



БИОЛОГИЧЕСКИЙ  
ФАКУЛЬТЕТ  
МГУ ИМЕНИ  
М.В. ЛОМОНОСОВА



*teach-in*  
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

# БИОФИЗИКА ЧАСТЬ 1

РУБИН  
АНДРЕЙ БОРИСОВИЧ

БИОФАК МГУ

КОНСПЕКТ ПОДГОТОВЛЕН  
СТУДЕНТАМИ, НЕ ПРОХОДИЛ  
ПРОФ. РЕДАКТУРУ И МОЖЕТ  
СОДЕРЖАТЬ ОШИБКИ.  
СЛЕДИТЕ ЗА ОБНОВЛЕНИЯМИ  
НА [VK.COM/TEACHINMSU](https://vk.com/teachinmsu).

ЕСЛИ ВЫ ОБНАРУЖИЛИ  
ОШИБКИ ИЛИ ОПЕЧАТКИ,  
ТО СООБЩИТЕ ОБ ЭТОМ,  
НАПИСАВ СООБЩЕСТВУ  
[VK.COM/TEACHINMSU](https://vk.com/teachinmsu).



БЛАГОДАРИМ ЗА ПОДГОТОВКУ КОНСПЕКТА  
СТУДЕНТА БИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА МГУ  
**БУКРЕЕВА АЛЕКСАНДРА ИГОРЕВИЧА**



## Содержание

|                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Лекция 1 Вводная лекция. ....                                                           | 6   |
| Биофизика.....                                                                          | 6   |
| Содержание курса .....                                                                  | 8   |
| Лекция 2 Клеточный метаболизм.....                                                      | 10  |
| Предмет биофизики .....                                                                 | 10  |
| Теоретическая биология .....                                                            | 11  |
| Цель курса .....                                                                        | 13  |
| Применение математической модели .....                                                  | 14  |
| Построение модели .....                                                                 | 18  |
| Модель гликолиза .....                                                                  | 18  |
| Качественный анализ.....                                                                | 22  |
| Принцип узкого места.....                                                               | 22  |
| Саморегуляция .....                                                                     | 26  |
| Лекция 3. Нелинейные процессы. ....                                                     | 28  |
| Модель "Хищник-жертва". ....                                                            | 28  |
| Колебания в ферментативных системах .....                                               | 36  |
| Лекция 4 Ферментативные реакции.....                                                    | 48  |
| Компьютерный эксперимент. ....                                                          | 48  |
| Уравнение Михаэлиса-Ментен.....                                                         | 49  |
| Регуляция ферментативных реакций .....                                                  | 57  |
| Лекция 5. Система с распределенными параметрами и хаотические процессы в биологии ..... | 67  |
| Система с распределенными параметрами. ....                                             | 67  |
| Хаотические процессы в биологии .....                                                   | 86  |
| Лекция 6 Термодинамика ферментативных реакций .....                                     | 96  |
| Введение.....                                                                           | 96  |
| Первый и второй законы термодинамики.....                                               | 97  |
| Фундаментальные понятия термодинамики .....                                             | 102 |
| Смысл и место термодинамики в биофизике.....                                            | 117 |
| Лекция 7. Химический потенциал окислительно-восстановительной реакции.....              | 120 |
| Электрохимическая ячейка.....                                                           | 123 |
| Фотосинтетическая цепь реакций у растений.....                                          | 125 |

|                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Лекция 8. Теорема Пригожина. Роль энтропии и информации в биологических процессах ..... | 131 |
| Введение: .....                                                                         | 131 |
| Фотосинтез, ТД открытой системы: .....                                                  | 131 |
| Химическая реакция .....                                                                | 138 |
| Условия применения теоремы Пригожина .....                                              | 141 |
| Термодинамическая характеристика метаболических процессов .....                         | 142 |
| Роль энтропии и информации в биологических процессах.....                               | 145 |
| Лекция 9 Мембранный транспорт в клеточных процессах .....                               | 149 |
| Основные функции мембран .....                                                          | 149 |
| Работы Овертона.....                                                                    | 150 |
| Процессы диффузии.....                                                                  | 151 |
| Транспорт воды.....                                                                     | 162 |
| Лекция 10. Мембранный транспорт в клеточных процессах .....                             | 178 |
| Теория постоянного поля.....                                                            | 178 |
| Соотношение Уссинга .....                                                               | 182 |
| Поток ионов, эл. ток и проводимость мембраны.....                                       | 184 |
| Описание транспорта ионов на основе теории скоростей реакций .....                      | 186 |
| Эквивалентная электронная схема мембраны в покое. ....                                  | 190 |
| Модель потенциал-зависимых ионных каналов .....                                         | 191 |
| Перенос заряда при активном транспорте .....                                            | 202 |
| Лекция 11 Образование структуры белка. Стабилизирующие взаимодействия .....             | 208 |
| Факторы стабилизации белка .....                                                        | 208 |
| Невалентные, или объемные взаимодействия. Взаимодействия Ван-дер-Ваальса .....          | 213 |
| Сравнение энергий взаимодействий в белке с энергией тепловых колебаний .....            | 214 |
| Другие типы объемных взаимодействий .....                                               | 215 |
| Кулоновские взаимодействия.....                                                         | 216 |
| Энерго-торсионный потенциал .....                                                       | 216 |
| Полная энергия взаимодействий полипептидной цепочки. ....                               | 217 |
| Параметры внутримолекулярной подвижности белка .....                                    | 220 |
| Лекция 12. Внутримолекулярная подвижность белка.....                                    | 222 |
| Внутримолекулярная подвижность белка.....                                               | 222 |
| Мессбауэровская спектроскопия.....                                                      | 228 |
| Внутримолекулярная подвижность и ее роль в работе ферментов.....                        | 229 |

---

|                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------|-----|
| Лекция 13. Механизм переноса электрона. Молекулярные моторы..... | 238 |
| Перенос электрона .....                                          | 238 |
| Бактериальный фотосинтез.....                                    | 239 |
| Туннельный эффект .....                                          | 240 |
| Работа АТФ-синтазы.....                                          | 249 |
| Меланосома .....                                                 | 253 |
| Роль АТФ.....                                                    | 255 |

## Лекция 1 Вводная лекция.

### Биофизика

В силу разделения наук получились большие разрывы. Науки разделились, а природа едина. Это было давно замечено, что и привело к созданию так называемых пограничных наук. Биофизика, как и биохимия - типичная пограничная наука. Объектом биохимии, как и биофизики, являются биологические процессы. Предмет биохимии сейчас – метаболизм, как основа всех физиологических проявлений. Она была предметом не всегда. В 20-ых годах прошлого века биохимия была наукой, которая занималась составом живых организмов: количество белков, жиров, углеводов.

Было определение: живая система обладает свойствами роста, размножения, раздражимости и метаболизма. Это "и" дорогого стоит. Метаболизм лежит в основе этих проявлений. Биохимия сформировалась, как результат единения различных подходов.

Как сложилась биофизика? Было два момента - субъективный и объективный, они были связаны. Субъективный - отголоски всестороннего образования продолжали проявляться. Великие ученые, которые были в области физики - Галилей, Декарт, Гарвей, известный вам врач, который открыл малый круг кровообращения, Боррели, итальянец, занимались биомеханикой, механикой, движением. Это происходило потому, что это было время, когда развивалась механика. С помощью механики представляли организм как состоящий из отдельных механических частей, понимая прекрасно, что это не совсем так. Но другого теоретического подхода не было. Эти люди обладали всесторонним образованием того времени. Мой руководитель по кандидатской работе и заведующий кафедрой биофизики до меня, которому я наследовал, получили образование, слушая в университете одновременно физический и медицинский курсы. По тем временам это было нормально. Дальше - великий Ньютон, конец 17 - начало 18 века, механика. Лавуазье, Эйлер - гемодинамика, биомеханика, Ломоносов - про зрительное цветное зрение у него много соображений. Лавуазье показал, что химия горения и дыхания - одно и то же. Пристли - открытие фотосинтеза. В 19 веке Фарадей открыл электромагнитные явления, Максвелл – понятие силовых линий, поля.

Сейчас мы не задумываемся о поле, как о чем-то сложном. Но в век механики, когда все взаимодействие происходило за счет механических взаимодействий, понятие поля было

революционное, как и отказ от теплорода в свое время. Это гносеологические сдвиги в понимании.

В биофизике и биологии колоссальную роль уже в 19 веке сыграла теория Аррениуса. Это - ионная теория растворов. Теория Нернста - ионное равновесие и биоэлектrogenез, биопотенциалы как результат движения ионов. В результате была сделана формулировка Дюбуа-Реймоном, который сказал, что нет никаких особых жизненных сил, которые бы существовали вне живых систем. Все они допускают физические измерения.

Относительно различных псевдонаучных вопросов, хочется отметить следующее. Есть много неясного, явления, которые мы не знаем и поэтому не можем описать, но то, что они все так или иначе могут быть познаны наукой — это факт. Но наука занимается явлениями, которые воспроизводятся. Принцип науки - достоверность и статистическая достоверность, как показатель явления достоверности, являются основными. Если явление не воспроизводится, это не значит, что его нет, мы его изучать не можем. Это - не предмет науки, а предмет веры. Однократное явление, которое видели один раз, и оно не воспроизводится - чудо. Если мы что-то не поняли, это не значит, что этого нет. Есть объективные условия, для которых мы можем все это делать. Биофизика, вобравшая в себя все эти представления, будет в таком виде представлена.

Есть теоретическая биофизика. Брюс Альбертс, молекулярный биолог, не биофизик, написал статью, в которой пишет, что все великие достижения биологи в 20-ом веке были сделаны, если с использованием методов физики, то без систематического использования идеи и представлений физики современной и математики. А теперь, говорит он, мы получили клетку, мы знаем вроде все как набор биологических белковых машин и принцип их функционирования, мы можем представить вообще все биополимеры. Считывание информации и прочее - явления, которые известны - открытия биологии, но по каким законам они эти явления происходят - объяснение требует привлечения понятия «энергия, кинетика, физические взаимодействия». Я еще добавлю фразу: "Считается так, что драма, а не трагедия в экспериментальной биологии и не только экспериментальной 20-21 века состоит в том, что в качестве теоретических объяснений своих явлений на элементарном уровне, на уровне взаимодействия она пользуется в основном представлениями физической химии, сформулированными в конце 19 - начале 20 века». В огромном количестве случаев это работает, но по мере проникновения дальше и дальше на элементарный уровень или на популяционный (кстати говоря, то же самое) мы получаем ситуацию, при которой этих

представлений оказывается недостаточно. Типичный пример - синтетическая биология и структурная биология – это элементарные структурные единицы живого, которые мы познаем с помощью разных методов. У вас курс будет синтетической биологии, когда в результате конкретных манипуляций с генами и прочим можно синтезировать одноклеточные пока организмы, но это реально. Мы говорили, что есть международные олимпиады школьников и студентов по поводу сделать какой-то организм синтетической биологии. Я думаю, мы тут отстаем и посмотрим, как это преодолеть. Биофизика имеет две задачи. Одна - конкретный материал биофизический, вторая - мы являемся форпостом введения методов подхода в точных науках для решения биологических проблем. Почему мы это делаем? «Есть квантовая механика давайте ее изучать, вдруг что-нибудь поможет». Это - не так. Есть биологическая проблема, без всякой физики открытая, чтобы понять, что там происходит, нужно привлечь физические представления. В готовом виде их нет. Надо развивать физику вместе с биологией. Это - биофизика. Поэтому биофизика выходит за рамки своих узкопрофессиональных интересов, идя на обслуживание биологической проблематики, дополняя ее новыми идеями, которые принадлежат не только биофизике, они - совместные идеи физики и других областей биологии.

## Содержание курса

Вначале мы немного вспомним. Я буду считать, что вы кинетику помните, покажу, какие новые подходы есть в биологии, выходящие за рамки решения дифференциальных уравнений в кинетике. Варианты колебательных процессов. Что нужно вам от нас, а нам от вас в смысле кинетики и саморегуляции биологических систем, будет в области кинетики. Проблемы самоорганизации; потом перейдем к термодинамике. У вас была физхимия в первом семестре. Энтропия, прочее, я расскажу, зачем это все нужно в биологии. Не тепловые эффекты мерять, посмотрите - лекарство или еда, килокалории такие-то, столько-то. Поговорим, что это дает. Потом я расскажу о термодинамике современной. Пригожин за что Нобеля получил, необратимые процессы. Не классическая термодинамика, а то, что в общем работает, где от времени все зависит. Биопотенциалы, мембранные процессы – это составляет предмет теоретической биофизики. Во втором семестре будет биофизика



конкретных клеточных процессов: фотобиология, биофизика, мембраны, их роль, радиационная биофизика, активные формы, радикалы. Эти вещи - уже проблематика, выходящая за рамки чисто биофизических процессов. Что такое биофизика, в чем предмет ее? Биофизика - наука о фундаментальных физико-химических механизмах взаимодействия биомакромолекул. Объект биофизики - и на популяционном уровне. Элементарные взаимодействия на популяционном уровне организмов, система Вольтера - типичная элементарная модель. Механизмы взаимодействия — это предмет. Объект - биологические процессы. Что роднит физику с биологией? Объект исследования роднит биофизику с физикой. Предмет — это взаимодействие. Физика - наука о взаимодействиях. Биофизика - тоже. Обратите внимание: если вы читаете текст медицинский и текст физический, количество глаголов и существительных там различно. Количество глаголов в медицинском тексте меньше, а существительных больше, чем в физическом. Глагол — это действие. Он отражает, что происходит, а когда мы не знаем, мы даем название. Чем больше мы даем названий, не говоря, что они делают друг с другом, тем, соответственно это отражает наше знание. Для физики тоже есть. Для биологии тоже. Скажем, мы пишем сложное уравнение. Движения колебаний, все такое. Частицы, которые участвуют в этих колебаниях, они что - уравнение решают, чтобы знать, куда идти? Нет, они по-другому делают. Наши уравнения сложные и представления отражают нашу слабость, а вовсе не научное совершенство. И я расскажу, как современный компьютер позволяет проводить настоящий эксперимент.

## Лекция 2 Клеточный метаболизм

### Предмет биофизики

Биофизика – наука о механизмах фундаментальных физико-химических взаимодействий структурных элементов живого, которые лежат в основе биологических процессов.

Физика - наука о фундаментальных взаимодействиях, лежащих в основе движения материи.

Предмет биофизики - такой же, как у физики - взаимодействия. Те взаимодействия, которые имеют биологический смысл, - лежат в основе биологических явлений и процессов.

Есть две проблемы, когда мы говорим о взаимодействиях. Это - главные проблемы теоретической биофизики.

1. Проблема регуляции биологических процессов. Каким образом метаболическая сеть регулируется и метаболические пути приходят к какому-то конечному результату. В случае клетки это - рост, размножение, деление, развитие и так далее, и как это связано со взаимодействиями. Зная структуру, мы не обязательно знаем, как она работает.
2. Проблема взаимодействия элементов. Для того, чтобы шли метаболические процессы, различные элементы должны взаимодействовать между собой: белки, ферменты, субстрат, входящий в активный центр. Есть ли какие-то внутренние движения, если есть, нужны ли они, чтобы белок функционировал - вторая ипостась этого подхода.

Сент-Джердби (нобелевский лауреат, занимался изучением мышечного сокращения), говорил: *"Мы знаем многое, как устроены мышцы, но мало понимаем о том, как она работает. Чем больше узнаем ее структуру, тем меньше понимаем, как она функционирует"*.

Сейчас в базах данных содержатся тысячи белков, но мы не понимаем, за счет чего многие из них работают. Может показаться, что при помощи физики и математики можно расшифровать все биологические процессы, но, когда начинается работа, оказывается все не просто. Дело не в том, что биология - сложная, но, чтобы понять механизмы, физика сама должна развиваться. Это - принципиально.

Другой момент состоит в том, что сейчас структурная биология — это наноструктуры. У нас всех навязло в зубах - нанобиотехнология, нанобиология, наноразмерные вещи. Формально вроде бы — ничего нового, но, если вы посмотрите размеры белков, официальное определение наноструктур — это структуры по размеру меньше 100 нанометров. Это - довольно приличные размеры. Белки - 30, 50 ангстрем, толщина мембраны — 50-100 ангстрем. 100 ангстрем — это 10 нанометров, в 10 раз меньше. Структурная биология в современном виде и раньше занималась наноразмерными структурами. Однако в последние годы появилась возможность получать непосредственную информацию о наноразмерных структурах с помощью конкретных экспериментальных методов.

Сейчас есть методы, которые позволяют получить конкретные параметры, характеризующие свойства биополимеров. И они должны лежать в основе подходов к решению этих проблем.

## Теоретическая биология

Начнем с регуляции. Вот небольшой кусок клеточного метаболизма (рис 1).

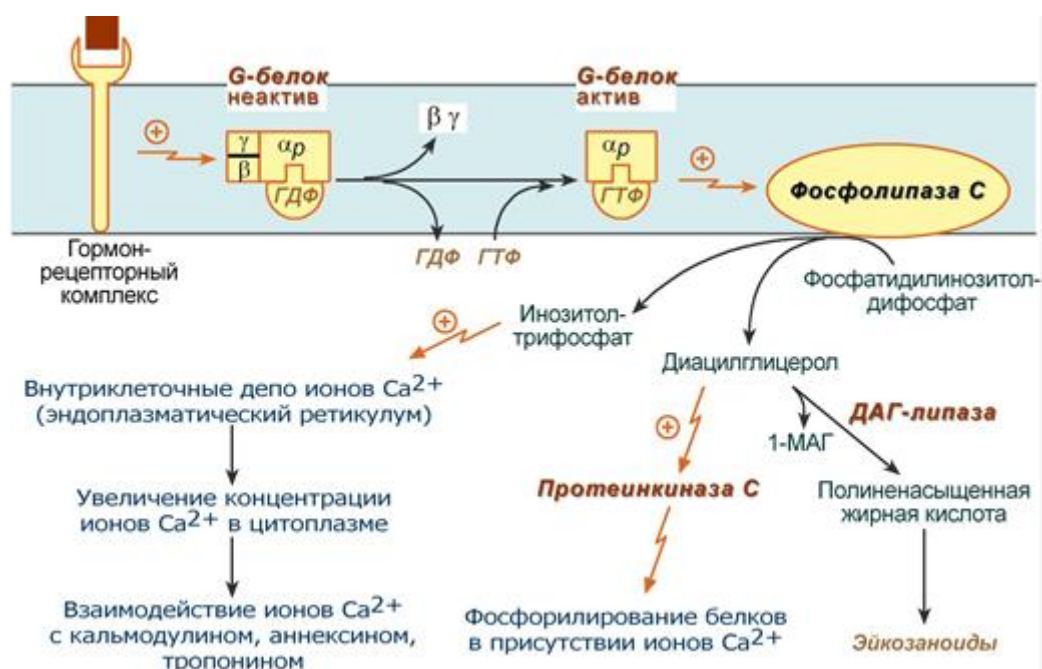


Рисунок 2.1. Пример метаболического пути.

Здесь происходит активация рецептора, замена ГТФ на ГДФ, АТФ на АДФ, из цитоплазматического ретикулума выходит кальций. Хочу обратить внимание - когда говорим о взаимодействиях, мы будем говорить о математической стороне.

Есть специальности: математическая биология и биоинформатика. Кандидатские и докторские по ним защищаются на кафедрах и физико-математических, и биологических наук. Интересен факт, что как только какие-то области возникали в математике независимо от биологии, тут же делались работы и попытки очень удачных вхождений этих новых методов для описания биологических процессов.

Рассмотрим сосуд, наполненный раствором химических веществ. Молекулы в этом растворе встречаются счет движения, кинетической энергии, теплового движения. Они сталкиваются, происходит реакция. Концентрация как фундаментальное понятие химической кинетики и общей химии считается априори справедливым. Концентрация это - среднее содержание вещества (как правило, в молях) в единице объема. Считается, что она - равномерна во всем реакционном сосуде, и, что важно для нас, в клетке. Но это не так, ибо клетка - гетерогенная структура. Однако, мы применяем законы кинетики. Это правильно в тех случаях, когда это условие соответствует этим предположениям.

По мере проникновения на молекулярный уровень и становления структурной биологии, нанобиологии, скажем так, мы начинаем понимать, что не так все просто. Пример - в межмембранных пространствах, митохондриях, тилакоидах, фотосинтезирующих организмах о рН можно говорить, его можно измерить, используя датчики и рН-зонды. Но

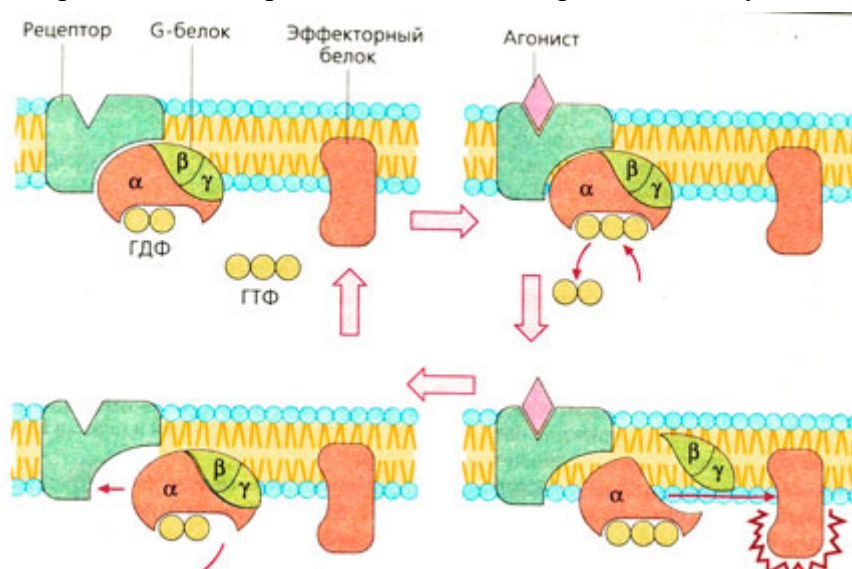


Рисунок 2.2 Механизм работы G-белков

pH - отрицательный логарифм концентрации. Количество ионов в конкретном компартменте может быть 10-15. Какой там pH? Можно взять логарифм от чего угодно, но это - не та концентрация. Далее в лекции будет рассмотрено применение новых математических методов.

Другой аспект: молекулы движутся. Это - диффузия. Речь идет не только о том, что произошел элементарный акт взаимодействия, исходные вещества и продукты диффундируют в пространстве. Нам могут помочь системы с распределенными параметрами, которые у вас были на втором курсе, диффузионный член и прочее.

Наконец, если посмотреть поближе, сами взаимодействия - биохимические: гормон активировал рецептор, взаимодействующий с G-белком, в составе которого три субъединицы: гамма-, бета- и альфа- (рис. 2). Белок становится активным. Что в нем произошло? Мы можем предположить, что произошло фосфорилирование. За счет чего? Где движущие силы?

Или классический пример с гемоглобином: кислород присоединяется к железу, это вызывает каскад последовательной оксигенации всех четырех субъединиц. Каждая последующая оксигенация происходит легче, чем предыдущая, идет кооперативное взаимодействие. При присоединении кислорода к железу, атом железа немного движется относительно плоскости гема (примерно на ангстрем). Железо в этом процессе меняет спиновое состояние. Это запускает каскад изменений глобулы, имеющей колоссальный размер по сравнению с атомом железа. Вопрос: в чем движущая сила?

Или классическая вещь - АТФ-синтаза. Вы все знаете: был эксперимент, проведенный японцами, где к АТФ-синтазе был прикреплен миозин с меткой. Так было установлен факт вращения АТФ-синтазы. Изучение подобного вращения – тоже задача биофизики.

## Цель курса

Мне хотелось бы от вас, чтобы вы научились мышлению. В математических методах мы убираем все подробности, но вы должны понимать смысл того, что происходит, уметь с помощью уравнений отразить биологические свойства на математическом языке. Никто в будущем от вас не требует решения. Но вы должны понимать исходную формулировку, основные пути решений, которые будете делать не вы, а специалисты с вами вместе, и самое

главное - оценить результаты, сопоставить выводы из математической модели с теми свойствами биологического объекта, которые вы заложили. Брат известного всем академика Лившица, тоже ученый-физик говорил: "Да я понимаю, что, если эти уравнения решить, получится тот результат, о котором вы говорите, но мне важно понять, чему это соответствует на самом деле". Более того, другой физик говорил: "Никогда не начинайте вычислений до того, как поймете, что там на самом деле может". Это - обращение к вам, биологам, которые занимаются регуляцией. Это - самое главное. Первую лекцию мы посвятим тому, что освежим в памяти математические курсы, пройденные ранее.

## Применение математической модели

Применение математических методов, дифференциальных уравнений, началось до того, как начали понимать организацию структурных элементов. Классический пример - гибель клетки (рис. 3).

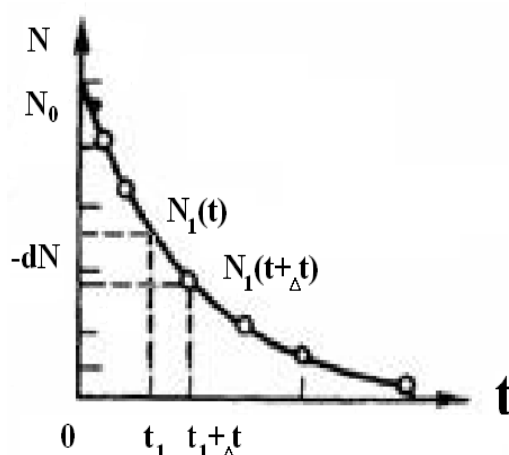


Рисунок 2.3. Графическое отображение зависимости количества клеток от времени в условиях постоянной гибели

Здесь  $N(t)$  количество клеток в какой-то момент времени  $t$ . Клетки умирают, количество живых клеток становится все время меньше и меньше. Для описания данного процесса надо привести какую-то гипотезу. Гипотеза - в том, что мы не знаем механизм гибели клеток и даже знание механизма гибели не сильно облегчило бы задачу. Потому в данном эксперименте необходимо следить за культурой в целом.

Рассмотрим синхронную культуру. В этой культуре все клетки проходят все стадии одновременно, степень синхронизации может быть разной. На кафедре биофизики важное место, но далеко не единственное занимают фотобиологические процессы. На них очень удобно заниматься кинетикой. Синхронизация культуры – сложный процесс, фотобиологические процессы запускаются при поглощении света: дается мощная вспышка и процесс запускается сразу во всех клетках. В ферментативных процессах для синхронизации используется "stopped flow" метод. При использовании данного метода, из двух шприцов смешиваются под давлением фермент и субстрат. Недостаток использования данного метода для изучения кинетики в том, что элементарный процесс, когда субстрат сел в активный центр и пошла реакция расщепления, допустим, связи в субстрате, занимает времена порядка наносекунд  $10^{-9}$  секунды. В случае фотосинтеза мы можем использовать фемтосекундный импульс порядка  $10^{-15}$  секунд (на кафедре используют импульс  $10^{-12}$  секунд). Однако, невозможно смешать (время  $10^{-9}$ ) субстрат с ферментом за время, меньшее чем в лучшем случае доли микросекунды, что не позволяет заниматься кинетикой быстрых процессов.

На рис. 2 изображена экспериментальная кривая. Теперь нам нужно навязать наше представление о том, что она означает. Представления, которые мы навязываем ей, исходя из наших соображений, мы должны записать математическим языком. Мы говорим о том, что в какой-то момент времени  $t_1$  осталось в живых  $N$  клеток. За какой-то короткий момент времени  $t + \Delta t$  это количество живых клеток уменьшится на какую-то величину  $dN$ . Какая это величина, нам неизвестно  $-dN$  (2.1).

$$-dN = kNdt \quad (2.1)$$

Из этого уравнения получим, что количество умерших клеток будет тем больше, чем исходно было живых в момент начала наблюдения. Поэтому  $-dN$  будет пропорциональна числу  $N$  оставшихся в живых и подверженных умиранию. Естественно,  $dN$  будет тем больше, чем дольше происходит наблюдение, поэтому оно будет пропорционально времени  $dt$ .  $k$  - коэффициент пропорциональности, его смысл будет определен позднее.

$$\frac{dN}{N} = -kdt \rightarrow \int_{N_0}^0 \frac{dN}{N} = \int_0^\infty -kdt \quad (2.2)$$

$$v = -\frac{dN}{dt} = -kN \quad (2.3)$$



Дальше решим дифференциальное уравнение (2). Скорость гибели клеток  $v$  (3) — это скорость  $dN/dt$ . Что важно: мы синхронизовали, посадили всех и они все должны умереть, но каждая по своей программе, в разное время. Мы не знаем, когда каждая умрет, знаем, что они все рано или поздно по очереди будут умирать. Это означает, что есть вероятность того, что каждая из них умрет. Таким образом,  $k$  - вероятность гибели каждой клетки.

Обычно вероятность - величина, которая по определению меньше или равна единице. В нашем случае мы не знаем, в каком интервале находится наше число  $k$ , поэтому возможно вероятность – не самое удачное название для нее, но все к нему привыкли.

Когда мы решаем это уравнение, мы получаем экспоненциальный закон затухания (4).

$$N = N_0 e^{-kt} \quad (2.4)$$

Это универсальная ситуация в биологии и не только (например, распад атомов). Возникает вопрос: сколько в среднем живут клетки? Эта ситуация в биологии очень важная. Часто бывает так: даете токсин на культуру, она умирает, вы проверяете крепость, силу яда на одной и той же культуре и говорите: когда, где они умерли скорее, там яд более сильный. Соответственно, мы можем охарактеризовать силу используя среднее время жизни. Как его найти? В момент времени  $t_1$  живых клеток было  $N$  и умерло  $dN$ . Их время жизни было  $t_1$ , остальные продолжали жить. В момент времени  $t_2$  умерло еще несколько клеток, их время было  $t_2$ . Давайте сложим: попарно умножим  $t$  на  $dN$ , сложим их и разделим на общее число клеток. Это будет среднее время (2.5).

$$\tau = \bar{t} = \frac{t_1 dN_1(t_1) + t_2 dN_2(t_2) + \dots}{N_1(t_1) + N_2(t_2) + \dots} \quad (2.5)$$

У вас - пять знакомых. Один прожил 50 лет, два прожило 75 лет, еще два - 80. Какое среднее время жизни ваших знакомых? Берем  $50 + 2*75 + 2*80$ , делим на пять и получаем среднее время их жизни. Среднее время жизни клеток считается тем же способом. Давайте подсчитаем, чему оно равно -  $t$  умножить на  $dN$ . Берем интеграл от 0 до бесконечности. Полученный интеграл разделим на  $N_0$ . Не будем решать это уравнение, брать интеграл, а поверим, что это –  $1/k$ .

$$\tau = \bar{t} = \frac{\int_0^{\infty} t dN(t)}{N_0} = \frac{1}{k}$$

Это значит, что среднее время жизни - величина, обратная  $1/k$ . То есть, коэффициент пропорциональности, или, как мы его назвали, вероятность гибели клетки оказывается



обратно пропорциональна ее среднему времени жизни. Однако вероятность - безразмерная величина, а наше  $k$  размерность имеет.

Размерность — это важное обстоятельство, которое надо учитывать. Значит, размерность константы - секунды в минус первой степени. Много это, или мало? Давайте посмотрим, что это такое. Время оборота фермента - примерно  $10^{-2}$ - $10^{-3}$  секунды, универсальное время для многих ферментов. Значит, один акт требует  $10^{-2}$  секунды. Время среднее —  $10^{-2}$  секунды. Значит, константа — это  $10^2 \text{ с}^{-1}$ . Это значит, если мы мысленно представим, что клетка умерла и тут же ожила, то сколько в секунду таких актов она может совершить?  $10^2$  актов в секунду, 100 в секунду. Это говорит о том, как быстро она может к такому результату, как смерть, прийти - 100 раз в секунду.

Если рассматривать возбуждение атома или флуоресценцию - испускание  $10^{-9}$  секунды, константа флуоресценции, испускания света -  $10^9 \text{ с}^{-1}$ . Это значит, что данный процесс может происходить миллиард раз в секунду. Это называется вероятность, в смысле способность испускать свет, или умирать, возвращаться опять, но это все мысленно.

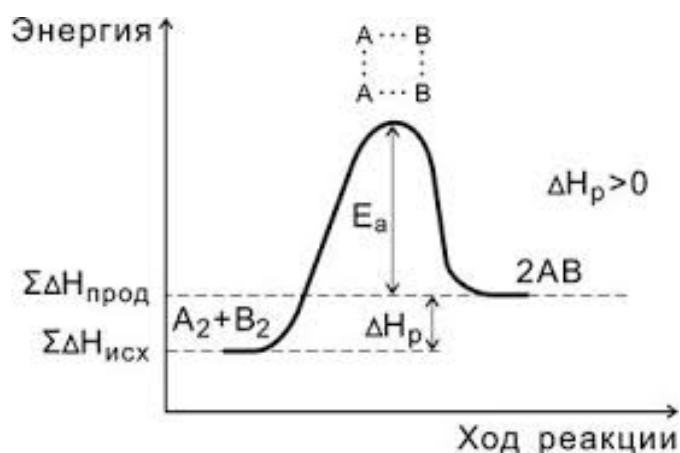


Рисунок 2.4. Кривая потенциальной энергии реакции

Еще одна догма, которую мы имеем из обычной физической химии — наличие энергии активации. Формальные понятия энергии активации будут разбираться в данном курсе, когда пойдет речь о ферментативном катализе. Представление о том, что реакция происходит за счет «горячих» молекул - правильное. «Горячие» молекулы - те, которые имеют достаточную кинетическую энергию, чтобы преодолеть активационный барьер. Но, если посмотреть на реальную кинетическую энергию, что значит, преодолеть барьер? Это значит, что молекуле необходимо разорвать какие-то связи. Если сравнить энергию связи,

ту, которую надо затратить, чтобы разорвать ее, с кинетической энергией горячих молекул, то не хватит кинетической энергии. По этой причине не надо представлять это как удар и последующий разрыв. Это - удар, достаточный, чтобы преодолеть взаимное отталкивание, и чтобы реагенты сблизилась на достаточно короткие расстояния. Там работает квантовая химия и перекрывание орбиталей. Это - с точки зрения внутреннего механизма.

Итак, среднее время - время, обратное вероятности или частоте событий, связанных со смертью клетки.

## Построение модели

Построение модели начинается с осмысливания ситуации. Математическая модель – описание каких-либо процессов математическим языком. Следующий этап - исследование свойств модели специфическими для математики методами, этот этап, скорее всего, будет проводиться специалистами в области моделирования. Роль биолога - составление и оценка результатов.

Математические модели начались задолго до того, как мы раскрыли все детали. В случае дыхания, зависимость скорости дыхания от субстрата была определена еще до того, как цикл Кребса и гликолиз были расшифрованы во всем объеме. Так модель Вольтерра-Лотки, была в начале 20 века, и примерно это время - расшифровка биохимиками гликолиза.

## Модель гликолиза

Было известно, что глюкоза поглощается клеткой, кислород поглощается, происходит дыхание, еще Лавуазье показал, что горение, дыхание - в принципе одно и то же. Выделяется  $\text{CO}_2$  и вода. Можно построить модель, представить себе (люди не знали про гликолиз и Кребса, но понимали, что это - не одноактный процесс) биохимический цикл в самом примитивном виде. Цикл — это когда конечный продукт превращается в начальный. Представим себе двучленный цикл. (рис 5)

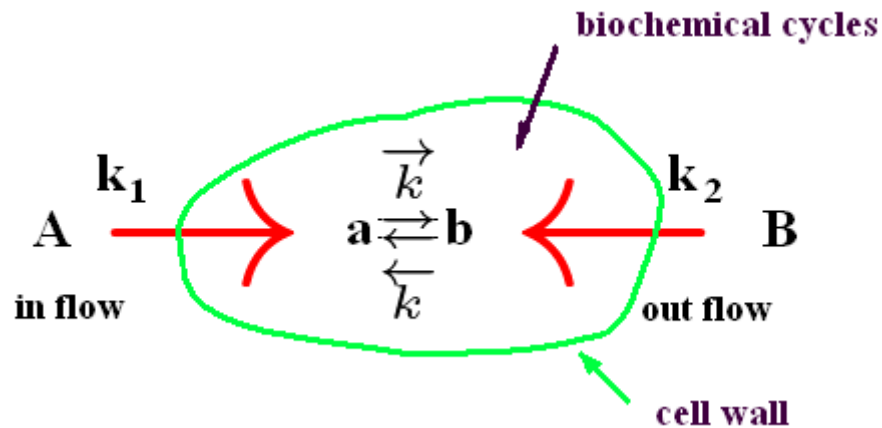


Рисунок 2.5. Двучленный цикл. Биохимия гликолиза

А переходит в В с константами  $\vec{k}$  и  $\bar{k}$  (прямая и обратная реакции). Источник глюкозы - А, постоянный за время наблюдения т.к. мы предполагаем, что избыток глюкозы велик и он не расходуется существенно. В биологии избыток пищи — это частое предположение. Глюкоза проникает внутрь посредством, например, активного транспорта или диффузии - за счет разности концентраций. Давайте считать, что транспорт необратим и идет в одну сторону (6). Обычно диффузия идет в обе стороны.

$$\frac{da}{dt} = k_1(A - a) + \bar{k}b - \vec{k}a = f_1(a, b) \quad (2.6)$$

Скорость поступления глюкозы (в-ва А) равна  $da/dt$ , пропорциональна разности концентраций снаружи и внутри ( $A-a$ ). Вещество а с константой  $\vec{k}$  переходит в вещество б. Цикл развивается, закручивается и возвращается на истоки с константой  $\bar{k}$  умножить на концентрацию b, вот - самое простое уравнение. С веществом b происходит то же самое (2.7).

$$\frac{db}{dt} = \vec{k}a - \bar{k}b + k_2(b - B) = f_2(a, b) \quad (2.7)$$

Оно образуется с той же скоростью, с какой а убывает, с той же константой, убывает, поскольку возвращается в конечном этапе цикла с константой  $\bar{k}$  и выходит наружу. В тут – большая, но на самом деле b - больше, чем В, и оно выходит наружу с константой  $k_2$ . Это - функция  $f_2(a, b)$ . Модель простая, отражает то, что мы знаем, о том, что там происходило. В данном случае мы исходим из упрощения. Упрощение здесь уместно, в нем мы превращаем сложный цикл в двучленный. Это значит, что константа  $\vec{k}$  - не одноэтапный

перенос, а в реальности соответствует более сложному процессу. Если бы мы все расписали, зная все константы, мы бы нашли, каким комбинациям констант может соответствовать  $\vec{k}$ . Однако в нашем случае в этом нет необходимости.

Можем заметить, что в этих уравнениях уже заложена регуляция в самом примитивном, но реальном случае. Скорость притока а равна разности концентраций снаружи и внутри. Регуляция состоит в том, что чем больше появляется вещества а, тем меньше эта разность и тем меньше скорость. Это - очень примитивный пример, но фактически он представляет регуляцию по принципу отрицательной обратной связи.

Пользуясь помощью коллег-математиков, получаем решение уравнений. Прежде всего, мы хотим узнать стационарную точку. По определению, стационарная точка - состояние, при котором переменные а и b не меняются. Мы их называем  $\bar{a}$  и  $\bar{b}$ . Как мы можем их найти, не решая уравнение? Что значит - не меняются? Производная по времени равна 0. Мы приравняем к 0 правые части и решим систему алгебраических уравнений (2.8).

$$\begin{cases} f_1(a, b) = 0 \\ f_2(a, b) = 0 \end{cases} \quad (2.8)$$

Найдем значения  $\bar{a}$ ,  $\bar{b}$ . Мы можем решить эти уравнения (2.9):

$$\begin{aligned} a &= \bar{a} + c_1 e^{-\lambda_1 t} + c_2 e^{-\lambda_2 t} \\ b &= \bar{b} + c_3 e^{-\lambda_1 t} + c_4 e^{-\lambda_2 t} \end{aligned} \quad (2.9)$$

$\bar{a}$ ,  $\bar{b}$  - стационарные значения плюс два экспоненциальных члена, где показатель экспонент -  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$ . Отсюда построить зависимость от времени а и b (2.10).

$$dt \quad t \rightarrow \infty \quad \begin{matrix} a \rightarrow \bar{a} \\ b \rightarrow \bar{b} \end{matrix} \quad \sim \quad \frac{d\bar{a}}{dt} = \frac{d\bar{b}}{dt} = 0 \quad (2.10)$$

Когда t стремится к бесконечности, все экспоненты уйдут в ноль, а и b примут стационарные значения. Это эквивалентно условию, когда производные равны 0. Надо долго ждать, чтобы они стали равны 0, но это так и есть. Сейчас мы понимаем откуда берутся эти кривые, но в момент открытия люди были удивлены. В экспериментах были получены кривые, экспериментальные зависимости а (концентрация глюкозы) и b (выделение CO<sub>2</sub> или поглощение кислорода). Переменные а и b в конце концов

устанавливались на стационарном уровне, но переходные кривые были различны в зависимости от начальных условий (рис 6).

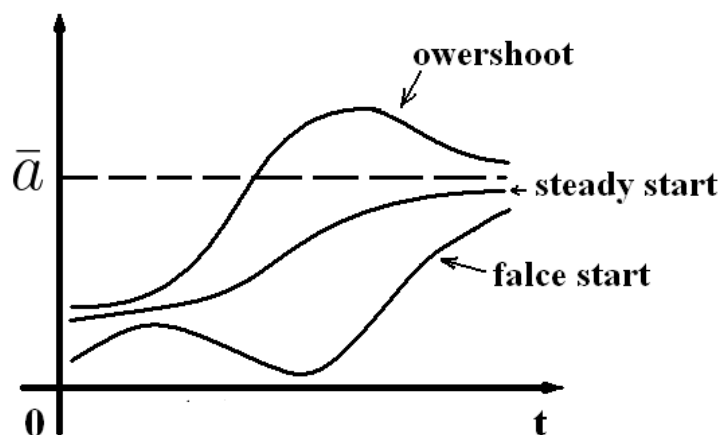


Рисунок 2.6. Достижение стационарного состояния в гликолизе

Важно, что все эти кривые все равно придут к стационарному состоянию и отличаются лишь видом:

- Устойчивый старт – постепенный рост без пересечения стационарного значения
- Ложный старт – кривая вначале уменьшается, а потом увеличивается
- Овершут, по-русски перехлест, пересекает точку стационара и после кривая постепенно возвращается к стационарному значению

Экспериментаторами был выдвинут принцип, что биологические системы обладают свойствами эквифинальности конечного стационарного состояния. Сейчас мы понимаем, это - не особое свойство, а следствие из модели. Математическое моделирование - дает проникновение вглубь свойств моделируемого объекта. Это - следствие решения уравнений, в данном случае дифференциальных.

В случае линейных уравнений – мы можем получить решение аналитически. Если уравнения нелинейные, то чаще всего прибегают к построению кривой при помощи компьютера. О приближениях будет отдельный разговор, поэтому пока опустим этот подход. Даже при большом кол-ве линейных уравнений возникает проблема, связанная со сложностью расчета.

## Качественный анализ

Однако, гораздо интереснее поставить общие вопросы, которые сродни качественной теории дифференциальных уравнений. Второй - качественный анализ. Сила данного подхода в том, что он может решить целый ряд проблем:

1. Количество стационарных состояний.
2. Определение устойчивости
3. Приближение системы к устойчивому состоянию
4. Колебания.
5. Самоорганизация

В рассмотренном выше примере стационарное состояние одно, т.к. мы рассматриваем линейное уравнение и корни уравнения - одни. В случае нелинейного уравнения, может быть несколько корней. Тогда нам нужно знать их количество и устойчивость.

Самый банальный пример колебаний в случае организмов – биологические часы. Даже в случае изоляции организма у него будет наблюдаться циркадный ритм, он будет наблюдаться долгое время после изоляции, после чего начнет затухать.

Вопрос самоорганизации так или иначе в биологии стоял довольно давно. Организация - уменьшение энтропии. При поверхностном наблюдении может показаться что это нарушает второй закон термодинамики, она должна увеличиваться самопроизвольно, но в живых системах самопроизвольно уменьшается. Далее в курсе будет рассказано про это подробнее.

Качественная теория дифференциальных уравнений дает возможность отвечать на эти вопросы. Чтобы уменьшить количество уравнений, мы пользуемся принципом узкого места.

## Принцип узкого места

В клетке данный принцип объективно отражает разную временную шкалу в процессах, объединенных в единую систему в клетке. В первом приближении, можно разделять эти процессы на три большие группы:

1. Ферментативные процессы - самые быстрые –  $10^{-2}$ - $10^{-6}$  секунды. Более быстрых процессах – большая редкость.
2. Процессы физиологической адаптации, в которых ферменты также участвуют. Это - процессы порядка секунд.
3. Репродукция. Она различается у разных организмов в широких пределах.

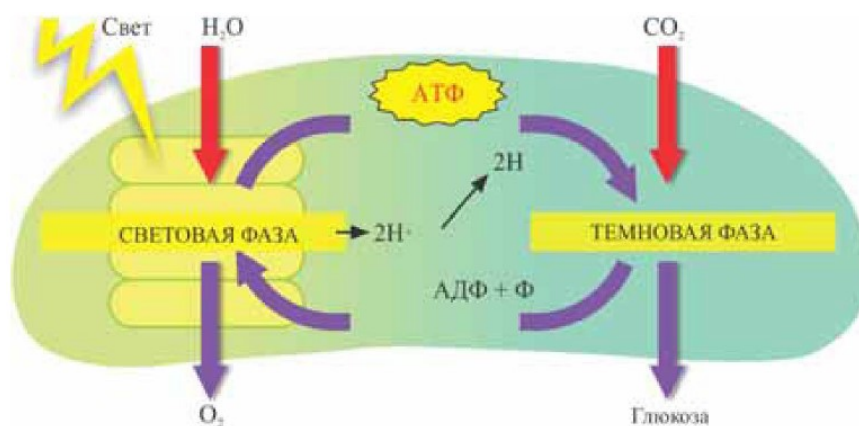


Рисунок 2.7. Схема фотосинтетических процессов

Пример из биологии – фотосинтез (рис. 7): начальная реакция - поглощение света, перенос электрона, образование стабильных продуктов фотосинтеза: АТФ и НАДФ-фосфат. Потом они идут в темноту и с помощью ферментативных реакций происходит выделение кислорода, восстановление  $\text{CO}_2$  и образование продуктов фотосинтеза. Фотохимические реакции - очень быстрые, времена их  $10^{-12}$ - $10^{-3}$  секунды: освобождение электрона, переход по переносчикам. Потом идут ферментативные реакции. Время оборота фермента с  $10^{-1}$  секунды до  $10^2$  - 100 секунд, когда много ферментов будет.

Принцип узкого места заключается в иерархии времен. Мы будем смотреть выход кислорода, конечного продукта, в зависимости от интенсивности света, при разных температурах. При этом экспериментально мы получим так называемую световую кривую фотосинтеза при разных температурах  $T_1^0$  и  $T_2^0$ .

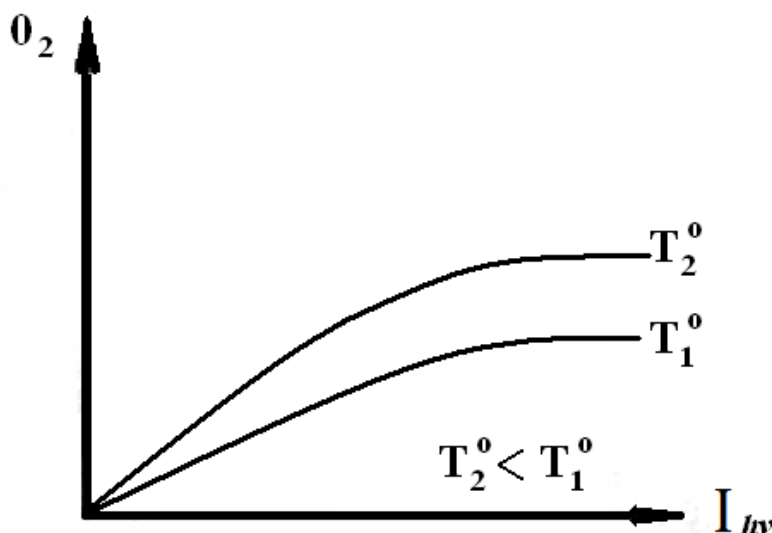


Рисунок 2.8. Пример световых кривых фотосинтеза при разных температурах

Мы начинаем увеличивать интенсивность света, скорость выделения кислорода растет. Потом рост замедляется и приходит в насыщение. Это происходит потому, что при небольших интенсивностях света количество электронов, которые освобождаются, не такое большое. Ферменты, которые ждут эти электроны, в достаточном количестве, могут все их подхватить, и в ходе дальнейших реакций за счет энергии дальше образуется глюкоза и выделяется кислород. Продолжая увеличивать интенсивность света, = мы увеличиваем количество электронов, и в какой-то момент оно превышает возможности ферментативных систем использовать их для восстановления  $\text{CO}_2$ . При дальнейшем увеличении интенсивности света выход продуктов не увеличивается, а энергия тратится на побочные процессы, например нагревание листа. При малых интенсивностях света выход кислорода лимитирует интенсивность света – это узкое место. Электроны могут быть подхвачены, ферментов много. При увеличении интенсивности света узкое место меняется, электронов много, соответственно, оно переходит на ферменты.



Заметим, что фотохимические реакции не зависят от температуры. Однако ферментативные процессы, от температуры зависят. По закону Аррениуса, при увеличении температуры энергия активации падает. Соответственно, при повышении температуры начинает увеличиваться скорость ферментативной реакции. Это значит, что ферменты могут работать быстрее и кол-во электронов, с которыми они могут взаимодействовать за единицу времени – больше. Значит, насыщение при повышении температуры будет, но при более высоких скоростях выделения конечных продуктов. И даже при других более высоких интенсивностях света.

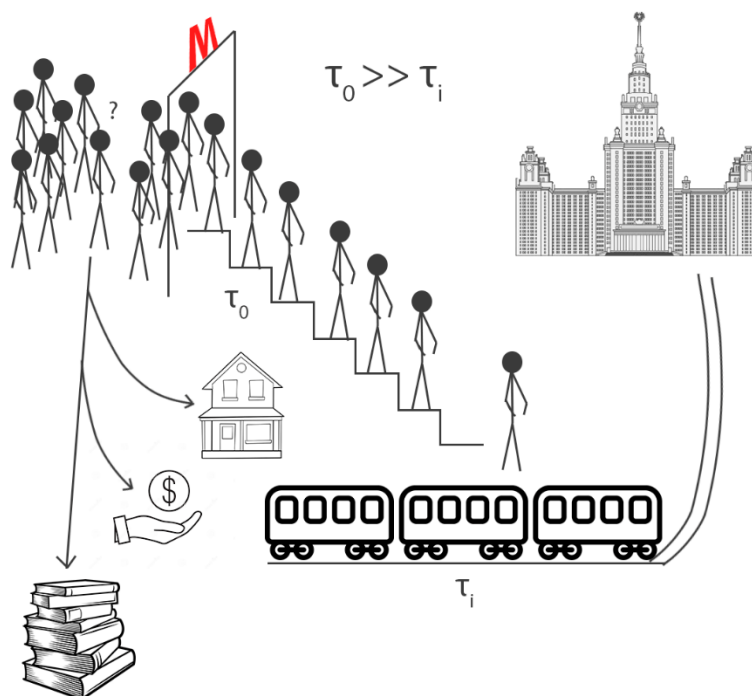


Рисунок 2.9. Иллюстрация к примеру о нелегком выборе студента в метро

Пример. Студенты торопятся попасть в вуз. Для этого им нужно спуститься в метро по эскалатору и попасть на поезд. В случае, когда людей в метро много – приходится долго стоять. Получается, что эскалатор - узкое место. Если увеличить частоту поездов в единицу времени, это не поможет. Наоборот, если пустой эскалатор, вы пробегаете быстро вниз, тогда, если время пробега по эскалатору меньше, чем время промежутка между поездом, узкое место – промежуток между поездами. Здесь регуляция по принципу обратной связи. По этой причине часть студентов не попадает на пары, а идет заниматься другими делами.

## Саморегуляция

В период становления были популярны гидродинамические модели. Вот аналогия, не модель реальная. Система открытая, стационарный уровень устанавливается, когда скорость притока равняется скорости оттока. В конце - кран, который открывается или закрывается, увеличивая или уменьшая приток воды. Если мы увеличим приток воды, уровень поднимется и установится на новом уровне. Это - не регуляция, это - ответ на внешнее воздействие, изменение внешних условий. При уменьшении притока - уровень воды опустится. Регуляция в биологии, одно из центральных понятий, — это способность системы в ответ на изменение внешних условий перестроиться таким образом, чтобы перейти в прежний режим, или какой-то другой. Этот процесс не тождественен простому ответу на внешнее воздействие.

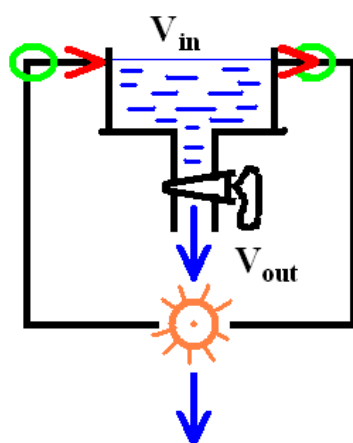


Рисунок 2.10. Иллюстрация к примеру про саморегуляцию

Представьте, что вода вытекает, крутит динамо-машину. Динамо-машина дает ток, который зажигает лампочку. Свет, исходящий из лампочки, проходит через воду на фотоэлемент. Если уровень воды повышается, нужно кран открыть, если понижается - прикрыть, кран присоединен к мотору. Когда свет поглощается, идет сигнал, сигнал передается на мотор за счет энергии вытекающей воды, это - система саморегуляции. Если бы мы сказали, что сами будем крутить кран, это - не саморегуляция.

Теперь мы имеем принцип узкого места, который позволяет уменьшать число уравнений. Рассмотрим подробнее принцип узкого места. Возьмем две переменные: медленная  $x_1$  и

быстрая  $x_2$ . Характерное время изменения -  $\tau_1$  и  $\tau_2$ . Она меняется медленно.  $\tau_1 > \tau_2$ . Они подчиняются дифференциальным уравнениям, похожих на те, что были рассмотрены ранее (2.11).

$$\begin{aligned}\dot{x}_1 &= f_1(x_1, x_2) \\ \dot{x}_2 &= A f_2(x_1, x_2)\end{aligned}\quad (2.11)$$

Как записать то, что у нас есть быстрые и медленные переменные? Медленная переменная  $x_1$  - обычная функция двух переменных. скорость переменной  $x_2$  должна быть очевидно больше, т.к. она быстрая. Запишем так: мы можем выделить какую-то величину  $A \gg 1$  из быстрой функции. Затем, вынесем ее перед  $f_2$ . Функция  $f_2$  теперь будет того же порядка, как  $f_1$ . Тогда если мы  $A$  перенесем в левую половину уравнения, получаем (2.12) и (2.13).

$$\frac{1}{A} = \varepsilon \approx 0 \quad (2.12)$$

$$\varepsilon \cdot \dot{x}_2 = f_2(x_1, x_2) \approx 0 \quad (2.13)$$

Что значит примерно 0? Вообще, большая или малая - некорректно, по сравнению с чем? По сравнению с изменением  $\dot{x}_1$  — это величина малая, то есть, она пребывает около своих стационарных значений. Парадокс в том, что такая большая и так быстро меняется, что все время находится около своих стационарных значений.

Аналогия: допустим, медленно маленький кораблик плывет по волнам, без паруса. На ряби волн он подпрыгивает, идет то вверх, то вниз, все это быстро по времени, если вы посмотрите его путь от А до В, то он меняется, увеличивается, потому что волны его тянут, но если вы посмотрите его положение относительно поверхности воды, в среднем, оно будет постоянно. То есть, такой быстрый, что в среднем, стационарный.

В результате мы можем уменьшить количество уравнений, приравняв (2.13) к 0. Это - объективный способ уменьшать уравнения. Если переходить к регуляции, как способу управления системой (она сама себя регулирует, а мы хотим ей управлять), можно управлять, если понять вначале, как система на что реагирует. Зная только операционные способы управления, вы не можете интуитивно почувствовать, к чему могут привести изменения в системе, даже не в столь отдаленных последствиях.

## Лекция 3. Нелинейные процессы. Модель "Хищник-жертва".

У Вольтерра родственник ловил рыбу у берегов Норвегии и у него периодически менялись уловы. Жертвы в данном примере- селедка или треска. Вольтерра, математик, помог ему и создал модель, которая позже получила название "Хищник-жертва" (3.1).

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dT} &= k_0 x - k_1 x y \\ \frac{dy}{dT} &= k_1 x y - k_2 y\end{aligned}\quad (3.1)$$

Исходные представления - очень простые. Примером могут быть волки и зайцы. Скорость размножения жертв пропорциональна их числу  $x$  и некоему коэффициенту  $k_0$  – коэффициенту размножения. Зайцев едят волки. Основное предположение заключается в том, что для того, чтобы съесть зайца, волку надо его встретить. Скорость исчезновения популяции зайцев-жертв пропорциональна числу встреч между ними и хищниками-волками. Число встреч определяется как в химии: реакция второго порядка - произведение концентраций. В данном случае используются не концентрации, а плотности популяций. Считается, что понятие плотности популяций, как и концентраций, - некая величина, которая соответствует равномерному распределению всех особей в данном ареале. Это - упрощение сильное и поэтому пишется константа  $k_1$ . Размерность константы  $k_0$  - единица на число особей на время. А  $xy$  - произведение концентраций (лучше сказать, плотностей популяций) В константе  $k_1$  учтено все - частота встреч, эффективность встречи. Так, например, заяц может убежать, волк может его не догнать и т.д.

Волки едят зайцев и размножаются. Это - условие размножения. Кроме того, волки умирают от различных причин с постоянной скоростью. Результат этой модели в том, что мы находим особую точку. Рис. 3.1.



Это - точка типа центр. Вокруг нее по фазовым траекториям происходит изменение численности популяций.  $k_1xy$  - нелинейный член - является ключевым в данной модели. Этот член нелинеен т.к. сумма показателей при его переменных больше единицы. Система такова, что, если вы сошли с этой траектории на другую, вы будете продолжать с той же частотой движение, но по другой амплитуде. Данная система не очень стабильна.

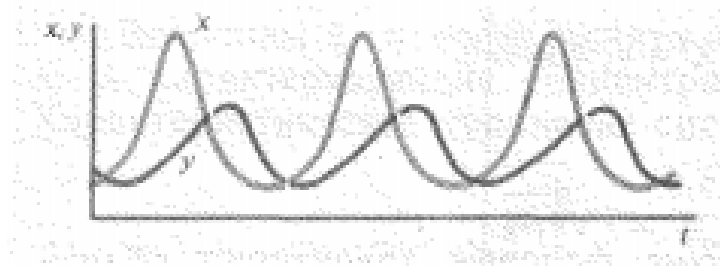


Рисунок 3.2. Зависимость численности хищника  $y$  и жертвы  $x$  от времени

Однако уже здесь видна регуляция (рис. 3.2).

Найдем значения особой точки, приравняв к нулю правые части дифференциальных уравнений:

$$\begin{cases} k_0x - k_1xy = 0 \\ k_1xy - k_2y = 0 \end{cases} \quad (3.2)$$

Нулевые значения не интересны, потому что там ничего не происходит. А вот вторые корни (3.3)

$$\begin{aligned} \bar{x}_2 &= \frac{k_2}{k_1} \\ \bar{y}_2 &= \frac{k_0}{k_1} \end{aligned} \quad (3.3)$$

Численность зайцев тем больше, чем больше  $k_2$  и тем меньше, чем больше константа  $k_1$ . Когда константа  $k_1$  увеличивается значит, волки быстрее едят, и, соответственно, численность зайцев уменьшается. Более интересна зависимость численности зайцев от  $k_2$  - скорости уменьшения численности волков. Численность волков же увеличивается, когда увеличивается константа  $k_0$ , когда прибавляется больше еды. Если константа  $k_1$  увеличивается, численность волков уменьшается. Получаются своего рода качели. Сравните это с тем, что было бы, если эта модель была эквивалентна реакции первого порядка, никакой бы нелинейности не было. Вот простое уравнение (3.4)

$$\begin{aligned}\dot{x} &= k_0 - k_1 x \\ \dot{y} &= k_1 x - k_2 y\end{aligned}\quad (3.4)$$

Например: зайцы  $x$  размножаются с постоянной скоростью. А убывают - умирают сами по себе  $k_1 x$ , их волки едят. Это было бы возможно, если бы волки были падальщиками и поедали зайцев только после смерти — это константа  $-k_1 x$ . Волкам в данном примере не надо ничего искать. Численность волков  $y$  будет  $k_1 x$  и минус убыль волков  $k_2 y$ . Численность зайцев, которые умирают,  $\bar{x}$  пропорциональна  $k_0$  и обратно пропорциональна  $k_1$ . В случае волков картина примерно та же. Их численность увеличивается от количества пищи пропорционально  $k_1$  и уменьшается пропорционально  $k_2$ .

$$\begin{aligned}\bar{x} &= \frac{k_0}{k_1} \\ \bar{y} &= \frac{k_1}{k_2}\end{aligned}\quad (3.5)$$

Гармонические колебания, являются результатом регуляции по принципу обратной связи. Сначала много волков, а зайцев мало. Волки едят зайцев, не представляя себе, что их ждет. При уменьшении численности зайцев, численность волков тоже уменьшается. При уменьшении численности волков, численность зайцев начинает увеличиваться. Через некоторое время волков становится мало, зайцев много, при этом зайцы продолжают размножаться. При этом волки опять размножаются до такой степени, что съедают всех зайцев. Зайцы начинают уменьшаться. Волки продолжают их есть, съедают столько, что зайцев становится меньше и волков становится меньше. Все возвращается на круги своя. Это - чисто качественно. Регуляция - в том, что они регулируют численность. Численность волков зависит от численности зайцев. Данная модель не является абстракцией, она отражает реальные изменения численности (рис 3.3)

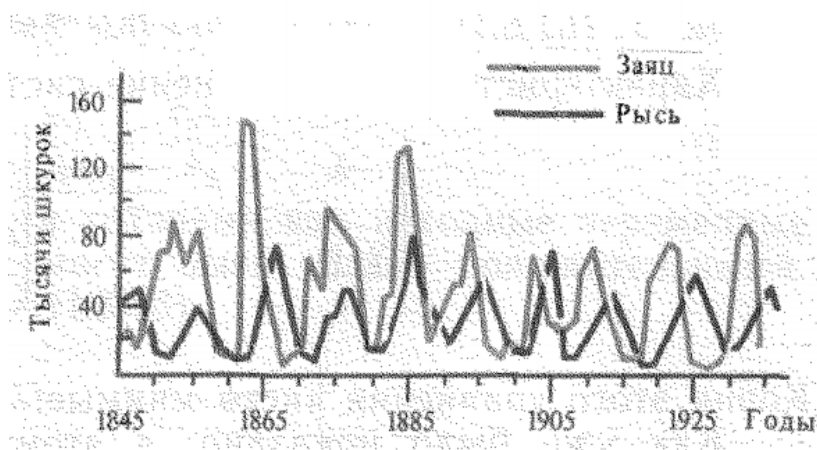


Рисунок 3.3. Кривые численности зайца и рыси в Канаде. По К. Вилли, Е. Детье., 1974

На графике выше представлены данные почти за 100 лет наблюдений. Примечательно, что на реальном графике присутствует сдвиг. Кроме этого, на них присутствует характерная изрезанность в некоторых местах. Легко представить при такой точности экологических наблюдений ошибки.

После, биологи стали заниматься тем, чтобы в лабораторных условиях воспроизвести эту динамику и эти опыты были сделаны. В 30-ых годах ученый Гаузе занимался тем, что на хищных парameциях изучал эти колебания. Есть еще пример: соевый долгоносик и паразит

наездник. Было очень много опытов, до сих пор есть, делают на размножении личинок, кто-то их ест, они быстро размножаются.

В рассмотренных примерах был рассмотрен только самый простой (и основной) фактор нелинейности - число встреч, пропорционально произведению численности. В экспериментальных условиях это оправдывается. Теперь посмотрим, что будет, если мы учтем некоторые другие факторы, например эффект тесноты (3.6). Все константы положили равными единице. Этот фактор, который в биологии хорошо известен - вариации на тему внутривидовой борьбы за пищу. К примеру, на всех травы не хватает, особи мешают друг другу. Существуют разные способы учесть данный фактор. Примечательно, что простые математические, почти арифметические выражения чаще всего наиболее оправдываются. В данном случае особи мешают друг другу - уменьшают скорость размножения. Ставим коэффициент размножения.

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= x - xy - \gamma_1 x^2 \\ \frac{dy}{dt} &= xy - y - \gamma_2 y^2\end{aligned}\quad (3.6)$$

Обозначим буквой гамма коэффициент, отражающий влияние степени взаимной тесноты. Дальше переменная самая естественная -  $x^2$ , так как частота встреч особей одного вида пропорциональна квадрату численности. Волк, из примера выше, сам себе мешает. В данном курсе важно показать именно возможность различных типов динамического поведения, и потом попытаться найти соответствие между свойствами математической модели и тем, что мы наблюдаем в природе.

