реакции (8.18) — 3-фосфоглицериновую кислоту, а фермент регенерируется:

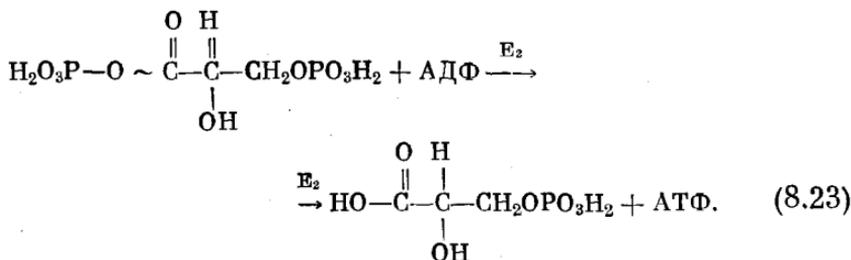


В этом случае энергия, освобождающаяся в результате окисления субстрата коферментом, рассеивается в виде тепла. Гидролиз ацилфермента происходит, однако, чрезвычайно медленно, и поэтому при каталитических количествах фермента окисление глицеральдегид-3-фосфата практически не идет. Для того чтобы в таких искусственных условиях количественно провести реакцию (8.20), нужны большие концентрации фермента E_1 , который играет роль не катализатора, а реагента. В присутствии неорганического фосфата число оборотов фермента в реакции увеличивается более чем в 150 000 раз. Реакция (8.20) сопровождается в этом случае процессом



в результате которого регенерируется фермент и образуется 1,3-дифосфоглицерат с макроэргической фосфорно-эфирной связью в положении 1. Таким образом, энергия, освобождаемая при окислении субстрата, оказывается локализованной в 1,3-дифосфоглицерате. Следующей, завершающей, стадией процесса является перенос макроэргической связи на АДФ с образованием 3-фосфоглицериновой кислоты, катализируемый ферментом

фосфоглицераткиназой:



Естественно, алгебраическая сумма реакций (8.19), (8.20), (8.22) и (8.23) соответствует процессу (8.18).

Собственно говоря, макроэргическая фосфорноэфирная связь уже появилась после образования кинетически устойчивого (в отсутствие E_2) 1,3-дифосфоглицерата. Последняя стадия процесса, реакция (8.23), представляет собой реакцию переноса этой связи на АДФ. Мы ограничимся поэтому рассмотрением процесса до стадии (8.22) включительно*). Выше уже было сказано, что в отсутствие неорганического фосфата фермент E_1 ведет себя как реагент, а не как катализатор. Комплекс E_1 с НАД взаимодействует с субстратом, образуя ацилфермент и НАД-Н (реакция (8.20)). Медленно идущий гидролиз ацилфермента представляет собой фактически реакцию, разобщающую процессы окисления и фосфорилирования глицеральдегид-3-фосфата. Из сказанного ясно, что по существу ацилфермент является макроэргическим соединением. Ацилирование E_1 в водной фазе термодинамически невыгодно, а гидролиз ацилфермента приводит к понижению свободной энергии системы, причем избыток ее рассеивается

в виде тепла. Это означает, что образование $\text{S} \sim \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}$ -связи в ходе реакции (8.20) (в отсутствие фосфата) энергетически невыгодно и происходит только потому, что одновременно реализуется другой, энергетически выгодный процесс — окисление НАД. Слово «одновременно» подчеркнуто не случайно. Ниже мы постараемся уточнить,

*) Это не означает, что физические механизмы замены одной макроэргической связи на другую в (8.23) ясны. Просто при их рассмотрении не возникает новых проблем, которые нельзя было бы проанализировать при обсуждении предшествующих стадий.

какой смысл следует вкладывать в этом случае в понятие одновременности.

Детальный механизм фосфорилирования субстрата при взаимодействии ацилфермента с неорганическим фосфатом (реакция (8.22)) не вполне ясен. Известно (см. [2]), что фосфат также образует комплекс с ферментом E_1 . Последний представляет собой «двуглавый фермент» с двумя активными центрами; один из них ответствен за перенос фосфата, а другой — за ацилирование. Весьма вероятно, что взаимодействие субстрата с ферментом и с фосфатом осуществляется в один акт и в присутствии фосфата ацилфермент при нормальном функционировании не существует в качестве кинетически независимой единицы. Каким бы ни был конкретный механизм, ясно, что образование фосфорноэфирной связи в положении 1 (см. (8.22)) в водной среде энергетически невыгодно и оно может произойти либо за счет *одновременно* идущего термодинамически выгодного восстановления НАД, либо в результате фосфорилирования уже образованного кинетически стабилизированного макроэрга (ацилфермента). Во всех случаях одной из стадий процесса должен быть элементарный акт, в котором *одновременно* осуществляется термодинамически выгодный (здесь восстановление НАД) и термодинамически невыгодный процессы (здесь ацилирование E_1 или фосфорилирование глицеральдегид-3-фосфата). В данном случае «одновременно» означает, что промежуток времени между обоими элементарными процессами настолько мал, что энергия, выделяемая в ходе экзергонического процесса, не успевает диссипировать в виде тепла. Тогда можно утверждать, что оба процесса представляют собой, в сущности, один элементарный акт (или — в рамках теории абсолютных скоростей реакции — имеется один активированный комплекс). В случае обычных реакций низкомолекулярных соединений речь идет о временах колебательной и вращательной релаксации, т. е. о временах порядка 10^{-11} — 10^{-13} сек. Если эти временные критерии выбраны правильно, то весьма маловероятно, чтобы сложный процесс, в котором принимают участие три низкомолекулярных соединения и по крайней мере две различные группы в двух активных центрах макромолекулы белка, действительно мог произойти в один акт.

Проблема физического механизма энергетического сопряжения химических реакций и является центральной проблемой биоэнергетики. Ниже будет рассмотрен один из возможных путей ее решения.

В гл. 6, посвященной физике ферментативного катализа, была изложена новая концепция элементарного акта в ферментативных каталитических реакциях. Согласно этой концепции присоединение субстрата к активному центру фермента приводит к появлению нового кинетически доступного конформационного состояния макромолекулы.

Исходная конформация становится напряженной и медленно релаксирует к новому состоянию. В ходе ее релаксации и реализуется катализируемое химическое превращение. Это медленное конформационное изменение является, по существу, механическим движением. Если химическое превращение субстрата сопровождается значительным понижением энергии (как, например, при процессе окисления глицеральдегид-3-фосфата и восстановления НАД), то можно сказать, что освобождение энергии в основном происходит в ходе этой медленной конформационной релаксации. После присоединения субстрата к ферменту первичным макроэргом становится неизменная исходная конформация макромолекулярного комплекса, ставшая механически напряженной. Время, в течение которого эту энергию можно использовать для проведения эндэргонического процесса, т. е. длительность элементарного акта, сравнимо со временем релаксации выделенных механических степеней свободы, возбуждаемых присоединением субстрата (10^{-5} — 10^{-1} сек).

Если в ходе конформационного изменения, затрагивающего весь макромолекулярный комплекс, изменяется распределение электронной плотности в активном центре, ведущем эндэргонический процесс, причем это изменение облегчает осуществление эндэргонической реакции, то оба процесса, экзэргонический и эндэргонический, протекают в один акт, хотя и могут быть отделены друг от друга во времени десятками и сотнями миллисекунд. Передача энергии от одного процесса к другому происходит путем возбуждения медленно релаксирующих механических степеней свободы макромолекулярного комплекса.

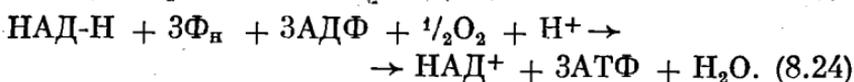
§ 8.4. МЕМБРАННОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ: ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Наиболее важными примерами мембранного фосфорилирования являются окислительное фосфорилирование, происходящее во внутренних мембранах митохондрий, и фотосинтетическое фосфорилирование (фотофосфорилирование), осуществляющееся в мембранах хлоропластов высших растений и водорослей и в хроматофорах фотосинтезирующих бактерий. Мы начнем с рассмотрения основных экспериментальных данных, относящихся к окислительному фосфорилированию в митохондриях. Как и всегда, мы ограничимся изложением лишь тех данных, которые будут необходимы в дальнейшем для понимания существа обсуждаемых физических проблем. Детальное описание строения митохондрий можно найти во многих монографиях и обзорах (см., например, [2, 3, 25]).

Вероятно, открытие окислительного фосфорилирования следует отнести к 1930 г., когда Энгельгардт [26, 27] установил связь между дыханием и фосфорным обменом в эритроцитах. Калькар [28, 29] получил аналогичные результаты на бесклеточных препаратах, а Белицер и Цыбакова [30] впервые установили стехиометрические соотношения между дыханием и фосфорилированием. Эти важнейшие исследования были продолжены Очоа [31, 32] на бесклеточных препаратах. Основным результатом проведенных работ состоит в установлении того, что окисление одной молекулы субстрата (т. е. образование одной молекулы воды в результате реакции $2H + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O$) сопровождается образованием более чем одной молекулы АТФ. Мы знаем теперь, что если субстратом ЦЭТ (см. § 7.3) служит НАД-Н, то в неповрежденных «сопряженных» митохондриях на каждый атом поглощенного кислорода (т. е. на каждую пару электронов, прошедшую через ЦЭТ) приходится образование трех молекул АТФ (другими словами, отношение $P/O = 3$). Если субстратом ЦЭТ служит сукцинат, то $P/O = 2$, а в случае субстратного фосфорилирования соответствующее отношение равно единице. Это означает, что прохождение электронов вдоль ЦЭТ должно сопровождаться фосфорилированием АДФ в нескольких местах ЦЭТ (в так называемых пунктах сопряжения).

Ферменты ЦЭТ, ответственные за перенос электронов, и фосфорилирующие ферменты, необходимые для синтеза АТФ из АДФ и фосфата, объединены в митохондриальных мембранах; они входят в сложную липопротеиновую структуру и разделяются лишь с большим трудом.

Суммарный процесс, осуществляющийся в сопряженной ЦЭТ при окислении НАД-Н, можно записать в виде



С достаточно большой степенью уверенности можно предположить, что фосфорилирование АДФ реализуется с помощью особого фермента — АТФ-азы, непосредственно не входящего в ЦЭТ, но локализованного в мембране поблизости от полиферментной системы ЦЭТ. Исследованию митохондриальной АТФ-азы и белковых компонент, необходимых для ее связи с компонентами ЦЭТ (так называемых сопрягающих факторов), посвящено множество работ. Однако большинство химических проблем, относящихся к митохондриальной АТФ-азе, остается нерешенным до настоящего времени. Существуют разные точки зрения даже по вопросу о том, имеются ли разные АТФ-азы (для каждого пункта сопряжения своя) или один и тот же фермент обслуживает все пункты сопряжения. По-видимому, более правдоподобно последнее предположение (см. [2]).

Можно различать пять состояний ЦЭТ митохондрий [33—36]. В состоянии 1, которое реализуется в отсутствие добавляемых извне субстратов дыхания и фосфорилирования, переносчики ЦЭТ частично восстановлены. Добавление АДФ (субстрата фосфорилирования) переводит митохондрии в состояние 2: все переносчики становятся окисленными, а скорость дыхания лимитируется только количеством субстрата окисления. Если добавить теперь субстрат окисления, то митохондрии переходят в активное состояние 3, в котором переносчики снова становятся частично восстановленными, а скорость электронного транспорта определяется скоростью поступления субстратов через внешнюю мембрану митохондрий и активностью фосфорилирующих ферментов. Когда значительная часть добавленной АДФ израсходуется (превращается в АТФ) или когда специально введен большой из-

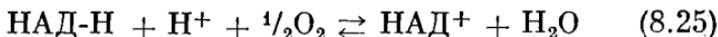
быток АТФ, возникает состояние дыхательного контроля, или состояние 4, в котором дыхание снова замедляется и его скорость лимитируется отношением $[АДФ]/[АТФ]$.

Изменяя это отношение (добавляя, например, АДФ), можно снова перевести митохондрии из состояния 4 в активное состояние 3. В отсутствие O_2 митохондрии находятся в состоянии 5, т. е. в состоянии анаэробноза, в котором все переносчики ЦЭТ восстановлены.

Эта предложенная Чансом классификация оказалась весьма полезной. Умело используя данные по влиянию перехода от состояния 4 к состоянию 3 на степень окисления отдельных переносчиков, по действию ингибиторов электронного транспорта и разобщителей фосфорилирования, Чанс выдвинул гипотезу о локализации отдельных пунктов сопряжения в ЦЭТ, которая мало изменилась вплоть до настоящего времени. Вопрос о пунктах сопряжения будет рассмотрен несколько ниже.

Учитывая сказанное выше, представляется очевидным, что основной биофизической проблемой, возникающей при рассмотрении процесса окислительного фосфорилирования, является вопрос о механизме образования первичного макроэрга, который затем с помощью АТФ-азы дает АТФ. В этом смысле проблема отличается от проблемы субстратного фосфорилирования только тем, что химической реакцией, идущей с понижением энергии, которая используется для создания первичного макроэрга, оказывается в данном случае перенос электрона между фиксированными соседними компонентами ЦЭТ.

Прежде всего рассмотрим термодинамический аспект проблемы. Из изложенного выше следует, что суммарный процесс (8.24), идущий в сопряженных митохондриях, можно разделить на две стадии, причем экзергоническая стадия



осуществляется в результате переноса двух электронов через ЦЭТ от НАД-Н на молекулярный кислород. Можно считать, что исходные и конечные продукты стадии (8.25) равновесно распределены между средой и ЦЭТ, и поэтому при рассмотрении суммарного процесса законно применение формул равновесной термодинамики. Изменение свободной энергии ΔF на этой стадии равно раз-

ности окислительно-восстановительных потенциалов пар НАД-Н/НАД⁺ и $1/2 O_2/H_2O$ и в клетках ($[НАД-Н]/[НАД^+] \approx \approx 1$, $p_{O_2} \approx 0,2$ атм, $pH \approx 7$) составляет [37]

$$\Delta F \approx -51 \text{ ккал/моль.} \quad (8.26)$$

Эта энергия может использоваться для осуществления различных эндэргонических процессов, в том числе фосфорилирования, причем на каждый моль синтезируемой АТФ можно потратить $51/3 = 17$ ккал/моль. Мураока и Слейтер [38] показали, что в состоянии дыхательного контроля (4 по классификации Чанса) после достижения определенного значения отношения $[АТФ]/[АДФ][Ф_H]$ реализуется термодинамическое равновесие между суммарным окислительно-восстановительным процессом и фосфорилированием в митохондриях. Поэтому, измерив концентрации АТФ, АДФ и $Ф_H$ в среде в состоянии 4, можно определить свободную энергию, необходимую для синтеза одного моля АТФ:

$$\Delta F' = \Delta F_{\text{набл}}^0 + 1,36 \lg \frac{[АТФ]}{[АДФ][Ф_H]}, \quad (8.27)$$

где $\Delta F_{\text{набл}}^0$ — стандартная свободная энергия фосфорилирования АДФ; согласно [7] при $25^\circ C$ и физиологических значениях pH $\Delta F_{\text{набл}}^0 \approx 8,0$ ккал/моль. Используя данные [39, 40], по концентрации АТФ, АДФ и $Ф_H$ в среде в состоянии 4, получают

$$\Delta F' \approx 8,0 + 6,5 = 14,5 \text{ ккал/моль.} \quad (8.28)$$

Таким образом, из доступных 17 ккал на синтез одного моля АТФ непосредственно идет примерно 14,5 ккал и в состоянии дыхательного контроля суммарная реакция окислительного фосфорилирования (8.24) протекает практически обратимо.

Вспомним теперь (см. гл. 7), что электронный перенос в ЦЭТ во всех ее участках происходит, по-видимому, по одноэлектронному механизму. Поэтому, для того чтобы понижение энергии электронов при прохождении через пункт сопряжения могло обеспечивать в конечном счете синтез молекулы АТФ, необходимо падение окислительно-восстановительного потенциала в этом пункте либо не менее чем на 630 мв (если к синтезу одной молекулы АТФ

приводит один акт одноэлектронного переноса), либо не менее чем на 315 *ме* (если к синтезу одной молекулы АТФ приводят два акта одноэлектронного переноса) *). В последнем случае должен существовать механизм накопления энергии, освобождающейся в результате двух последовательных актов электронного переноса, без ее диссипации.

Локализацию пунктов сопряжения в ЦЭТ, согласно современным представлениям, иллюстрирует рис. 8.1 [41]. Пункт сопряжения I локализован между группой переносчиков, связанных с флавопротеином, дегидрирующим НАД-Н, и убихиноном УХ. Пункт сопряжения II локализован вблизи цитохрома b_T (см. § 7.3), а пункт III связан с комплексом цитохромов a_3 , a и ионов меди (см. также [42]).

Разность равновесных значений окислительно-восстановительных потенциалов любой пары соседних переносчиков ЦЭТ значительно меньше 630 и даже 315 *ме* (см., например, [43]). Этот энергетический парадокс представляет собой, вероятно, одну из центральных проблем мембранного фосфорилирования.

Здесь прежде всего следует выяснить, в какой степени равновесные значения окислительно-восстановительных потенциалов (ОВП) изолированных переносчиков могут использоваться при анализе энергетических характеристик ЦЭТ. Действительно, вполне разумно было бы предположить, что ОВП встроенных в мембрану переносчиков ЦЭТ достаточно сильно отличаются от соответствующих значений изолированных переносчиков. Более того, можно предположить, что ОВП переносчиков-трансформаторов**) могут существенно зависеть от состояния мембраны, в частности, сильно меняться при ее энергизации. Вместе с тем допустимо и следующее предположение: в такой хорошо организованной структуре, как мембранные ЦЭТ, содержащие переносчики, энергия, высвобождаемая при

*) При этом предполагается, что переход от первичного макроэрга к АТФ не сопровождается диссипацией энергии. В противном случае требуемые разности окислительно-восстановительных потенциалов должны быть еще больше.

**) То есть переносчиков, окислительно-восстановительные превращения которых непосредственно приводят к образованию первичного макроэрга.

электронном переносе, весьма значительно отличается от разности ОВП соседних переносчиков. Медленность конформационной релаксации переносчиков приводит к тому, что большую часть времени своего функционирования

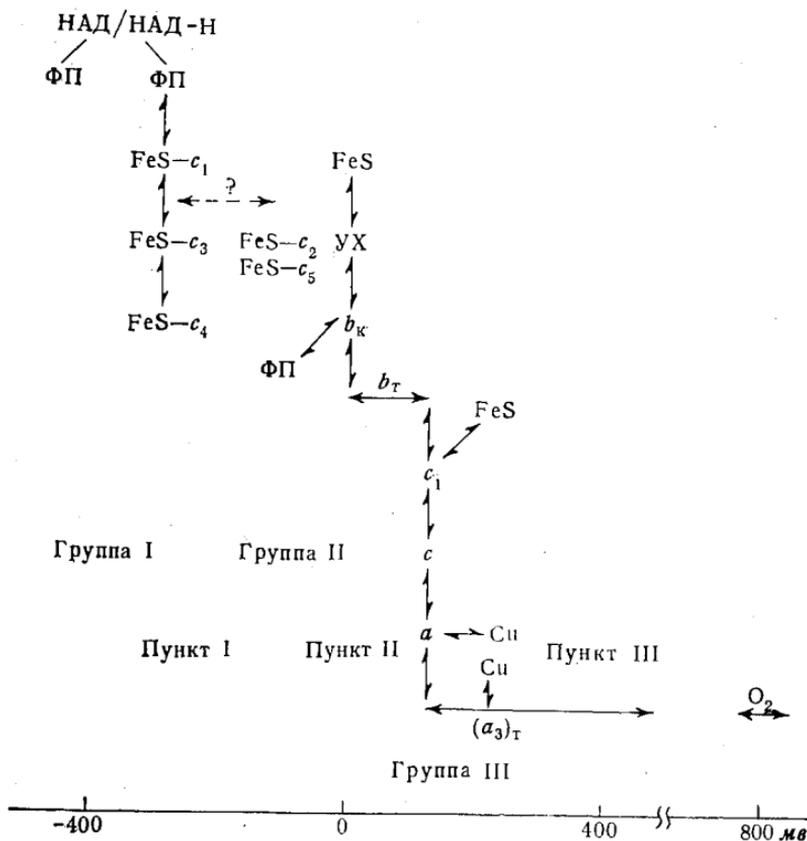


Рис. 8.1. Локализация пунктов сопряжения в ЦЭТ митохондрий. Индексом «т» отмечены переносчики-трансформаторы энергии.

они находятся в *кинетически* неравновесном состоянии. При этом равновесные значения ОВП для переносчиков в мембране могут оставаться почти такими же, как и у изолированных переносчиков. Последнее согласуется с тем обстоятельством, что электронные спектры поглощения переносчиков в мембране и изолированных переносчиков

сравнительно мало отличаются друг от друга. Для выбора между двумя приведенными выше возможными решениями энергетического парадокса следует рассмотреть данные по измерениям ОВП отдельных переносчиков ЦЭТ непосредственно в мембранах митохондрий. Такие измерения провели недавно Уилсон и Даттон [44, 45]. ОВП среды устанавливали путем подбора буферных количеств окислителя и восстановителя, а в качестве медиаторов использовали N,N,N',N' -тетраметил-*n*-фенилендиамин (ТМФД), феназинметасульфат (ФМС) или феназинэтансульфат (ФЭС). Отношение концентраций окисленных и восстановленных форм переносчиков (цитохромов) определяли спектрофотометрически. Этим способом исследовали пункты сопряжения II и III.

Удалось обнаружить, что в пункте сопряжения II две компоненты цитохрома b (названные b_k и b_r) [46] неодинаково ведут себя при энергизации или разобщении митохондрий. Кинетические различия были обсуждены ранее (см. § 7.3). В разобщенных или неэнергизованных митохондриях измеренные описанным выше способом ОВП цитохромов b_k и b_r равны соответственно +20 и -35 мв, т. е. почти одинаковы. При энергизации добавкой АТФ ОВП цитохрома b_k остается неизменным, а ОВП компоненты b_r повышается примерно на 275 мв, достигая значения +240 мв. На основании этих результатов было высказано предположение о существовании двух форм цитохрома b_r : низкопотенциальной и высокопотенциальной, в которую переходит первая форма при энергизации митохондрий. Собственно, высокопотенциальная форма цитохрома b_r и является, согласно этим представлениям, первичным макроэргом пункта сопряжения II, и ее можно обозначить $b_r \sim$. Изменение значения ОВП цитохрома b_r при энергизации и соответствует тому количеству энергии, которое можно использовать для синтеза первичного химического макроэрга (а затем АТФ) при переносе одного электрона через пункт сопряжения II. В работе [41] Чанс предложил конкретный цикл превращения цитохрома b_r , в котором переносчик испытывает последовательные переходы между всеми четырьмя возможными формами (b_r^{3+} , b_r^{2+} , $b_r^{3+} \sim$ и $b_r^{2+} \sim$). Из приведенных выше численных данных ясно, что для синтеза АТФ в этом случае необходим либо параллельный, либо последователь-

ный перенос двух электронов через пункт сопряжения II *).

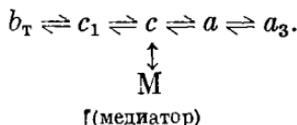
Аналогичные представления развиваются в работах [47—49].