В свое время был заведующий кафедрой зоологии позвоночных Наумов Николай Павлович. Он был одним из авторов работы по математическим методам в экологии. Он говорил: «Я поражен, насколько вопросы и формулировки, которые мы в экологии задаем по поводу факторов и типов динамического поведения экологических особей, адекватны тем вопросам, которые задают люди, занимающиеся качественной теорией дифференциальных уравнений. В данном случае - поведение системы на фазовой плоскости и насколько все это совпадает по духу, хотя выражения разные. Производные, положительные, отрицательные, в экологии этого нет».



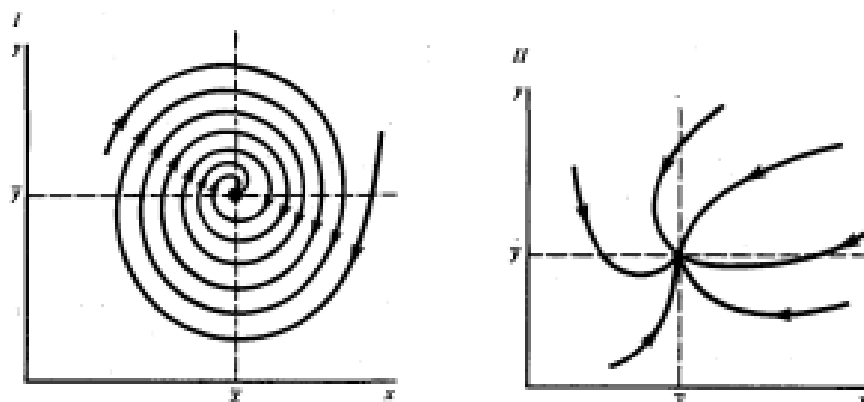


Рисунок 3.4. Примеры фазовых портретов системы

Тем не менее, вместе это составляет единую картину. В данном случае, когда  $\gamma_1, \gamma_2$  равно 0, на фазовой плоскости центр. Когда  $\gamma_1, \gamma_2$  - какая-то величина большая, но не очень большая, у нас появляется колебательная устойчивость - устойчивый фокус. Если изучаемая система вернется в стационарное состояние постепенно — это будет устойчивый узел. Колебательным образом - устойчивый фокус. Когда гамма - очень большие, колебательный характер уходит. Мы имеем устойчивый узел. Учитывая разные факторы такой модели, можно получить разные типы динамического поведения.

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= x - \frac{xy}{1 + \alpha x} - \varepsilon x^2 \\ \frac{dy}{dt} &= -\gamma y - \frac{xy}{1 + \alpha x} - \mu y^2\end{aligned}\quad (3.7)$$

В модели "Хищник - жертва", в отличие от простой модели Вольтера, учтено насыщение хищника по жертве, чего, естественно, в природе нет. Чтобы ввести эти ограничения, в знаменатель вводится единица плюс  $\alpha x$ . Ограничение - в том, что, если  $x$  будет расти с маленьких значений, вначале будет числитель превалировать, а когда  $x$  стремится к бесконечности, предел дроби будет равен отношению коэффициентов в старших степенях. Это будет  $1/\alpha$ . Чем больше  $\alpha$ , тем  $1/\alpha$  будет меньше. Жертва и хищник тем самым ограничиваются. Кроме того, есть эффект тесноты. Этот эффект введен и для жертв  $-\varepsilon x^2$ , и для хищников  $-\mu y^2$ . Кроме этого, волки тоже стали сами умирать  $-\gamma y$ . В рамках лекции нам

до реальных приложений экологической системы далеко. Но мы ввели новые факторы. Посмотрим на изменение системы, будем менять два фактора. Эффект самоограничения  $\alpha$ , формально ввели, но посмотрим, и эффект тесноты  $\mu$  для волков.

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= x - \frac{xy}{1 + \alpha x} - \varepsilon x^2 \\ \frac{dy}{dt} &= -\gamma y - \frac{xy}{1 + \alpha x} - \mu y^2\end{aligned}\quad (3.8)$$

Рассмотрим параметрический портрет системы при фиксированных  $\gamma$  и  $\varepsilon$ . Теперь вся область возможных значений параметров тесноты и самоограничения распадается на отдельные области, в каждой из которых есть свой тип особой точки и фазовых траекторий.

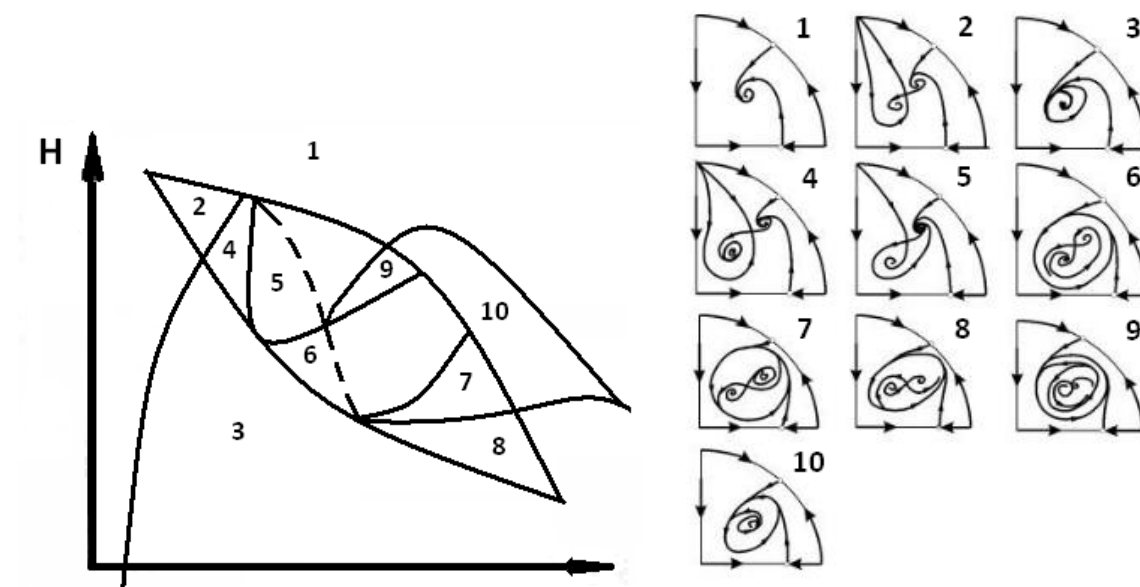


Рисунок 3.5. Фазовые области и портреты для модели «хищник-жертва»

В системе возможны:

1. Одно устойчивое равновесие (область 1 и 5)
2. Устойчивый предельный цикл (области 3 и 8) и т.д.

Давайте возьмем одну из областей и посмотрим на нее поближе. При этом мы меняем только два параметра - самоограничение и частоту. Оцените, насколько чувствительно

общее поведение системы ко всем характеристикам аэродинамического поведения только в зависимости от изменений только этих двух параметров. Это - саморегуляция.

Рассмотрим область 6. В этой области при этих значениях самоограничения и тесноты получается следующий характер фазовых траекторий (рис 3.6).

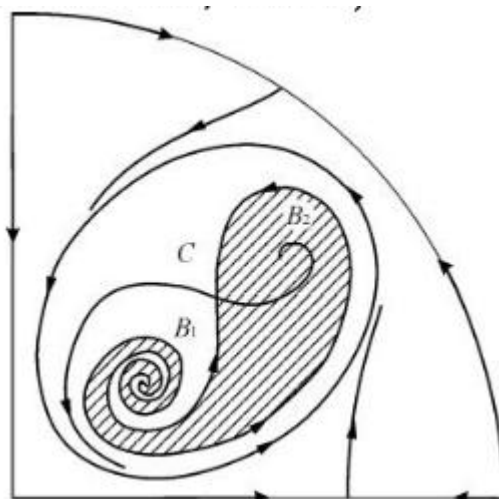


Рисунок 3.6. 6-я область фазового портрета модели «хищник-жертва»

Это фазовая плоскость для двух переменных, где  $Y$  - волки и  $X$  - зайцы.  $B_1$  - особая точка, неустойчивый узел. Во всей заштрихованной части плоскости все фазовые траектории от этой точки будут уходить и придут к точке  $B_2$  - устойчивому фокусу. В точке  $C$  - пересечение, седло, потому что две фазовые траектории направлены одна в одну сторону, вторая - в другую. Область выше точки  $C$  - неустойчивая, и все траектории, которые из нее выходят, переходят в траекторию предельного цикла. Он отличается от фазовой траектории типа центр тем, что при отклонении от цикла траектории способны обратно на него возвращаться - т.е. происходят устойчивые автоколебания. Существуют математические критерии, которые позволяют отличить цикл от центра.

Не надо забывать, что это - сравнение и аналогия с химической кинетикой это - столкновение молекул, однако в экологии все сложнее. Мы очень упрощаем картину. Съели зайца и, если рассматривать точнее, то можно предположить, к примеру, что съели его не целиком. В экологии, численность - с одной стороны, с другой - энергоемкость единицы биомассы. Необходимо как-то сопоставлять их. В биохимической кинетике это сопоставляется, однако, есть принципиальные трудности.

## Колебания в ферментативных системах

Колебания в гликолизе – также классический пример, но уже из области биохимии. Классика – потому, что хорошо прослеживается путь, который надо пройти, когда мы занимаемся математическим моделированием. Он состоит в следующем: мы изучаем свойства объекта экспериментальными методами и наблюдениями, потом учитываем факторы, составляя математическую модель. Эта совместная работа биологов и математиков. Причем биологи отвечают за то, каким образом необходимо учитывать эти факторы при составлении математической модели. Важно верно оценить результат, полученный из модели. Необходимо понять, что он означает, провести обратную логическую задачу с помощью свойств биологического объекта, который вы изучаете. Далее следует обратная задача: вы получаете свойства математической модели и думаете, что это означает. И когда вы приходите к выводу, начинается самое главное: как проверить гипотезу и поставить эксперимент?

Описанный выше путь был проделан при рассмотрении колебательных процессов в гликолизе. Общее уравнение гликолиза:



Гликолиз — это анаэробное дыхание, самый древний путь образования АТФ. Он - небольшой по энергетической эффективности, там всего две молекулы АТФ. Еще вначале тратится молекула АТФ на первых этапах. Схематично ситуация выглядит таким образом: вот глюкоза, идет гликолиз, здесь в результате появляются две молекулы АТФ, НАДФН восстановленный и две молекулы пирувата. Молекулы пирувата после переходят в митохондрии. Схематично процесс описан следующим образом (рис. 3.7).

Пируват в пируватдекарбоксилирующем комплексе проходит через реакцию декарбоксилирования, в ходе которого выделяется  $\text{CO}_2$ . НАДФН еще раз восстанавливается, появляется ацетилкоэнзим А и дальше запускается цикл трикарбоновых кислот, основной путь. В ЦТК происходит очередное декарбоксилирование, а также освобождается электрон, появляются НАДФН и ФАД. Электроны от них поступают в электронно-транспортную цепь. В ЭТЦ протонный градиент, формируемый при прохождении электронов, тратится на синтез АТФ.

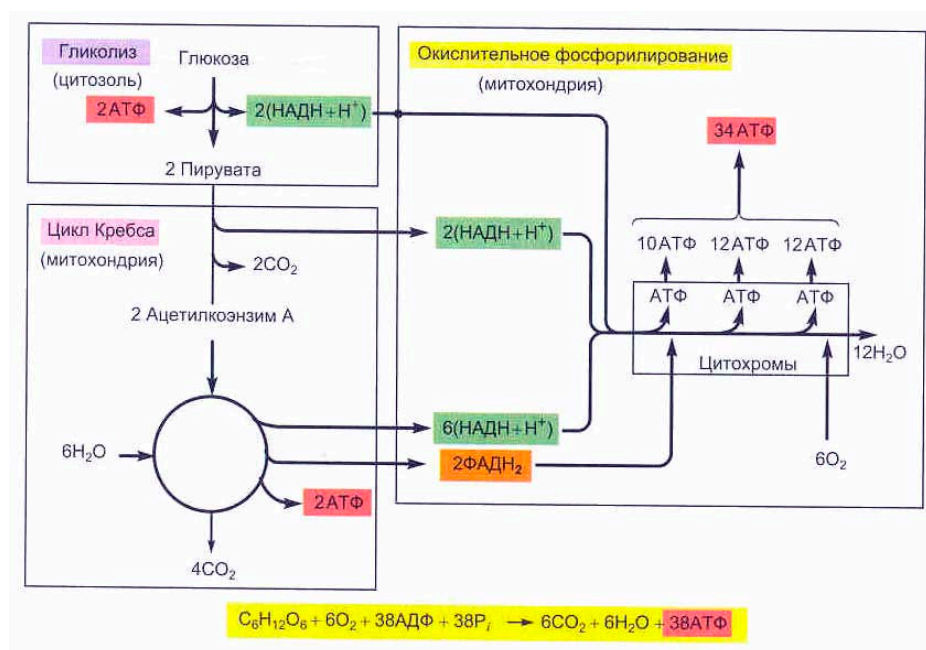


Рисунок 3.7. Схематичное изображение процессов полного окисления глюкозы в клетке

Далее будет рассмотрено, какие колебания получаются в гликолизе, а в ЭТЦ – когда мы будем молекулярной биофизикой заниматься. На данном объекте будут две важные проблемы: перенос электрона, за счет каких движущих сил и законов, и АТФ-синтаза, она ответственна за синтез АТФ. Биохимия расшифровала все до мельчайших подробностей, однако нас интересует вопрос, какие движущие силы в ней присутствуют, зачем происходит вращение и как все происходит с точки зрения взаимодействий компонентов. История экспериментального обнаружения периодических автоколебательных процессов, в данном случае было получено на клетках дрожжей, была поучительна. Рассмотрим ту часть гликолиза, которая непосредственно моделируется. Попадает глюкоза в клетку, АТФ расходуется на первых этапах, центральная реакция, о которой пойдет речь: глюкозо-6-фосфат переходит во фруктозо-6-фосфат и она переходит во фруктозо-би-фосфат. Эта реакция катализируется ферментом фосфофруктокиназой. Дальше получается фруктозо-6-фосфат, она переходит в фосfogлицериновый альдегид, дальше идет фосfogлицерат и т.д., Обратите внимание: процесс довольно быстрый сам по себе и понадобился колоссальный труд биохимиков где-то в 20-ых годах для его расшифровки, а цикл Кребса был расшифрован в митохондриях еще позднее - в 30-ых годах. Была проделана огромная

экспериментальная работа и отдельные стадии были выделены. Однако, мы не можем следить в режиме реального времени за ходом процесса, нам нужно фиксировать клетку - скорость превращения довольно большая. Это можно сравнить с уровнем воды в раковине. Если сравним скорость притока и оттока, то стационарный уровень будет очень мал. В организме человека в день образуется 50 кг АТФ. Это происходит из-за того, что АТФ образуется и расходуется с большой скоростью. Поэтому очень трудно найти при больших скоростях превращение расходуемая, получается маленькая стационарная концентрация, которую очень трудно ее определить. Это делается спектральными методами. Раньше для этого использовались приборы СФ-10 и СФ-4. Если вы что-то делаете с образцом, добавляете какой-то яд, активатор, и, если вещество поглощает или флуоресцирует на известной длине волны, можно исследовать его опираясь на эти характеристики. Например, цитохромы в окисленном и восстановленном состоянии меняют свое поглощение. Таким образом мы можем увидеть изменения экстинкции. В случае если изменения незначительны, следует повысить чувствительность прибора. Чувствительность упомянутых приборов была порядка одного процента, соответственно, они могли детектировать только одну молекулу из ста. С помощью спектральных методов чувствительность была повышена. Выдающийся биофизик Британ Чанс, который занимался дифференциальной спектрометрией во время войны, сделал прибор, рекордная чувствительность которого была на три порядка выше. Этого было достаточно для того, чтобы найти изменение поглощения при определенных видах волн промежуточных

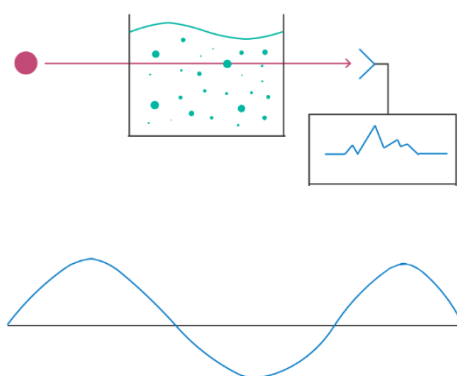
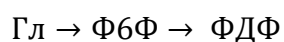


Рисунок 3.8. Иллюстрация к процессу изучения промежуточных соединений в синхронной культуре дрожжей

продуктов. Британ Чанз в своих экспериментах использовал синхронную культуру дрожжей и изучал протекающие в ней процессы.

Свет определенной длины волны, который поглощается или возбуждает флуоресценцию, проходя через среду попадал на детектор прибора. При введении глюкозы в клетках дрожжей запускался гликолиз и прибор начинал измерять поглощение промежуточных соединений. Ученый увидел, что есть некоторый разброс показателей около какого-то среднего значения. Когда он приехал на съезд биохимический съезд в Москву, биофизики из Пущино сказали, что тут наблюдается не разброс, а – автоколебания. Физическая точность данного эксперимента и чувствительность - очень хорошие, биологическая точность - достаточно хорошая, что позволяло делать предположения о наличии реальных автоколебаний в системе. Британ Чанз уже позже в Америке совместно с профессором Хиггинсом, рассчитал эти уравнения на компьютере. В ходе расчетов он получил колебания за счет подбора параметров. С таким большим количеством переменных трудно работать, надо каждый раз менять параметры и заново проводить расчет. Поэтому им не было проведено качественного анализа портрета на фазовой плоскости.

В России также занялись этой моделью. Реакция фосфорилирования Ф6Ф была выбрана потому, что из биохимических опытов было известно, что она - наиболее медленная. Был применен принцип узкого места. Можно было составить 22 уравнения, выделить и найти малый параметр, но ученые просто взяли биохимические данные по гликолизу и сказали (потому что это так и было по биохимическим данным), что это - наиболее медленная стадия. Эту стадию катализирует фермент фосфофруктокиназа, кроме того, в ней еще АТФ расходуется. Напомним, что в гликолизе АТФ сначала расходуется, потом образуется снова, поэтому небольшой выход АТФ. На выходе мы получаем продукт АДФ и циклическая АМФ. Тогда деталей не было известно, как работает этот фермент. В общем, если рассматривать гликолиз, все промежуточные стадии быстрые, а медленная - переход фруктозо-6-фосфата во ФДФ.



Давайте пройдем этот путь, составим простые уравнения. Пусть  $X$  — это фруктозо-6-фосфат,  $Y$  - ФДФ. Скорость изменения  $X$  — это скорость притока  $V_1$  минус скорость оттока  $V_2$ . Отток — это ферментативная реакция превращения фруктозо-6-фосфата. Далее



рассмотрим ФДФ, его концентрация равна  $Y$ . Скорость ее изменения равна притоку в ходе ферментативной реакции минус отток. Теперь надо написать простые уравнения.

$$\frac{dx}{dt} = v_1 - v_2 = f_1(x, y) \quad (3.9)$$

$$\frac{dy}{dt} = v_2 - v_3 = f_2(x, y) \quad (3.10)$$

В данной реакции никаких соударений нет, это - реакция первого порядка. Казалось бы, надо написать так: сначала берем скорость притока глюкозы. Можно взять большую или малую концентрации, это в нашей власти. Будем считать, что она – постоянная и глюкозы в системе сколько, что она не расходуется. Далее отток -  $-k'_2x$ .  $X$  - концентрация фруктозо-6-фосфата. ФДФ образуется со скоростью  $k'_2x$ . И расходуется по реакции первого порядка -  $k_3y$ .  $V$  - постоянная, а это - уравнение первого порядка. Если вы проведете анализ методами качественной теории, то никаких колебаний мы не получим.

Алгебраическую систему вы решите, найдете особые точки, стационарные, никаких колебаний не получится. Почему? Вот здесь понимаем великий смысл базовой модели Вольтера - он сказал: нужна нелинейность. В данном случае произведение  $XY$ . Это - условие, необходимое и в ряде случаев достаточное для осцилляции. Без нелинейности модель не даст колебаний и триггеров. Теперь попробуем найти эту нелинейность. Формально можно написать  $k_2xy$ . Но столкновений между  $x$  и  $y$  не происходит, получается продукт первого порядка. Однако то время не было в биохимии доказано, что это - реакция автокаталитическая. То есть, фермент фосфофруктокиназа активируется продуктами этой реакции. Значит ее активность тем больше, чем больше концентрация образованного продукта. Что это значит? Это - факт, который был предположен, но тогда и еще не был доказан. Биохимики это нашли без применения математики. Это было, как теоретики говорят, вложено руками в данную модель. Но как это записать? Самый простой способ: константа  $k'_2$  она тем больше, чем больше концентрация продукта. Будем считать, что  $Y$ . Записать это в самой простой форме можно так (3.11)

$$k'_2 = k_2y \quad (3.11)$$

Вот почему штрих был использован в самом начале объяснения. И если подставить сюда, получим уже другое уравнение,

$$\frac{dx}{dt} = v_1 - v_2 = f_1(x, y) \Rightarrow v_1 - k'_2x \rightarrow v_1 - k_2xy \quad (3.12)$$

$$\frac{dy}{dt} = v_2 - v_3 = f_2(x, y) \Rightarrow k'_2x - k_3y \rightarrow k_2xy - k_2y \quad (3.13)$$



Получится такая реакция. Но этого все равно недостаточно, т.к. зайцы не могут размножаться до бесконечности. Нужны какие-то самоограничения. Это - в экологических огромных просторах. А здесь все реакции должны быть ограничены по скорости. Скорость поступления глюкозы ограничена ее концентрацией снаружи и свойствами проницаемости мембран — это фактор, с которым мы работаем. Здесь у нас уравнение Михаэлиса-Ментен. Самый естественный случай самоограничения, это - когда мы в знаменатель поставим  $K_x$  - константу Михаэлиса - плюс  $X$ . Следующий раз про уравнение Михаэлиса-Ментен будет рассказано подробнее, пока мы просто его применяем на базе знаний из других пройденных курсов. И, соответственно, каждые  $X$  и  $Y$  должны иметь самоограничения. В данном случае речь не идет о том, что это - уравнение Михаэлиса-Ментен, а о том, чтобы скорость реакции превращения из  $X$  в  $Y$  должна самоограничиваться по концентрациям  $X$  и  $Y$ . Она не может бесконечно расти, эксперимент не позволяет это, поэтому, когда мы это сделаем, получим такое уравнение - в чем оно состоит: это - модель Селькова.

Мы теперь начинаем анализировать эту систему (обычным способом), находим особые точки, потом берем частные производные по переменным (как обычно делали на втором курсе), и потом смотрим соотношение величин частных производных, плюс, минус, особые точки, прочее, и получаем следующий результат.

Во-первых, константы Михаэлиса - достаточно большие. Соответственно, активность ферментов не очень велика. При решении этой системы мы получаем особую точку (рис. 3.9)

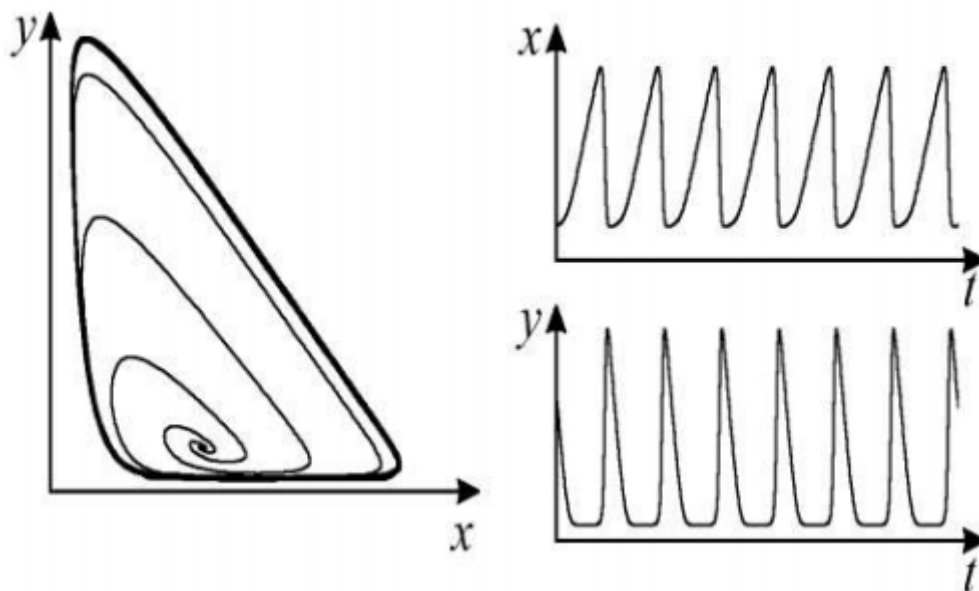


Рисунок 3.9. Фазовый портрет реакции гликолиза катализируемой фосфофруктокиназой

Теперь давайте посмотрим, какие имеются нелинейности. У нас появляется кубическая нелинейность, соответственно будет три корня. Когда мы будем к нулю приравнивать, у нас будет кубическая нелинейность. Это - сильная нелинейность. И так, у нас получается три корня и особая точка – неустойчивый фокус. Это – плохо, т.к. это не соответствует реальности. У нас колебания - периодические, как и наблюдалось в синхронной культуре дрожжей, в которой никаких неустойчивых фокусов не было. Что это означает? Наши переменные - вещественные. Они все должны быть, как говорят, вот в этом первом квадранте на фазовой плоскости. Это - первое условие, второе условие - они должны периодически повторяться и не выходить на бесконечность. В ноль они тоже не должны уходить, иначе нет системы. Значит, было показано (методами изоклин, потом нашли критерии) существование предельного цикла. То есть, здесь оказался предельный цикл, вот это - настоящие автоколебания, которые ни были подтверждены экспериментально. Справа на рисунке 3.9 можно увидеть колебания концентраций фруктозо-6-фосфата и ФДФ. Кроме того, NADPH, который там получается, все эти уравнения не зацеплены друг об друга, мы не можем точно если вы не напишете, в явном виде NADPH в другой реакции появляется

и колеблется тоже периодически, мы не можем точно сказать, как он связан со всеми, пока не напишем уравнения, но нам в данном случае это не важно, важно, что эти колебания идут синхронно по многим переменным. Скорее всего, многие переменные, но не все, также будут автоколебаться, поэтому это - экспериментальный факт, который доказан и модель, которая показывает, за счет чего это получается. Еще раз повторим, за счет чего модель указывает на нелинейность. Эта нелинейность связана с автокаталитической реакцией, которая катализируется ферментом фосфофруктокиназой, активность которой по предположению должна автокаталитически увеличиваться продуктами, которые появляются в результате самой реакции: положительная обратная связь.

Теперь подумаем, как это можно проверить. Для этого надо что-то делать с системой, то есть, надо посмотреть, от каких факторов свойства колебаний будут меняться и, может, они исчезнут в зависимости от каких-то факторов в самой модели. Вот так как в примере выше при введении тесноты появлялись изменялись точки: исчез центр, получился устойчивый фокус, а потом вообще узел. а здесь можно менять какие-то параметры нашей системы с тем, чтобы потом убедиться в том, что от этого свойства модели меняются. И потом это необходимо проверить в эксперименте. Потому мы можем в модель что угодно добавить, или даже придумать комбинацию констант, которую в природе, в реальности не осуществишь. Нам же надо что-то хорошее иметь, чтобы можно было пощупать, посмотреть, даже в модели Вольтера добавленный нами эффект тесноты. Как этот эффект менять в природе? Это надо какую-то другую систему иметь, другой эффект тесноты, а там не только он поменяется, еще чего-нибудь. Эти вещи очень трудно проверить. В экспериментальной экологии это можно делать. Были планы на факультете сделать кафедру экспериментальной экологии. Очень хорошая вещь, однако по ряду причин это не получилось сделать. В штатах существует экспериментальная «экологическая ниша». Ангар, с отводкой от реки в виде ручейка, объемом примерно с нашу аудиторию. В него поместили всех, кого могли: каких-то жуков и т.д. И, естественно, повесили датчики. Датчики представляли из себя целлофановые пакеты на листьях, для измерения газообмена. Задача этой «экологической ниши» была в том, чтобы провести тотальный опрос и посмотреть, как это коррелирует. Для экологии это трудный вопрос, но в случае биохимии все проще.

Стали смотреть, каким образом можно менять фазовый портрет в зависимости от тех переменных, которые входят в модель. Давайте посмотрим от каких параметров зависит

наш фазовый портрет. Оказалось - есть параметр  $\alpha$ , он формально получается из математики (3.14).

$$\alpha \sim \frac{1}{kx}$$

Он более сложен, но мы посмотрим на наиболее значимую часть из него. Он пропорционален величине  $x$ , концентрации глюкозы, и  $k$ , константе скорости поступления глюкозы. Оказалось следующее (рис. 3.10):

1. Если этот параметр меньше единицы, то колебаний нет, а есть особая точка - устойчивый фокус, имеется колебательная устойчивость.
2. Если этот параметр больше единицы, получается неустойчивый фокус с выходом на предельный цикл.

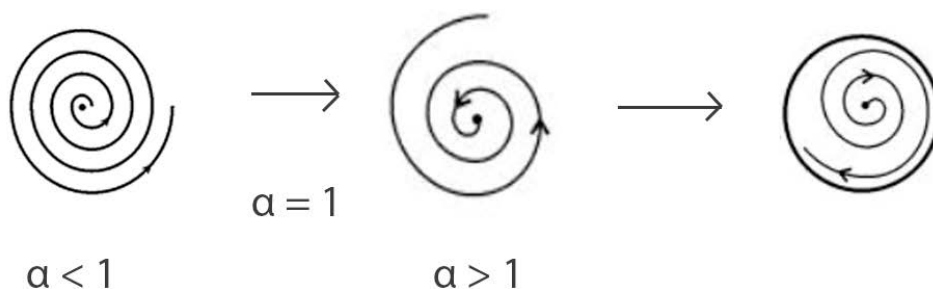


Рисунок 3.10. Изменение фазового портрета в зависимости от изменения коэффициента  $\alpha$

И как вы помните, бифуркационное значение параметра, когда фазовый портрет меняется резко — это альфа равна единице. Альфа — это формальный коэффициент, теперь перейдем теперь к жизни. Альфа обратно пропорциональна скорости поступлению глюкозы в клетку. Скорость поступления мы регулируем концентрацией глюкозы. На второй лекции рассматривались ситуации, когда поступление вещества  $A$  равнялось разности концентрации  $A$  снаружи минус  $A$  внутри. В ней фигурировала константа. Это - она и есть. Это мы можем регулировать. Мы можем давать глюкозу или же не давать ее, и таким образом, регулировать процесс. Когда альфа меньше единицы, знаменатель большой. Большой знаменатель - большая концентрация глюкозы наружи. Клетки сытые, не

колеблются. Маленький знаменатель, когда клетки голодные. И действительно, в экспериментах в чистом виде голодные клетки дают автоколебания, а когда увеличим концентрацию глюкозы до определенного момента увидим, что сытые клетки не дают колебаний, а дают колебательную устойчивость. Мораль: мы научились управлять колебаниями за счет того, что, нашли параметрическую зависимость характера фазового портрета от параметра, величина которого обратно пропорциональна, в данном случае - концентрация глюкозы снаружи. Не важно как она точно зависит, но важно, что присутствует пропорциональность. Точное выражение не выписано, но мы можем управлять и получать характер динамического поведения такой, который нам нужно.

Если мы возьмем голодные клетки у которых альфа больше единицы, то увидим периодические изменения. И до бифуркационного значения мы наблюдаем предельный цикл, но вот мы прибавили глюкозу, перешли через единицу, и получаем уже совсем другое поведение. Можно, кроме того, устроить так, чтоб была колебательную устойчивость. Как мы делаем дадим глюкозу, раскаталась, они потом наелись этой глюкозы, не сразу она вся вошла туда, загрузили все полностью, и остались колебания.

В модель мы внесли автокатализ (рис. 3.11). Давайте посмотрим, подтверждается ли автокаталитический характер, а если да, то как и какими свойствами обладает с точки зрения биохимии. Еще раз посмотрим на нашу реакцию с участием фосфофруктокиназы. Здесь идет гидролиз АТФ. Получается АДФ и фосфат, через несколько этапов образуется циклическая АМФ. Как вы знаете цАМФ - активное соединение, вторичный мессенджер. Можно менять скорость образования АДФ, скорость притока глюкозы, скорость образования второго АДФ, скорость образования фруктозо-6-фосфата, превращения его во ФДФ и потом отток на пируват с помощью фермента пируваткиназы. Через некоторое время, я покажу, как эти процессы хаотизируются в эксперименте. Это - не какая-то абстракция, хаос, это реально для этой системы.

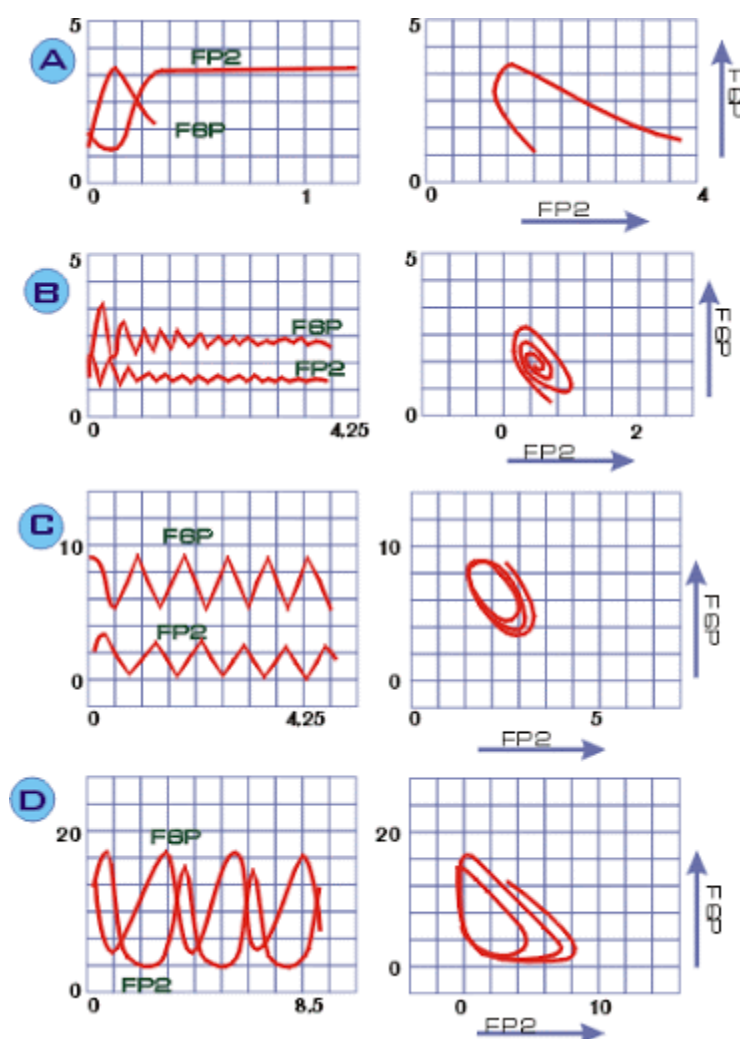


Рисунок 3.11. Различные автокаталитические колебания в реакции, катализируемой ФФК

Продукты реакции с фосфофруктокиназой - фруктоза-1-6-бисфосфат, АДФ, циклическая АМФ. Они работают, регулируя активность фермента. Это - то, что говорит биохимия они работают вот так: АДФ и циклическая АМФ — это продукты реакций. Они активируют фермент фосфофруктокиназу. Когда они его активируют? Если у нас получается мало АТФ, необходимо активировать этот продукт, запустить гликолиз на эти этапы и дальше получился АТФ. Теперь: когда у нас АТФ много, оказывается, АТФ сама при избыточной концентрации тоже садится на фосфофруктокиназу и ингибирует ее. Кроме того имеет место автокатализ. Потом, когда мы дали клеткам много глюкозы, они наелись, получилось много АТФ. Много АТФ тоже не нужно, и, как следствие, надо ингибировать ФФК. Поэтому АТФ садится на фосфофруктокиназу и ингибирует ее.

Забегая вперед: что значит активирует, что значит ингибирует: когда будем заниматься ферментативным катализом, мы рассмотрим, что в молекулярной биофизике есть активные центры (конкурентные или аллострические), есть ингибиторы. У фермента может быть два активных центра, они садятся то на один активирующий, то на другой. Таким образом передается сигнал, происходит активация сигнала ингибирования. Что значит передается сигнал? Это - методы молекулярной динамики, их мы начинаем понимать.

Классический пример, опять же, - гемоглобин. Сел кислород на железо - чуть-чуть сдвинулась плоскость гема - активировалась оксигенация субъединиц, пошел сигнал. Сейчас биофизика начинает в реальности эти свойства. Ничего революционного для физики нет, но это - новый объект, и он обладает очень серьезными свойствами, которые надо вместе изучать. Тут нет различий - физика, биология, биохимия, биофизика - в природе все едино.

Возвращаясь к гликолизу - эту реакцию биохимики расшифровали, это все написано в книге Ленинджера "Биохимия".

Оцените ситуацию: «вложили руками» - нужна нелинейность, но смысл этой нелинейности совсем другой. Это не соударения. По форме уравнение -  $K$  умножить на  $XY$ . По этому уравнению волки едят зайцев, происходит автокатализ, а в химии - соударения второго порядка, реакции второго порядка. У этих процессов совсем разная природа, а по форме она происходит одинаково. Вот в чем сила идеи взаимодействия как отвечающей за макросвойства объекта. Еще раз хочу сказать: в чем принципиальный этап, который мы сейчас имеем, говоря о наноразмерных системах, имея в виду наноразмерные структурные элементы, ее образующие: в том что мы, изучая непосредственно свойства этих наноразмерных элементов, мы можем прогнозировать и структурно влиять на макросвойства объектов. На слуху синтетическая биология и структурная биология. При разных нюансах понимания структурная биология - свойства все и математика, все вместе, а синтетическая биология - если б нам сказали: "Сделайте автоколебания в дрожжевых клетках". Для этого мы возьмем плазмиду, поместим в клетку таким образом, чтобы происходила экспрессия фосфокиназ и других ферментов.



## Лекция 4 Ферментативные реакции

Мы увидели понятие базовой модели, нелинейные уравнения, что нелинейность соответствует реакциям второго порядка в химической кинетике. Она объясняет некие нетривиальные типы динамического поведения. Мы проделали путь от формулировки модели к анализу модели, получению данных в случае реакции гликолиза.

### Компьютерный эксперимент.

Эксперимент, в общих чертах, - вы берете объект, делаете с ним что-то, при этом ставите в какие-то условия и смотрите его ответную реакцию. Потом вам необходимо подумать, что произошло. При этом у вас не никаких сомнений в том, что это - тот объект, свойства которого вы ходите изучить, получить какие-то данные, количественные или какие другие. Часто пример приводится: ручные часы. Вы можете придумать какое-нибудь устройство сами, которое бы показывало время. Его можно сделать самому, но это будет не тот механизм. Если будете на этой модели, которую сами придумали, не соответствующей исходному, изучать их свойства, это будут не те свойства, которыми обладает настоящий объект. Та же проблема - с математическим моделированием. Ранее, в сторону этого метода была критика, т.к. можно произвести количественный расчет, но модель может не соответствовать действительности. Принципиально то, что исходные модели, которые мы закладываем, и свойства, которые мы изучаем, должны соответствовать реальному биологическому объекту. В случае гликолиза мы экспериментально проверили, что это - так, увидели, что сытые клетки не дают колебаний, а голодные дают. Мы можем ставить компьютерный эксперимент, на этой модели, изучать, что будет, например, если мы в  $n$  раз увеличим концентрацию глюкозы. Мы можем придумать любые условия и не обязательно при этом делать реальные эксперименты. Можно изучать то, что мы делаем, на компьютерной модели, потому что мы уже убедились в том, что она соответствует действительности и тогда мы уже говорим о компьютерном эксперименте. Важно понимать, что наличие мощного компьютера не обеспечит правильность результатов при неверно заданной модели.

Роль биологов, которые занимаются реальным изучением объекта и ваше представление, изложенное на математическом языке - основа моделирования. Тогда мы можем говорить о компьютерном эксперименте. Тем не менее, модель каждый раз надо проверять, так как



сложно учесть все. На компьютере можно увидеть, посмотреть, изучить, дать количественные характеристики тем свойствам объекта, которые мы либо не видели в эксперименте, либо часто не поддаются, по крайней мере, сейчас, экспериментальному изучению.

Приведем пример из области молекулярной биофизики методы моделирования и внутримолекулярной подвижности биополимеров, в основном под биополимерами мы подразумеваем белки. Точечные мутации вызывают изменение активности ферментов. Можно предложить сделать плазмиды, произвести экспрессию, получить направленный точечный мутагенез. Далее будут показаны модели, которые основаны на реальном знании биологической структуры белков. Используя их, вы можете проделать это все на компьютерном эксперименте и получить данные, которые потом прекрасно подтверждаются. Так происходит, например, и дизайн лекарств, реальный эксперимент — это решающая проверка. Подбор средств лекарств к нахождению конкретной мишени во многом делается на компьютерном эксперименте.

## Уравнение Михаэлиса-Ментен

Мы остановились на автоколебаниях. Мы их увидели на математике, на модели, реально в экологических и биохимических системах. В основе всего лежит клеточный метаболизм. Но в основе метаболических реакций во многом лежит ферментативная активность. Ферменты ускоряют, регулируют, иногда замедляют. Надо поставить вопрос: простая ферментативная реакция, та, которая подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен, обладает какими-то свойствами, проявляет нетривиальные типы динамического поведения? Можно ли в ней наблюдать автоколебания или триггеры? Есть устойчивое/неустойчивое стационарное состояние? Одно состояние или несколько, и когда это может быть?

Мы рассмотрим это на уравнении Михаэлиса-Ментен, а также выведем его, чтобы лучше понимать, чем мы пользуемся. Его получили в 20-ых годах прошлого века интуитивно понимая, что есть быстрые и медленные процессы. В 52 году Тихонов доказал теорему о разделении переменных на быстрые и медленные, это было известно, он доказал, как выделять малый параметр строго математически, до этого этим пользовались без строгого обоснования, что не умаляет полученных результатов.

Давайте в случае уравнения Михаэлиса-Ментен воспользуемся принципом узкого места. Получим его, а дальше посмотрим константу Михаэлиса, узнаем, откуда она взялась, и почему большая величина константы означает маленькую активность. Потом мы посмотрим, что можно делать, чтобы получить разные типы динамического поведения. Рассмотрим уравнение (рис. 4.1).



Рисунок 4.1. Простое уравнение реакции, используемое для вывода уравнения Михаэлиса

Есть фермент, большая глобула белковая, имеющая маленький активный центр (ES). Как правило, в активном центре имеется 3-6 аминокислотных остатков. Низкомолекулярный субстрат попадает в активный центр и подвергается превращению. Опыты, как говорят в биохимии, в пробирке, показывают следующую последовательность реакций. В пробирке имеется субстрат (S) и фермент (P), субстрат перерабатывается в продукт в результате ферментативной реакции. Если бы субстрат был в открытой системе, мы бы подавали субстрат со скоростью  $V_1$ , скорость ферментативной реакции с образованием продукта -  $V_2$ , и наш продукт уходил бы со скоростью -  $V_3$  (рис. 4.2).

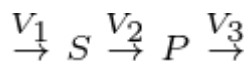


Рисунок 4.2. Последовательность прямых реакция с указаниями скоростей каждой из них

В пробирках, где были получены закономерности уравнения Михаэлиса, берется субстрат S в большом количестве. Концентрация большая, не расходуется за время опыта, дальше он работает с ферментом и получается то же самое. Субстрат S встречается со свободным ферментом E, получается фермент-субстратный комплекс ES. Есть (эти обозначения приняты в литературе)  $k_{+1}$  - константа образования фермент-субстратного комплекса. Кроме того, этот комплекс может с небольшой вероятностью распадаться назад, т.е. произойти регенерация фермента. Толку от этого процесса нет, потому что субстрат выпадает из комплекса. Процессу регенерации соответствует константа  $k_{-1}$ , ясно, что она меньше, чем  $k_{+1}$ . Основная реакция – переработка субстрата фермент-субстратным комплексом с константой  $k_{+2}$  с образованием продукта. Продукт - P, E - свободный фермент.

Общее количество фермента в системе –  $E_0$ . В каждый момент времени фермент находится либо в свободном состоянии  $E$ , либо в фермент-субстратном комплексе  $ES$  (4.1).

$$E + ES = E_0 \quad (4.1)$$

Сумма всегда постоянная, закон сохранения работает. Если фермент - активный и субстрат в избытке, в основном свободного фермента мало. А если фермент - малоактивный, он много времени находится в свободном виде.

Напишем уравнения химической кинетики (4.2).

$$\begin{cases} \dot{S} = -k_{+1}SE + k_{-1}(ES) \\ \dot{E} = -k_{+1}SE + k_{-1}(ES) + k_{+2}(ES) \\ \dot{(ES)} = k_{+1}SE - k_{-1}(ES) - k_{+2}(ES) \\ \dot{P} = k_{+2}(ES) = v_p \end{cases} \quad (4.2)$$

В ходе первой реакции ( $\dot{S}$  – производная по времени  $S$ .) идет убыль субстрата с константой  $k_{+1}$ . Это - реакция второго порядка, потому что субстрат и фермент должны встретиться, соединиться,  $SE$  - произведение концентраций. Кроме того, субстрат может регенерировать. Это - паразитная реакция с константой  $k_{-1}$ , назад, обратный распад.  $k_{-1}$  умножить на  $(ES)$ ,  $(ES)$  - фермент-субстратный комплекс.

Сейчас мы занимаемся формальными вещами. Что происходит внутри фермент-субстратного комплекса, какие общие закономерности – это биохимия ферментативного катализа, целая огромная глава. Мы же поговорим о механизмах не с точки зрения отдельных реакций, а, в первую очередь, рассмотрим глубокие физические принципы, которые лежат в основе акта ферментативного катализа. Но сейчас мы формально говорим: что-то происходит, и он может распасться назад. Свободный фермент  $\dot{E}$  убывает, потому что связывается с субстратом с константой  $k_{+1}$  по той же схеме. Скорость убыли субстрата и скорость убыли свободного фермента в этой реакции одинаковые -  $k_{+1}SE$ . Кроме того, субстрат немного восстанавливается за счет паразитной реакции  $k_{-1}(ES)$ . Это - реакция первого порядка, а  $k_{+1}SE$  - второго порядка. И самое главное - идет регенерация свободного фермента за счет того, что субстрат подвергается превращению, продукт покидает активный центр и появляется свободный фермент с константой  $K_{+2}$ . Константа ферментативной реакции - скорость образования продукта, она фактически определяет

скорость регенерации фермента и появления его в свободном виде. Это - время оборота фермента, время между актом, когда он образовал фермент-субстратный комплекс и появился опять в свободном виде вместе с продуктом.

Фермент-субстратный комплекс ( $ES$ ) образуется по реакции второго порядка с той же скоростью, с какой происходит убыль субстрата и свободного фермента -  $k_{+1}SE$ . Он убывает, распадается назад в ходе паразитной реакции, константа  $k_{-1}SE$  и, самое основное, - появляется продукт, константа  $k_{+2}(ES)$ . Реакция образуемого продукта  $P$  - самый главный процесс, ради которого все эти процесс и происходят. Это - константа  $k_{+2}$  умножить на концентрацию образованного фермент-субстратного комплекса -  $k_{+2}(ES)$ . Данная реакция первого порядка.  $V_p$  - скорость самой ферментативной реакции. Мы ничего не знаем про узкие места, быстрые и медленные переменные. Однако, с четырьмя уравнениями работать сложно, поэтому нам надо уменьшить их количество. Если тут есть быстрые и медленные переменные, мы должны были бы выделить малый параметр, потом провести процедуру обезразмеривания переменных. Но мы не будем этим заниматься, а подойдем к проблеме с точки зрения здравого смысла. Если есть переменные быстрые и медленные, то они должны отличаться по характерным временам изменения.

Характерное время в случае фермента - время оборота фермента, для субстрата, или для субстрат-ферментного комплекса. Время, за которое половина субстрата превратится в продукт — это время побольше, чем время оборота фермента в одном акте. Мы можем это оценить.

В реакции  $k_{+2}(ES)$ ,  $k_{+2}$  - самая большая константа, она определяет в основном время оборота фермента. Поскольку эта реакция первого порядка, то это - величина обратная времени, ее размерность - секунда в минус первой степени, а время – единица делить на константу будут секунды. Тогда время оборота фермента (4.3)

$$\tau_E = \frac{1}{k_{+2}} \quad (4.3)$$

Время превращения субстрата в продукт -  $\tau_s$ . В случае, если бы мы говорили о времени движения машины, то считали бы время как расстояние делить на скорость. Так и здесь - нам необходимо взять исходную концентрацию субстрата, которую мы заложили в пробирку, и разделить на скорость ферментативной реакции -  $V_p$  (4.4).

$$\tau_s = \frac{S}{V_p} \quad (4.4)$$

Самое маленькое время, когда быстрее всего будет субстрат превращаться, будет, когда наибольшая величина ферментативной реакции. Это условие будет выполнено, когда весь фермент активен и находится в связанном с субстратом состоянии. В идеальном случае, когда в реакции

$$E + ES = E_0$$

весь фермент будет связан с субстратом, время будет равно (4.5):

$$\tau_S^{min} = \frac{S}{K_{+2}E_0} \quad (4.5)$$

Заметим, что в уравнении 4.5 фигурирует именно  $E_0$ , а не  $ES$ . Таким образом получается ситуация, в которой весь свободный фермент сразу взаимодействует с субстратом, образуя комплекс. Отсюда следует, что время превращения субстрата в продукт намного больше, чем время присоединения субстрата к свободному ферменту. При этих условиях будет достигнута максимальная скорость превращения субстрата в продукт.

Далее сравним полученные времена. Из уравнений 4.3 и 4.5 получим следующее соотношение (4.6):

$$\tau_S = \tau_E \frac{S}{E_0} \quad (4.6)$$

Вот мы получили простое соотношение, не прибегая к математическим процедурам. Нам в данном случае этого вполне достаточно. Концентрация фермента, как известно, намного меньше, чем субстрата. В пробирочных опытах – точно, и у нас средняя концентрация субстрата и продукта –  $10^{-2}$ - $10^{-3}$  моль на литр. Концентрация фермента –  $10^{-5}$ - $10^{-6}$ . Получается 3-4 порядка разница. Подставляя значение  $S$  и  $E_0$ , мы получаем, что время превращения субстрата в продукт  $\tau_S$  в  $10^4$  раз больше, чем время оборота фермента. Мы получили результат, который показывает, что наша система расслаивается на быстрые и медленные переменные.

Время оборота фермента и время превращения субстрата одного порядка это быстрые переменные, что мы можем приравнять к 0 производные (4.7):

$$\begin{aligned} \dot{E} &= 0 \\ (\dot{ES}) &= 0 \end{aligned} \quad (4.7)$$

Они в среднем, по сравнению с временем превращения субстрата в продукт, находятся вблизи своих стационарных состояний. Я потом приведу картинку, которая наглядно это

показывает. Теперь мы можем приравнять к 0 правые части четырех этих уравнений. Когда мы их приравняем к 0, получим 2 алгебраических уравнения, решим и получим знаменитое уравнение Михаэлиса-Ментен, (это уравнение – следствие принципа узкого места и решения алгебраических уравнений). Посмотрите структуру этого уравнения (4.8).

$$\bar{v}_p = \frac{k_{+2} E_0 S}{k_m + s} \quad (4.8)$$

Сама константа Михаэлиса является комбинацией других констант (4.9).

$$K_M = \frac{K_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}} \quad (4.9)$$

Она взялась при решении алгебраического уравнения. Далее рассмотрим смысл. Во-первых,  $K_{-1}$  – константа реакции первого порядка, соответственно, имеет размерность  $c^{-1}$ . Константа  $K_{+1}$  – встреча молекулы фермента с молекулой субстрата. Она соответствует реакции второго порядка. Размерность реакции второго порядка — это  $\text{моль}^{-1} \cdot c^{-1}$ . Подставим их в выражение (4.10):

$$[K_M] = \left[ \frac{c^{-1}}{c^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}} \right] = [\text{моль}] \quad (4.10)$$

Получим размерность константы Михаэлиса – моли. Это – важный момент потому, что, если они разных размерностей, надо думать, что делать. Обычно обезразмеривают уравнения, чтобы можно было работать, но там проблема другая. Рассмотрим график этой (4.8) функции (рис 4.3).

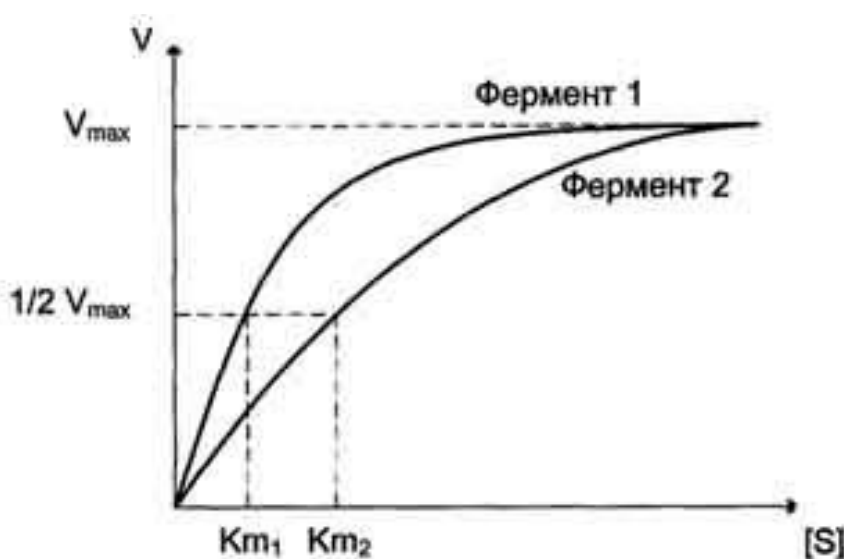


Рисунок 4.3. Кривые Микаэлиса. На данном графике отображено влияние конкурирующего ингибитора (фермент 2) в сравнении с нормальной работой фермента (фермент 1).

Эта функция стремится к своему пределу при  $S \rightarrow \infty$ . Предел будет равен (4.11):

$$K_{+2}E_0 = V_p^{max} \quad (4.11)$$

Строго говоря, у нас четыре уравнения, два из них приравняли к 0. Однако, можно задаться вопросом, как можно 4 сцепленных уравнения два приравнять к 0, а два - не приравнять. Это - приближение в силу малости параметра, который мы выделяем. когда они сильно намного величина намного близкая к 0, но не бесконечно малая.

Когда мы построили этот график, а это результат уравнения, мы смотрим как зависит скорость ферментативной реакции от концентрации субстрата. В начале, когда нет субстрата, нет реакции. Скорость равна 0. Начинаем увеличивать концентрацию субстрат - . растет числитель, знаменатель тоже растет. S.

Предел дроби при  $S \rightarrow \infty$  есть  $K_{+2}E_0$ , смысл понятен. Биологически это означает: когда у нас огромная в пределе концентрация субстрата, весь фермент находится в связанном состоянии, тогда он весь работает никто не простаивает. Получается,  $K_{+2}E_0$  - предельная скорость ферментативной реакции.

Давайте подробнее рассмотрим константу  $K_M$ . Возьмем две константы. Одну – маленькую, одну - большую. Если константа – маленькая, происходит быстрое нарастание, потому что

знаменатель не портит жизнь. Числитель растет, знаменатель «не тянет». Если константа - большая, в пределе будет то же самое, нарастание будет медленней. Это значит, не так быстро работает ферментативная реакция.

У константы Михаэлиса есть и численный смысл. Скорость ферментативной реакции в какой-то момент определяется концентрацией субстрата. Если константу Михаэлиса, имеющую размерность молей, положим численно равной субстрату в данный момент времени, то в этот момент у нас получится в числителе  $S$ , а в знаменателе  $S+S$ , в этот момент скорость ферментативной реакции будет равна (4.12).

$$V_p = \frac{K_{+2}E_0}{2} \quad (4.12)$$

То есть, смысл константы Михаэлиса - количество субстрата, при котором скорость ферментативной достигает половины от предельной максимальной скорости. Если мы достигаем скорости равной половине от предельной скорости ферментативной реакции, а она зависит только от  $K_{+2}E_0$ , но не зависит от субстрата. Это видно из уравнения. Если она достигается при малой концентрации субстрата, то там активный фермент, а если для достижения большой скорости требуется большая концентрация субстрата, значит он простаивает и фермент неактивный. Вот почему большая константа Михаэлиса говорит о меньшей активности фермента. Но это - формальный результат.

Вот константа Михаэлиса, мы ее получили, просто решая уравнения. Смысл ее определяет концентрацию субстрата при которой скорость ферментативной реакции равна половине от максимальной. Сама константа зависит от: числителя ( $K_{-1} + K_{+2}$ ) и знаменателя -  $K_{+1}$ . В числителе  $K_{-1}$  - паразитная реакция, она намного меньше, чем  $K_{+2}$ . Поэтому мы можем пренебречь величиной  $K_{-1}$  и сравнить  $K_{+2}$  и  $K_{+1}$ . Ясно, что чем больше  $K_{+2}$ , тем константа Михаэлиса больше. Странно: большая константа - слабая ферментативная активность. И что - слабая активность при большой скорости ферментативной реакции? И действительно это в принципе верно, но дело в том, что все, как правило, огромное большинство ферментативных реакций, имеют время оборота ферментативных реакций примерно одинаковое. Оно лежит в области  $10^{-2} - 10^{-3}$  секунды. Это сотая секунда, миллисекунда. Они, в общем, мало меняются от фермента к ферменту. А вот константа  $K_{+1}$  в знаменателе - гвоздь программы. Она меняется и фактически определяет сродство субстрата к ферменту.



Под словом сродство надо понимать следующее — это образование продуктивного фермент-субстратного комплекса.

Этапы образования фермент-субстратного комплекса:

1. Диффузия
2. Встреча
3. Проникновение субстрата в активный центр
4. Образование субстратом продуктивной конфигурации

Эти этапы спрятаны в константе  $K_{+1}$ . Это - феноменологическая константа, мы ее берем, просто изучая кинетику. Это хорошо для сравнения, но ничего не говорит о механизмах превращений внутри фермент-субстратного комплекса. Этим займемся, когда будем для молекулярной биофизики говорить о механизмах ферментативного катализа. В чем там движущие силы.

Можно сказать одну вещь, забегая вперед: ферментативные реакции зависят от температуры. Зависимость температуры связана в классической теории Аррениуса с преодолением активационного барьера. Увеличиваем температуру - хвост горячих молекул увеличивается. Это правильно для физхимии растворов. В случае ферментативных реакций есть зависимость от температуры, но смысл совсем другой. Энергия активации формально там имеется, но все устроено совершенно иначе.

Вернемся обратно к нашей функции. Как можно себе представить быстрые и медленные переменные. В Таджикистане было строительство Нурекской ГЭС. Строителям нужно было насыпать плотину. Рядом с плотиной была огромная гора. По плотине же ездят два самосвала и нам говорят, что к такому-то числу гора должна переместиться. Вот это - субстрат. Он медленно уменьшается и медленно растет продукт, идет переработка субстрата. Время переработки -  $\frac{S}{v_p}$ . Фермент, в данном примере, — это маленькая тележка, самосвал, которая подбегает к субстрату, грузится и может свалиться назад (это константа  $K_{-1}$ ), но в основном грузится нормально, и уже будучи нагруженной движется к продукту со страшной скоростью.

## Регуляция ферментативных реакций

Попробуем увидеть динамику, триггер и колебания в уравнении Михаэлиса-Ментен. Изучить динамические свойства в этой системе.

В ферментах происходит регуляция либо за счет ингибиторов, либо активаторов. Ингибиторы служат для того, чтобы регулировать ферментативные реакции. Когда мы в опытах имеем ингибиторы, мы просто их даем, механизм знаем, действие изучаем, смотрим, что получается, находим эффективность той или иной реакции в зависимости, скажем, от концентрации ингибитора и смотрим, какой это имеет биологический смысл.

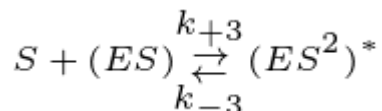
Ингибиторы делятся на два сорта:

1. Конкурентные - конкурируют с субстратом за место в активном центре. Когда ингибитор туда садится, фермент занят, субстрату нечего делать.
2. Аллостерические ингибиторы.

С точки зрения механизма аллостерические ингибиторы несколько интересней. У фермента, большой белковой глобулы, активный центр - маленький. Так вот ингибитор «кусает» белок и портит жизнь в активном центре. Фактически мы говорим, что ингибиторный сигнал передался и испортил жизнь в активном центре. На классическом примере есть ингибирование избытком субстрата. В гликолизе фосфофруктокиназа активировалась цАМФ и АДФ. На этом этапе был гидролиз АТФ. Фосфофруктокиназа активировалась, а это было сопряжено с гидролизом АТФ. С другой стороны - когда АТФ мало, то продукты активировали процесс, а когда АТФ много, ингибировался фермент фосфофруктокиназа за счет того, что АТФ, будучи в избыточной концентрации, садилась не на активный центр, который активировал ее, а на свой активный центр, что играло ингибиторную роль и нарушало активацию фосфофруктокиназы. Это имеет биологический смысл. Когда слишком много АТФ, естественно, нужно затормозить его синтез. Реакция замедляется, замедляется образование пирувата, его передача в митохондрии, все притихло. А когда мало АТФ – эта цепь реакций активизируется. В данном случае АТФ - субстрат. Он садится или не садится. С точки зрения формальной кинетики это можно сцепить в уравнение и смысл будет один и тот же - ингибирование реакции избытком субстрата. Рассмотрим пример. Уравнение Михаэлиса-Ментен, субстрат с ферментом в условиях ингибирования избытком субстрата. Система будет состоять из двух уравнений. Одно — это уравнение, связанное с субстратом.

А в случае самоингибирования - ингибирования самим субстратом, получается следующее: образовался фермент-субстратный комплекс, готовый давать продукт. Субстрат - в таком избытке, что, прежде чем фермент-субстратный комплекс распался с образованием продукта, он вступает в реакцию с избыточной концентрацией субстрата. Активный центр

занят, но избыточная концентрация взаимодействует с какой-то частью белковой глобулы и образует неактивный фермент-субстратный комплекс, в котором у субстрата две молекулы. Обозначение:  $(ES^2)^*$



Звездочка означает, что комплекс ингибирован. Выкладки математические несложные: можно опять ввести узкое место, найти стационарную скорость ( $\bar{V}_p$ ), зависимость скорости ферментативной реакции в условиях ингибирования избытком субстрата.  $k_{+3}$  - константа образования, а  $k_{-3}$  распада ингибированного фермент-субстратного комплекса.

Можем ввести формально отношение этих концентраций. Это - константа равновесия (4.13).

$$K_S = \frac{k_{-3}}{k_{+3}} \quad (4.13)$$

Мы получим уравнение зависимости скорости ферментативной реакции в условиях обычной реакции Михаэлиса-Ментен, но избыточная концентрация субстрата ее ингибирует. Это - биохимический факт. Математически это выражается уравнением (4.14):

$$\bar{v}_p = \frac{k_{+2} E_0 S}{k_M + S + \frac{S^2}{K_S}} \quad (4.14)$$

Числитель в данном уравнении тот же самый, в знаменателе - константа Михаэлиса, концентрация субстрата и появился новый член -  $S^2$  делить на константу равновесия  $K_S$ . Теперь ситуация меняется. Предельная скорость ферментативной реакции, когда  $S$  стремится к бесконечности в случае уравнения Михаэлиса-Ментен была  $K_{+2}$  на  $E_0$ . Здесь другая ситуация. Предел дроби при  $S^2$  – единица, значит, предел всей этой дроби при  $S$ , стремящейся к бесконечности равен 0, что и соответствует реальности. Когда  $S$  очень много, фермент весь находится в отравленном состоянии, в комплексе, и работы нет. График этой функции - колоколообразная кривая (рис 4.4).

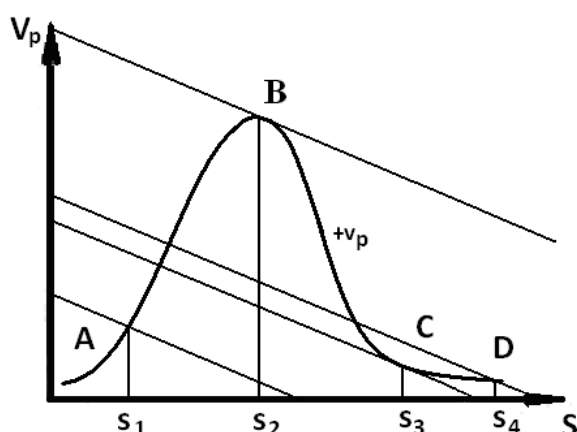


Рисунок 4.4. График функции с учетом субстратного ингибирования фермента

Когда мы начинаем работать с небольшой концентрацией субстрата (точка A),  $S$  пока будет меньше единицы,  $S^2$  и подавно меньше единицы. В знаменателе можем этой величиной  $S^2$ , малой по сравнению с  $S$  в первой степени пренебречь. И у нас работает обычный Михаэлис-Ментен. Мы идем вверх, все честно хорошо до точки B. Тут начинает проявлять влияние  $S^2$ , он тянет вниз, знаменатель растет, и мы получаем колоколообразную кривую, потому что через точки C и D идет уменьшение. Вот такая скорость ферментативной реакции при ингибировании ее избытком субстрата. Ничего не введено, мы имеем только субстрат с особым свойством.