В пункте сопряжения III аналогичным способом исследовали зависимость от энергизации митохондрий ОВП цитохромов a_3 и a [44]. Оказалось, что стандартное значение ОВП цитохрома a_3 понижается с 395 до 300—290 *мв* после энергизации митохондрий добавкой АТФ. Разобщители снимают этот эффект. Стандартное значение ОВП цитохрома a (+190 *мв*) не меняется под действием АТФ. Чанс и Эресинска [50] предложили на основании этих данных схему трансформации энергии и образования первичного химического макроэрга в пункте III. Первичным макроэргом является в этом случае низкопотенциальная форма цитохрома a_3 с ОВП около +300 *мв*. Незначительная величина изменения ОВП при энергизации делает такую интерпретацию данных [44, 45] не очень правдоподобной (изменение свободной энергии системы при протекании окислительно-восстановительного процесса в пункте III оказывается приблизительно в шесть раз меньше величины необходимой для синтеза одной молекулы АТФ).

Приведенная выше интерпретация измерений Уилсона и Даттона становится еще более сомнительной в свете результатов, полученных недавно Кэзуэллом [51]. Он указал, что окислительно-восстановительный медиатор ТМФД, использованный в измерениях Уилсона и Даттона, свободно взаимодействует в мембранах митохондрий лишь с цитохромом c , очень плохо взаимодействует с цитохромом b и совсем не взаимодействует с цитохромами a и a_3 (см. [52]). Будем считать, что медиатор, обеспечивающий связь между ОВ процессами в среде и ОВ реакциями переносчиков ЦЭТ митохондрий, взаимодействует лишь с цитохромом c и собственный электронный транспорт в ЦЭТ пренебрежимо мал (в опытах Уилсона и Даттона были применены ингибиторы). Ниже приведена схема

*) Строго говоря, даже в этом случае суммарной энергии (около 0,55 эв) слегка не хватит для синтеза одной молекулы АТФ (примерно 0,63 эв).

соответствующего участка ЦЭТ:



Если между цитохромом c и цитохромами b_T и a_3 имеется хотя бы по одному пункту сопряжения, то отношения концентраций окисленных и восстановленных форм этих цитохромов при данном ОВП среды не являются однозначными функциями их стандартных ОВП. Пусть между электронным переносом через пункт сопряжения и синтезом АТФ устанавливается равновесие (при стехиометрическом отношении два электрона на одну молекулу АТФ); тогда для пунктов сопряжения II и III должны удовлетворяться уравнения

$$K_{II} = \frac{[b_T^{\text{окисл}}]^2 [\text{ТМФД}^{\text{восст}}]^2 [\text{АТФ}]}{[b_T^{\text{восст}}]^2 [\text{ТМФД}^{\text{окисл}}]^2 [\text{АДФ}] [\text{Ф}_H]}, \quad (8.29)$$

$$K_{III} = \frac{[a_3^{\text{восст}}]^2 [\text{ТМФД}^{\text{окисл}}]^2 [\text{АТФ}]}{[a_3^{\text{окисл}}]^2 [\text{ТМФД}^{\text{восст}}]^2 [\text{АДФ}] [\text{Ф}_H]}. \quad (8.30)$$

Измеряемые отношения $[a_3^{\text{окисл}}]/[a_3^{\text{восст}}]$ и $[b_T^{\text{окисл}}]/[b_T^{\text{восст}}]$ будут для сопряженных митохондрий меняться с добавкой АТФ согласно уравнениям (8.29) и (8.30), а не в зависимости от изменения состояния и стандартных ОВП переносчиков. Действительно, подобрав медиаторы, непосредственно реагирующие с цитохромом b (витамин K_5 и 2,6-дихлорфенолиндофенол), Кэзуэлл показал, что измеряемый стандартный потенциал цитохрома b в митохондриях равен $+75$ мв и не меняется при энергизации под действием АТФ и при добавке разобщителей. Таким образом, в энергизованных митохондриях не существует особой высокопотенциальной равновесной для данного состояния митохондриальной мембраны формы цитохрома b . По существу, дело сводится к следующему. Если с помощью медиатора, непосредственно реагирующего с переносчиком, измеряется отношение концентраций окисленной и восстановленной форм переносчика при данном ОВП среды, то оно равно отношению скоростей восстановления и

окисления переносчика и соответствует истинному окислительно-восстановительному равновесию. В случае медиатора, непосредственно реагирующего с другим переносчиком и отделенного от интересующего нас переносчика пунктом сопряжения, скорость восстановления или окисления будет лимитироваться медленным процессом синтеза или гидролиза макроэрга. Поэтому, хотя измеряемое отношение концентраций и равно отношению скоростей восстановления и окисления, оно не соответствует истинному окислительно-восстановительному равновесию переносчика.

Следует сделать еще одно замечание. Отношение концентраций окисленных и восстановленных форм переносчиков измеряется в этих экспериментах спектрофотометрически, т. е. определяется в основном окислительно-восстановительное состояние протетической группы. Однако, как мы видели в гл. 5, окисление и восстановление цитохромов может сопровождаться значительными конформационными превращениями, идущими, как правило, медленнее изменений протетической группы. Таким образом, измеряемые отношения концентраций могут не соответствовать отношению равновесных, отрелаксировавших окисленных и восстановленных форм. Мы увидим ниже (см. § 8.6), что при таком способе измерения фактором, определяющим изменение окислительно-восстановительного состояния переносчика при энергизации мембраны (и, следовательно, измеряемый скачок «свободной энергии»), может стать именно скорость конформационного превращения. Лишь при бесконечно медленном превращении измеряемые величины будут строго соответствовать энергии, освобождаемой при электронном переносе и доступной для использования в синтезе АТФ. Во всех других случаях должны получаться заниженные значения. Собственно говоря, измеряемые обычными методами значения стандартных ОВП переносчиков в ЦЭТ либо не являются стандартными ОВП в строгом смысле этого слова, а их изменения при энергизации всегда меньше истинных изменений энергии системы, либо являются равновесными (при измерениях методом Кэзуэлла), но их разность для соседних переносчиков не соответствует истинным изменениям энергии при электронном переносе в кинетически неравновесной сопряженной мембране.

В последние годы все возрастает количество работ, посвященных изучению фотофосфорилирования в фотосинтезирующих системах, но до сих пор пункты сопряжения в ЦЭТ хлоропластов и хромофоров точно не установлены. По-видимому, можно считать доказанным, что фотофосфорилирование является по существу темновым процессом, сопряженным с процессами электронного транспорта между фиксированными переносчиками в ЦЭТ хромофоров и хлоропластов (см. § 7.3). Правда, Жолио и Кок [53], измерившие значение темновой константы равновесия для процесса электронного переноса между активными центрами фотосистем I и II в хлоропластах зеленых растений и в хлорелле и установившие малость этой константы и ее независимость от присутствия разобщителей и АТФ, заключили, что электронный перенос между двумя фотосистемами не сопряжен с фосфорилированием, которое, вероятно, каким-то образом обеспечивается энергетически непосредственно за счет поглощаемого светового кванта. Мы видели уже, что так называемые равновесные термодинамические характеристики, полученные при изучении фиксированных в мембране центров и переносчиков, обычно не имеют отношения к реально осуществляющемуся процессу. Общее рассмотрение вопроса о числе и характере пунктов сопряжения при нециклическом электронном транспорте можно найти в обзоре [54]. Еще в 1965 г. Аврон и Чанс [55] убедительно показали, что по крайней мере один пункт сопряжения находится в ЦЭТ между двумя фотосистемами в хлоропластах и локализован до цитохрома *f*. Интересные результаты были опубликованы Рэкером с сотрудниками в 1970 г. [56]. Авторы получили субхлоропластные частицы, способные фотовосстанавливать НАДФ и осуществлять циклическое фотофосфорилирование. Они показали, что в этих частицах (содержащих главным образом фотосистему I) циклического транспорта электронов недостаточно для циклического фотофосфорилирования, а необходимо вводить некоторое количество электронов извне, специально добавляя экзогенный восстановитель. Возможно, что в исходных хлоропластах функцию внешнего электронного донора для циклического фосфорилирования выполняет фотосистема II. Действительно, уже давно было показано [57], что ингибитор дихлорметилмоче-

вина, блокирующий перенос электронов между двумя фотосистемами, ингибирует также циклическое фотофосфорилирование. Во всяком случае, результаты работы [56] можно интерпретировать как свидетельство в пользу необходимости параллельного переноса двух электронов для образования первичного химического макроэрга (подробнее см. ниже, в § 8.5). Здесь важно отметить, что авторы [56] приходят к выводу о том, что пункт сопряжения

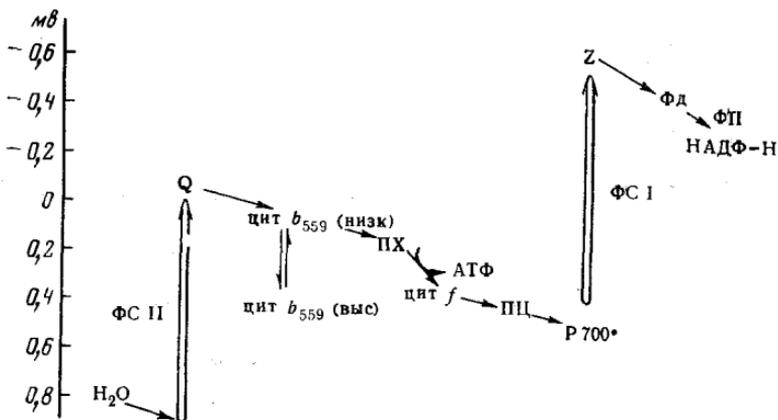


Рис. 8.2. Локализация фосфорилирования в нециклической ЦЭТ хлоропластов (по [58]).

в циклическом фотофосфорилировании локализован между P 700 и цитохромом b_6 (закрывающим в их схеме цикл в обход цитохрома f и пластоцианина (ПЦ) и непосредственно восстанавливающим (P 700)⁺). При нециклическом фотофосфорилировании пункт сопряжения локализован между пластохиноном (ПХ) и цитохромом f . К этому же выводу пришли недавно Боме и Крамер [58], исследовавшие кинетику электронного транспорта и фосфорилирования в хлоропластах. По их данным, цитохром f и ПХ расположены рядом в нециклической ЦЭТ (рис. 8.2) и в сопряженных хлоропластах именно перенос электрона от пластохинона к цитохрому f становится лимитирующей стадией. Они считают, что это единственный пункт сопряжения на всем пути нециклического электронного транспорта. Разница стандартных значений ОВП ПХ и цитохрома f составляет около 250 мв, и при прохождении одного

или даже двух электронов через пункт сопряжения ее не хватает для синтеза хотя бы одной молекулы АТФ. При нециклическом фосфорилировании число синтезируемых молекул АТФ на каждую пару электронов, прошедшую от воды до НАДФ, приближается к двум [59], и поэтому, по-видимому, либо существует по крайней мере еще один пункт сопряжения, либо истинное падение энергии одного электрона при переходе его от ПХ к цитохрому *f* близко к 0,63 эв и не соответствует разности равновесных значений ОВП.

Исследуя электронный транспорт и фотофосфорилирование в хлоропластах с разными электронными акцепторами, Саха и др. [60] пришли к выводу, что в нормально функционирующих хлоропластах отношение $P : 2e$ равно двум (см. также [61]) и имеется два отдельных пункта сопряжения, один из которых, по всей вероятности, локализован между водой и активным центром фотосистемы II. Такое же предположение еще раньше было высказано в работе [62]. Поскольку падение стандартных значений ОВП между водой и активным центром фотосистемы II, вероятно, не превышает 100 мв, термодинамика процесса остается в рамках классических представлений непонятной.

Таким образом, термодинамические аспекты проблем фотофосфорилирования в хлоропластах и окислительного фосфорилирования в митохондриях весьма близки. По-видимому, и в том и в другом случае близки также детали обоих механизмов (см., например, [63]).

В данном параграфе речь шла только об экспериментальных данных, относящихся к энергетике суммарного процесса мембранного фосфорилирования. Основной результат кинетических исследований, заключающийся в том, что сопряжение замедляет электронный перенос в пункте сопряжения, был достаточно подробно изложен в § 7.3. Естественно, многолетнее изучение мембранного фосфорилирования в целом ряде лабораторий разных стран привело к установлению множества других экспериментальных фактов и эмпирических закономерностей, относящихся, например, к появлению разных значений рН по обе стороны мембраны, трансмембранному потенциалу, действию различных разобщителей и ингибиторов и т. д. Нет никакой возможности излагать эти данные

сколько-нибудь подробно. Мы будем касаться их в следующем параграфе лишь постольку, поскольку они будут необходимы при рассмотрении отдельных теоретических концепций мембранного фосфорилирования.

§ 8.5. МЕМБРАННОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ: СУЩЕСТВУЮЩИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ

Все распространенные сейчас точки зрения на механизм мембранного фосфорилирования, точнее, на природу первичного процесса консервации энергии можно разбить на три основные группы: химическая, хемиосмотическая и конформационная концепции [37]. Как уже было сказано выше, общей их чертой является допущение существования первичного макроэрга, не идентичного АТФ. Они отличаются друг от друга представлениями о природе первичного макроэрга и о механизме первичного процесса консервации энергии.

В ее современном виде химическая концепция была сформулирована Слейтером в 1953 г. [64]. В основе ее лежит предположение о том, что первичный акт консервации энергии, т. е. процесс преобразования энергии, освобождающейся при электронном переносе, в долгоживущую форму, происходит в молекуле переносчика-трансформатора и заключается в образовании макроэргического соединения, содержащего один из продуктов окислительно-восстановительной реакции и низкомолекулярный лиганд (обозначаемый в дальнейшем I):



Затем с помощью фермента АТФ-азы первичный макроэрг обеспечивает синтез АТФ:

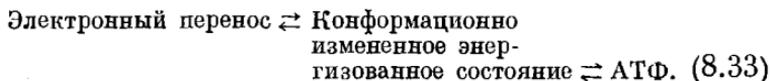


В сущности, химическая концепция мембранного фосфорилирования ничем не отличается от объяснения субстратного фосфорилирования, за исключением того, что окислительно-восстановительный процесс сводится к актам одноэлектронного переноса между соседними компонентами ЦЭТ, фиксированными в мембране. Физический механизм реакции (8.31) остается неизвестным. Для предотвращения практически полной диссипации энергии

электронный перенос от А к В и образование макроэргической связи $A \sim I$ должны осуществляться в один элементарный акт, что, как было указано в § 8.3, весьма трудно себе представить в рамках классических идей. Легко видеть, что химическая концепция мембранного фосфорилирования является естественным распространением взглядов на субстратное фосфорилирование, изложенных в § 8.3.

Конформационная концепция основана на многочисленных экспериментальных данных о конформационных изменениях отдельных белков-переносчиков при окислительно-восстановительных процессах, а также мембраны в целом при функционировании ЦЭТ. Согласно этой концепции процесс образования химического макроэрга можно представить себе как обращение процесса конформационного изменения миозина при гидролизе АТФ. Первичным актом в консервации энергии считается индуцированное электронным переносом изменение конформации дыхательного переносчика (флавопротеина, железосерного белка или цитохрома) [65].

Детальное обсуждение конформационной гипотезы приведено в работах Грина с сотрудниками [66, 67]. Общую схему синтеза АТФ можно представить в следующем виде:



В работе [6] речь идет о конформационно измененном энергизованном состоянии всей мембраны. Предполагается, что мембрана может находиться либо в энергизованном, либо в неэнергизованном состоянии. Эти состояния распространяются по мембране (от одного белково-липидного комплекса ЦЭТ к другому) в виде своеобразной волны. По-видимому, авторы цитированных выше работ полагают, что первичным актом является энергизация (индуцируемое конформационное изменение) макромолекулярных переносчиков. В этом смысле конформационную концепцию можно считать одним из вариантов химической, с тем отличием, что первичный химический макроэрг, $A \sim I$, заменен на энергизованное, конформационно измененное состояние переносчика А. Вместе с тем энер-

гизованное состояние всей мембраны, в котором может храниться энергия, освобождающаяся при функционировании ЦЭТ, сближает конформационную концепцию с хемиосмотической.

Первый вариант хемиосмотической гипотезы был предложен Митчеллом в 1961 г. [68]. В основе этой гипотезы лежало предположение о том, что в определенных участках ЦЭТ электронный перенос происходит поперек мембраны, что сопровождается возникновением ΔpH между внешней и внутренней ее поверхностями. Так, окисление субстрата на внешней поверхности:



приводит к накоплению протонов во внешней области, а восстановление конечного акцептора — молекулярного кислорода — происходит на внутренней поверхности, где локализована цитохромоксидаза и возникает дефицит протонов. Таким образом, между двумя поверхностями мембраны образуется разность потенциалов, или мембранный потенциал. Собственно говоря, мембраны с разделенными зарядами, обеспечивающими мембранный потенциал, и являются первичным макроэргом. Адсорбированные на поверхности протоны могут заменяться другими катионами с сохранением заряда мембраны и увеличением кислотности внешней среды. Электронный перенос будет поэтому приводить к двум эффектам: появлению мембранного потенциала и различию в величинах pH по обе стороны мембраны. Наличие мембранного потенциала непосредственно приводит к синтезу АТФ, например, по механизму, обратному активному переносу ионов через мембрану под действием АТФ (кстати, физические основы этого механизма далеко не ясны). Действительно, было показано, что при обращении движения ионов Na^+ и K^+ через мембрану NaK -активируемая АТФ-аза начинает катализировать синтез аденозинтрифосфата [69].

В первоначальной схеме Митчелла [68] фосфорилирование осуществлялось непосредственно под действием возникающего при электроном переносе градиента pH . Впоследствии Митчелл сильно модифицировал свою гипотезу, включив ряд промежуточных стадий [70]. Принцип построения схемы хемиосмотического сопряжения ясен из рис. 8.3. Функционирование ЦЭТ приводит к эффек-

тивному переносу протонов через мембрану, обусловливаемому в конечном счете различием ОВП переносчиков ЦЭТ. В мембране имеются «интермедиаты сопряжения»

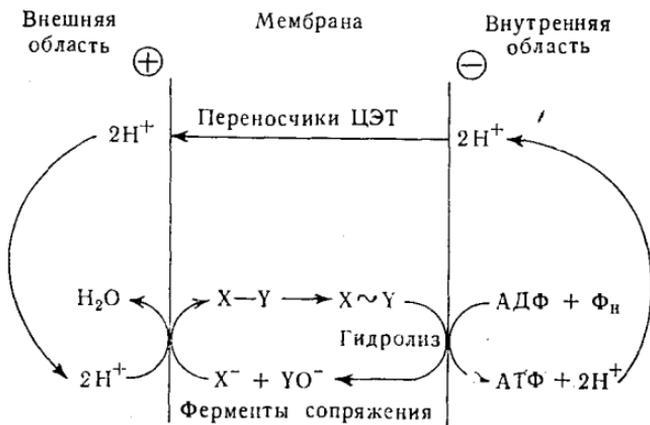
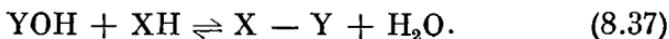
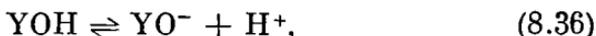


Рис. 8.3. Схема хемиосмотического сопряжения.

неизвестной природы XH и YO_H, которые способны к ионизации и к реакции конденсации:



Повышение электрохимического потенциала водородных ионов на внешней стороне мембраны за счет увеличения их концентрации и мембранного потенциала приводит к смещению вправо равновесия реакции



Нейтральная молекула X — Y мигрирует через мембрану (не обязательно одна и та же молекула проходит всю толщину мембраны). Контактировав с внутренней областью, где электрохимический потенциал протонов низок, а концентрации ионных форм X⁻ и YO⁻ малы, молекула X — Y становится лабильной, а связь между X и Y — макроэргической (X ~ Y). Равновесие (8.38) смещается влево, а за счет гидролиза X ~ Y синтезируется АТФ и обра-

зуются протоны, замыкающие протонный цикл. В системе должны работать три типа ферментов сопряжения: гидролаза, катализирующая процесс на внешней поверхности мембраны, транслоказа, обеспечивающая перенос (возможно, ступенчатый) через мембрану, и синтетаза, катализирующая синтез АТФ. Для того чтобы удовлетворить экспериментальным данным о наличии трех пунктов сопряжения в митохондриальных ЦЭТ, необходимо допустить существование по крайней мере трех петель ЦЭТ,

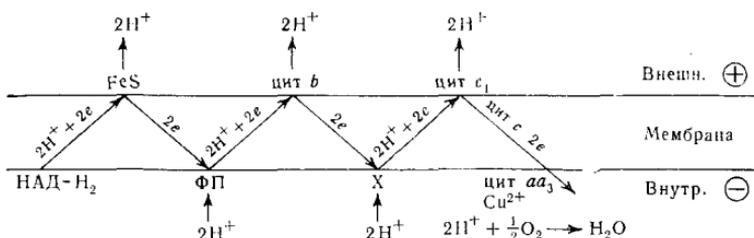


Рис. 8.4. Возможная схема электронно-протонного транспорта в ЦЭТ митохондрий согласно хемиосмотической гипотезе.

в которых попеременно происходит перенос электронов через мембрану из внешней области к внутренней и протонов в обратном направлении, например, по схеме рис. 8.4. Первоначально хемиосмотическая гипотеза возникла как естественная реакция на неудачу попыток обнаружить постулированные химической гипотезой первичные химические макроэрги, предшествующие АТФ. Однако развитие хемиосмотической концепции привело к необходимости постулировать образование в мембране интермедиатов сопряжения $X \sim Y$ неизвестной природы, также предшествующее синтезу АТФ. Таким образом, единственное отличие хемиосмотической концепции от химической и конформационной заключается в том, что согласно этой концепции перенос электронов через любой из пунктов сопряжения приводит непосредственно к возникновению разности электрохимических потенциалов протонов по обе стороны мембраны ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$ + мембранный потенциал) и первичным макроэргом является, таким образом, измененное состояние самой мембраны. Согласно же двум последним концепциям первичный макроэрг представляет

собой измененное (химически или конформационно) состояние отдельного переносчика *).

Рассмотрим теперь более подробно доводы в пользу всех трех концепций и против них. Вероятно, главный недостаток этих концепций состоит в том, что ни одна из

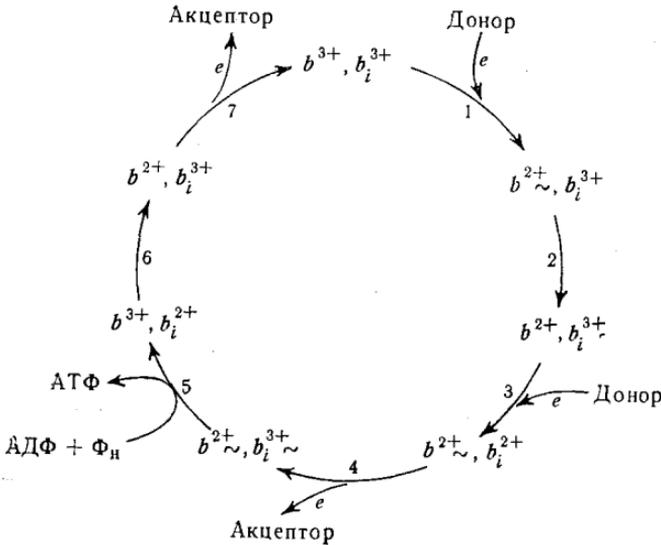


Рис. 8.5. Схема сопряжения в пункте II ЦЭТ митохондрий (по [37]).

них не отвечает на основной вопрос о физических механизмах сопряжения. Химическая гипотеза сводит проблему механизма мембранного фосфорилирования к столь же неясной проблеме субстратного фосфорилирования. Неудача попыток выделения первичных химических макроэргов не должна никого смущать, так как вполне возможно, что они образуются в качестве промежуточных продуктов внутри мембраны в ничтожных концентрациях. Значительно серьезнее то обстоятельство, что измеряемые изменения ОВП промежуточных переносчиков недостаточно велики для обеспечения синтеза АТФ (см. § 8.4). Слейтер [37] предложил недавно схему сопряжения, основанную на представлении об участии в качестве

*) В работе [71] предложена модель, объединяющая конформационную и хемосмотическую концепции.