Дальше мы хотим посмотреть, есть ли динамика. Чтобы посмотреть динамическое поведение, мало работать с пробиркой, потому что концентрация субстрата - большая, постоянная. Для дальнейшего рассмотрения сделаем систему открытой, это примерно то же действие, что производили на второй лекции.

Концентрация субстрата  $S_0$ , достаточно большая. Субстрат попадает в клетку, со скоростью  $V_{0k}$ . Скорость пропорциональна разности концентраций снаружи и внутри. Субстрат внутри перерабатывается в ферментативной реакции со скоростью  $V_p$ . Давайте графически посмотрим, есть ли в этой системе стационарные состояния, и как их найти.  $V_p$  на графике, скорость этой реакции, колоколообразно зависит от концентрации субстрата, который попал в клетку. Стационарное состояние будет наблюдаться в системе тогда, когда ни  $S$ , ни  $P$  не будут меняться. Скорость притока субстрата по уравнению будет равняться скорости

его переработки в продукт. График  $V_p$  - расход субстрата, а скорость притока субстрата  $V_{0k}$  - прямые линии.

$$v_{0k} = k(S_0 - S) \quad (4.15)$$

Наклон равен константе, по оси ординат она отсекает величины, равные  $K$  умножить на  $S_0$ . Прямые линии, которые отсекаются, пересекают скорость притока.

Пусть  $\alpha = kS_0$ , небольшая величина и у нас имеются пересечение в точке А. Это одно стационарное состояние. Так же, как глюкозой управляли, снаружи, так и в этом случае, мы можем увеличивать  $S_0$ . Константа  $k$  определяется, например, проницаемостью мембраны, менять ее мы не можем. А вот  $S_0$  мы можем изменять и поэтому  $\alpha$  будет возрастать. Мы увеличиваем, координаты стационарной точки ползут, концентрация стационарная увеличивается постепенно. Но когда мы подняли ее до такого состояния, которое на графике соответствует точке С, точка пересечения здесь, касание произошло, а еще раз подняли выше - и у нас точка пересечения раз, два и третья появилась, меняем просто концентрацию субстрата снаружи, естественная ситуация, и имеем драматические изменения числа стационарных состояний.

Потом идем дальше, доходим до точки В и получаем два стационарных состояния. Поднимем еще больше, увеличим  $S_0$ , у нас останется одно стационарное состояние. Иными словами, скорость изменения субстрата равняется скорости притока  $k(S_0 - S)$  минус скорость оттока  $V_p$  (4.15).

$$V_S = V_0 - V_p = k(S_0 - S) - V_p \quad (4.15)$$

Стационарные состояния – точки, где они пересекаются и равны. Мало того, что, когда скорость притока увеличиваем, ползет точка, еще и число стационарных состояний меняется. Надо посмотреть их устойчивость: напишем уравнения, найдем частные производные, стационарную точку, значения: положительные, отрицательные. Это можно сделать, но мы сделаем опять с помощью качественного подхода.

Попробуем проверить устойчивость. Вот точка А, дадим отклонение искусственно. Потом математики пишут в уравнение: как со временем меняется это отклонение. Если производная по времени отрицательная, отклонение уменьшается, вернемся назад -

устойчивое состояние было, если положительная, она уходит вверх. Все больше и больше увеличивается, и точка неустойчива.

Сделаем то же самое, без производных. В точка А - стационарное состояние. Дадим прирост отклонения от стационарной точки. Получилось - изменился и приток, и отток. Как - по ординате видно. Вправо от точки А, была одна скорость ферментативной реакции, стала больше. Скорость притока стала меньше. Когда мы дали отклонение, скорость ферментативной реакции – большая, скорость притока - меньше. Это значит, что возмущение, которое мы дали, будет убрано за счет того, что в этой области большая скорость ферментативной реакции переработает прибавку и мы вернемся назад. С другой стороны - уменьшим. Как будто можно вытащить субстрат мысленно. А в этой области наоборот произошло уменьшение, новое значение концентрации субстрата вышло вместо стационарного, но при этом скорость ферментативной реакции стала меньше, чем скорость притока субстрата: прибавка будет за счет избыточного притока по сравнению со скоростью ферментативной реакции. То же самое мы получили бы, если бы честно нашли особую точку. Производные здесь отрицательные, это нивелируются возмущения, которые мы внесли. Точно также в районе точки В будет, а ветвь ВС - по-другому. Если прибавим субстрат, справа - большая скорость притока, а скорость оттока меньше. Влево - наоборот уменьшим у нас еще больше будет ферментативная реакция производить дальнейшее уменьшение, потому что ее амплитуда больше, чем амплитуда скорости притока. Точка  $S_3$  - неустойчивая. Мы будем свалимся с этой точки до того, как попадем на ветвь устойчивых стационарных состояний (точка D).

Мы получили: ветвь АВ - ветвь устойчивых стационарных состояний, ветвь CD – тоже, ВС- ветвь неустойчивых стационарных состояний. Если мы возьмем нашу систему с такой скоростью реакции ферментативной и скоростью притока, что в системе будет 3 стационарных точки. Средняя - будет неустойчивая, это - седло. Мы получили бы это седло, если бы все решали, значение производных нашли в каждой стационарной точке и прочее.

По оси абсцисс концентрацию субстрата отложим, по оси ординат- значение внешнего параметра притока субстрата  $\alpha = k_1 S_0$ , ползем по ветке АВ, увеличиваем приток  $\alpha$  растет, концентрация стационарная тоже увеличивается. Ползем до точки В, дальше некуда деваться как прыгать на ветвь D, в CD. Прыгнули, здесь мы находимся устойчивая точка. Единственная. Назад ползем - субстрат уменьшаем, приток уменьшается. Доходим до новой точки. И дальше совершаем прыжок на ветвь устойчивых состояний, на ветвь А. (рис. 4.5)

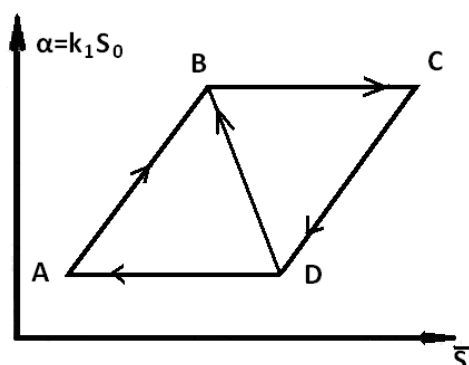


Рисунок 4.5. Графическое изображение колебаний в системе

Это - колебания. Однако, здесь есть маленький обман. Он состоит в том, что это - не автоколебания. Мы ведем  $\alpha$  и  $S$ , а потом прыжок, а дальше мы стали уменьшать концентрацию субстрата, навязывая их системе. Это – не автоколебания. Но здесь уже тоже расслоение на быстрые и медленные переменные. Кстати, видно условность этого дела. В ферментативной реакции быстрой переменной был фермент, а медленной – субстрат. В этом примере несколько иначе, мы увеличиваем  $\alpha$ , потом уменьшаем, и гуляем по этому делу, и вслед за ним идет субстрат.  $\alpha$  - медленная переменная, субстрат - быстрая. Она должна успеть подстроиться под изменения системы. Это похоже с титрованием - вы меняете буфер, капнули какой-то раствор, и затем смотрите реакцию. Система пришла в равновесие – капнули еще раз. Если титровать быстро, до момента, когда раствор успеет устояться, у вас получится неверный результат. Это тоже пример разделения на быстрые и медленные переменные. Скорость подачи сигнала должна быть такая, чтобы он успевал перейти в стационарное состояние в соответствии с полученным сигналом.

Рассмотрим метод получения автоколебаний. Часто в биологии есть s-образные свойства или колоколообразность, такой случай нелинейности. Нам надо какие-то свойства

принимать во внимание. В нашем случае, мы приняли во внимание не просто Михаэлиса-Ментен, а ингибирование с избытком субстрата. Можно принять во внимание известное в биохимии свойство - зависимость активности фермента от концентрации субстрата. Есть ингибирование, есть примеры, когда можно активировать фермент избытком субстрата. Типичный пример - зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата. Скорость растет по уравнению Михаэлиса-Ментен, потом при определенной концентрации субстрата, активность скачкообразно возрастает.

Например, активность фермента от pH. Конформация белковой глобулы меняется и активность фермента в целом может меняться. Механизмы этого процесса будут изложены позже. При таком расположении, ситуация будет уже автокаталитической. Если мы дадим скорость притока субстрата  $V_0$  в нашу систему так, что точка пересечения будет как на рис 4.6., то она не будет устойчива.

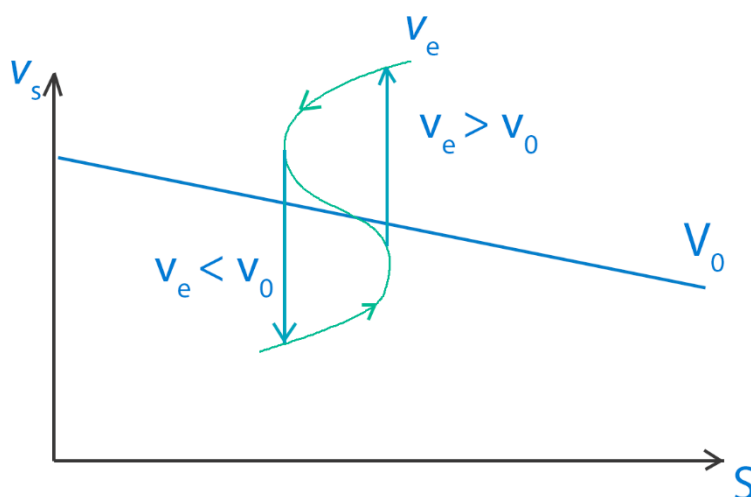


Рисунок 4.6. Автоколебания в ферментативном процессе

Таким образом мы получаем следующее: увеличиваем концентрацию субстрата, скорость реакции растет, потому что в этой области скорость притока больше, чем скорость оттока. И хотя скорость ферментативной реакции растет, все равно скорость притока  $V_0$  больше, чем скорость ферментативной реакции. Но вот мы дошли до концентрации субстрата, при которой скачком меняется ферментативная активность за счет конформационных изменений фермента, и мы переходим на верхнюю ветвь. На ней скачком поменялось ситуация: скорость притока была больше скорости ферментативной реакции, здесь же



наоборот - скорость ферментативной реакции больше. Концентрация субстрата теперь будет уменьшаться до новой точки. Снова происходит скачок - и это уже автоколебания. Это надумано, а вот - конкретный пример: известная биохимическая реакция, катализируемая ферментом ацетилхолинэстеразой. S - ацетилхолин - субстрат, два продукта –  $P_1$  - холин и  $P_2$  - ацетат-анион. Также освобождается протон и, при этом, понижается pH среды. Если активность фермента зависит от pH колоколообразным образом (рис. 4.7), скорость реакции будет тоже зависеть от pH: когда pH большой - продукта нет, и, соответственно, активность фермента маленькая. Начинаем реакцию - не большая активность, но с образованием продуктов pH уменьшается и активность постепенно растет. Потом при некоторой величине pH мы переходим через оптимум, активность опять падает, а если падает активность, то уменьшается скорость реакции, продукт уменьшается. pH начинает опять постепенно расти. Оптимум ферментативной активности - оптимум pH – обычное дело в биохимии.

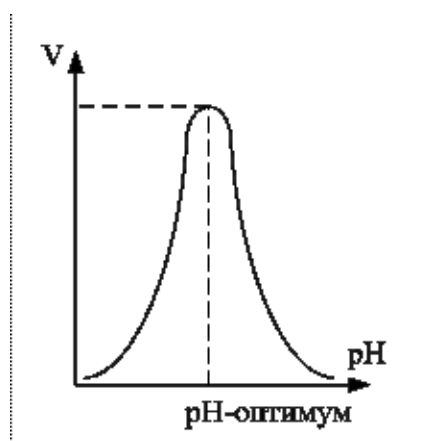


Рисунок 4.7. Колоколообразная зависимость скорости ферментативной реакции от pH среды

Эксперимент показал, что при этом pH меняется в течение секунд. Обычные времена колебаний, где-то 5000 секунд, при этом меняется периодически и концентрация субстрата и pH. Это еще один пример автокатализа. Если не знать, почему что меняется, получается довольно экзотическая картина. Если продукт и субстрат могут обладать отрицательной активацией, то есть, ингибированием по принципу обратной связи, то мы можем изобразить это на фазовой плоскости.

Общий вывод: формальный, в хорошем смысле, анализ, в случае если вы адекватно отражаете то, что происходит в системе с помощью правильных математических модели, может очень много дать в области понимания причин. В данном случае - нетривиального динамического поведения.

## Лекция 5. Система с распределенными параметрами и хаотические процессы в биологии

Это последняя лекция по кинетике, и в ней будет рассказано о двух проблемах:

1. Системы с распределенными параметрами
2. Хаотические процессы в биологии.

Мы рассмотрим их, не вдаваясь в математические подробности. Они важны для решения биологических проблем. Еще раз напомним, идет переключки между параллельным развитием точных наук (независимо от биологии) и нашим проникновением в область исследования. Предмет наш - природа фундаментальных физико-химических механизмов взаимодействий структурных элементов, что, собственно, позволяет изучать структурная биология. Параллельное развитие математических методов находит свое применение. Пока еще мы делаем тут если не первые, то вторые, третьи шаги. Но перспективы уже намечаются.

### Система с распределенными параметрами.

Система хищник - жертва. Представьте себе, что у нас есть изолированные долины, где жертвы с хищниками "играют" в автоколебания. В соответствии с моделями, мы видим периодические изменения численности. Средняя плотность на единицу поверхности меняется одновременно во всех точках этого реакционного пространства. В разных точках - в зависимости от констант, колебательные процессы будут идти немножко по-разному. Могут быть разные фазы, амплитуды, мы видим одновременные изменения всего, так показывает модель. Представим себе, что они, кроме того, бегают друг к другу со своими скоростями. Вопрос: увидим ли мы какую-нибудь регулярную картину?

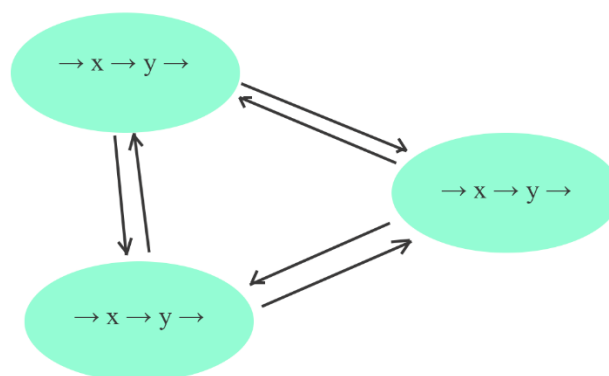


Рисунок 5.1. Иллюстрация к примеру с хищниками и жертвами в трех изолированных долинах

Регулярная картина означает не только колебания одновременно во всех точках, но и какое-то распределение в пространстве. Есть калейдоскоп. Вращая систему зеркал, на каждом повороте мы наблюдаем какое-то распределение. Там свои законы, это не имеет отношения с точки зрения механизма к этому. Это несколько схоже, казалось бы, хаос, а вместе с тем вдруг что-то там получается. Собственно, этим занимается теория дифференциальных уравнений с распределенными параметрами. Где, говоря более простым языком, переменные, в нашем случае плотность популяции или концентрация веществ, не только меняются во времени, но и в пространстве.

На первой лекции мы рассматривали метаболическую картину: кусочек клетки, где лиганды садились на рецепторы. В ней протекала диффузия, перемещался инозитолтрифосфат. Там получается реакция в каждой точке, но вместе с тем диффузия. Реагенты должны прийти, встретиться друг с другом, должны получиться продукты, они должны уйти куда-то, и ладно, если система гомогенна, а если она гетерогенна, как у нас? Тем, как это происходит, занимаются разделы, о которых будет кратко изложено ниже. Отдельно рассмотрим окисление броммалоновой кислоты. Это был первый пример реальной подобной системы.

Другие примеры: волны освобождающегося кальция в икре пресноводной рыбы - тип автоволновых процессов тип процессов в ней - бегущий импульс, фронт распространения популяции. Это экологи знают хорошо. В скоростях нет ничего экзотического - 8 микрон в секунду.

Другой пример: распространение возбуждения в проводящих клетках сердца. Нейробиофизики, нейрофизиологи часто занимаются этими вопросами. У них для изучения работы сердца применяются специализированные модели. Вне зависимости от механизма возникновения, распространение описывается такими системами, о которых я расскажу. Рассмотрим аппарат, который лежит в основе этих процессов. Скажем, есть устойчивая стационарная точка. Знаем ее координаты, начинаем испытывать на устойчивость. Даем отклонение, либо шарик отклоняем, либо ищем знак производной. Производная отрицательная - точка будет устойчивая. Если производная вызванного случайного отклонения - положительная, точка неустойчива.

В рамках этих представлений получается исходно распределенная система. Представим спокойную поверхность воды. В нее однократно кинули камень, получили изменения - пошла волна (рис. 5.2). Если будем мерить амплитуду отклонения от первоначального, в данном случае, равновесного состояния, получится изрезанная амплитуда. Для каждой точки будет свое изменение амплитуды во времени, в целом, амплитуда, вызванная возмущением, когда мы бросили камень, изменяется и во времени и в каждой точке пространства. Соединение одновременно пространственной и временной координат требует воображения.

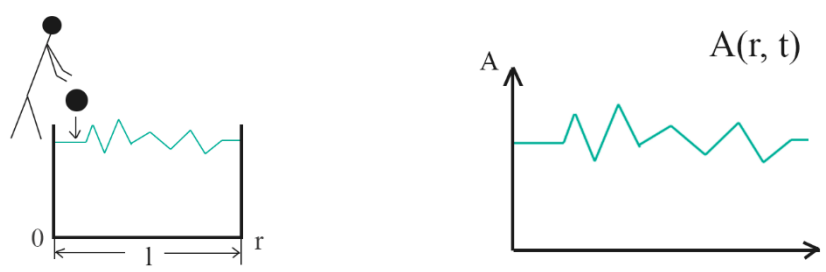


Рисунок 5.2. Иллюстрация к примеру с волнами на поверхности воды

Биофизик Романовский Юрий Михайлович на физфаке защищал докторскую диссертацию. У него была хорошая работа. Другой физик-теоретик сказал: "слушайте, как это вы соединили? Это же исключительно трудно - соединить время с пространством". У него был остроумный ответ: "это в жизни, а сама жизнь - тоже исключительное явление». Вот соединение пространства и временного изменения.

Есть в учебнике рекомендованная литература, там не так, как в математической физике, но довольно подробно показано, как решаются такие уравнения: однородные, неоднородные. Смысл в том, что у нас есть реакционное пространство в виде трубочки и концентрация распределяется по пространственной координате. Она не равномерна в каждой точке, это - не гомогенное распределение. Концентрация будет меняться в силу законов диффузии: от большего переходить в меньшую область.



Рисунок 5.3. Иллюстрация к примеру с реакционным пространством в виде трубочки

Это - открытая система. Возьмем элементарный объем. Изменение концентрации в нем будет происходить за счет двух процессов - притока и оттока. Изменение будет тем больше, чем больше разность потоков на концах. Поток же определяется коэффициентом диффузии и, соответственно, градиентом (5.1).

$$I = -D \frac{\partial C(r,t)}{\partial r} \quad (5.1)$$

В нашей формуле фигурируют коэффициент диффузии и производная по координате. Приведем пример. Водопады: большой водопад быстро течет, маленький водопад - не быстро. Значит будет разность этих величин в точках  $r$  и  $r + \Delta r$ . Общее изменение будет пропорционально этой разности плюс промежуток времени, в течение которого вы наблюдаете эти изменения.

Я показывал количество клеток, которые умирают в единицу времени. Это примерно то же самое, только здесь - приток-отток, надо еще разделить на такую величину, как единица длины. Длина у нас - элементарная  $\Delta r$ , маленькая, но все равно. Делим на  $\Delta r$  и получаем единицу длины. Делаем простые преобразования: разделим на  $\Delta t$ , переведем на бесконечно малые величины.

Получим, что изменение концентрации во времени (вот мы за объемом следим и меряем точкой) равняется коэффициенту диффузии, то есть, с какой скоростью они двигаются, и второй производной по координате (5.2).

$$\frac{\partial C}{\partial r} = D \frac{\partial^2 C}{\partial r^2} \quad (5.2)$$

Это означает, что, чем больше величина в правой части равенства, тем скорее происходят во времени изменения, за которыми мы наблюдаем. Этого достаточно, чтобы знать, как получаются все эти решения.

Возникли возмущения. Как они меняются? Для такого уравнения все затухает. Кинули камень в воду, вода поколебалась, успокоилась. Отклонения, которые здесь возникают, получается набор синусоид

Посмотрите на рис. 5.1. Справа - неровная линия. Можно разложить в ряд Фурье, будет набор гармоник с разными амплитудами и разными коэффициентами затухания. Это реально и в радиотехнике. Очень хорошая вещь - широкая полоса усилителя, никакой не синусоиды. Вы ее разлагаете в ряд Фурье, находите гармоники, но с большей амплитудой, потом даете эту частоту, и она усиливается выборочно. Получается так, что у нас - набор (суперпозиция) затухающих гармоничных синусоид. Посмотрит, как они построены: есть амплитуда, в наборах это определяется набором натуральных чисел. Есть амплитуда  $A_n$ , у каждой - номер гармоники (5.3).

$$C_n(r, t) = A_n e^{-dK_n^2 t} \sin K_n r \quad (5.3)$$

Экспонента как устроена? У нее - отрицательный показатель.  $D$  - коэффициент диффузии,  $t$  - время и здесь еще входит  $K_n^2$ . Это так называемое волновое число. Оно простую имеет формулу (5.4).

$$K_n = \frac{n\pi}{l} \quad (5.4)$$

Здесь внизу -  $l$ .  $l$  - длина нашей трубочки, в которой все происходит. Чем больше  $l$ , тем, соответственно, меньше  $K_n$ . Это - все решение. Синусоида -  $K_n$  умножить на  $r$ .  $K_n$  - постоянная величина для данного набора  $N$  и  $l$ . Синус крутится, меняется по координатам. Эти уравнения применяются к уравнениям теплопроводности, распространения возбуждения, я говорю в самой простой форме, чтобы суть было понятно. Теперь: мы с вами занимаемся процессами, которые связаны с биохимическими превращениями,

химическими реакциями. Если говорить общими словами, в этой среде - только диффузия за счет разности концентраций. А там эта диффузия - диффузией, но в каждой точке происходит некая биохимическая реакция. Такая среда, в которой идет не только диффузия реагентов и продуктов появляющихся, но где еще в каждой точке в принципе происходит некоторая биохимическая (химическая, одно и то же в данном случае) - реакция, называется активная среда. Насколько я знаю, это название - не только в биологии. Плазма в физике, лазерные все вещи.

Термин "активная среда" был, насколько я знаю, предложен очень крупным выдающимся физиком Хохловым Ремом Викторовичем, который был ректором Московского университета. В 77 году он, к сожалению, трагически погиб в горах. Активная среда - то же самое уравнение с точки зрения модели, но в него добавляется химический член, который показывает, какие там происходят превращения и все, что здесь есть - то, чем мы занимались на протяжении всех трех-четырех лекций с точки зрения кинетики (5.5).

$$\frac{\partial c}{\partial t} = f(c) + D \frac{\partial^2 c}{\partial r^2} \quad (5.5)$$

При этом получается то, чем занимается теория систем с распределенными параметрами. Например, в общем виде, система из двух уравнений -точечная система (5.6).

$$\begin{cases} \frac{\partial x}{\partial t} = f(x, y) + D_x \frac{\partial^2 x}{\partial r^2} \\ \frac{\partial y}{\partial t} = f(x, y) + D_y \frac{\partial^2 y}{\partial r^2} \end{cases} \quad (5.6)$$

Мы с вами до сих пор занимались так называемой точечной системой. Это означает, что те химические превращения, которые происходят в реакционном объеме, происходит одинаково, одновременно во всех точках системы. Нет диффузии, или она бесконечно быстрая.



А здесь это не так и к точечной системе добавляются диффузионные члены. В активной среде в каждой точке пространства красные точки соответствуют химическим превращениям (рис. 5.4).

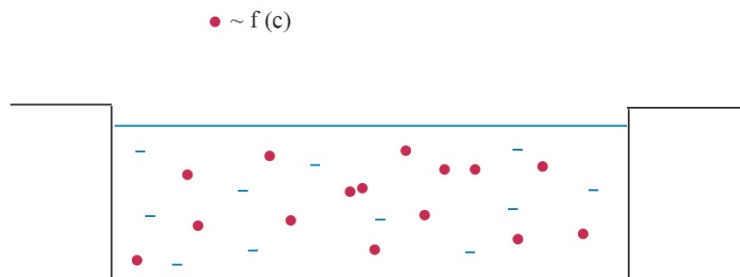


Рисунок 5.4. Химические превращения в активной среде

У нас происходят превращение и диффузия реагентов. Диффузия происходит по законам диффузии, т.е. по разностям концентраций. Отклоним и посмотрим на возмущение системы. Пока чисто формально посмотрите: вот так отклонения, которые мы получаем (рис. 5.5).

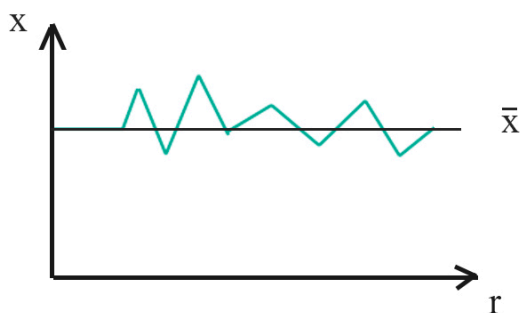


Рисунок 5.5. Набор гармоник

Вот изрезанность такая, в разных точках разные отклонения получились, и они ведут себя по-разному. Это тоже - набор гармоник.

$$\sim \exp \left\{ \left[ f'_x - \left( \frac{n\pi}{l} \right)^2 \right] Dt \right\} \cos \left( \frac{n\pi}{l} \right) r \quad (5.7)$$

Здесь (5.7) показатель экспоненты умножить на набор косинусоид. Там были синусоиды, здесь косинусоиды. Показатель экспоненты по-другому устроен. Это (я беру функцию одной переменной только) - разность между значением производной и тем же самым квадрат волнового числа умножить на  $D$ , умножить на  $t$ . Теперь ситуация по-другому выглядит. Этот экспоненциальный член определяет затухание амплитуды нашего отклонения.

Если там показатель был отрицательный, минус, то здесь разница получается между значением производной и по-прежнему тем же самым положительным значением вот этого квадрата волнового числа умножить на коэффициент диффузии на время. Знак производной и величина ее: если производная отрицательная, это соответствует устойчивому решению точечной системы. Если химическая система без диффузии дает устойчивое решение, то показатель будет отрицательный, все возникшие возмущения уйдут. Если же показатель, знак производной - положительный, еще по амплитуде она будет большая, то эта величина будет положительная, значит, точка неустойчива и у нас эти отклонения, которые - возмущения, будут нарастать.

Давайте вернемся еще раз к этому волновому числу. Точечную систему оставим в покое, устойчивую, неустойчивую, а здесь получается так: разница между значением производной и квадратом волнового числа, если мы значение производной оставим постоянной, будет определяться величиной этого волнового коэффициента, а он меняется от номера гармоники.  $\pi$  и  $l$  - постоянные, а номер гармоники меняется. Чем больше величина  $n$ , тем больше квадрат волнового числа, он со знаком минус, фактор устойчивости увеличивается. Если маленькие гармоники, тогда  $n$  у нас - небольшое. И тогда квадрат волнового числа небольшой и наши положительные производные по абсолютной величине перевесят абсолютное значение члена  $K_n^2 Dt$ , и у нас получится неустойчивость. Это означает, что в активной среде некоторые гармоники низкого порядка могут давать отклонение, которое нарастает во времени и они будут уводить систему от стационарного состояния. Это - нечто новое. Но это - результат, который мы здесь получили.

Посмотрим, как способом это реализуется. Один из первых чисто умозрительных экскурсов в область биологии сделал английский ученый Алан Тьюринг. Он рано довольно умер, в 50-ых годах прошлого века. Он предположил следующее. Он был математик, но имел

научные интересы и в биологии. Возьмем гидру. Вы знаете, что, если оторвать ее, она начинает расти, потом появляется голова. Он поставил вопрос, почему сразу не растет голова? Наивный вопрос, мы приведем тысячу примеров всяких, почему нет, тем не менее, для математика, который просто смотрит на вещи с точки зрения уравнений может быть дело в том, что она может начинать расти по каким-то законам. Прекрасно люди понимают, что там кроется сложная биохимия. Но почему при определенной длине тела гидры начинается рост? А рост того, чего не было до этого, можно сопоставить с каким-то отклонением от стационара, которое вызывает некое нарушение, пертурбацию, и, наверное, там появляются какие-то гармоники, более неустойчивые, низкие гармоники. Откуда они могут взяться? Появляются отклоняющиеся гармоники, отклонения сопоставляем с ростом головы.

Не надо критиковать эти предположения, тут важна сама мысль! Голова появляется потому, что у нас появляется положительный показатель экспоненты. Биохимия - та же самая, а показатель экспоненты – положительный. Это происходит потому, что волновое число уменьшилось. А уменьшилось оно потому, что гидра длиннее стала.  $L$ , длина трубочки, которая сопоставляется, стала больше, а волновое число - меньше. Он не настаивал, на том, что это заменяет биохимические исследования. Просто представил свою иллюстрацию.

Что в результате? Я вам расскажу только об одном способе представления. Так называемый брюсселятор, который должен был быть изучен в курсах ранее. Хочу рассказать, с чего началась реальная система, которая в значительной степени положила начало исследованиям в этой области. В 1959 году в журнал «Биофизика» была послана статья Белоусова (это однофамилец Белоусова, который работает на кафедре эмбриологии). Вы все в школе, когда химией занимались, могли получить разные результаты. Вы могли на этих предметах что-нибудь смешать и получить продукты разного цвета. Возьмем сложную реакцию, в ней есть продукты красного и синего цвета, неважно какой природы. Если идет эта реакция, они одновременно появляются в соответствии с законами реакции – но какой будет цвет пробирки в целом? Авторы статьи написали: берем реакцию окисления ионами церия иона бром-малоновой кислоты, в ходе нее выделяется бром. Идет сложная система реакций (в ней нет ничего особенного с точки зрения химии). Если эту реакцию запустить в пробирке, а там появляются продукты синего и красного цветов, то, как утверждается в

статье, вся пробирка будет периодически менять цвет. Довольно резко, то синий, то красный, колебательный будет, потом, когда реакция закончится, все затихнет.

Редакция статью отвергла и написала, что этого не может быть т.к. это - нарушение второго закона термодинамики. Фактически, мы ничего не делаем с системой, как эта система может самоорганизовываться в пространстве? Но Белоусов был упорный человек, еще раз повторили опыты, и все подтвердили. Вот схема реакций (рис. 5.6).

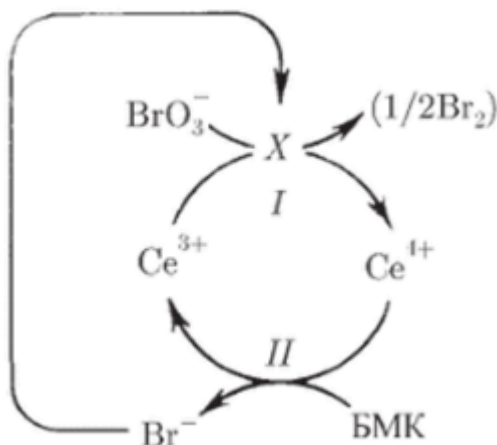


Рисунок 5.6. Схема реакции Белоусова-Жаботинского

Вот продукты:  $\text{Br}$ ,  $\text{BrO}_3$ . На втором этапе появляется отрицательный ион брома, он реагирует с  $\text{HBrO}_2$ . Эти продукты ( $\text{BrO}^-$  и  $\text{HBrO}_2$ ) вступают в реакцию с  $\text{Ce}$ .  $\text{Ce}$  окисляется, а в другой реакции - наоборот, восстанавливается за счет окисления ионов броммалоновой кислоты.

Более того, когда такие же реакции стали проводить в полужидкой фазе, посуде подобной чашке Петри, они стали организовываться, формируя узоры. На кафедре биофизики, вроде, в большом или малом практикуме должна быть подобная реакция.

Сделали систему уравнений в соответствии с этими переменными. Выделили малый параметр и нашли, что при его определенном значении эта система дает неустойчивую особую точку - фокус, как и в гликолизе, которая выходит на траекторию предельного цикла.

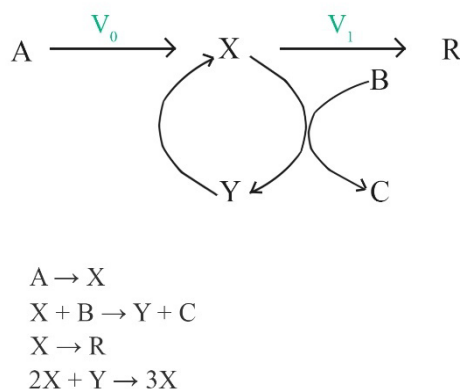


Рисунок 5.7. Система уравнений, составленная на базе реакции Белоусова-Жаботинского. Далее с этой системой работал биофизик Жаботинский. С помощью брюсселятора была показана возможность образования диссипативных структур в такой системе. Я хочу обратить ваше внимание на то, что система брюсселятора знакома вам. Она похожа на то, что рассматривалось на первой лекции по кинетике. Вот биохимический цикл с двумя переменными (рис. 5.7). Рассмотрим упрощенно. У нас имеется приток вещества А, глюкозы или другого субстрата. X может выйти наружу, а может, соединяясь с В, постоянная концентрация которого перейти в Y с образованием продукта С. А дальше Y переходит в X, таким образом замыкая цикл.

Особенность этой системы, которая может давать большинство типов диссипативных структур, или автоволновых динамических режимов, состоит в том, что в ней есть кубичная нелинейность. Имеется система реакций: А переходит в X, X + В переходит в Y, X может уходить в R, но 2X, соединяясь с Y, могут давать три X. Формально, мы можем сократить, убрав 2X – тогда получится, что Y превращается обратно в X. Трудный вопрос, в чем природа этой кубичности. Если реакция X+Y происходит, с некоей константой k', а k', в свою очередь, зависит от X, у нас получается k X<sup>2</sup>Y (рис. 5.8).

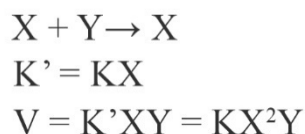


Рисунок 5.8. Объяснение появления кубичности в системе

Одна из реальных интерпретаций состоит в том, что есть ферменты с двумя активными центрами и субстрат реагирует с обоими. Там формально можно писать: субстрат умножить на квадрат концентрации фермента. Так или иначе - ищите нелинейность, ищите кубичную нелинейность. У нас была кубичная нелинейность, в гликолизе я обращал ваше внимание на это.

С точки зрения образования диссипативных структур ситуация следующая. Рассмотрим уравнение брюсселятора (5.8).

$$\begin{cases} \frac{\partial x}{\partial t} = A + x^2 - x(1 + B) + D_x \frac{\partial^2 x}{\partial r^2} \\ \frac{\partial y}{\partial t} = Bx - x^2 y + D_y \frac{\partial^2 y}{\partial r^2} \end{cases} \quad (5.8)$$

Я вам сказал, какие биохимические процессы происходят, вы можете легко написать эти уравнения. Рассмотрим, что дает анализ. Точечная система, когда все коэффициенты диффузии равны 0 или стремятся к бесконечности, дает неустойчивый фокус, который переходит в предельный цикл при условии, когда  $B > 1 + A^2$ . Эти коэффициенты легко сравнить, если мы имеем дело с какой-то реальной системой. Если мы имеем обратное неравенство ( $B < 1 + A^2$ ), тогда мы получим устойчивый фокус.

Значение  $B$ , равное единице - бифуркационное значение параметра. Значит, этой системой можно управлять. Но что касается распределенной системы, когда коэффициенты диффузии не равны 0, у нас должна быть система, в которой по-прежнему выполняется условие ( $B < 1 + A^2$ ), но, при этом, коэффициенты диффузии должны сильно различаться между собой ( $D_x \ll D_y$ ). Тогда мы получаем диссипативную структуру.

Вот, самоорганизация в гомогенной среде без какого-то гетерогенного насилия снаружи. Какой здесь рефрен? Как происходит самоорганизация биологических систем в процессе эволюции? Хорошо известно, что почти все структурные элементы могли получиться так или иначе абиогенным путем. Известный эксперимент: берете кварцевые пробирки, напускаете  $\text{CO}_2$ , пары воды, неорганику, потом берете фосфор,  $\text{ZnO}$  для формирования подложки, даете ультрафиолетовый свет или электрические разряды и получаете набор аминокислот или даже нуклеотидов. Это общий ответ на вопрос, почему организмы,

различающиеся колоссально друг от друга по своему метаболизму, по степени регуляции в эволюционном плане, очень мало отличаются в отношении конкретных структурных элементов, их строения, состава и функций, которые они там выполняют. Вот ответ на вопрос, почему центр тяжести в становлении живых систем в значительной степени переносится в центр проблемы самоорганизации. Это - один из ответов, достаточно общий ответ.

Замечания по поводу слова диссипативные. Это связано с тем, что эта структура существует при условиях постоянного обмена веществом со средой, и, если вы прервете эту связь, структура распадается. Когда мы пытаемся применить эти представления в области биологии, надо понимать, что в ней все несколько не так, хотя наш объект, зачастую, представляет открытую систему. Если вы изолируете клетку в течение достаточно длительного времени, она будет жить и, естественно, постепенно умрет, но структурные элементы ее распадутся не так быстро по сравнению с тем, как происходит распад настоящих диссипативных структур. Конечно, сама идея самопроизвольного превращения гомогенной системы с гомогенным распределением всех структурных элементов в гетерогенную систему по какой-то программе по каким-то законам - дело серьезное и само по себе привлекает внимание исследователей.



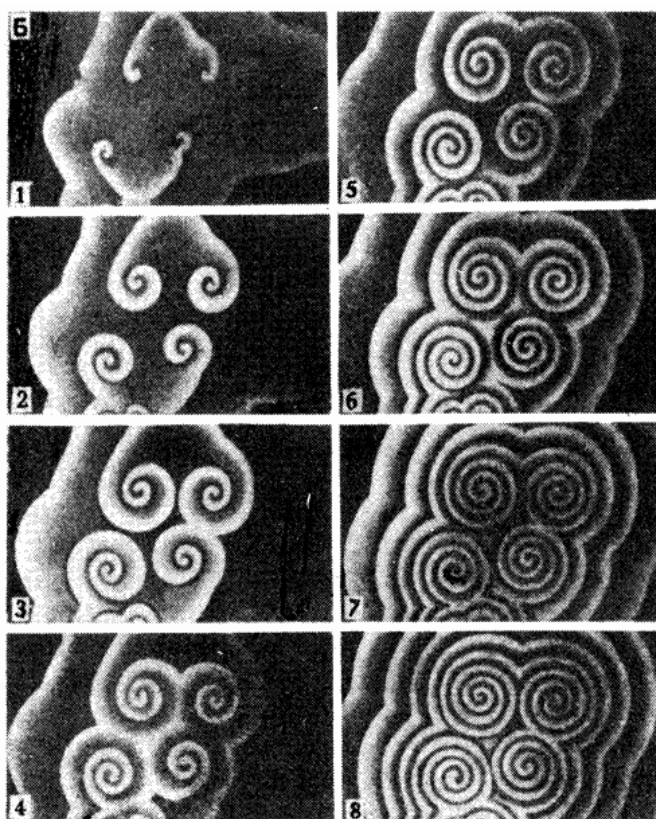


Рисунок 5.9. Типы пространственных режимов в реакции Белоусова-Жаботинского

Пример - реакция Белоусова - Жаботинского. (рис. 5.9). Посмотрите, какие пространственные структуры в этой реакции. Эти процессы проходят самопроизвольно.

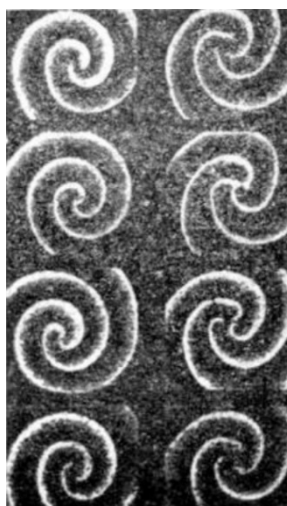


Рисунок 5.10. Пример диссипативных структур - ведущих центров



Теперь вот такие структуры имеют место вот здесь посмотрите. Они называются ведущие центры (рис. 5.10).

Они могут аннигилировать между собой, соединяться, разъединяться. Или другой пример (рис. 5.11).

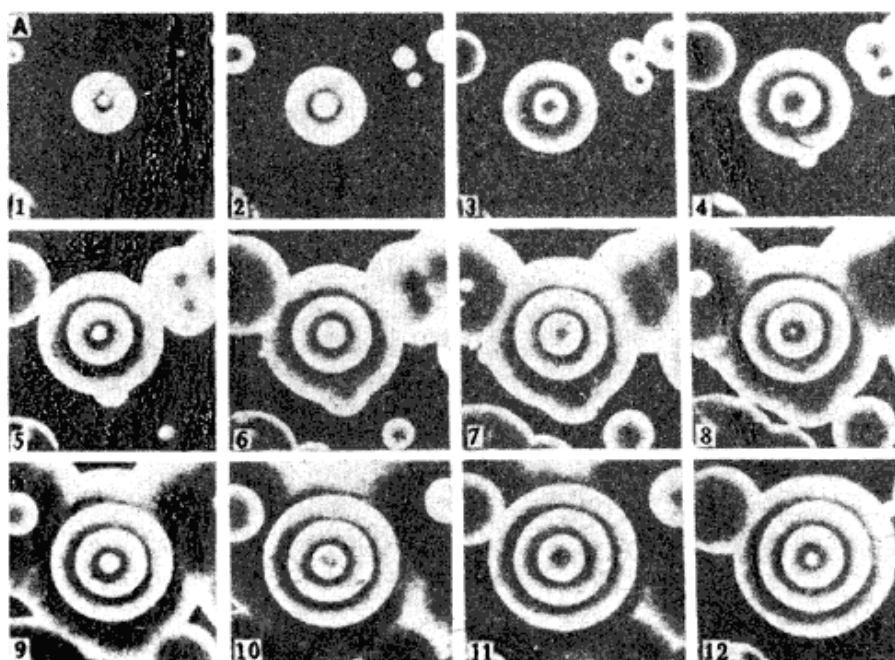


Рисунок 5.11. Пространственный режим в реакции Белоусова-Жаботинского, характеризующийся концентрационными волнами с цилиндрической симметрией

Можно наблюдать динамику их образования во времени. Это пример эволюции структур Белоусова-Жаботинского. Жаботинский - биофизик, который придумал математические модели, объясняющие подобное поведение системы. Изменения наблюдаются в течение секунд.

Вернемся к системе гликолиза у дрожжей. Мы добавили в нее диффузионные члены, появилась диссипативная структура (5.9).

$$\begin{cases} \frac{\partial x}{\partial t} = 1 - xy + D_x \frac{\partial^2 x}{\partial r^2} \\ \frac{\partial y}{\partial t} = ay \left( x - \frac{1+r}{1+ry} \right) + D_y \frac{\partial^2 y}{\partial r^2} \end{cases} \quad (5.9)$$

Рассмотрим эксперимент, где диссипативные структуры в дрожжах наблюдают под микроскопом (5.12). Тут не важно, какая структура, они со временем изменяются, значит, в них происходит самоорганизация.

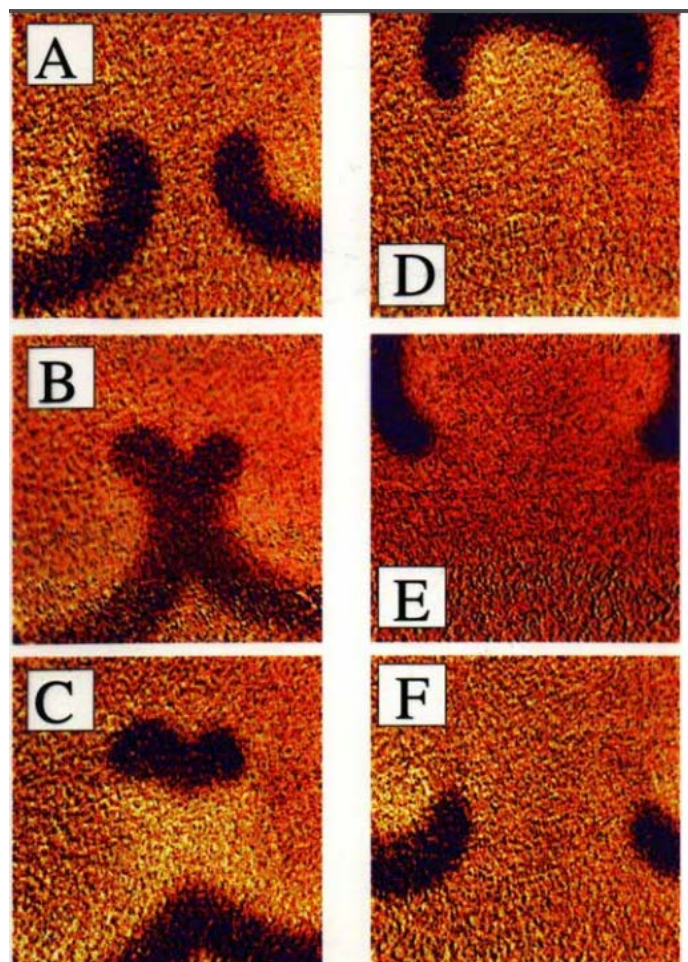


Рисунок 5.12. Структуры в гомогенате дрожжей. Распределенная система гликолиза. А-F - последовательные моменты времени

Если мы введем диффузию, модель покажет, что там действительно появляются диссипативные структуры, которым мы в реальности тоже увидим. Сложно судить, почему они именно такой формы, но результат совпадения теоретического предсказания с экспериментальным.

Вы знаете, что в жизни наши структуры, которые делают на чашке Петри бактерии, одноклеточные организмы, потрясают разнообразием (рис. 5.13).

Базовая модель – это хорошо, но можем ли мы реально найти условия образования именно таких структур? Сейчас этим серьезно занимаются люди в институте биофизики.

В построении данных моделей есть особенность. Просто обойтись диффузионными членами не получается. Нам нужна некая векторная составляющая, введение которой позволяет объяснить узоры, которые получаются.

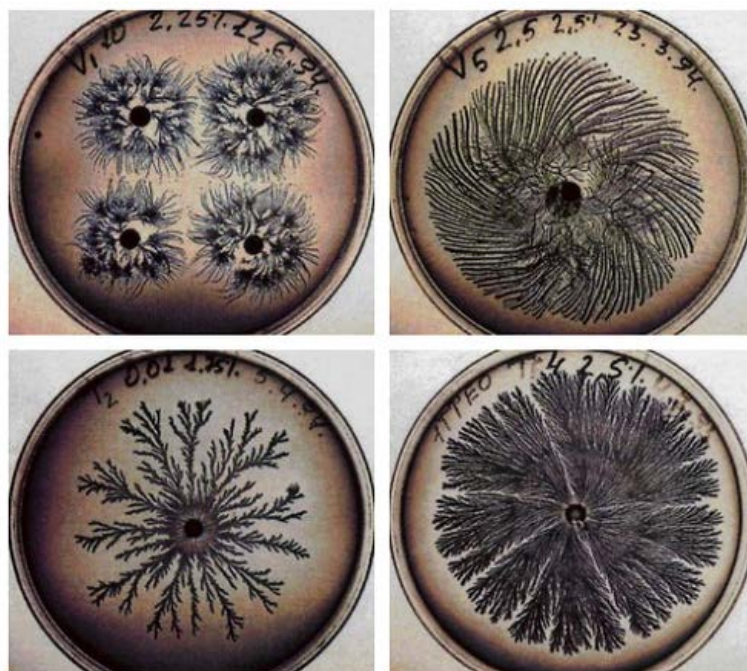


Рисунок 5.13. Фракталы, образуемые колониями бактерий

Пример: циклическая АМФ выделяется при росте клеток, это – аттрактант, который их привлекает. Соединяя диффузию с векторным характером, удастся получить объяснение концентрических кругов. Микробиология не составляет большой проблемы, проблема - объяснить и предсказать зависимости от значений параметров. Какие типы структур будут, как они организуются в такие вещи — это конечно нетривиально. Совокупность клеток не знает, что будет в результате на макроуровне. Каждая клетка отвечает за то взаимодействие непосредственно с окружением, в котором она находится, она не решает уравнений, а двигается по своим законам. Например, вы сидите в лодке в каком-то бурном море, вы можете управлять лодкой, чтоб не перевернуться, но куда вас несет течение и что будет в результате, вы не можете знать. И макрорезультат является результатом взаимодействия между структурными элементами. Тоталитарный режим управления системы - когда есть закон, которому все подчиняются, здесь вроде бы никаких законов нет, здесь характер



взаимодействия. Вот они, наноразмерные структуры, в результате способны проявлять определенное макроповедение.

Я хочу подчеркнуть, что это новая глава в области биологии - не основываясь на конкретном знании элементарных взаимодействий структурных элементов, мы можем строить макрокартину и понимать, что происходит в целом в такой системе.

Вы знаете, что есть активаторы и ингибиторы роста. В случае формообразования есть ауксины и прочие в-ва, которые ускоряют рост. Это базовая, иллюстрирующая модель. Потому что мы не знаем, что такое в данном случае активатор ингибитор, но факт того, что мы этого не знаем призывает к общности в составлении моделей и их решении. Рассмотрим одну из моделей (5.10). В ней есть уравнение, показывающее, как меняется активатор.

$$\begin{cases} \frac{\partial a}{\partial t} = A + \frac{a^2}{h} - a + D_a \frac{\partial^2 a}{\partial r^2} \\ \frac{\partial h}{\partial t} = a^2 - h + D_h \frac{\partial^2 h}{\partial r^2} \end{cases} \quad (5.10)$$

Допустим, что в гомогенной среде равномерно распределены активатор и ингибитор. Рассмотрим их взаимодействие друг с другом. Активатор за счет прихода какого-то субстрата появляется с постоянной скоростью. Допустим, приходит глюкоза сюда, метаболизируется, и с постоянной скоростью получается активатор. Кроме того, он размножается сам, сам себя активирует, это –  $H^2$ , а ингибитор, который есть, он в знаменателе, потому что он давит все, в том числе, образование активатора. Кроме того, активатор уходит из данной области пространства и диффундирует по пространству. Что делает ингибитор? Он образуется тоже благодаря действию активатора.  $A^2$  он и себя размножает, активатор, и ингибитор, уходит из пространства и диффундирует.

Данная схема довольно примитивная, в ней нет никаких экзотических предположений, никакого навязанного ритма. Ну и, конечно, скорость диффузии ингибитора - она больше, чем скорость диффузии активатора. Теперь запускаем эту систему. Что такое структура? Гетерогенное распределение гомогенного первоначального распределения концентрации. Там еще другие есть модели. Я далек от того, чтобы этим моделям придавать какой-то смысл до тех пор, пока мы не найдем конкретно из биохимии, а уж не из какой не из математики, что в данном случае имеется в виду.

Рассмотрим тромбообразование. Тромб образуется, на него налипают тромбоциты, активируются. Смысл моделирования этого процесса в том, что если вы дадите противотромбинный агент, то динамика действий этого агента связана с тем, что вы должны учитывать, в какие периоды вы дадите его в соответствии с динамикой образования тромбов (рис. 5.14). Более того, это, оказывается, имеет переключку с частотой сердечных сокращений.

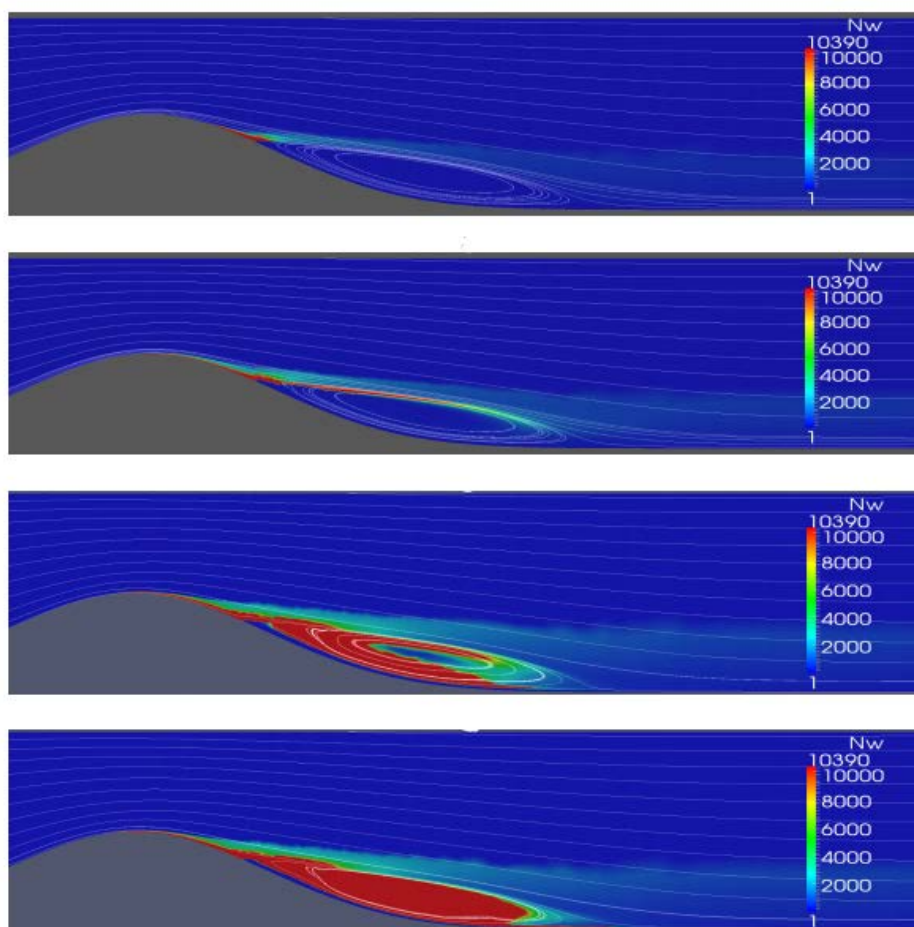


Рисунок 5.14. Моделирование динамики тромбообразования

Это - одна из совершенно реальных конкретных областей. Математические модели - они не заменяют, естественно, реального эксперимента, но очень сильно дают возможность продвинуться в этом направлении. Первый этап, о котором мы все время говорили, это компьютерный эксперимент уже, в котором вы можете, изучая модель, специфическими путями получить значения параметров, которые иногда просто экспериментально трудно

определить. Однако даже до этого, сам процесс составления модели позволяет очень хорошо структурировать, формализовать все, что вы знаете о биологическом объекте. Потому что мало описать объект важно понимать внутреннюю динамику, а математическая модель как раз и есть просто реализация ваших представлений о той динамике, которая есть в объекте. Когда вы готовы изложить это на математическом языке, т.е. сконструировать модель, это говорит об уровне вашего понимания того, что происходит.

Понимая, как строится модель, вы будете играть руководящую ведущую роль в применении этой модели и решении ваших конкретных биологических задач. Но ваша роль здесь должна быть очень конструктивной и в определении того, что дает такой подход, кроме того, ваша роль будет важна и в оценке результатов такого подхода.

## Хаотические процессы в биологии

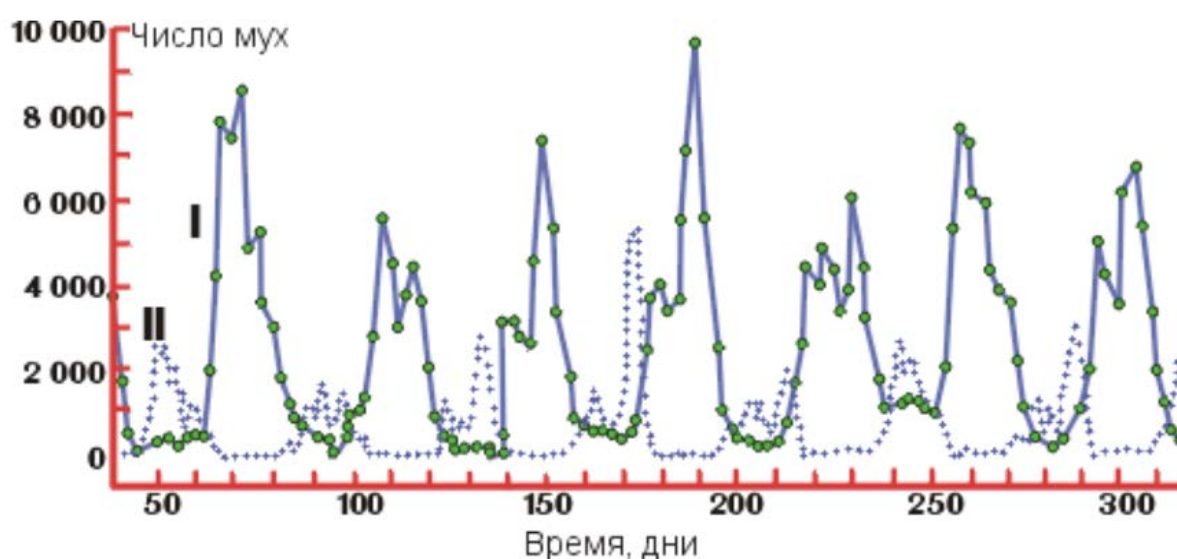


Рисунок 5.15. Динамика численности плодовой мушки

Посмотрим на рис. 5.15. Хаотическое состояние непредсказуемо. Мы живем в области детерминистских моделей. Это значит, что мы знаем, как наша система ведет себя, какие там взаимодействия, имеем характерные времена изменения, соответствующие модели, отражающие изменение концентрации. Это означат, что, если мы имеем решение кинетической системы и поменяем начальные условия, то она изменит свой результат. Это

- детерминистский результат. А модель недетерминистская - хаотическая, непредсказуемая. Если мы поменяли немножко начальные условия, результат может поменяться очень сильно. И, что характерно, этот результат не воспроизводится.

Исходно один из первых подобных результатов был получен великим французским математиком Пуанкаре. Он в начале 20 века занимался относительно простой задачей - смотрел как меняется угол отклонения маятника в зависимости от величины вынуждающей периодической движущей силы. В какой-то момент оказалось, что, если сила  $F_0 \cos(wt)$  больше некоторого критического значения, то поведение маятника становится непредсказуемым. То есть, вы каждый раз задаете то же самое значение, а угол отклоняется совсем не на ту величину, на которую, казалось бы, должен отклоняться в соответствии с уравнениями.

Второй пример был, - предсказание погоды. Если рассмотреть простые уравнения, в которых даже нет кубичности, то можно увидеть, что они дают непредсказуемое поведение, то есть, не воспроизводятся. На фазовой плоскости это поведение фазовых траекторий называется странный аттрактор (рис. 5.16).

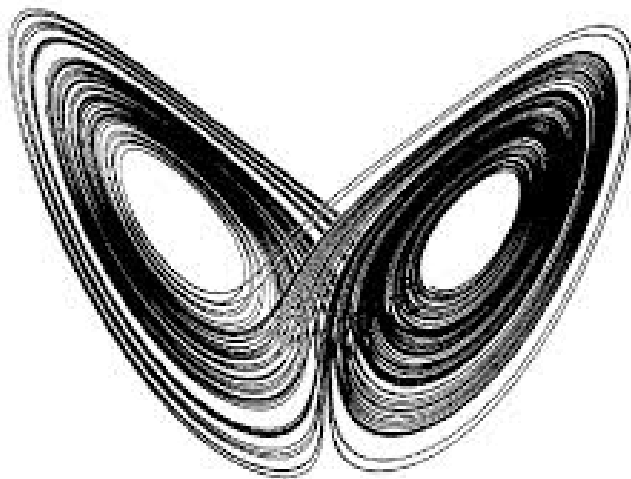


Рисунок 5.16. Пример странного аттрактора в трехмерном пространстве

Аттрактор (от английского слова attract - привлекать) - область, которая занимает эти фазовые траектории. Но она достаточно размыта и они траектории крутятся в ней. Каждый раз возобновляя эксперимент, вы не можете воспроизвести траекторию в точности.

Для понимания хаотического процесса можно рассмотреть Бильярд Синая (рис. 5.17).

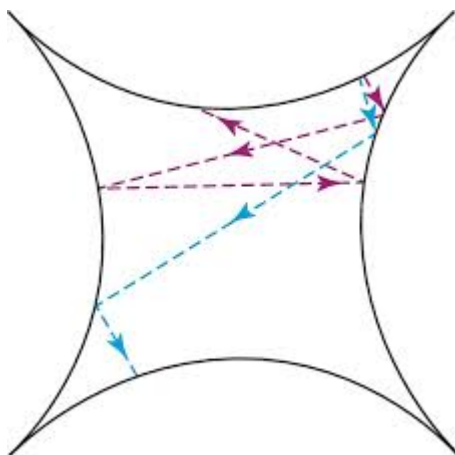


Рисунок 5.17. Бильярд Синая. Данный пример показывает, как небольшие отклонения угла падения резко изменяют угол отражения бильярдного шара

Синай, занимается хаотическими процессами. Он придумал пример - бильярд: угол падения равен углу отклонения. Если вы будете ударять шарик под каким-то углом, можете легко рассчитать, под каким углом он будет каждый раз ударяться и отклоняться от очередного борта бильярдного стола. Теперь представьте себе, что у нас бильярдный стол - не прямой, а выпуклый и размер шарика соизмерим с размером этих выпуклостей. Тогда, если вы чуть-чуть направление шара, при воспроизведении удара, то не сможете точно воспроизвести его траекторию даже на компьютере. Компьютер - великое изобретение, но он дает точность до какого-то знака, не до бесконечности. Каждый раз он немножко ошибается. Это немножко, в случае хаотизации, нарастает по мере каждой очередной реализации. Если стенки выпуклые, небольшое отклонение будет нарастать и при каждом ударе будет все больше и больше, если попробуете снова, то опять в конце у вас будет большое отклонение, но не выходящее за рамки бильярдного стола, фигурально говоря, или за рамки какой-то области, которая ограничивает область такого аттрактора.



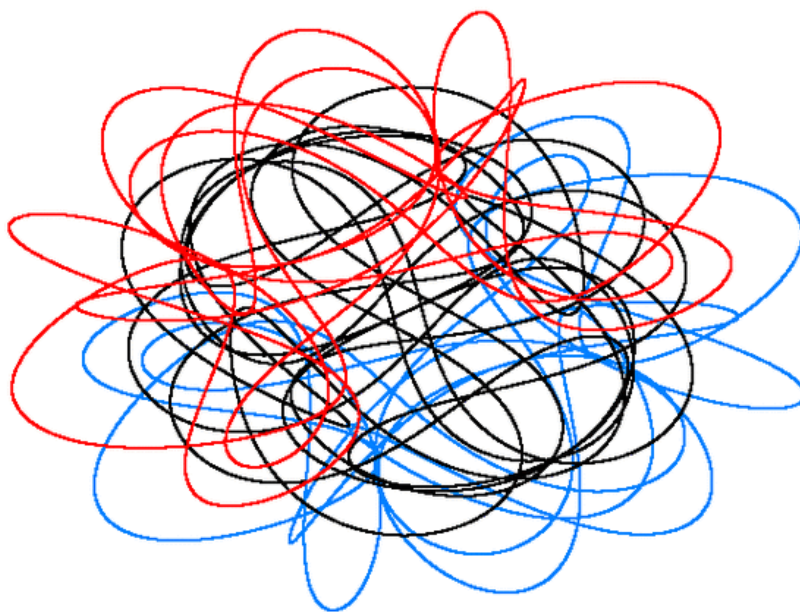


Рисунок 5.18. Пример одной из орбит, возникающих при решении задачи о трех телах

Кстати говоря, в физике имеет место задача трех тел (5.18). Она не имеет точного решения. Тела вращаются по своим траекториям, и каждый раз, начиная с нового места, за счет сил притяжения, вы не повторяете эту траекторию. Вот дискретная модель роста популяций (рис. 5.19).