трансформатора энергии комплекса из двух одноэлектронных переносчиков. В пункте сопряжения II ЦЭТ митохондрий им может быть, например, комплекс из двух цитохромов b и b_i *). Эти цитохромы могут находиться в энергизованных формах, отличающихся от обычных своими ОВП и спектральными характеристиками. Цикл Слейтера для пункта сопряжения II в митохондриальной мембране изображен на рис. 8.5. Энергизованными могут быть только окисленный цитохром b_i и восстановленный цитохром b . Цитохром b_i способен восстанавливаться только в энергизованном состоянии. В исходном состоянии оба цитохрома димерного комплекса окислены (b^{3+} , b_i^{3+}). Цикл состоит из семи стадий. В ходе стадии 1 цитохром b^{3+} восстанавливается электроном, получаемым от предшествующего переносчика ЦЭТ (донора), и превращается в энергизованный цитохром b^{2+} . В результате стадии 2 состояние энергизации переносится на вторую компоненту димерного комплекса b_i^{3+} , приобретающую способность восстанавливаться донором. Это происходит на стадии 3, в результате которой состояние энергизации вновь переходит на цитохром b^{2+} . В ходе стадии 4 цитохром b_i^{2+} окисляется и энергизуется, передавая электрон акцептору, т. е. следующему за ним переносчику ЦЭТ. Таким образом, оба цитохрома в димере оказываются энергизованными (b^{2+} , b_i^{3+}). Следующая стадия 5 представляет собой внутрикомплексный перенос электрона (ОВП b_i ~ выше, чем ОВП b ~), сопровождающийся деэнергизацией обоих цитохромов, причем освобождающаяся энергия используется на синтез АТФ. Стадия 6 — внутрикомплексный перенос электрона в обратном направлении (ОВП b_i ниже, чем ОВП b), и, наконец, стадия 7 — окисление цитохрома b^{2+} акцептором с замыканием цикла. В этой остроумной схеме остается неясным главное: природа энергизованного состояния, механизм его образования и механизм передачи энергии в систему АТФ. Слейтер полагает, что аналогичные циклы с димерными

*) Цитохром b_i в обозначениях Слейтера эквивалентен цитохрому b_T в обозначениях Чанса [41, 46] (см. §§ 7.3 и 8.4), если судить по спектральным характеристикам. Однако если основываться на кинетических свойствах, то цитохром b_T Чанса в высокопотенциальной форме эквивалентен b^{2+} [37].

комплексами можно построить и в других пунктах сопряжения митохондриальной мембраны (рис. 8.6).

Основой конформационной концепции служат многочисленные экспериментальные данные о структурных изменениях мембран сопряженных хлоропластов и митохондрий при иницировании электронного транспорта или при энергизации под действием АТФ. Эти данные получены различными физическими методами и свидетельствуют как о макроструктурных изменениях мембраны, так и о локальных изменениях. Читатель может найти

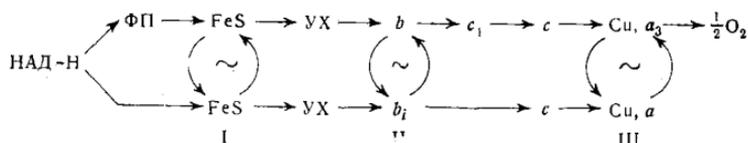


Рис. 8.6. Циклы сопряжения в пунктах I, II, III в ЦЭТ митохондрий (по [37]).

описание фактов и библиографию в работах [72—78]. По-видимому, нет сомнения в том, что трансформирующие энергию электронного переноса мембраны или отдельные макромолекулярные комплексы в них испытывают структурные превращения, причинно связанные с трансформацией энергии. Однако авторы конформационных гипотез в большинстве случаев полагают, что именно измененная непосредственно в результате электронного переноса (или под действием электрического поля, обусловленного переносом электронов [78]) структура мембраны является энергизованной [66, 67, 79, 89]. Весьма трудно представить себе механизм *направленного* изменения структуры с повышением ее потенциальной энергии в результате локального процесса электронного переноса. Загадкой остается также физический механизм процесса синтеза химическо-но макроэрга за счет потенциальной энергии конформационно измененной структуры.

Наиболее ожесточенные споры в литературе вызывает в последние годы хемиосмотическая гипотеза Митчелла. По-видимому, существует три типа экспериментальных данных, которые можно рассматривать как подтверждение его концепции. Прежде всего, это возникновение градиента рН и трансмембранного потенциала при энергизации

сопряженных митохондриальных мембран субстратом или АТФ, а мембран хлоропластов — светом или АТФ (см., например [81—93]). Затем опыты типа экспериментов Ягендорфа и Юрайба [94, 95], которые смогли осуществить в хлоропластах образование АТФ из АДФ и F_n , подвергая их воздействию сначала кислот, а затем щелочной среды. Наконец, множество работ посвящено доказательству того, что большинство разобщителей мембранного фосфорилирования повышает протонную проводимость мембраны, снижая таким образом градиент рН и мембранный потенциал (см., например [37, 96—99]).

В свое время самой привлекательной чертой хемиосмотической концепции была возможность обойтись без промежуточных химических макроэргических соединений, которых еще никому не удалось обнаружить. После того, как пришлось постулировать в рамках хемиосмотической концепции существование промежуточного ангидрида неизвестной природы $X \rightarrow Y$ и соответствующих анионов, это преимущество гипотезы Митчелла отпало. Само по себе появление градиентов рН и мембранного потенциала поперек мембраны не может служить доказательством концепции Митчелла. Оба эти градиента могут возникать вследствие процессов, ведущих к синтезу АТФ, но не быть их причиной. Действительно, в гл. 5 мы увидели, что изменение окислительно-восстановительного состояния отдельных переносчиков может сопровождаться значительными конформационными превращениями макромолекулы белка, которые в свою очередь, как правило, ведут к изменению значения рК кислотных групп молекул и, следовательно, к эжекции или поглощению протонов. При несимметричном расположении отдельных переносчиков относительно внутренней и внешней поверхностей мембраны это должно вызвать появление наблюдаемых градиентов. В этом случае мембранный потенциал и градиент рН служит лишь характеристиками энергизованного состояния отдельных переносчиков или мембраны в целом. Как известно, многие разобщители мембранного фосфорилирования одновременно повышают протонную проводимость мембраны и выравнивают, таким образом, концентрации протонов по обе ее стороны, но это не может служить доказательством того, что энергизация сводится именно к созданию неравновесного распределения, в котором

хранится повышенная потенциальная энергия системы. Для кинетически неравновесных конструкций, например для отдельных компонент ЦЭТ или для мембраны в целом, характерно наличие «спусковых крючков», срабатывание которых может привести к понижению потенциальной энергии всей системы, локализованной на совершенно других степенях свободы. Наконец, пожалуй, прямым свидетельством против основных положений хемиосмотической концепции могут служить результаты непосредственных измерений мембранного потенциала и градиента рН в разных состояниях сопрягающих мембран. Ни одному исследователю не удалось получить значений этих параметров, достаточно больших для обеспечения синтеза АТФ, даже если бы трансформация энергии проходила без потерь. Более того, величина мембранного потенциала оказалась в ряде случаев не зависящей от энергетического состояния митохондрий [100]. Подробный анализ этой проблемы дал Аврон [101] в своей недавней работе, посвященной выяснению связи между переносом протонов и фосфорилированием. Он отмечает, что опыты Ягендорфа [94, 95] действительно свидетельствуют в пользу принципиальной возможности использования градиента рН в качестве единственного источника энергии для образования АТФ в хлоропластах. Однако это не исключает того, что искусственное создание большого градиента рН может приводить к возникновению некоторого макроэргического состояния, обеспечивающего синтез АТФ. Для того чтобы экспериментально ответить на вопрос о ситуации, реализующейся при нормальном фотофосфорилировании, можно использовать два подхода. Во-первых, точно измерить величину $H^+/h\nu$ или H^+/e^- , т. е. число протонов, переносимых через мембрану, на каждый поглощенный квант или прошедший по ЦЭТ электрон. Согласно хемиосмотической концепции H^+/e^- должно равняться числу пунктов сопряжения, т. е., в случае хлоропластов единице или двум. Экспериментальные результаты различных авторов сильно расходятся, но Карлиш и Аврон [102, 103] показали, что можно получить любые величины от 0,1 до 6 в зависимости от условий. Квантовый выход переноса протона $H^+/h\nu$ должен быть близок к H^+/e^- . Однако прямые измерения, проведенные в двух лабораториях [104, 105], дали величины $H^+/h\nu$ от 5

до 7, что не согласуется с хемиосмотической концепцией. При непосредственном измерении светоиндуцированного мембранного потенциала [91] были получены величины, не превышающие 10 мв. Вместе с тем было установлено, что АТФ образуется и при нулевом мембранном потенциале [106]. Измерения показали, что при оптимальных условиях в хлоропластах разность рН по обе стороны мембраны не может превышать 3,5 [91]. Это соответствует приблизительно 200 мв и явно недостаточно для синтеза АТФ.

Эти выводы, основанные на экспериментальных данных, не могут считаться неопровержимыми. Измерение истинного значения трансмембранного потенциала в субклеточных частицах чрезвычайно трудно. При получении слишком малых величин мембранного потенциала всегда остаются сомнения в корректности измерений. Малость электрической емкости мембраны приводит к тому, что в принципе заметные величины разности потенциалов могли бы наблюдаться без создания значительных различий в поверхностных зарядах и в концентрациях ионов по обе стороны мембраны.

Если выделить существенные моменты, то в современном понимании хемиосмотическая гипотеза сводится к следующим утверждениям. В процессе трансформации энергии (первоначально запасенной в виде разности ОВП переносчиков, несимметрично расположенных в мембране) в энергию макроэргической связи в АТФ обязательно реализуется промежуточная стадия, на которой энергия запасена в форме трансмембранного потенциала (возможно, и не сопровождающегося возникновением ΔpH). Эта зарядка «мембранного конденсатора» является универсальным процессом при биоэнергетических превращениях в мембранных структурах [107]. Использовать энергию, запасенную в конденсаторе, можно, разрядив его через специальное устройство — фермент АТФ-синтазу*). В этом устройстве ионы водорода отдают свою избыточную энергию (равную разности их электрохимических потенциалов по обе стороны мембраны), за счет чего синтезируется молекула АТФ. Для обеспечения

*) Мы будем называть так АТФ-азу митохондрий или хлоропластов.

синтеза одной молекулы АТФ в условиях клетки необходимо прохождение через АТФ-синтетазу двух-трех ионов водорода.

Сформулированная таким образом хемиосмотическая гипотеза почти неопровержима. Очень трудно выяснить, является ли мембранный потенциал причиной или следствием возникновения некоторого промежуточного макроэрга. Вероятно, единственным экспериментом, противоречащим хемиосмотической гипотезе, мог бы стать синтез АТФ с помощью АТФ-синтетазы в гомогенной системе. До сих пор никому осуществить его не удалось.

В последнее время появились новые экспериментальные и теоретические работы, ставящие под сомнение основные положения хемиосмотической концепции. Так, в работе [108] одновременные измерения ΔpH и трансмембранного потенциала в митохондриях привели автора к выводу о количественном несовпадении полученных величин с требованиями хемиосмотической гипотезы. В работе [109] были воспроизведены рассмотренные выше эксперименты Ягендорфа и Юрайба [95], в которых образование АТФ в хлоропластах индуцировали кислотно-основным переходом. Было показано, что синтез АТФ определяется в этом случае не величиной ΔpH между двумя сторонами мембраны, как этого требует хемиосмотическая концепция, а абсолютными значениями концентраций протонов. В группе Витта был разработан новый метод измерения мембранного потенциала по фотоиндуцированным изменениям спектральных характеристик каротиноидов в мембранах хлоропластов и хромофоров (см., например, [110, 111]). Этим методом были получены многие результаты, подтверждающие хемиосмотическую концепцию. Регистрируемые спектральные изменения считаются обусловленными электрическим полем (электрохромизм). Следует отметить, однако, что любые слабые возмущения должны приводить к аналогичным изменениям спектра молекул красителей. Независимо от того, чем эти изменения вызваны, вряд ли на основании таких измерений можно судить о процессах трансформации энергии. В работе Балчевской [128] было показано, что в хромофорах фотосинтезирующих бактерий лишь сравнительно малая часть этих изменений связана с фотофосфорилированием.

Критическое рассмотрение общих положений хемиосмотической концепции см. в работах [112—114].

Хемиосмотическая концепция стимулировала множество прекрасных экспериментальных и теоретических работ и в этом смысле была и остается чрезвычайно полезной. Однако, как легко видеть из вышесказанного, она ничуть не лучше химической концепции отвечает на основной вопрос о физических принципах сопряжения. Снова остается непонятным, как протекание экзергонического процесса (перенос иона водорода по градиенту электрохимического потенциала) может обеспечить протекание эндэргонического процесса (синтез фосфорно-эфирной связи) без диссипации энергии. В какой форме сохраняется энергия между последовательными переносами протонов? Дело здесь не в том, что не сформулирован конкретный механизм, а в том, что не предложен принцип, позволяющий реализовать такое сопряжение.

Мне кажется, что на основании анализа, проведенного в настоящем параграфе, мы вправе утверждать следующее: ни одну из существующих теоретических концепций *) мембранного (как, впрочем, и субстратного) фосфорилирования не только нельзя считать доказанной экспериментально, но в них и не ставится вопрос о физических механизмах процессов трансформации энергии, лежащих в основе этих концепций.

В большинстве случаев считается, что физических проблем не существует, т. е., например, достаточно свести проблему мембранного фосфорилирования к проблеме фосфорилирования субстратного, чтобы не о чем было заботиться.

В следующем параграфе будет предпринята попытка сформулировать эти физические проблемы и наметить возможные пути их решения, основанные на общих принципах подхода к биологическим системам и процессам, развиваемых в настоящей книге. Конкретные схемы, которые будут рассмотрены, следует считать чисто иллюстративными.

*) Множество новых конкретных теорий мембранного фосфорилирования, предлагаемых в ежемесячно публикуемых работах, обычно сводится в принципе к одной из изложенных концепций.

§ 8.6. НЕКОТОРЫЕ ФИЗИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ТРАНСФОРМАЦИИ ЭНЕРГИИ В КЛЕТКЕ КАК РЕЛАКСАЦИОННОГО ПРОЦЕССА

При рассмотрении внутриклеточной трансформации энергии, т. е. процесса, в котором энергия, освобождающаяся в ходе одной химической реакции, используется для повышения потенциальной энергии реагентов в другой химической реакции, мы выберем в качестве примера сопряжение электронного переноса с фосфорилированием в мембранах митохондрий или хлоропластов. Принципы, лежащие в основе предлагаемого подхода, были, по-видимому, впервые сформулированы в работах [115, 116]. Забудем сперва о мембране в целом и рассмотрим пункт сопряжения, состоящий из трех последовательно расположенных переносчиков А, В, С (направление переноса электрона от А к С), каждый из которых представляет собой белковую макромолекулу с активным центром, способным претерпевать одноэлектронные окислительно-восстановительные превращения (например, цитохром). Пусть энергии высших занятых электронных уровней у восстановленных форм активных центров переносчиков А и С различаются на величину ΔE , в принципе достаточную для обеспечения синтеза молекулы АТФ ($\Delta E \geq \geq 0,63 \text{ эв}$ *). Что, собственно, означает это утверждение? Мы видели выше, что любые химические (локальные) изменения в белковой молекуле, особенно в ее активном центре, приводят к конформационным превращениям макромолекулы, влияющим в свою очередь на состояние и электронные характеристики активного центра. Изменение окислительно-восстановительного состояния активного центра вызывает изменение конформации молекулы, а затем дополнительное изменение положения электронного уровня активного центра, которое, таким образом, зависит от того, успела ли закончиться конформационная релаксация макромолекулы или нет. Поэтому, говоря о разности энергий уровней переносчиков А и С, необходимо указать, какие состояния последних мы имеем в виду.

*) Не будем пока говорить о разности ОВП переносчиков, так как измерение последних в функционирующих мембранных структурах, как мы видели, затруднительно. Мы вернемся к этому вопросу ниже.

Поскольку речь будет идти только об одноэлектронном переносе, каждый переносчик может существовать в двух формах; окисленной (например, А) и восстановленной (например, А⁻), причем каждая из них может быть конформационно отрелаксировавшей или нет. Указанная выше разность энергий ΔE относится к отрелаксировавшим восстановленным формам переносчиков.

Как мы видели выше, для того чтобы одно химическое превращение энергетически обеспечивало реализацию другого, необходимо их осуществление в один элементарный акт. Элементарным актом химического процесса, идущего с участием белковых макромолекул, является стадия конформационной релаксации (см. § 6.5). Поэтому мы вправе предположить, что именно в ходе этой стадии реализуется основное изменение энергии переносчика-трансформатора (переносчик В в нашем примере).

Итак, исходное состояние системы из трех переносчиков: донора А, трансформатора В и акцептора С — можно записать в виде А⁻ВС. Будем условно изображать отрелаксировавшие (равновесные) конформации окисленных форм переносчиков индексом 1, а отрелаксировавшие конформации восстановленных форм — индексом 2. Пусть в исходном состоянии все переносчики конформационно равновесны:



Рассмотрим, что должно происходить с переносчиком-трансформатором при переносе электрона от А к С. Как было показано в § 7.5, такой перенос происходит по туннельному механизму и требует совпадения электронных уровней соседних переносчиков с точностью до 0,1 эв, причем разность энергий рассеивается в виде тепла путем обычной колебательной релаксации. Таким образом, условием переноса электрона от А₂⁻ на В₁ является наличие у активного центра В₁ свободного электронного уровня, лежащего ниже верхнего занятого электронного уровня А₂⁻ не более чем на 0,1 эв. После переноса быстро произойдет колебательная релаксация центра и близлежащих групп (см. § 5.4), но вся молекула переносчика В с восстановленным активным центром останется в окисленном конформационном состоянии (так же, как молекула переносчика А с окисленным активным центром — в

восстановленном конформационном состоянии):



В результате переносчик-трансформатор В оказался в конформационно неравновесном состоянии \bar{V}_1 . Это состояние стало неравновесным (механически напряженным) не потому, что изменилась конформация В, а потому, что появление лишнего электронного заряда в активном центре привело к возникновению нового, в принципе кинетически доступного конформационного состояния \bar{V}_2 с меньшей энергией. Перенос электрона от \bar{V}_1 на C_1 запрещен, так как разность энергий соответствующих электронных уровней значительно превышает 0,1 эв. Медленная конформационная релаксация $\bar{V}_1 \rightarrow \bar{V}_2$ должна привести к совпадению внешнего занятого электронного уровня активного центра \bar{V}_2 с низшим свободным уровнем C_1 с точностью до примерно 0,1 эв.

Естественно предположить, что за это время успеет произойти и конформационная релаксация $A_2 \rightarrow A_1$ (поскольку А и С не являются по предположению трансформаторами энергии, процессы их конформационной релаксации должны сопровождаться значительно меньшими изменениями энергии и пока не будут нас интересовать).

Итак, следующее состояние трех переносчиков можно записать в виде



Как и исходное, это состояние является конформационно равновесным, хотя конформация переносчика-трансформатора претерпела резкие изменения.

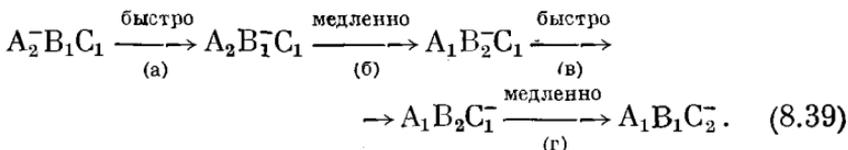
Соответствующие электронные уровни \bar{V}_2 и C_1 теперь совпадают с точностью, достаточной для туннельного осуществления переноса; последний происходит достаточно быстро и переводит систему в состояние



которое снова является конформационно неравновесным и должно медленно релаксировать в конечное равновесное состояние



Итак, произошел перенос электрона от донора к акцептору, а переносчик-трансформатор претерпел циклическое окислительно-восстановительное и конформационное изменение. Весь процесс можно схематически изобразить следующим образом:



Восстановление и окисление активного центра переносчика-трансформатора В происходит на быстро протекающих стадиях а и в. Исходные состояния переносчика В на этих стадиях конформационно равновесны, а в ходе самих стадий могут реализоваться лишь небольшие изменения энергии системы, обязательно рассеивающиеся в виде тепла. Большие изменения энергии, которые в принципе могут использоваться для обеспечения какого-либо параллельного химического процесса, осуществляются лишь на медленной релаксационной стадии. В течение ряда лет в литературе велась ожесточенная дискуссия по вопросу о том, на какой стадии используется энергия электронного переноса — на стадии окисления или восстановления переносчика-трансформатора. Мы видим, что сама постановка вопроса лишена смысла: утилизация энергии может происходить только в ходе конформационной релаксации переносчика, которая вообще не является окислительно-восстановительным процессом.

На рис. 8.7 схематически изображены изменения полной энергии системы АВС и отдельных переносчиков на стадиях процесса (8.39). Поскольку для дальнейших рассуждений важны лишь относительные изменения энергии, то чисто условно уровни полных энергий отдельных переносчиков в исходном состоянии совмещены друг с другом и с уровнем полной энергии всей системы. На стадии а энергия акцептора С, естественно, остается без изменений *). Энергия донора А должна на этой стадии повышаться на величину, практически равную потенциалу

*) Пока мембрана не рассматривается и переносчики можно считать невзаимодействующими.

ионизации A_2^- за вычетом быстро диссипирующей в тепло энергии, освобождающейся при релаксации активного центра A и его ближайшего окружения (см. гл. 5 и 6). Энергия переносчика-трансформатора B понижается (средство B_1 к электрону и быстрая релаксация). Можно постулировать (это не обязательно), что изменение энергии B на этой стадии больше по абсолютной величине изменения энергии уровня A_2 и, следовательно, энергия

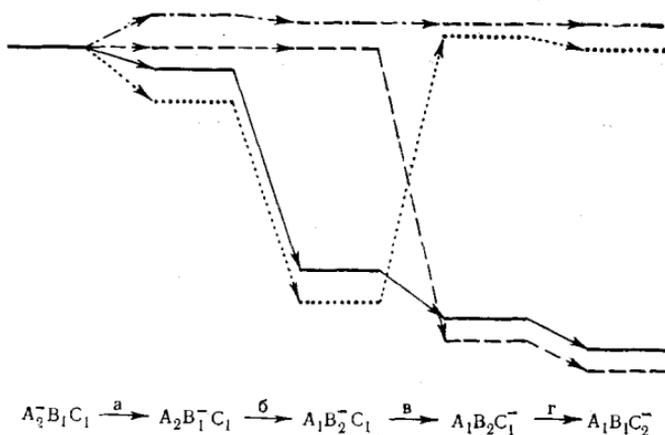


Рис. 8.7. Схема изменений полной энергии системы ABC (сплошные линии) и полных энергий переносчиков A (штрих-пунктир), B (точечный пунктир) и C (обычный пунктир) на отдельных стадиях процесса (8.39).

всей системы на стадии a должна слегка уменьшаться. На стадии b уровень C_1 снова остается без изменений, уровень A незначительно понижается вследствие конформационной релаксации $A_2 \rightarrow A_1$, а энергия переносчика-трансформатора B резко уменьшается в результате медленной конформационной релаксации $V_1^- \rightarrow V_2^-$. Способность к такому понижению энергии и есть отличительная характеристика трансформатора. В ходе этой релаксации *электронный уровень* *) активного центра V_2^- сближается (с точностью примерно до $0,1 \text{ эв}$) с незанятым электронным уровнем активного центра акцептора C_1 , в результате

*) Здесь следует четко различать электронные уровни и приведенные на схеме уровни полной энергии переносчиков.

чего может произойти перенос электрона на C_1 с образованием неравновесных (из-за медленности конформационных релаксаций) состояний B_2 и C_1^- (стадия в). Уровень А при этом не меняется, энергия В повышается до величины, превосходящей энергию исходного конформационно равновесного состояния B_1 , а энергия акцептора С испытывает резкое понижение, главным образом в связи с высоким сродством C_1 к электрону (собственно, различие в электронных сродствах A_1 и C_1 или в потенциалах ионизации A_2^- и C_2^- и есть источник энергии всего процесса).

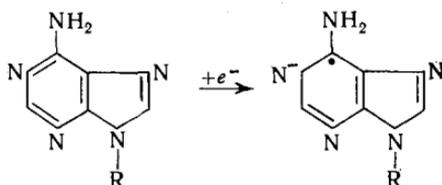
Во время медленной стадии г переносчики В и С релаксируют к своим соответствующим равновесным конформациям. В результате всего процесса донор А передал электрон акцептору С, причем оба они пришли в соответствующие конформационно равновесные состояния, а переносчик-трансформатор В, испытав полный цикл окислительно-восстановительных и конформационных превращений, вернулся в исходное состояние.

В рамках этой схемы первичным макроэргом является переносчик-трансформатор в состоянии B_1^- , т. е. с восстановленным активным центром и *исходной*, но ставшей неравновесной окисленной конформацией. Во время конформационной релаксации трансформатора на стадии б и может утилизироваться энергия этого первичного макроэрга.

Как это может произойти? Один из возможных конкретных механизмов (ни в коем случае не доказанный!) был предложен в [115]. Достаточно обосновано мнение, что в пункте сопряжения существует лабильный комплекс между переносчиком-трансформатором и активным центром фермента сопряжения, в состав которого, возможно, входит аденин связанной АДФ.

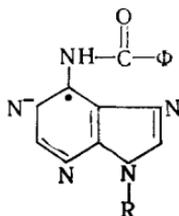
Конформационная релаксация $B_1^- \rightarrow B_2^-$ влияет не только на электронный уровень В, но и на акцепторный уровень аденина, так что в течение значительной части времени релаксации эти два уровня практически (с точностью до 0,1 эв) совпадают. В этих условиях квантово-механический резонанс приводит к динамической делокализации электрона [117]. Поэтому во время медленного адиабатического прохождения электронных уровней трансформатора и аденина друг относительно друга

избыточная электронная плотность V^- распространяется на аденин. Повышение электронной плотности на адениновом кольце (его восстановление) сопровождается резким повышением основности аминогруппы аденина, приближающейся к значению, характерному для алифатических аминов [118]:

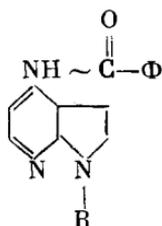


Здесь справа изображена восстановленная анион-радикальная форма аденинового остатка, NH_2 -группа которого обладает повышенной основностью и легко образует связь с любой электрофильной группой. В работе [118] в качестве примера такой группы был рассмотрен неорганический фосфат и ковалентное присоединение фосфата к аминогруппе аденина считалось первой стадией образования АТФ. В принципе схемы подобного типа согласуются с данными Каюшина с сотрудниками [119] о появлении радикальных форм при ферментативном гидролизе АТФ и с результатами [120], согласно которым гидрированные (восстановленные) молекулы АДФ могут образовывать связь с фосфатом.

Вряд ли, однако, фосфат непосредственно участвует в образовании первичного химического макроэрга [25]. В качестве одной из рабочих гипотез можно принять карбоксильную схему, предложенную в работах [121, 122]. Повышение электронной плотности на адениновом кольце и увеличение основности аминогруппы приводят к образованию амидной связи с одной из карбоксильных групп фермента сопряжения:



Для такого состояния аденинового кольца гидролиз этой амидной связи характеризуется низкой свободной энергией гидролиза, и сама связь не является поэтому макроэргической. Конформационная релаксация переносчика-трансформатора В, однако, продолжается, и его электронный уровень оказывается ниже, чем у аденина. Происходит перекачивание электронной плотности с аденина обратно на активный центр В, аминогруппа снова становится ароматической, а уже образовавшаяся амидная связь — макроэргической:



Таким образом, «разрядка» первичного «механического» микроэрга V_1 и образование первичного «химического» макроэрга происходят за время одного элементарного акта — конформационной релаксации переносчика-трансформатора, и оба процесса могут поэтому реализоваться без значительной диссипации энергии.

Следует подчеркнуть следующее обстоятельство. Электронный уровень трансформатора в течение всего времени релаксации $V_1 \rightarrow V_2$ остается основным, т. е. нижшим занятым электронным уровнем для данной мгновенной конформации переносчика. Это исключает возможность диссипации энергии за счет внутримолекулярного излучательного или безызлучательного электронного перехода.

До сих пор мы рассматривали систему переносчиков АВС изолированно от мембраны. Однако эти переносчики и сопрягающий фермент встроены в липопротеиновую мембрану, состояние которой кооперативно зависит от состояния его компонент. Релаксация неравновесной конформации переносчика в пункте сопряжения сопровождается образованием химической макроэргической связи в сопрягающем ферменте (будем условно называть его АТФ-синтетазой), что в свою очередь приводит к изменению конформации этого белка. Новая конформация

АТФ-синтетазы вызывает соответствующий релаксационный процесс целого участка мембраны, новая конформация которого определяется в конечном счете состоянием переносчиков и образовавшимися первичными макроэргическими связями. Эта новая равновесная конформация мембраны, по-видимому, эквивалентна энергизованной конформации Грина [123]. Наблюдаемый в эксперименте переход мембраны в состояние, характеризующееся повышенной растворимостью в ней гидрофобного парамагнитного зонда [76] другой интенсивностью флуоресценции зонда [124] и т. д., отражает именно процесс релаксации в новое равновесное состояние целого участка

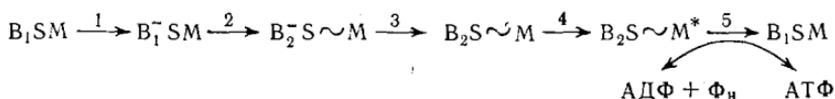


Рис. 8.8. Последовательность процессов в пункте сопряжения при мембранном фосфорилировании.

мембраны после образования первичного химического макроэрга; следовательно, переход мембраны в энергизованную конформацию Грина есть вторичный процесс и соответственно его характеристическое время больше, чем время релаксации сопряженного переносчика [46].

Важно подчеркнуть, что энергизованная конформация мембраны существенно равновесна. Ее конформационная энергия равна нулю, и в этом смысле она, собственно, не энергизована. Однако такая конформация реализуется лишь при наличии макроэргических связей в АТФ-синтетазе, и можно сказать, что мембрана химически энергизована. Ее энергия может использоваться в последующих ферментативных кислотно-основных реакциях синтеза АТФ, а также для других эндэргонических процессов.

Таким образом, в каждом пункте сопряжения осуществляются процессы, схематически изображенные на рис. 8.8. B_1SM — исходное состояние переносчика-трансформатора В, АТФ-синтетазы S и мембраны М. В результате присоединения электрона (быстрая стадия 1) конформация переносчика не меняется, но становится неравновесной и медленно релаксирует к равновесному состоянию B_2^- , причем одновременно в активном центре

АТФ-синтетаза образуется первичная химическая макроэргическая связь (стадия 2). Электрон быстро переносится на следующий акцептор (стадия 3), а мембрана, которая стала неравновесна в результате изменения АТФ-синтетазы, релаксирует к новой равновесной структуре M^* (стадия 4). В состоянии $V_2S \sim M^*$ переносчик-трансформатор не может присоединить электрон от донора (соответствующие уровни существенно не совпадают, см. рис. 8.7), а измененная структура мембраны затрудняет релаксацию $V_2 \rightarrow V_1$. В отсутствие акцепторов энергии (например, АДФ) состояние $V_2S \sim M^*$ весьма медленно [125] релаксирует с выделением тепла в исходное состояние (дыхательный контроль). Фосфорилирование АДФ снимает химическое напряжение ($S \sim \rightarrow S$) и ускоряет релаксацию, замыкающую цикл (стадия 5).

Благодаря кооперативным свойствам мембраны состояния отдельных переносчиков и времена их релаксационных изменений взаимозависимы. Исходное состояние переносчика-трансформатора перед рабочим ходом (стадия б на рис. 8.7) существенно неравновесно, а перепад энергии при его релаксации определяется не только его собственными характеристиками, но и состоянием целых участков мембраны, которое в свою очередь зависит от ситуации в других пунктах сопряжения данной ЦЭТ, а может быть, и других ЦЭТ. По-видимому, за счет процессов такого типа может осуществляться регуляция электронного транспорта и трансформации энергии в мембранах. Вероятно, эта регуляция автоматически приводит к тому, что в правильно работающей фосфорилирующей мембране перепад энергии при релаксационном переходе $V_1^- \rightarrow V_2^-$ каждого переносчика-трансформатора к моменту его восстановления становится равным или превышает величину, необходимую для синтеза одной молекулы АТФ. Стехиометрия процесса (прохождение двух электронов через пункт сопряжения приводит к синтезу одной молекулы АТФ) выполняется лишь в среднем. Перенос одного электрона через всю ЦЭТ митохондрий от НАД-Н до O_2 приводит к образованию либо одной, либо двух молекул АТФ (в среднем 1,5) в зависимости от мгновенного состояния ЦЭТ. В ситуации, когда конформации переносчиков и положения их электронных уровней существенно неравновесны, бессмысленно пользоваться

обычными термодинамическими функциями и, в частности, окислительно-восстановительными потенциалами. Скорости отдельных стадий цикла (см. рис. 8.8) и, следовательно, отношения концентраций окисленных и восстановленных форм переносчиков могут сильно зависеть от состояния мембраны. Поэтому не удивительно отмеченное выше парадоксальное расхождение между результатами импульсных и стационарных экспериментов с ЦЭТ митохондрий (см. гл. 7).

Релаксация к равновесию возможна не только путем изменения конформации макромолекулы, но и путем изменения ее поверхностного заряда. Можно сказать, что возникающая после первичного акта (перенос электрона для молекулы, образование химического макроэрга для мембраны) конформация неравновесна не только геометрически, но и электрически. Если возможно достаточно быстрое изменение поверхностного заряда, то релаксация к равновесию возможна и без значительного изменения геометрии. Можно предположить, что на этом основано действие многих разобщителей. Как мы видели, в хемосмотической концепции разобщающее действие многих соединений связывалось с их способностью катализировать перенос ионов водорода через мембрану с последующей нейтрализацией ее электрического поля. Если действительно разобщители способны осуществлять быструю электрическую релаксацию переносчиков-трансформаторов и мембраны в целом, то соответствующие электронные уровни будут снижаться настолько быстро, что химические макроэрги не успеют образоваться, а время переноса электронов через пункт сопряжения резко уменьшится. Мы видели, что это действительно происходит (см. § 7.3).

Рассмотренные здесь физические основы механизма мембранного фосфорилирования согласуются также с результатами работы [126], где показано, что не существует общего для всех пунктов сопряжения промежуточного химического макроэрга.

В работе [127] обсуждается возможная роль мембранного потенциала в регуляции электронного транспорта и мембранного фосфорилирования.

В заключение следует еще раз подчеркнуть, что конкретные детали рассмотренных здесь механизмов (напри-

мер, участие аденина и карбоксильных групп АТФ-синтетазы в образовании первичных химических макроэргов) носят чисто иллюстративный характер и были необходимы лишь для более четкого обсуждения некоторых физических концепций.

Совершенно ясно, что для эффективного преобразования энергии необходимо возбуждать такие степени свободы системы, которые медленно обмениваются энергией с тепловыми степенями свободы. По-видимому, наиболее подходящими для этой цели являются механические степени свободы. Мы видели, что способность к направленным конформационным изменениям, т. е. к механическому движению под действием локальных возмущений, есть отличительная особенность белковых макромолекул. Можно полагать, что эта особенность используется во всех процессах трансформации энергии в клетке, в том числе и в процессах субстратного и мембранного фосфорилирования.

Не исключено, что индуцировать требуемые релаксационные изменения АТФ-синтетазы можно в принципе и без участия переносчика-трансформатора, а с помощью других возмущающих агентов, например светом (фотоперенос электрона на активный центр) или резкими изменениями рН, ионного состава и т. д.

В этой книге была сделана попытка сформулировать некоторые общие физические проблемы, которые встают перед исследователем, анализирующим биологические явления.

В основу положено представление о биологических системах как о машинах, т. е. конструкциях, обладающих выделенными степенями свободы и способных, с одной стороны, использовать внутреннюю энергию для совершения полезной работы, а с другой — создавать осмысленную упорядоченность — информацию. Как мы видели, такие представления применимы уже на уровне биополимеров.

От машин, которые может сейчас создавать человек, биологические машины отличаются прежде всего тем, что в них механические и статистические компоненты не отделены друг от друга, а почти на всех уровнях организации пространственно совмещены.

Как и все машины, живые системы характеризуются прежде всего кинетической неравновесностью. Особенности их функционирования на разных уровнях организации определяются не столько тем, что они поддерживаются в неравновесном состоянии благодаря обмену энергией и веществом с окружающей средой, сколько тем, что переход к равновесию затруднен кинетически.

Процессы, идущие в живой материи и с живой материей, полностью подчиняются всем законам термодинамики (либо равновесной, либо неравновесной в зависимости от рассматриваемых интервалов времени). Однако в связи с указанной выше механичностью живых систем и их компонент привычный термодинамический подход оказывается в большинстве случаев малопродуктивным. Наиболее интересные свойства живого, даже на уровне макромолекул и субклеточных структур (такие, как ферментативный катализ и трансформация энергии), существенно связаны с возбуждением механических, выделенных, мед-

ленно релаксирующих степеней свободы. Я попытался (естественно, пока на чисто феноменологическом уровне) охарактеризовать возможные пути подхода к решению возникающих при этом проблем.

Трудности, возникающие на пути адекватного физического описания основных характеристик макромолекулярных и субклеточных структур живой материи, связаны не только с их кинетической неравновесностью, но и с тем, что степень этой кинетической неравновесности меняется в ходе их функционирования и при незначительном изменении таких параметров, как температура и рН. Последнее обстоятельство делает бессмысленным использование многих понятий и формул, с успехом применявшихся при изучении процессов с участием более простых молекул. Создание соответствующих количественных и полуэмпирических теорий, способных заменить подходы Вант-Гоффа в термодинамике и Аррениуса — Эйринга в кинетике, — важнейшая задача, стоящая сегодня перед наукой, называемой биологической физикой.

Далеко не все биологические явления допускают в настоящее время не только решение соответствующих физических проблем, но даже их формулировку. Ту часть биологии, которая настолько проста и настолько хорошо изучена, что в ней возможна уже сейчас хотя бы постановка физических вопросов и применение принципов исследования, разработанных в физике, можно назвать (правда, такое название весьма неудачно), биологической физикой.

Можно полагать, что эта часть биологии будет неуклонно расти, асимптотически приближаясь к целому (хотя мы сегодня находимся еще в самом начале пути). Никаких принципиальных запретов здесь не видно. Не следует, однако, закрывать глаза на то, что сегодня ученые не имеют ни малейшего представления о том, какими окажутся эти физические подходы, не только для столь сложных биологических явлений, как мышление, но и для таких фундаментальных и, следовательно, простых биологических процессов, как морфогенез. В гл. 1 уже было сказано, что вряд ли преодоление этих трудностей будет связано с необходимостью создания принципиально новой, специально «биологической» физики. Просто мы еще слишком плохо знаем биологию.

Жизнь в том виде, в каком она существует на нашей планете, и во всяком случае достаточно сложные ее формы, способные к самопознанию, есть, по-видимому, явление не только чрезвычайно редкое, но, вероятно, единственное во Вселенной.

Было бы обидно поэтому не воспользоваться, таким счастливым стечением обстоятельств и не употребить все силы для изучения живой материи — самого интересного предмета исследования для живой материи, способной к исследованию.

К главе 1

1. Л. А. Блюменфельд, в сб. «О сущности жизни», «Наука», 1964, стр. 121.
2. М. Eigen, Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules, Naturwissenschaften 58, 465 (1971).
3. Н. В. Тимофеев-Ресовский, Н. Н. Воронцов, А. В. Яблоков, Краткий очерк теории эволюции, «Наука», 1969.

К главе 2

1. Э. Шредингер, Что такое жизнь с точки зрения физики?, ИЛ, 1947.
2. С. E. Shannon, W. Weaver, The mathematical theory of communication, Univ. of Illinois Press, 1949.
3. J. C. Maxwell, Theory of heat, London, 1871.
4. L. Szillard, Über die Entropieverminderung in einem thermodynamischen System bei Eingriffen intelligenter Wesen, Z. Physik 53, 840 (1929).
5. P. Demers, Les demons de Maxwell et le second principe de la thermodynamique, Can. J. Research A22, 27 (1944).
6. P. Demers, Second law and the quantum theory, Can. J. Research A23, 47 (1945).
7. J. Rothstein, Information, measurements and quantum mechanics, Science 114, 171 (1951).
8. J. Rothstein, Information and thermodynamics, Phys. Rev. 85, 135 (1952).
9. Л. Бриллюэн, Наука и теория информации, Физматгиз, 1960.
10. Г. Кастлер, Возникновение биологической организации, «Мир», 1967.

К главе 3

1. А. Я. Хинчин, Математические основания статистической механики, Гостехиздат, 1943.
2. А. М. Молчанов, Термодинамика и эволюция, в сб. «Колебательные процессы в биологических и химических системах», «Наука», 1967, стр. 292.
3. L. Onsager, Reciprocal relations in irreversible processes. 1, Phys. Rev. 37, 405 (1931).

4. *L. Onsager*, Reciprocal relations in irreversible processes. 2, *Phys. Rev.* 38, 2265 (1931).
5. Э. С. Бауэр, Теоретическая биология, изд. ВИЭМ, 1935.
6. А. Г. Гурвич, Теория биологического поля, Медгиз, 1944.
7. С. Де Гроот, Термодинамика необратимых процессов, ИЛ, 1956.
8. С. Де Гроот, П. Мазур, Неравновесная термодинамика, «Мир», 1967.
9. Р. Хаазе, Термодинамика необратимых процессов, «Мир», 1967.
10. P. S. Glansdorf, J. Prigogine, On a general evolution criterion of macroscopic physics, *Physica* 30, 351 (1964).
11. J. Prigogine, Structure, dissipation and life, in: «Theoretical physics and biology», North-Holland publ. Co., 1964, p. 23.
12. J. Keizer, R. F. Fox, Qualms regarding the range of validity of the Glansdorf — Prigogine criterion for stability of non-equilibrium states, *PNAS* 71, 192 (1974).
13. A. J. Lotka, Zur Theorie der periodischen Reaktionen, *Z. Phys. Chem.* 72, 508 (1910).
14. A. J. Lotka, Undamped oscillations derived from the law of mass action, *JACS* 42, 1595 (1920).
15. A. J. Lotka, Elements of physical biology, Dover Publ. Inc., 1925.
16. V. Volterra, Leçons sur la theory mathematique de la lutte pour la vie, Granthiers-Villars, Paris, 1931.
17. Д. А. Франк-Каменецкий, Термодинамические процессы в кинетике окислительных реакций, *ДАН СССР* 25, 672 (1939).
18. Д. А. Франк-Каменецкий, Кинетика сложных реакций. 1, *Усп. химии* 10, 373 (1941).
19. Б. П. Белоусов, Периодически действующая реакция и ее механизм. Рефераты по радиационной медицине за 1956 г., Медгиз, 1959, стр. 145.
20. А. М. Жаботинский, Периодический ход окисления малоновой кислоты в растворе, *Биофизика* 9, 306 (1964).
21. А. М. Жаботинский, Периодические окислительные реакции в жидкой фазе, *ДАН СССР* 157, 392 (1964).
22. А. М. Жаботинский, Колебательные химические реакции в гомогенной среде и смежные проблемы, в сб. «Колебательные процессы в биологических и химических системах», «Наука», 1967, стр. 149.
23. А. М. Жаботинский, А. П. Заикин, Пространственные эффекты в автоколебательной химической системе, в сб. «Колебательные процессы в биологических и химических системах», т. 2, Пушино-на-Оке, 1971, стр. 229.
24. А. М. Жаботинский, А. Н. Заикин, О механизме возникновения ведущих центров, в сб. «Колебательные процессы в биологических и химических системах», т. 2, Пушино-на-Оке, 1971, стр. 288.
25. A. N. Zaikin, A. M. Zhabotinsky, Concentration wave propagation in two-dimensional liquid-phase selfoscillating systems, *Nature* 225, 535 (1970).
26. А. М. Жаботинский, Концентрационные автоколебания, «Наука», 1974.

27. Биологические часы, «Мир», 1964.
28. Ю. М. Рожановский, Н. В. Степанова, Д. С. Чернавский, Что такое математическая биофизика? (Кинетические модели в биофизике), «Просвещение», 1971.
29. Е. Е. Сельков, Колебания в биохимических системах. Экспериментальные данные, гипотезы, модели, в сб. «Колебательные процессы в биологических и химических системах», «Наука», 1967, стр. 7.
30. Е. Е. Сельков, Клеточные часы как автоколебательная биохимическая система, в сб. «Колебательные процессы в биологических и химических системах», т. 2, Пущино-на-Оке, 1971, стр. 5.
31. Н. М. Чернавская, Д. С. Чернавский, Об автоколебаниях в процессах фотосинтеза, Биофизика 3, 521 (1958).
32. Н. М. Чернавская, Д. С. Чернавский, Периодические явления в фотосинтезе, УФН 72, 627 (1960).
33. Д. С. Чернавский, Н. М. Чернавская, О колебаниях в темновых реакциях фотосинтеза, в сб. «Колебательные процессы в биологических и химических системах», «Наука», 1967, стр. 51.
34. В. Hess, A. Boiteux, Oscillatory phenomena in biochemistry, Ann. Rev. Biochem. 40, 237 (1971).
35. L. Duysens, J. Amesz, Fluorescence spectrophotometry of reduced phosphopyridine nucleotide in intact cells in the near-ultraviolet and visible regions, BBA 24, 19 (1957).
36. A. T. Wilson, M. Calvin, The photosynthetic cycle. CO₂-dependent transients, JACS 77, 5948 (1955).
37. В. Chance, R. W. Estabrook, A. Ghosh, Damped sinusoidal oscillations of cytoplasmic reduced pyridine nucleotide in yeast cells, PNAS 51, 1244 (1964).
38. В. Chance, В. Hess, A. Betz, Isolierung eines oszillierendes Systems aus *S. Carlsbergensis*, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 68, 748 (1964).
39. В. Hess, В. Chance, A. Betz, DPNH oscillations in a cell-free extract of *S. Carlsbergensis*, BBRC 16, 182 (1964).
40. Д. С. Чернавский, Л. Н. Григоров, М. С. Полякова, Модулирование триггерных схем Жакоба и Моно, в сб. «Колебательные процессы в биологических и химических системах», «Наука», 1967, стр. 138.
41. Е. Е. Сельков, Self-oscillations in glycolysis, 1. A simple kinetic model, Eur J. Biochem. 4, 79 (1968).
42. Б. Гудвин, Временная организация клетки, «Мир», 1966.