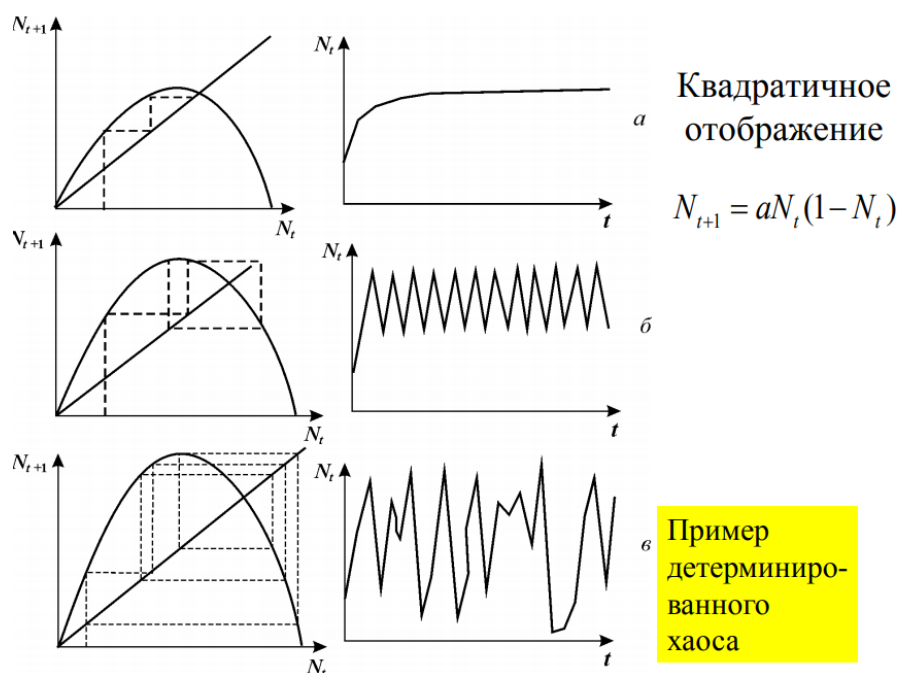


Рисунок 5.19. Пример детерминированного хаоса

$N_{n+1}$  - количество особей в  $n + 1$  поколении, это есть функция от  $N_n$ . Оно будет увеличиваться за счет размножения  $n$ -ного поколения ( $a$  - коэффициент размножения) минус численность поколения  $n$ -ого. Это уже известный нам эффект тесноты. Что получится, если мы запустим эту систему? Ну вот, вначале мы начнем при каком-то  $a$ . Численность растет и потом в стационаре усредняется. Если мы начинаем увеличивать  $R$ , то вдруг заметим цикл (рис. 5.15. б). При последующем малом увеличении произойдет удвоение цикла. При дальнейшем увеличении получается хаос.

Заметим, что амплитуда никуда оно из границ не выходит. Это - странный аттрактор. Данное поведение системы - хаотическое.

Теперь рассмотрим сценарий хаоса (рис. 5.20). На нем мы видим, как увеличение коэффициента приводит сначала к удвоению, а после – к хаосу. Что самое интересное, когда вы начинаете дальше увеличивать  $a$ , опять иногда появляются окна детерминизма.

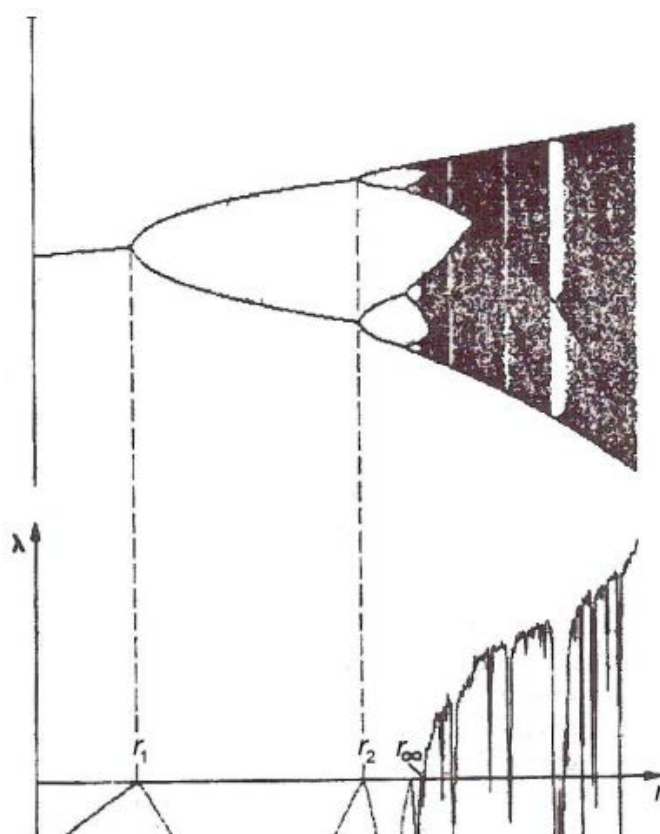


Рисунок 5.20. Сценарий удвоения предельного цикла.

Это новый раздел математики, но он будет востребован. Сейчас я покажу, где можно ожидать эту востребованность. Есть примеры хаотических колебаний. Рассмотрим цикл кальция (рис. 5.21).

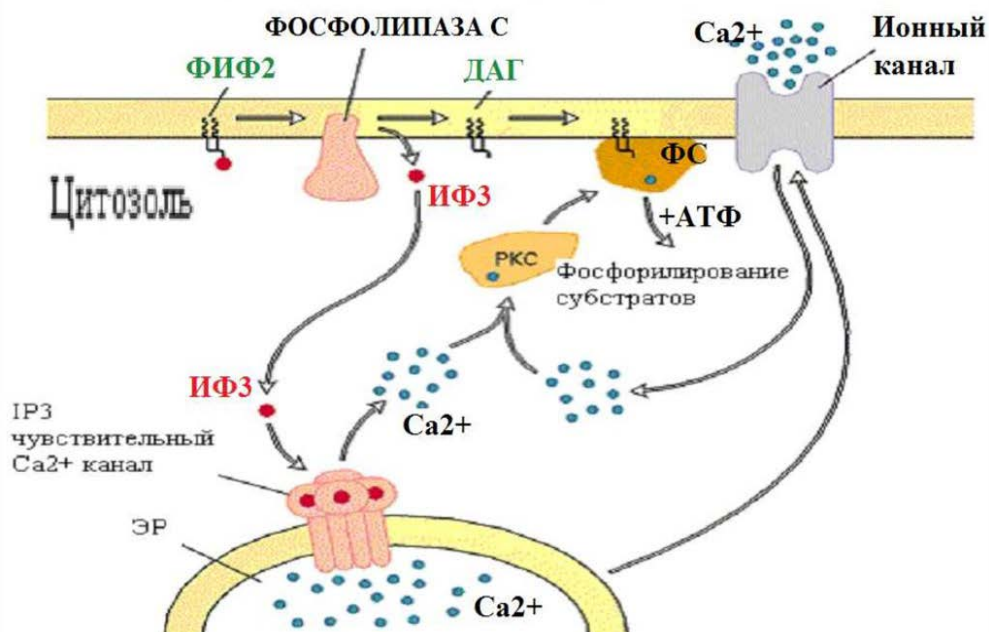


Рисунок 5.21. Схема метаболизма кальция в клетке

Приход кальция, под действием инозитолтрифосфата, кальций покидает депо в эндоплазматическом ретикулуме. В митохондриях - другое депо кальция, которое автокаталитически высвобождается. Высвободившийся кальций влияет на Na-H-обменник. Концентрация кальция внутри, оказывается, может хаотизироваться (рис. 5.22).

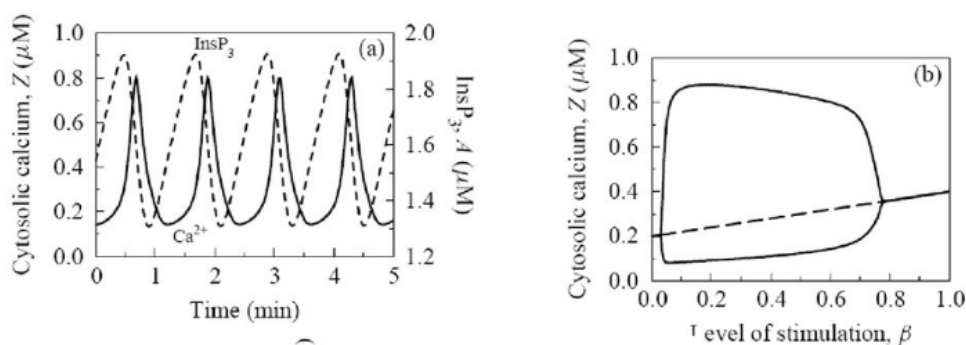


Рисунок 5.22. Появление хаотических колебаний концентрации кальция в клетке

Сначала начинаются вначале колебания, а потом - хаотизация, невоспроизводимое поведение колебаний свободного кальция внутри цитозоля.

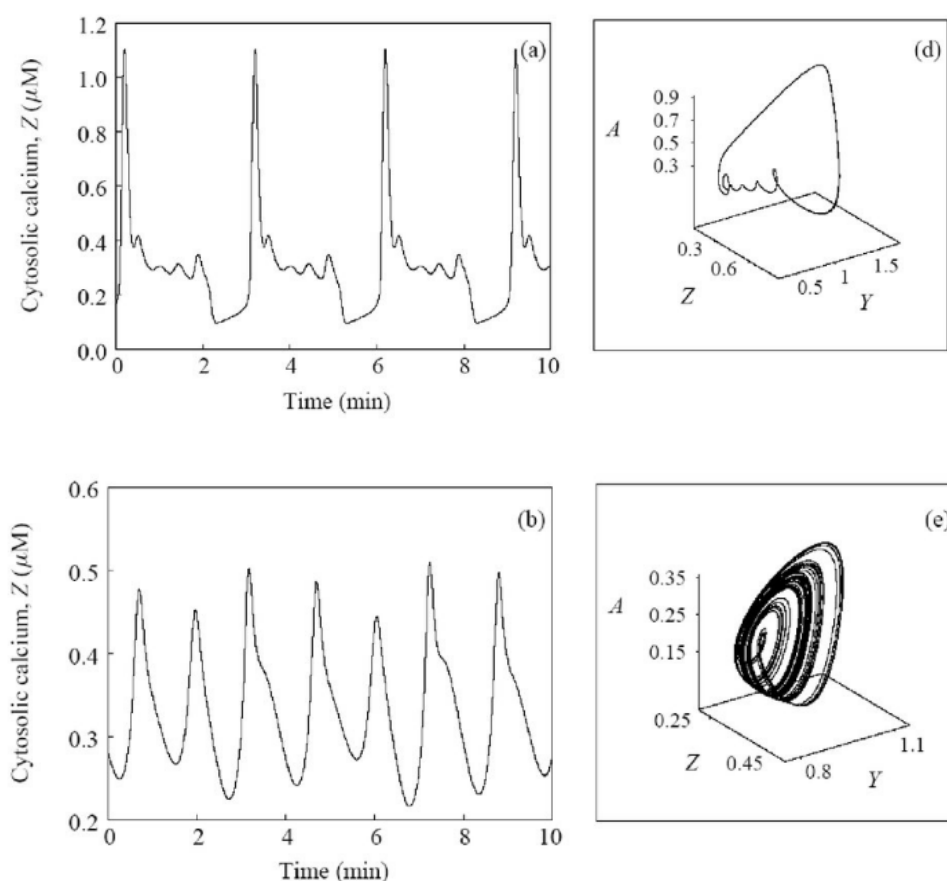


Рисунок 5.23. Хаотизация модели Хищник-жертва

Существует довольно много моделей, которые иллюстрируют возможность хаотизации систем, которые мы привыкли видеть, как детерминистские системы (рис. 5.23). Например, уравнение "хищник-жертва". Если мы прибавим к этим уравнениям диффузионные члены, получаем сразу хаотическое поведение (5.11).

$$\begin{cases} \frac{\partial u}{\partial t} = \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + u(1-u) - \frac{u}{u+H}v \\ \frac{\partial v}{\partial t} = \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} + k \frac{u}{u+H}v - mv \end{cases} \quad (5.11)$$

$u$  – жертва,  $v$  – хищник

Вначале появится широкий предельный цикл, потом возникнет хаотизация, которая будет со временем нарастать. Если вы будете воспроизводить все это дело, то не можете воспроизвести. Эти кривые, если вы формально их меряете, не ложатся одна на другую.

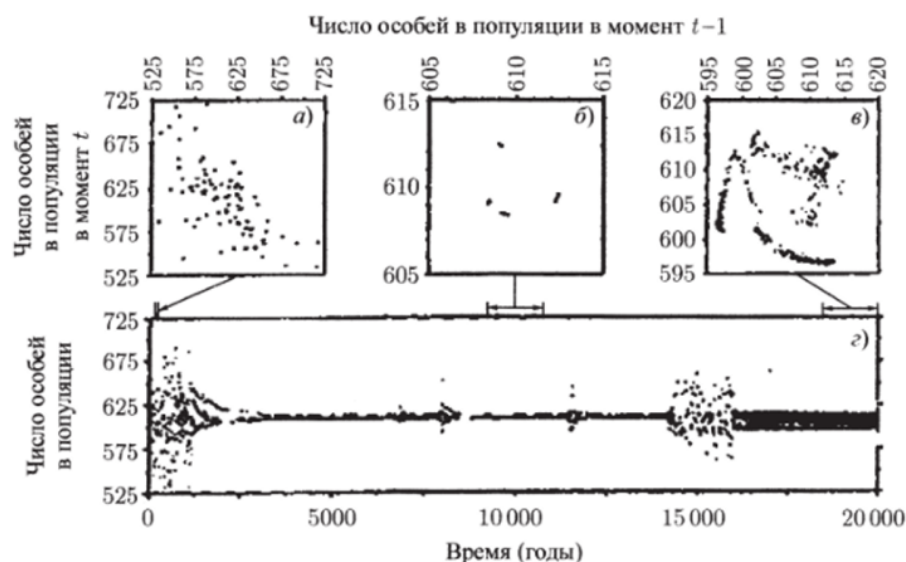


Рисунок 5.24. Динамика численности популяции личинок морских ежей

Последний пример, который я вам приведу – это динамика численности (5.24). Она со временем начинает хаотизироваться. В ней чередуются нормальные и хаотические состояния. Здесь экзотика состоит в том, что ее рассчитали до двадцати тысяч лет вперёд. Но согласитесь, имеет место интересная ситуация. Неожиданные нерегулируемые всплески численности популяций каких-то, не связаны ни с какими изменениями погодных и прочих условий (однако, конечно, бывают связанные). Предпосылки к хаотизации находятся в самой системе.

Это может иметь отношение еще и в другом аспекте - росте. В биологии известно довольно большое количество таких периодических неравномерных структур. Например, кораллы. Они - типичные структуры, которые имеют проявления детерминированного хаоса. Вместе с тем, альвеолы легких — это структуры, которые подчиняются хаотическим законам. Почему подчиняются? Оказывается, уравнение детерминистской дискретной модели роста популяций преобразуется легко с помощью, казалось бы, искусственной замены, в другое уравнение (5.12).

$$Z_{n+1} = f_c(Z_n) = Z_n^2 + C \rightarrow rx_n(1 - x_n) = x_{n+1} \quad (5.12)$$

$$\text{При } x = \frac{1}{2} - \frac{z}{r}, c = (2r - r^4)^{\frac{1}{4}}$$

Вот оно, уравнение, которое показывает последовательность чисел. Этой последовательностью чисел, не имеющей никакого отношения, казалось бы, к биологии, занимался математик Жюлеа. Он смотрел последовательности чисел. Эта последовательность - комплексные числа ( $Z = a + bi$ ). Он берет число, возводит в квадрат и прибавляет какое-то постоянное число ( $Z_n^2 + C$ ). Граница между тем, когда  $Z$  по абсолютной величине меньше или больше единицы в том, что когда  $Z > 1$  по абсолютной величине, все эти последовательности квадратов стремятся к бесконечности, а когда  $Z < 1$ , они становятся меньше и меньше, стремятся к 0. Граница между этими двумя множествами, идущими в бесконечность или в ноль в данном случае - окружность радиуса  $R$ , как абсолютная величина модуля комплексного числа. Оказывается, что если взять эти комплексные числа, возводить в квадрат и прибавлять еще одно комплексное число, то граница - не такая.

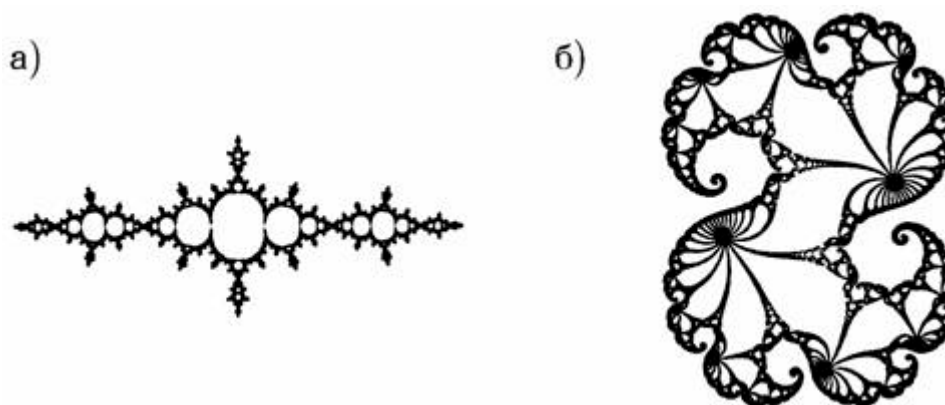


Рисунок 5.25. Множества Жюлиа при разных значениях  $C$ . а) множество Жюлиа при  $C = 0,27334+0,00742 \cdot i$ , б) при  $C = -1,25$

Начинается граница совершенно непонятного строения. Более того, существуют различные виды этой границы. Это все - границы вот этой последовательности чисел. С прибавлением  $C$  мы получаем вот такую последовательность. Более того, если мы теперь раскрасим наши члены последовательности разной краской, грубо говоря от 90 до 120-го синие, от 130 до 150-го - красные, или по-разному их покрасим, то мы получаем фантастические примеры различных границ. Если  $C$  равно нулю, при этом прибавляем каждый раз, вот такая граница, такая — вот такая. Они все получили даже названия, скажем морской конек, еще что-



нибудь. Это - результат итераций, вы примерно попадаете в цель. Допустим, каждый раз у вас какие-то отклонения есть. Характер разброса, сумма какого-то определенного окна в этих членах последовательности таким образом распределены в пространстве.

Вернемся к преобразованию 5.12. Вот простое преобразование дискретной модели роста популяции. Мы видим, что в нашей простой дискретной модели заложено колоссальное количество типов динамического поведения. Это - еще один из примеров.

Рассмотрим рост кораллов. От чего они растут? Есть какой-то активатор и какой-то ингибитор. Вот смысл математических упражнений — это имеет реальное приложение.

Рассмотрим пример: допустим, у нас были эксперименты не имеющие отношения к хаосу. Допустим, мы мерили биофизические параметры на мембранах растительных организмов и смотрели на адаптацию при изменении температурных условий. В процессе перехода адаптации у нас - разброс этих параметров, то есть, это - хаотизация. То есть, проблема хаоса - проблема некоторой «конструктивной растерянности» организма. Когда вы принимаете решения, например, у вас возникает неопределенность в пределах ограниченной области. Это - область, которая сейчас развивается, через несколько лет разовьется вполне. Если мы говорим о математической биологии (книжки большие издаются), то она займет свое место не столько потому, что она имеет математический аппарат, а потому, что мы найдем реальные объяснения неким биологическим процессам, которые наблюдаем.



## Лекция 6 Термодинамика ферментативных реакций

### Введение

#### Значение термодинамики

Сегодня мы начинаем термодинамику. Физическая химия - основа общепринятых представлений в биохимии, термодинамика - существенная составляющая часть. Мы пользуемся понятиями: разность окислительно-восстановительных потенциалов, константа равновесия, константа диссоциации, тепловой эффект реакции, изменение свободной энергии, они - основы физхимии, в значительной степени (для этого вам читали курс физхимии) связаны с термодинамикой.

#### Задачи термодинамики

Классическая термодинамика - наиболее общая наука о превращениях одного вида энергии в другой. Много примеров: энергия химических связей, АТФ превращается в механическую энергию, трансмембранный потенциал - электрическая энергия, энергия движения ионов.

Термодинамика классическая рассматривает эти все представления и использует первый и второй законы термодинамики в выведении характеристических функций.

Второе, что она делает: по изменению энтропии предсказывает направление самопроизвольных процессов. Второй закон говорит, что энтропия в изолированных системах всегда увеличивается в самопроизвольных необратимых процессах, достигая максимума в состоянии равновесия. Функция предсказательная в классической термодинамике очень важна. В биологии – ещё большее. В ней равновесие - смерть биологической системы. Поэтому там вопрос - можно ли предсказать что-нибудь по типу куда мы идем, к состоянию равновесия по увеличению энтропии, а здесь – как, что, что с энтропией делается. Еще аспект: все меняется во времени, мы кинетикой не зря занимаемся. Можно ли предсказать направление, не зная механизмов конкретных, скажем онтогенез, направление эволюции, роста?

#### План изучения термодинамики

Мы вспомним основы (первый-второй законы) термодинамики только в отношении химических реакций. Вначале - классическая термодинамика, что она дает для биологии, потом - что делать, когда хотим от исходного состояния к равновесному идти, и со

временем что-то делать. Мы устойчивость стационарных состояний смотрели, решали уравнения, вы знаете механизмы, как разлагать Безье особые точки, может быть, можно не знать этого, а по термодинамическим характеристическим функциям то же самое сказать? Смысл вопроса состоит в предсказательной ценности второго закона термодинамики для необратимых процессов, происходящих в открытых биологических системах.

Вспоминая первый, второй законы, не будем в подробности вдаваться, термодинамика – аппарат математически внешне простой. Никаких уравнений серьезных, дифференциальные уравнения не решаем, но смысл – глубокий. Формулы – простые в пределах вашей математической компетенции, без них не обойтись, это – язык, на котором происходит изложение.

## Первый и второй законы термодинамики

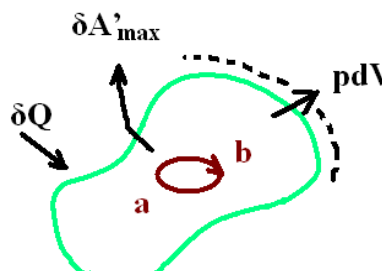
Первый вопрос – эволюционный процесс. Как предсказать направление необратимых процессов, которые идут, в открытых системах (наш случай), или (классической термодинамики) в изолированных системах.

Второй – как происходят превращения энергии из одной формы в другую. По каким законам, сколько можно запасти энергии, сколько использовать. Вторая проблема в каком-то смысле более актуальна, потому что это – наша задача: сколько молекул АТФ может образоваться за счет переноса электронов по цепи в митохондриях за счет разности потенциалов.

Пример: можно ли работу мышечного сокращения обеспечить за счет такого количества молекул АТФ в единицу времени? Это – первый закон термодинамики. Его много раз проверяли на биологических системах, в начале 20 века, были опыты, человека помещали в калориметр, мерили потоки тепла, учитывали все, что он съел, работу, которую он произвел. Это опубликовано в учебниках. Если вы потребили какое-то количество энергии в питательных веществах, смотрите на этикетки. Энергетическую ценность продукта определяют в калориметре, сжигают, там выделяется энергия. Тепло, которое там есть, калория – она калория, и все. Как она попала, что с ней было – дело организма, а мы знаем баланс.

При этом получается три процесса (Рис. 6.1, А).

A  $\delta Q = dU + pdV + \delta A'_{max}$



B

$$dS = \frac{\delta Q}{T} \text{ обратимые процессы}$$

$$dS > \frac{\delta Q}{T} \text{ необратимые процессы}$$

Рисунок 6.1. Термодинамические процессы в живых системах

На рисунке: превращается тепло  $\delta Q$ , энергия в виде питательных веществ (a). Они распадаются, чтобы получились кирпичики, и освободилась энергия, заключенная в их химических связях. За счет энергии из этих кирпичиков, или каких-то других, строится тело, система живая, растет, размножается, все происходит. При этом энтропия ее понижается, поскольку организованность растет. Мы к этому вернемся. Весь процесс формально можно так описать.

## Изменение внутренней энергии.

Термодинамика родилась в 19 веке. В таком виде, до кинетики развитой, биологические системы появились до статистической физики. Потом возникла статистическая термодинамика, это была в значительной степени наука, основанная на реакциях, проходящих в газовой фазе. Потом в растворы пошло. Понятие внутренней энергии – понятие очень важное, оно определено для каждой систем по-разному немножко. В случае идеального газа, откуда возникла термодинамика исходно, цикл Карно, движение поршня. Внутренняя энергия идеального газа – это энергия теплового движения, хаотическое движение молекул - внутренняя энергия. Когда происходит увеличение внутренней энергии  $dU$ , часть этой энергии превращается в работу против сил внешнего давления  $pdV$ , в цикле поршень двигается, происходит преодоление сил внешнего давления и увеличение объема. Вот – работа. Считается положительным тепло, которое поглотилось система  $\delta Q$ , отрицательным – если система выделила тепло. В нашем случае - еще химические реакции

$\delta A'_{\max}$ , они связаны с тем, что происходит превращение веществ одно в другое. Я поговорю о том, что такое химическая реакция с точки зрения того, как она учитывается.

## Изменение энтропии

Производится работа против сил внешнего давления. С этим связано по второму закону изменение энтропии. Энтропия, вы уже слышали, - функция состояния, ее изменение не зависит от пути перехода. Это значит: любым способом попал – будет такая энтропия. Обычно в обратимых процессах изменение энтропии  $dS$  при переходе из одного состояния в другое в точности равняется приведенной теплоте  $\delta Q/T$ . Имеется в виду энергия, которую мы дали системе, отнесенной к температуре, при которой получился переход. Для необратимых процессов изменение энтропии - больше. Изменение энтропии не стало больше, количество энергии поглотилось не меньше. Но химические реакции происходят в системе потому, что она готова к этому, в ней есть какие-то градиенты химической реакции, исходные реагенты, продуктов еще нет или мало. Они начинают реагировать, идет химическая реакция, совершается химическая работа  $\delta A'_{\max}$  (нам нужно понять, что это, найти, как ее определять) и выделяется тепло. Это - отрицательное тепло, с положительным, которое приходило в результате обратимых процессов. Из него вычитается то, что система выделяет и в результате  $\delta Q/T$  общий баланс становится меньше. Не энтропия  $dS$  увеличивается, а тепловой эффект поглощенной теплоты  $\delta Q/T$  меньше за счет выделенной. Вот - гвоздь программы наших дальнейших рассмотрений (Рис. 6.1, Б). Имейте это в виду, дальше мы к этому вернемся.

## Изменение $\delta A'_{\max}$ – максимально полезной работы

Чтобы найти изменение  $\delta A'_{\max}$ , максимально полезной работы, вводятся характеристические функции (6.1 – 6.2):

$$G(P, V) = U - TS + PV \quad (6.1)$$

$$F(v, T) = U - TS \quad (6.2)$$

Вводятся полная энергия, или термодинамический потенциал Гиббса  $G(P, V)$ , и свободная энергия  $U - TS$ .  $U - TS$ , это – свободная энергия. Еще есть энтальпия, внутренняя энергия.

Почему так ввели, не написали  $+TS$ ,  $-PV$ ? Давайте я покажу, как вводятся эти функции. Если взять полный дифференциал этой функции от  $P$  и  $T$ , а свободной энергии - от объема и температуры, то его изменение при постоянных значениях переменных в точности равняется вот этой  $\delta A'_{\max}$  полезной работе (6.3-6.4).

$$dG = -SdT + vdP - \delta A'_{\max} \quad (6.3)$$

$$dF = -SdT - vdP - \delta A'_{\max} \quad (6.4)$$

В этом -смысл введения именно в таком виде.

Вопрос - как найти изменения  $dG$  и  $dF$ , чтоб по ним оценить работу химической реакции при постоянных соответственно температуре (как правило, постоянная), давлении и объеме. Вот как это делается: характеристические функции –

$H = U + pV$  - энтальпия, полное теплосодержание,

$G = U + pV - TS$  термодинамический потенциал  $G$  – это энтальпия без  $TS$ , энтропийной части),

$F = U - TS$  свободная энергия (внутренняя энергия минус энтропийная часть). Если внутренняя энергия для идеального газа – энергия хаотического движения, то для химических реакций - нечто другое. Мы к этому перейдем, потому что внутренняя энергия молекул АТФ, которую мы используем, когда происходит гидролиз АТФ – наш хлеб. Биохимический. Внутренняя энергия там – не энергия связи. Не хаотическое движение, это другое, и в случае электрических явлений - по-другому, это - очень важное понятие, но оно не определено. Каждый раз в конкретном случае надо понимать, что мы имеем в виду. Энтропийная часть – то, что не может превратиться в работу.  $H = U + pV$  полное изменение энтальпии — это тепловой эффект реакции, то, что на этикетках написано – это все, что освободилось, когда мы какой-нибудь там кусочек взяли, 100 грамм хлеба сожгли, 360, 300, не помню, сколько черный хлеб килокалорий на 100 грамм. Одна килокалория - 4 килоджоуля. Вспомним потенциал термодинамический,  $G = U + pV - TS$ . Это – энтальпия минус  $TS$  эта вот работа. Изменение энтропии  $TS$  — это то, что – платим за все перегруппировки, еще чего-то. Получение этих потенциалов:

Если в первый закон  $T$  вместо  $\Delta Q$  поставите из второго закона, будет

(6.5)

$$TdS = dU + PdV + \delta A'_{max} \quad (6.5)$$

Берем термодинамический потенциал (6.6),

$$G = U + pV - TS \quad (6.6)$$

ввели его, находим дифференциал (6.7)

$$dG = PdV + v dP - TdS - SdT - \delta A'_{max}, \quad (6.7)$$

подставляем значение  $dU + PdV + \delta A'_{max}$  вместо  $TdS$ , приводим подобные члены, вычитаем (6.8),

$$dG = +PdV + VdP - dU - PdV - \delta A'_{max} - SdT - \delta A'_{max} \quad (6.8)$$

Получаем выражение:

$$dG = -SdT + VdP - \delta A'_{max} \quad (6.9)$$

Полный дифференциал равен (6.10):

$$-(dG)_{P,T} = \delta A'_{max}. \quad (6.10)$$

и полный дифференциал – это  $-SdT + VdP$ . Если это изменение видим, и оно происходит при постоянных температуре и давлении, то тогда  $dT$  и  $dP$  обращаются в 0, и  $dG$  равняется в точности изменению произведенной работы  $\delta A'_{max}$ .

Замечание. В случае биохимических реакций, изменение объема, как правило, не происходит. По крайней мере, в биохимических простых процессах. Это значит, что  $\Delta U=0$  и изменения потенциала термодинамического  $G$  и свободной энергии  $F$ , в общем, одинаковы, потому что отличаются между собой только на  $PV$ , а  $PdV$  равняется нулю примерно, нет объема. Поэтому часто в литературе биологической говорят: свободная

энергия, полный потенциал, понятия, в общем, вроде как путаются, но на самом деле это примерно одно и то же с точностью до неизменного объема.

## Фундаментальные понятия термодинамики

### Понятие химического потенциала

Теперь вводится понятие химического потенциала. Это - фундаментальное понятие, которое позволяет нам заниматься конкретными вычислениями. Я привел самый качественный простой вывод: вот это - потенциал, потому что он вводится  $\mu_0 + RT \ln C$  (концентрации), мы чуть-чуть расширяем физхимию, вот изменение полной энергии Гиббса (6.11),

$$\begin{cases} G = U + pV - TS \\ SQ = TdS \end{cases} \quad (6.11)$$

дифференциал берем (6.12).

$$dG(P, T) = -SdT + VdP + \sum \mu_k dn_k \quad (6.12)$$

$-SdT + VdP$  — это то, что связано с тем первым законом термодинамики, прибавили энергию, получили что-то такое - изменение энтропии этой системы за счет того, что она обменялась, получила энергию извне, но кроме того, в этой системе еще сидят реагенты, которые готовы провести химическую реакцию  $\sum \mu_k dn_k$

Идея состояла в том, что мы не знаем механизм химической реакции и кинетикой не занимаемся, но можем сказать, что в химической реакции есть большое количество реагентов, одни из них уменьшают исходные реагенты, свое количество молекул, а количество молекул продуктов реакции нарастает. Будем считать, что каждое изменение -  $dn_k$ -атое.  $n_k$ -атое — это количество молекул или количество молей. Моль - доля числа Авогадро. Скажем, что такое  $10^{-5}$  моля в литре молекул находится (моль/литр)? В одном моле  $6 \cdot 10^{23}$  молекул - число Авогадро, а в  $10^{-5}$  —  $6 \cdot 10^{18}$ . Поэтому, когда мы говорим моли — это число молекул, пропорциональное Авогадро. И  $\sum \mu_k dn_k$  химическая реакция, которая происходит, одни уменьшают свое число молекулы, другие растут - это дает свой вклад в изменение энергии Гиббса  $(dG)_{P,T}$ . Я буду говорить энергия Гиббса  $G$ . Вклад - механизм реакции. Он будет пропорционален вкладу каждого из веществ, который участвует в этом процессе. Пропорционален  $\mu_k$ -атое вещество.  $\mu_k$ -атое — это коэффициент



пропорциональности, мы пока ничего не говорим, что это - потенциал химический.  $dn_k$  - это изменение числа молей, или числа молекул этого вещества. Если это - исходный продукт, то будет  $-dn$ , он уменьшается, если реагент,  $+dn$ . Если мы каждый из  $dn$  умножим на свой коэффициент пропорциональности, получим вклад его в энергию Гиббса  $(dG)_{P,T}$ . Поскольку уравнение 6.12- полный дифференциал, то вы помните, что  $dS/dP$ - производная, объем этой производной (6.13)

$$V = \left(\frac{dS}{dP}\right)_T, \left(\frac{dG}{dP}\right)_P = -S \quad (6.13)$$

Давайте посмотрим, что за коэффициент пропорциональности  $\mu_k$ , как он связан с концентрацией. Представим себе, что температура постоянна  $-SdT + VdP$  исчезает, посмотрим, как  $\sum \mu_k dn_k$  дает вклад свой в полный потенциал Гиббса. Пусть у нас количество молей изменения  $dn=1$  моль. Расходы одно вещество будет, тогда  $G = \mu * 1$ . Полное изменение.  $dG = d\mu = VdP$  ( $d\mu$  – изменение коэффициента). У нас прошла химическая реакция. Изменилось давление. Давление сродни хаотическому удару молекул в единицу времени. Дальше предположим, что все это подчиняется поведению идеального газа (сильное допущение, идеальный газ - молекулы сталкиваются, но не взаимодействуют, не изменяются, перестройки в них нет, а у нас - химическая реакция), идет перестройка, и структура, но будем считать, что это - так. Оправдание - выводы, которые мы получим, очень хорошо на практике оправдываются и работать можно, но не надо забывать, что это – допущение. В идеальном газе есть уравнение состояния идеального газа, классика.  $PV=Rt$ . Если вместо  $V$  подставим значение  $RT/P$ , и умножим на  $dP$  (6.14),

$$VdP = \frac{RT}{P} * dP \quad (6.14)$$

то получим, что (6.15)

$$d\mu = RT/P * dP. \quad (6.15)$$

Но это -  $d\mu$  или  $dG$  одного моля. Это - небольшое изменение. Чтобы найти полное изменение, надо проинтегрировать. Возьмем неопределенный интеграл, и мы получим  $\mu_0$  постоянное некоторое плюс  $RT \lg P$  (6.16).

$$\mu = \int \frac{RT}{P} dP = \mu_0 + RT \lg P \quad (6.16)$$

Теперь делаем еще допущение, менее навязчиво, давление (баллон с газом - давление на стенки - фактически связано так или иначе с кинетическим движением и концентрацией молекул)  $P$  заменим на концентрацию  $C$  (моль/литр). Количество частиц будет число Авогадро умножить на концентрацию (6.17)

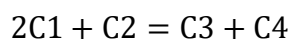
$$n = NA * C. \quad (6.17)$$

Получился химический потенциал (6.18)

$$\mu = \mu_0 + RT \lg C \quad (6.18)$$

### Скорость химической реакции

Посмотрим на химическую реакцию глубже. В школе говорили: уравнивайте стехиометрические коэффициенты. Вот химическая реакция:



Состоит в том, что две молекулы  $C_1$  соединяются с одной молекулой  $C_2$ , идет перестановка атомов. Одни связи разрываются, другие образуются в активном кластере, в нем получаются продукты, другие. Они отличаются разными связями атомов между собой. Количество молекул при этом может быть разным. Слева молекул в одном акте реакции две плюс одна. Справа - одна плюс две. Количество молекул меняется, количество атомов - то же самое. Когда уравниваете коэффициенты, уравниваете следуя закону сохранения вещества, то есть числа атомов, количество молекул, дающих вклад в концентрацию, концентрация — это количество молей, то есть количество молекул в долях от числа Авогадро, которые присутствуют в растворе. Это в одном акте. Все расчеты - как оценка мощности работы двигателя машины. Загружаете цилиндр, один такт проворачиваете, в результате расхода скажете, сколько он может проехать. Валовой выход реакции - число актов умножите на время работы реакции, считая еще, сколько времени занимает один такт.

В этой реакции идет убыль числа молей, то есть, числа молекул исходных  $C_1$ ,  $C_2$  и образование  $C_3$ ,  $C_4$  минус  $dn_1$ ,  $dn_2$ . Это когда  $dG$  был, а здесь - плюс и умножить на соответствующие стехиометрические коэффициенты. Если концентрация - в молях на литр, это означает число молекул или число частиц. Равняется  $N_A * C_1$ , число Авогадро. Вся реакция происходит за счет того, что они сталкиваются вместе и попадают в один реакционный комплекс. Как будто мы запустили и во всем растворе появились реакционные комплексы. Сколько комплексов может быть? Нужно общее число молекул каждого вещества, которое попало в комплекс и приняло участие в этом акте реакции

разделить на то, сколько молекул в компании одного вида сидит. Например, произошла убыль вещества  $n_1$ . Какое-то количество молекул - убыль за счет того, что они попали в комплекс и сколько комплексов было. Если в комплекс попало две молекулы вещества, то надо общее число, которое убыль, разделить на два. Соответственно,  $dn$  делим на его стехиометрический коэффициент  $\nu_n$ . Число молекул, которые в одном акте реакции во всех местах попали в активный комплекс, делим на число их в данном комплексе (6.19).

$$-\frac{dn_1}{V_1} = -\frac{dn_2}{V_2} = \frac{dn_3}{V_3} = \frac{dn_4}{V_4} = d\xi \quad (6.19)$$

$-dn_1/\nu_1$  – два, а в этом случае –  $-dn_2/\nu_2$ . Справа в формуле по одной молекуле появилось из тех же комплексов. Они все равны между собой, потому что число комплексов для всех - одинаковое, это - те комплексы, которые в одном акте реакции получились и продвигают реакцию. Это отношение  $d\xi$  называется степень полноты, или продвижения реакции. То есть сколько у нас в одном акте реакций произошло образование активных комплексов.

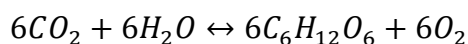
Мы не говорим, все ли комплексы дали реакцию. Она может быть обратимой, необратимой. Число комплексов (6.20):

$$d\xi = \frac{1}{\nu_k} dn_k \quad (6.20)$$

-стехиометрический коэффициент. Эта ситуация для всех одинакова. Скорость реакции - наработка продуктов реакции, которая связана с тем, что число активных комплексов, которые образовались, убывает со временем. Это - скорость реакции, то есть, изменение полноты реакции со временем. Воспользуемся образом загрузки порции бензина в цилиндр: допустим, у нас бензин разного сорта, загрузили общий объем такой-то, прошел такт один, чем больше количество комплексов, много цилиндров, тем больше степень продвижения реакции. Скорость — это как порции со временем изменяются и дают продукты. Мы можем загрузить, он сработал, ждем полчаса, следующее загрузим, а можем подряд делать. Скорость изменения числа комплексов - и есть скорость реакции (6.21).

$$V = \frac{1}{\nu_k} \cdot \frac{dN_k}{dt} = \frac{d\xi}{dt} \quad (6.21)$$

Еще - фактически построение того, что я говорил: образование молекулы глюкозы из  $\text{CO}_2$  и воды. Или, в обратную сторону, окисление молекулы глюкозы



Нужно 6 CO<sub>2</sub> плюс 6 воды, одна молекула глюкозы плюс выделяется кислород. Вот фотосинтез. Или назад. кислород с глюкозой дают CO<sub>2</sub> и воду. Уравниваем коэффициенты по числу молекул, а если подсчитаете атомов слева и справа - одинаково. Они перегруппировались от того, что одни связи разорвались, другие – образовались, а сколько энергии выделилось, сколько запаслось - термодинамика должна сказать. Но химическая реакция — вот она.

### Химический потенциал

Как понимать химический потенциал? Еще раз: связь с Авогадро, одна грамм-молекула - количество граммов вещества, численно равное его молекулярному весу, вы помните, а молекулярный вес одной атомной единицы, одного атома водорода а<sub>H</sub> - 1,67\*10<sup>-24</sup> грамма. Число Авогадро - из этого равенства единица делить на число вес атома. Это будет 6\*10<sup>23</sup>. Понятие химического потенциала можно представить следующим образом: вот давление какое-то, вклад в химическую реакцию, изменение общего потенциала G. Дверь в метро открывается туда-сюда. Представьте игру. С одной стороны синие, их четыре, с другой - зеленые, их два. Четыре - условно. Каждый может независимо толкать дверь, не мешая друг другу, это принципиально, это идеальный газ. Не мешают друг другу, с одинаковой силой толкают двери. Перетолкнул синие потому, что у них частота ударов больше. Во сколько раз вклад их в движение двери - это а ля химический потенциал. Давление сюда больше, чем отсюда, не в два раза. Вклад определяет логарифм числа частиц и молекул - логарифм отношения (6.22).

$$\mu_1 = \mu_{01} + RT \ln c_1, \text{ или } \mu_1 = \mu_{01} + RT \ln n_c, n_c = NA_c \quad (6.22)$$

Если взять разность химических потенциалов  $\mu_0 \ln 4 - \mu_0 \ln 2$ .  $\lg 4 - \lg 2$  — это - логарифм двух (ну, помните,  $\ln 4/2 = \ln 2$  это 0,3, не помню, в логарифм раз будет меньше, не в два раза, а в  $\lg 2$ . Это - очень серьезный результат, потому что дает количественную возможность работать.

## Константа равновесия

При перегруппировке атомов одни связи разрываются, другие - образуются, это все - исходный момент для рассмотрения механизма реакции с точки зрения роли активированного комплекса. Мы к этому вернемся, когда будем о ферментативном катализе говорить. Напомню основы кинетики, константы равновесия, потом посмотрим, какое это имеет отношение к трансформации энергии, скажем, в случае гидролиза АТФ. Это - типичный пример. Великий Аррениус предположил, что реакция может идти в прямом и в обратном направлении, я взял простой пример - превращение мономолекулярной реакции.  $C_1$  переходит в  $C_2$ . Чтобы произошла реакция, нужно преодолеть энергетический барьер, то есть, иметь какую-то избыточную кинетическую энергию. Известно, что молекулы обладают распределением Максвелла по скоростям, по кинетической энергии и только, горячие молекулы, имеющие достаточную энергию для преодоления барьера, могут реагировать. Но если вы сравните кинетическую энергию молекул даже горячих с энергией связей, которые надо разорвать, чтобы там произошла перегруппировка атомов, то она намного меньше и этой энергии как таковой (не надо думать столкнулись так сильно, что распалось что-то такое), просто столкнулись достаточно сильно, чтобы преодолеть отталкивание между электронными оболочками, а дальше уложится в продуктивную конформацию. В активный активированный комплекс, или активный центр фермента с субстратом, мы преодолеваем энергетический барьер в прямом или обратном направлении. В равновесии, это постулат химический, который не следует ни из какой термодинамики, подтверждается опытом, в частности, с мечеными изотопами, скорости прямой и обратной реакции равны. Химическое равновесие - обратимая реакция, скорости равны. Например, в равновесии идет перенос электрона от восстановленного переносчика к окисленному. Если реакция - на изолированных, они обмениваются электронами наступает равновесие. Вы титруете редокс-потенциал, рН титруете - то же самое фактически. Точка равновесия каждый раз - когда скорости прямой и обратной реакций уравновешены. Это - детальное равновесие, оно наступает, когда есть равенство скоростей и константа равновесия. Константа равновесия равняется отношению равновесных концентраций. Равновесные концентрации здесь обозначены черточкой (6.23).

$$K = \frac{c_2}{c_1} = \frac{\overrightarrow{k}}{\overleftarrow{k}} \quad (6.23)$$

И это отношение, константа, обратно пропорционально константам прямой и обратной реакции. Это — первое.

Второе - от чего зависит константа? От частоты столкновений, частоты актов, приводящих к реакции? Но частота столкновений – одно, к реакции приводят только те, которые обладают избыточной кинетической энергией для преодоления барьера. Это значит, что константа в случае прямой реакции – частота  $k_0$  (тут аккуратно надо, разные интерпретации): частота столкновений, атомных колебаний в комплексе. Ее размерность –  $1/c^{-1}$ . Но это - все они, а приводит к реакции часть, которая может преодолеть барьер энергетический,  $e^{-\Delta E/KT}$  (6.24)

$$\vec{k} = k_0 e^{-\frac{\Delta \vec{E}}{kT}} \quad (6.24)$$

Множитель с минусом уменьшает  $k_0$ . Экспонента с отрицательным показателем уменьшает  $k_0$ . Чем больше  $\Delta E$ , энергия активации, которую надо преодолеть, тем меньше доля молекул, обладающих такой энергией в распределении Максвелла по скоростям и энергиям. С другой стороны, если мы хотим увеличить их энергию, мы увеличиваем температуру, тогда доля эта возрастет. Это видно отсюда: показатель  $k$  - константа Больцмана, он - не константа скорости. Чем выше температура, тем этот множитель будет больше. Это - отрицательный показатель, чем он в целом больше, тем он сильнее уменьшает  $k_0$ , но он уменьшается если мы вот здесь увеличим знаменатель. Не так сильно он портит нам жизнь, когда увеличивается температура, доля молекул увеличивается. Обратная реакция - то же самое, только там энергия активации другая (6.25):

$$\vec{k} = k_0 e^{-\frac{\Delta \overleftarrow{E}}{kT}} \quad (6.25)$$

$E$  со стрелкой вправо - энергия активации для прямой реакции  $E$  со стрелкой влево - для обратной. Гвоздь программы: константа равновесия, формально мы ее определили как отношение равновесной концентрации к отношению прямой и обратной констант реакции, равняется экспоненте в степени разность энергии активации (6.26).

$$K = \frac{\vec{k}}{\overleftarrow{k}} = e^{\frac{-(\Delta \overleftarrow{E} - \Delta \vec{E})}{RT}} \quad (6.26)$$

## Разница внутренних энергий

Разность энергии активации - минус дельта Е обратное минус дельта Е прямое это тепловой эффект реакции. Момент важный - разница внутренних энергий. Внутренняя энергия молекулы — это энергия всех кулоновских взаимодействий в молекуле. Если не квантовая механика, в основе лежат кулоновские взаимодействия. Это - взаимодействие электронов с ядрами, электронов между собой и ядер между собой по всей молекуле. Подсчитывается квантовая химия, все можно подсчитать, но вот это - тепловой эффект реакции.

Разница внутренних энергий: в химии есть закон, что скорость химической реакции пропорциональна тепловому эффекту реакции, разнице между начальными и конечными продуктами. Это правильно. Берется вот откуда: каждая из молекул должна преодолеть барьер для того, чтобы произошла реакция, она это делает, если обладает исходной энергией, но эта величина больше, когда у нас больше разность. Разность больше – когда обратная реакция затруднена. Чем больше энергия активации обратной реакции, тем труднее вернуться назад. Число актов, которые возвращают нас назад, будет меньше, общая скорость наработки вещества в результате повторения актов реакции будет больше. Отсюда берется эмпирическое правило. Это – приближенный закон.

## Гидролиз молекулы АТФ

Молекула АТФ с этой точки зрения. Вот диаграмма потенциальной энергии двухатомной молекулы. АТФ это – АДФ и фосфатный остаток очень образно. Когда они удалены друг от друга далеко, их энергия равняется нулю. Они начинают сближаться, притягиваться друг к другу, их энергия взаимодействия - со знаком минус (буду более подробно говорить, когда будем устойчивость глобулярных белков рассматривать). Такая энергия уходит, по абсолютной величине увеличивается, в целом - уменьшается, но, когда они слишком близко подходят, начинается отталкивание электронных оболочек.



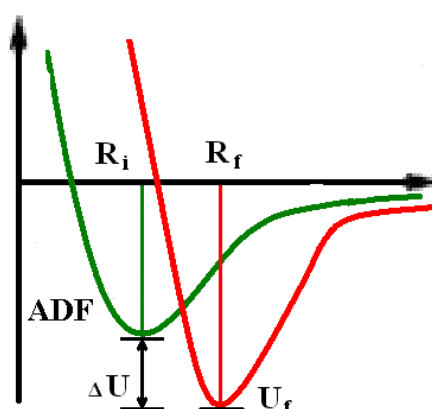


Рисунок 6.2. Диаграмма потенциальной энергии двухатомной молекулы.

Электронные оболочки - нейтральные, у них спины насыщенные, нет никаких возможностей сделать спаренные спины, и поэтому они начинают отталкиваться друг от друга. Очень грубо: если энергии молекулы кинетической достаточно, чтобы преодолеть это отталкивание, то образуется комплекс. Но эта энергия сильная, это вот так уменьшается, а это очень круто идет отталкивание, в результате на каком-то расстоянии энергия притяжения отталкивания уравнивается, это равновесное состояние. Вершина зеленой параболы - электронное состояние, энергия электронного состояния всей молекулы. Я говорил о кулоновских взаимодействиях, но, кроме того, молекула образовалась, стабильная, фосфат подошел к АДФ, прицепился к ней, там кислороды есть, фосфатная группа отрицательно заряжена, они отталкиваются, она напряженная, как пружина, надо ее гидролизовать, чтоб высвободилась энергия, которую мы будем использовать. Кроме того, ядра (которые с основ молекулы) колеблются, энергия колебания - тем больше, чем больше размах колебаний. Получается, вот это точка равновесная  $R_i$  - начальное состояние. АТФ любой молекулы - стабильная, но в пределах стабильного состояния ядра колеблются. Чем они дальше отступают, тем энергия их больше и это - парабола. Это как меняется кинетическая энергия ядер. Поскольку ядра - достаточно маленькие, она тоже квантуется, колебательные подуровни - такие. Так же как у электронов уровни электронной энергии, так и у ядер. Но это значит - молекула АТФ.

Реакция происходит потому, что молекула АТФ гидролизуется, отрывается связь, фосфат сюда и получается молекула АДФ, фосфат, еще вода должна быть, чтоб фосфорная кислота появилась. Формально это - другая структура при том же количестве атомов. Произошла перегруппировка (я про АТФазу расскажу, какие там силы двигаются, более подробно) и

установилась новая структура. На диаграмме новая структура соответствует новому равновесному положению всей конфигурации. Произошло смещение по ядерной координате, это – изменение структуры. Эффект реакции –  $\Delta U$ . Разница между энергией начального и конечного состояния АТФ и АДФ + фосфат. Из чего она получается, мы в калориметре можем измерить. Примерно 7 килокалорий на моль, примерно, 0,3 электрон-вольта на одну молекулу. Величина кванта света ультрафиолет это 2-3 электрон-вольта. Величина видимого света – 1,2, 1,4 электрон-вольта. Перепад редокс-потенциалов по цепи переносчиков –100-200 милливольт, это 0,1-0,2 электрон-вольта на молекулу. Энергия тепловых колебаний - просто  $KT$ .  $K$  – константа Больцмана умножить на температуру. При 25 градусах, обычная температура - примерно, 0,5-0,6 килокалорий на моль. Это – примерно 0,02 электрон-вольта. меньше, чем 0,3 электрон-вольта на порядок реакции. Это все достаточно стабильно. С другой стороны, перепады между редокс-потенциалами 1,2 килокалории на моль — это, примерно, 0,01-0,02 электрон-вольта. Одна килокалория на 0,4 электрон-вольта, 0,04-0,08 – это – порядка  $KT$ . Вот это – важный момент. Оказывается, что перепада потенциала примерно побольше, чем энергия тепловых колебаний, но очень ненамного больше. Это значит, что перепад потенциала идет в условиях, близких к равновесным. Хочу напомнить, что в биохимии часто говорили, что близость к равновесному состоянию – это известно в термодинамике, - повышает коэффициент полезного действия всей системы. Это биология и обеспечивает. Близость к равновесному состоянию означает, что у нас - примерно одинаковые потенциалы химические. Итак, в случае молекул АТФ мы получили следующее: гидролиз АТФ, макроэргическая связь, АДФ-фосфат, есть обратимые реакции, изменение свободной энергии, равное изменению потенциала Гиббса, потому что объем не меняется, это - разность химических потенциалов (6.27).

$$\Delta F_{p,v} \sim \Delta \mu_0 \sim RT \ln K(t) \quad (6.27)$$

Мы знаем,  $\Delta F$ ,  $\Delta G$  при постоянной температуре, давлении и объеме равняется разности химических потенциалов. Или это есть изменение  $\Delta U$ , которая определяется логарифмом константы. Вот еще раз посмотрите (6.28).

$$K = \frac{\vec{k}}{\overleftarrow{k}} = e^{\frac{-(\Delta \overleftarrow{E} - \Delta \overrightarrow{E})}{RT}} \quad (6.28)$$

Если мы здесь возьмем  $K = e^{-lgk}$ , то это будет как раз  $e^{-\Delta U/RT}$ . То есть константа равновесия, равная и отношению равновесных концентраций АДФ-фосфат к АТФ, равная обратному отношению прямой к обратной реакции. Равняется  $K = e^{-\Delta U/RT}$ .  $\Delta U$  – это величина макроэрго, энергия, которая освобождается при гидролизе АТФ.

### Изменение внутренней энергии $\Delta U$

Возьмете логарифм – получите  $\Delta U$ . Считается, это – то, что происходит в один акт и считается одним из самых существенных результатов классической термодинамики, физхимии. Потому что  $\Delta U$  – разница между энергиями взаимодействия в этой молекуле и в этих молекулах. С помощью квантовой химии тут пока это не получается по другим причинам, но в принципе, мы можем это подсчитать квантово-химически. Применить уравнение Шредингера там, что хотите и должны бы получить это в пределах молекулы, но термодинамика говорит: найдите константы скоростей, равновесия с точностью  $KT$  или  $RT$  и логарифм этой константы даст то изменение  $\Delta U$ , которое должно соответствовать изменению внутренней энергии, то бишь, изменению энергии взаимодействия внутри молекулы. Получается, вам не нужно знать в пределах одной молекулы взаимодействие, а только по отношению к концентрации. Считается один из самых великих результатов классической термодинамики. Потому что вот эта вот кривая изменения энергии активации – не усредненная, она для каждой молекулы (рис. 6.2).

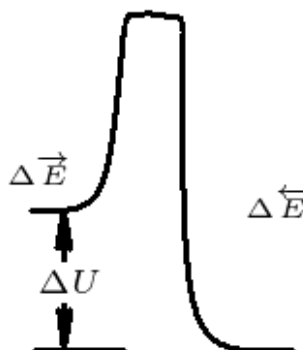


Рисунок 6.3. Кривая изменения энергии активации

Либо она может преодолеть, либо не может. В этом гвоздь программы. Вот почему здесь соединяется макроподход, стохастика вроде распределения Максвелла, все как вы можете про каждую молекулу говорить, а мы не про каждую. Мы просто долю молекул, которые могут это сделать, определяем и смотрим, от чего это зависит. Это зависит от макропоказателей.

Последнее.  $RT \ln K$  констант прямой к обратной реакции - логарифм константы равновесия.  $\Delta U$  (6.29).

$$RT \ln \frac{\vec{k}}{k} = RT \ln K \quad (6.29)$$

$$RT \ln e^{-\frac{\Delta U}{KT}}$$

$$\Delta G = \Delta U - TS.$$

По идее, такое рассмотрение показывает изменение  $\Delta U$ . Но при этом еще происходит изменение энтропии. В одном акте реакции его трудно подсчитать. Это – отдельный разговор, но это – уже молекулярной биофизика, но пока я говорю, что здесь есть потери энергии с перегруппировкой связанные. Вы двигаете мебель, количество молекул, элементов мебели у вас в комнате одно и то же, вы сделали перестановку, затратили энергию какую-то. Установили, у вас изменилась энтропия. Это изменилось, а сколько вы энергии затратили и что выиграли в данном случае выигрыш в виде удовольствия от новой расстановки мебели – это уже, как говорить, сидит в  $\Delta U$ . А  $\Delta S$  – потери: двигались, скребли по полу.

## Изменение энергии Гиббса $\Delta G$

Возьмем самый простой случай. Коэффициент стехиометрический – равный единице, все вещества. Кстати, когда смотрите на карту клеточного метаболизма, как ее надо понимать? Скажем, идет стрелка. Отсюда переходим сюда. Мы просто загружаем какую-то порцию и смотрим, сколько пришлось по каким законам по направлению. То есть там направление, а мы пытаемся количественно это оценить.

За счет протекания реакций, в одной акте произошло изменение термодинамического потенциала. Оно равняется (в данном случае все  $\eta_i=1$ ) разности химических потенциалов (6.30).

$$\Delta G = \sum \nu_i \mu_i = -\mu_1 + \mu_2 = -\delta A'_{max} \quad (6.30)$$

$-\mu_1$  убывают начальные продукты,  $+\mu_2$  - конечные образуются. Это связано с работой химической реакции. Давайте подсчитаем (6.31 – 6.32)

$$\mu_1 = \mu_{01} + RT \ln c_1 \quad (6.31)$$

$$\mu_2 = \mu_{02} + RT \ln c_2 \quad (6.32)$$

В начале в растворе сидят -  $C_{10}$  и  $C_{20}$ . Начальная концентрация. Мы запускаем реакцию. Не пишем химических уравнений кинетики. Нам только потенциал нужен. Как меняется концентрация, какая кинетика – не важно. В начале была разность потенциалов  $\Delta G$ , (6.33)

$$\Delta G = (\mu_{02} - \mu_{01}) + RT \lg(c_{20}/c_{10}) \quad (6.33)$$

это разность  $\mu$  нулевых умножить на  $RT \lg$  отношения начальных концентраций. Вот вначале приготовили систему, как водопад.  $\Delta G$  - разность высоты водопада. Когда пойдет реакция, вода по водопаду какой-то глубины вытекает, понижается концентрация воды, грубо говоря, количество воды понижается, потенциал ее уменьшается. Так идет химическая реакция. Вода сама назад не идет, химическая реакция может назад забрасываться. Теперь (6.34)

$$\Delta G = \Delta G_0 + RT \lg C_2/C_0 \quad (6.34)$$

Это - сколько мы можем получить работы за счет того, что будет уменьшаться высота водопада и мы придем к равновесию. Конец реакции - равновесие. Когда скорости прямой равняются скорости обратной. Это значит, что в равновесии (6.35)

$$c_2 = \bar{c}_2 \quad c_1 = \bar{c}_1 \quad \Delta G = 0$$

$C_2$  с черточкой,  $C_1$  с черточкой. А разница  $\Delta G$  если, она была  $\mu_{02}-\mu_{01}$ , будет равна нулю. У нас была разница  $\Delta G$  начальных,  $\Delta G_0$ , разность  $\mu$  нулевых, постоянные химического

потенциала, а это - начальные концентрации. В равновесии  $\Delta G=0$  по определению.  $\Delta G_0$  равно разности постоянных химических потенциалов. Они равняются  $-RT \lg$  отношения концентраций, или  $RT \lg$  константы равновесия. Классика физической химии. Теперь (6.36)

$$\Delta G = -RT \ln \frac{\overline{c_2}}{\overline{c_1}} = -RT \ln K(t) \quad (6.36)$$

мы можем, определив экспериментально, константы равновесия, найти  $\Delta G_0$ -нулевые. Во всех химических справочниках есть изменение свободной энергии или  $\Delta G$  у разных реакций. Они там сидят для того, чтобы можно было смотреть, можно ли сопрягать эти реакции.

### Сопряжение химических реакций

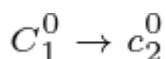
Давайте посмотрим: константа равновесия связана с  $\Delta G_0$ .

$$K(T) \rightarrow \Delta G_0$$

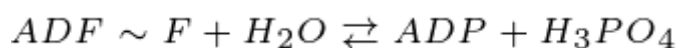
Представим себе, что  $\Delta G_0 < 0$ . Константа равновесия  $K(t) > 1$  – больше единицы. Реакция пошла от  $C_1$  к  $C_2$ . Убыль было начальных продуктов, появились продукты  $C_2$ .

$$\overline{c_2} > \overline{c_1}$$

Это значит, что убыль химического потенциала в начальных продуктах произошла и образовались конечные продукты.  $C_1$  перешло по направлению  $C_2$ .



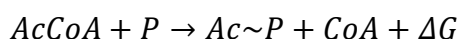
Вот направление реакций. Это означает, что константа прямой реакции больше, чем константа обратной. Если  $\Delta G_0 > 0$ , тогда константа равновесия  $K(t) < 1$ . Реакция пошла справа налево - произошло увеличение  $\Delta G_0$ . Как говорят, идет против термодинамического потенциала. Так не бывает самопроизвольно. Самопроизвольно может только уменьшаться. Это значит, что для того, чтобы произошла эта реакция, должна быть какая-то «энергодающая» реакция, которая вызывает повышение термодинамического потенциала. АДФ плюс фосфат. АДФ и фосфат – это АТФ, гидролиз



идет, получается АДФ и фосфорная кислота.  $\Delta G_0$  - минус 7 килокалорий. Это -  $\Delta G_0$ . Во всех справочниках даются величины  $\Delta G_0$ . Идет убыль  $\Delta G_0$ , понижается энергия АТФ, мы с вами видели на диаграмме, образуется АДФ с меньшей энергией. Меньшая энергия – в том

смысле, что она - по абсолютной величине больше, они крепче держат друг друга за руки, а АТФ как пружинки отталкиваются. Стоит порвать какую-то защелочку, вылетает энергия. Как вылетает, куда используем, мы пока об этом не говорили.

Пример сопряжения: Ацилкоэнзим А плюс фосфат. Получается ацилфосфат макроэргическая связь. Идет увеличение термодинамического потенциала. За счет того, что если мы будем сопрягать энергию гидролиза АТФ, с образованием макроэргический фосфат, это можно сопрягать.



### Первое замечание

Сопрягаем на бумаге, в хорошем смысле, но на бумаге. Сколько мы в принципе можем освободить энергии при гидролизе АТФ и А? Константа. Мы определили константу равновесия, значит, знаем судьбу. Если каким-то образом к ней прицепим вот этот ацил с фосфатом, она может передать энергию, но как - вопрос другой. Обратите внимание на следующее: эти работы все проводились когда начиналась физхимия, еще драматические события, целые трагедии были. Эти сопряжения такое оно проводилось для реакции в газовых фазах. А в газовой фазе сопрягались эндотермические и экзотермические реакции, там сопряжение – естественно, через внутреннюю энергию, потому что можно уподобить в газовой фазе разряженные молекулы работает происходит реакция экзотермическая, выделяется тепло, начинается увеличение кинетической энергии всех окружающих, в том числе участников эндотермической реакции, а она идет с поглощением тепла. Там сопряжение - перекачка энергии от одной реакции к другой. Очень естественно через внутреннюю энергию, будем считать, что это – идеальный газ, который представляет собой кинетическую энергию, во всех остальных случаях это можно написать на бумаге, найти константу равновесия, ну как себе представить что? Произошел гидролиз АТФ, выделилась энергия, ушла в термостат, запаслась там, держим, а потом даем ее куда-то там ацилу – не работает. Все рассеется в тепло за несколько межмолекулярных движений, нужно какое-то устройство.

### Второе замечание



В биохимических справочниках  $\Delta G$  нулевые, которые здесь рассматриваются, даются как значение  $\Delta G$  нулевых, тогда, когда достигнуто равновесие. В экспериментальной биологии мы часто титруем редокс-потенциалы в живой системе. Оказывается, что эти потенциалы в реальных условиях близки к  $\Delta G$  нулевым, которые получает физхимия за счет равновесного титрования. Титрование делается как: берется буфер, определенный редокс-потенциал, берется вещество, берется концентрация и смотрите, при каких концентрациях с этим буфером они достигают определенного равновесия. Потом буфер другой берется и титруется. Задается потенциал, редокс, посмотрится ответ реакции и оказывается, что точка перегиба равновесного -  $\Delta G_0$ , а точка перегиба - когда у нас знаменатель, который диффузионный член, обращается в 0, то есть достигается равновесие. Вот когда мы  $\Delta G_0$  можем определить. Как это получается - у нас перепады маленькие за счет того, что как вы помните в кинетике в стационарном состоянии скорость притока большая, если она близка к скорости оттока, постоянная, то ничего не накапливается. Как уровень воды в раковине. Если скорость притока - большая, и отток, будет большой уровень, а если они сравниваются, будет пусто в раковине. Это – равенство притока и оттока приводит к тому, что у вас не происходит изменение концентраций, но стационарная концентрация очень маленькая. Видимо, в этом – дело, подарок природа нам сделала. Если бы мы могли, сильно менялись бы реальные редокс-потенциалы в процессе работы системы, эти  $\Delta G_0$  могли не иметь никакого отношения к тому, что происходит в реальной действительности.