К главе 4

1. Ю. И. Хургин, Д. С. Чернавский, С. Э. Шноль, Молекула белка-фермента как механическая система, Мол. биол. 1, 419 (1967).
2. И. М. Лифшиц, Некоторые вопросы статистической теории биополимеров, ЖЭТФ 55, 2408 (1968).
3. И. М. Лифшиц, А. Ю. Гросберг, Фазовая диаграмма полимерной глобулы и проблема самоорганизации ее пространственной структуры, ЖЭТФ 65, 2399 (1973).

4. *S. F. Edwards*, The statistical mechanics of polymers with excluded volume, Proc. Phys. Soc. 85, 613 (1968).
5. *K. F. Freed*, Functional integrals and polymer statistics, Adv. Chem. Phys. 22, 1 (1972).
6. *М. В. Волкенштейн*, Конфигурационная статистика полимерных цепей, Изд. АН СССР, 1959.
7. *И. М. Лифшиц, А. Ю. Гросберг*, Диаграмма состояний полимерной глобулы и проблема самоорганизации ее пространственной структуры, УФН 113, 331 (1974).
8. *И. М. Лифшиц*, Переход клубок — глобула в биополимерных макромолекулах, Материалы IV Межд. биофиз. конгр., Тезисы докладов, 1972, стр. 18.

К главе 5

1. *И. М. Лифшиц*, Некоторые вопросы статистической теории биополимеров, ЖЭТФ 55, 2408 (1968).
2. *И. В. Берестецкая, Ю. Н. Косаганов, Ю. С. Лазуркин, Е. Н. Трифонов, М. Д. Франк-Каменецкий*, Плавление ДНК, содержащей дефекты вторичной структуры, Мол. биол. 4, 137 (1970).
3. *М. Д. Франк-Каменецкий*, Теоретическое рассмотрение влияния различных факторов на тепловую денатурацию ДНК, ДАН СССР 157, 187 (1964).
4. *М. Д. Франк-Каменецкий*, Рассмотрение перехода спираль — клубок в гомополимерах методом наиболее вероятного распределения, Мол. биол. 2, 408 (1968).
5. *D. M. Crothers, B. H. Zimm*, Theory of the melting transition of synthetic polynucleotides: evaluation of the stacking free energy, J. Mol. Biol. 9, 1 (1964).
6. *Yu. S. Lazurkin, M. D. Frank-Kamenetski, E. N. Trifonov*, Melting of DNA: its study and application as a research method, Biopolymers 9, 1253 (1970).
7. *B. H. Zimm*, Theory of «melting» of the helical form in double chains of the DNA type, J. Chem. Phys. 33, 1349 (1960).
8. *M. D. Frank-Kamenetski, Yu. S. Lazurkin*, Conformational changes in DNA molecules, Ann. Rev. Biophys., Bioengin. 3, 127 (1974).
9. *М. Жолн*, Физическая химия денатурации белков, «Мир», 1968.
10. *W. W. Forest, J. M. Sturtevant*, The heat of denaturation of ferrihemoglobin in acid solution, JACS 82, 585 (1960).
11. *P. Bro, J. M. Sturtevant*, The heat content of bovine serum albumine in acid solution, JACS 80, 1789 (1958).
12. *J. Steinhardt, E. M. Zaiser*, Kinetic study of the reversible acid denaturation of ferrihemoglobin, JACS 75, 1599 (1953).
13. *E. M. Zaiser, J. Steinhardt*, Effect of temperature on the reversible pH-dependent denaturation of horse ferrihemoglobin, JACS 76, 2866 (1954).
14. *W. M. Jackson, J. F. Brandts*, Thermodynamics of protein denaturation. A calorimetric study of the reversible denaturation of chymotrypsinogen and conclusions regarding the accuracy of the two-state approximations, Biochemistry 9, 2294 (1970).

15. *P. L. Privalov, N. N. Khechinashvili, B. P. Atanasov*, Thermodynamic analysis of thermal transitions in globular proteins. 1. Calorimetric study of chymotrypsinogen, ribonuclease, and myoglobin, *Biopolymers* **10**, 1865 (1971).
16. *П. Л. Привалов*, Термодинамика температурных превращений глобулярных белков, *Материалы IV Межд. биофиз. конгр., Тезисы докладов, Симпозиумы, 1972*, стр. 16.
17. *P. L. Privalov*, Thermal investigations of biopolymer solutions and scanning microcalorimetry, *FEBS Letters* **40**, S140 (1974).
18. *P. L. Privalov, N. N. Khechinashvili*, A thermodynamic approach to the problem of stabilisation of globular protein structure: a calorimetric study, *J. Mol. Biol.* **86**, 665 (1974).
19. *П. Л. Привалов, Н. Н. Хечинашвили*, Калориметрическое исследование тепловой денатурации цитохрома С, *Биофизика* **19**, 14 (1974).
20. *С. В. Конев, С. А. Аксентьев, Е. А. Черницкий*, Кооперативные переходы белков в клетке, «Наука и техника», Минск, 1970.
21. *Е. А. Черницкий*, Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке, «Наука и техника», Минск, 1972.
22. *J. F. Brandts*, Thermodynamics of protein denaturation. 1. The denaturation of chymotrypsinogen, *JACS* **86**, 4291 (1964).
23. *J. F. Brandts*, Thermodynamics of protein denaturation. 2. A model of reversible denaturation and interpretations regarding the stability of chymotrypsinogen, *JACS* **86**, 4302 (1964).
24. *C. Tanford*, Protein denaturation, *Adv. Protein Chem.* **23**, 121 (1968).
25. *K. Okunuki*, Denaturation and inactivation of enzyme proteins, *Adv. Enzymol.* **23**, 29 (1961).
26. *H. F. Epstein, A. N. Schlechter, R. F. Chen, C. B. Anfinsen*, Folding of staphylococcal nuclease: kinetic studies of two processes in acid renaturation, *J. Mol. Biol.* **60**, 499 (1971).
27. *J. W. Teipel, D. E. Koshland, Jr.*, Kinetic aspects of conformational changes in proteins. 1. Rate of regain of enzyme activity from denaturated proteins, *Biochemistry* **10**, 792 (1971).
28. *J. W. Teipel, D. E. Koshland, Jr.*, Kinetic aspects of conformational changes in proteins. 2. Structural changes in renaturation of denaturated proteins, *Biochemistry* **10**, 798 (1971).
29. *С. Глэстон, К. Лейдлер, Г. Эйринг*, Теория абсолютных скоростей реакций, *ИЛ*, 1948.
30. *K. J. Laidler*, Chemical kinetics, 2nd ed., McGraw Hill, 1965.
31. *E. C. Adams, M. R. Weiss*, Calorimetric studies of the hemoglobin-haptoglobin reaction, *Biochem. J.* **115**, 441 (1969).
32. *F. Laviale, M. Rogart, A. Alfsen*, Calorimetric determination of the enthalpy and heat capacity changes for the association of haptoglobin with hemoglobin. 1. Demonstration of two interacting systems, *Biochemistry* **13**, 2231 (1974).
33. *L. G. Clarke*, Thesis, Univ. Vermont, 1966.
34. *D. D. F. Shiao, J. M. Sturtevant*, Calorimetric investigations of the binding of inhibitors to α -chymotrypsin. 1. The enthalpy of dilution of α -chymotrypsin and of proflavin and the enthalpy of binding of indoll, N-acetyl-D-tryptophan and proflavin to α -chymotrypsin, *Biochemistry* **8**, 4910 (1969).

35. *C. H. Johnson, J. R. Knowles*, The binding of inhibitors to α -chymotrypsin, *Biochem. J.* **101**, 56 (1966).
36. *R. J. Foster, C. Niemann*, The evaluation of the enzyme-inhibitor dissociation constants of α -chymotrypsin and several pairs of charged and uncharged competitive inhibitors at pH 7.9 and 6.9, *JACS* **77**, 3365 (1955).
37. *A. Yapel*, Thesis, Univ. of Minnesota, 1966.
38. *D. D. F. Shiao*, Calorimetric investigation of the binding of inhibitors to α -chymotrypsin. 2. A systematic comparison of thermodynamic functions of variety of inhibitors to α -chymotrypsin, *Biochemistry* **9**, 1083 (1970).
39. *H. J. Hinz, D. D. F. Shiao, J. M. Sturtevant*, Calorimetric investigation of inhibitor binding to rabbit muscle aldolase, *Biochemistry* **10**, 1347 (1971).
40. *S. F. Velick, J. P. Baggott, J. M. Sturtevant*, Thermodynamics of nicotinamide adenine dinucleotide addition to the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of yeast and of rabbit. An equilibrium and calorimetric analysis over a range of temperatures, *Biochemistry* **10**, 779 (1971).
41. *M. W. Kirscher, H. K. Schachman*, Conformational changes in proteins as measured by difference sedimentation studies. 1. A technique for measuring small changes in sedimentation coefficient, *Biochemistry* **10**, 1900 (1971).
42. *M. W. Kirscher, H. K. Schachman*, Conformational changes in proteins as measured by difference sedimentation studies. 2. Effect of stereospecific ligands on the catalytic subunit of aspartate transcarbamylase, *Biochemistry* **10**, 1919 (1971).
43. *G. I. Lichtenstein*, The dynamic structure of proteins and enzyme catalysis, *Studia Biophys.* **33**, 185 (1972).
44. *C. M. Dobson, R. J. P. Williams*, An NMR study of the dynamics of inhibitor-induced conformational changes in lysozyme, *FEBS Letters* **56**, 362 (1975).
45. *Л. А. Блюменфельд*, Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода, «Советская наука», 1957.
46. *М. Вейсблут*, Физика гемоглобина, в сб. «Структура и связь», «Мир», 1969, стр. 11.
47. *М. Perutz*, Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin. Heme-heme interaction and the problem of allostery, *Nature*, **228**, 726 (1970).
48. *М. Perutz*, Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin. Bohr effect and combination with organic phosphates, *Nature* **228**, 734 (1970).
49. *Л. А. Блюменфельд*, Химическое строение гемоглобина и механизм реакции обратимого присоединения кислорода, *ДАН СССР* **85**, 1111 (1952).
50. *J. L. Hoard*, Stereochemistry of porphyrins, in: «Hemes and hemo-proteins», Acad. Press, 1966, p. 9.
51. *J. A. Hewitt, J. V. Kilmartin, L. F. Ten Eyck, M. F. Perutz*, Non-cooperativity of the $\alpha\beta$ -dimers in the reaction of hemoglobin with oxygen, *PNAS* **69**, 203 (1972).
52. *М. Perutz*, Nature of haem-haem interactions, *Nature* **237**, 495 (1972).

53. *M. Perutz, L. F. Ten Eyck*, Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 36, 295 (1971).
54. *A. Alpert, R. Banerjee, L. Lindqvist*, Rapid structural changes in human haemoglobin studied by laser photolysis, BBRC 46, 913 (1972).
55. *Q. H. Gibson*, The photochemical formation of a quickly reacting forms of haemoglobin, Biochem. J. 71, 293 (1959).
56. *A. Hvidt, S. O. Nielson*, Hydrogen exchange in proteins, Adv. Protein Chem. 21, 287 (1966).
57. *S. W. Englander, N. Downer, H. Teitelbaum*, Hydrogen exchange, Ann. Rev. Biochem. 41, 903 (1972).
58. *S. W. Englander, A. Rolfe*, Hydrogen exchange of respiratory proteins. 3. Structural and free energy changes in hemoglobin by use of a difference method, J. Biol. Chem. 248, 4852 (1973).
59. *L. A. Blumenfeld, R. M. Davydov, S. N. Magonov, R. O. Vilu*, Studies on the conformational changes of metalloproteins induced by electrons in water-ethylene glycol solutions at low temperatures. Hemoglobin, FEBS Letters 49, 246 (1974).
60. *Л. А. Блюменфельд, Д. Ш. Бурбаев, А. Ф. Ванин, Р. О. Вилу, Р. М. Давыдов, С. Н. Магонов*, Неравновесные структуры металлоорганических центров ферментов, Ж. стр. химии 15, 1030 (1974).
61. *Л. А. Блюменфельд, Р. М. Давыдов, В. К. Ваняг, С. Н. Куприн, Н. С. Фель, П. И. Долин*, Исследование методом импульсного радиоллиза конформационно-неравновесных состояний гемоглобина и его комплексов, Электрохимия 13, № 5 (1977).
62. *G. S. Adair*, The oxygen dissociation curve of hemoglobin, J. Biol. Chem. 63, 529 (1925).
63. *R. T. Ogata, H. M. McConnell*, States of hemoglobin in solution, Biochemistry 11, 4792 (1972).
64. *J. Monod, J. Wyman, J. P. Changeux*, On the nature of allosteric transitions: a plausible model, J. Mol. Biol. 12, 88 (1965).
65. *D. E. Koshland, Jr., G. Nemethy, D. Filmer*, Comparison of experimental binding data and theoretical models in protein containing subunits, Biochemistry 5, 365 (1966).
66. *W. N. Huestis, M. A. Raftery*, Conformation and cooperativity in hemoglobin, Biochemistry 14, 1866 (1975).
67. *Ю. А. Ермаков, В. И. Пасечник, С. В. Тульский*, Исследование фотодиссоциации карбоксигемоглобина при разных степенях насыщения, Биофизика 20, 591 (1975).
68. *Ю. А. Ермаков, В. И. Пасечник*, Кинетика реакций гемоглобина с окисью углерода. I. Релаксационные измерения при фотолитическом освещении, Биофизика 21, 629 (1976).
69. *Ю. А. Ермаков, С. И. Куприн, В. И. Пасечник*, Кинетика реакций гемоглобина с окисью углерода. II. Анализ кинетических схем в линейном приближении, Биофизика 21, 788 (1976).
70. *В. И. Пасечник*, Об особенностях релаксационных экспериментов для белков с памятью, Биофизика 21, 746 (1976).
71. *Л. А. Блюменфельд, Ю. А. Ермаков, В. И. Пасечник*, Кинетика реакций гемоглобина с окисью углерода. III. О существовании конформационно-неравновесных молекул гемоглоби-

- на в процессах присоединения и диссоциации CO, Биофизика **22**, 8 (1977).
72. *R. Dickerson, T. Takano, D. Eisenberg, O. B. Kallai, R. Swanson, A. Cooper, E. Margoliash*, Ferricytochrom C. 1. General features of the horse and bonito proteins at 2.8 Å resolution, *J. Biol. Chem.* **246**, 1511 (1971).
 73. *T. Takano, R. Swanson, O. B. Kallai, R. E. Dickerson*, Conformational changes upon reduction of cytochrome C, Cold Spring Harbor Symposium on Quant. Biol. **36**, 397 (1971).
 74. *R. Swanson, B. L. Trus, N. Mandel, G. Mandel, O. B. Kallai, R. E. Dickerson*, Tuna cytochrome C at 2.0 Å resolution. 1. Ferricytochrome structure analysis, Preprint, 1976.
 75. *T. Takano, B. L. Trus, N. Mandel, G. Mandel, O. B. Kallai, R. Swanson, R. E. Dickerson*, Tuna cytochrome C at 2.0 Å resolution. 2. Ferrocyclochrome structure analysis, Preprint, 1976.
 76. *F. Margoliash, A. Shejter*, Cytochrome C, *Adv. Protein Chem.* **21**, 113 (1966).
 77. *D. D. Ulmer, J. H. R. Kägi*, Hydrogen-deuterium exchange of cytochrome C. 1. Effect of oxidation state, *Biochemistry* **7**, 2740 (1968).
 78. *L. A. Blumenfeld, R. M. Davydov, N. S. Fel', S. N. Magonov, R. O. Vilu*, Studies on the conformational changes of metalloproteins induced by electrons in water-ethylene glycol solutions at low temperatures. Cytochrome C, *FEBS Letters* **45**, 256 (1974).
 79. *J. Pecht, M. Faraggi*, Electron transfer to ferricytochrome C: reaction with hydrated electron and conformational changes involved, *PNAS* **69**, 902 (1972).
 80. *I. Aviram, A. Shejter*, On the conformation change attending the hydration of lyophilized cytochrom C, *Biopolymers* **11**, 2441 (1972).
 81. *Л. В. Беловолова, Л. А. Блюменфельд, Д. Ш. Бурбаев, А. Ф. Ванин*, Об образовании комплекса между окисью углерода и цитохромом с, *Мол. биол.* **9**, 934 (1975).
 82. *S. Greschner, L. A. Blumenfeld, M. V. Genkin, R. M. Davydov, N. M. Raldugina*, Kinetics of conformational changes in acidic cytochrome C induced by salts, *Studia biophys.* **57**, 109 (1976).
 83. *L. A. Blumenfeld, S. Greschner, M. V. Genkin, R. M. Davydov, N. M. Raldugina*, Kinetic study of conformational changes in ferricytochrome C induced by pH change, *Studia biophys.* **57**, 110 (1976).
 84. *Г. И. Лухтенштейн*, Закономерности в энтропийных и энергетических свойствах ферментативных процессов, *Биофизика* **11**, 24 (1966).
 85. *R. Lumry, Sh. Rajender*, Enthalpy-entropy compensation phenomena in water solutions of proteins and small molecules — an ubiquitous property of water, *Biopolymers* **9**, 1125 (1970).
 86. *Г. И. Лухтенштейн, Б. И. Сухоруков*, О кинетике кооперативных процессов, *ЖФХ* **38**, 747 (1964).
 87. *J. G. Beeststone, D. H. Irvine*, Reactivity differences between haemoglobins. 4. The thermodynamics of ionization of some vertebrate haemoglobins, *J. Chem. Soc. A*, 5090 (1964).

88. *J. G. Beettlestone, D. H. Irvine*, Reactivity differences between haemoglobins. 5. Further studies on the ionization of methaemoglobins, *J. Chem. Soc. A*, 3271 (1965).
89. *A. C. Anusiem, J. G. Beettlestone, D. H. Irvine*, Reactivity differences between haemoglobins. 6. The reaction of human methaemoglobins A and C with azide ion, and the concept of «haemlinked» groups, *J. Chem. Soc. A*, 357 (1966).
90. *J. G. Beettlestone, D. H. Irvine*, Reactivity differences between haemoglobins. 7. The effect of ionic strength on the affinity of methaemoglobins A and C for azide ion. A test of the dielectric cavity model for methaemoglobins, *J. Chem. Soc. A*, 951 (1968).
91. *A. C. Anusiem, J. G. Beettlestone, D. H. Irvine*, Reactivity differences between haemoglobins. 8. The thermodynamics of the reaction of human methaemoglobins A and C with fluoride, thiocyanate, and cyanide ions. An interpretation of enthalpy changes in terms of hydration, *J. Chem. Soc. A*, 960 (1968).
92. *П. Л. Привалов*, Тепловые исследования водных растворов биополимеров, Докторская диссертация, Пушкино-на-Оке, 1970.
93. *Я. С. Лебедев, Ю. Д. Цветков, В. В. Воеводский*, О происхождении компенсационного эффекта в случае реакции рекомбинации радикалов в облученных полимерах, *Кинетика и катализ* 1, 496 (1960).
94. *С. Э. Шноль*, О самопроизвольных синхронных переходах молекул актомиозина в растворе из одного состояния в другое, *Вопросы мед. хим.* 4, 443 (1958).
95. *С. Э. Шноль*, Синхронные конформационные колебания молекул актина, миозина и актомиозина в растворах, в сб. «Молекулярная биофизика», «Наука», 1965, стр. 56.
96. *С. Э. Шноль*, Конформационные колебания макромолекул, в сб. «Колебательные процессы в биологических и химических системах», «Наука», 1967, стр. 22.
97. *С. Э. Шноль*, Спонтанные обратимые изменения («конформационные колебания») препаратов мышечных белков, Докторская диссертация, Пушкино-на-Оке, 1970.
98. *С. Э. Шноль*, Синхронные в макрообъеме колебания АТФ-азной активности в концентрированных препаратах актомиозина, в сб. «Колебательные процессы в биологических и химических системах», т. 2, Пушкино-на-Оке, 1971, стр. 20.
99. *С. Э. Шноль, В. И. Гришина*, Сложно-периодический характер изменения концентраций различных веществ в крови, *Биофизика* 9, 376 (1964).
100. *С. Э. Шноль, О. А. Руднева, Б. Л. Никольская, Т. А. Ревельская*, Изменения амплитуды самопроизвольных переходов препаратов актомиозина из одного состояния в другое при хранении препаратов, *Биофизика* 6, 166 (1961).
101. *Е. П. Четверикова*, Колебания активности креатинкиназы, выделенной из скелетных мышц, *Биофизика*, 13, 864, (1968).
102. *Е. П. Четверикова*, Конформационные колебания мышечной креатинкиназы в растворе, в сб. «Колебательные процессы в биологических и химических системах», т. 2, Пушкино-на-Оке, 1971, стр. 25.

103. В. В. Рыбина, Е. П. Четверикова, Реактивность и колебания сульфгидрильных групп креатинкиназы, в сб. «Колебательные процессы в биологических и химических системах», т. 2, Пушкино-на-Оке, 1971, стр. 29.
104. S. E. Snoll, E. P. Chetverikova, Synchronous reversible alterations in enzymatic activity (conformational fluctuations) in actomyosin and creatine kinase preparations, ВВА 403, 89 (1975).
105. D. Meadows, O. Yardetzky, Nuclear magnetic resonance studies of the structure and binding sites of enzymes. 4. Cytidine-3-monophosphate binding to ribonuclease, PNAS 61, 406 (1968).
106. J. L. Markby, M. N. Williams, O. Yardetzky, Nuclear magnetic resonance studies of the structure and binding sites of enzymes. 12. A conformational equilibrium in staphylococcal nuclease involving a histidine residue, PNAS 65, 645 (1970).
107. H. Rüterjans, H. Witzel, O. Pongs, Proton magnetic resonance studies on ribonuclease T, BBRC 37, 247 (1969).
108. K. Linderström-Lang, J. Schellmann, Protein structure and enzyme activity, The Enzymes 1, 443 (1959).

К главе 6

1. С. Бернхард, Структура и функция ферментов, «Мир», 1971.
2. А. Е. Браунштейн, Активные центры и природа каталитического действия ферментов, ЖВХО, им. Менделеева 8, 81 (1963).
3. М. В. Волькенштейн, Физика ферментов, «Наука», 1967.
4. М. Диксон, Э. Уэбб, Ферменты, «Мир», 1966.
5. М. Eigen, G. G. Hammes, Elementary steps in enzyme kinetics, Adv. Enzymol. 25, 1 (1963).
6. С. Е. Бреслер, Об активном центре ферментов, Труды V Межд. биохим. конгр., Симп. 1, Изд. АН СССР, 1962, стр. 51.
7. Э. Л. Смит, Д. Р. Киммель, А. Лайт, Структура папаина, Труды V Межд. биохим. конгр., Симп. 4, Изд. АН СССР, 1962, стр. 148.
8. J. Shevellier, J. Jacquot-Armand, J. Inn, Recherche d'une activité enzymatique dans les hydrolysats de trypsine, ВВА, 92, 521 (1964).
9. R. Frader, A. Light E. L. Smith, Chemical and enzymic studies on the aminoterminal sequence of papain, J. Biol. Chem. 240, 253 (1965).
10. Э. Коскоер, Молекулярная биохимия, «Мир», 1964.
11. D. E. Koshland, Jr., R. E. Neet, The catalytic and regulatory properties of enzymes, Ann. Rev. Biochem. 37, 672 (1968).
12. D. E. Koshland, Jr., Comparison of nonenzymic and enzymic reaction velocities, J. Theor. Biol. 2, 75 (1962).
13. S. Milstien, L. A. Cohen, Rate acceleration by stereopopulation control models for enzyme action, PNAS, 67, 1143 (1970).
14. R. Lumry, Some aspects of the thermodynamics and mechanism of enzymic catalysis, The Enzymes 1, 157 (1959).
15. H. Eyring, R. Lumry, J. D. Spikes, Kinetics of enzyme-catalyzed reactions, in: «The mechanism of enzyme action», J. Hopkins Press, 1954, p. 123.

16. *D. E. Koshland, Jr.*, Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis, *PNAS* 44, 98 (1958).
17. *М. В. Волькенштейн*, Электронно-конформационные взаимодействия в биологических системах, *Изв. АН СССР, сер. биол.*, 805 (1971).
18. *М. В. Волькенштейн, Р. Р. Догонадзе, А. К. Мадумаров, Э. Д. Урушадзе, Ю. И. Харкац*, К теории ферментативного катализа, *Мол. биол.* 6, 431 (1972).
19. *E. A. Moelwyn-Hughes*, Physical chemistry and chemical kinetics of enzymes, *The Enzymes* 1, 28 (1959).
20. *C. N. Hinshelwood*, The theory of unimolecular reactions, *Proc. Roy. Soc. A*113, 230 (1926).
21. *L. S. Kassel*, The kinetics of homogenous gas reactions, *The Chem. Catalog. Comp.*, N. Y., 1932.
22. *N. B. Slater*, Gaseous unimolecular reactions: theory of the effects of pressure and of vibrational degeneracy, *Phil. Trans. Roy. Soc. A*246, 57 (1953).
23. *Э. С. Бауэр*, Теоретическая биология, изд. ВИЭМ, 1935.
24. *Н. И. Кобозев*, О механизме катализа. III. О валентной и энергетической форме гетерогенного и ферментативного катализа, *ЖФХ*, 34, 1443 (1960).
25. *Н. И. Кобозев*, Принцип ансамбля и аггравации в катализе. III. О надструктурном факторе активности (эффект аггравации в катализе и кинетике), *ЖФХ* 21, 1414 (1947).
26. *Ю. И. Хургин, Д. С. Чернавский, С. Э. Шноль*, Молекула белка-фермента как механическая система, *Мол. биол.* 1, 419 (1967).
27. *С. Э. Шноль*, Конформационные колебания макромолекул, в сб. «Колебательные процессы в биологических и химических системах», «Наука», 1967, стр. 22.
28. *В. И. Дещеревский, А. М. Жаботинский, Е. Е. Сельков, Н. П. Сидоренко, С. Э. Шноль*, Колебательные биологические процессы на молекулярном уровне, *Биофизика* 15, 225 (1970).
29. *Н. П. Сидоренко, В. И. Дещеревский*, Обобщенная форма кинетических уравнений ферментативного катализа как следствие учета релаксации белковой макромолекулы, *Биофизика*, 15, 785 (1970).
30. *F. J. Kajne, S. H. Suelter*, Effects of temperature, substrate, activating cations on the conformations of pyruvate kinase in aqueous solutions, *JACS* 87, 897 (1965).
31. *J. Reuben, F. J. Kajne*, Thallium-205 NMR study of pyruvate kinase and its substrates (evidence for a substrate induced conformational change), *J. Biol. Chem.* 246, 6227 (1971).
32. *G. G. Hammes, Cheng-Wen Wu*, Regulation of enzyme activity, *Science* 172, 1205 (1971).
33. *W. Balthasar*, Spin-labelling studies of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Eur. J. Biochem.* 22, 158 (1971).
34. *J. Schlessinger, A. Levitzki*, Molecular basis of negative co-operativity in rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *J. Mol. Biol.* 82, 547 (1974).
35. *K. Kirscher, E. Galleao, J. Schuster, D. Goodall*, Co-operative binding of nicotinamide-adenine dinucleotide to yeast glyceral-

- dehyde-3-phosphate dehydrogenase. 1. Equilibrium and temperature jump studies at pH 8.5 and 40° C, *J. Mol. Biol.* 58, 29 (1971).
36. *K. Kirscher, E. Galleao, J. Schuster, D. Goodall*, Co-operative binding of nicotinamide-adenine dinucleotide to yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. 2. Stopped flow studies at pH 8.5 and 40° C, *J. Mol. Biol.* 58, 51 (1971).
37. *Г. И. Лихтенштейн*, Исследование структуры и функции белков методом парамагнитных меток, *Усп. биол. химии* 12, 3 (1971).
38. *Г. И. Лихтенштейн*, Роль конформационных и энергетических факторов в ферментативном катализе, Докторская диссертация, ИХФ АН СССР., 1971.
39. *G. I. Lichtenstein*, The dynamic structure of proteins and enzyme catalysis, *Studia Biophys.* 33, 185 (1972).
40. *А. Л. Бучаченко, А. М. Вассерман*, Знаки констант сверхтонкого взаимодействия и спиновые плотности в азотокисных радикалах, *ЖСХ* 8, 27 (1967).
41. *А. Н. Кузнецов*, Уширение линий ЭПР под влиянием вращательной диффузии сферического радикала в анизотропной среде, *ЖСХ* 11, 535 (1970).
42. *В. П. Тимофеев, О. Л. Поляновский, М. В. Волькенштейн, О. В. Преображенская, Г. И. Лихтенштейн, Ю. В. Козанов*, Исследование конформационных свойств молекулы аспартат-трансаминазы с помощью спин-меток, *Мол. биол.* 6, 377 (1972).
43. *S. L. Hamilton, H. M. McConnell*, Spin labels, in: «Structural chemistry and molecular biology», W. H. Freeman & Co., 1968, p. 115.
44. *H. M. McConnell, B. C. McFarland*, Physics and chemistry of spin labels, *Quart. Rev. Biophys.* 3, 91 (1970).
45. *D. J. Stone, T. Buckman, P. L. Nordio, H. M. McConnell*, Spin-labelled biomolecules, *PNAS* 54, 1010 (1965).
46. *А. Н. Кузнецов*, Метод спинового зонда, «Наука», М., 1976.
47. *Г. И. Лихтенштейн, Ю. Д. Ахмедов*, Исследование конформационных переходов в лизоциме методом парамагнитных меток, *Мол. биол.*, 4, 551 (1970).
48. *Г. И. Лихтенштейн, В. П. Тимофеев, М. В. Волькенштейн, О. Л. Поляновский, Ю. В. Козанов*, Исследование конформационных переходов в глутаматаспартаттрансаминазе методом ЭПР, *Мол. биол.* 5, 1 (1971).
49. *J. C. Seidel, J. Gergely, M. Chopek*, The tryptic digestion of spin-labelled heavy meromyosin, *ABB*, 142, 223 (1971).
50. *Л. Г. Игнатьева, Т. Л. Серегина, Л. А. Blumenфельд, Э. К. Рууге, Р. И. Артюх, Г. Б. Постникова*, Исследование ферментативной активности миозина методом спиновой метки, *Биофизика* 17, 533 (1972).
51. *J. C. Seidel, J. Gergely*, Electron spin resonance of myosin spin labelled at the S₁ thiol groups during hydrolysis of adenosine triphosphate, *ABB* 158, 853 (1973).
52. *L. A. Blumenfeld, A. G. Ignatjeva*, Conformational changes of myosin under ATP hydrolysis, *Eur. J. Biochem.* 47, 75 (1974).

53. Н. В. Медведева, Э. К. Рууге, Л. А. Блюменфельд, Температурная зависимость спектров ЭПР спин-меченого миозина и его комплекса с АДФ, Биофизика 20, 26 (1975).
54. Э. К. Рууге, Н. В. Медведева, М. Н. Виленкина, Л. А. Блюменфельд, Исследование конформационных превращений миозина с помощью двух типов спиновых меток, Биофизика 21, 409 (1976).
55. Л. А. Блюменфельд, Активационные параметры ферментативных реакций, Биофизика 16, 724 (1971).
56. E. Goldberg, T. Wuntch, Electrophoretic and kinetic properties of *Rana pipiens* lactate dehydrogenase isozymes, J. Exp. Zool. 115, 101 (1967).
57. K. J. Laidler, Chemical kinetics of enzyme action, Clarendon Press, 1958.
58. С. В. Конев, С. А. Аксентьев, Е. А. Черницкий, Кооперативные переходы белков в клетке, «Наука и техника», Минск, 1970.
59. R. Lumry, Sh. Rajender, Enthalpy-entropy compensation phenomena in water solutions of proteins and small molecules — an ubiquitous property of water, Biopolymers 9, 1125 (1970).
60. G. Talsky, W. Müller, Temperaturverhalten einiger kinetischer Parameter bei der Hydrolyse von cyclischen Cytidin-2',3'-monophosphate durch Ribonuclease, H. S. Z. Physiol. Chem. 352, 1681 (1971).
61. E. H. Johnson, H. Eyring, M. J. Polissar, The kinetic basis of molecular biology, Wiley & Son, 1954.
62. J. Belehradek, Temperature and living matter, Protoplasm Monographien, Borntraeger-Verlag, Berlin, 1935.
63. J. Belehradek, Physiological aspects of heat and cold, Ann. Rev. Physiol. 19, 59 (1957).
64. A. W. Murray, Studies on the nature of the regulation by purine nucleotides of adenine phosphoribosyl transferase and of hypoxanthine phosphoribosyl transferase from Ehrlich ascites tumour cells, Biochem. J. 103, 271 (1967).
65. R. L. Miller, A. L. Bieber, Purification and properties of inosine monophosphate: pyrophosphate phosphoribosyltransferase, Biochemistry 7, 1420 (1968).
66. V. Massey, B. Curti, H. Ganther, A temperature dependent conformational change in d-amino acid oxidase and its effect on catalysis, J. Biol. Chem. 241, 2347 (1966).
67. G. M. Lehrer, R. Barker, Conformational changes in rabbit muscle aldolase. Kinetic studies, Biochemistry 9, 1533 (1970).
68. M. R. Paule, The effect of temperature on the kinetics of adenosine diphosphoglucose pyrophosphorylase from *Rhodospirillum rubrum*, Biochemistry 10, 4509 (1971).
69. Л. А. Блюменфельд, Об элементарном акте в ферментативном катализе, Биофизика 17, 954 (1972).
70. A. Alpert, R. Banerjee, L. Lindqvist, Rapid structural changes in human haemoglobin studied by laser photolysis, BBRC 46, 913 (1972).
71. В. Н. Морозов, О детерминированности времени перестройки сложных систем, Биофизика 17, 926 (1972).

72. *L. A. Blumenfeld*, The physical aspects of enzyme functioning, *J. Theor. Biol.* 58, 269 (1976).
73. *Н. В. Медведева, Э. К. Рууге, Л. А. Блюменфельд*, О релаксационном характере изменения активности некоторых ферментов при скачкообразных рН- и температурных переходах, *Биохимия* 39, 999 (1974).
74. *Д. С. Чернавский*, Физические модели биохимического катализа, «Знание», 1972.
75. *Б. И. Гольдштейн, М. А. Лившиц, М. В. Волькенштейн*, О кинетических проявлениях конформационных изменений ферментов, *Мол. биол.* 8, 784 (1974).
76. *Л. В. Беловолова, Л. А. Блюменфельд, Д. Ш. Бурбаев, А. Ф. Ванин*, Об образовании комплекса между окисью углерода и цитохромом с, *Мол. биол.* 9, 934 (1975).
77. *A. E. Braunstein, M. G. Kritsman*, Formation and breakdown of amino acids by intermolecular transfer of the amino groups, *Nature* 140, 503 (1937).
78. *V. I. Ivanov, M. J. Karpeicky*, Dynamic threedimensional model for enzymic transamination, *Adv. Enzymol.* 32, 21 (1969).

К главе 7

1. *L. Michaelis*, Oxidation-reduction systems of biological significance. 6. The mechanism of the catalytic effect of Fe on the oxidation of cysteine, *J. Biol. Chem.* 84, 777 (1929).
2. *L. Michaelis*, The formation of semiquinones as intermediary reduction products from pyocyanine and some other dyestuffs, *J. Biol. Chem.* 92, 241 (1931).
3. *L. Michaelis*, Theory of reversible two-step oxidation, *J. Biol. Chem.* 96, 703 (1932).
4. *E. Haas*, The mode of action of yellow pigment protein, *Biochem. Z.* 290, 291 (1937).
5. *Б. Чанс*, Свободные радикалы и фермент-субстратные комплексы в сб. «Свободные радикалы в биологических системах», ИЛ, 1963, стр. 11.
6. *B. Commoner, J. Townsend, G. Pake*, Free radicals in biological materials, *Nature* 174, 689 (1954).
7. *Л. А. Блюменфельд*, Спектры парамагнитного резонанса биологических объектов и миграция энергии, *Изв. АН СССР, сер. биол.*, 285 (1957).
8. *Л. А. Блюменфельд, А. Э. Калмансон*, Спектры электронного парамагнитного резонанса нативных и денатурированных белков, *ДАН СССР* 117, 72 (1957).
9. *Л. П. Каюшин, И. К. Коломийцева, К. М. Львов*, Изучение свободных радикалов в переживающих животных тканях, *ДАН СССР* 134, 1229 (1960).
10. *M. Eigen, P. Matthies*, Über Kinetik und Mechanismus der Primärreaktionen der Zersetzung von Chinon in alkalischer Lösung, *Chem. Ber.* 94, 3309 (1961).
11. *Л. А. Блюменфельд, В. В. Воеводский, А. Г. Семенов*, Применение электронного парамагнитного резонанса в химии, Изд. СО АН СССР, Новосибирск, 1962.

12. Д. Ингерем, Электронный парамагнитный резонанс в биологии, «Мир», 1972.
13. Сборник «Свободные радикалы в биологических системах», ИЛ, 1963.
14. Magnetic resonance in biological systems, Pergamon Press, 1967.
15. В. Commoner, J. F. Ternberg, Free radicals in surviving tissues, PNAS 47, 1374 (1961).
16. J. R. Mallard, M. Kent, Electron spin resonance in surviving rat tissues, Nature 210, 588 (1966).
17. О. Н. Бржевская и др., Свободно-радикальные состояния клеток и субклеточных компонент, Биофизика 12, 354 (1967).
18. G. A. Kerkut, M. L. Edwards, K. Leech, K. A. Munday, Free radicals in animal tissues, Experientia 17, 497 (1961).
19. А. В. Панеманглор, О роли воды и кислорода в образовании и гибели свободных радикалов в тканях животного происхождения, Кандидатская диссертация, МГУ, 1975.
20. А. Г. Четвериков, Л. А. Блюменфельд, Г. В. Фомин, Возможные механизмы возникновения и гибели свободно-радикальных состояний в клетках, Биофизика 10, 476 (1965).
21. L. A. Blumenfeld, A. G. Chetverikov, D. N. Kefalieve, A. F. Vanin, The free radical ESR signals in the frozen and freeze-drying animal and plant tissues, Studia biophys. 10, 101 (1968).
22. А. Г. Четвериков, Исследование спектров электронного парамагнитного резонанса биологических образцов, Биофизика 9, 678 (1964).
23. А. Г. Четвериков, Д. П. Кефалиева, А. Ф. Ванин, Сигналы ЭПР свободных радикалов в лиофилизированных и замороженных растительных объектах, Биофизика 14, 559 (1969).
24. О. Н. Бржевская, Л. П. Каюшин, М. Н. Кондрашева, О. С. Неделина, Е. М. Шекшеев, Исследование свободно-радикальных состояний в процессах дыхания и фосфорилирования в митохондриях, Биофизика 11, 1076 (1966).
25. Э. К. Рууге, Л. А. Блюменфельд, Свободно-радикальные состояния, возникающие в процессах электронного транспорта в митохондриях, в сб. «Биоэнергетика и биологическая спектродиффрактометрия», «Наука», 1967, стр. 127.
26. Н. М. Эмануэль, Т. Э. Липатова, Уменьшение количества свободных радикалов в клетках асцитного рака Эрлиха при воздействии пропионгаллата, ДАН СССР 130, 221 (1960).
27. А. Э. Калмансон, Л. П. Липчина, А. Г. Четвериков, Исследование методом электронного парамагнитного резонанса реакции взаимодействия с опухолевыми и нормальными клетками семихинонных ион-радикалов, возникающих из ингибиторов свободно-радикальных процессов, Биофизика 6, 410 (1961).
28. А. Г. Четвериков, А. Э. Калмансон, И. Г. Харитоненков, Л. А. Блюменфельд, Исследование методом ЭПР свободных радикалов в биологических объектах, возникающих во время протекания ферментативных реакций, Биофизика 9, 18 (1964).
29. И. Г. Харитоненков, Статическое и динамическое моделирование свободно-радикальных состояний биологических объектов, Кандидатская диссертация, МГУ, 1965.

30. *А. Э. Калмансон, И. Г. Харитоненков, А. Г. Четвериков, Л. А. Блюменфельд*, Параструйный метод исследования спектров ЭПР свободных радикалов в гетерогенных условиях, *Биофизика* **8**, 722 (1963).
31. *И. Н. Нактинис, А. Г. Черняускаене*, О природе свободно-радикального сигнала ЭПР, регистрируемого в высушенных живых тканях, *Биофизика* **19**, 1039 (1974).
32. *В. Б. Голубев, М. Н. Кузнецова, В. Б. Евдокимов*, Исследование процесса превращений в ряду хинон—семихинон — гидрохинон в щелочной среде. 1. Переход хинона в семихинон, *ЖФХ* **37**, 2795 (1963).
33. *Г. В. Фомин, Л. А. Блюменфельд, Б. И. Сухоруков*, Электронодонорные свойства иона гидроксила, *ДАН СССР*, **157**, 1199 (1964).
34. *Б. И. Лизогонький, А. В. Рагимов, А. А. Берлин*, Получение и исследование стабильных полирадикалов семихинонного типа, *ТЭХ* **1**, 511 (1965).
35. *Б. И. Шапиро, В. М. Казакова, Я. К. Сыркин*, Исследование механизма взаимодействия некоторых ароматических динитропроизводных со щелочью методом ЭПР, *ДАН СССР* **165**, 619 (1965).
36. *Г. В. Фомин, В. А. Римская*, Фотовосстановление водой (ионом OH^-) слабых органических акцепторов, в сб. «Состояние и роль воды в биологических объектах», «Наука», 1967, стр. 131.
37. *S. D. Lazarov, A. Trifonov, T. Popov*, Einiges zum Verhalten von *p*-Chinonen in aprotischen und protonenliefernden Medium, *Z. Phys. Chem.* **238**, 145 (1968).
38. *С. М. Шейн, Л. В. Брюховецкая, А. Д. Хмелинская, В. Ф. Стариченко, Т. М. Иванова*, Ион-радикальный механизм реакций ароматического нуклеофильного замещения, *Реакц. способн. орг. соед.* **6**, 1087 (1969).
39. *С. М. Шейн, Л. В. Брюховецкая, Ф. В. Пичугин, В. Ф. Стариченко, В. Н. Панфилов, В. В. Воеводский*, Образование анион-радикалов в реакциях ароматического нуклеофильного замещения, *ЖСХ* **11**, 243 (1970).
40. *Г. В. Фомин, Л. А. Блюменфельд, Р. М. Давыдов, Л. Г. Игнатьева*, Участие H_2O (ионов OH^-) в окислительно-восстановительных процессах, в сб. «Состояние и роль воды в биологических объектах», «Наука», 1967, стр. 120.
41. *Г. В. Фомин*, Исследование реакции иона гидроксила с органическими электронными акцепторами. Кандидатская диссертация, *ИХФ АН СССР*, 1969.
42. *В. Б. Голубев, Л. С. Ягужинский, А. В. Волков*, О механизме реакции хинонов с гидроксил-ионом, *Биофизика* **11**, 572 (1966).
43. *С. И. Шолина, Г. В. Фомин, Л. А. Блюменфельд*, Образование OH -радикалов при фотопереносе электрона от иона гидроксила к производным антрахинона, *ЖФХ* **43**, 800 (1969).
44. *Л. А. Блюменфельд, Л. В. Брюховецкая, Г. В. Фомин, С. М. Шейн*, Роль актов электронного переноса в реакциях органических соединений, *ЖФХ* **44**, 931 (1970).
45. *Г. В. Фомин, Л. М. Гурджиян, Л. А. Блюменфельд*, Механизм восстановления и гидроксильирования антрахинон-2-сульфонатов в щелочных растворах, *ДАН СССР* **191**, 151 (1970).

46. К. А. Билевич, О. Ю. Охлобыстин, Перенос электрона как элементарный акт органических реакций, Усп. химии **37**, 2162 (1968).
47. К. А. Bilevitch, N. N. Vubnov, O. Yu. Okhlobystin, Electron transfer as first step in nucleophilic substitution, Tetr. Letters, 3465 (1968).
48. Г. В. Фомин, Л. А. Блюменфельд, Л. М. Гурджиян, Механизм образования анион-радикалов в реакции органических акцепторов электрона с ионом OH^- , в сб. «Высокомолекулярные соединения», Изд. ИХФ АН СССР, 1970, стр. 284.
49. Г. В. Фомин, Н. Н. Катмазовский, Л. Г. Игнатьева, Л. А. Блюменфельд, Взаимодействие иона гидроксила с хинонами в растворах белков, Биофизика **13**, 765 (1968).
50. Л. М. Райхман, Л. А. Блюменфельд, Семихионные свободные радикалы в процессах дыхания и фосфорилирования в митохондриях, Биохимия **31**, 1127 (1966).
51. N. R. Boardman, The photochemical system of photosynthesis, Adv. Enzym. **30**, 1 (1968).
52. G. M. Cheniae, J. F. Martin, Sites of function of manganese within photosystem 2: roles in O_2 evolution and system 2, BBA **197**, 219 (1970).
53. G. Hind, R. L. Heath, S. Izawa, The role of chloride ion in photosynthesis, in: «Progress in photosynthetic research», vol. 2, Lichtenstein, 1969, p. 1022.
54. G. Vierke, On the impossibility of an OH-radical model for photosynthetic water oxidation, Z. Naturforsch. **27b**, 172 (1972).
55. J. M. McCord, J. Fridovich, The reduction of cytochrome C by milk xanthine oxidase, J. Biol. Chem. **243**, 5753 (1968).
56. J. M. McCord, J. Fridovich, Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein), J. Biol. Chem. **244**, 6049 (1969).
57. B. B. Keele, J. M. McCord, J. Fridovich, Superoxide dismutase from *E. Coli*. — new Mn-containing enzyme, J. Biol. Chem. **245**, 6176 (1970).
58. G. Rotilio, L. Calabrese, Properties of apoprotein and role of copper and zinc in protein conformation and enzyme activity of bovine superoxide dismutase, Biochemistry **11**, 2182 (1972).
59. H. Metsner, Lichtinduzierte Wasserspaltung in Photosynthese-Modell, H. S. Z. Physiol. Chem. **349**, 1586 (1968).
60. Г. Г. Комиссаров, Ю. С. Шумов, О возможности фотоэлектролиза воды в моделях, содержащих фотосинтетические пигменты, и в зеленом листе, ДАН СССР **182**, 1226 (1968).
61. Г. Г. Комиссаров, А. Н. Асанова, Ю. С. Шумов, Светоиндуцированное выделение кислорода в водной суспензии фотосинтетических пигментов, ДАН СССР, **206**, 1468 (1972).
62. Г. Г. Комиссаров, Ю. С. Шумов, Ю. Е. Борисевич, Фотовольтаическая батарея — функциональная модель хлоропласта, ДАН СССР **187**, 670 (1969).
63. А. А. Красновский, Г. П. Брин, Фотокаталитическое действие ZnO и TiO_2 в реакциях, идущих с выделением кислорода, ДАН СССР **139**, 142 (1961).