## Смысл и место термодинамики в биофизике

Равновесная термодинамика - то, чем мы занимались, классическая термодинамика, то, о чем мы с вами вспомнили. Это – переход из начального неравновесного состояния в конечное, равновесное. Вот у нас начальная концентрация, вот конечная. В химической реакции - вся наша философия. Разность химических потенциалов, скорость и прочее. Сам процесс перехода мы не рассматриваем в классической термодинамике. Нам важна разность начальных и конечных состояний. Энтропия как изменяется, энтропия - функция состояния вообще от пути перехода не зависит. В жизни все меняется во времени. Начальное состояние у всех одинаково и конечное, разница – изменение всех параметров со временем. Наша задача - оставаясь в рамках термодинамического рассмотрения,

посмотреть, как меняются характеристических функции, показатели, как они становятся переменными во времени. Меняется - как  $\delta A'$ , как оно связано со скоростью. Формально мы говорим: допустим, тем более в нашем случае мы не слишком отклоняется от равновесия в реальных условиях за счет подгонки скоростей. Все соотношения мы (6.37)

$$\delta A_m(t) = -\Delta G(t) = \sum_i \nu_i (\mu_{oi} + RT \ln C_i(t)) \quad (6.37)$$

допускаем между термодинамическими функциями, которые мы ввели  $\delta A_m$ ,  $\Delta G$  для равновесных условий, они сохраняются в процессе изменения. То есть, возвращаясь назад: вы кинетику смотрели, у нас со временем все менялось, в каждый момент времени сохраняются эти соотношения несмотря на то, что все они зависят от времени. Это потому, что кинетика в основе. Вот логарифм  $C$ , концентрация, он определяется во времени кинетическим уравнением. Возникает вопрос: чем мы будем заниматься? Как нам быть с энтропией, когда все меняется во времени, да еще открытая система. В изолированной системе она будет только расти. Второй закон. А в открытой системе, когда есть приток и отток, что с ней будет? Великий Шредингер написал, что такое жизнь с точки зрения физики. Он формально, правильно считает, что это, фактически, борьба, или процесс увеличения отрицательной энтропии. Спрашивается, можно ли это уподобить осаждению кристаллов, когда растет кристаллическая форма, энтропия уменьшается, то в растворе там молекулы бегали, энтропия большая была, а то они сели в кристаллическую стабильную форму, энтропия уменьшилась. У нас не так. Мы берем, скажем, глюкозу, не растем как кристалл, мы ее разлагаем, чтобы получить энергию, и, используя ее, строить свое тело из обломков глюкозы, или каких-то других кирпичиков. Вот наш путь. Формально можно говорить о том, что это - отрицательная энтропия. Или рост положительной при распаде тела, скажем. Это верно. Но механизмы сидят в рамках термодинамики в зависимости от времени всех термодинамических переменных, а с точки зрения кинетики – в кинетических уравнениях. Давно было становление курса биофизики, считалось так, что основа термодинамика. Вначале читалась термодинамика, потом кинетика. Сейчас не получается потому, что кинетические закономерности играют главенствующую роль. Термодинамика имеет свои прелести, в биологии будет приложение как связаны потоки и скорости между

собой, это оценить трансформацию энергии. В предсказания движения к стационарному состоянию, там есть свои проблемы, которые в ряде случаев еще можно решить.

## Лекция 7. Химический потенциал окислительно-восстановительной реакции

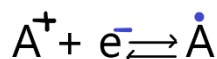
Мы научились определять, что у нас  $\Delta G$ , изменение термодинамического потенциала, равняется вот этой химической работе. Я понял так, что у вас что-то с редокс-потенциалами де-юре было, а де-факто как-бы нет. Поэтому я напомним только то, что нужно, чтобы найти вот эту величину. Вот величина нашего потенциала, он состоит из двух частей -  $\Delta G$  нулевое - разность между постоянными величинами в потенциале химическом и диффузионный член. Разность - начальная концентрация, разность отношений логарифма потенциально возможная. Как найти эту величину? Когда идет химическая реакция, мы знаем начальные концентрации, равновесные концентрации, когда равновесные концентрации, тогда  $\Delta G$  равно нулю, потому что уже все градиенты ушли, и что осталось?  $0 = G_0 + RT \cdot \log$  равновесных концентраций. То есть, по обычным законам вы измеряете равновесные концентрации и узнаете  $\Delta G_0$ . В случае гидролиза АТФ или образования АТФ мы смотрим. Когда у нас получается АТФ, у нас запасается 7 килокалорий на моль. А когда (я говорил вам в тот раз) гидролиз АТФ, он выделяет 7 килокалорий на моль. Ещё раз подчеркну вещь тривиальную, но важную. 7 килокалорий на моль (вот они) — это не энергия связи, это - разность между энергией АТФ и водой, и АДФ + фосфорная кислота. Эта разность выделяется. Как выделяется, термодинамика не говорит. Одна из самых, может быть, самый главный вид работы, энергообеспечивающий растения и животные и вообще все на земле, - перенос электрона по дыхательной, или фотосинтетической цепи, где происходит запасание, а потом образующаяся глюкоза окисляется в цикле трикарбоновых кислот. И вот идёт работа электрона.

Как найти работу, которую совершает электрон,  $\Delta G_0$  нулевое? Напомним. В физхимии было, может быть, не достаточно, как хотелось бы. Вот посмотрите, электрон. Окисленное соединение, присоединяется электрон - восстановленное. Здесь совершается работа.

Электрон Потенциалы уменьшаются, увеличиваются, и эта разность запасается. Как оценить? Давайте подойдем к вопросу просто. У нас есть химический потенциал. Начального, окисленного вещества плюс электрон. Мы пишем в эту сторону. Сразу хочу сказать, вы знаете. Можно в другую сторону писать. А точка это электрон окисляется в эту сторону в зависимости от того, как писать туда-обратно, начинается путаница. Мы будем пользоваться общепринятой системой ну чтобы вы понимали откуда все получается. Значит,  $\Delta G$  в этой реакции она здесь химическая работа. это было столько а стало больше

меньше и плюс еще потенциал который создается при переносе электронов. Скажем вот это по обе стороны мембраны, например. Они обмениваются электронами ну и получается разность потенциалов, понимаете?

Заряды, получается, уже скопились или восстановленные или окисленные и создают собственно эту разность. Общий электрохимический потенциал вещества заряженного иона допустим он будет состоять вот такая запись (7.1-7.2).



$$\Delta\mu = -\mu_+ + \mu^\bullet = (\mu_0^\bullet - \mu_0^+) + RT \ln \frac{A^\bullet}{A^+} \sim \delta A_{\text{хим}} \quad (7.1)$$

$$\Delta G \sim \delta A'_{\text{хим}} + \Delta G_{\text{electron}}$$

$$\Delta G_{el} = zF\varphi * Na_e = 9,65 \times 10^4 \text{ Кл/моль} \quad (7.2)$$

Полный потенциал (7.3):

$$\mu_k = \mu_{0k} + zF\varphi + RT \ln C_k \quad (7.3)$$

Понятно, да? Я не комментирую, потому что это – само собой. Вот, например вот ионы по обе стороны мембраны. Две лекции сделаем специально про перенос иона через мембраны вот когда ионы гуляют через мембрану, у них разный потенциал допустим, эти ионы в разных фазах. В Фазе 1 потенциал такой в фазе другой потенциал - другой. Электрохимический. Вот концентрации ионов по обе стороны — вот потенциал, который созданы каждая вкладка мембраны, а это - нулевые значения. В равновесии у нас получатся потенциалы химические равные равновесные, но, естественно, C1 и C2 не будут равны и соответственно  $\varphi_1$  и  $\varphi_2$  не будут равны. Можно найти уравнение. Разность химических можно вычесть. Вычитаем из одного другое, получаем такое уравнение: разность нулевых значений плюс разность Z, на число Фарадея разность химических потенциалов трансмембранный электрический потенциал плюс это равняется  $RT \lg$  отношения равновесных концентраций или  $RT \lg$  константы равновесия. Ну, значит, что можем дальше делать? Представьте себе, что у нас  $\mu$  нулевые одинаковы почему это может быть? Что такое  $\mu_0$ ? Оно отражает природу вещества. Представьте себе одни и те же ионы только один

заряженный, другой – незаряженный и нулевые у них одинаковы так что это можно положить равным нулю и у нас получается простая формула (7.4).

$$\Delta\varphi = \varphi_1 - \varphi_2 = E = E_0 + \frac{RT}{zF} \ln K \quad (7.4)$$

Е разность потенциалов электрическая вот он редокс-потенциал, который создается на мембране это есть  $E_0$  нулевое плюс  $RT/zF \cdot \ln$  отношения равновесных концентраций восстановленной к окисленной форме. Это  $E_0 + RT/zF$  или логарифм константы. Вернемся к этой схеме, окисленной плюс, электрон получается восстановленный. Это – константа восстановления, а это – окисление. Ну, reduction и oxidation. Значит,  $E_0$  – это есть  $RT \lg$  константы ну, с точностью до знака тут. Значит, если это в равновесии равно нулю, вот эта вот величина, так же как  $\Delta G$  равно нулю, в химической реакции, в равновесии, то  $E_0$  – это есть  $RT$  логарифм отношения концентраций. Теперь посмотрим смысл, чтоб было так понятно. В равновесии скорость восстановления окисленного соединения равняется скорости окисления восстановленного соединения (7.5).

$$k_{red}(A^+) = k_{ox}(A^\bullet) \quad (7.5)$$

Константа равновесия (7.6), равная отношению равновесных концентраций, это есть отношение константы восстановления к константе окисления.

$$K = \frac{A^\bullet}{A^+} = \frac{k_{red}}{k_{ox}} \quad (7.6)$$

Если константа равновесия больше единицы ( $K > 1$ ), понятно, что если она больше единицы, тогда  $E$  больше нуля, и константа восстановления больше, чем константа окисления ( $k_{red} > k_{ox}$ ). Это что значит? Что это – сильный окислитель. У него скорее восстановится, чем отдаст электрон, если он восстановлен. И наоборот, если константа равновесия меньше единицы ( $K < 1$ ), то константа скорости восстановления меньше, чем константа скорости окисления ( $k_{red} < k_{ox}$ ). Это значит, что такое? Он – восстановитель, ему надо отдать электрон легко. Значит, изменение  $\Delta G$  (7.7), равное редокс-потенциал – это есть  $Zf$  деленное на  $\Delta\varphi$ .

$$-\Delta G = E = zF/\Delta\varphi \quad (7.7)$$

## Электрохимическая ячейка

Классическая электрохимическая ячейка, посмотрите (рис. 7.1), опускаем у нас электрод, цинк, опускается в раствор  $ZnSO_4$  соль серной кислоты цинка, а рядом – медь в  $CuSO_4$ . Опускается электрод, состоящий из меди.

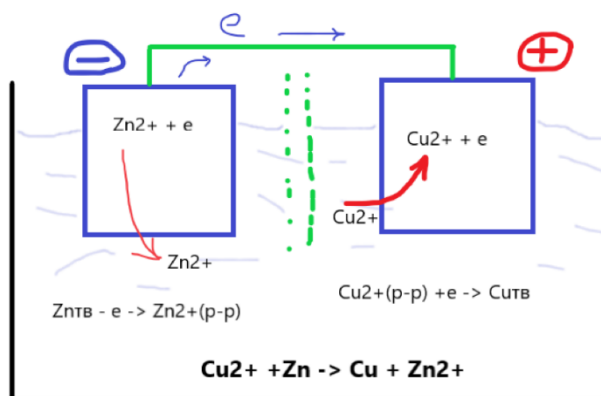


Рисунок 7.1. Гальванический элемент Cu/Zn

Мы их соединяем проволочкой и между перегородка есть. Ну, здесь как вы знаете, солевой мостик, помните, здесь в физхимии говорили, чтоб цепь была замкнута, и у нас пойдет ток. От минуса к плюсу, формально, что это значит. Откуда они взялись? Здесь электроны. В растворе цинк в ионной форме, а здесь цинк в твердой форме плюс свободные электроны. Цинк может выйти в раствор и может присоединить электрон снаружи. То же самое делает медь. Естественно, если у цинка сродство к электрону небольшое по сравнению с медью, то он электрон не будет держать сильно. Здесь будет избыток электронов, так как ионы цинка выйдут и он не реализуется до тех пор, пока мы проволочкой не соединим с другим электродом, где тоже есть избыток электронов но не такой большой поэтому здесь пойдет ток и что будет происходить ток уходит туда электроны уходят цинк ионы выделяются сюда, цинк из твердой фазы переходит в ионную фазу отдавая электроны которые уходят к меди. А медь что делает? К меди приходят электроны, получается избыток электронов, и



ионы меди осаждаются на этом электроде. Суммарная реакция такая: медь от цинка получает два электрона, цинк отдает ей электроны. И в зависимости от того, кто куда пойдет (электроны), у них разная окислительная восстановительная сила, скажем так, но это все относительно, можно с чем-то сравнивать. В физхимии есть электроды сравнения. Значит, берем цинк опускаем в раствор, то же самое, как в предыдущем случае. В другой ячейке - водород и платина. Платина - электрод, а водород газообразный. Соединяем проволокой, а между ячейками - калий хлор - солевой мостик, чтобы ионы бегали туда-сюда. Получается замкнутая цепь. Значит цинк по-прежнему переходит в раствор, а избыток электронов отдает водороду, то есть водород получается более сильный окислитель, чем цинк. Цинк из твердой фазы переходит в ионную фазу, а водород (здесь ионы водорода получают электроны) восстанавливается от электрода избыточными электронами, и получается газообразный водород, он выделяется. Теперь возьмем медь, которая обладает большим сродством к электрону, чем цинк. Здесь, наоборот, избыток электронов будет у водорода, они пойдут в ячейку с медью, и ионы меди будут восстанавливаться из раствора на твердом электроде, медь будет осаждаться, а ионы водорода будут появляться в растворе, pH будет понижаться. Вывод: у цинка константа восстановления меньше, чем константа окисления. Он готов отдать электроны, поэтому потенциал его  $E_{Zn/Zn^{2+}} = -0,763V$ . Почему минус? Если брать отношение такое ( $Zn/Zn^{2+}$ ): конечный к начальному, то что у нас получается? Он сильный восстановитель, значит он отдал все электроны и, значит, будет голенький без электронов. Под логарифмом знаменатель будет большой, а логарифм дроби, у которой знаменатель большой, то есть сама она меньше единицы, отрицательный? И пойдут здесь будет знак минус, а здесь наоборот медь вся восстановленная, в основном, потому что она сильно к себе электроны тянет от водорода и получается здесь большой числитель 16.46 логарифма отношений концентраций  $Cu/Cu^{2+}$ . Получается плюс. В нашей системе, плюс – это сильный окислитель. Минус - восстановитель. В справочных таблицах легко найти значения потенциалов для этих пар. Обратите внимание на следующее: цитохром – не так все просто, когда переходим к биологии. Посмотрите, железо в растворе  $+0,77$  - сильный окислитель, что это значит? Оно хватает электрон, трехвалентное переходит в двухвалентное. Проще ему так сделать, чем двухвалентному отдать кому-то электрон и перейти в трехвалентное, это окислитель. В цитохроме есть гемм, как в гемоглобине, есть цитохром В, цитохром С, цитохром А. Везде двух или трехвалентное железо, но обратите

внимание на потенциалы: у гемма -0,23, у цитохрома В -0,04, он не такой сильный восстановитель, а у цитохрома С вообще +0,26. Цитохром А : +0,29.

Дело в конформационном окружении. В молекулярной механике мы обсудим роль строения белковой глобулы в формировании потенциала и механизме реакции.

## Фотосинтетическая цепь реакций у растений

В обычной схеме редокс-цепи хлоропласта окисляется вода. Потенциал  $E_{H_2O}$  +0,8. Квант света позволяет осуществлять необходимые окислительно-восстановительные реакции. С перепадами -0,6, -0,4, -0,2, 0. Когда цитохром получает электрон, у него уже положительные потенциалы. То же самое в дыхании. (см. рис.7.2)

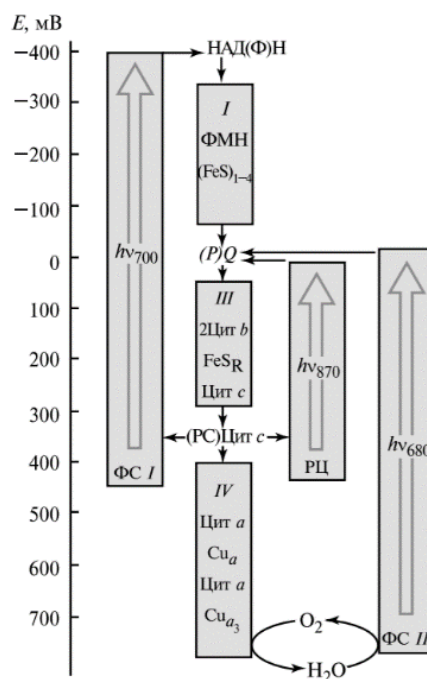


Рис. 7.2. Сопряжение различных электро-транспортных комплексов в ЭТЦ

Начинается всё с сильного восстановителя NADH (отрицательный потенциал), а заканчивается акцептором электронов – кислородом с потенциалом +0,82. Вот эта разность потенциалов и обеспечивает энергизацию мембраны. Измеряется это всё комбинированием методов титрования и спектроскопии, сопоставляются спектры и потенциалы в живых

системах, они оказываются очень близкими к тем, получаются в водных растворах выделенных органелл, митохондрий, хлоропластов и хроматофоров.

Теория Митчелла. Именно он сказал, что энергия, запасаемая мембраной, используется для синтеза АТФ. Однако расчёты показали, что для образования 1 АТФ из АДФ и фосфата нужно 7 ккал или 3 эВ, значит потенциала мембраны было недостаточно.

Митчелл ошибался?

Нет, он основывался на экспериментах, поэтому скорее всего ошибка в расчётах, так как мы пользуемся равновесными потенциалами и делаем слишком много допущений.

Например, диффузионный член мы полагаем равным 0. Клетки в растворе будут вести себя противоположно второму закону термодинамики, расти и увеличиваться в количестве, хотя система должна идти к равновесию.

Вспоминаем, что система у нас открытая, а закон работает для изолированных.

Если мы дали какую-то энергию системе, то, по второму закону, приведенная теплота — это отношение энергии к температуре, при которой она получена, и в точности равна изменению энтропии. Это в случае, если процесс получения энергии был равновесным и обратимым. В случае необратимых процессов, энтропия точнее тепловое количество энергии, которое получила система будет меньше, точнее внутренние необратимые процессы идут с выделением тепла.

Основной постулат термодинамики, применимый к открытым (то есть всем биологическим) системам: всё изменение энтропии нашей системы складывается (7.8) из двух частей - обмена с внешней средой и есть внутренних необратимых процессов.

$$dS = d_{exchange}S + d_{internal}S$$

(7.8)

Пример: приток глюкозы, кислорода и выделение CO<sub>2</sub> — это как раз обмен с внешней средой, а гликолиз, цикл Кребса и т.д. — внутренние необратимые процессы.

Главный процесс на Земле, за счёт которого мы существуем — фотосинтез. Из CO<sub>2</sub> и воды с помощью энергии света получаем продукты, энергия которых меньше, чем этого самого света. Это и называют запасанием энергии, хотя по сути свет помогает преодолеть активационный барьер, а не запасается как таковой. Наоборот, при окислении глюкозы, энергия освобождается.

Так как мы очень сильно зависим от внешней среды, также мы делаем допущение, что равновесные процессы обмена со средой идут, но очень медленно, причём не зависят друг от друга на ограниченном отрезке времени. Это позволяет учитывать правильный баланс. Теперь сопоставим эти две части, на которые мы разделили энтропию, и посмотрим, как развивается система во времени. Берём производную по времени (7.9).

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

(7.9)

Задача: предсказать эволюцию системы по изменению энтропии (7.10).

$\frac{d_i S}{dt} > 0$  (в норме), а если  $= 0$ , то система умерла или близка к смерти.

$\frac{d_e S}{dt} = 0 \Rightarrow$  система изолирована

$\frac{d_e S}{dt} > 0 \Rightarrow$  распад системы (потребляет меньше, чем отдаёт)

$\frac{d_e S}{dt} < 0 \Rightarrow$  нормальный баланс

причём, если

$\left| \frac{d_e S}{dt} \right| > \frac{d_i S}{dt} \Rightarrow$  рост

$\left| \frac{d_e S}{dt} \right| < \frac{d_i S}{dt} \Rightarrow$  распад

$\left| \frac{d_e S}{dt} \right| = \frac{d_i S}{dt} \Rightarrow$  стационарное состояние

(7.10)

Считаем, что процесс обмена с внешней средой обратим, внутренние процессы – необратимы и идут с конечными скоростями. Значит у нас две шкалы времени. Получили разделение на быстрые и медленные переменные.

Макропоказателем можно считать тепловой эффект, а с химической точки зрения – скорость реакции и электродвижущий потенциал.

Движущая сила реакции (7.11)

$$A = - \sum \mu_i v_i, \quad v_i = c_i^{\cdot} \quad (7.11)$$

$\beta = \frac{T d_i S}{dt} = A_v > 0$  (скорость продуцирования энтропии для суммы всех процессов)

$$\beta = \sum A_i v_i$$

$$\beta = A_1 v_1 + A_2 v_2 > 0 \quad (7.12)$$

окисление глюкозы  $A_2 v_2 > 0$  (сопрягающая реакция, обеспечивающая процесс)

образование фосфата  $A_1 v_1 < 0$  (сопряжённая реакция)

Получаем верхний предел скорости запасаения АТФ (7.13) и КПД (7.14)

$$|v_1| \leq \frac{A_2 v_2}{A_1} \quad (7.13)$$

$$\eta = \frac{-A_1 v_1}{A_2 v_2} \quad (7.14)$$

В таком виде можно представить многие процессы: перенос тепла, ток (закон Ома), перенос ионов под действием электрического поля. То есть  $\beta$  – это произведение потоков на движущую силу (7.15).

$$\beta = \sum J X$$

( $J$  – ток,  $X$  – движущая сила)

(7.15)

В равновесных состояниях  $v_1 = v_2$

Мы знаем, что в равновесии  $X_{eq} = 0$

$$J(X) = J(X_{eq}) + J'_{eq}(X) \Delta X \quad (7.16)$$

(разложили в ряд Тейлора до первого члена в 7.16)

$$J(X_{eq}) = 0$$

$$J'_{eq}(X) = L$$

$$\Delta X = X - X_{eq} = X$$

(отклонение от равновесия)

Из всего следует

$$J(X) = LX$$

$$(L = \frac{1}{R}) \quad (7.17)$$

Для процессов рядом с точкой равновесия соблюдаются линейные соотношения (7.18)

$$\begin{cases} J_1 = L_{11}X_1 + L_{12}X_2 \\ J_2 = L_{21}X_1 + L_{22}X_2 \end{cases} \quad (7.18)$$

Энергия получается

$$\beta = J_1X_1 + J_2X_2 > 0$$

$$J_1X_1 < 0, J_2X_2 > 0 \quad (7.20)$$

Примеры, где ещё используются эти соотношения:

### 1. Осмос

Процессы: поток воды и обмен веществом. Вода движется за счёт разности гидростатических давлений  $\Delta p$ , процесс переноса осмолитика обеспечивается разностью концентрация

$$\Delta\pi \sim (C_0 - C_i)$$

Процессы между собой связаны. Применяем формулы Онзагера (7.17 и 7.18).

Уменьшение объёма воды (выход воды)

$$J_v = L_{vp}\Delta p + L_{vD}\Delta\pi$$

$$J_D = L_{Dp}\Delta p + L_{DD}\Delta\pi \quad (7.21)$$

Нужно оценить коэффициент проницаемости  $\sigma$

Если мембрана полностью непроницаема

$$\Delta p = \pi, \sigma = 1$$

Если мембрана полупроницаема

$$\Delta p = 0, C_{oH_2O} = C_{iH_2O}, \sigma = 0$$

При

$$J_{v(eq)} = 0$$

$$L_{vp}\Delta p = -L_{vD}\Delta\pi$$

$$\Sigma = -\frac{L_{vD}}{L_{vp}} = \frac{(\Delta p)}{\Delta\pi} \quad (7.22)$$

При

$$\sigma = 0, \quad L_{PD} \sim 0$$

$J_v$  и  $J_D$  независимы.

## 2. Перенос ионов через мембрану (описан в отдельной лекции)

В заключение скажем, что фенологические соотношения работают, несмотря на то что мы не знаем точных внутренних механизмов процессов.

Отрицательная энтропия появляется как следствие сближения реагентов на расстояния химических связей.



## Лекция 8. Теорема Пригожина. Роль энтропии и информации в биологических процессах

### Введение:

Сегодня мы с вами закончим термодинамику. Вспомним физхимию в той части, которая имеет отношение к химической работе. Узнаем о некоторых явлениях, биологических процессах, которые трактуются с точки зрения термодинамики. В кинетике, как и в термодинамике, есть важный аспект построения моделей, т.н. аспект формализации наших знаний.

### Фотосинтез, ТД открытой системы:

Пример фотосинтеза. Мы преодолеваем активационный барьер за счет энергии света. Когда говорим, что при фотосинтезе запаслась энергия света в виде химических связей, продуктов фотосинтеза, это - несколько образное выражение, потому что роль света здесь — это преодоление активационного барьера. В этом смысле фотосинтез ничем не отличается от любой другой фотохимической реакции, кроме того, что энергия конечных продуктов (внутренняя энергия) больше, чем исходных. Как правило, у большинства фотохимических процессов энергия уменьшается, то есть идет выделение тепла, а здесь происходит запасание энергии  $\Delta U$ .  $\Delta U$  состоит из свободной энергии плюс,  $\Delta S$  – изменения энтропии. Здесь изменение энтропии - отрицательное, поэтому происходит уменьшение свободной энергии, то есть, той ее части, которая может производить работу. Иллюстрация ко всему выше сказанному, приведена ниже на рисунке 8.1.

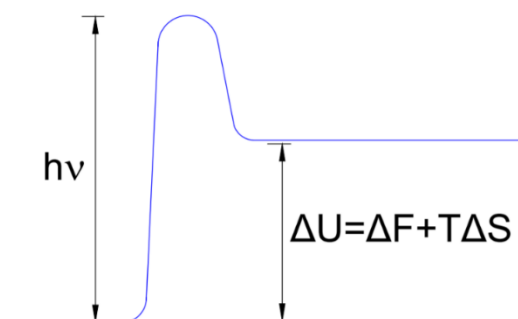


Рисунок 8.1. - энергия в процессе фотосинтеза.

Про энтропию в пределах одной молекулы и как ее учесть, будет рассказано позже - когда пойдем от молекулярной биофизики к внутреннему строению макромолекул. Пока – в общем виде. Уменьшение энтропии — это Шредингеровское «Мы питаемся отрицательной энтропией». Мы не питаемся, мы - ее делаем, за счет того, что кирпичики живого, которые либо у нас есть, либо мы их поглотили из внешней среды, доставляем в место сбора для их “соединения”. В случае химической реакции это – организация активных кластеров. Они организуются за счет энергии теплового движения и того, что встречаются друг друга случайным образом. Заморозьте - никто ни с кем не будет взаимодействовать.

Происходит реакция - запасание энергии в виде организованных продуктов с меньшей энтропией, в силу того что они более организованы, это - плата. Какая? Внутренняя энергия распадается на две части:

1) часть, которая может совершать работу, дальше нужно будет что-то с ней делать. 2) часть, которая является «платой» за образование соединения. Далее рассмотрим следующую формулу (8.1):

$$\Delta G = \Delta G_0 + RT \lg(K_p) \quad (8.1)$$

Что интересно:  $\Delta G$  – изменение вообще полной энергии Гиббса в процессе одного оборота реакции. Это – субхимическая работа, она зависит от разности химических потенциалов начальных и конечных продуктов, и мы это строго доказали. С введением понятия химического потенциала ( $\mu_0 + RT \lg$ ), изменение  $\Delta G$  и есть  $\Delta G_0$  (разница нулевых значений) плюс  $RT \lg(K_p)$ . Смысл выражения (в классической термодинамике) состоит в том, что начальная разность концентраций производит работу и равна некой константе  $\Delta G_0 + RT \lg(K_p)$ . И в зависимости от того, больше эта константа единицы или меньше, получается  $\Delta G$  уменьшается или увеличивается в процессе реакции.

Теперь обратите внимание на следующее: во всех справочниках приводятся значения  $\Delta G_0$ . Что такое  $\Delta G_0$ ? Когда в равновесии реакция кончилась, никакого исходного градиента химических потенциалов уже нет, тогда верно выражение  $0 = \Delta G_0 + RT \lg(K_p)$ . Что интересно, когда реально происходят измерения в живых системах: титрование, разность электрохимических потенциалов, мы получаем уже реальные значения порядка  $\Delta G_0$ . Это странно, потому что в реальных системах измерения проводятся не в состоянии равновесия,

там нет отношения концентраций, равное константе равновесия. Вторым членом можно пренебречь, потому что константа близка к единице, а  $\lg(1) = 0$ . Поэтому этот член – мы называем его диффузионный член, пропадает. И пропадает он из-за отсутствия равновесия. Когда идет перенос электрона, донор передает электрон акцептору. Что это что означает? Логарифм отношения концентраций донора восстановленного к акцептору получается близок к нулю. Но почему, там же разные константы?

Ответ простой: дело в том, что, когда электрон попал на акцептор, он тут же уносится. Это схоже с уровнем жидкости в раковине – если скорости притока оттока большие, реакция идет быстро, а в стационарном состоянии они почти равны. А отношение почти равных концентраций — это почти единица. Это – особое свойство нашей открытой системы.

Еще одно замечание. Образование отрицательной и положительной энтропии в результате необратимых процессов – два рода связанных, но не компенсирующих процессов. Это происходит по очень простой причине. Процессы доставки исходных веществ к месту сборки в организованные структуры, где рождается отрицательная энтропия, подчиняются теореме Пригожина. Но когда происходит сам процесс сборки, непосредственно рождения отрицательной энтропии происходит, когда компоненты соединяются друг с другом и доставляются к месту сборки на расстояния порядка длин химических связей, где происходит перекрывание электронных оболочек. Там не нужна тепловая энергия активации, если мы их сблизим. Это надо понимать, поэтому не надо нам всем быть в плену таких броских выражений: «мы питаемся отрицательной энтропией», это идет речь об изменении свободной энергии, и везде есть свои конкретные молекулярные механизмы. Давайте посмотрим на примере потока энергии в экологических системах. На начальный уровень поступает энтальпия, полное энергосодержание, которое доставляется светом. Получается свободная энергия, которая запасается на первом фототрофном уровне.

Энтальпия вычисляется по формуле (8.2):

$$\Delta H_K = (\Delta F_K \approx \Delta G_K) + T\Delta S_K \quad (8.2)$$

Далее зоопланктон начинает есть водоросли в нашей экологической системе. Часть свободной энергии переносится на следующий уровень, часть идет на рост и развитие, часть теряется на всякие побочные процессы. Оборот биомассы в океанах очень быстрый. По

данным биофизиков, занимающихся исследованиями в Арктике, время жизни единицы биомассы на суше примерно 15 лет, тогда как в океане - порядка двух или трех месяцев.

В экологии рассматриваются вопросы движения энергосодержания в единицу биомассы. Рассмотрим движущие силы этого процесса, а также рассмотрим процессы саморегуляции в экологической системе.

Считается, что если и есть саморегуляция, то отдельных частей экологических систем. Толпа людей, которая собралась, не регулируется в целом, каждый взаимодействует с ближайшими соседями. Тоталитарная регуляция появляется при появлении лидера или какого-то прессинга.

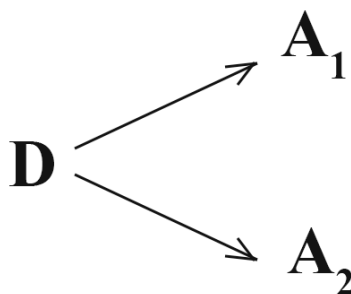


Рисунок 8.2. Пути передачи энергии донором

В рамках тех представлений, которые мы с вами говорим, рассмотрим движущую силу. На рисунке 8.2 изображен донор. Он может отдать свою энергию либо на один, либо на другой путь. Из знаний химии мы можем предположить, что скорость реакции переноса биомассы пропорциональна тепловому эффекту реакции, чем больше эффект, тем быстрее. Это связано с тем, что тепловой эффект — это разница между энергиями активации.

Здесь мы говорим о разном энергосодержании единицы биомассы. Движущая сила, если сравнить с химическими реакциями, это взаимодействие популяций (вспоминаем модель хищник-жертва). Единицы биомассы, даже если они эквивалентны в смысле энергетического содержания, в биологическом смысле совершенно необязательно будут эквивалентны. Поэтому понятие этих движущих сил — это проблема.

Кинетика и термодинамика работают так, что у нас есть движущие силы, есть скорости реакции, потоки и соотношения между ними. Если мы установили соотношение Анзагера вблизи равновесия мы получаем некоторое понимание, но если мы не можем понять, как

формализовать движущие силы, значит возникает проблема. На сегодняшний день — это пока не очень понятно.

На всех уровнях мы наблюдаем один и тот же расклад. Мы получаем энергию на втором уровне, часть пошла на третий уровень, часть - на собственный, часть – на всякие побочные реакции (8.3).

$$\Delta F_2 = \Delta F'_2 + \Delta F''_2 + \Delta F'''_2 \quad (8.3),$$

где  $\Delta F'_2$  - перенос на 3-й уровень,  $\Delta F''_2$  - рост,

$\Delta F'''_2$  - побочные процессы

В случае теоремы Пригожина мы с вами понимаем, что такое движущая сила. Сейчас рассмотрим рост организма. Вот один из вариантов (рис. 8.3) (не считайте, что разработана термодинамическая теория роста как таковая). Это попытка попробовать понять закономерности роста организма, применяя формализм, не зная механизма образования этих движущих сил с точки зрения конкретной кинетики. Экспериментальные данные показывают, как меняется тепловой поток, выделение тепла, или скорость поглощения кислорода.

Энергообмен любого организма можно найти двумя путями:

1. По тепловыделению, а это – производство положительной энтропии.
2. По характеру поглощения кислорода

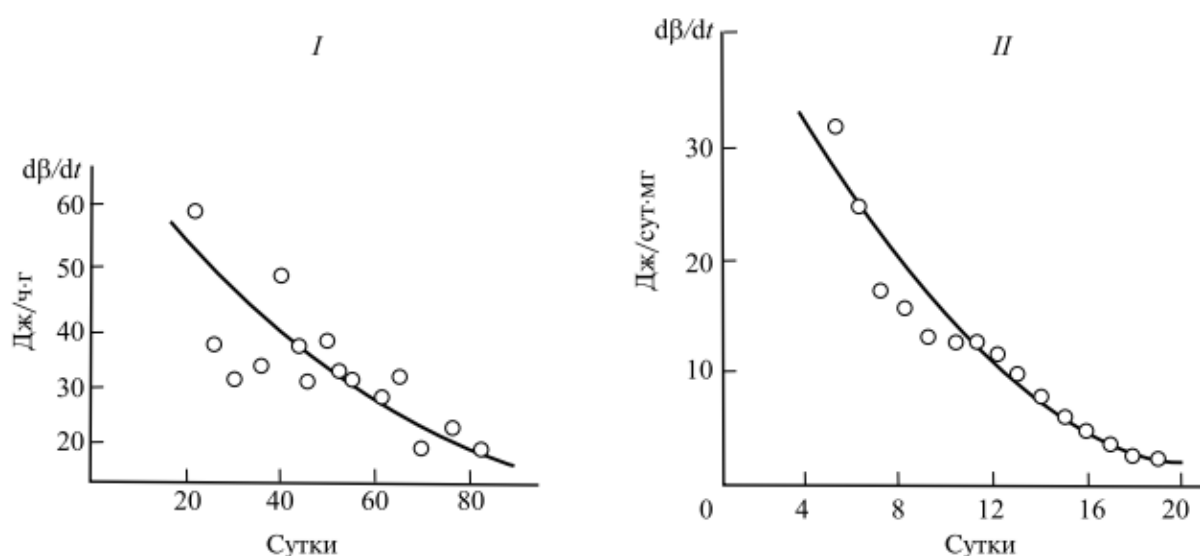


Рисунок 8.3. Скорость теплопродукции икры форели и яиц кур

Посмотрим связь скорости химической реакции с ростом организма (рис. 8.3.). Скорость выделения теплоотдачи, или скорость образования положительной энтропии, как суммарная скорость протекания всех необратимых процессов в организме, образует в результате подобную функцию (8.4). Таким образом, чем больше организм растет, тем больше метаболизм замедляется.

$$q = A - B \cdot \log P \quad (8.4)$$

Значит, скорость теплопродукции — это скорость изменения продуцирования энтропии, значит она все время замедляется. Идеи Пригожинской термодинамики, когда минимальная скорость в стационарном состоянии состоит в том, что «отдавать жалко», поэтому пусть отдаем, но немножко. Вот мы пришли к такому стационарному состоянию. Это немного наивное осмысливание свойств стационарного состояния.

Давайте посмотрим, возьмем удельную скорость роста, то есть скорость роста на единицу биомассы. Идея состоит в том, что у всех организмов есть средняя продолжительность жизни, которая неизвестно для каждого отдельного организма, но известна в рамках популяции. Тогда можно сказать, что скорость роста по мере того, как растет организм, уменьшается. Тогда чем ближе текущий момент приближается к максимальному моменту, тем меньше эта разность и тем меньше скорость (8.5).

$$J = \frac{1}{P} \frac{dP}{dt} = K_g (T_m - t) \quad (8.5)$$

Исходя из этих соображений мы будем говорить, что у нас скорость роста ( $J$ ) замедляется простому линейному закону, где  $K_g$  — это константа пропорциональности. Время не может быть как таковой движущей силой, это некая мистика. Поэтому мы введем м формально понятие «Сила», как нечто пропорциональное количеству времени до момента гибели (8.6).

$$X_g = r_g (T_m - t) \quad (8.6)$$

Теплопродукция, то, что здесь меряется, меряется либо по теплопродукции в экспериментах, либо по поглощению кислорода. Поскольку поглощение кислорода связано с окислительным фосфорилированием - основным источником энергии, то можно считать, что скорость эта пропорциональна. Тогда, применяя наши термодинамические представления, решаем, что теплопродукция по кислороду пропорциональна произведению движущих сил на скорость (8.7).

$$\dot{q} = J_g X_g = K_g r_g (T_m - t)^2 \quad (8.7)$$

Продифференцировав выражение 8.5. мы можем найти  $(T_m - t)^2$  (8.8)

$$(T_m - t)^2 = \frac{4,6}{K_g} \log \frac{P_m}{P}, \quad (8.9)$$

где  $P_m$  — это максимальный вес

4,6 появляется в формуле из-за перехода от натурального логарифма к десятичному. Отсюда можем найти, что скорость теплопродукции меняется с изменением веса следующим образом (8.10).

$$\dot{q} = 4,6 r_g \log \frac{P_m}{P} \quad (8.10)$$



Таким образом, наша теплопродукция распадается на две части (8.11):

- основной обмен ( $\dot{q}_o$ )
- теплопродукция во время роста или какой-либо деятельности ( $\dot{q}_g$ )

$$\dot{q} = \dot{q}_o + \dot{q}_g \quad (8.11)$$

Применим полученные факты к уравнению 8.4. Получается так, что величины А и В можно определить следующим образом (8.12-8.13).

$$A = \dot{q}_o + 4,6r_g \log P_m \quad (8.12)$$

$$B = 4,6r_g \quad (8.13)$$

Это хорошая вещь, чтобы понять такие эмпирические взаимоотношения, но не заменяет необходимость изучения конкретных механизмов.

Перейдем еще раз к Пригожину. В случае линейных соотношений Онзагера, скорость продуцирования энтропии, или, в данном случае, потребления кислорода, будет принимать постоянное минимальное значение. Биологический смысл этой теоремы - в том, что в стационарном состоянии мы живем с минимальными тратами, сохраняем свою энергию, энергоемкость.

## Химическая реакция

Попробуем сопоставить, насколько верно говорить, что теплопродукция и прирост энтальпии однозначно соответствуют друг другу.

Движущая сила или сродство — это изменение энергии Гиббса ( $dG$ ) на один оборот реакции ( $d\xi$ ) (8.14).

$$dG_{T,P} = \sum \mu_K dn_K = d\nu_K \mu_K d\xi \quad (8.15)$$

$dn$  - количество молей или количество молекул в долях от числа Авогадро, которые приняли участие в одном акте реакции.  $d\xi$  — это будет число активных центров эти молекул,

которое будет одинаково для всех исходных реагентов и для всех продуктов. Последнее равенство в выражении 8.15 получается путем подстановки вместо  $dn$  следующего выражения (8.16):

$$d\xi = \frac{1}{\nu_K} dn_K \quad (8.16)$$

Отсюда можно получить (8.17):

$$A = - \left( \frac{dG}{d\xi} \right)_{T,P} \quad (8.17)$$

Запишем значение  $G$  (8.18)

$$G = H - TS \quad (8.18)$$

$TS$  – энтропийный член, который работу не производит, это – «наша плата за жизнь». Полная энтальпия выражается (8.19).

$$H = U + pV \quad (8.19)$$

Возьмем производную выражения 8.17, подставив значение  $G$  из 8.18 (8.20).

$$A = - \left( \frac{dH}{d\xi} \right)_{T,P} + T \left( \frac{dS}{d\xi} \right)_{T,P} \quad (8.20)$$

Мы получили полное выражение для нашей движущей силы.

Тепловой эффект — это выделение тепла, изменение энтальпии ( $dH/d\xi$ ). Тогда получается, что при его измерении мы не учитываем вторую часть, отражающую изменение структурной энтропии ( $dS/d\xi$ ).

Таким образом, когда у нас идет реакция у нас не только выделяется энергия, энтальпия уменьшается, у нас меняется организованность наших реагентов, а это значит меняется энтропия. Этим, в ряде случаев, пренебрегать нельзя.

Рассмотрим конкретный пример. В процессе стационарного роста уменьшается скорость продуцирования энтропии, то есть тепловой эффект реакции, скорость выделения тепла или скорость поглощения кислорода. Допустим, это тепло берется при свободном окислении. Представьте себе, что в процессе онтогенеза, а тем более филогенеза, степень сопряжения свободного окисления с запасанием энергии АТФ на мембранах увеличивалась или уменьшалась, и тогда у нас тепло будет выделяться или больше, или меньше. Эти изменения мы будем наблюдать не потому, что изменилось исходное энергосодержание в глюкозе, а изменилась именно степень сопряжения, наш энтропийный член.

Теперь мы видим, что все изменение энтропии в результате наших необратимых внутренних процессов, в свою очередь, складывается из двух частей:

1. Изменения теплопродукции, теплового эффекта реакции или скорости продуцирования энтропии ( $\beta_d$ ).
2. Энтропийной части, синтеза структур ( $\beta_u$ )

В сумме, энтропийный синтез структур – это разница между энтропией, связанной с общим поглощением кислорода, и той энтропийной частью, которая связана с синтезом.

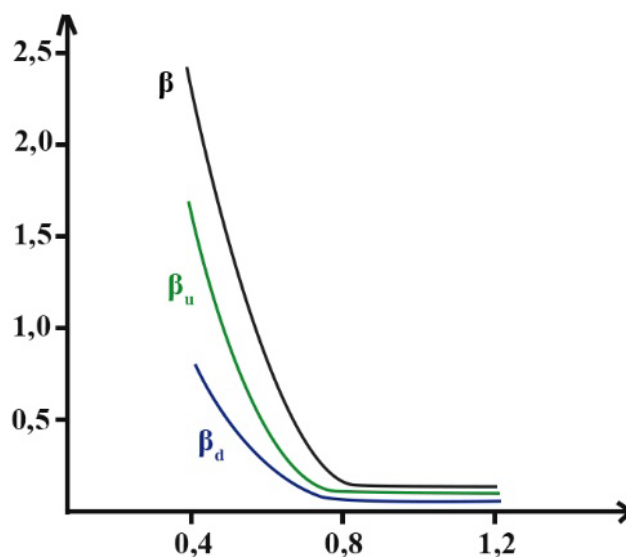


Рисунок 8.4. Кривые зависимости теплоотдачи от размера игры  
в процессе оогенеза икры шпорцевой лягушки

Рассмотрим экспериментальные данные на примере оогенеза шпорцевой лягушки (рис.8.4). Во время оогенеза ее икра увеличивается в размерах ну и вот 2 -3 раза. При измерении, поглощение кислорода и реальная теплопродукция не совпадают. Причем разница между ними образует кривую, отражающую изменение энтропийного члена. Иными словами значит, что теорема Пригожина применима в условиях, соответствующих ее формулировке. Однако, в ряде случаев мы не можем пренебрегать энтропийными членами.

## Условия применения теоремы Пригожина

Далее пойдет речь об условия применения теоремы Пригожина.

Приведем аналогию между термодинамическим процессом и процессом движения паровоза. Паровоз движется вперед и в какой-то момент совершает остановку на станции. При этом, для поддержания горения в топке требуются уголь и кислород. Выделение тепла зависит от скорости теплопродукции и разности температур между окружающей средой и, соответственно, паровозом. Также в паровозе установлен манометр, который следит за тем, чтобы не было перегрева воды. Это полная аналогия с энергообменом животного за одним исключением, когда мы едим выделяется тепло, а если мы при этом двигаемся, энергия сопрягается, идет на механическую работу и тепла выделяется меньше. Отличие же в том, что организмы теплокровных поддерживают свою температуру постоянной. Ее можно поддерживать по-разному: можно менять степень сопряжения, а можно, как птицы, регулировать теплоотдачу. Например, если наружи температура маленькая, то тепло будет скорее удаляться, и птица будет замерзать. Для предотвращения теплопотери они могут распушить оперение, «нахохлиться». В жаркую погоду они усиливают кровоснабжение покровов для лучшей теплоотдачи.

Экспериментаторы-зоологи измеряют расход энергии в покое по скорости поглощения кислорода — это основной метаболизм, а также расход энергии в активном состоянии. При понижении температуры, птица будет мерзнуть, и тогда ей нужно усилить свой метаболизм, увеличить свободное окисление и, соответственно, больше кушать и больше потреблять кислорода. По скорости потребления кислорода можно смотреть, во сколько раз можно увеличить основной метаболизм при уменьшении наружной температуры.

Если птица не сидит на месте, а совершает активные действия, тогда теплоотдача тоже будет происходить при уменьшении температуры среды, но не такая большая, потому что часть энергии метаболизма, которая пошла бы на теплоотдачу уйдет на производство работы. Разница между этими величинами будет как раз той работой, которую птица совершает.

Теперь надо оценить возможность физиологической терморегуляции в покое. Максимальное увеличение теплоотдачи произойдет при высокой температуре окружающей среды, когда снижается теплоизоляция и подтягиваются к поверхности кровеносные сосуды. Когда холодно, птицы начинают регулировать теплоотдачу через изменение кровотока.

Степень использования энергии на механическую работу, есть разница между  $h_1$  и  $h_{em}$ . Тогда коэффициент полезного действия (8.21):

$$\alpha = \frac{h_1 - h_{EM}}{h_1} \quad (8.21)$$

Птицы имеют высокий уровень метаболизма – до 6 Вт/кг, что существенно превышает соответствующее значение для млекопитающих (~ 4 Вт/кг).

Пригожинские представление о том, что процесс эволюции, если представить его термодинамически, связан с тем, что мы минимизируем энергозатраты, на самом деле связан с активностью, которая связана с теплоотдачей.

## **Термодинамическая характеристика метаболических процессов**

Посмотрим, как можно дать какую-то характеристику процессов, используя аппарат термодинамики, о котором мы говорили.

Возьмем простой биохимический цикл. Он не открыт, нет обмена с внешней средой. Допустим, все уравнения первого порядка и все реакции обратимы. В результате решения уравнений, наши переменные, у нас их будет три, от каких-то начальных значений перейдут в стационарное состояние. Допустим, мы не знаем кинетики и можем следить только за изменением наших переменных концентраций. Если переход системы происходит в один

оборот реакции, то у нас система перейдет из одного состояния с одним химическим потенциалом, в другое состояние.

Если мы были при начальном состоянии  $c_i$  и перешли в  $\bar{c}_i$ , стационарное состояние, то отклонение от стационарного состояния, которое было, уменьшилось (8.22).

$$y_i = c_i - \bar{c}_i \quad (8.23)$$

Таким образом,  $c_i$  приближается к стационарному состоянию. Это значит, что изменение химического потенциала каждого вещества дает свой вклад в общее протекание реакции.

Теперь, если мы возьмем и скажем, что отклонения от состояния стационарного небольшие, это значит  $\frac{y_i}{\bar{c}_i} \ll 1$ , если мы подставим значение  $c_i$  из ур-я 8.23, мы с вами найдем уравнение для изменения величины, которая связана с приближением к стационарному состоянию.

Движущие силы движения играю в том, что происходит изменение потенциала: был  $\mu_1$ , а при отклонении он переходит в  $\bar{\mu}_1$ , в стационарное состояние. Тогда разница этих потенциалов будет равна:

$$\mu_1 - \bar{\mu}_1 = RT \ln \frac{c_i}{\bar{c}_i} = RT \ln \left( 1 + \frac{y_i}{\bar{c}_i} \right) \quad (8.24)$$

Если отклонение небольшое, то разлагая логарифм в ряд мы получим (8.25):

$$\mu_1 - \bar{\mu}_1 = \frac{RT y_i}{\bar{c}_i} \quad (8.25)$$

Все наши уравнения в кинетической форме мы теперь можем записать с помощью термодинамических символов. У нас получается, что отклонение от стационарной точки разлагается на три члена (8.26-8.27) представляющих из себя произведения коэффициента Онзагера на разность химических потенциалов вещества  $c_1$ .

$$\dot{y}_1 = \frac{(k_1 + k'_3)c_1}{RT} (\bar{\mu}_1 - \mu_1) - \frac{k'_1 \bar{c}_2}{RT} (\bar{\mu}_2 - \mu_2) - \frac{k_3 \bar{c}_3}{RT} (\bar{\mu}_3 - \mu_3) \quad (8.26)$$

$$\dot{y}_1 = L_{11}X_1 + L_{12}X_2 + L_{13}X_3 \quad (8.27)$$

Таким образом, мы получили уравнение Онзагера. Мы видим, что отклонение нашей переменной  $c_1$  от стационарной точки разности ее потенциалов и разности потенциалов других веществ в цикле.

Легко увидеть, что если система, приближается к равновесию, т.е. равенству прямой и обратной реакции всех членов цикла, что при этом наши коэффициенты взаимности равны между собой (8.28 – 8.29).

$$k_1 \bar{c}_1 \approx k'_1 \bar{c}_2 \quad (8.28)$$

$$k_2 \bar{c}_2 \approx k'_2 \bar{c}_3 \quad (8.29)$$

$$k_3 \bar{c}_3 \approx k'_3 \bar{c}_1 \quad (8.30)$$

Таким образом мы выяснили, что можно записать кинетическое уравнение, через эквивалентные движущие силы химических потенциалов.

Рассмотрим на примере фотосинтеза. Под действием происходит перенос электрона и появляется трансмембранный электрохимический потенциал водорода по обе стороны мембраны. Под действием этого потенциала меняется состояние всех различных переносчиков. Экспериментально измеряемые изменения переменных (в данном случае – сдвиг максимумов поглощения) рассмотрим при условиях, когда у нас отсутствует сопряжение, и когда есть сопряжение процесса с синтезом АТФ. Тогда, мы увидим разные кривые, а это значит – и разные химические потенциалы в начале и в конце, совершенно независимо от тех кинетических уравнений, которые мы пока не знаем. Далее мы говорим, что в результате у нас появляется  $\Delta\mu_{H+}$ , которая соответствует работе химической реакции (8.31).

$$\Delta\mu_{H+} \sim T \frac{dS}{dt} \quad (8.31)$$



При этом, мы учитываем внешнюю среду, свет – все изменения энтропии. Это значит, вклад переменной  $A$  будет равен (8.32):

$$\Delta A = \mu_K^o - \bar{\mu}_K = \ln \frac{c_K^o}{\bar{c}_K} \quad (8.32)$$

Тогда, скорость изменения будет равна (8.33):

$$\beta = \dot{c}_K(t) \ln \frac{c_K(t)}{\bar{c}_K} \quad (8.33)$$

Общие изменения будут вычисляться по формуле (8.34):

$$Q \sim \Delta\mu_{H+} = \int_0^\infty \beta(t) dt = \int_0^\infty \dot{c}_K \ln \frac{c_K}{\bar{c}_K} dt \quad (8.34)$$

При решении интеграла получим (8.35):

$$Q \sim \Delta\mu_{H+} = -c_K^o \ln \frac{c_K^o}{\bar{c}_K} + (\bar{c}_K - c_K^o) \quad (8.35)$$

График функции достаточно простой (рис.8.5). Он говорит, что вся энергия запасается в виде  $\Delta\mu_{H+}$ . Движет этим процессом – энергия света.

Этот результат можно оценить

## Роль энтропии и информации в биологических процессах

Давайте рассмотрим, как организованность, информация и энтропия взаимосвязаны между собой.

Энтропия связана с числом микросостояний системы. Рассчитывается по формуле (8.36):

$$S = K_B \ln W, \quad (8.36)$$

где  $K_B$  – константа Больцмана,

$W$  – число микросостояний

Информация, как известно, измеряется в битах. Когда мы узнаем результат подкидывания монетки, то получаем информацию о реализации одного из двух возможных исходов – 1 бит информации. Количество информации высчитывается по формуле (8.37):

$$I = \log_2 W \quad (8.37)$$

Приведем пример. В аудитории должно быть 64 студента, но один них – прогулял занятие. Когда староста сообщил об этом в деканат, то заместитель декана получил 6 бит информации. Стоит заметить, что важно разделять объем информации и ее ценность. Можно заметить, что формулы 8.36 и 8.37 похожи между собой. Приведем их в эквивалентный вид (8.38).

$$S = 2,3 \cdot 10^{-24} I \quad (8.38)$$

Это значит следующее. Возьмем воду. Количество микросостояний воды на один моль будет равняться логарифму факториала числа Авогадро. Теперь мы мгновенно заморозили воду и получили координаты каждой из этих молекул. Полученный лед также имеет свою энтропию. Тогда информация будет вычисляться как разность между максимальной энтропией и энтропией льда.

Попробуем посчитать, сколько примерно бит информации содержится в человеческом теле. В организме человека  $10^{13}$  клеток. Нам необходимо знать, где каждая из этих клеток должна находиться. Воспользуясь формулой 8.37 подсчитаем суммарное количество информации:

$$I = \log_2(10^{13}!) \approx 4 \cdot 10^{14} \text{ бит}$$

Примем во внимание состав клеток, тогда количество информации увеличится еще на 12 порядков:

$$I \approx 10^{26}$$

При составлении организма из набора клеток и аминокислот мы использовали информацию, значит, энтропия должна уменьшиться.

Рассмотрим количество энтропии, эквивалентное этому количеству информации:

$$S = 2,3 \cdot 10^{-24} \cdot 10^{26} = 200 \text{ энтропийных единиц}$$

Это соответствует 900г глюкозы. Формально все правильно, но это – эквивалентность микросостоянию. а процесс рождения информации включает несколько стадий: нам необходимо не только сгенерировать ее, но и запасти и запомнить.

Допустим, мы играем в бильярд с четырьмя лузами. Информация о том, в какую лузу попал шар – 2 бита. Но реально, чтобы шар там удержался, ему необходимо потерять часть своей энергии – свалиться. Это значит, что информация, которую мы рассчитали, должна закрепиться. Если бы наш бильярд имел плоские лузы, мяч не задержался бы ни в этой из них и микросостояние не было бы реализовано.

Нюанс в том, что система не может запомнить каждое состояние. Для хранения мы можем, например, заморозить нашу систему.

Применение энтропии хорошо для микросостояний, а информация, которую надо запомнить, будет являться макроинформацией.

Для использования информации необходимы следующие этапы:

1. генерация информации
2. запасание
3. обработка
4. передача
5. восприятие

Только все эти этапы определяют истинную ценность информации в сопоставлении с энергетикой.

Если вы в камеру хранения на вокзале кладете чемодан под кодовый замок и, при этом, набираете любые(!) цифры. В момент набора вы родили информацию, но она ничего не стоит, если не была совершена работа по ее запоминанию.

Важность восприятия информации можно оценить, рассмотрев, как пример, международный конкурс Чайковского. В первом туре все участники его играют первый концерт, и все участники имеют одинаковые ноты. Однако они все играют по-разному. На это есть две причины: они ударяют по клавишам с разной силой и частотой, мы воспринимаем их музыку и меняем свое состояние в зависимости от возникших ощущений, это особенность нашей семантической системы.

Существует два способа запасаания информации в молекулах-носителях:

1. Принцип запоминания случайного выбора, как в случае ДНК,
2. Неслучайный отбор

Получение информации представляет собой считывание в процессе ее биосинтеза.

Существует точка зрения, которая говорит, что статистические процессы в биологии недостаточно полные, для применения теории информации. Но это, формально, лишь уход от ответа.

## Лекция 9 Мембранный транспорт в клеточных процессах

### Основные функции мембран

Мембраны выполняют исключительно большую роль в клеточных процессах, функций много.

1 Барьер: отделяет нужные вещества от ненужных, одни пропускает в клетку, другие - нет (прежде всего мы имеем в виду наружная клеточная мембрана). Транспортные процессы: осмос, диффузия, перенос по каналам, перенос с участием переносчиков, активный транспорт.

2. Проведение импульса (на мембране существует система, отвечающая за возбудимость клетки).

3. Экспонирование рецепторов (не только фоторецепторы).

4. Клеточная подвижность (связана с транспортом).

5. Преобразование энергии (мембранные системы в митохондриях и хлоропластах, внутренние мембраны).

6. Мембранные процессы:

А) Различные процессы везикулярного транспорта (образование впячиваний или экзоцитозом, мембранные везикулы отшнуровываются, движутся, сливаются);

Б) Слияния и деления клеток;

В) Межклеточные взаимодействия (например образование длинных тяжей между клетками, которые предположительно являются нанотрубками в клеточных культурах).

### План лекции

1. Прямое прохождение веществ через липидный бислой (правило Овертона).

2. Диффузия и законы Фика. Поступление веществ в мембранные везикулы, перемешиваемые слои.

3. Транспорт воды, в частности осмос. Капиллярное поднятие воды. Водный потенциал. Гидравлическая проводимость. Коэффициенты отражения.

4. Ионные равновесия и транспорт ионов.

а) равновесия в растворах, разделенных мембраной,

б) равновесие вблизи заряженной поверхности. (биологические мембраны, как правило, несут отрицательный фиксированный заряд, что накладывает свои особенности и ограничения в распределении ионов).

5. Электрохимический потенциал. Взаимодействие иона с растворителем. Профили энергии иона в мембране.

6. Ионифоры: каналы и переносчики.

## Работы Овертона

Опубликованы примерно в 1900-м году, 120 лет назад, основное в них - проницаемость клеток пропорциональна коэффициенту распределения вещества в системе октанол-вода. Октанол-вода - традиционная система, до сих пор все коэффициенты распределения определяются в ней. Согласно его опытам и современным данным, легко проникают через мембраны (липидный бислой) вещества:

1. Малые гидрофобные молекулы: кислород, углекислый газ, азот, бензол.

2. Малые полярные молекулы: вода, глицерин, спирт (этанол).

Коэффициент проницаемости для воды через мембрану -  $D_{H_2O_m} = 5 \cdot 10^{-10} \text{ см}^2/\text{с}$ . Эта величина гораздо меньше, чем проницаемость обычных небольших веществ в воде. В биологических мембранах вода проникает не только через липидный бислой, но и через аквапорины (специальные белки). Хочу акцентировать ваше внимание, что проникновение идет не только по белковым компонентом мембраны, но и через липидный бислой. Он не пропускает крупные полярные молекулы: аминокислоты, различные сахара, углеводы, нуклеотиды, АТФ, АДФ, НАДФ, ионы, которые играют важную роль в жизнедеятельности клетки (протоны, натрий, бикарбонат  $\text{HCO}_3^-$ , калий, кальций, хлор, магний). На диаграмме 9.1. показан итог деятельности Овертона.

Он показал, если мы отложим в двойных логарифмических координатах коэффициент распределения в логарифмической шкале и проницаемость, то будет перепад в несколько порядков (около шести) и по той, и по другой оси; и есть примерно линейная зависимость: чем лучше вещества растворяются в липидах (в неполярной фазе), тем свободнее проникают.

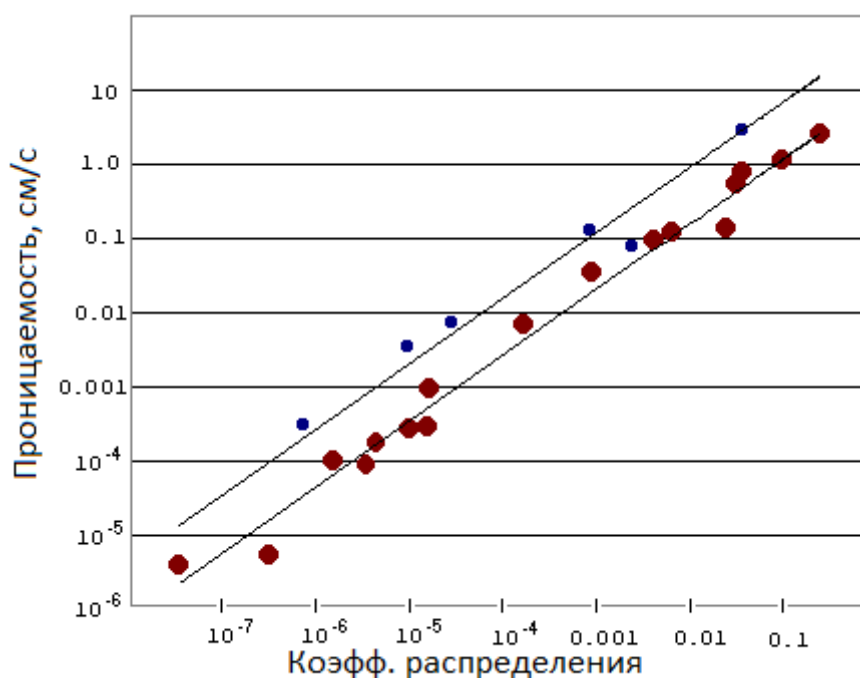


Рисунок 9.1. Проницаемость ~ коэфф. распределения в октанол/вода.

## Процессы диффузии

### Основы диффузии

Диффузия - движение, связанное с броуновским движением молекул. За счет нее вещества всегда перераспределяются из области высокой концентрации в область более низкой. Уравнение 9.1. - уравнение Стокса-Эйнштейна - одно из основных, связывает коэффициент диффузии с температурой, радиусом иона и вязкостью.

$$D = \frac{kT}{6\pi r\eta} \quad (9.1)$$

Греческая буква  $\eta$  обозначает вязкость. Вязкость воды составляет  $10^{-3}$  Па\*с. Эта формула позволяет оценить коэффициент диффузии для малых молекул, скажем, радиусом порядка 0,2 нм, или 2 ангстрема. Если мы подставим в эту формулу вязкость воды, коэффициент диффузии составит порядка  $10^{-5}$  см<sup>2</sup>/с. Это - типичные значения коэффициентов диффузии для низкомолекулярных веществ.

Для ионов вводится еще понятие подвижности иона ( $u$ ). Ионы движутся не только за счет диффузии, но и за счет действия электрического потенциала, подвижность учитывает влияние электрического поля. Размерность получается  $\text{см}^2\text{с}^{-1}\text{В}^{-1}$  ( $\text{м}^2\text{с}^{-1}\text{В}^{-1}$ ). Численно подвижность равна скорости движения ионов ( $\text{см/с}$ ) при напряженности поля в  $1 \text{ В/см}$ .  
Подвижность некоторых ионов представлена ниже (9.2.-9.4.), для примера:

$$u_{\text{K}} = 7,6 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2\text{с}^{-1}\text{В}^{-1}, \quad (9.2.)$$

$$u_{\text{Na}} = 5,2 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2\text{с}^{-1}\text{В}^{-1}, \quad (9.3.)$$

$$u_{\text{H}} = 36,2 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2\text{с}^{-1}\text{В}^{-1} \quad (9.4.)$$

Согласно уравнению Стокса-Эйнштейна, зависимость от радиуса должна выражаться спадающей гиперболой, это показано на рисунке 9.2.

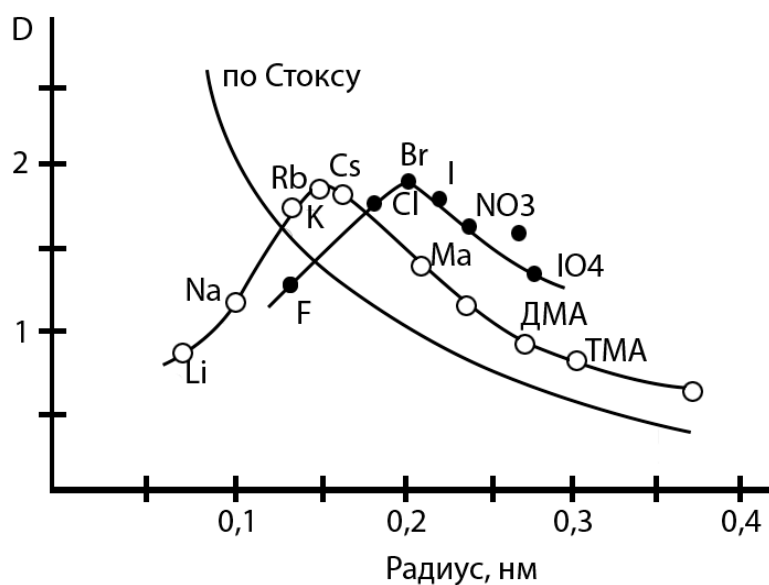


Рисунок 9.2. Зависимость размера частиц от коэффициента диффузии.

Кривая, около которой написано «По Стоксу», должна быть такой. Ионы щелочных металлов и анионы группы галогенов: хлор, бром, фтор отклоняются от этой зависимости. Для крупных ионов и производных: диметиламмония, 3-метиламмония или метиламмония зависимость соблюдается, в ряду от лития до цезия она - прямо противоположная: радиус иона растет и подвижность растет, у малого иона - наоборот, подвижность низкая. Данный случай - аномальное поведение этих ионов. Это тоже нужно представлять. Обычно оно



объясняется тем, что вокруг малых ионов образуется более объемная гидратная шуба, речь идет о кристаллографическом радиусе, радиус гидратированного иона будет противоположным. Есть более сложное объяснение, но пока достаточно такого. Диаграмма 9.2. также показывает, что различие в подвижностях этих ионов может вызывать образование так называемого диффузионного потенциала (9.5).

$$\Delta\varphi = \frac{u_+ - u_-}{u_+ + u_-} \frac{RT}{F} \ln \frac{c_2}{c_1}, \quad (9.5)$$

Диффузионный потенциал возникает на границе раздела двух растворов, например в электроде сравнения. В нем внутренний баллончик заполняется высоким содержанием солей и есть внешний раствор. Для заполнения электродов сравнения практически всегда используются ионы калия и хлора. По формуле, описывающей диффузионный потенциал, его величина будет зависеть от подвижности ионов: и катионов, и анионов. Если подвижности совпадают, диффузионного потенциала не будет, он нам и не нужен. Поэтому, используем KCl. Если вы посмотрите на диаграмму 9.2., где калий и хлор находятся, увидите, что подвижности примерно одинаковые. Если сравним подвижность, скажем, натрия и хлора, увидим, что подвижность натрия гораздо ниже, чем у хлора. Это будет приводить к появлению постороннего диффузионного потенциала, который обычно мешает при измерениях.

## Основные законы диффузии

Их два. Это – так называемые законы Фика. Первый закон Фика ниже под номером 9.6.

$$j = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (9.6)$$

В данном случае мы рассматриваем одномерную диффузию по одной координате  $x$ .  $dc/dx$  - градиент концентрации, поток пропорционален градиенту концентрации. Знак минус – потому, что движение ионов всегда происходит в направлении убывания концентрации.

Первый закон - довольно очевидный, есть очень много линейных соотношений, когда поток линейно связан с действующей силой. То есть  $j$  - поток,  $dc/dx$  - действующая сила.

Давайте рассмотрим элемент объема, через который идет поток на входе и на выходе (рисунок 9.3.).

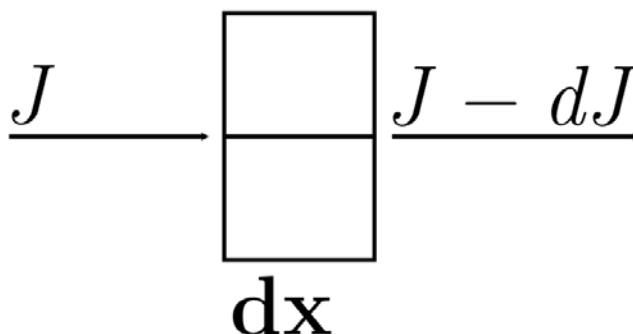


Рисунок 9.3. 1-й закон Фика.

На входе мы имеем поток  $J$ . Часть вещества остается в объеме, а на выходе поток будет чуть меньше:  $J - dJ$ , толщина этого слоя –  $dx$ . В этой системе можно выразить накопление или изменение вещества в этом объеме двумя способами: либо как изменения концентрации за единицу времени  $dc/dt$ , либо как изменение потока за единицу времени. Это - так называемое соотношение непрерывности (9.7.), означает сохранение массы (вещество не пропадает, всегда должно соблюдаться сохранение по общей массе потоков).

$$\frac{\partial C}{\partial t} = - \frac{\partial J}{\partial x} \quad (9.7)$$

Это соотношение является связующим между первым и вторым законом Фика. Эта формула говорит об изменениях концентрации. Если мы теперь продифференцируем выражение 9.6, то есть подставим в формулу 9.7. первый закон, то придем ко второму закону Фика. (выражение 9.8.)

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (9.8)$$

Уже без минусов,  $dc/dt$  - изменение концентрации во времени пропорционально второй производной концентрации по координате. Может показаться, что вторая производная концентрации по координате слишком сложна для понимания, но надо вспомнить, что такое диффузионный профиль. Предположим, мы имеем узкий лоток, в центр наносим какое-то вещество. Сначала по центру лотка будет очень высокая концентрация, со временем вещество диффундирует в обе стороны, диффузионный профиль будет описываться куполообразной зависимостью. Кривизна купола связана со второй производной. Если на вершине купола знак второй производной - отрицательный, кривая выпуклая, то в этой области концентрация со временем будет уменьшаться. На краях кривой распределения знак производной - положительный и концентрация будет возрастать. Еще следствие из второго закона: давайте рассмотрим случай стационарной диффузии.

## Стационарная диффузия

Она значит, что концентрация в каждой точке постоянна и не меняется во времени,  $dc/dt=0$ . Если оно равно 0, вторая производная равна нулю, отсюда первая производная  $dc/dx$  – константа, это значит, что профиль концентрации линеен. Кривое распределение вещества в лотке (мы нанесли по центру какое-то вещество и смотрим, как его профиль будет меняться): отклонение молекул вещества от центрального положения, которое мы можем принять за 0 описывается формулой 9.9.

$$\sigma^2=2Dt \quad (9.9)$$

$\sigma^2$ - дисперсия, которая связана с коэффициентом диффузии и со временем. Это говорит о том, что чем больше время, тем больше дисперсия, профиль концентрации будет расплзаться.

На рисунке 9.4. изображены диффузионные профили.

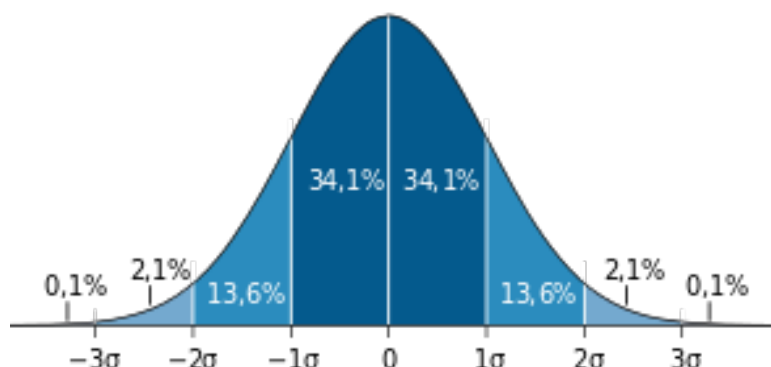


Рисунок 9.4. Распределение диффузионных профилей.

Они описываются уравнением нормального распределения Гаусса, сюда же входит дисперсия  $\sigma^2$  (9.10.).

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (9.10)$$

Если возьмем  $x=0$ , экспонента будет равна единице, и мы получим зависимость того, как концентрация по центру убывает со временем. Подставив  $\sigma$  в эту часть (коэффициент равен единице), получим зависимость того, как убывает сигма со временем. Эта формула на самом деле более богатая, по ней можно построить много разных кривых, например, кривые распределения для разных времен.

На рисунке 9.4. показано, что такое  $\sigma$ . Это – расстояние, где помещается больше, чем шестьдесят восемь процентов от общего вещества. Практически  $\sigma$  берут в качестве меры диффузионного расстояния, на которое вещество может продиффундировать за данный момент времени. Формула 9.9. важна потому, что характеризует связь между диффузионным расстоянием, или в данном случае  $\sigma^2$ -диффузионное расстояние, и временем, которое необходимо затратить. Если речь идет об очень малых клетках, то на малых клетках сигма, то есть характерные диффузионные расстояния, очень малы, время диффузии оказывается очень мало. Время всегда меньше секунды для малых клеток точно. Если берете клетки большие, где диффузионные расстояния исчисляются сантиметрами,

например клетки водоросли Хара до 10 сантиметров, то окажется, что время для диффузии потребуется порядка нескольких недель. Это означает что диффузия на больших расстояниях не работает. Все это следует из формулы 9.9.

## Диффузия в мембранной везикуле

Частный, сравнительно простой пример показан на рисунке 9.5.:

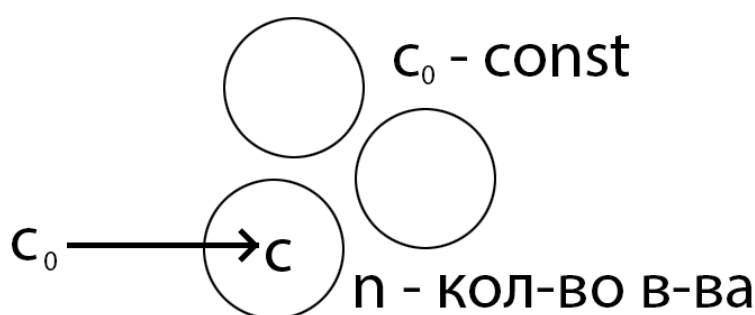


Рисунок 9.5. Пример диффузии в мембранной везикуле.

Есть скажем сферические клетки, мы добавляем в наружный раствор вещество до концентрации  $c_0$ , это вещество может проникать в мембраны, когда оно поступает сначала концентрация внутри была очень низкая нулевая, скажем, потом постепенно нарастает. Концентрацию снаружи будем считать постоянной, потому что очень большой объем внешней среды. Стоит отметить, что убыль небольшого количества вещества, за счет потока, не приведет к изменению наружной концентрации. Поэтому можем использовать закон Фика. В данном случае диффузия лимитируется не толщиной объема среды, а тонкой-тонкой мембраной, которая окружает везикулы. Поэтому уравнение первого закон Фика можно упростить до формулы 9.11.

$$J = P(c_0 - c) \quad (9.11)$$

Здесь вы видите очень простую формулу: проницаемость  $P$  умноженная на разность концентраций  $(c_0 - c)$ , то есть градиент концентрации только выражен уже в конечных величинах. Давайте рассмотрим, что такое  $dc/dx$  в случае тонкой мембраны: это перепад

концентрации между  $c_0$ - $c$ , деленный на толщину мембраны  $h$ . В общем случае надо еще учесть, что коэффициенты распределения вещества между мембраной и водной средой могут придавать коэффициенту значение единицы или другое, сильно отличное от единицы, значение. Поэтому вот эта величина:  $D$  умножить на  $\gamma$  и разделить на  $h$  называется проницаемостью. Теперь, когда мы получили выражение 9.11, как поток связан с перепадом концентрации. Как мы можем из этой же формулы перейти к изменению концентрации внутри везикул? Для этого мы должны учесть поток вещества через единицу площади. Если умножим проницаемость на площадь поверхности этой везикулы, то узнаем сколько всего поступает вещества за одну секунду. Если после этого разделим  $PS$  на объем, то получим изменение концентрации. То есть, от формулы 9.11. мы сразу можем перейти к формуле 9.12.

$$dc/dt = PS(c_0 - c)/V \quad (9.12)$$

Вот решение (формула 9.13.) того, как будет меняться концентрация:

$$c = c_0(1 - \exp(-\frac{PS}{V}t)) \quad (9.13)$$

$C_0$  это - концентрация в объеме, экспонента плавно нарастает до максимума, до кривой с насыщением. В качестве коэффициентов показателя экспоненты - проницаемость и отношение площади поверхности к объему клетки. Ниже приведен график, иллюстрирующий решение для диффузии в мембранных везикулах, под номером 9.6

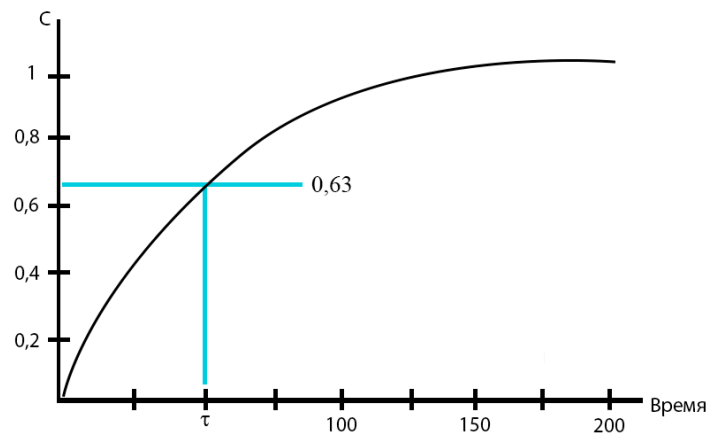


Рисунок 9.6. Отношение концентрации ко времени.

Цифра 0,63 считается следующим образом: время  $\tau$  приравнивают к времени  $t$  в формуле 9.13. и путем простых преобразований приходят к равенству:  $1 - e^{-1} = 0,63$ .

$\tau$  определяется геометрией клетки и ее проницаемостью.

## Диффузия в перемешиваемых слоях

Что такое перемешиваемые слои показано на рисунке 9.7:

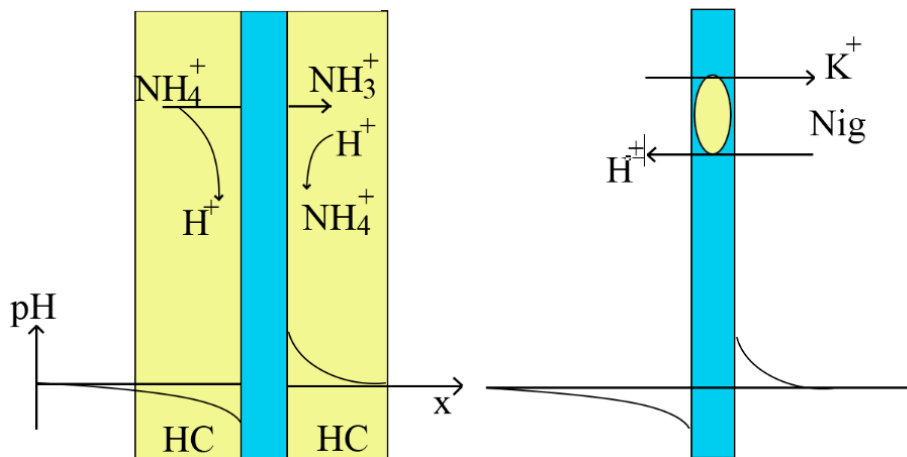


Рисунок 9.7. Диффузия в перемешиваемых слоях (НС) возле БЛМ.

Около мембраны за счет некоторых адгезии вода будет неподвижно связана с мембраной. Даже если вы включите мешалку и будете перемешивать суспензию, то всегда около поверхности мембраны остается тонкий слой, который не перемешивается, он называется перемешиваемым слоем. Его толщина будет зависеть от скорости. Если это – перемешивание, толщина будет уменьшаться с увеличением скорости перемешивания, но ее (мембрану) никогда нельзя полностью устранить. Что может происходить в не перемешиваемых слоях: на рисунке 9.7. бислойная липидная мембрана - модельная система, по одну сторону добавляем ион аммония. Известно, что ионы аммония могут диссоциировать на аммиак с выделением протонов, в отличие от аммония, который является заряженной молекулой. Аммиак - незаряженная молекула и сравнительно свободно проникает через мембрану. Он уходит, протоны остаются, а поступившей аммиак  $\text{NH}_3^+$  будет взаимодействовать с протонами, связывать их и будет переходить в формулу аммиака. Такой механизм будет приводить к тому, что в непосредственной близости, слева от мембраны, будет происходить накопление протонов и pH будет понижаться. Справа же от мембраны будет происходить поглощение протонов и pH будет повышаться. Между объемами растворов нет никаких градиентов, одинаковая pH, а в примембранных слоях появляются большие градиенты и особенно большой трансмембранный градиент протонов, то есть, между правой и левой стороной будет большой перепад pH. Толщина

неперемешиваемых слоев для бислойных и липидных мембран - порядка 2 десятых миллиметров, 200 микрометров. У клеток, у которых размер составляет десяток микрон, можно считать внутреннее содержимое - целиком неперемешиваемым слоем, поэтому если добавить, допустим, аммиак к суспензии небольших клеток, получится защелачивание внутри, как показано на рисунке 9.7. Аммоний будет проникать, связывать протоны и внутри произойдет защелачивание. Это может возникнуть в неперемешиваемых слоях, то есть, можно получить перепады pH несмотря на то, что в объеме нет никаких перепадов. Это - частный случай, такие же локальные градиенты можно получить в присутствии некоторых ионофоров. Справа на рисунке 9.7. изображен переносчик нигелицин, который обменивает ионы калия на протоны. Если у нас мембраны модифицированы таким переносчиком, а затем мы добавим ионы калия в один из растворов, то калий будет идти в одну сторону, а протоны пойдут в другую. Точно так же возникнут локальные перепады pH.

Может возникнуть вопрос: есть ли какие-то лимитирующие стадии, которые лимитируют диффузию? Давайте посмотрим, как профиль концентрации может зависеть от лимитирующей стадии. Это показано на рисунке 9.8.

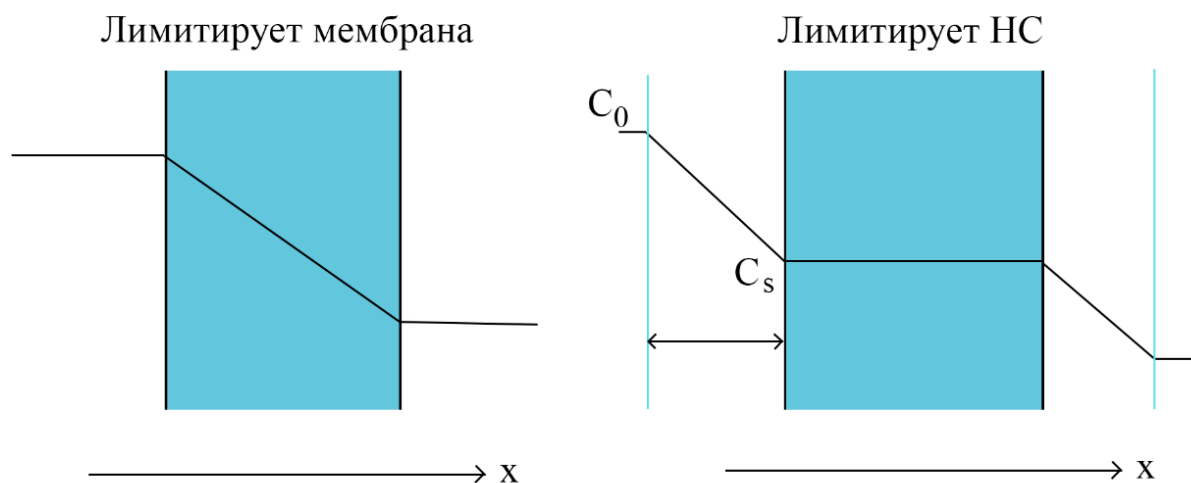


Рисунок 9.8. Зависимость профиля концентрации от лимитирующей стадии.

Если у вас лимитирует мембрана, это значит, что в неперемешиваемых слоях устанавливается равновесие, то есть, выравниваются концентрации. Мы видим, что никакого перепада концентрации до мембраны нет, перепад концентрации происходит только в самой мембране. Это - одна ситуация.



Иногда случается другая ситуация, когда лимитируют именно перемешиваемые слои, то есть, мембрана обладает очень высокой проницаемостью, а сами перемешиваемые слои составляют лимитирующие стадии. В этом случае, профиль концентрации будет иной. Будет происходить падение концентрации на одном перемешиваемом слое и на другом, в самой мембране будет устанавливаться очень быстрое равновесие и перепадов никакой концентрации не будет.

Мы рассмотрели два предельных случая.

Есть и промежуточный вариант: если ограничивают транспорт и перемешиваемые слои, и сама мембрана, то можно показать, что такая формула 9.14. будет работать:

$$\frac{1}{R_{эф}} = \frac{1}{P} + \frac{d1}{D} + \frac{d2}{D} \quad (9.14)$$

Есть некоторая эффективная проницаемость и эта эффективная проницаемость складывается из трех слагаемых, где  $d1/D$  и  $d2/D$  - есть длины первого и второго перемешиваемых слоев соответственно.

Мы рассматривали в основном простую диффузию, а существует так называемая облегченная диффузия. Это тот случай, когда вещества диффундируют из области высокой концентрации в область низкой концентрации, но в их переносе участвует переносчик. Как можно отличить облегченную диффузию от обычной: для обычной диффузии зависимость потока должна быть линейной. В случае переносчика, он имеет ограниченную пропускную способность, поэтому его всегда можно насытить. То есть в случае простой диффузии мы имеем зависимость от концентрации в виде линейной функции, а в случае переносчика - будет зависимость по кривой с насыщением. Кроме того, в случае облегченной диффузии должна соблюдаться специфичность к отдельным веществам, то есть вы можете взять чуть-чуть другое вещество по структуре, оно уже будет проникать иначе. В случае переносчика обычно также есть специфические ингибиторы — это тоже способ отличить виды диффузии.

## Транспорт воды

### Осмос

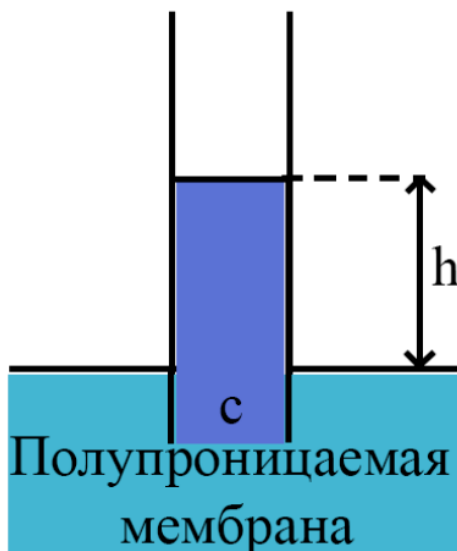


Рисунок 9.9. Осмос.

Здесь изображена модельная система: трубка, на торце фиксирована полупроницаемая мембрана. Проницаемая для воды и непроницаемая для растворенных веществ. Внутри концентрация высокая, а трубка помещена в воду, оказывается, что солевой раствор тянет воду на себя. В результате происходит подъем жидкости в трубке, может подняться на высоту  $h$ . Это связано с представлениями об осмотическом давлении, что выражено в формулах 9.15. и 9.16.

$$\pi = RTc \quad (9.15)$$

$$RTc = pgh \quad (9.16)$$

Введенная Вант-Гоффом  $\pi$  — это осмотическое давление. Осмотическое давление прямо пропорционально концентрации. То есть законы идеальных газов применены к растворам и получена такая формула. Когда достигается равновесие? На какую высоту может подняться вода за счет осмоса? В этом случае равновесие будет достигнуто, когда осмотическое давление будет равно давлению водного столба.

Осмос играет колоссальную роль, особенно в перераспределении воды между клетками и средой. Особенно интересны клетки эпителиальных тканей, которые могут сталкиваться с очень соленой водой, как эпителий кишечника. Можно пить пресную воду и соленую воду

в каких-то количествах. Клетки должны приспосабливаться и должны иметь механизмы осмотической регуляции и объемной регуляции.

### Капиллярные силы

Растение способно поднимать воду на очень большую высоту, например, некоторые деревья достигают высоты по сотне метров, и все-таки происходит поднятие воды. Роль играют так называемые капиллярные силы, или поверхностное натяжение в капиллярах, что отражено на рисунке 9.10.

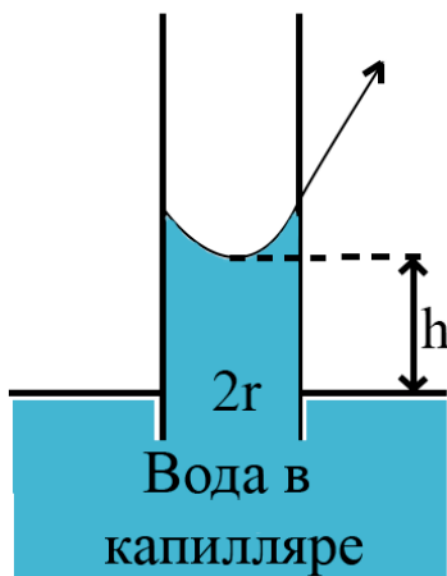


Рисунок 9.10. Поднятие воды в капилляре.

Опыт простой: если вы возьмете узкий стеклянный капилляр меньше миллиметра шириной и погрузите его в воду, то заметите, что вода поднимается вверх по капилляру до высоты, которая будет зависеть от его радиуса. Чем уже капилляр, тем выше подъем воды. Капиллярное поднятие связано с представлениями о поверхностном натяжении (формула 9.17.).

$$h = \frac{2\sigma}{\rho g r} \quad (9.17)$$

Поверхностное натяжение обозначается буквой  $\sigma$  и обусловлено тем, что молекулы воды, которые находятся на границе раздела с воздухом, например, имеют некоторую избыточную энергию. Мы не будем подробно рассматривать, вот формула, которая

показывает связь между высотой, на которую может подняться вода за счет поверхностного натяжения.

Чем меньше радиус, тем больше будет высота подъема. В данном случае баланс между силой поверхностного натяжения, которое действует в упрощенном варианте вертикально вверх и сила, которая давит вот этот самый столб жидкости вниз. Из этого и получено уравнение 9.17.

Запишем поток воды через мембрану клетки (9.18.).

$$J_v = L_p(P - \Delta\pi) \quad (9.18)$$

Есть две действующие силы. Одна из них - перепад давления. Если вы прикладываете некоторое давление, то создаете поток воды. Возвращаясь к рисунку 9.9., если вы сверху приложите давление то, естественно, вы можете вызвать обратный ход воды. Это будет соответствовать опреснению. Важно то, что давление является одной из действующих сил для движения воды и вторая сила- перепад осмотического давления между клеткой и средой.  $L_p$  - коэффициент пропорциональности, который называется гидравлической проводимостью. В случае равновесия, клетки находятся в стационарном состоянии, потока воды нет, он равен 0. Это будет означать, что перепад гидростатического давления между клеткой и средой должен в точности соответствовать перепаду осмотического давления. Такая ситуация возникает в растительных клетках потому, что они часто окружены почти пресной бессолевой средой и баланс устанавливается за счет того, что внутри них повышается гидростатическое давление. У животных клеток не будет перепада гидростатического давления т.к. у них мембраны нежные, не могут выдержать большого перепада давления.

### Транспорт ионов

Поговорим об электрохимическом потенциале и рассмотрим некоторые равновесные соотношения.

### Электрохимический потенциал

Под номером 9.19. записана формула электрохимического потенциала.

$$\mu = \mu_0 + RT\ln(c) + zF\phi \quad (9.19)$$

Электрохимический потенциал складывается из химического потенциала: сумма нулевого стандартного химического потенциала плюс  $RT$ , умноженные на логарифм концентрации, сюда же попадает электрическая энергия иона. Эта энергия здесь потому, что мы имеем произведение заряда на потенциал. Когда вы умножаете заряд на потенциал, то получаете энергию или работу. Давайте сначала рассмотрим равновесие между водными растворами, которые разделены мембраной. И будем рассматривать идеализированный случай, когда мембрана хорошо пропускает какой-то один вид ионов и не пропускает другой. Пусть мембрана пропускает хорошо калий и не пропускает ионы хлора. Как мы будем подходить к анализу такой системы?

Во-первых,  $\mu_0$  зависит от растворителя, это означает, что  $\mu_0$  в первом отсеке будет равно  $\mu_0$  во втором:

$$\mu_{01} = \mu_{02} \quad (9.20)$$

Если рассмотрим случай электрохимического равновесия, то получим, что  $\mu_1$  равно  $\mu_2$ . Электрохимический потенциал иона  $K$  одинаков и в одном, и в другом отсеке.

Если мы запишем формулу 9.19, но исключим из нее  $\mu_0$  и запишем ее для первого раствора и для второго с индексами  $c_1$  и  $\phi_1$ , и соответственно для второго, это будет  $c_2$  и  $\phi_2$ , то мы получим формулу, которая известна как уравнение Нернста, которая описывает, так называемую, равновесную разность потенциалов. Из этих соотношений получим 9.21.

$$\phi_2 - \phi_1 = \Delta\phi = \frac{RT}{zF} \ln \frac{c_1}{c_2} \quad (9.21)$$

Это - равновесный потенциал. Ранее мы рассматривали просто два раствора, скажем 1 и 2, а то же самое относится и к клетке, когда есть у нас внутренняя и наружная среда клетки. Уравнение для этой разности потенциалов обозначим как (9.22.)

$$\phi_j = \phi_i - \phi_0 = \frac{RT}{zF} \ln \frac{c_0}{c_i} \quad (9.22)$$

Где  $j$  - равновесный потенциал иона. Это может быть ион калия, натрия, хлора и так далее, но обычно в простейшем варианте рассматриваем эти три иона. Здесь можно отметить, что равновесие не означает отсутствие градиента концентрации, или разности потенциалов. Разность потенциалов может существовать бесконечно долго при тех условиях, которые мы задали и градиент концентрации будет существовать. Полезно знать, что величина  $RT$

составляет при комнатной температуре примерно два с половиной килоджоуля на моль ( $RT = 2.5$  кДж/моль), а величина  $RT/F$  примерно при тех же условиях составляет 25 милливольт. Тогда величина  $2.3RT/F$  составляет примерно 59 милливольт, или иногда можно округлить до 60. Такое равновесие между водными растворами — это уравнение Нернста.

Второй случай равновесия.

Равновесие в двойном электрическом слое у поверхности мембраны (рисунок 9.11.).

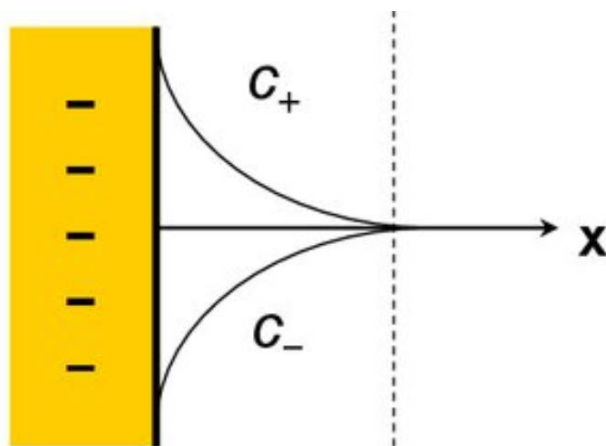


Рисунок 9.11. Равновесие в ДЭС у поверхности мембраны.

Двойной электрический слой: здесь изображена мембрана, которая несет какие-то заряженные группы. Обычно это - отрицательно заряженные группы. Что будет происходить в растворе около такой заряженной мембраны? Поскольку здесь преобладают отрицательные заряды, то катионы будут накапливаться вверх. В этой области их концентрация будет выше, чем в объеме растворов, а анионы будут наоборот отталкиваться поэтому их концентрация будет меньше. Эта диаграмма называется двойным электрическим слоем, для нее характерно, что концентрация катионов не равна концентрации анионов. В объеме раствора сумма катионов и анионов одинакова и выполняются условия электронейтральности, а в двойном электрическом слое условия электронейтральности не выполняется.

Поскольку мембрана несет отрицательный заряд, то потенциал будет отрицательным. Такая система анализируется, исходя из определения электрохимического потенциала. Мы учитываем, что если мы хотим сравнивать на поверхности объем раствора, то мы должны сказать, что эта величина  $\mu_0$  зависит от растворителя. Здесь везде растворитель - вода, поэтому это - константа при любом  $x$ , независимо от этого самого  $x$ , будет  $\mu_0$  одинаковое.

Тогда мы можем сказать, что электрохимический потенциал на границе раздела будет равен, но электрохимическому потенциалу в объеме раствора (формула 9.23.).

$$\mu_s = \mu_o \quad (9.23.)$$

Исходя из равенства электрохимических потенциалов, мы можем получить выражение (9.24.), которое называется уравнением Больцмана, которое связывает концентрацию на поверхности и в объеме с величиной потенциала поверхностного.

$$c_s = c_o \exp\left(-\frac{zF\phi_s}{RT}\right) \quad (9.24.)$$

Если у вас потенциал отрицательной, тогда показатель экспоненты положительный и тогда концентрация поверхности будет больше для катионов. Если  $z$  - положительная тогда концентрация будет преобладать. Надо отметить, что формула Больцмана похожа на уравнение Нернста и по смыслу совпадает с ним, только это разные представления. Здесь мы выражаем отношение концентрации, а там нас интересует потенциал. В принципе, из одной формулы можно получить другую, они взаимозаменяемы.

Теперь рассмотрим, как меняется потенциал на границе раздела (рисунок 9.12.).

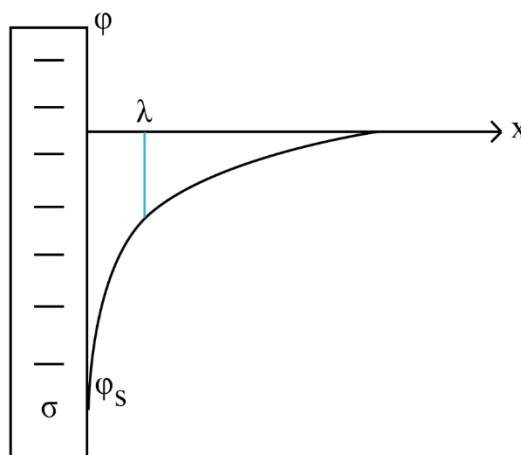


Рисунок 9.12. Изменение потенциала  $\phi$  на границе раздела фаз.

Обычно рассматривают случай, когда потенциалы не очень велики и тогда можно показать конечный результат (выражение 9.25.) - потенциал меняется экспоненциально. Потенциал экспоненциально убывает с расстоянием  $x$ . Чем больше  $x$  - тем меньше будет этот потенциал, а величина  $\lambda$  - характеризует толщину диффузного слоя (выражение 9.26.).

$$\phi = \phi_s \exp(-x/\lambda) \quad (9.25)$$

$$\lambda \sim 1/\sqrt{c} \quad (9.26)$$

При  $x = \lambda$ ,  $e$  будет в минус первой степени и это будет соответствовать уменьшению примерно на две трети, то есть потенциал будет на  $2/3$  меньше. Уменьшится до уровня примерно 37 процентов. В теории выводится как зависит величина толщина диффузионного слоя от разных параметров. Для нас важен основной смысл, что толщина зависит обратно пропорционально от корня из концентрации. Где  $c$  - это концентрация солей в растворе. То есть это означает, что чем больше концентрация солей - тем меньше будет толщина диффузного слоя. Если мы берем самые разбавленные растворы, то толщина может достигать 1 микромметр. Если мы берем концентрированные растворы, то толщина  $\lambda$  может составлять несколько нанометров.

### Электрокинетические явления: электрофорез, электроосмос.

Наличие поверхностных зарядов приводит еще к одному широкому классу явлений, которые называются электрокинетические явления. До этого мы смотрели электростатику, а теперь уже появляется кинетика. К электрокинетическим явлениям относятся хорошо знакомый электрофорез и, ну может быть чуть менее знакомый, электроосмос. Электрофорез — это движение частиц, которые несут на себе поверхностный заряд в электрическом поле. Мы же рассмотрим систему, где есть у нас пористая мембрана и вот эти поры в мембране содержат фиксированные отрицательные заряды, и мы прикладываем поле так, что оно направлена параллельно этим стенкам поры, то в этих порах возникнет течение жидкостей — вот это электроосмос, что и показано на рисунке 9.13.

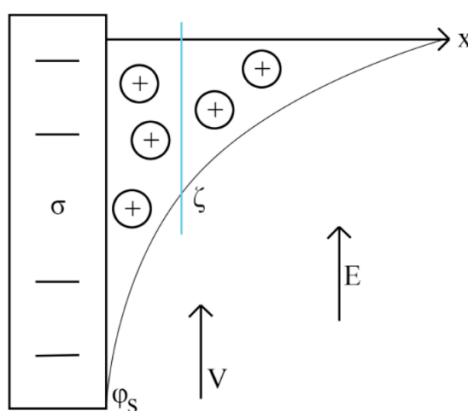


Рисунок 9.13. Электроосмос.



Значит в данном случае фаза сама - заряжена неподвижно, в отличие электрофореза. С чем связано появление вот таких потоков и вообще движение жидкости или движение заряженных частиц? Ну давайте снова вернемся к рисунку 9.13: в двойном электрическом слое будут преобладать катионы и это преобладание будет распространяться на некоторое расстояние от границы раздела. Ближайшие к мембране слои воды испытывают адгезию и очень плотно связаны с мембраной. Они остаются неподвижными, но слои которые чуть дальше удалены, на некоторое расстояние, слабо связаны с мембраной и поэтому если мы приложим поле, направленное параллельно мембране (или тангенциально мембране), то это поле будет действовать на заряды, которые уже не связаны тесно с поверхностью мембраны и это будет приводить к тому, что вода, содержащая избыток катионов, начнет движение и она будет двигаться как раз в том же направлении, в котором и положительные заряды движутся в электрическом поле. То есть, возникнет некоторое движение жидкости. Здесь мы должны определить такие параметры, как:

Дзета потенциал - это потенциал который возникает в так называемой плоскости скольжения. Плоскость скольжения как раз определяет ту границу, которая проходит между подвижными и неподвижными слоями воды. Все эти эффекты будут зависеть от вязкости среды, но в данном случае от воды.

Дельта - толщина неподвижного слоя.

Сигма - поверхностный заряд.

$\phi_s$  - поверхностный потенциал.

Дзета потенциал всегда меньше по абсолютной величине, чем поверхностный потенциал. Величина дзета поддается экспериментальному определению, в отличие от  $\phi_s$ , которые трудно экспериментально измерить.

Диэлектрическая проницаемость воды -  $\epsilon\epsilon_0$  - то есть произведение относительной проницаемости на абсолютно диэлектрическая проницаемость вакуума.

К такой системе, которую мы с вами рассматриваем, применимо уравнение 9.27. — это уравнение Смолуховского. Формула, которая описывает электрофоретическую подвижность - то есть скорость движения либо воды, либо частиц в электрическом поле, деленная на напряженность электрического поля.

$$v/E = \zeta\epsilon\epsilon_0/\eta \quad (9.27)$$

Эта запись означает, что электрофоретическая подвижность зависит от дзета потенциала и обратно пропорциональна вязкости.

Как эта формула получена здесь это не показано, показаны только некоторые идеи как можно эту формулу (9.27.) получить: электрическая сила, действующая на заряды, расположенные ближе к объему среды, а не на ее разделе, уравнивается силой вязкого трения, что и отражено в формуле 9.28.

$$F_{эл} = F_{вязкого трения} \quad (9.28)$$

Эту формулу можно интерпретировать, как закон Ньютона для вязкого трения и переписать формулу 9.28. в новом виде:

$$\sigma E = \eta v / \delta \quad (9.29)$$

Формула 9.29. говорит о том, что силы вязкого трения пропорциональны вязкости среды и пропорционально градиенту скорости. То есть, градиент скорости мы можем вычислить, зная, что скорость движения на расстоянии, у самой мембраны = 0. Поэтому вместо градиента скорости мы можем записать конечные величины. Здесь вывод, конечно, не полный, но его вы всегда можете прочитать в учебнике.

## Энергия ионов в воде и липидной мембране

Электрохимический потенциал является показателем энергией иона в какой-то среде: в воде или в мембране.  $\mu_o$ , как мы уже говорили, отражает взаимодействие с растворителем. Взаимодействие ионов — это в простейшем случае просто гидратация ионов в воде. Рассмотрим следующий рисунок 9.14.

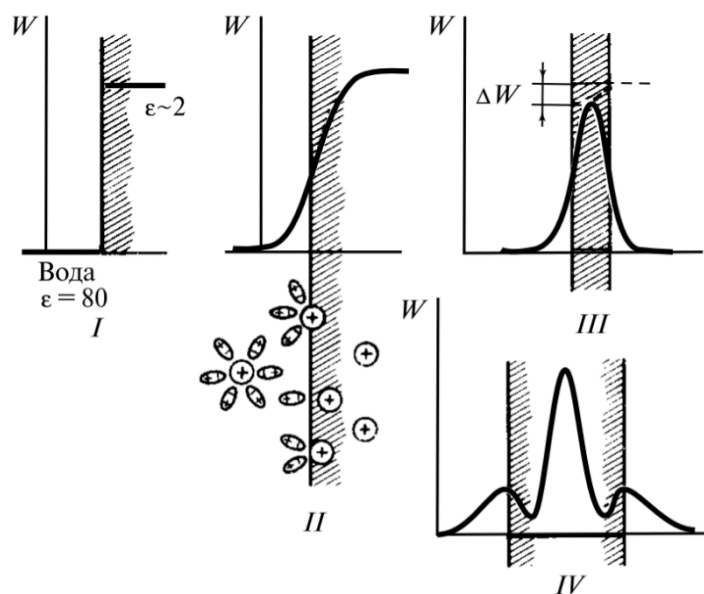


Рисунок 9.14. Профили свободной энергии иона на границах жидкостей в мембранах.

Где I - без учета краевых эффектов (вода/неполярный растворитель(масло)). II - на малых расстояниях вблизи границы раздела. III - в тонкой незаряженной мембране. IV - в мембране с фиксированными зарядами.

Как можно видеть из рисунка выше, ион в воде окружен гидратной оболочкой, за счет нее электростатическое поле иона экранируется. Диполи экранируют электростатическое поле, и энергия иона понижается. Поэтому энергия иона в воде сравнительно низкая, а диэлектрическая проницаемость для воды около 80. Рассмотрим случай I: здесь нарисована граница раздела между водой и маслом.

Вода/неполярный растворитель, значит этот неполярный растворитель характеризуется низким значением  $\epsilon$ , то есть диэлектрической проницаемостью. Ион, чтобы сюда попасть в масло, должен освободиться от своей гидратной шубы и на это требуется очень большая энергия. Поэтому в грубой шкале мы можем нарисовать, что энергия иона очень низкая в воде и очень высокая в гидрофобной фазе. Но это справедливо только при очень грубом рассмотрении, когда мы не учитываем каких-то молекулярных размеров. Если мы рассмотрим случай II (в более крупном приближении), то мы должны сказать, что энергия дегидратации иона меняется не скачком, как было нарисовано в случае I. Энергия дегидратации иона будет меняться плавно. Потому что ион не сразу избавляется от своей

гидратной оболочки. И даже находясь на границе, ион продолжает взаимодействовать с молекулами воды, с диполями. И даже находясь внутри, какие-то взаимодействия остаются. Поэтому этот переход является плавным. Это мы рассмотрели случай бесконечно протяженной гидрофобной фазы, а если мембрана имеет конечную толщину, то вот это полное изменение может не успеть до конца развиваться и в результате просто за счет толщины мы получим более низкий уровень энергии. Произойдет понижение по сравнению с бесконечно протяженной гидрофобной фазой. Мы получили следующую картину, что переход иона из одного раствора в другой соответствует преодолению активационного барьера, который показан в случае III. Скорость перехода естественным образом будет зависеть от высоты активационного барьера.

Мы можем сделать еще один шаг и посмотреть на случай IV. Если мы учтем какие-то наличия фиксированных зарядов на границах раздела, то мы получим профиль уже с дополнительными ямами на краях мембраны, но в любом случае, преодоление такого барьера будет рассматриваться как:

1. Начальное связывание иона, где он попадет в эту яму.
2. Затем ион может долго пытаться преодолеть яму, пока наконец энергия не окажется достаточно большой для преодоления барьера.
3. Затем ион попадает во вторую яму, откуда уже уходит дальше.

Что самое важно важное - то, что переход иона через мембрану соответствует преодолению какого-то активационного барьера и существует электростатическая теория, в ходе которой было получено уравнение Борна (9.30.).

$$\Delta W = \frac{Z^2 e^2 N}{8\pi\epsilon_0 r} \left( \frac{1}{\epsilon_2} - \frac{1}{\epsilon_1} \right) \quad (9.30.)$$

Эта формула показывает высоту активационного барьера. Здесь  $\epsilon_2$  — это диэлектрическая проницаемость в мембране, а  $\epsilon_1$  - диэлектрическая проницаемость воды. Членом  $-1/\epsilon_1$  в некоторых случаях можно пренебречь. Согласно электростатической теории Борна, проницаемость для мембраны должна быть тем хуже, чем больше заряд иона. Кроме того, высота активационного барьера очень сильно зависит от радиуса: чем больше радиус - тем

меньше эта высота. Это формула позволяет дать оценку энергии активации преодоления активационного барьера и оказывается, что это энергия очень велика и составляет сотни килоджоулей на моль. Это важно, потому что если мы рассматриваем скорость прохождения ионов через мембрану, то ее мы можем описать уравнением 9.31.

$$j = k_0 \exp \frac{-Ea}{RT} \quad (9.31.)$$

Следующее, что мы должны рассмотреть: известно, что есть такой класс веществ, который называется ионофорами, которые облегчают проникновение ионов. Давайте рассмотрим на чем же основаны физические механизмы действия ионофоров. Переносчик валиномицин - образован аминокислотами и важно то, что этот переносчик является электронейтральным. Сам по себе он никакого заряда не несет, но может образовывать комплекс с ионом калия. Механизм действия ионофоров в том, что вместо иона с малым радиусом, мы получаем ион с большим радиусом, а заряд тот же самый. Согласно формулам 9.30. и 9.31., при увеличении радиуса, энергия, необходимая для преодоления активационного барьера снижается и, в случае с валомидином, скорость реакции ограничивается только скоростью диффузии.

Теперь давайте рассмотрим другой тип ионофоров — это каналобразующие агенты и здесь, в качестве примера, выберем грамицидин. Посмотрим, как же меняется энергия активации в случае с грамицидином.

Здесь уже не идет речи о том, что меняется радиус иона, радиус - всегда остается постоянным. Но грамицидин меняет эпсилон мембраны за счет того, что грамицидин — это пептид из 15 аминокислот, который, попадая в полярную фазу, сворачивается в полу-спираль. Внутри такой спирали обращены полярные группы, с которыми ион может взаимодействовать. Во время взаимодействия энергия иона снижается по сравнению с таким же ионом, но без всяких взаимодействий. Толщина полу-спирали соответствует примерно половине толщины мембраны и поэтому одна такая спираль никогда не сможет обеспечить прямое прохождение ионов. Надо, чтобы полу-спирали, как показано на рисунке 9.15., стабилизировались.

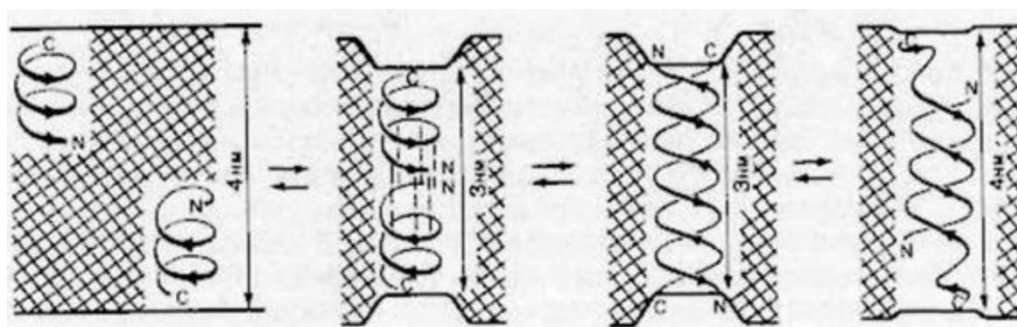


Рисунок 9.15. Объединение полу-спиралей в поры.

Поскольку это пептид, у него есть С конец и есть N конец. N конец называется головой, С конец называется хвостом. Такие полу-спирали диффундируют свободно в латеральном направлении - в плоскости мембраны, толщина которой около четырех нанометров. Полу-спирали могут случайно оказаться друг напротив друга и тогда происходит стабилизация такой структуры, появляется почти сквозная пора. На рисунке 9.15. показано, что произошло объединение по принципу “голова к голове” и появилась пора, через которую могут проходить ионы. Поскольку длина этой структуры составляет чуть меньше, чем толщина мембраны, то система находится немного в напряженном. Стоит сказать, что такие структуры существуют не бесконечно, их разваливают тепловые флуктуации. То есть, за счет тепловых флуктуаций они могут снова разойтись, а кроме того, этому помогает несоответствие длин спирали и мембраны. Для того, чтобы увидеть образование таких структур, нужно взять бислойную липидную мембрану, приложить небольшое напряжение (чтобы была некоторая разность потенциалов) и смотреть протекающий ток в присутствии очень низких концентраций грамицидина. Пример этого показан на рисунке 9.16.

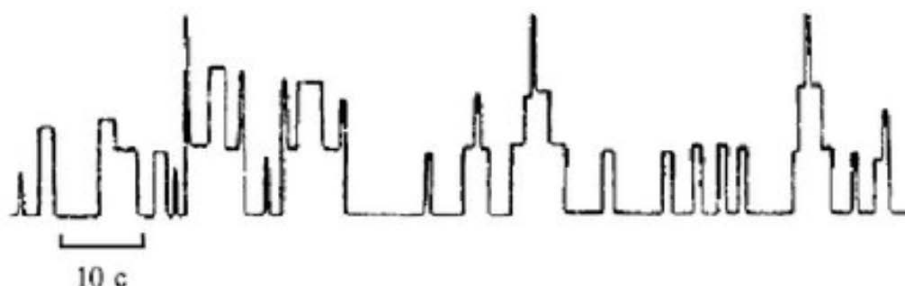


Рисунок 9.16. Токи одиночных каналов грамицидина А в БЛМ при малых концентрациях.

Концентрация должны быть действительно очень низкой - порядка  $10^{-12}$  моль, потому что если она будет большой, тогда картина вся смажется и ничего нельзя будет увидеть.

Как видно из рисунка 9.16. - при соблюдении условий, описанных выше, ток будет меняться скачками с одинаковой амплитудой. Скачки двойной амплитуды, а где-то даже тройной амплитуды, свидетельствуют об образовании одного, двух или трех каналов соответственно. В норме, для обычного грамицидин А, время жизни таких каналов составляет около двух десятых секунды. Проводились опыты, когда использовались ковалентно-сшитые димеры по принципу “голова к голове” и оказалось, что время жизни в таком случае значительно увеличивается (до 10 секунд). Такие структуры уже считаются долгоживущими и не так легко разваливаются. Такие двухтяжевые димеры также показаны на рисунке 9.15. (2 последних иллюстрации). Вернемся к исходной формуле 9.30.

Образование сквозной поры соответствует тому, что локально произошла замена  $\varepsilon_2 = \varepsilon_m$  на некоторые  $\varepsilon_p$ , которая значительно выше. Таким образом, энергия активации резко понижается.

Теперь давайте сравним эффективности переноса ионов в канале и с переносчиком.

Сначала рассмотрим случай с каналом:

Возьмем канал, у которого известны некоторые значения: проводимость  $g \sim 10$  пикосименс (пСм), что соответствует проводимости  $10^{-11} \text{ Ом}^{-1}$  и пусть приложена разность потенциалов  $\Delta\varphi \sim 0,1 \text{ В}$ .

Тогда мы можем записать линейное соотношение для тока, который будет протекать такой системе. Ток пропорционален проводимости, умноженной на разность потенциалов.  $10^{-11}$  умножаем на 0,1 и получаем  $10^{-12} \text{ Кл/с}$ . А уже теперь, зная ток, можно рассчитать количество элементарных зарядов, которые были перенесены.

Мы знаем, что каждый одновалентный ион несет заряд, который численно равен заряду электрона. Заряд электрона — это  $1,6 * 10^{-19} \text{ Кл}$ . Учитывая все вышеперечисленное, можно записать следующее выражение (9.32.) и найти порядок ионов, которые были перенесены:

$$n = I/e = 10^{-12}/(1,6 * 10^{-19}) \sim 10^7 \text{ ионов/с} \quad (9.32.)$$

Формула 9.32. выражает пропускную способность канала.

Теперь рассмотрим пропускную способность переносчика.



Мы говорили, что его функционирование лимитируется диффузией. Тогда мы можем пользоваться формулой диффузии (9.33.).

$$x^2 = 2Dt \quad (9.33.)$$

Учитывая, что переносчик должен пройти двойной путь, запишем  $x = 10\text{ нм}$  для простоты вычислений. Также будем считать, что коэффициент диффузии достаточно высокий:  $D = 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$ . Тогда, пользуясь формулой 9.33., можно найти время одного цикла. В нашем случае это примерно  $10^{-4} \text{ с}$  - это будет означать, что каждый переносчик может совершить 10 тысяч таких циклов за секунду, то есть - перевести  $10^4$  ионов/с. Результат очевиден: один канал гораздо более эффективен, чем один переносчик.

## Транспорт ионов: электродиффузионная теория

Теперь давайте перейдем к транспорту ионов и рассмотрим электродиффузионную теорию. Мы переходим к потокам и для них будет справедливо линейное соотношение между потоком и действующей силой (9.34.):

$$J = -uc \frac{d\mu}{dx} \quad (9.34.)$$

Где действующая сила — это градиент электрохимического потенциала, а в качестве пропорциональности здесь выступает концентрация и подвижность ионов. Минус означает, что ионы всегда движутся в направлении убывания электрохимического потенциала.  $x$  — это расстояние или координата, по которой происходит диффузия. Подставляя в (9.34.) формулу электрохимического потенциала (9.19), можно получить формулу (9.35.) - формулу Нернста-Планка:

$$J = -RTu \frac{dc}{dx} - zFuc \frac{d\varphi}{dx} \quad (9.35.)$$

Эта формула является фундаментальной, но не очень удобной, потому что и концентрация, и потенциал меняется в зависимости от  $x$ . Поэтому она используется как основа для дальнейших выкладок и показывает, что в потоке всегда есть диффузионная составляющая



и, так называемая, миграционная составляющая. Теперь рассмотрим кинетические параметры, входящие в электродиффузионную теорию:

- Подвижность ионов,  $u$ ;
- Коэффициент диффузии,  $D \sim uRT$ ;
- Проницаемость,  $P \sim uRT\gamma/h$ ;
- Проводимость,  $g \sim Pc$ ;

## Приближение (теория) постоянного электрического поля

Есть несколько решений уравнения Нернста-Планка, но мы остановимся только на одном из них, которое называется приближение постоянного поля. Сначала рассмотрим постулаты теории постоянного поля:

- Мембрана рассматривается как однородная сплошная среда и в этой среде ионы могут диффундировать.
- Если есть разность потенциалов между растворами, то электрический потенциал в мембране меняется линейно.
- Ионы движутся в мембране независимо и не взаимодействуют между собой.
- Концентрации на двух сторонах мембраны пропорциональны концентрациям в растворах с коэффициентом  $\gamma$ , где  $\gamma$  - коэффициент распределения.

Приближение постоянного поля означает, что в формуле Нернста-Планка (9.35.) избавляются от одной из двух переменных, зависящих от координаты.  $d\phi/dx$  приравнивается к константе. То есть, если потенциал меняется линейно, то  $d\phi/dx$  мы можем записать как разность потенциалов на границах мембраны, деленная на толщину мембраны, что и отражено в формуле 9.36.

$$d\phi/dx = \phi_m/h = \phi/h \quad (9.36.)$$

Где  $\phi = \phi_m$  - мембранный потенциал,  $h$  - толщина мембраны. От индекса  $m$  избавляются лишь для краткости записи.

## Лекция 10. Мембранный транспорт в клеточных процессах

План лекции:

1. Транспорт ионов и эл. потенциалы в теории постоянного поля: выпрямляющие свойства мембран, соотношение Уссинга
2. Описание транспорта на основе профиля энергии ионов в канале: влияние эл. поля на энергию иона в канале
3. Потенциал действия. Изменение концентрации ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  при ПД
4. Модель потенциалзависимых ионных каналов: зависимость проводимости от эл. потенциала; отрицательный наклон В-А кривой
5. Активный транспорт. Хемиосмотическая гипотеза Митчелла. Схема Поста-Альберса для цикла работы  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -насоса.

### Теория постоянного поля

Иногда ее называют просто приближением, т.к. на слово «теория» оно не дотягивает.

Основные постулаты:

1. Мембраны - однородная сплошная среда.
2. При наличии разности эл. потенциала (РЭЛ), профиль эл. потенциала в мембране линеен
3. Ионы движутся в мембране независимо
4. Концентрации ионов на краях мембраны пропорционален концентрациям в растворах с коэффициентом  $\gamma$  (коэф. распределения).

Второй постулат связан с тем, что поле в мембране – постоянное.

В основе всей этой теории лежит уравнение Нернста-Планка (10.1)

$$J = -RTu \frac{dc}{dx} - zFuc \frac{d\varphi}{dx} \quad (10.1)$$

Поток, в данном случае, пропорционален градиенту концентрации и градиенту электрического потенциала. В этом уравнении две составляющие:  $RTu \frac{dc}{dx}$  – диффузионная и  $zFuc \frac{d\varphi}{dx}$  движение в электрическом поле, где градиент электрического потенциала –  $\frac{d\varphi}{dx}$ .

Воспользовавшись вторым постулатом, мы можем пренебречь переменной  $dx$  и записать градиент потенциала в следующем виде (10.2):

$$\frac{d\varphi}{dx} = \frac{\varphi_m}{h} = \frac{\varphi}{h} \quad (10.2),$$

где  $\varphi = \varphi_m$  – мембранный потенциал,  
 $h$  – толщина мембраны.

Таким образом мы избавились от переменной  $\varphi$  в уравнении 10.1 и получили дифференциальное уравнение, которое можно решить обычным методом (10.3):

$$J_j = \frac{zF\varphi}{RT} P_j \frac{c_o - c_i \exp\left(\frac{zF\varphi}{RT}\right)}{1 - \exp\left(\frac{zF\varphi}{RT}\right)}, \quad (10.3)$$

$$\text{где } P_j = \frac{uRT\gamma}{zFh},$$

$p$  – проницаемость,  $\gamma$  – коэф. распределения «м-на – вода»,  
 $u$  – подвижность,  $h$  – толщина мембраны,  $c_o$  – концентрация снаружи,  
 $c_i$  – концентрация внутри клетки

Уравнение 10.3 известно как уравнение Уравнение Гольдмана-Ходжкина-Каца для потока ионов. Оно содержит экспоненциальные члены, что связано с тем, что уравнение описывает нелинейную зависимость потока от потенциала.

Поток имеет размерность – моль/м<sup>2</sup>с. Он связан с электрическим током следующим уравнением (10.4):

$$I = zFJ \quad (10.4)$$

где  $z$  – заряд иона

Концентрации ионов в клетке по разные стороны мембраны могут сильно отличаться. Так, ионов калия в клетках растений почти в 1000 раз больше, чем в водной среде, которая их омывает. 100 ммоль внутри против 0,1 снаружи. Очень большие перепады. Теперь посмотрим, как будет вести себя поток для калия в зависимости от потенциала (рис. 10.1). В случае больших потенциалов, устремляя потенциал  $\varphi \rightarrow +\infty$ . В таком случае  $c_0$  и 1 в дроби из ур-я 10.3 окажутся очень малы, экспоненты сократятся и останется только коэффициент  $c_i$  вместо всей дроби.

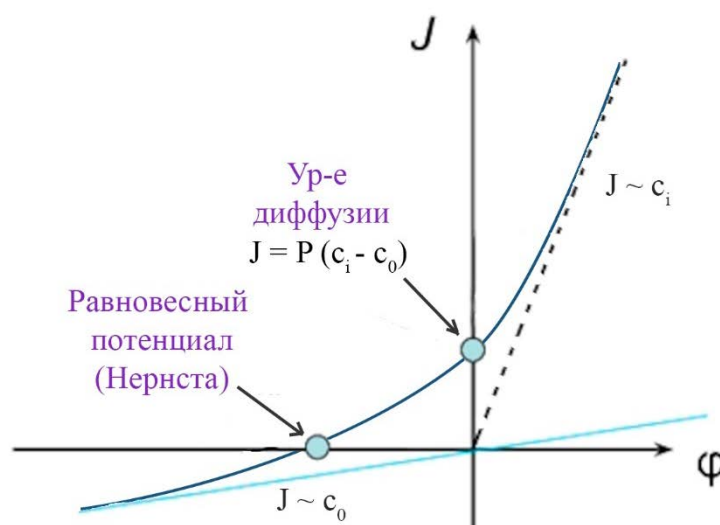


Рисунок 10.1. График уравнения Гольдмана-Ходжкина-Каца для потока ионов

То, что нарисовано пунктиром и голубым цветом - асимптоты. Теперь, если мы устремим  $\varphi \rightarrow -\infty$ , экспоненты исчезнут, и останется только коэффициент  $c_0$ . Поскольку  $c_0$  соответствует очень низкой концентрации, появляется другая асимптота с очень маленьким наклоном.

Когда мы переходим в область положительных потенциалов, ток у нас резко возрастает при небольших смещениях, это означает, что проводимость большая. На малых же потенциалах такое же смещение потенциалов вызывает маленькая сдвиг тока. Можно неверно предположить, что это происходит из-за того, что открываются управляемые каналы. Но здесь ситуация другая. Регулируемых каналов нет, а вся нелинейность связана только с перепадами концентрации. Когда вы гоните ток из области большой концентрации, то насыщаете мембрану носителями зарядов, когда пытаетесь ток гнать в обратное

направление, то наоборот, из мембраны эти носители зарядов уходят и ее сопротивление становится большим.

Чтобы это было понятно, можно привести аналогию: население живет в основном на окраинах города, а когда ему надо на работу, все едут в центр. Получается, что в это время дорога, которая направлена в центр, будет загружена. Поскольку некому ехать в это время из центра к окраинам, дорога пустая. Это не связано с тем, что дороги перекрывает, обе дороги открыты, но в одну сторону будет транспорт загружен, в другую -нет.

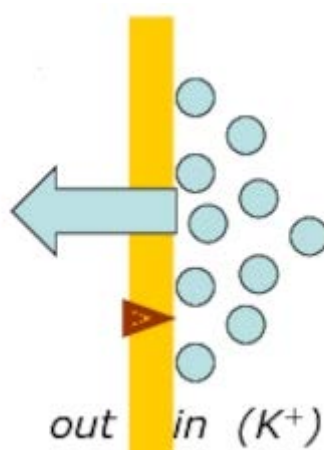


Рисунок 10.2. Гольдмановское выпрямление

Это аналогия для Гольдмановского выпрямления (рис. 10.2). С одной стороны, много ионов, поэтому, когда попробуем пропускать ток, они пойдут. В другую же сторону ионов почти нет - поэтому ток будет очень маленький.

На графике 10.1 есть две характерные точки. Одна - точка пересечения с осью абсцисс, где ток равен нулю. Когда будет ток равен нулю. Теперь приравняйте скобку в уравнении 10.3 к нулю, и вы увидите, что из нее можно получить равновесные соотношения: уравнение Нернста или уравнение Больцмана. Поэтому эта точка - есть равновесный потенциал. Вторая точка - когда потенциал равен нулю. Здесь анализ чуть-чуть сложнее потому, что потенциал равный нулю обратит знаменатель в ноль. Поэтому давайте воспользуемся разложением в ряд (10.5).

$$\varphi \rightarrow 0; \quad 1 - e^x \approx -x \quad (10.5)$$

После преобразований мы получим уравнение диффузии (10.6):

$$J = P(c_o - c_i) \quad (10.6)$$

Таким образом, если потенциала нет, то вещество может только диффундировать. Зависимости, когда изменяется ток в зависимости от потенциала, называются вольт-амперной характеристикой.

## Соотношение Уссинга

Это же самое уравнение лежит в основе так называемого соотношения Уссинга.

Уссинг в сороковые годы прошлого века изучал кожу лягушки. Кожа лягушки помещалась между двумя отсеками и можно было менять раствор в обоих отсеках и, кроме того, пропуская ток можно было менять потенциал. Им измерялись односторонние потоки, когда раствор, находящийся по одну сторону от мембраны и содержащий изотопную метку, пересекал мембрану. Он увидел, что, когда концентрация  $\text{Na}^+$  в обоих отсеках была равная и потенциал отсутствовал из-за пропускания тока – потоки оказались неравны. Это не укладывается в представление о пассивном транспорте. Поэтому был сделан вывод, что это - активный транспорт.

Уссинг заметил, что уравнение Г-Х-К для потока естественным образом раскладывается на два односторонних потока: поток в одну сторону минус поток в другую сторону (10.7).

$$J_j = \frac{zF\varphi}{RT} P_j \frac{c_o - c_i \exp\left(\frac{zF\varphi}{RT}\right)}{1 - \exp\left(\frac{zF\varphi}{RT}\right)} = \vec{j} - \tilde{j} \quad (10.7)$$

Из этого можно сделать вывод, что мы можем записать член с  $c_o$  в знаменателе как поток в одну сторону, а член с  $c_i$  как поток в другую сторону. Если мы возьмем отношение этих односторонних потоков, то получим соотношение Уссинга (10.8):

$$\frac{\vec{j}}{\xi} = \frac{c_o}{c_i e^{\frac{zF\phi}{RT}}} \quad (10.8)$$

Формула Уссинга описывает соотношение односторонних пассивных потоков ионов. Это соотношение было проверено не только на коже лягушки, но и для различных клеток, включая нейрон кальмара. Однако, в ходе экспериментов оказалось, что это соотношение хорошо соблюдается для потоков ионов  $K^+$  и резко нарушается для потоков  $Na^+$ .

Это соотношение иногда называют критерием пассивного транспорта. Если оно соблюдается, то транспорт пассивный. Нарушается же соотношение при двух случаях: при активном транспорте, например, с натрием, либо при взаимодействии ионов в каналах.