64. Г. В. Фомин, Г. П. Брин, М. В. Генкин, А. К. Любимова, Л. А. Блюменфельд, А. А. Красновский, Масс-спектрометрическое исследование фоторазложения воды в системе неорганический стабилизатор — акцептор электрона, ДАН СССР 212, 424 (1973).
65. Л. А. Блюменфельд, М. И. Темкин, О возможном механизме образования аденозинтрифосфорной кислоты в ходе окислительного фосфорилирования, Биофизика 7, 731 (1962).
66. О. Н. Бржевская, К. М. Львов, О. С. Неделина, К вопросу о существовании свободных радикалов при ферментативном гидролизе аденозинтрифосфата, Бисфизика 9, 500 (1964).
67. О. Н. Бржевская, Л. П. Каушин, О. С. Неделина, О существовании свободных радикалов при ферментативном гидролизе аденозинтрифосфата (АТФ), Биофизика 11, 213 (1966).
68. О. Н. Бржевская, О. С. Неделина, Исследование реакции гидролиза АТФ актомизоном в присутствии акридинового оранжевого, Биофизика 13, 141 (1968).
69. В. Chance, The nature of electron transfer and energy coupling reactions, FEBS Letters 23, 3 (1972).
70. В. S. S. Masters, N. H. Bilimoria, H. Kamin, Q. H. Gibson, The mechanism of 1- and 2-electron transfers catalysed by reduced triphosphopyridine nucleotide-cytochrome C reductase, J. Biol. Chem. 240, 4081 (1965).
71. R. C. Bray, P. F. Knowles, L. S. Meriwetter, ESR and the role of molybdenum in enzymic catalysis by milk xanthine oxidase, in: «Magnetic resonance in biological systems», Pergamon Press, 1967, p. 249.
72. P. F. Knowles, Evidence for semiquinone — molybdenum (V) interaction in molybdenum containing flavoproteins, in: «Magnetic resonance in biological systems», Pergamon Press, 1967, p. 265.
73. J. T. Spence, M. Heydanek, P. Hemmerich, An ESR study of molybdenum — flavin model reaction, in: «Magnetic resonance in biological systems», Pergamon Press, 1967, p. 269.
74. Э. Рэкер, Биоэнергетические механизмы, «Мир», 1967.
75. S. P. J. Albrecht, E. C. Slater, EPR studies at 20° K on the mitochondrial respiratory chain, BBA 245, 503 (1971).
76. S. P. J. Albrecht, E. C. Slater, Effect ATP on the EPR spectrum at 20° K of phosphorylating sub-mitochondrial particles, BBA 245, 508 (1971).
77. R. A. Glegg, P. B. Garland, Non-haem iron and the dissociation of piercidin A sensitivity from site I energy conservation in mitochondria from *Torulopsis utilis*, Biochem. J. 124, 135 (1971).
78. M. Gutman, T. P. Singer, H. Beinert, ESR studies on the iron-sulfur centers of DPNH dehydrogenase during the redox cycle of the enzyme, BBRC 44, 1572 (1971).
79. N. R. Orme-Johnson, W. H. Orme-Johnson, R. E. Hansen, H. Beinert, J. Hatefi, EPR detectable electron acceptors in sub-mitochondrial particles from beef heart with special reference to the iron-sulfur compound of DPNH-ubiquinone reductase, BBRC 44, 446 (1971).

80. E. C. Slater, The coupling between energy-yielding and energy-utilizing reactions in mitochondria, *Quart. Rev. Biophys.* 4, 35 (1971).
81. P. B. Garland, Biochemical applications of continuous culture: energy-conservations mechanisms in *Torulopsis utilis*, *Biochem. J.* 118, 329 (1970).
82. D. O. Hall, R. Cammack, K. K. Rao, Non-haem iron proteins, in: «Iron in biochemistry and medicine», Acad. Press, 1974, p. 279.
83. Д. Ш. Бурбаев, А. В. Лебанидзе, О гетерогенности железосерных центров N 2 в митохондриях и тканях сердца быка, *Биофизика* 21, 942 (1976).
84. Д. Грин, С. Флейшер, Молекулярная организация биологических преобразующих систем, в сб. «Горизонты биохимии», «Мир», 1964, стр. 293.
85. M. Klingenberg, A. Kröger, The role of ubiquinone in the respiratory chain, in: «Biochemistry of mitochondria», Acad. Press, 1967, p. 11.
86. B. Chance, E. R. Redfearn, Direct spectrophotometric studies of the kinetics of oxidation and reduction of ubiquinone of heart-muscle particles, *Biochem. J.* 80, 632 (1961).
87. B. Chance, D. F. Wilson, P. L. Dutton, M. Erecinska, Energy coupling mechanisms in mitochondria: kinetic, spectroscopic, and thermodynamic properties of an energytransducing form of cytochrome b, *PNAS* 66, 1175 (1970).
88. H. Theorell, A. Akesson, Absorbtion spectrum of further purified cytochrome C, *Science* 90, 67 (1939).
89. A. Schejter, P. George, The 695 m μ band of ferricytochrome C and its relation to protein conformation, *Biochemistry* 3, 1045 (1964).
90. G. Greenwood, G. Palmer, Evidence for the existence of two functionally distinct forms of cytochrome C monomers at alkaline pH, *J. Biol. Chem.* 240, 3660 (1965).
91. G. Brandt, P. C. Parks, G. H. Cherlinski, G. P. Hess, On the elucidation of the pH dependence of the oxidation-reduction potential of cytochrome C at alkaline pH, *J. Biol. Chem.* 241, 4180 (1966).
92. G. Czerlinski, V. Bracokova, Kinetics of the interconversions among the electron-transfer-linked forms of ferricytochrome C, *ABB* 147, 707 (1971).
93. M. F. Wilson, C. Greenwood, Studies on ferricytochrome C. 2. A correlation between reducibility and the possession of 695 nm absorbtion band of ferricytochrome C, *Eur. J. Biochem.* 22, 11 (1971).
94. B. Chance, C. Lee, L. Mela, Some properties of the 695 m μ band of cytochrome C, in: «Abstr. Symposium on cytochromes», Osaka, 1967, p. 181.
95. K. S. Amble, A. Venkataraman, Depolymerisation of cytochrome oxidase to a soluble monomeric protein, *BBRC* 1, 133 (1959).
96. R. C. Criddle, R. M. Bock, Physico-chemical properties of soluble cytochrome oxidase, *BBRC* 1, 138 (1959).
97. B. Chance, M. Erecinska, Flow flash kinetics of the cytochrome a₃ — oxygen reaction in coupled and uncoupled mitochondria using the liquid dye laser, *ABB* 143, 675 (1971).

98. *H. Beinert, D. E. Griffiths, D. S. Wharton, R. H. Sands*, Properties of the Cu associated with cytochrome oxidase as studied by paramagnetic resonance spectroscopy, *J. Biol. Chem.* **237**, 2337 (1962).
99. *M. Morrison, S. Horie, H. S. Mason*, Cytochrome *C* oxidase components. 2. A study of the copper in cytochrome *C* oxidase, *J. Biol. Chem.* **238**, 2220 (1963).
100. *Oxidases and related redox systems*, J. Willey, 1965, p. 929.
101. *R. C. Criddle, R. M. Bock, D. E. Green, H. Tisdale*, The physical characteristics of proteins of the electron transfer systems and interpretation of the structure of the mitochondria, *Biochemistry* **1**, 827 (1962).
102. *B. Chance, W. D. Bonner, B. T. Storey*, Electron transport in respiration, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **19**, 295 (1968).
103. *B. Chance*, Spectra and reaction kinetics of respiratory pigments of homogenized and intact cells, *Nature* **169**, 215 (1952).
104. *B. Chance, R. Ernster, R. B. Garland, C. P. Lee, P. A. Light, T. Ohnishi, C. J. Ragan, D. Wang*, Flavoproteins of the mitochondrial respiratory chain, *PNAS* **57**, 1498 (1967).
105. *D. E. Fleischmann, G. Tollin*, Molecular complexes of flavins and phenols. 1. Absorption spectra and properties in solution, *BBA* **94**, 248 (1965).
106. *В. И. Скулачев*, Аккумуляция энергии в клетке, «Наука», 1969.
107. *D. F. Wilson, P. L. Dutton*, The oxidation-reduction potentials of cytochrome *a* and *a*₃ in rat liver mitochondria, *ABB* **136**, 583 (1970).
108. *J. S. Rieske*, Changes in oxidation-reduction potential of cytochrome *b* observed in the presence of actinomycin A, *ABB* **145**, 179 (1974).
109. *B. Chance, D. De Vault, V. Legalais, L. Mela, T. Jonetani*, Kinetics of electron transfer reaction in biological systems, in: «Fast reactions and primary processes in chemical kinetics» (5th Nobel Symposium), Almquist & Wiksell, Stockholm, 1967, p. 437.
110. *B. Chance, C. P. Lee, T. Ohnishi, J. Higgins*, Electron transport and energy coupling, in: «Electron transport and energy conservation», Adriatica editrice, Bari, 1970, p. 29.
111. *B. Chance, B. Shoener, D. De Vault*, Reaction-velocity constants for electron transfer and transport reactions, in: «Oxidases and related redox systems», ed. M. E. King, H. S. Mason, M. Morrison, 1965, p. 907.
112. *J. Pecht, M. Faraggi*, Electron transfer to ferricytochrome *C*: reactions with hydrated electron and conformational transitions involved, *PNAS* **69**, 902 (1972).
113. *М. В. Генкин, Р. М. Давыдов, О. В. Крылов, Л. А. Блюменфельд*, Влияние иммобилизации на кинетику конформационных переходов в феррицитохроме *c*, индуцированных изменением pH, *ДАН СССР* **232**, 367 (1977).
114. *L. P. Vernon*, Photochemical and electron transport reactions of bacterial photosynthesis, *Bacteriol. Rev.* **32**, 243 (1968).

115. *J. S. Leigh, Jr.*, The primary electron acceptor in photosynthesis, *BBRC* **46**, 414 (1972).
116. *D. L. Keister*, Indophenols as electron donors and catalysts of photophosphorylation in chloroplasts reactions, *J. Biol. Chem.* **240**, 2673 (1965).
117. *D. B. Knaff, D. I. Arnon*, A concept of three light reactions in photosynthesis by green plants, *PNAS* **64**, 715 (1969).
118. *U. Siggel, G. Renger, H. H. Stiel, B. Rumberg*, Evidence for electronic and ionic interaction between electron transport chains in chloroplasts, *BBA* **256**, 328 (1972).
119. *С. В. Хангулов, М. Г. Гольдфельд, Л. А. Blumenфельд*, О механизме двухэлектронного переноса в фотосинтетической цепи электронного транспорта, *ДАН СССР* **218**, 726 (1974).
120. *S. V. Hangulov, M. G. Goldfeld, L. A. Blumenfeld*, Two-electron step in the photosynthetic electron transport, *Studia biophys.* **48**, 85 (1975).
121. *M. G. Goldfeld, S. V. Hangulov, L. A. Blumenfeld*, ESR signal response in short-flash-excited chloroplasts and the two-electron step in photosynthetic electron transport, *Photosynthetica* **10**, (1976).
122. *B. Chance, M. Nishimura*, On the mechanism of chlorophyll-cytochrome interaction: the temperature insensitivity of light-induced cytochrome oxidation in *Chromatium*, *PNAS* **46**, 19 (1960).
123. *H. T. Witt, A. Müller, B. Rumberg*, Oxidized cytochromes and chlorophyll c_2^+ in photosynthesis, *Nature* **192**, 967 (1961).
124. *B. Chance, W. D. Bonner, Jr.*, The temperature insensitive oxidation of cytochrome *f* in green leaves — a primary biochemical event of photosynthesis, in: «Photosynthetic mechanisms of green plants», Publication N 1145, Nat. Acad. Sci. USA, 1963, p. 66.
125. *W. J. Wredenber, L. N. M. Duysens*, Light-induced oxidation of cytochrome in photosynthetic bacteria between 20 and -170°C , *BBA* **79**, 456 (1964).
126. *D. De Vault, B. Chance*, Photosynthesis using a pulsed laser. 1. Temperature dependence of cytochrome oxidation rate in *Chromatium*. Evidence for tunnelling, *Biophys. J.* **6**, 825 (1966).
127. *D. De Vault, J. H. Parks, B. Chance*, Electron tunnelling in cytochromes, *Nature* **215**, 642 (1967).
128. *P. L. Dutton, T. Kihara, B. Chance*, Early reactions in photosynthetic energy conservation: the photooxidation at liquid nitrogen temperatures of *Rhodospseudomonas gelatinosa*, *ABB* **139**, 236 (1970).
129. *Л. Н. Григоров*, Исследование реакций переноса электрона в бактериальном фотосинтетическом реакционном центре, Кандидатская диссертация, МГУ, 1970.
130. *Л. Н. Григоров, А. А. Кононенко, А. Б. Рубин*, Исследование низкотемпературных фотоиндуцированных окислительно-восстановительных реакций цитохромов в клетках серобактерий, *Мол. биол.* **4**, 483 (1970).
131. *Л. Н. Григоров, Д. С. Чернавский*, Квантово-механическая модель переноса электрона от цитохрома к хлорофиллу в фотосинтезе, *Биофизика*, **17**, 195 (1972).

132. *D. S. Bendall, D. Sofroya*, Reactions at 77° K in photosystem 2 of green plants, *BBA* 234, 371 (1971).
133. *C. S. Jang, W. E. Blumberg*, Quantitative studies on the EPR signals of photosynthetic system 1 and ferredoxin, *BBRC* 46, 422 (1973).
134. *P. Jordan*, Über die physikalische Structure organischen Riesenmoleküle, *Naturwissenschaften* 26, 693 (1938).
135. *A. Szent-Gyorgyi*, Towards a new biochemistry, *Science* 93, 609 (1941).
136. *A. Szent-Gyorgyi*, The study of energy levels in biochemistry, *Nature* 148, 157 (1941).
137. *Ю. А. Владимиров, С. В. Конев*, О возможности миграции энергии в молекуле белка, *Биофизика* 2, 3 (1957).
138. *Ю. А. Владимиров, С. В. Конев*, О возможных механизмах миграции энергии в молекуле белка, *Биофизика* 4, 533 (1959).
139. *G. Weber*, Fluorescence-polarisation spectrum and electronic energy transfer in proteins, *Biochem. J.* 75, 345 (1960).
140. *С. В. Конев*, Электронно-возбужденные состояния биополимеров, Изд. АН БССР, Минск, 1965.
141. *Ю. А. Владимиров*, Фотохимия и люминесценция белков, «Наука», 1965.
142. *С. И. Вавилов*, Микроструктура света, Изд. АН СССР, 1950.
143. *Th. Förster*, Intermolecular energy transfer and fluorescence, *Ann. d. Phys.* 2, 55 (1948).
144. *А. Н. Теренин*, Основные проблемы фотобиологии, Изв. АН СССР, сер. биол., 369 (1947).
145. *А. Н. Теренин, А. А. Красновский*, К вопросу о миграции энергии в биологических процессах, *УФН* 37, 65 (1949).
146. *M. G. Evans, J. Gergely*, A discussion of possibility of bands of energy levels in proteins. Electronic interaction in non-bonded systems, *BBA* 3, 188 (1949).
147. *Л. А. Блюменфельд*, По поводу статьи А. С. Давыдова, «Вычисление низших электронных уровней молекулы нафталина», *ЖЭТФ* 18, 670 (1948).
148. *L. E. Lyons*, Photo- and semi-conductance in organic crystals. 5. Ionized states in molecular crystals, *J. Chem. Soc.*, 5001 (1957).
149. *В. А. Бендерский, Л. А. Блюменфельд*, Состояния с переносом заряда в органических системах, *ДАН СССР* 144, 813 (1962).
150. *Л. А. Блюменфельд, В. А. Бендерский*, Состояния с переносом заряда в органических системах, *ЖСХ* 4, 405 (1963).
151. *Л. А. Блюменфельд, В. А. Бендерский*, Состояния с переносом заряда в органических системах. III. Зона проводимости и возбужденные состояния молекул в органических полупроводниках. *ЖСХ* 7, 370 (1966).
152. *Л. А. Блюменфельд, В. А. Бендерский, П. А. Стунжас*, Состояния с переносом заряда в органических системах. IV. Парамагнетизм и проводимость органических полупроводников, *ЖСХ* 7, 686 (1966).
153. *Ф. Гутман, Л. Ла Йонс*, Органические полупроводники, «Мир» 1970.

154. *E. J. Murphy, A. C. Walker*, Electrical conduction in textiles, I, J. Phys. Chem, **32**, 1761 (1928).
155. *G. King, J. A. Medley*, D.-C. conduction in swollen polar polymers. Electrolysis of the keratin-water system. 2. Influence of temperature and adsorbed salts on the d.-c. conduction of polar polymer-adsorbate system, J. Colloid Sci, **4**, 1 (1941).
156. *M. H. Cardew, D. D. Eley*, Semiconductivity of organic substances. Hemoglobin and aminoacids, Disc. Farady Soc. **27**, 115 (1959).
157. *Д. Эли*, Полупроводниковые свойства биологических молекул, в сб. «Горизонты биохимии», ИЛ, 1964, стр. 261.
158. *C. T. O'Konski, P. Moser, M. Shirai*, Electric properties of macromolecules. XI. Conductivity and dielectric constant of solid sodium, lithium, and magnesium deoxyribonucleates, in: «Quantum aspects of polypeptides and polynucleotides», Intersci. Publ., 1964, p. 479.
159. *Л. И. Богуславский, А. В. Ваников*, Органические полупроводники и биополнмеры, «Наука», 1968.
160. Органические полупроводники, «Наука», 1968.
161. *А. А. Дулов, А. А. Слишкин*, Органические полупроводники, «Наука», 1970.
162. *Э. М. Трухан*, Дисперсия диэлектрической проницаемости гетерогенных систем, ФТТ **4**, 3496 (1962).
163. *Э. М. Трухан*, Определение подвижности свободных носителей заряда в биологических соединениях, Биофизика **11**, 412 (1966).
164. *Л. А. Блюменфельд, Д. Н. Кафалиева, В. А. Лившиц, И. С. Соловьев, А. Г. Четвериков*, Спектры действия фотопроводимости зеленых листьев и хлоропластов на частоте 10^{10} гц, ДАН СССР **193**, 700 (1970).
165. *D. D. Eley, R. Pething*, Microwave Hall mobility measurements on rat liver mitochondria and spinach chloroplasts, J. Bioenerg. **2**, 39 (1971).
166. *D. D. Eley, R. Pething*, Microwave dielectric and Hall effect measurements on biological materials, Disc. Faraday Soc. **51**, 164 (1971).
167. *Л. А. Блюменфельд, О. П. Самойлова, И. С. Соловьев*, О природе микроволновой фотопроводимости фотосинтезирующих объектов, Биофизика **19**, 87 (1974).
168. *О. П. Самойлова, И. С. Соловьев, Л. А. Блюменфельд*, Зависимость кинетики нарастания и спада сигнала микроволновой фотопроводимости хлореллы от состояния культуры, Биофизика **21**, 1031 (1976).
169. *И. С. Соловьев, О. П. Самойлова, Л. А. Блюменфельд*, Влияние длинноволновой подсветки на кинетические характеристики сигналов микроволновой фотопроводимости клеток хлореллы и эффект Эмерсона, Биофизика **21**, 1035 (1976).
170. *В. А. Лившиц*, Исследование электрических и магнитных свойств неупорядоченных органических полупроводников, Диссертация, 1969.
171. *Л. А. Блюменфельд*, Парамагнитные центры и заряды в фотосинтетических системах, Материалы IV Межд. биофиз. конгр., Тезисы докладов, Симпозиумы, 1972, стр. 56.

172. М. К. Пулатова, В. Н. Розуменкова, Л. П. Каюшин, Особенности спектров электронного парамагнитного резонанса синтетических полипептидных пленок и белков, *Биофизика* 6, 548 (1961).
173. М. К. Пулатова, О. А. Азизова, К вопросу о природе спектров электронного парамагнитного резонанса аминокислот и белков, подвергнутых действию γ -радиации и света, *Биофизика* 9, 33 (1969).
174. Л. П. Каюшин, К. М. Львов, М. К. Пулатова, Исследование парамагнитных центров облученных белков, «Наука», 1970.
175. Е. Н. Судьбина, М. К. Пулатова, Л. П. Каюшин, ЭПР исследования природы и свойств парамагнитных центров γ -облученных белков, *Биофизика* 16, 596 (1976).
176. N. E. Geacintov, F. Van Nostrand, J. F. Becker, J. B. Tinkel, Magnetic field induced orientation of photosynthetic systems, *BBA* 267, 65 (1972).
177. F. V. Nostrand, N. E. Geacintov, J. F. Becker, The *in vivo* orientation of chlorophyll, in: «Book of Abstracts, VI Internat. Congr. on Photobiology», Bochum 21—25. 08.1972, N 230.
178. А. Ю. Борисов, М. Д. Ильина, Время жизни и выход флуоресценции двух фотохимических систем, *Биохимия* 36, 822 (1971).
179. А. Н. Теренин, Е. К. Пуццейко, Внутренний фотоэлектрический эффект в агрегированном хлорофилле, метилхлорофилле и пигментах хлоропластов, Труды V Межд. биох. конгр., симп. 6, Изд. АН СССР, 1962, стр. 52.
180. R. J. Cherry, Semiconduction and photoconduction of biological pigments, *Quart. Rev. (Lond.)* 22, 160 (1968).
181. И. С. Мейланов, В. А. Бендерский, Л. А. Блюменфельд, Фотоэлектрические свойства слоев хлорофиллов *a* и *b*. I. Фототоки при постоянном освещении, *Биофизика* 15, 822 (1970).
182. И. С. Мейланов, В. А. Бендерский, Л. А. Блюменфельд, Фотоэлектрические свойства слоев хлорофилла *a* и *b*. II. Фототоки при импульсном освещении, *Биофизика* 15, 959 (1970).
183. E. C. Weaver, EPR studies of free radicals in photosynthetic systems, *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 19, 283 (1968).
184. E. C. Weaver, New light-induced EPR signal in *Anacistis nidulans*, *Nature* 226, 183 (1970).
185. В. А. Бендерский, Л. А. Блюменфельд, А. И. Приступна, Различные типы парамагнитных центров в полимерах с сопряженными связями, *ВМС А9*, 171 (1967).
186. Л. С. Любченко, В. П. Стригуцкий, К вопросу о природе парамагнетизма в полимерных органических полупроводниках в сб. «Органические полупроводники, изд. АН УССР, Киев, стр. 115.
187. H. Weinert, V. Kok, The relation between light induced EPR signal and pigment P 700, in: «Photosynthetic mechanisms of green plants», Publication 1145, Nat. Acad. Sci. USA, Wash., 1963, p. 131.
188. T. Niyama, B. Ke, Difference spectra and extinction coefficients of P 700, *BBA* 267, 160 (1972).
189. Д. Н. Кафалиева, Л. А. Блюменфельд, И. С. Соловьев, В. А. Лившиц, А. П. Дарманян, Релаксационные характеристики фото-

- индуцированных парамагнитных центров в хлоропластах, Биофизика 14, 117 (1969).
190. А. Керкени, А. Т. Черноколев, А. К. Кукушкин, М. К. Солнцев, Запасание энергии в зеленом листе, облученном непрерывным и импульсным светом при низкой температуре, в сб. «Теор. и эксп. биофизика», вып. 4, изд. Калинингр. университета, 1973, стр. 91.
 191. А. К. Кукушкин, Термовысвечивание зеленого листа, облученного видимым светом в вакууме при низкой температуре, Биофизика 13, 1124 (1968).
 192. F. Gutmann, Electron tunnelling in biological processes, Nature 219, 1359 (1968).
 193. L. A. Blumenfeld, D. S. Chernavskii, Tunnelling of electrons in biological processes, J. Theor. Biol. 39, 1 (1973).
 194. L. J. Osterhoff, A. Kuppermann, Discussion on «Kinetics of electron transfer reactions in biological systems», in: «Fast reactions and primary processes in chemical kinetics» (5th Nobel Symposium), Stockholm, 1967, p. 466.
 195. Л. А. Блюменфельд, В. И. Гольданский, М. И. Подгорецкий, Д. С. Чернавский, Пространственная и временная делокализация электронов в молекулярных системах и понятие сопряжения в химии, ЖСХ 8, 854 (1967).
 196. J. H. Callomon, T. M. Dunn, J. M. Mills, Rotational analysis of the 2600 Å absorption system of benzen, Phil. Trans. Roy. Soc. A259 499 (1966).
 197. В. Г. Левич, А. М. Кузнецов, Расчет константы скорости реакции с переносом заряда в полярной жидкости в гармоническом приближении, ТЭХ 6, 291 (1970).
 198. Р. Р. Догондзе, А. М. Кузнецов, Расчет вероятности элементарного акта реакции переноса заряда в полярной жидкости в приближении Ландау — Зинера, ТЭХ 6, 298 (1970).
 199. В. Г. Левич, Р. Р. Догондзе, М. А. Воротынецов, Э. Д. Герман, А. М. Кузнецов, Ю. И. Харкац, Кваптовая теория кинетики электрохимических процессов, Электрохимия 6, 562 (1970).

К главе 8

1. F. Lipmann, Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy, Adv. Enzymol. 1, 99 (1941).
2. Э. Рэкер, Биоэнергетические механизмы, «Мир», 1967.
3. В. П. Скулачев, Аккумуляция энергии в клетке, «Наука», 1969.
4. H. Kalckar, Biological phosphorylation. Development of concepts, Prentice-Hall Inc., 1969.
5. D. Stellen, Biosynthesis and pyrophosphate, Amer. J. Med. 28, 867 (1960).
6. K. Shikama, Standart free energy maps for the hydrolysis of ATP as a function of pH, pMg and pCa, ABB 147, 311 (1971).
7. J. Rosing, E. C. Slater, The value of ΔG° for the hydrolysis of ATP, BBA 267, 275 (1972).
8. R. A. Alberty, Effect of pH and metal ion concentration on the equilibrium hydrolysis of adenosine triphosphate to adenosine diphosphate, J. Biol. Chem. 243, 1337 (1968).

9. *R. A. Alberty*, Standart Gibbs free energy, enthalpy, and entropy changes as a function of pH and pMg for several reactions involving adenosine phosphates, *J. Biol. Chem.* **244**, 3290 (1969).
10. *T. Benzinger, C. Kitzinger, R. Hems, K. Burton*, Free energy changes of the glutaminase reaction and the hydrolysis of the terminal pyrophosphate bond of adenosine triphosphate, *Biochem. J.* **71**, 400 (1959).
11. *B. E. C. Banks, C. A. Vernon*, Reassessment of the role of ATP *in vivo*, *J. Theor. Biol.* **29**, 301 (1970).
12. *L. J. Gillespie, G. A. Maw, C. A. Vernon*, The concept of phosphate bond-energy, *Nature* **171**, 1147 (1953).
13. *B. E. C. Banks*, Thermodynamics and biology, *Chem. in Britain* **5**, 514 (1969).
14. *R. A. Ross, C. A. Vernon*, A reply to Douglas Wilkie, *Chem. in Britain* **6**, 539 (1970).
15. *B. E. C. Banks, C. A. Vernon*, A reply to Linus Pauling and A. F. Huxley, *Chem. in Britain* **6**, 541 (1970).
16. *L. Pauling*, Structure of high-energy molecules, *Chem. in Britain* **6**, 468 (1970).
17. *D. Wilkie*, Thermodynamics and biology, *Chem. in Britain* **6**, 472 (1970).
18. *A. F. Huxley*, Energetics of muscle, *Chem. in Britain* **6**, 477 (1970).
19. *C. W. F. McClare*, In defence of the high energy phosphate bond, *J. Theor. Biol.* **35**, 233 (1972).
20. *T. L. Hill, M. T. Morales*, On high energy phosphate bonds of biochemical interest, *JACS* **73**, 1656 (1951).
21. *Б. Пюльман, А. Пюльман*, Квантовая биохимия, «Мир», 1965.
22. *H. Kalckar*, The function of phosphate in cellular assimilations, *Biol. Rev. Cambr. Phil. Soc.* **17**, 28 (1942).
23. *R. E. Alving, K. Laki*, Energy and electron orbitals in adenosine phosphates, *J. Theor. Biol.* **34**, 199 (1972).
24. *C. W. F. McClare*, Chemical machines, Maxwell's demon and living organisms, *J. Theor. Biol.* **30**, 1 (1971).
25. *А. Ленинджер*, Митохондрия, «Мир», 1966.
26. *W. A. Engelhardt*, Ortho- und Pyrophosphat im aeroben und anaeroben Stoffwechsel der Blutzellen, *Biochem. Z.* **227**, 16 (1930).
27. *W. A. Engelhardt*, Die Beziehungen zwischen Atmung und Pyrophosphatumsatz in Vogelerithrocyten, *Biochem. Z.* **251**, 343 (1932).
28. *H. Kalckar*, Phosphorylation in kidney tissue, *Enzymologia* **2**, 47 (1937).
29. *H. Kalckar*, The nature of the phosphoric esters formed in kidney extracts, *Biochem. J.* **33**, 631 (1939).
30. *В. А. Беллицер, Е. Т. Цыбакова*, О механизме фосфорилирования, сопряженного с дыханием, *Биохимия* **4**, 516 (1939).
31. *S. Ochoa*, Coupling of phosphorylation with oxidation of pyruvic acid in brain tissues, *J. Biol. Chem.* **138**, 751 (1944).
32. *S. Ochoa*, Efficiency of aerobic phosphorylation in cellfree heart extracts, *J. Biol. Chem.* **151**, 493 (1943).
33. *B. Chance, G. R. Williams*, A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation, *Nature* **176**, 250 (1955).

34. *B. Chance, G. R. Williams*, Respiratory anzyme in oxidative phosphorylation. IV. Respiratory chain, *J. Biol. Chem.* **217**, 429 (1955).
35. *B. Chance, G. Hollinger*, Sites of energy conservation in oxidative phosphorylation, *JACS* **79**, 2970 (1957).
36. *B. Chance, G. R. Williams*, The respiratory chain and oxidative phosphorylation, *Adv. Enzymol.* **17**, 65 (1965).
37. *E. C. Slater*, The coupling between energy-yielding and energy-utilizing reactions in mitochondria, *Quart. Rev. Biophys.* **4**, 35 (1974).
38. *S. Muraoka, E. C. Slater*, Redox state of respiratory chain components in rat liver mitochondria. I. Effect of varying substrate concentration and azide, *BBA* **180**, 221 (1969).
39. *R. S. Cockrell, E. J. Harris, B. C. Pressman*, Energetics of potassium transport in mitochondria induced by valinomycin, *Biochemistry* **5**, 2326 (1966).
40. *E. C. Slater*, Energy-conservation mechanisms of mitochondria, in: «Electron transport and energy conservation», *Adriatica Editrice, Bari*, 1970, p. 363.
41. *B. Chance*, The nature of electron transfer and energy coupling reactions, *FEBS Letters* **23**, 3 (1972).
42. *D. F. Wilson, M. Erecinska, T. Ohnishi, P. L. Dutton*, Energy relationships between the redox and phosphorylation reactions in mitochondria, *Bioelectrochem. and Bioenergetics* **1**, 3 (1974).
43. *M. Klingenberg*, The respiratory chain, in: «Biological oxidations» *Intersci. Publ.*, 1968, p. 3.
44. *D. F. Wilson, P. L. Dutton*, The oxidation-reduction potentials of cytochrome *a* and *a₃* in rat liver mitochondria, *ABB* **136**, 583 (1970).
45. *D. F. Wilson, P. L. Dutton*, Energy dependent changes in the oxidation-reduction potential of cytochrome *b*, *BBRC* **39**, 59 (1970).
46. *B. Chance, D. F. Wilson, P. L. Dutton, M. Erecinska*, Energy-coupling mechanisms in mitochondria: kinetic, spectroscopic and thermodynamic properties of an energy-transducing form of cytochrome *b*, *PNAS* **66**, 1175 (1970).
47. *J. S. Rieske*, Changes in oxidation-reduction potential of cytochrome *b* observed in the presence of actinomycin *A*, *ABB* **145**, 179 (1974).
48. *J. A. Berden, F. P. Opperdoes*, An antimycin-sensitive cytochrome *b* component in beef-heart mitochondria, *BBA* **267**, 17 (1972).
49. *P. L. Dutton, M. Erecinska, N. Sato, J. Mukai, D. F. Wilson*, Reactions of *b*-cytochromes with ATP and antimycin *A* in pigeon heart mitochondria, *BBA* **267**, 15 (1972).
50. *B. Chance, M. Erecinska*, Flow flash kinetics of the cytochrome *a₃*-oxygen reaction in coupled and uncoupled mitochondria using the liquid dye laser, *ABB* **143**, 675 (1971).
51. *A. H. Caswell*, The estimation of redox potentials of cytochromes in mitochondria, *ABB* **144**, 445 (1971).
52. *D. D. Tyler, R. W. Eastabrook, D. R. Sanadi*, Oxidative phosphorylation and energy-linked cytochrome *b* reduction with tetramethyl-*p*-phenylenediamine as substrate, *ABB* **114**, 239 (1966).

53. *P. Joliot, A. Joliot, B. Kok*, Analysis of the interactions between the two photosystems in isolated chloroplasts, *BBA* **153**, 635 (1968).
54. *А. Б. Рубин, Т. Е. Креindelева*, Фотосинтетический перенос электронов и сопряженные с ним процессы фосфорилирования у растений, *УСБ* **73**, 364 (1972).
55. *M. Avron, B. Chance*, The relation of light-induced oxidation-reduction changes in cytochrome *f* of isolated chloroplasts to phosphorylation, in: «Currents in photosynthesis» Rotterdam, 1966, p. 455.
56. *G. A. Hauska, R. E. McCarty, E. Racker*, The site of phosphorylation associated with photosystem I, *BBA* **197**, 206 (1970).
57. *A. T. Jagendorf, M. Marulies*, Inhibition of spinach chloroplasts photosynthetic reactions by *p*-chlorophenyl-1,1-dimethylurea, *ABB* **90**, 184(1960).
58. *H. Bohme, W. A. Cramer*, Localization of a site of energy coupling between plastoquinone and cytochrome *f* in the energy transport chain of spinach chloroplasts, *Biochemistry* **11**, 1155 (1972).
59. *S. Izawa, N. E. Good*, The stoichiometric relation of phosphorylation to electron transport in isolated chloroplasts, *BBA* **162**, 380 (1968).
60. *S. Saha, R. Quitrakul, S. Izawa, N. E. Good*, Electron transport and phosphorylation in chloroplast as a function of the electron acceptor, *J. Biol. Chem.* **246**, 3201 (1971).
61. *S. C. Reeves, P. Heathcole, D. O. Hall*, Stoichiometry of photophosphorylation basal electron transport, and chloroplast structure, in: «Book of Abstracts, VI Internat. Congr. on Photobiology», Bochum 21—25.08.1972, N284.
62. *H. Böhme, A. Trebst*, Properties of ascorbate photooxidation in isolated chloroplasts. Evidence for two ATP sites in noncyclic photophosphorylation, *BBA* **180**, 137 (1969).
63. *E. Racker, N. Nelson, D. Deters*, Enzymatics of phosphorylation, in: «Book of Abstracts, VI Internat. Congr. on Photobiology», Bochum, 21—25.08.1972, NO33.
64. *E. C. Slater*, Mechanism of phosphorylation in the respiratory chain, *Nature* **172**, 975 (1953).
65. *T. King, M. Kubojama, S. Takemori*, Cardiac cytochrome *C* — cytochrome oxidase complex, in: «Oxidases and related redox systems», vol. 2, 1965, p. 707.
66. *J. T. Penniston, R. A. Harris, J. Asai, D. E. Green*, The conformational basis of energy transformations in membrane systems. I. Conformational changes in mitochondria, *PNAS* **59**, 624 (1968).
67. *R. A. Harris, J. T. Penniston, J. Asai, D. E. Green*, The conformational basis of energy transformations in membrane systems. III. Correlation between conformational change and functional states, *PNAS* **59**, 830 (1968).
68. *P. Mitchell*, Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transport by a chemiosmotic type of mechanism, *Nature* **191**, 144 (1961).

69. *P. J. Garrahan, J. M. Glynn*, Driving the sodium pump backwards to form adenosine triphosphate, *Nature* **211**, 1414 (1966).
70. *P. Mitchell*, Chemiosmotic coupling in oxidative and photophosphorylation, *Biol. Rev.* **41**, 445 (1966).
71. *P. D. Boyer*, A model for conformational coupling of membrane potential and proton translocation to ATP synthesis, and to active transport, *FEBS Letters* **58**, 1 (1975).
72. *Б. Аннаев, В. К. Кольтовер, Л. М. Райхман, В. И. Сускина*, Исследование конформационных переходов в мембранах эндоплазматического ретикулума методом парамагнитного зонда, *ДАН СССР* **196**, 969 (1971).
73. *Ю. Г. Молотковский, В. С. Дзюбенко, В. Н. Тимонина*, Структурные и конформационные переходы в хлоропластах, индуцируемые моновалентными катионами, *Физиол. раст.* **19**, 525 (1972).
74. *B. Chance, C. P. Lee, T. Ohnishi, J. Higgins*, Electron transport and energy coupling, in: «Electron transport and energy conservation», *Adriatica Editrice, Bari*, 1970, p. 29.
75. *B. Chance, M. Pring, A. Azzi, C. P. Lee, L. Mela*, Kinetics of membrane transitions, *Biophys. J.* **9**, A-90 (1969).
76. *V. K. Koltover, L. M. Reichman, A. A. Jasaitis, L. A. Blumenfeld*, A study of spin-probe solubility in mitochondrial membranes correlated with ATP dependent conformational changes, *BBA* **234**, 306 (1971).
77. *L. Packer*, Metabolic and structural states of mitochondria. I. Regulation by adenosine diphosphate, *J. Biol. Chem.* **235**, 242 (1960).
78. *L. Packer*, Structural changes in chloroplast membranes, in: «Book of Abstracts, VI Internat. Congr. on Photobiology», Bochum 21—25.08. 1972, N 030.
79. *D. E. Green*, Electrochemical model of mitochondrial structure and function, *PNAS* **69**, 726 (1972).
80. *A. Bennun*, Hypothesis for coupling energy transduction with ATP synthesis or ATP hydrolysis, *Nature New Biology* **233**, 5 (1971).
81. *Л. Л. Гринюс, В. П. Скулачев*, Генерация мембранного потенциала, сопряженная с переносом водорода, *Биохимия* **36**, 430 (1971).
82. *В. В. Кулене, В. П. Скулачев, А. А. Ясайтис*, Обнаружение мембранного потенциала митохондрий по изменению флуоресценции анилининонафталинсульфоната, *Биохимия* **36**, 649 (1971).
83. *Е. А. Либерман, В. П. Топаль, Л. М. Цофина, А. А. Ясайтис, В. П. Скулачев*, Транспорт ионов и электрический потенциал митохондриальных мембран, *Биохимия* **34**, 1083 (1969).
84. *А. А. Ясайтис*, Разделение и конструкция митохондриальных систем, генерирующих мембранный потенциал, Докторская диссертация, МГУ, 1972.
85. *L. L. Grinius, A. A. Jasaitis, J. P. Kadziauskas, E. A. Liberman, V. P. Sculachev, V. P. Topali, L. M. Tsofina, M. A. Vladimirova*, Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. I. Submitochondrial particles, *BBA* **216**, 1 (1970).

86. *L. E. Bakeeva, L. L. Grinius, A. A. Jasaitis, V. V. Kuliene, D. O. Levitsky, E. A. Liberman, I. I. Severina, V. P. Sculachev*, Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. II. Intact mitochondria, *BBA* 234, 177 (1971).
87. *J. Barber*, A method of estimating the magnitude of the light-induced electrical potential across the thylakoid membranes, *FEBS Letters* 20, 251 (1972).
88. *B. Chance, J. Bunkenburg, J. A. McGray*, Fast spectrophotometric measurement of H^+ changes in *Chromatium* chromatophores activated by a ligand dye laser, *Nature* 225, 705 (1970).
89. *W. Junge*, Electric potential difference and photophosphorylation, in: «Book of Abstracts, VI Internat. Congr. on Photobiology», Bochum 21—25.08.1972, N 034.
90. *E. A. Liberman, V. P. Topali, L. M. Tsofina, A. A. Jasaitis, V. P. Sculachev*, Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria, *Nature* 222, 1076 (1968).
91. *H. Rottenberg, T. Grünwald, M. Avron*, Determination of ΔpH in chloroplasts. I. Distribution of ^{14}C -methylamine, *Eur. J. Biochem.* 25, 24 (1972).
92. *Sh. Shuldiner, H. Rottenberg, M. Avron*, Determination of ΔpH in chloroplasts. II. Fluorescent amines as a probe for the determination of ΔpH in chloroplasts, *Eur J. Biochem.* 25, 64 (1972).
93. *H. Rottenberg, T. Grünwald*, Determination of ΔpH in chloroplasts. III. Ammonium uptake as a measure of ΔpH in chloroplasts and subchloroplast particles, *Eur. J. Biochem.* 25, 71 (1972).
94. *A. T. Jagendorf, E. Uribe*, Photophosphorylation and the chemiosmotic hypothesis, *Proc. IEG* 1, 678 (1966).
95. *A. T. Jagendorf, E. Uribe*, ATP formation caused by acid-base transition of spinach chloroplasts, *PNAS* 55, 170 (1966).
96. *Е. А. Либерман, Е. Н. Мозова, В. П. Скулачев, В. П. Топалы*, Действие разобщителей окислительного фосфорилирования на бимолекулярные фосфолипидные мембраны, *Биофизика* 13, 188 (1968).
97. *Е. А. Либерман, В. П. Топалы*, Перенос ионов через бимолекулярные мембраны и классификация разобщителей окислительного фосфорилирования, *Биофизика* 13, 1025 (1968).
98. *V. P. Sculachev a. o.*, The effect of uncouplers on mitochondria, respiratory enzyme complexes, and artificial phospholipid membranes, *Currents in Med. Biol.* 2, 98 (1968).
99. *V. P. Sculachev a. o.*, Uncoupling oxidative phosphorylation: energy-dependent anion transfer, discharge of membrane potential or electrophilic attack on coupling intermediate?, in: «The energy level and metabolic control in mitochondria», *Adriatica Editrice, Bari*, 1969, p. 283.
100. *J. T. Tupper, H. Tedeshi*, Mitochondrial membrane potential measured with microelectrodes: probable ionic basis, *Science* 166, 1539 (1969).
101. *M. Avron*, Proton transport and photophosphorylation, in: «Book of Abstracts, VI Internat. Congr. on Photobiology», Bochum 21—25.08.1972, N 035.

102. *S. J. D. Karlisk, M. Avron*, Relevance of proton uptake induced by light to the mechanism of energy coupling in photophosphorylation, *Nature* 216, 1107 (1967).
103. *S. J. D. Karlisk, M. Avron*, Energy transfer inhibition and ion movements in isolated chloroplasts, *Eur. J. Biochem.* 20, 51 (1971).
104. *R. A. Dilley, L. P. Vernon*, Quantum requirement of the light-induced proton uptake by spinach chloroplasts, *PNAS* 57, 395 (1967).
105. *R. L. Heath*, Light requirements for proton movement by isolated chloroplasts as measured by the bromocresol purple indicator, *BBA* 256, 645 (1972).
106. *S. J. D. Karlisk, M. Avron*, Effect of phosphorylating conditions on photoinduced changes in light scattering, *Eur. J. Biochem.* 9, 291 (1969).
107. *В. П. Скулачев*, Трансформация энергии в биомембранах, «Наука», 1972.
108. *D. G. Nichols*, The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton electrochemical gradient across the inner membrane of rat-liver mitochondria as determined by ion distribution, *Eur. J. Biochem.* 50, 305 (1974).
109. *T. Yamamoto, Y. Tonomura*, pH jump-induced phosphorylation of adenosine diphosphate in thylakoidal membranes. Dependence of the rate on pH and concentrations of substrates, *J. Biochem.* 77, 137, (1975).
110. *W. Junge H. T. Witt*, The ion transport system of photosynthesis investigations at a molecular level, *Z. Naturforsch.* 23, 244 (1968).
111. *W. Junge, H. Rumberg, H. Schröder*, The necessity of an electric potential difference and its use for photophosphorylation in short flash groups, *Eur. J. Biochem.* 14, 575 (1970).
112. *R. J. P. Williams*, The separation of electrons and protons during electron transfer: the distinction between membrane potentials and transmembrane gradients, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 227, 98 (1974).
113. *G. Weber*, Addition of chemical and osmotic energies by ligand-protein interactions, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 227, 486 (1974).
114. *Л. А. Блюменфельд*, О некоторых физических аспектах внутриклеточной трансформации энергии, *Биофизика* 21, 946 (1976).
115. *Л. А. Блюменфельд, В. К. Кольтовер*, Трансформация энергии и конформационные переходы в митохондриальных мембранах как релаксационные процессы, *Мол. биол.* 6, 161 (1972).
116. *Л. А. Blumenfeld, D. S. Chernavskii*, Tunnelling of electrons in biological processes, *J. Theor. Biol.* 39, 1 (1973).
117. *Л. А. Блюменфельд, В. И. Гольданский, М. И. Подгорецкий, Д. С. Чернавский*, Пространственная и временная делокализация электронов в молекулярных системах и понятие сопряжения в химии, *ЖСХ* 8, 854 (1967).
118. *Л. А. Блюменфельд, М. И. Темкин*, О возможном механизме образования аденозинтрифосфорной кислоты в ходе окислительного фосфорилирования, *Биофизика* 7, 731 (1962).

119. Л. П. Каюшин, Е. Е. Кофман, И. Н. Голубев, К. М. Львова, М. К. Пулатова, К вопросу о передаче энергии гидролиза аденозинтрифосфорной кислоты сократительному белку, Биофизика 6, 20 (1961).
120. А. Д. Макаров, А. Н. Мальян, В. К. Опанасенко, Взаимодействие аденозинтрифосфатов с хлоропластами в реакции фотосинтеза, Биофизика 16, 1125 (1971).
121. V. P. Sculachev, Adenosine diphosphate as a possible hydrogen carrier in the respiratory chain, Nature 198, 444 (1963).
122. В. П. Скулачев, Роль адениннуклеотидов в фосфорилирующем дыхании и физиологические функции окислительных процессов, Усп. биол. химии 6, 180 (1964).
123. D. E. Green, J. Asai, R. O. Harris, J. Penniston, Conformational basis of energy transformations in membrane systems. III. Configurational changes in the mitochondrial inner membrane induced by changes in functional states, ABB 125, 684 (1968).
124. A. Azzi, B. Chance, G. Rodda, C. Lee, A fluorescence probe of energy-dependent structure changes in fragmented membranes, PNAS 62, 612 (1969).
125. A. Azzi, B. Chance, G. Rodda, G. Lee, Fluorescence probe of energy-dependent structure changes in fragmented membranes, BBA 189, 141 (1969).
126. J. S. Kahn, Absence of a common intermediate pool among individual enzyme chains of energy-conservation pathway in chloroplasts of *Euglena*, Biochem. J. 116, 55 (1970).
127. Н. М. Чернавская, Д. С. Чернавский, Л. Н. Григоров, О возможной роли туннельного эффекта в транспорте электронов, Труды МОИП 49, 191 (1973).
128. M. Baitscheffsky, Reversible energisation in photosynthesis as measured with endogenous carotenoid, in «Dynamics of energy-transducing membranes», eds. Ernster, Estabrook, Slater, 1977, Elsev. Sc. Publ. comp., Amsterdam, p. 365.