Уравнение Г-Х-К можно записать для каждого вида ионов присутствующих в системе. Обычно рассматривают ионы  $Na^+$ ,  $K^+$  и  $Cl^-$  в стационарном случае, когда суммарно через мембрану ток не протекает, т.е. выполняется условие (10.9):

$$I_{Na} + I_K + I_{Cl} = 0 \quad (10.9)$$

Тогда, если для каждого из них подставить предыдущие формулы и решить относительно потенциала, получится формула для мембранного потенциала (10.10).

$$\phi_m = \frac{RT}{zF} \ln \frac{P_K[K_o^+] + P_{Na}[Na_o^+] + P_{Cl}[Cl_i^+]}{P_K[K_i^+] + P_{Na}[Na_i^+] + P_{Cl}[Cl_o^+]} \quad (10.10)$$

Заметим, что у хлора в числителе и знаменателе стоят противоположные остальным ионам индексы.

Данная формула применима, когда потенциал не меняется, т.е. для покоя и пике потенциала действия. В остальных случаях эта формула считается неприменимой.

Существует частный случай, когда ионы хлора распределены равновесно, т.е.  $I_{Cl} = 0$ . Это значит, что суммарного потока ионов хлора нет уравнение будет еще проще (10.11):

$$\phi_m = \frac{RT}{zF} \ln \frac{P_K[K_o^+] + P_{Na}[Na_o^+]}{P_K[K_i^+] + P_{Na}[Na_i^+]} \quad (10.11)$$

Также можно попытаться еще упростить данное выражение. В покое проницаемость для  $K^+$  намного больше, чем для  $Na^+$ . Поэтому мы можем пренебречь натриевыми членами,  $P_K$  сократится и мы получим выражение, которое показывает, что потенциал мембранный будет примерно равен равновесному потенциалу для калия (10.12):

$$P_K \gg P_{Na}, \quad \varphi_m \sim \varphi_K \quad (10.12)$$

При возбуждении же будем считать, что проницаемость для  $Na^+$  намного больше, чем для  $K^+$ . Тогда получится, что мембранный потенциал будет примерно равен равновесному потенциалу для натрия (10.13).

$$P_{Na} \gg P_K, \quad \varphi_m \sim \varphi_{Na} \quad (10.13)$$

## Поток ионов, эл. ток и проводимость мембраны

Еще раз вернемся к основам электродиффузионной теории. В ее основе лежит линейное соотношение между потоком и действующей силой, а в качестве действующей силы используется градиент электрохимического потенциала,  $c$  – концентрация и  $u$  – подвижность (10.14).

$$J_j = -cu \frac{d\mu}{dx} \left[ \frac{\text{моль}}{\text{м}^2 \text{с}} \right] \quad (10.14)$$

Проводимость определяется как изменение тока при небольшом изменении потенциала (10.15).

$$g = \frac{dI}{d\varphi} \quad (10.15)$$



Рассмотрим частный случай уравнения Г-Х-К, когда концентрации снаружи и внутри одинаковые, т.е. выполняется условие (10.16).

$$c_i = c_o = c \quad (10.16)$$

В этом случае все экспоненты в числителе и знаменателе сокращаются и выражения упрощаются до простого линейного уравнения (10.17 – 10.19).

$$J_j = \frac{zF\varphi}{RT} P_i c \quad (10.17)$$

$$I = \frac{z^2 F^2 \varphi}{RT} P_i c \quad (10.18)$$

$$g = \frac{z^2 F^2}{RT} P_i c \quad (10.19)$$

Теперь поток должен линейно зависеть от потенциала. Вся нелинейность была связана с разными концентрациями. Выражение 10.19 - самое простое выражение для проводимости, из него видно, в чем отличие проводимости от проницаемости. Проницаемость - способность мембран пропускать какой-то вид ионов, если этих ионов нет, концентрация будет равна нулю, то проводимость будет 0. То есть важно то, что проводимость пропорциональна и проницаемости, и концентрации.

Обычные проводимости удобны потому, что дают очень простые соотношения связи между током и потенциалом (10.20).

$$I = g (\varphi - \varphi_0) \quad (10.20)$$

Таким образом, ток пропорционален коэффициенту проводимости. Чтобы было очевидно, что это - действующие силы, запишем, что такое электрохимический градиент (10.21).

$$\Delta\mu_j = RT \ln \left( \frac{c_2}{c_1} \right) + zF(\varphi_2 - \varphi_1) = zF\varphi_m - zF\varphi_o = zf(\varphi_m - \varphi_o) \quad (10.21)$$

В этом уравнении мы записываем разность потенциалов  $\varphi_2 - \varphi_1$  как  $\varphi_m$ , таким образом получив  $zF(\varphi_2 - \varphi_1) = zF\varphi_m$ . Член  $RT\ln\left(\frac{c_2}{c_1}\right)$  необходим, в свою очередь, умножить на  $zF$  и разделить на  $zF$ , тогда он будет представлять из себя почти равновесный потенциал, только логарифм будет с обратным знаком. Таким образом мы получили, что разность электрохимических потенциалов пропорциональна отклонению мембранного потенциала от равновесного. Если мембранный потенциал равен равновесному, то действующей силы нет.

## Описание транспорта ионов на основе теории скоростей реакций

Другие названия: микроскопическое описание ионов, эстафетный механизм.

Критика электродиффузионной теории:

1. Мембрана неоднородна, содержит ионные каналы и липидный бислой.
2. Не учитывает, что каналы представляют из себя узкие поры. Если они узкие, то ионы не могут двигаться независимо и будут мешать друг другу, и поэтому должны быть взаимодействия между ними.
3. Коэффициенты распределения на краях мембраны могут быть неодинаковы, если там будет разный поверхностный заряд (поверхностный заряд - фактор, который определяет в том числе и коэффициент распределения).

Основные положения:

1. Ион, который несет гидратную оболочку, может сравнительно легко терять ее, если он при этом будет взаимодействовать с полярными группами канала.
2. Основные свойства канала определяются профилем энергии иона, а он будет зависеть от диэлектрической проницаемости, стерических соотношений. Профиль энергии рисуется в виде нескольких барьеров и потенциальных ям. При этом, каждая яма может вмещать только один ион. Из-за сильных кулоновских взаимодействий в одной яме не может находиться могут находиться 2 иона одновременно
3. В потенциальной яме ион проводит сравнительно долгое время и за счет флуктуаций, он перескакивает в свободную яму, если она свободна.

4. Электрическое поле (в отличие от электро-диффузионной модели, где она рассматривалась только как движущая сила) влияет на высоту активационного барьера.

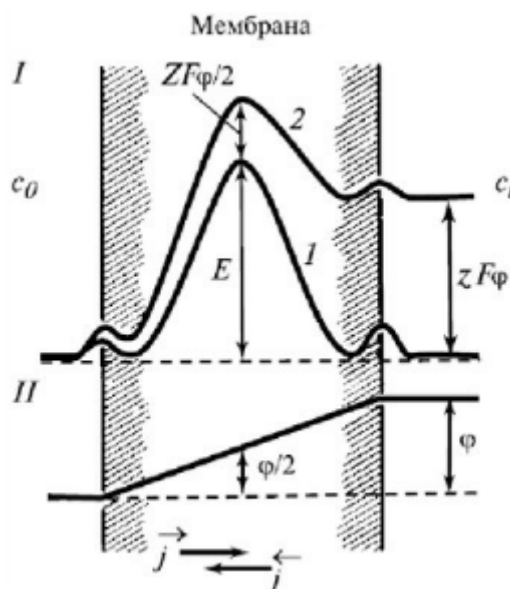


Рисунок 10.3. Энергетический профиль в трехбарьерной модели канала

На рисунке 10.3 показаны профили энергии канала. Это простая модель, называемая трехбарьерной, т.к. в ней имеется два барьера на краях мембраны и один по центру. В основном, энергия  $E$  обусловлена энергией дегидратации.

Если мы приложим разность потенциалов к мембране, (как мы говорили, потенциал в тонких мембранах будет меняться линейно), то потенциал сместится на величину  $zF\phi$  на стороне мембраны, где этот потенциал сместился. При этом сместиться и высота энергии иона по центру мембраны. Поскольку величина изменения потенциала будет составлять  $\phi/2$ , то смещение энергии составит  $\frac{zF\phi}{2}$ . В итоге получится, что для перехода иона слева направо энергия станет больше на эту величину, а для перехода обратно она станет меньше на ту же величину. Для данной модели есть формула, связывающая скорость переноса ионов в такой модели с высотой активационного барьера (10.21).

$$J \sim k \frac{kT}{h} e^{-\frac{E_a}{kT}} \quad (10.21),$$

где  $E_a$  – энергия активации,  $J$  – поток ионов

$\frac{kT}{h}$ , в данном уравнении, это число попыток, которые ион предпринимает чтобы преодолеть активационный барьер.  $e^{-\frac{E_a}{kT}}$  — это фактор, который определяет вероятность преодоления барьера. Здесь основное – то, что еще и каждый барьер чувствителен к полю, только эта чувствительность будет очень маленькая за счет того, что здесь очень мало падает напряжение.

Энергию активации можно разложить составляющую, которая не зависит от приложенного потенциала и составляющую, которая от него зависит (10.22).

$$A \exp \frac{-E_a}{RT} = A \exp \frac{-E}{RT} \exp \frac{-zF\phi}{2RT} = v \exp \frac{-zF\phi}{RT} \quad (10.22)$$

$A \exp \frac{-E}{RT}$  можно обозначить как константу скорости -  $v$ . Это - константа скорости преодоления барьера в отсутствии электрического поля. Тогда мы можем записать суммарный поток как разность односторонних потоков, то есть поток, который идет в одну сторону минус поток, идущий в обратную сторону (10.23).

$$J = \gamma v \left( c_i e^{\frac{z\psi}{2}} - c_o e^{\frac{z\psi}{2}} \right) \quad (10.23)$$

$c_i \gamma$  – дает концентрацию на краю мембраны внутри нее, а  $c_o \gamma$  - концентрация внутри мембраны тоже на краю. значит вот это константа преодоления основного барьера, а здесь как мы говорили барьер становится выше, другой – ниже. Заметим, что потенциал  $\phi$  в уравнении заменен на потенциал  $\psi$  (потенциал, выраженный в безразмерных единицах), он возникает при делении потенциала на  $RT/F$ .

Это уравнение она показывает, что наш если у нас концентрация  $c_i$  и  $c_o$  очень сильно отличаются, то мы получим кривую, похожую на ту, что получили с Гольдмановским выпрямлением. Отличие в том, что вместо линейной зависимости мы получим гиперболический синус, то есть, зависимость линейна при небольших потенциалах, но на больших будет отклоняться (рис. 10.4).

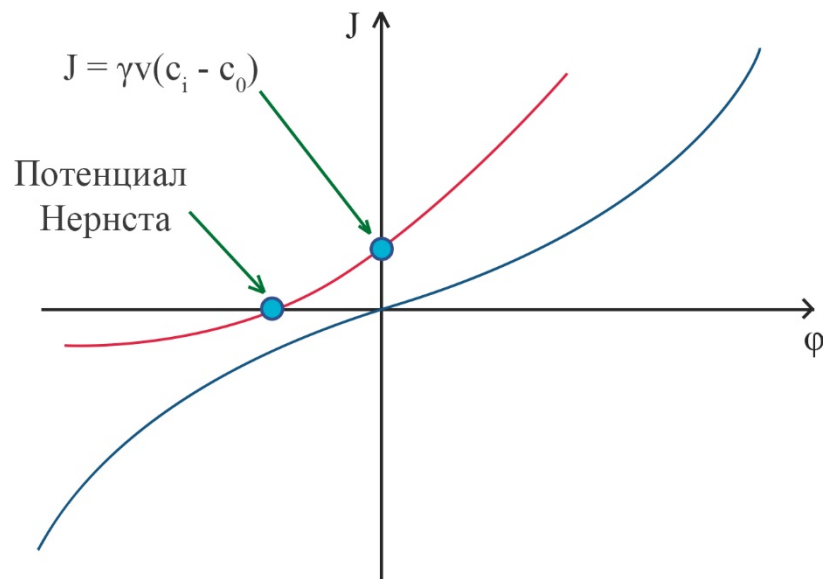


Рисунок 10.4. Вольт-амперная характеристика

Отличия между этими двумя теориями, в частности, в вольт-амперных характеристиках. Полученная на графике нелинейность связана как раз с влиянием поля на высоту энергетического барьера для перехода ионов. Если мы возьмем частные случаи, когда концентрации одинаковые, то уравнение для потока будет упрощаться (10.24)

$$J = \gamma v \frac{z\varphi F}{RT} c \quad (10.24)$$

$$\text{При } c_i = c_o = c \text{ и } \varphi \approx 0$$

Если вы сравните с уравнениями, которые были получены в приближении постоянного поля, они совпадают при условии, что  $\gamma$  - комбинация произведения коэффициента распределения умноженная на  $v$  - константу преодоления основного барьера, есть проницаемость (10.25).

$$P_i = \gamma v \quad (10.25)$$

Исходя из этого уравнения, можем попробовать написать уравнение Уссинга, потому что это - тоже разность односторонних потоков. Если это сделать, то окажется, что уравнение Уссинга в этом описании тоже соблюдается

## Эквивалентная электронная схема мембраны в покое.

Мы рассмотрели два описания: одно - постоянного поля, второе – эстафетный механизм переноса ионов. При любом описании всегда справедлив подход, основанный на эквивалентной схеме мембраны. В простейшем случае, если мы рассматриваем стационарное состояние, мы можем рассматривать простую эквивалентную схему (рис.10.5).

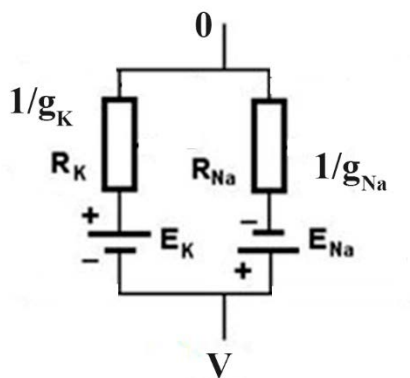


Рисунок 10.5. Схема мембраны в покое

У нас есть калиевая проводимость со своим равновесным потенциалом  $E_K$ ,  $R_K$  – сопротивление, соответствующее этой проводимости,  $1/g_K$  - величина проводимости и аналогичные значения для натрия. В эту схему не попадает, например, конденсатор с емкостью мембраны, т.к. если мы рассматриваем потенциал покоя, то он не меняется. Если потенциал – константа, то емкостного тока нет.

В покое через мембрану ток не должен течь, то есть все токи текут как бы замкнуто и не выходят в наружную цепь. Это значит, что ток в левой цепи будет равен току в правой цепи, но только с обратным знаком.

Рассмотрим, как связан мембранный потенциал в данной схеме с величиной  $E_K$  и  $E_{Na}$ . Этот потенциал на мембране будет находиться где-то между ними и вычисляться по формуле (10.26).

$$\varphi_m = V = \frac{g_K}{g_K + g_{Na}} E_K + \frac{g_{Na}}{g_K + g_{Na}} E_{Na} \quad (10.26)$$

В некоторых предельных случаях, потенциал на мембране может быть очень близок к одному из них.

$$\text{В покое:} \quad g_K \gg g_{Na}, \quad V \approx E_K$$

$$\text{В ПД:} \quad g_{Na} \gg g_K, \quad V \approx E_{Na}$$

Таким образом, потенциал будет приближаться к тому равновесному потенциалу, для которого проводимость максимальна.

Еще замечание: сколько нужно перенести ионов во время потенциала действия.

Чтобы мембрану поляризовать, например, на 100 милливольт, нужно перенести очень небольшое количество ионов, то есть при этом не происходят глобальные изменения концентрации. Например, концентрация натрия в аксоне будет меняться всего  $10^{-8}$  моля, а уровень концентрации натрия в покое в цитоплазме -  $10^{-2}$  М. Мы видим, что величина изменения на 6 порядков меньше, чем фоновый уровень, поэтому это не приведет ни к какому заметному изменению концентрации.

Вместе с тем, в нейронах потенциал действия может возникать за счет потоков кальция возникает за счет потоков кальция. Фоновый уровень кальция в цитоплазме очень мал –  $10^{-7}$  моль. И вот показывается что если учесть, что здесь концентрация очень низкая то изменения концентрации кальция могут быть вполне существенными, то есть они могут существенно повлиять на концентрацию.

## Модель потенциал-зависимых ионных каналов

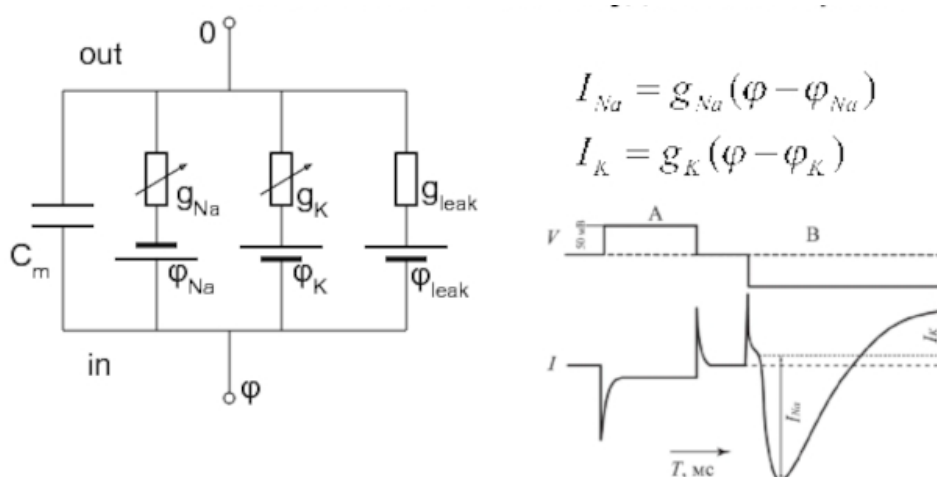


Рисунок 10.6. Эквивалентная схема возбудимой мембраны.

Теперь перейдем от схемы состояния покоя к эквивалентной схеме возбудимой мембраны (рис. 10.6). Когда мы рассматриваем возбудимую мембрану, мы должны учесть и емкость, т.е. если потенциал не стационарный, то будет протекать емкостной ток. Например, в процессе, когда происходит генерация потенциала действия, емкостной ток равен сумме переносимых юных токов. Также показано, что этот ток выводится во внешнюю цепь и мы можем его регистрировать. В случае покоя, мы говорили, что во внешнюю цепь никакой ток не выходит. Здесь еще есть ток и потенциал утечки, который линейно зависит от потенциала.

Типичная схема опыта представлена на рис. 10.6 справа. Если мы поддерживаем потенциал с помощью системы с обратной связью, то, при смещении в сторону гиперполяризации, мы наблюдаем сначала входящий емкостной ток (1-й пик на отрезке А), затем идет стационарный ток утечки (отрезок между пиками), и, если мы возвращаемся к исходному потенциалу, то наблюдается емкостной ток противоположного знака (2-й пик отрезка А) и ток утечки, естественно, снимается.

Если мы деполяризуем мембрану до 0, то в начальный момент наблюдаем емкостной ток. Если бы ни произошло активация ионных каналов, то мы бы регистрировали ток утечки, он показан пунктиром. В нормальных же условиях происходит активация натриевых и калиевых каналов. Сначала активируется ток  $\text{Na}^+$  и мы наблюдаем самый большой пик, затем происходит инактивация натриевого тока и параллельно активируется калиевый ток. Поэтому в стационаре считается, что мы измеряем калиевый ток. Этот метод дает



возможность измерять величину натриевого токов ионов при целой серии деполяризующих импульсов.

Значит, важно то, что натриевые и калиевые токи хорошо разделены во времени. Было бы неудобно и трудно их анализировать, если бы они развивались на более коротких временах, то есть, были бы сближены один по отношению к другому.

На рис. 10.6 также представлены уравнения, описывающие каждый из ионных токов.

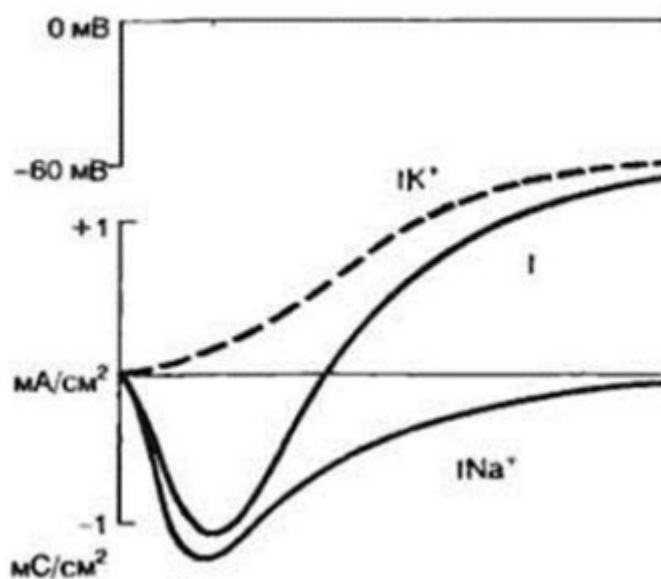


Рисунок 10.7. Временная диаграмма напряжений и токов при фиксации напряжения

При подаче серии импульсов, будет наблюдаться следующая картина (рис. 10.7). Ток  $\text{Na}^+$  сначала усиливается потом проходит через точку реверсии и далее ведет себя монотонно. Эти данные позволяют рассчитать получить графики для проводимости. Рассчитать их можно по формуле (10.27):

$$g = \frac{I}{\varphi_m - \varphi_{Na}} \quad (10.27)$$

Эта формула выводится из выражения 10.20. Если теперь мы отложим проводимости, то получим следующий экспериментальный график (рис. 10.8).

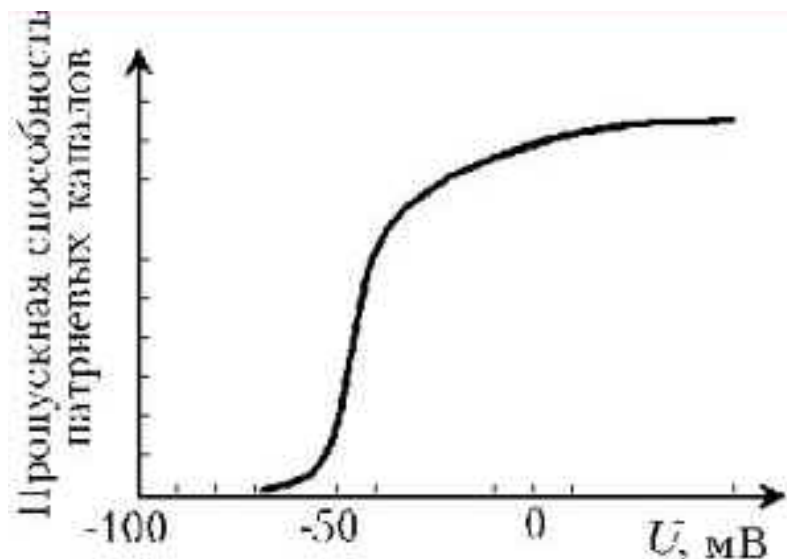


Рисунок 10.8 Изменение пропускной способности Na-каналов, в зависимости от мембранного потенциала

Мы наблюдаем переход от закрытых каналов к открытым по такой s-образной, или сигмоидной кривой.

Это - два важных экспериментальных наблюдения, которые хотел бы отметить:

- Na-ток имеет участок отрицательного наклона в своей вольт-амперной характеристике
- Существует зависимость проводимости от мембранного потенциала

Давайте посмотрим, как их можно аппроксимировать с помощью модели.

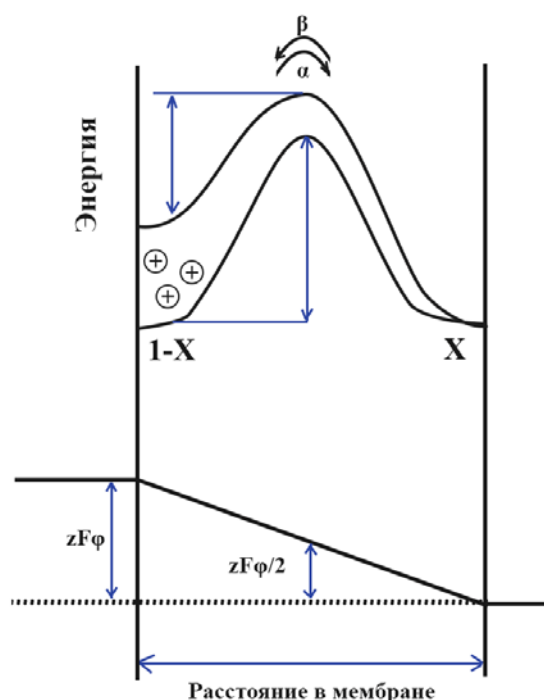


Рисунок 10.9. Иллюстрация к модели управления состоянием канала при перемещении заряженных групп

Мы рассматриваем мембрану и предполагаем, как и в модели Хождкина-Хаксли, что есть некоторые управляющие частицы (это могут быть просто заряды, либо заряженные белковые группы), которые могут перемещаться в мембране (рис.10.9). Если они находятся по одну сторону мембраны, канал будет в закрытом состоянии. Если перемещаются по другую сторону мембраны, канал переходит в открытое состояние.

Энергетический профиль будет иметь максимум посреди мембраны, поскольку мембрана – гидрофобная среда. Мы рассмотрим простую модель с одним центральным барьером.

Положение частиц слева соответствует закрытому состоянию, справа – открытому. Если вероятность того, что частица находится справа обозначить  $X$ , то вероятность того, что она будет находиться слева будет  $1 - X$ . Константу преодоления барьера слева направо обозначим  $\alpha$ , обратно -  $\beta$ .

Если мы повышаем потенциал в левом растворе, то энергия повышается на величину  $zF\phi$ , по центру мембраны –  $zF\phi/2$ . Соответственно изменится и профиль энергии, потому что эта энергия будет добавляться к исходному базовому профилю. Здесь уровень слева сместится вверх, середина сместится на меньшую высоту, правая часть совсем не сместится. Таким образом мы получим, что теперь этим частицам будет легче переходить на правую часть, а

переход в обратную сторону будет затруднен. Поэтому мы можем записать выражения для констант скоростей с учетом того, что электрическое поле влияет (10.28-10.29):

$$\alpha = \alpha_o \exp \frac{zF\varphi}{2RT} \quad (10.28)$$

$$\beta = \beta_o \exp \frac{-zF\varphi}{2RT} \quad (10.29)$$

Нашу кинетическую схему можно представить еще проще (рис. 10.10)

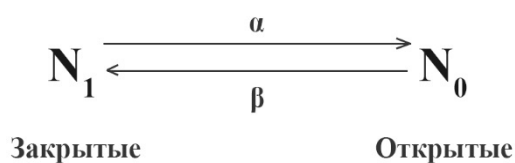


Рисунок 10.10. Упрощенная схема работы каналов

Давайте распишем эту систему. Первое уравнение – закон постоянства числа каналов (10.30).

$$N_0 + N_1 = N \quad (10.30)$$

Второе уравнение - равновесное соотношение, которое говорит, что скорость переходов в одну сторону равна скорости перехода в другую сторону (10.31). Т.е. есть число переходов в состоянии равновесия должно быть одинаковым.

$$N_1 \alpha = N_0 \beta \quad (10.31)$$

Теперь подставив выражение 10.31 в 10.30, можем получить следующее (10.32):

$$(N - N_0) \alpha = N_0 \beta \quad (10.32)$$

Исходя из этого уравнения, если мы раскроем скобки, можем выразить долю открытых каналов (10.33). Поскольку  $\frac{\beta}{\alpha}$  - есть константа равновесия  $K$ , то мы можем записать, что доля открытых каналов равна  $\frac{1}{1+K}$ .

$$\frac{N_0}{N} = \frac{\alpha}{\alpha+\beta} = \frac{1}{1+\frac{\beta}{\alpha}} = \frac{1}{1+K} \quad (10.33)$$

Подставляя выражения для  $\alpha$  и  $\beta$  (10.28-10.29), мы можем выразить константу равновесия (10.34). Мы видим, что константа равновесия зависит от потенциала.

$$K = \frac{\beta}{\alpha} = K_0 \exp -\frac{zF\varphi}{RT} \quad (10.34)$$

Теперь подставим это выражение в 10.33 и получим долю открытых каналов, как функцию потенциала  $\varphi$  (10.35).

$$\frac{N_0}{N} = \frac{1}{1+K_0 \exp\left(-\frac{zF\varphi}{RT}\right)} \quad (10.35)$$

Давайте построим график при разном  $z$  (рис. 10.11).

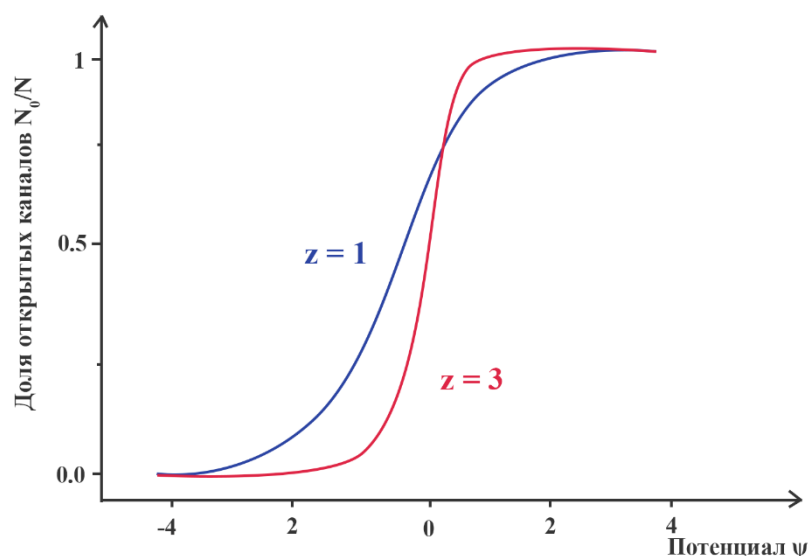


Рисунок 10.11. Зависимость проводимости канала с двумя состояниями от потенциала при разных значениях  $z$

Эти кривые очень похожи на те экспериментальные данные, которые упоминались ранее. Если мы сдвигаем потенциал в сторону деполяризации, то доля открытых каналов возрастает.  $\psi$  – безразмерная единица, одна единица которой соответствует примерно 25 мВ. Крутизна перехода зависит от заряда управляющих групп, которые регулируют проводимость.

Теперь давайте объясним, как появляется зависимость с участком отрицательного сопротивления. Для этого мы запишем выражение для тока через мембрану (10.36).

$$I = N \cdot p \cdot i, \quad (10.37)$$

где  $p$  – вероятность открытого состояния  $\left(\frac{N_0}{N}\right)$ ,

$i$  – ток через одиночный канал,  $N$  – общее число каналов.

На рис. 10.12 показано, как будет вести себя ток через одиночный канал.

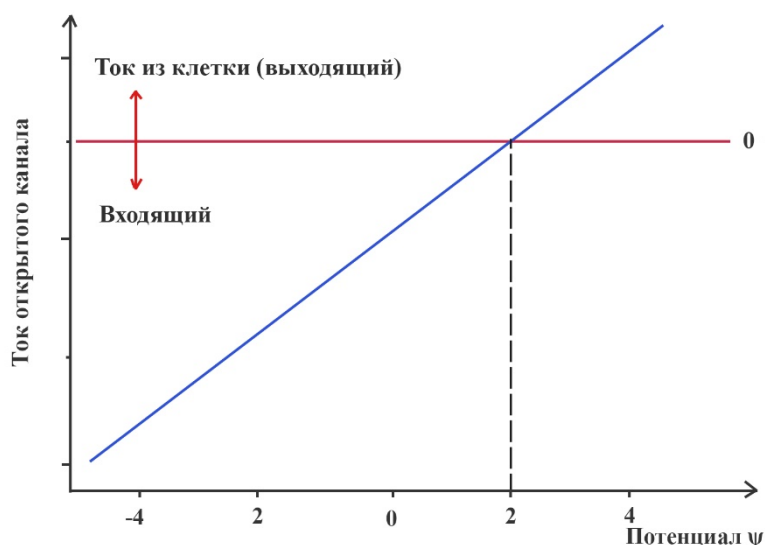


Рисунок 10.12. График тока через одиночный канал

Ток через одиночный канал записывается в следующем виде (10.38).

$$i = g_o(\varphi - \varphi_o) \quad (10.38)$$

Ток через одиночный канал определяется проводимостью канала и отклонением мембранного потенциала от равновесного потенциала  $\varphi_o$ . Равновесный потенциал мы берем где-то в районе двойки - 50 мВ. Если потенциал будет выше, ток будет выходящий. если меньше чем равновесие, тогда будет только входящий ток. Поскольку нас интересовало произведение этих двух кривых, мы можем получить ту самую кривую с участком отрицательного наклона, т.е. мы воспроизводим экспериментальный результат (рис. 10.13).

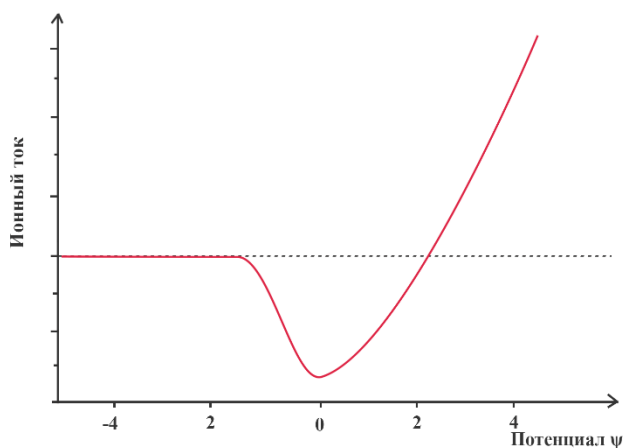


Рисунок 10.13. В-А кривая общего тока  $I$  с участком отрицательного наклона

Теперь рассмотрим, почему на ВАХ для  $K^+$  каналов нет участка отрицательного наклона. Ответ связан с тем, что равновесные потенциалы для калия и натрия лежат в очень далеких областях и находятся по разные стороны от области активации проводимости ионных каналов. Для калия равновесный потенциал - более отрицательный, чем область, где происходит активация. Это означает, что если происходит активация, то ток будет всегда направлен наружу и поэтому отрицательный наклон не проявится. Для натриевых каналов равновесный потенциал  $Na^+$  выше, а область активации смещена влево относительно этого потенциала, поэтому там будут отрицательные входящие токи и, соответственно, мы увидим область отрицательного сопротивления.

Данная модель отличается от модели Ходжкина-Хаксли тем, что для активации канала достаточно совершить переход только одной воротной частице, когда в модели Х-Х необходим переход 3-х или 4-х воротных частиц. Это предположение в модели Х-Х связано с необходимостью объяснить так называемую задержку в активации проводимости и не экспоненциальную кинетику (рис. 10.14).



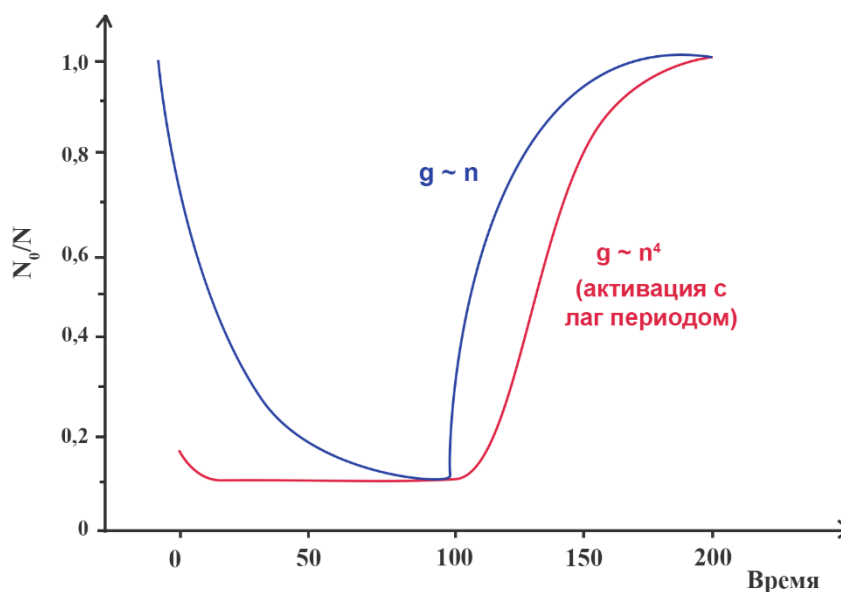


Рисунок 10.14. Изменение доли открытых каналов при сдвиге потенциала

В настоящее время существуют альтернативные объяснение данной задержки. Они могут заключаться, например, в более сложной модели канала, которая имеет три состояния (рис. 10.15) Таким образом, у вас сначала канал находится в состоянии  $N_2$  и затем мембрана деполяризуется, то сначала произойдет переход в состояние  $N_1$ , которое тоже закрыто и только потом произойдет переход в открытое состояние.



Рисунок 10.15. Модель канала с тремя состояниями

## Перенос заряда при активном транспорте

Рассмотрим идею Митчелла, которая объясняла, как реакция биологического окисления может быть использована для синтеза АТФ. Запишем реакцию окисления субстрата (рис. 10.16)

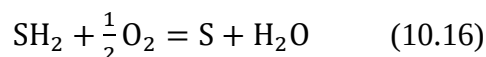


Рисунок 10.16. Реакция окисления восстановленного субстрата

Однако, при такой записи не видим никаких мембранных процессов. Заслуга Митчелла в том, что он показывал роль мембранных процессов. Было предположено, что реакции окисления субстратов и восстановление кислорода происходят по разные стороны мембраны (рис. 10.17).

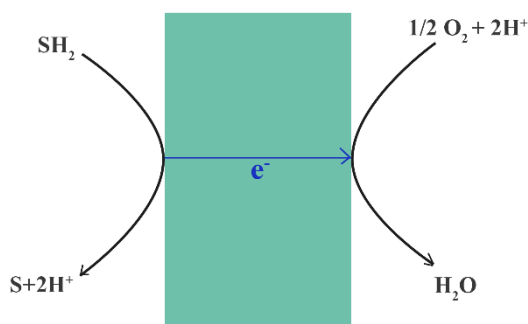


Рисунок 10.17. Схема работы мембранной цитохромоксидазы

Так это ОВР, мембрана должна обладать способностью переносить электрон. Можно заметить, что в процессе реакции, справа понижается концентрация протонов, а слева — возрастает, таким образом возникает градиент концентрации протонов. Считается что энергия этого градиента может использоваться для синтеза АТФ. Тогда можно записать соотношение (10.39).

$$\Delta G_{\text{ATP}} + n \cdot \Delta \mu_{\text{H}} = 0 \quad (10.39)$$

В этой реакции существуют следующие соотношения:

$$\Delta\mu_H \sim 180 \text{ мВ} \sim 18 \frac{\text{кДж}}{\text{моль}} \sim 3 \text{ ед. } pH$$

Для  $H^+$ -АТФазы сопрягающих мембран  $\sim 4 H^+ / \text{АТФ}$

Величину электрохимического градиента можно выражать по-разному: например, в милливольтгах, и тогда, например, в митохондриях считается, что электрохимический градиент протонов составляет около 180 мВ и эту же величину можно изображать в единицах энергии, тогда это будет около  $18 \frac{\text{кДж}}{\text{моль}}$ , или, например, в ед. pH. Эти размерности получены следующим способом (10.40):

$$\Delta\mu_H \left[ \frac{\text{Дж}}{\text{моль}} \right]; \quad \Delta\mu_H / F \text{ [В]}; \quad \Delta\mu_H / 2,3RT \text{ [ед. } pH\text{]}; \quad (10.40)$$

Перейдем к АТФ-азе. Она состоит из двух частей:

- мембранная часть -  $F_0$
- находящаяся в водной фазе -  $F_1$

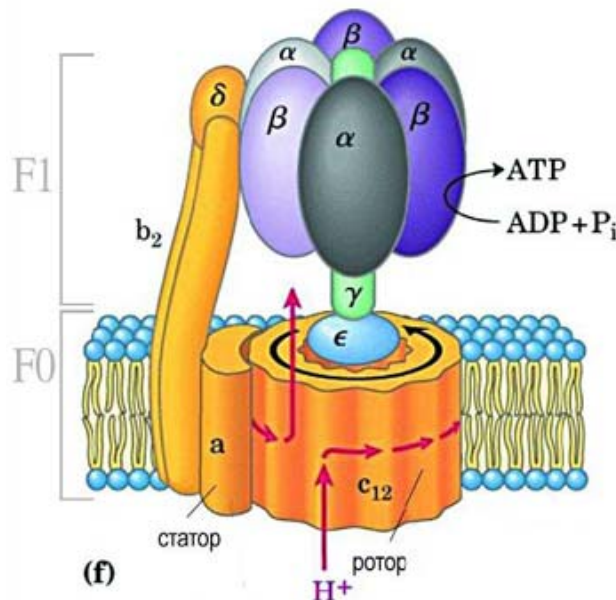


Рисунок 10.18. Строение АТФ-синтазы

Нас будет интересовать, как энергия протонов может быть преобразована для синтеза АТФ. Считается, что это устройство имеет две части (рис. 10.18):

- статорную, неподвижную, несущую субъединицы  $\alpha$  и  $\beta$
- роторную, подвижную, состоящую из блока с-субъединиц и центральной части, взаимодействующей с  $\alpha$  и  $\beta$  субъединицами.

Когда ротор вращается, то с ним вращается гамма-субъединица, меняется при этом меняет сродства субъединиц статора к АТФ и ADP.

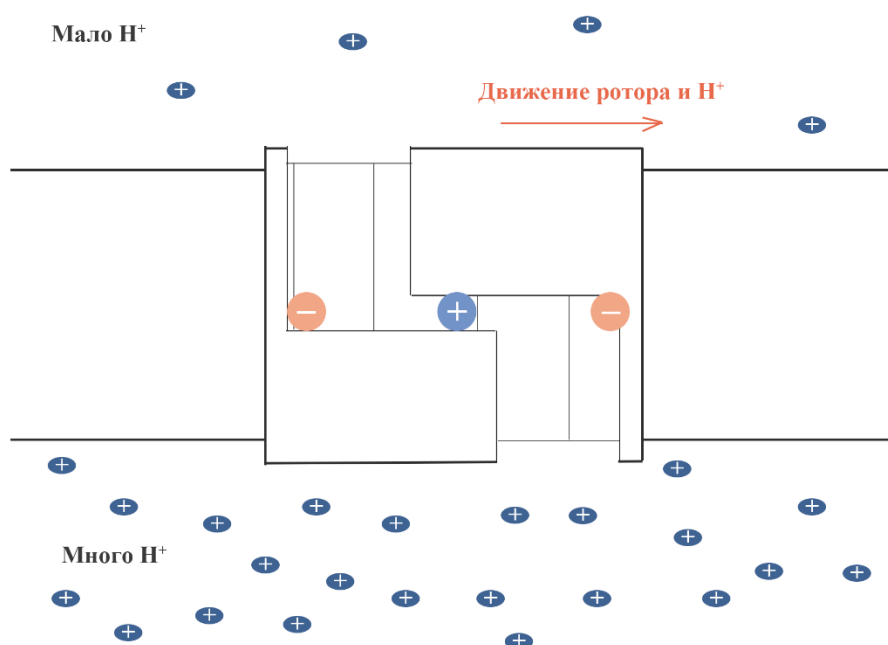


Рисунок 10.19. Схематичное изображение блока с-субъединиц

Вращение обеспечивается движением протонов, которые связываются с ион-связывающими участками с-субъединицами и совершают полный оборот в составе ротора, после чего высвобождаются и уходят. Таким образом, энергия градиента используется для вращения. Рассмотрим ротор подробнее (рис. 10.19). Ион-связывающие участки могут находиться либо в протонированном состоянии, либо непротонированном. Там, где протонов мало, протоны высвобождаются и поэтому эти участки остаются заряженными. Это приводит к тому, что за счет появления свободного заряда ион-связывающие участки не могут войти в область с низкой диэлектрической проницаемостью, ту, которая контактирует с липидным бислоем. На стороне, где много протонов, эти участки быстро

протонируются, становятся незаряженными и могут легко проходить в липидные области. Поэтому, движения системы строго направлены.

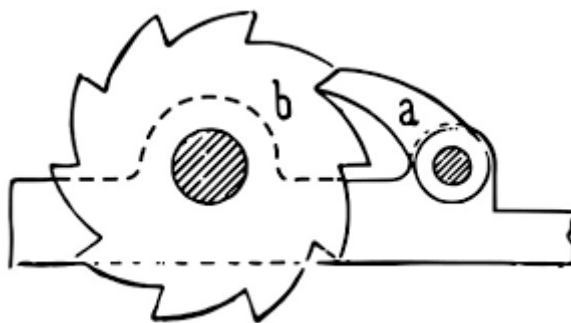


Рисунок 10.20. Пример храпового механизма

Для аналогии можно представить себе диффузионно-храповый механизм (рис. 10.20). Обратное вращение этого механизма останавливается специальной защитной защелкой. Так и в случае ротора, заряд не позволяет войти в область с низкой диэлектрической проницаемостью.

Также существуют АТРазы Р-типа. К ним относятся:

- $H^+$ -АТРазы растений
- $H^+/K^+$  АТРазы желудка
- $Na^+/K^+$  АТРазы,  $Ca^{+}$ -АТРазы

Работа АТФаз этого типа всегда включает, по крайней мере, три составляющие:

- Связывание и освобождение ионов
- Присоединение/отщепление фосфата
- Изменение конформации E1/E2

Рассмотрим, как изучалась работа натриевого насоса. На плоскую бислойную мембрану присоединяются незамкнутые участки мембраны, содержащие  $Na^+/K^+$  АТРАЗу. Очень удобный способ - мгновенное высвобождение АТФ под действием гидролиза, при воздействии УФ-света на молекулы «caged-АТФ». Под действием ультрафиолетового

импульса АТФ высвобождается из «caged-АТР», вступает в реакцию на натриевом насосе и происходит перенос иона. В такой системе дается ультрафиолетовая вспышка и наблюдается перенос порядка пикампер.

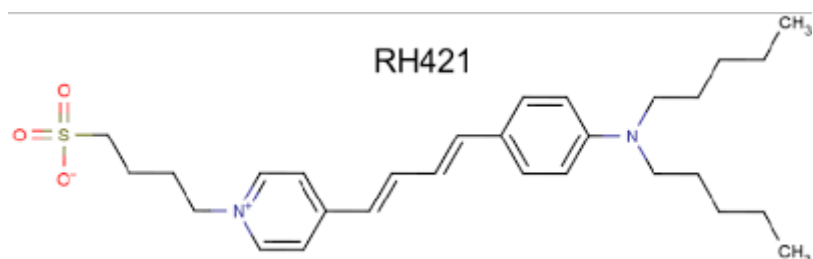


Рисунок 10.21. Пример потенциалчувствительного красителя

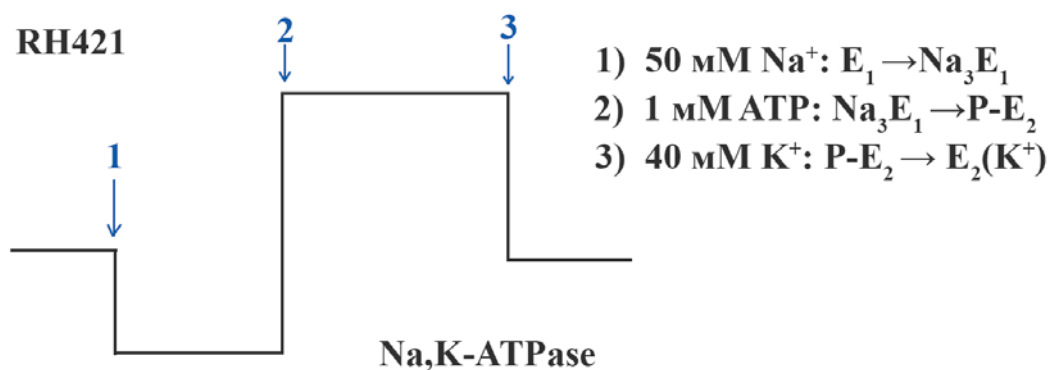


Рисунок 10.22. Изменение флуоресценции потенциалчувствительного красителя

Другой способ - встраивание в мембраны потенциал-чувствительных красителей (рис. 10.21), или, как их еще называют, электрохромных зондов. Они работают в суспензии фрагментов, содержащих препараты Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> АТРАЗЫ. Если добавляется натрий в суспензию, происходит связывание этого иона с ферментом, и на мембране происходит сдвиг потенциала (рис. 10.22). Следующая ступень — это добавка АТФ, она вызывает очень большой сдвиг, при этом происходит конформационный переход E<sub>1</sub> → E<sub>2</sub>. Ионы натрия уходят и теперь фермент в таком состоянии может достаточно долго существовать. Третья, завершающая стадия, происходит при добавлении калия, что вызывает еще один переход, при этом P-E<sub>2</sub> переходит в состояние E<sub>2</sub>, т.е. происходит дефосфорилирование.

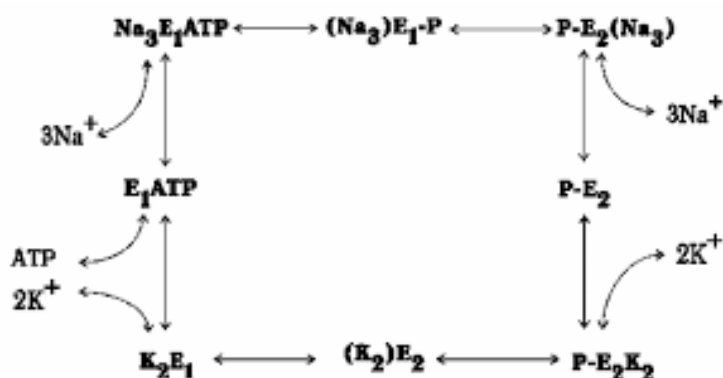


Рисунок 10.23. Схема Поста-Альберса

Рассмотрим цикл натрий-калиевого насоса, так называемую схему Поста-Альберса (рис. 10.23). В состоянии E<sub>1</sub>, связывающие центры обращены к цитоплазме. В присутствии АТФ происходит образование комплекса фермента с фосфатом. Такой комплекс в неустойчивом состоянии иногда называется ферментом в состоянии окклюзии. В этом состоянии ион-связывающие центры закрыты и не имеют доступа ни к среде, ни к цитоплазме. Потом происходит конформационный переход, при котором открываются связывающие участки в сторону наружной среды, натрий высвобождается и фермент будет находиться в состоянии P-E<sub>2</sub>. Если добавить калий, происходит следующий участок срабатывания. Образуется комплекс, затем отщепляется фосфат и цикл, при взаимодействии с АТФ, возвращается в норму.

## Лекция 11 Образование структуры белка. Стабилизирующие взаимодействия

### Материал предыдущей лекции

Молекулярные биологи сравнили клетку с набором белковых машин. Белковые «станки» осуществляют определённые реакции определённым образом для определённых целей. Также немаловажную роль играет взаимодействие белков, происходящее по законам биохимии и физической химии. Изучение таких величин, как энергия активации, константы равновесия, химический потенциал, энергия Гиббса – заслуга физхимика Сванте Аррениуса.

По мнению Аррениуса, за счет столкновения молекул происходит преодоление энергетического барьера, ведущее к химической реакции. В случае химических процессов всё идёт согласно **теории абсолютных скоростей реакции**, изучаемой в курсе физической химии. Однако, с точки зрения биофизики, внутри белкового «станка» прежде всего происходит перегруппировка атомов. В случае отсутствия реакции молекула приобретает равновесную конформацию, но при этом наблюдается колебательное движение атомов молекулы. Молекула белка также стабильна, но остаётся вопрос о наличии таких внутримолекулярных движений и их необходимости для функционирования белка.

### Ключевые вопросы лекции

1. Почему белок стабилен и что влияет на его стабильность?
2. Каким образом образуется белковая глобула, обладает ли она внутримолекулярной подвижностью и с помощью каких методов это можно увидеть?
3. Каким образом с этой точки зрения работают ферменты?
4. Каковы молекулярные механизмы при переносе электрона при дыхании и фотосинтезе?

## Факторы стабилизации белка

Между аминокислотными остатками в белках присутствуют **ковалентные взаимодействия** за счёт пептидных связей. То, что происходит внутри глобулы, определяется взаимодействием между этими остатками. Сила этих взаимодействий определяется тем, насколько далеко эти остатки находятся друг от друга: чем они ближе,



тем сильнее взаимодействие. Такие взаимодействия называются **объемными взаимодействиями**. Это - не химические связи, как в главной цепочке. Мы посмотрим природу этой связи, почему такая глобула стабилизируется.

## Плотность белка

Одна из особенностей белков как объектов исследований – их **плотность**. Плотность белка показывает, насколько близко аминокислотные звенья подходят друг к другу в глобуле нативного белка. Этот показатель наиболее высок у замороженного или обезвоженного белка. Там звенья плотно друг к другу стоят. При денатурации белка и последующей ренатурации глобулярная структура восстанавливается очень быстро. В клетке на рибосоме с помощью шаперонов это вообще происходит быстро и сворачивается однозначно.

Проблема сворачивания, **фолдинга** белка, не решена до сих пор. Стабильная структура белка обеспечивается минимумом энергии межмолекулярных взаимодействий, или максимумом по абсолютной величине энергии взаимодействия внутри молекулы. Так, при увеличении температуры глобула становится менее организованной, тепловые движения дестабилизируют молекулу, и она из глобулы становится клубком. При понижении температуры происходит схлопывание глобулы. Температура  $\Theta$  обозначает точку перехода между клубком и глобулой.

Если взглянуть на зависимость плотности глобулы от её радиуса, можно увидеть, что она достаточно стабильна (рис. 11.1). При случайной «встрече» менее плотного участка с плотным может образоваться полукомпактная глобула, у которой при этом минимума энергии не будет. Происходит частичная денатурация третичной структуры. Так будет продолжаться до тех пор, пока не будет достигнута оптимальная и наиболее энергетически выгодная конформация. Один такой акт занимает примерно одну наносекунду. Это немного, но, если, к примеру, взять белок длиной 58 аминокислотных остатков, у него случайный поиск оптимальной конформации может  $10^{41}$  лет. Это нереально, но в жизни данный процесс происходит за секунды.

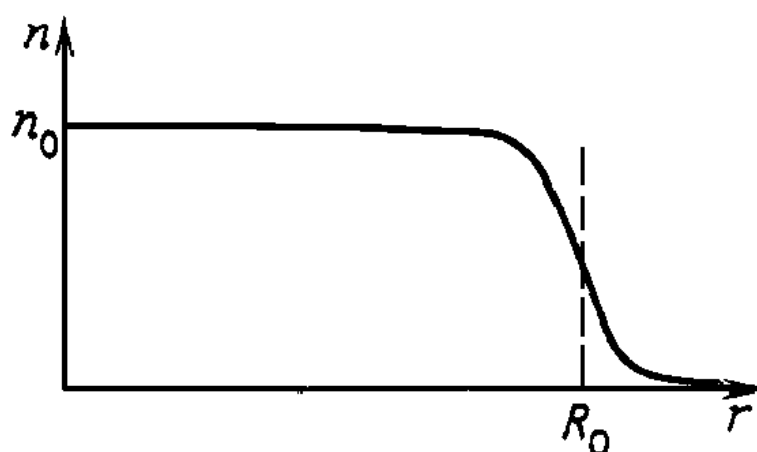


Рис. 11.1. Распределение плотности звеньев в глобуле в зависимости от расстояния от центра глобулы.  $R_0$  – радиус глобулы,  $n_0$  – число звеньев в глобуле.

### Плавнение белка и гидрофобные взаимодействия.

При нагревании белка энтальпия системы растет. Грубо говоря, в данном случае энтальпия показывает количество сообщенной системе энергии. Производная от энтальпии по температуре показывает, сколько нужно тепловой энергии дать, чтобы поднять температуру на один градус. Это – теплоемкость. Она начинает расти, растет производная, потом начинает уменьшаться, она положительна, площадь под этой кривой – сколько мы энергии дали. Сначала белок – полностью нативный, потом – частично денатурированный, частично нативный, идет равновесие между этими формами, в конце – полностью денатурированный. Образуется клубок. Теплоемкость денатурировавшего белка больше, чем теплоемкость нативного белка, потому, что большую роль играют гидрофобные взаимодействия.

Гидрофобные взаимодействия между отдельными участками белковой молекулы стабилизируют белок, играют роль фактора сжатия. Гидрофобные взаимодействия влияют на стабилизацию белковой глобулы благодаря ячеистой структуре воды (рис. 11.2). Образованная структура отличается высокой стабильностью за счёт понижения энтропии и увеличения энтропии. Это компенсируется достаточно большой величиной  $\Delta U$ . Таким образом, уравнение  $\Delta F = \Delta U - T\Delta S$  имеет положительное значение.

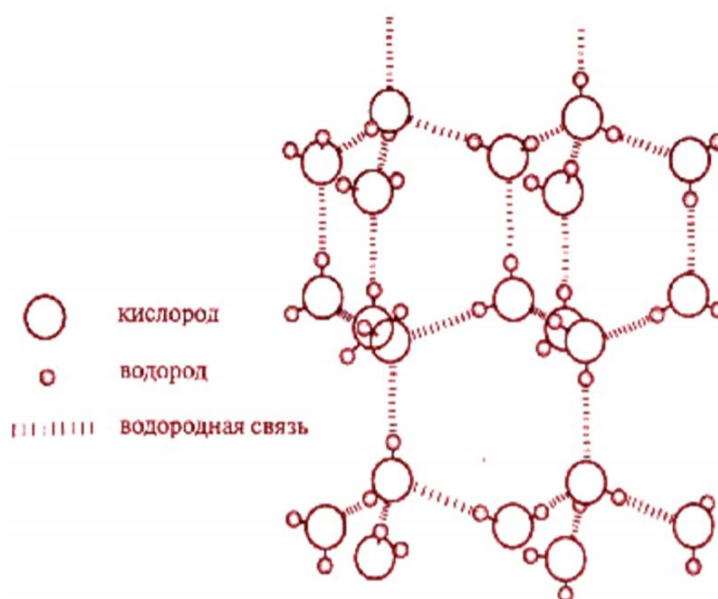


Рис. 11.2. Ячеистая структура воды

По причине ячеистости воды плотность льда ниже плотности воды. При низкой температуре подвижность молекул воды гораздо ниже и ячейки остаются пустыми. У воды в жидком состоянии внутри ячеек обычно находятся другие молекулы воды.

Вода, ячеистая структура, и углеводородные гидрофобные соединения не смешиваются. Казалось бы, углеводород разрушает ячеистую структуру воды, проникая в неё, энтропия воды повышается. Это выгодно, поскольку происходит уменьшение свободной энергии. Но при этом происходит разрушение водородных связей. Взамен углеводород может предложить свои водородные связи. Однако, они слабее и их недостаточно. Поэтому энергия такой системы, если будем смешивать компоненты, смешивать, больше, чем энергия компонентов по отдельности.

На границе фазы углеводород-вода нарушена ячеистая структура воды. Вода становится плотной, водородные связи сворачиваются, прижимаются друг другу, энтропия, в силу малой подвижности воды, тоже понижается. Такое разделение невыгодно, но оно происходит, так что необходимо уменьшить действие этого фактора за счёт уменьшения площади контакта углеводородной фазы и воды. Это достигается за счёт объединения в более крупные структуры: увеличение объема капли ведёт к уменьшению суммарной площади поверхности. Это вызывает расслоение на две фазы. То есть, гидрофобные взаимодействия, как таковые, – не особые силы, а чисто термодинамические эффекты.

В зависимости от игры этих сил могут быть разные варианты. Например, углеводороды слились, вода плотная вокруг, дальше - ячеистая структура. Когда мы сильно повысили температуру, белок денатурирует и все расплетется. С повышением температуры повышается энтальпия и энтропия. Эффект определяется разностью  $\Delta H - T/\Delta S$ . К примеру, при температуре  $150^0$ , чтобы получилось смешение, энтальпия должна повыситься, стать + 2 а энтальпия - + 8. Разница будет  $+10 - (+2)$ . + 8 трудно им смешаться, надо повысить термодинамический потенциал плюс 8 в относительных единицах, при других температурах меняется как эффект гидрофобный термодинамический потенциал.

Парадокс в том, что с повышением температуры повышается гидрофобный эффект, а если понижать температуру, гидрофобный эффект должен уменьшаться. И действительно, можно его понизить настолько, что белок развалится и была предсказана так называемая холодовая денатурация. При температурах около  $0 - +5^0$  белок разваливается за счет того, что все факторы стабилизирующие, гидрофобные взаимодействия, уменьшаются с понижением температуры. Если мы проводим плавление, основная цепь постепенно разворачивается, но при ходовой денатурации вся цепь основных валентностей развивается и занимает весь объем. В цепочке аминокислотных остатков с боковыми радикалами образуются связи между ними. При этом они не просто сами по себе находятся в растворе: чтобы дать возможность им связаться, сама цепь извивается, и они начинают менять своё положение друг относительно друга. Такой направленный фолдинг можно описать только используя сложные принципы высшей математики и топологии.

## Расплавленная глобула.

В натуральном нативном белке есть определённые домены, элементы, элементы  $\alpha$ -,  $\beta$ -вторичной структуры, связанные между собой шпильками и другими структурами. При нагреве белок плавится неравномерно из-за разных температур плавления и коэффициентов расширения у различных доменов, что приводит к ослаблению взаимодействий между ними. Образуется **расплавленная глобула**, после чего происходит денатурация с разрушением третичной и вторичной структуры. Получается менее плотный, чем глобула, клубок. Более того, за счёт тепловых движений клубок может в несколько раз изменять свой объем.

Оказывается, расплавленная глобула, которую можно искусственно получить при опытах с денатурацией, на самом деле функциональную роль играет в работе белка.

Некоторое оживление внутримолекулярной подвижности уже было обнаружено, и это была одна из важных вех в понимании того, что внутримолекулярное движение, подвижность, играет большую функциональную роль. Это - общая топографическая ситуация, которая стала более-менее ясна сравнительно недавно.

## Невалентные, или объемные взаимодействия. Взаимодействия Ван-дер-Ваальса

Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия – дипольные взаимодействия. Две дипольных молекулы притягиваются, потому что расстояние между притягивающимися разноименными зарядами меньше, чем между отталкивающимися разноименными зарядами. Если подсчитать энергию взаимодействия, она обратно пропорциональна кубу расстояния между одинаковыми зарядами при линейном расположении дипольных молекул. Если их всех ориентировать по-разному, во всех направлениях, получается, что энергия взаимодействия, усреднение по всем ориентациям, обратно пропорциональна  $R^6$ , расстоянию в 6 степени. Это универсальная вещь. Основной клубок начинает схлопываться в глобулу, если есть какие-то диполи в виде  $\text{NH}_2$ -группа, избыточной электронной плотности на кислороде или азоте. Диполи могут взаимно притягиваться или отталкиваться, при этом и энергия взаимодействия обратно пропорциональна  $R^6$ .

Но это будет работать, когда они существуют. Все радикалы, в основном, нейтральны. В этом случае тоже возможно взаимодействие за счёт образования так называемых **наведенных диполей**. В химии квантуется энергия электрона.  $n$  - главное квантовое число. Когда  $n=0$ , энергия электрона не равна нулю. Есть нулевая энергия (11.1):

$$E_0 = 1/2 \cdot \hbar \omega_0 \quad (11.1)$$

Есть энергия, есть движение, импульс (произведение массы на скорость) (11.2):

$$P = mv \quad (11.2)$$

и есть координата (11.3):

$$E = P^2/2m. \quad (11.3)$$

И оказывается, что не может обладать электрон одновременно и координатой, и импульсом, или скоростью. Это - соотношение неопределенности. Неопределенность  $\Delta x \cdot \Delta p$  (неопределенность Гейзенберга) (11.4) — это величина порядка  $\hbar$ ,

$$\Delta x \cdot \Delta p \simeq \hbar \quad (11.4)$$

если  $\Delta x \neq 0$  и  $\Delta p \neq 0$ , они двигаются, имеют некоторую энергию раз они двигаются и еще рядом стоят две нейтральные молекулы, при этом движение одной поляризует другую. Так образуются мгновенные диполи. Друг друга поляризуют и потом взаимодействуют. Можно провести аналогию с двумя маятниками: если их привесить к потолку, они не взаимодействуют друг с другом. Если привесить к канату, энергии механических колебаний одного передаются другому. У них начинаются совместные биения. У них идет взаимодействие, то есть, энергия двух маятников взаимодействующих не равна сумме энергии двух изолированных маятников. Она выражается как (11.5):

$$E = E_+ + E_- = \hbar \omega_0 \left( 1 - \frac{e^4}{2f^2 R^6} \right) \quad (11.5)$$

$\hbar \omega_0$  - вот эта нулевая энергия колебаний маятников минус энергия взаимодействия, обратно пропорциональная  $R^6$ . Это так называемые дисперсионные взаимодействия. Там еще другие есть, но нам этих хватит. Они стабилизируют глобулу.

## Сравнение энергий взаимодействий в белке с энергией тепловых колебаний

Величина энергии валентных взаимодействий в главной цепочке в полной последовательности (энергия связи) может достигать 100 ккал/моль. Валентные дисперсионные взаимодействия - намного меньше: 1-3 ккал/моль.  $k_B T$  (константа Больцмана) при температуре 25° составляет примерно 0,6 ккал/моль. Вот энергия тепловых колебаний. То есть, Ван-Дер-Ваальсовские взаимодействия дисперсионные стабилизируют глобулу, но в среднем они больше, чем энергия тепловых колебаний. В основном именно они держат молекулу в стабильном состоянии.

Теперь случаи Ван-Дер-Ваальсовских взаимодействий. При сближении нейтральных молекул энергия их взаимодействия  $U(R)$  убывает обратно пропорционально  $R^6$ : (11.6)

$$U(R) = -\frac{A}{R^6} + \frac{B}{R^{12}} \quad (11.6)$$

При  $A/R^6$  – минус, это – энергия притяжения в изолированном состоянии. Когда они далеко друг от друга, их энергия взаимодействия – 0. Начинают сближаться, но при слишком близких расположениях друг к другу у них начинается отталкивание электронных оболочек. Они нейтральны, все спины насыщены, нет вариантов, а энергия отталкивания, обратно пропорциональна  $R^{12}$ , очень быстро нарастает при сближении. В данном случае наблюдается минимум энергии взаимодействия, которая стабилизирует два Ван-Дер-Ваальсовских атома на каком-то расстоянии за счет своей энергии связи, противостоящей энергии тепловых движений, которые растаскивают их в стороны. Необходимо отметить, что здесь под радиусами имеются в виду расстояния между атомами в молекуле:  $R(\text{C-C}) = 0,32 \text{ нм}$ ,  $R(\text{C-O}) = 0,28 \text{ нм}$ ,  $R(\text{H-H}) = 0.2 \text{ нм}$ . Это расстояние почти достигается в белке. Между основаниями ДНК взаимодействия сильнее. ДНК – консервативная молекула, для которой не нужны случайны флуктуации. Для белков это гораздо менее характерно.

## Другие типы объемных взаимодействий

### 1. Водородные связи

2. **Электростатические взаимодействия** – обычные кулоновские взаимодействия, если там не существуют заряды.

### 3. Гидрофобные взаимодействия

4. Так называемый **потенциал вращения боковых цепей вокруг одиночных связей**.

В целом энергия Ван-дер-Ваальсовских взаимодействий состоит из энергии притяжения  $1/R^6$  и энергии отталкивания  $1/R^{12}$ .

Водородные связи могут быть сильнее, но это сильно зависит от электроотрицательности отдельных атомов.

## Кулоновские взаимодействия

Энергия взаимодействия равняется произведению взаимодействующих зарядов величин  $q_i q_k$ , деленное на расстояние  $r_{ik}$  и на диэлектрическую постоянную  $\epsilon$  (11.7):

$$U = \sum \frac{q_i q_k}{\epsilon r_{ik}} \quad (11.7)$$

В биологии это - важный момент, потому что в воде диэлектрическая постоянная составляет порядка 80-81. Чем больше она, тем меньше энергия взаимодействия за счет экранировки. Вода - как диполь, заряд – внутри, раствор внутри воды. Диполи воды ориентируется соответственно заряду и за счет взаимодействия понижается эффективный заряд, поэтому энергия взаимодействия заряда, который экранирован молекулами воды, будет меньше, чем если бы воды не было. Иными словами, диэлектрическая постоянная, показывает, во сколько раз может снизиться заряд иона, окруженного сольватной оболочкой, во столько раз она понижается. В белке диэлектрическая постоянная составляет порядка 3-4, на мембранах - тоже порядка 3-4 из-за их гидрофобности. Там нет поляризации, диэлектрическая постоянная маленькая и энергия иона там больше, чем в воде в 20. Поэтому иону трудно проникнуть в мембрану и нужны каналы или подвижные переносчики ионов, чтобы не трезить лишнюю энергию.  $KT = 0,6$  ккал/моль, а энергия Ван-Дер-Ваальсовских равна взаимодействиям примерно 1-3 ккал/моль

## Энерго-торсионный потенциал

В органической химии распространены цис- и транс-изомеры. Энергетически эти состояния различаются, поскольку в состоянии цис- электроны, которые образуют связи C-H у двух атомов углерода, ближе друг к другу, и они начинают отталкиваться. Расстояние маленькое, длина связи C-C равна примерно одному ангстрему. В транс-положении они дальше друг от друга. Энергия отталкивания меньше и общая энергия понижается. Поэтому в зависимости от поворота вокруг этой единичной оси получается чередование каждые 60 градусов максимума и минимума энергии (11.8):



$$U = \frac{1}{2} U_0 (1 - \cos 3\varphi) \quad (11.8)$$

Преодоление барьера происходит очень раз в  $10^{-10}$  секунды. Барьер - 3 ккал/моль, небольшой. Преодоление происходит за счет чего: КТ – 0,6 килокалорий, а барьер - 3 килокалории.

В белке - длинная цепочка, в которой есть как одинарные, так и двойные связи. Вокруг одинарных связей возможно вращение, а вокруг двойных и пептидных связей – нет. Пептидная связь так устроена, что  $\pi$ -орбитали участвующих в пептидной связи атомов перекрываются, а  $\sigma$ -орбитали лежат перпендикулярно плоскости перекрывания  $\pi$ -орбиталей. Если мы захотим подсчитать энергию длинной полипептидной цепочки, то нам нужно учесть все возможные Ван-Дер-Ваальсовские взаимодействия и взаимодействия, обусловленные водородными связями, которые могут встретиться. Это практически невозможно. Энергия взаимодействия может передаться, но очень трудно подсчитать все вместе. А когда есть по дороге какая-нибудь пептидная связь, вокруг которой нельзя вращаться, получается цепочка с изолированными парами вращения. Устроена как книжка. Вот одна связь, вот другая, вот одинарная связь, вокруг нее идет вращение. Мы книжку закрываем, открываем, двугранный угол то увеличивается, то уменьшается, в зависимости от этого у нас - разная энергия взаимодействия, но она не передается, потому что рядом - пептидная связь то есть, некооперативные эффекты. Формального пишем угол поворота вокруг пептидной связи, на самом деле плоскость не сгибается, она остается, вокруг нее можно крутиться.

## Полная энергия взаимодействий полипептидной цепочки.

Полная энергия взаимодействия полипептидной цепочки складывается из энергии торсионного потенциала, зависящего от углов вращения ( $\varphi$  и  $\psi$ ), Ван-дер-Ваальсовского потенциала, электростатического взаимодействия.

Возьмем дипептид метиламид-н-ацетил-аминокислота вот блинчик пептидной связи, который не дает вращаться вот они между собой начинают по этим углам  $\varphi$  и  $\psi$  вращаться и в зависимости от углов они будут приближаться и отдаляться друг от друга. Когда углы меняются, меняются расстояния. Для дипептида энергия взаимодействия будет зависеть от этих углов: при сближении кулоновские взаимодействия будут меняться. Функция, которая

получится в двух переменных, необязательно должна иметь минимум, но тогда дипептид не будет стабильным с точки зрения энергетики, потому что стабильная структура обладает минимумом энергии.

В данном случае она обладает двумя минимумами если вы спроектируете на плоскость переменных  $\phi$  и  $\psi$ , получите геодезические линии, показывающие энергию взаимодействия со знаком минус. Если минус большой по абсолютной величине энергия будет стабильна. Сложные молекулы, состоящие из большого числа остатков, таким образом обсчитывать гораздо сложнее. В экспериментах выяснено, что элементы вторичной структуры, которые образуются при сворачивании клубка в глобулу, на определённом этапе сворачивания сохраняются при всех последующих этапах сворачивания. Это означает, что сворачивание носит направленный характер. В эксперименте появляются  $\alpha$ - и  $\beta$ -структуры на первых этапах сворачивания и сохраняются в дальнейшем. Это соответствует принципу координации между ближними и дальними взаимодействиями. Более того, вероятность их встречи значительно больше. Мы выбираем пару аминокислотных остатков, считаем ее как дипептид, который встретился, получаем некий минимум, выбираем уже достигнутую низкоэнергетическую конформацию для пары и начинаем ее соединять с третьей, делая допущение о том, что получается снова дипептид. Так постепенно можно прийти к глобальному минимуму. Когда научились довольно быстро определять элементы вторичной структуры, теоретики по основной последовательности верно вторичную структуру с вероятностью примерно 50%. Предсказание третичной структуры шло хуже, четвертичная вообще не предсказывалась. Другой способ предсказания - по статистическим закономерностям нахождения тех или иных аминокислотных остатков в тех или иных  $\alpha$ - или  $\beta$ - структурах. Этапы сворачивания белковой молекулы приведены на рис. 11.3.

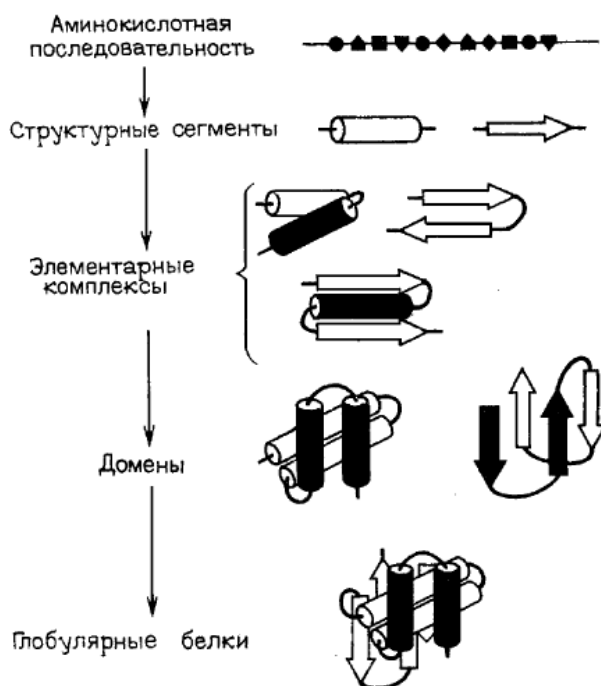


Рис. 11.3. Этапы сворачивания белковой молекулы и иерархия белковой структуры.

Чтобы обеспечить такую стабильную структуру в лабораторных условиях необходимо понизить температуру, чтобы энергия тепловых взаимодействий была недостаточна для разрыва связей. Но при этом сам процесс сворачивания сильно замедлится. Температура должна быть достаточно большая, чтобы процесс сворачивания шел но не слишком большая чтоб разрывались связи. В процессе получится расплавленная глобула но в конце мы получим вот такую значит расплавленную глобулу, в которой элементы вторичной структуры уже есть, но между ними еще есть движения. Если мы получили в конце концов температуру стеклования, когда уже окончательно из расплавленной глобулы получается нативная глобула, её необходимо стабилизировать. Когда стали проводить опыты по сворачиванию, оценили случайные последовательности и время их сворачивания. Оказалось, что есть как быстросворачивающиеся, так и медленно сворачивающиеся молекулы. И те, которые сворачивались быстро, имели энергетический провал, из которого было сложно выбраться за счёт теплового движения. Остальные же были нестабильны. Это означает, что есть определённые эволюционно отобранные последовательности аминокислот.

Всего науке известно минимум 100 тысяч нативных белков, но теоретически их может существовать на много порядков больше. Почему же эти возникли и почему они остались? Один из общих ответов такой: это – запоминание случайного выбора. Эти белки возникли случайно и случайно закрепились в результате онтогенеза и филогенеза. Разные в эволюционном положении организмы имеют схожий набор структурных элементов.

## Параметры внутримолекулярной подвижности белка

Глобула внутри стабильна и одновременно с этим подвержена внутримолекулярному динамическому движению. Классический пример внутримолекулярной подвижности связан с гемоглобином. Молекула гемоглобина состоит из четырёх субъединиц: две  $\alpha$ - и две  $\beta$ -субъединицы. К железу в составе гемоглобина присоединяется кислород. Железо после присоединения кислорода изменяет спиновое состояние (спин стал нулевым). Далее железо двинулось в плоскость гема, произошел небольшой изгиб и началась оксигенация субъединиц, при этом энергия активации процесса уменьшается по мере прохождения процесса (**кооперативный эффект**). Движущими силами в этом процессе будет как раз изменение электронного состояния всей молекулы в целом, что неизбежно ведёт к изменению её конформации за счёт смещения равновесных сил, стабилизирующих молекулу. Система подыскивает новый более стабильный энергетический уровень, исходя из нового состояния электронной оболочки.

Для того, чтобы понять, что происходит внутри молекулы, зачастую используются специфические метки. Они вводятся в конкретное место в молекуле, а дальше остаётся только наблюдать за сигналом, который исходит от этой метки. Это может происходить за счёт ЭПР, ЯМР, флуоресценции. Подвижность метки может зависеть от тепловых движений соседних молекул. Исходя из этого можно делать выводы о подвижности окружения этой метки.

К примеру, берём тирозин, измеряем его спектр флуоресценции. Появилось возбуждение, которое затем мы быстро релаксировали на нижние колебательные подуровни. С них испустили свет флуоресценции. При понижении температуры максимум спектра не изменится, но сам спектр станет уже. А если взять тирозин в белке, при понижении температуры максимум сдвигается в коротковолновую область. Это происходит потому, что лишняя энергия по колебательным подуровням переходит не в среду, а передаётся

соседним аминокислотам. Для того, чтобы отдать энергию, необходимо «раскачать» соседние аминокислоты, и испускание происходит с более высокого энергетического подуровня. Поэтому максимум флуоресценции в данном случае увеличивается при понижении температуры. А если этот белок обезводить, то этот эффект пропадает. И в зависимости от связи с белком и окружения происходит сдвиг спектра флуоресценции. Когда появилось возбуждение изменилось электронное состояние и появился диполь. Подвижная вода за короткое время может успеть сольватировать его и снизить его энергию. Поэтому снижение энергии возбуждения будет зависеть от образования сольватной оболочки, и мы можем определить эту подвижность путем сдвига этого максимума. В таком случае нужно использовать другую метку с более большим временным разрешением.

## Лекция 12. Внутримолекулярная подвижность белка

### Внутримолекулярная подвижность белка

Белки – наноразмерные структуры. Толщина мембраны – 50-100 Å. Мембранный белок – 20-40 Å. Классический прием их изучения – это давать флуоресцентную метку, которая садится в белок, внутрь, и дальше ведется наблюдение за сигналами, которые эта метка дает. Время затухания флуоресценции или фосфоресценции – наносекунды или микросекунды. В этом диапазоне, по изменению спектра, мы можем судить о внутримолекулярной подвижности, т.к. метка совершает тепловые движения. А для ее движения необходимо свободное место, которое образуется за счет подвижности ближайшего микроокружения.

С таких простых соображений начинается анализ серьезных экспериментальных закономерностей, а потом уже начинается серьезная работа или физика, или математика, которые дают всему этому количественное оформление. Расчет — это не самоцель. Он должен быть основан на каких-то представлениях, которые вы, как биологи, фактически должны сформировать. Прежде, чем считать, как говорят серьезные физики, надо ясно себе представить, что ваш объект устроен.

### Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР)

Кратко обсудим метод ЭПР и посмотрим, по какой информации мы получаем данные с помощью этого метода, чтобы говорить о внутримолекулярной подвижности метки.

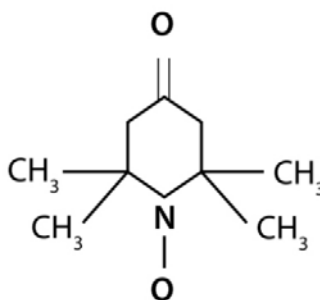


Рисунок 12.1. Структура нитроксильного радикала

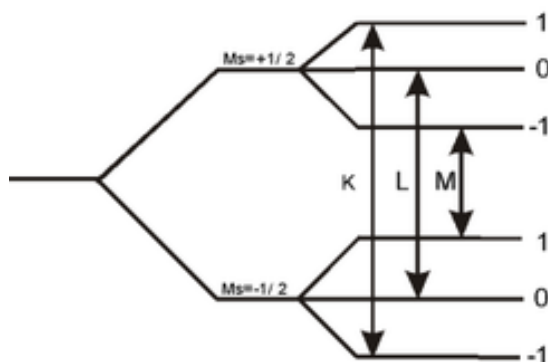


Рисунок 12.2. Расщепление энергетических уровней спиновой метки в постоянном электромагнитном поле.

Пример такой метки - нитроксильный радикал (рис. 12.1). Неспаренный электрон в группе NO ориентируется во внешнем поле. И соответственно появляются два уровня: против поля и по полю. Происходит расщепление, так как два этих состояния имеют разную энергию (12.2). Затем дается переменное магнитного поля, которое поглощается, с одной стороны, с другой стороны - совершаются вынужденные переходы сверху вниз. Поскольку заселенность внизу больше, чем наверху, то частота переходов снизу вверх будет больше, и, в целом, происходит поглощение энергии. Это поглощение и есть сигнал ЭПР.

Еще тонкость: у азота ядра есть собственный магнитный момент, который тоже ориентируется во внешнем поле: либо по полю, либо против, либо перпендикулярно. Эти три разные ориентации складываются во внешнем поле. Они маленькие, но дают прибавку. Поэтому, каждый уровень еще расщепляется на три уровня, в зависимости от ориентации ядра азота.

По ширине уровня поглощения магнитного поля, мы можем говорить о внутримолекулярной подвижности (рис. 12.3).

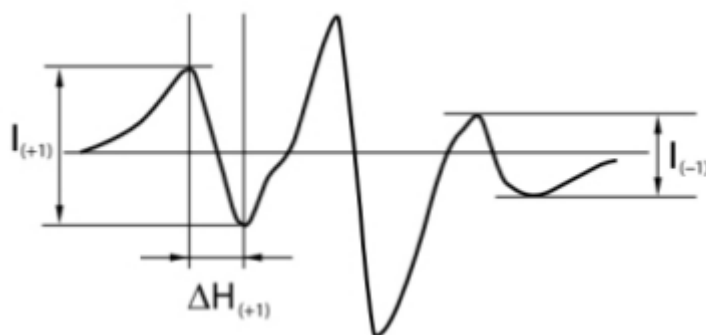


Рисунок 12.3. Пример типичного спектра ЭПР

Оказывается, что внутримолекулярная подвижность метки будет уменьшаться при углублении ее в глобулу белка. В поверхностном слое времена движения  $\sim 10^{-11}$ , почти как в растворе. Подповерхностные слои  $10^{-8}$ - $10^{-10}$ . Внутри -  $<10^{-8}$  (рис. 12.4).

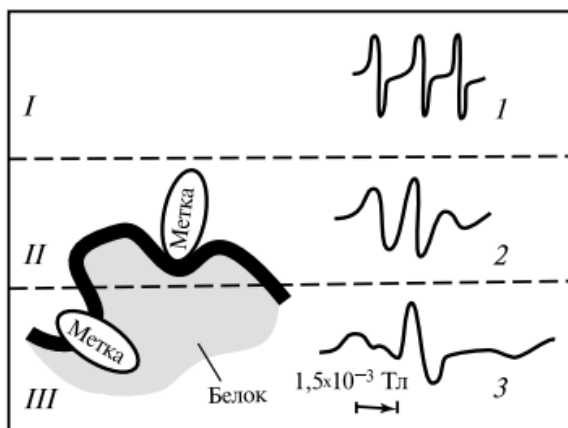


Рисунок 12.4. Спектр спинового зонда при различной степени погружения в белковую глобулу

Допустим, мы расщепили уровни. И поглощения, и переходы должны представлять из себя узкую линию. Спрашивается, почему у нас происходит поглощение при разных внешних магнитных полях. Вспомним, как делается ЭПР: нами фиксируется частота переменного поля, которое поглощается, а изменяется внешнее поле. Когда вы изменяете внешнее поле, то получите точку максимума – значение резонанса  $H_0$ , и некоторый интервал поглощения вокруг него. Это происходит потому, что эти уровни, на которые он расщепился, не остаются постоянными. Они подвержены изменению за счет в основном двух процессов. Первый процесс – частичная передача энергии электроном в окружающую среду, он может не полностью перейти на нижний уровень, а отдать часть энергии за счет спин-орбитального взаимодействия.

Вспомните, как работает флуоресцентная метка. Мы на одной из прошлых лекций помещали тирозин в белок и понижали температуру. Максимум флуоресценции при этом сдвигался в коротковолновую область. Это происходило потому, что на возбужденном уровне избыток тепловой энергии трудно было отдать всему белку, на это было нужно время. Соответственно, он не успевал все отдать, как происходило естественное испускание света с более высоких колебательных подуровней. Здесь - то же самое и поэтому время отдачи энергии мы отдаем немножко решетке и поэтому у нас получается изменение положения уровня.

Изменение положения уровня — это реальное резонансное поглощение, которое мы даем. Эффект резонансного поглощения, который мы вызываем переменным магнитным полем, происходит при



разных внешних полях. Мы отдали часть энергии, значит,  $H_0$  нам не хватает, нужно побольше, или прибавили часть энергии от решетки.

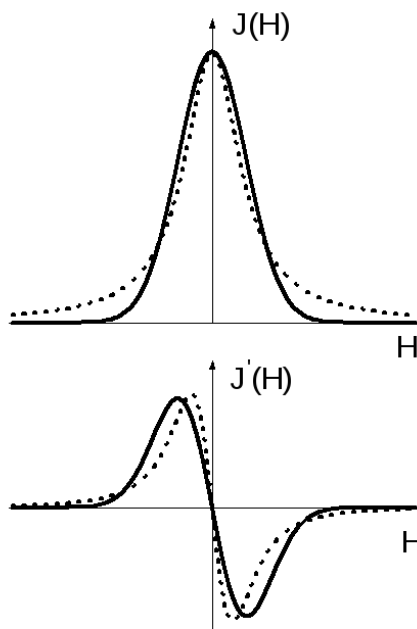


Рисунок 12.5. Сигнал ЭПР - производная от поглощения переменного магнитного поля

Сам сигнал ЭПР — это производная от величины поглощения (рис. 12.5).

Есть второй процесс. Все эти метки находятся в окружении, где есть различные магнитные примеси, которые тоже дают свой вклад. Они дают свои локальные поля, которые складываются или вычитаются из внешнего поля, что дает изменение реальной ширины расщепления (12.1).

$$H = H_0 \pm H'_{\text{лок}} = \Delta E \quad (12.1),$$

где  $\Delta E$  — разница между энергиями двух расщепленных уровней,

$H'_{\text{лок}}$  - сумма локальных полей

Это значит, что при измерении резонансного поглощения, положение уровней меняется. Если бы оно не менялось, мы бы точно нашли линию резонанса.

Повторяю, два процесса приводят к изменению первоначальной ориентации, то есть, положению его уровня. Один процесс — взаимодействие с решеткой, а второй процесс — влияние локальных магнитных полей. В результате получается соотношение неопределенностей для времени (12.2).

$$\Delta E \cdot \Delta t \sim \hbar \quad (12.2)$$

Это - ширина уровня, умноженная на время существования нашего спина в данном состоянии. Если это время бесконечно, то ширина уровня равняется нулю. Если это время конечно, то чем оно меньше, тем с меньшей точностью мы определяем его и тем больше ширина.

Если подвижность окружающей среды у нас небольшая, отдать энергию трудно, то время отдачи энергии будет большое. Значит, ширина уровня, связанная с передачей энергии белку, будет небольшая. У радикалов спин-решеточные взаимодействия очень незначительные и время существования этого уровня, за счет обмена энергии с решеткой, большое. А влияние магнитный примесей сильное. И оказывается, что если метка при этом вращается, быстро изменяет свое положение, то происходит усреднение и ширина уровня уменьшается.

По аналогии, нашу метку, на которую влияют магнитные неоднородности, можем представить в виде птицы, которая кушает из разных кормушек. Получается, каждая кормушка вносит свой вклад в состав пищи птицы. Тогда при условии, что еда не перемешивается в ЖКТ птицы, а двигается по нему последовательно, мы можем получить некий спектр его питания. На оси абсцисс отложим условный номер кормушки, а по оси ординат – съеденный вес пищи. Тогда площадь под этой кривой будет отражать суммарное количество съеденной еды. Площадь под кривой будет общий вес съеденной пищи. Это - сигнал ЭПР.

В случае, если птица начнет летать быстро между кормушками, она будет не успевать проглатывать еду, и она будет перемешиваться в ее зобе – таким образом она усредняет потребленную пищу. Это возможно если время перелета птицы меньше, чем время проглатывания пищи. В таком случае, вес еды будет представлен в виде столбика, а разброс по оси абсцисс будет отсутствовать – линия резонанса будет узкая.

Таким образом, как мы выяснили, усреднение влияний окружения будет зависеть от подвижности зонда, которая зависит от наличия свободного пространства. Формула зависимости будет выглядеть таким образом:

$$\Gamma = \Delta H \sim \frac{1}{T_{\text{exper}}} \sim \frac{1}{2T_1} + \frac{1}{T_2} \quad (12.3)$$

где  $T_2$  – время спин-спиновой релаксации,

$T_1$  – время спин-решеточной релаксации

Для свободных радикалов  $T_1 \gg T_2$ .  $T_2$  - время сохранения первоначальной ориентации спина, противостояние этим толчкам. Его толкают, он быстро крутится и все усредняется.

Путем серии расчётов, можно получить формулу, связывающую время вращения с шириной уровней (12.4).

$$\tau_c = 6,65\Delta H_{+1} \cdot 10^{-9} \left( \sqrt{h_{+1}/h_{-1}} - 1 \right) \quad (12.4)$$

Эти параметры позволяют посмотреть на это с точки зрения внутримолекулярной подвижности, и, как следствие, то, что я вам показал, - один из примеров наличия дегетерогенности распределения времен в белке (рис. 12.6).

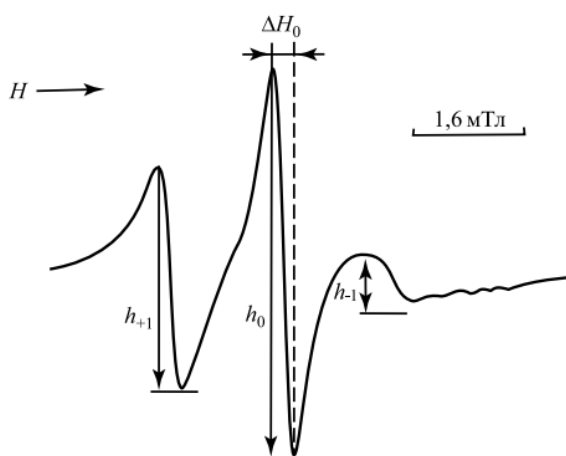


Рисунок 12.6. Спектр ЭПР парамагнитной метки

Рассмотрим еще пару примеров. В АТФ-синтазу вводится метка и получается спектр ЭПР. Мы можем взять активную и неактивную АТФ-синтазу. Оказывается, что ширина линии ЭПР активной молекулы меньше, чем в случае неактивной АТФ-синтазы. Или, например, миозиновая нить. Когда происходит гидролиз АТФ, происходит фиксация проявляется уширение линии. Когда комплекс метки с миозином раскрыт, метка свободно вращается и на спектре появляются три эквидистантные линии, как и должно быть в свободном состоянии.

Этот метод также можно использовать при анализе крови на наличие каких-либо веществ. Для этого берутся антитела к необходимому веществу и к ним добавляются меченные лиганды. Полученный комплекс антитела и лиганда добавляется к крови пациента. При наличии в крови пациента искомого вещества, оно будет вытеснять меченный лиганд, что отразится на спектре – появятся три четкие эквидистантные линии.

Теперь обсудим, что мы получаем в результате. Мы меряем времена внутримолекулярных движений, причем в широком диапазоне. Важно понимать, что у каждого метода есть свое окно временного разрешения. Например, если рассматривать родопсин, то время одного акта работы составляет порядка  $10^{-12}$  секунды. Первичное разделение зарядов в фотобиологических процессах – пикосекунды. Внутримолекулярные движения отдельных субъединиц измеряются временами порядка  $10^{-6}$ - $10^{-3}$  секунд. Есть расплавленные глобулы, которые предшествуют ферментативному, там времена уже более длинные.

Следующий вопрос в том, как представить все эти процессы в белке, ведь в самой глобуле они скоординированы. При этом фолдинг может длиться 100 секунд, а акт зрительной рецепции  $10^{-12}$  секунды, и оба этих процесса могут происходить в одном и том же белке. Значит времена внутримолекулярных движений могут различаться на 14 порядков в одной и той же молекуле, и все эти процессы могут быть скоординированы в пространстве и во времени.

Теперь второе замечание. Мы с вами нашли все объемные взаимодействия и посчитали, могут ли все эти объемные взаимодействия обеспечить самосборку глобулы. Вопрос в том, могут ли те расчеты совпадать с экспериментальными данными. Оказывается, что совпадают. Это значит, что мы правильно угадали все, что происходит в белке.

## Мессбауэровская спектроскопия

Теперь здесь встает другой вопрос. Мы определили характерные движения, времена внутримолекулярных движений, но мы не определили расстояние, на которое происходит смещение. Этому служит метод так называемой Мессбауэровской спектроскопии. Рассмотрим ферредоксин, содержащий атом железа. Сущность этого метода в том, что если мы облучаем гамма-квантами этот белок, то происходит поглощение квантов атомом железа. При этом, из-за большого уровня энергии гамма-кванта, происходит смещение атома. Это схоже с отдачей при выстреле из ружья. Энергия смещения очень небольшая – 0,002 эВ (электронвольт), по сравнению с гамма квантом, имеющим энергию порядка МэВ (мегаэлектронвольт). Но, в силу соотношения неопределенностей для времен, ширина уровня -  $10^{-7}$  эВ, то есть на фоне этой узкой линии поглощения видно смещение и, в зависимости от температуры, мы можем измерить величину смещения.

Мессбауэровская спектроскопия показала, что смещение происходит на расстояние порядка 0,5-1 Å, что соизмеримо с Мессбауэровским атомом и длиной химической связи.

Теперь мы знаем времена и знаем величины смещения. На основании этих данных можно произвести компьютерное моделирование молекулярной подвижности. Этот метод позволяет увидеть траектории внутримолекулярных движений. Этот метод применяется в данный момент при дизайне лекарств, или, например, при исследовании точечного мутагенеза.

Во время первых опытов по внутримолекулярной подвижности, удавалось рассчитать траектории до  $10^{-8}$  секунды, что было сильно меньше, чем время оборота фермента ( ~ миллисекунда). В последние годы на факультете для подобных расчетов стали применяться компьютерные кластеры и суперкомпьютер «Ломоносов», что приближает время моделирования к миллисекундам.

Мы не отказываемся от традиционной физики, химических, они работают внутри биологических систем, в которых соблюдаются исходные предпосылки Аррениуса. Однако внутримолекулярная динамика позволяет конкретно видеть, как сближаются белки, как они поворачиваются, как в них протекают различные процессы.

## Внутримолекулярная подвижность и ее роль в работе ферментов

Далее речь пойдет о ферментах. Рассмотрим энергетический профиль простейшей биохимической реакции (рис. 12.7).



Рисунок 12.7. Энергетический профиль биохимической реакции

Разница между начальным и конечным уровнями — это  $\Delta G$  реакции, или тепловой эффект реакции (12.5).

$$\Delta G \sim \Delta U \quad (12.5)$$

$\Delta G$  реакции пропорциональна движущей силе. Один из основных постулатов, которыми мы пользуемся заключается в том, что скорость реакции пропорциональна произведению концентраций (12.6).

$$V = K[A][B] \quad (12.6)$$

Константа скорости подчиняется выражению (12.7):

$$k = k_0 e^{\frac{\Delta E}{k_B T}} \quad (12.7)$$

Скорость химической реакции пропорциональна разности химических потенциалов. При этом, химический потенциал это (12.8):

$$\mu = \mu_0 + RT \lg C. \quad (12.8)$$

Еще один постулат в том, что все происходит независимо.

Рассмотрим изменение потенциальной энергии во время протекания реакции (рис. 12.8).

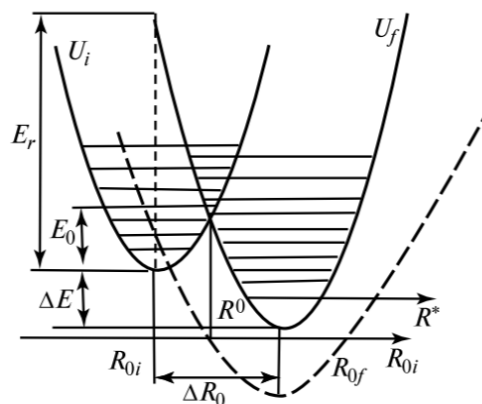


Рисунок 12.8. Изменение потенциальной энергии при протекании реакции

Потенциальная энергия начального состояния находится слева, справа – энергия продуктов реакции.

Кроме того, константа равновесия равна отношению констант прямой и обратной реакции (12.9).

$$K_p = \frac{\vec{k}}{\bar{k}} = e^{\frac{-\Delta\bar{E} + \Delta\vec{E}}{KT}} \quad (12.9)$$

Дальше мы говорим о ферменте. Ферменты, как всем известно, ускоряют биохимическую реакцию за счет чего, что уменьшается энергия активации. Возьмем логарифм константы Аррениуса (12.10).

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{\Delta E}{k_B T} \quad (12.10)$$

Если вы в экспериментах начинаете мерить константу скорости, вы строите кинетическую кривую – к примеру, зависимость появляющихся продуктов от времени (12.9). По этой кривой, если это - реакция первого порядка, производная - будет константа. Вы можете получить константу при разных температурах, обрабатывая разные кинетические кривые. Потом, взяв набор констант, строите зависимость  $\ln K$  от  $1/T$ . Тангенс угла наклона полученного графика и есть энергия активации  $\Delta E/k_B$ .

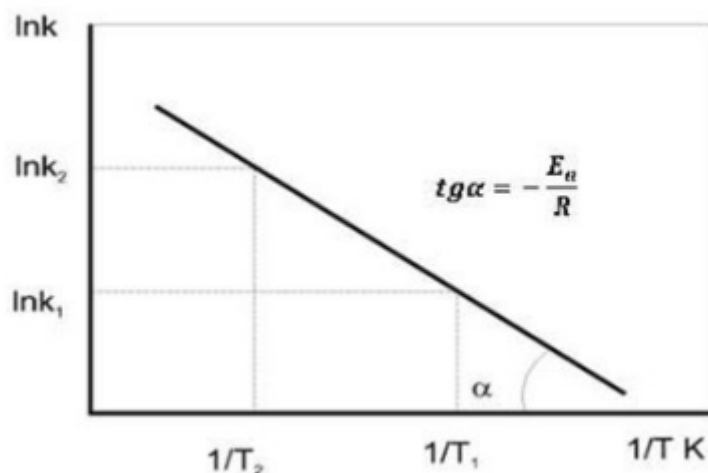


Рисунок 12.9. Графическое определение энергии активации.

Таким образом, фермент увеличивает скорость реакции, уменьшая энергию активации, и, тем самым, уменьшая наклон кривой зависимости от температуры.

В биохимии существуют классические представления о работе фермента. Для преодоления энергетического барьера реакции необходима свободная энергия  $\Delta F$  (12.11).

$$\Delta F = \Delta U - T\Delta S, \quad (12.11)$$

где  $\Delta U$  – изменение внутренней энергии,

$T\Delta S$  – изменение энтропии

Таким образом, для преодоления барьера необходимо попасть в активную конфигурацию. При этом у вас будет изменяться и  $\Delta U$  и энтропия. Как правило, энтропия при этом уменьшается, что увеличивает барьер. Снижение барьера происходит в основном за счет увеличения внутренней энергии.

В биохимии существуют две классические теории взаимодействия фермента и лиганда:

- Теория «Ключ-замок» (рис. 12.10), если у нас есть четкое соответствие между строением низкомолекулярного субстрата и строением активного центра
- Теория индуцированного соответствия («Рука – перчатка») (рис. 12.11). По ней фермент подстраивается под строение своего субстрата.



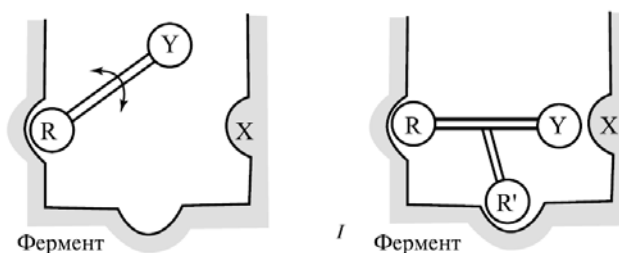


Рисунок 12.10. Модель "ключ-замок"

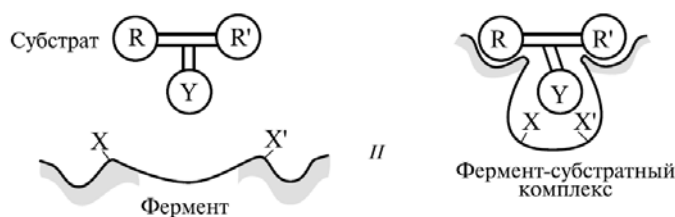


Рисунок 12.11. Модель индуцированного соответствия

К последней теории могут возникнуть возражения, т.к. барьер вроде бы не уменьшился, а даже наоборот, т.к. энергию на изменение конформации глобулы необходимо дополнительно затратить. Поэтому считается следующее: когда происходит взаимодействие субстрата и фермента, происходит сорбция субстрата - взаимодействие его с ферментом. Считается, что энергия сорбции при этом не тратится в тепло, а сосредотачивается на определенных связях в конформационных состояниях, которые потом используются для того, чтобы уменьшить влияния отрицательной энтропии.

Посмотрим, что такое активированный комплекс. В момент активации энергии молекул А и В повышаются, т.е. изменяются энергия взаимодействия  $\Delta U$  и энтропийный член  $-T\Delta S$  (12.12).

$$\Delta F = \Delta U^* - T\Delta S^*, \quad \Delta F \sim - \Delta E_{\text{акт}}$$

Фактически, уменьшить барьер можно двумя способами: сверху «срезать» или можно «поднять» снизу. Вспомним уравнение для константы скорости реакции (12.13)

$$K = \frac{k_B T}{\hbar} e^{\frac{\Delta S}{R}} \cdot e^{-\frac{\Delta U^*}{RT}} \quad (12.13)$$

В этом уравнении  $K$  – константа скорости,  $K_B T / \hbar$  – частота атомных колебаний,  $\kappa$  – вероятность перехода через барьер, когда он достигнут его. При этом  $K_B T / \hbar \sim 10^{12} \text{с}^{-1}$ .

В итоге, с точки зрения активированного комплекса ситуация определяется следующим образом: энергия сорбции не ушла в тепло, а аккумулировалась и находится в напряженной конформации. Кроме того, меняется энтропийный член.

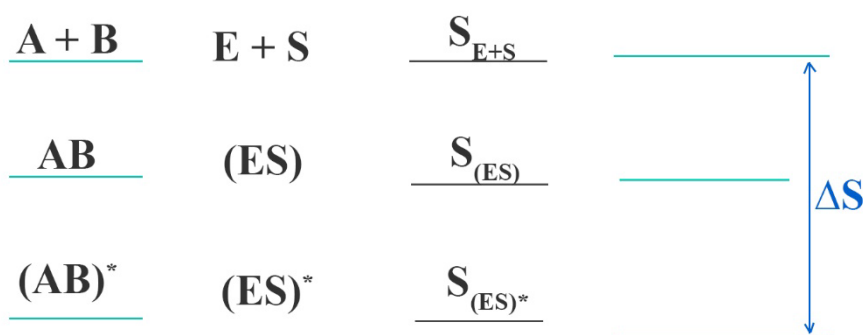


Рисунок 12.12. Схема изменения энтропии в ферментативной реакции

Представьте себе, что у нас идет реакция без фермента (рис. 12.12). Сначала  $A + B$  находятся в свободном, имея какую-то собственную энтропию. Теперь  $AB$  соединяется в комплекс, что должно привести к понижению энтропии. При активации энтропия понижается еще сильнее.

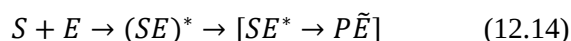
Роль фермента в этой схеме в том, что субстрат, связываясь с ферментом, уменьшает свою энтропию. Дальше, при активации этого активного комплекса, понижение энтропии, которое происходит, не такое большое по абсолютной величине. Поэтому, ускорение реакции происходит за счет того, что понижение энтропии не велико и не так сильно уменьшает константу, как если бы все происходило при свободных молекулах.

Представим себе следующую аналогию. Вы прыгаете на батут, упругая деформация подкидывает вас, вы перелетаете барьер. Но если спортсмен слишком легкий, то батут не прогнута, а значит ничего не получится. Батут в этом примере – конформация фермента. Можем представить, что кто-то первый раз прыгнув на батут прогнули его, но батут не выпрямился под ним обратно – энергия батута запаслась. Тогда, легкий спортсмен, веса которого недостаточно для деформации батута, сможет прыгнуть.

Таким образом, энергия накапливается в напряженных конформациях. Более того, было утверждение, что фермент устроен так, что энергия тепловых флуктуаций не рассеивается в тепло, а может накапливаться на выбранных степенях свободы. Возникает вопрос, а что это за флуктуации? Если это - обычные флуктуации, то это - нарушение второго закона термодинамики, что невозможно. А если это - необычные флуктуации, то откуда они берутся. Но возможность запасаения энергии в напряженных конформационных состояниях теоретически показана.

Например, у нас в белковой глобуле есть одноименные заряды, которые отталкиваются на каком-то расстоянии. Так вот, в напряженной конформации, в результате сорбции, они разошлись еще больше и остались в таком напряжении. Когда стали более серьезно заниматься этим вопросом и смогли выделить некоторые фермент-субстратные комплексы, стали рассчитывать внутримолекулярную динамику внутри, то оказалось, что никаких напряженных конформаций нет, то есть, создание напряженной конформации не является движущей силой катализа.

Современные представления заключаются в том, что катализ происходит спонтанно. Рассмотрим механическую аналогию. У нас есть пружина, состояние которой имитирует конформационное состояние белковой глобулы. Есть полочка с двумя скальпелями, это - активный центр. Реакция состоит в том, что субстрат, попав сюда, разрезается скальпелями. Теперь пришел субстрат и сел на полочку. При этом, изменилось электронное состояние активного центра и всей белковой глобулы в целом. Кислород подошел к атому железа в гемоглобине, немножко вдвинул его и пошел каскад конформационных изменений. Мы его имитируем тем, что у нас растянулась пружина якобы под действием силы тяжести. Дальше происходит активация фермента. Дальше произошел спонтанный разрез. И измененный субстрат в виде продукта покинул АЦ из-за изменения сродства с ним. В итоге получилось, что пружина растянута, а субстрата нет. Значит, электронное состояние опять вернулось в первоначальное, а конформационное состояние опять неравновесно, поэтому фермент возвращается назад. т.е. работает как челнок. Энергии активации внутри этого акта как таковой нет.



Рассмотрим схему 12.14-12.15. Сначала происходят проникновение субстрата, его активация и последующее образование продукта. Но, после образования продукта, фермент остается в активном состоянии, с точки зрения своего конформационного положения. После, продукт покидает активный центр и фермент возвращается в первоначальное состояние.

В довнутримолекулярнодинамическую эру слово "проникнуть" носило непонятный смысл. Все понимали: есть цитохром, внутри него - атом железа, туда проникает электрон. Как он проникает?

Вообще, непонятно. Вот пример, в белке приоткрывается полость, каждую микросекунду на угол 30 градусов, и туда субстрат может проникать. Он туда проникает и попадает в активный центр. Это попадание и укладывание в продуктивную конформацию занимает примерно  $10^{-2}$ - $10^{-3}$  секунды. Другой пример. Вы приходите вечером домой, в подъезде темно, и вы начинаете попадать ключом в замок. Теперь представьте себе, что сама замочная скважина начинается периодически двигаться. Возникает вопрос, будет вероятность попадания больше или меньше? В зависимости от частоты, т.е. если частота замочной скважины синхронизуется с вашей. В белке похожая картина, белок открывается и закрывается перед субстратом, а сам субстрат движется за счет тепловых движений.

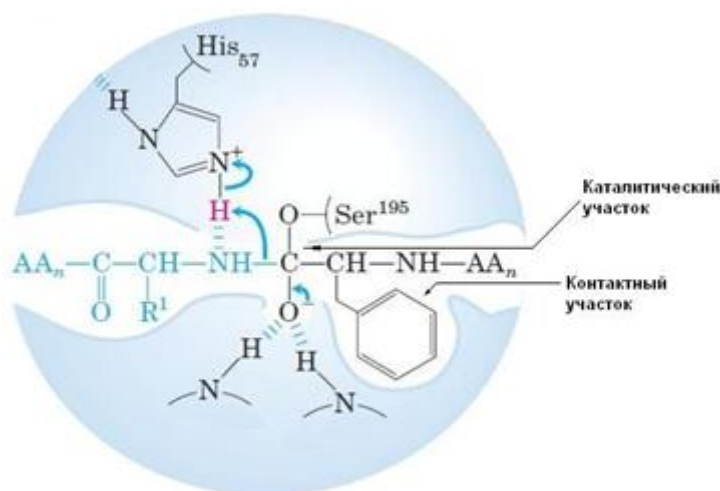


Рисунок 12.13. Активный центр химотрипсина

Очередной пример - работа фермента химотрипсина. Рассмотрим его активный центр (рис. 12.13), содержащий гистидин и серин. У серина есть кислород с двумя неподеленными парами, с ним связан протон. При этом, азот в гистидине дает водородную связь между азотом и водородом. Когда приходит пептид, ферменту надо из двойной связи сделать одинарную, тогда будет легче его разрушить. Чтобы уложиться в продуктивную конформацию, а именно, чтобы СО встало напротив гамма - кислородного атома, а N-H встал напротив протона, уходит некое время. Когда они уложились, дальше не надо никакой энергии активации, потому что расстояние в АЦ порядка длин химических связей. На это уходит время  $10^{-2}$ - $10^{-3}$  секунды. Фактически получается, что проникнуть в фермент даже легче, чем в нем уложиться в конформацию.

Если рассматривать механизм взаимодействий, то получится, что весь акт реакции, с точки зрения кинетики, можно представить в виде реакции четвертого порядка. Вероятность этой реакции в растворе ничтожна, но она имеет место быть а ферменте.

Когда мы говорим о влиянии температуры на скорость ферментативной реакции, то, формально, мы используем энергию активации, но это не энергия активации в классическом Аррениусовском смысле, это не преодоление активационного барьера за счет соударений.

Температура, собственно, влияет на молекулярную динамику, но это - подготовка. В этом - хитрость и сложность ферментативных процессов.

Не могу удержаться от аналогии. Когда мы проходим коллективный медосмотр, мы можем прорваться в один из кабинетов без очереди, но подобное поведение во всех кабинетах будет требовать очень много энергии. Фермент в этой аналогии, это кабинет, полный врачей, готовых вас осматривать. Они кладут вас на операционный стол, и каждый занимается своим делом. Никакого нарушения второго закона нет, вся энергия идет, чтобы вас на стол положить, а дальше все идет само.

## Лекция 13. Механизм переноса электрона. Молекулярные моторы

Сегодня рассмотрим две проблемы:

1. перенос электрона, механизм и для чего это нужно.
2. молекулярные моторы, движущие силы, АТФ-аза, АТФ-синтаза

Также посмотрим, как кинезин тащит меланому вдоль микротрубочки. Мы привыкли, что это происходит за счет энергии АТФ. Но мы проходили термодинамику и смотрели на  $\Delta G_0$ , а теперь попробуем это сочетать с процессом фосфорилирования.

### Перенос электрона

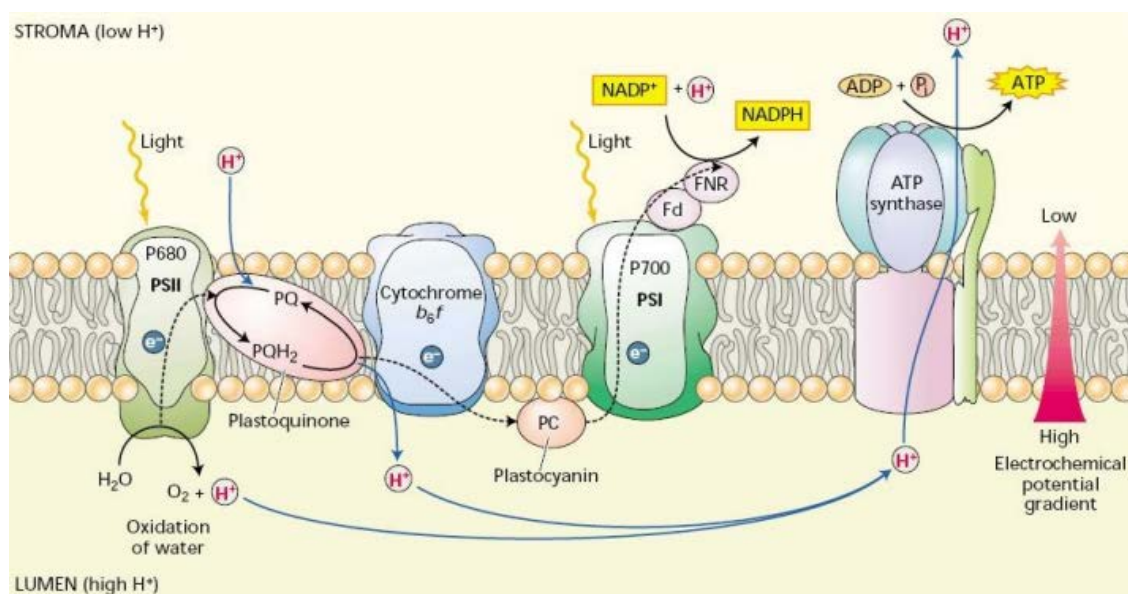


Рисунок 13.1. Схема ЭТЦ хлоропласта растений

Рассмотрит ЭТЦ хлоропласта (рис. 13.1). Внутри это схоже с тем, что делает субстрат, как он проникает в фермент, в глобулу за счет молекулярной динамики, как он там укладывается и почему все это происходит быстро.

Перенос электрона - особый случай. Почему он происходит быстро? Когда мы говорим, что субстрат лег в продуктивную конформацию в случае пептидной связи, мы либо можем в экспериментально выделить эти фермент-субстратные комплексы, либо можем рассчитать

это методами молекулярной динамики. Но экспериментально эти процессы внутри реально смотреть очень трудно, т.к. мы должны дать быстро субстрат и дальше смотреть методами ЯМР, ЭПР, флуоресцентными метками. Но мы не можем дать быстро субстрат, потому что время смешения субстрата с ферментом в 100 раз более длительный процесс чем время элементарного акта взаимодействия, поэтому кинетику там не увидеть.

Фотосинтез же мы можем запустить очень быстро, за счет коротких лазерных импульсов, порядка фемтосекунды (это  $10^{-15}$  секунды).

В фотосистеме 2 находится специальная пара – P680, получающая возбуждение от светособирающей антенны, и передающая через ряд переносчиков заряд с одной стороны мембраны на другую за очень короткое время. Вопрос – как? Ведь эти переносчики сидят внутри белка неподвижно

Вначале были теории, что электрон переносится в белке так, как в полупроводнике. У полупроводника есть кристалл, у него есть валентная зона, они все связаны между собой. Кроме того, есть зона проводимости, и электрон туда забрасывается, а дальше сваливается на всякие примесные ловушки. Однако, это оказалось неверно, т.к. полупроводниковая теория — это энергетическая теория для идеальных кристаллов, а белок не имеет регулярной решетки, нет протяженной зоны проводимости.

Что примечательно, перенос электрона проходит на больших скоростях, в начальной стадии переноса –  $10^{-12}$  секунды, потом происходит замедление, до  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ , и постепенно происходит замедление до  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  секунды. Замедление связано с деятельностью подвижных переносчиков: пластохинона, пластоцианина, ферредоксина. Эти переносчики работают с нормальными временами, порядка миллисекунды, это - время ферментативных реакций. Поэтому замедление происходит для того, чтобы сделать электрон доступным для обычных ферментативных реакций.

Давайте посмотрим, относится ли перенос электрона к химическим реакциям, связан ли он со столкновениями и, как следствие, зависит ли от температуры, или относится к физическим реакциям, от температуры не зависящим.

## Бактериальный фотосинтез

Вы знаете, что существует бактериальный фотосинтез, где донором электрона, вместо воды, служат органические соединения, сероводород, кислоты.



Бактериохлорофилл получает световое возбуждение, после чего от него отрывается электрон, который переходит на цепь хинонов.

Времена переноса:

- меньше 3 пикосекунд это меньше чем  $10^{-12}$  секунды,
- 150 пикосекунд,
- 100 микросекунд,
- миллисекунды

Высокая скорость переноса в этой системе связана с борьбой с АФК, чтобы кислород не успел схватить лишний электрон. Более того, данный процесс происходит на расстояниях 10-21 Å. Возникает вопрос, как электрон не двигаясь, может за такое короткое время пробежать такое большое межмолекулярное расстояние.

Когда электрон уходит, в бактериохлорофилле появляется положительная дырка, она заполняется за счет электрона, который идет через по цитохромной цепи от цитохрома. Эта реакция занимает две микросекунды. Но каков механизм этого процесса и какова роль белкового окружения?

## Туннельный эффект

Рассмотрим экспериментальные данные. Фотоактивный пигмент, после воздействия вспышки света, почти мгновенно отдает электрон, что отражается на его спектре, и в нем возникает положительная дырка, которую он заполняет от цитохрома. Посмотрим, с какой скоростью происходит восстановление пигмента при разных температурах. Данный эксперимент был впервые сделан в американской лаборатории Бриттоном Чансом и его коллегами. Они стали понижать температуру и смотреть, как меняется константа скорости восстановления пигмента, или окисления цитохрома. Эта реакция имеет фундаментальный биологический смысл, потому что это - снабжение электронами нашего пигмента. Оказалось, что константа скорости реакции понижается при уменьшении температуры до 100 K, а дальше, в интервале от 100 K до абсолютного замерзания, она не меняется (рис. 13.2). Это значит, что это биологически осмысленная реакция переноса электрона,



имеющая фундаментальный энергетический смысл и в широком диапазоне от температуры не зависящая.

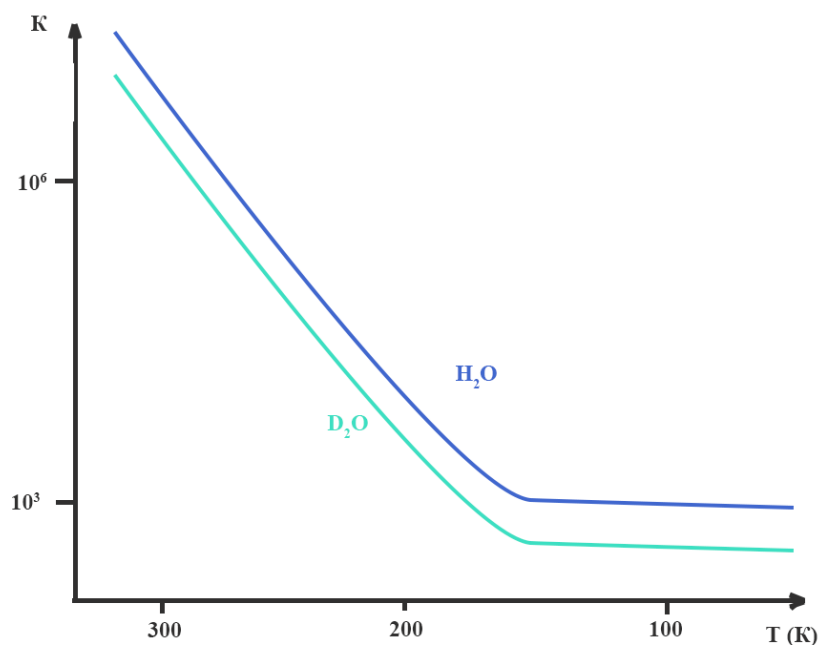


Рисунок 13.2. Зависимость скорости реакции восстановления бактериохлорофилла от температуры, при использовании воды разной тяжести

Теперь рассмотрим влияние белкового окружения. Для его изучения можно перевести дейтерирование, тем самым утяжелив их, т.к. это должно сказаться на движении нашего окружения. В таких условиях кривая будет иметь схожую форму, но константа окажется меньше примерно в 1.5 раза.

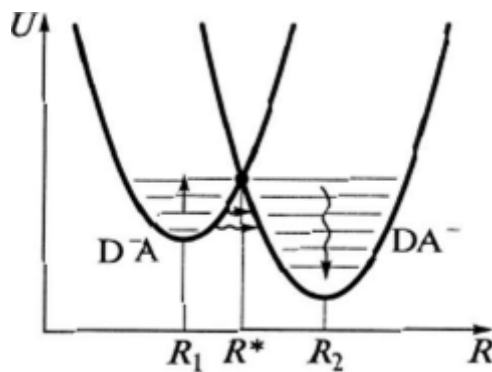


Рисунок 13.3. Электронно-колебательные взаимодействия при туннелировании электрона

Было предложено объяснение данного перехода при применении теории туннельного эффекта (рис. 13.3). Допустим, электрон находится в потенциальной яме в молекуле цитохрома (слева), и, по нашей реакции, он должен переместиться в молекулу пигмента (справа). Совершению данного перехода мешает потенциальный барьер. Однако, квантовая механика показывает, что вероятность перехода все равно есть. Благодаря туннельному эффекту, электрон может просачиваться через барьер.

Однако серия экспериментов показала, что реальная эффективность переноса электрона - 100%, тогда как квантовый эффект говорит, что при наличии двух потенциальных ям, вероятность найти электрон в одной из ям, будет приближаться к 50%, получатся квантово-механические колебания. Это значит, что за время нахождения электрона на виртуальном уровне, на котором он оказывается в результате туннелирования, он должен потерять часть энергии. Тогда разница в энергиях будет препятствовать переходу электрона назад. Отданная электроном энергия распределяется в окружающую среду. При изменении массы окружения (ее дейтерировании), она становится менее восприимчива к этим процессам, что может дополнительно сказываться на переносе электрона.

Константа скорости подбарьерного перехода выражается следующим образом (13.1):

$$K = \frac{K_0 T}{\hbar} e^{\frac{-2L\sqrt{2m(U_0-E)}}{\hbar}} \quad (13.1),$$

где  $L$  – расстояние между уровнями,

$m$  – масса электрона,  $(U_0 - E)$  – высота барьера,  $\hbar = \frac{h}{2\pi}$

Есть формула, которая показывает вероятность туннельного эффекта (13.2):

$$\frac{e^{-\frac{L\sqrt{2m\varepsilon}}{\hbar}}}{e^{-\frac{\varepsilon}{k_0 T}}} > 10 \quad (13.2),$$

где  $\varepsilon$  – энергия активации

Числитель дроби - вероятность перехода электрона по туннельному эффекту, а знаменатель - вероятность надбарьерного активационного перехода. Оказалось, что вплоть до 700 К туннельный эффект в десять раз выше по скорости, чем обычный Аррениусовский переход.

Таким образом, туннельный перенос - не экзотика, а активный механизм, который работает в реакциях при комнатных температурах.

Кроме того оказывается, что в белке от донора к акцептору есть различные электронные пути и эти пути идут по  $\sigma$ -связи (рис.13.4). Это очень важно, потому что, как мы уже говорили, полупроводниковая теория нам не подошла, т.к. для нее нам нужен идеальный кристалл. В белке же  $\sigma$ -связи изгибаются, и электрон может следовать по ним.

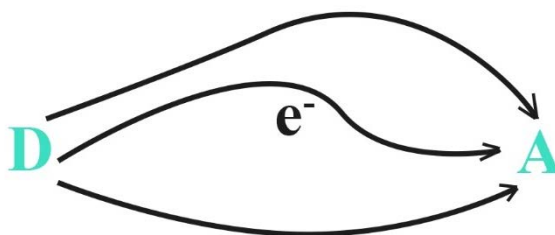


Рисунок 13.4. Траектории перемещения электрона от донора к акцептору

В данной теории, на первый взгляд, может возникнуть несостыковка. Дело в том, что перенос электрона происходит за время порядка микросекунды, тогда так колебательная релаксация, которая замедляет перенос электрона длится порядка  $10^{-11}$ - $10^{-12}$  что сильно короче, чем микросекунда, за которую приходит электрон.

Перенос электрона можно наблюдать по изменению спектра  $P^+$ , в процессе его восстановления. Этот эксперимент проводится для пигмента в растворе, тогда как реальный процесс туннелирования наблюдается в белке. Спектрально они будут похожи, тогда как времена будут отличаться, чтобы «раскачать» окружение в в белке нужно больше времени. Поэтому мы замедляем не просто колебательную релаксацию, а колебательную конформационную релаксацию всего окружения, которое окружает пигмент, получивший электрон.

Соответственно, недостаточно рассматривать просто перенос, необходимо рассматривать весь комплекс вместе. Вернемся к рисунку 13.3, где отображена потенциальная энергия нашего комплекса. Слева на схеме изображена вершина этой параболы, которая соответствует электронному уровню в начальном состоянии, когда электрон находится на доноре, справа – на акцепторе. Горизонтальные линии на схеме - потенциальные энергии

колебания ядер. Получается почти Аррениусовская диаграмма: есть начальное состояние, энергетический барьер (в точке  $R^*$ ), откуда происходит падение в потенциальную яму. Отличие будет в том, что преодоление этого потенциального барьера будет происходить и в отсутствии тепловой энергии. Это происходит потому, что у нас происходит не просто туннелирование электрона, ядра тоже туннелируются. В действительности кривые потенциальной энергии не имеют четной границы, эти линии размыты, и ядра могут достигать точки барьера, а электрон – туннелировать вслед за ними. После этого, во время первичной релаксации, происходит начальная фиксация электрона, что вызывает волну конформационных изменений. Точно так же, как кислород связывается с железом в гемоглобине: вначале образуется связь, и только позднее идут конформационные изменения.

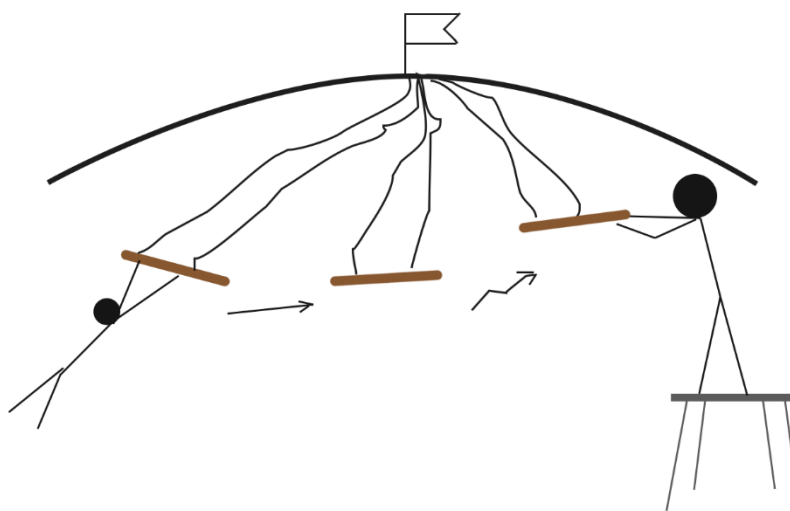


Рисунок 13.5. Иллюстрация к аналогии с цирком

Можно провести аналогию с цирком (13.5). В этом примере артист, прыгающий с одной трапеции на другую – электрон, туннелирующий от донора к акцептору. Вначале артист, который стоит на помосте, кидает трапецию своему товарищу. Когда трапеции сблизятся – произойдет туннелирование электрона. Далее происходит фиксация, он сразу теряет часть энергии, цепляясь за новую трапецию, а дальше идут конформационные изменения более высокого порядка. Они затрагивают остальную глобулу и происходит уже окончательно изменение конформации, на которое необходимо большее время. Таким образом, в начале

релаксация происходит быстро, а дальнейшая, более крупномасштабная релаксация, идет с задержкой.

Когда при этих крупномасштабных изменениях комплекс переходит в определенное взаимное положение, происходит туннелирование (рис. 13.6). Это значит, что меняется электронное состояние комплекса, и электрон начинает идти по другой траектории. Достигнув другой молекулы, туннелирование может произойти в обратную сторону. Таким образом, перенос электрона должен быть сопряжен с внутримолекулярной подвижностью.

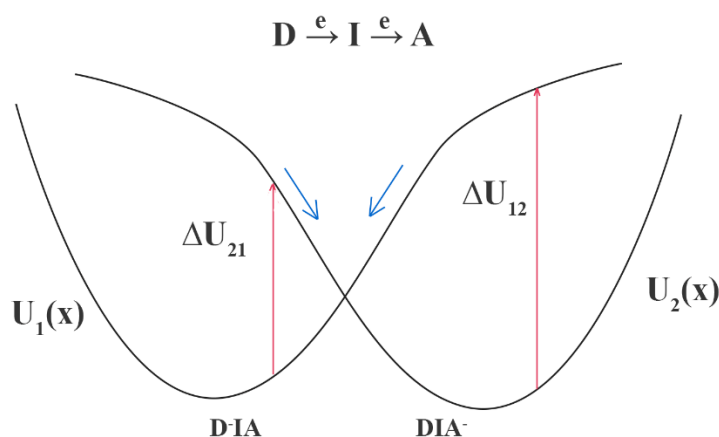


Рисунок 13.6. Энергетические переходы донора и акцептора в процессе туннелирование электрона

Рассмотрим примеры, где туннелирование наблюдается экспериментально (рис. 13.7). На графике А можно наблюдать зависимость характеристик переноса от температуры. Кривые 2 и 3 – внутримолекулярная подвижность, кривая 1 - эффективность переноса. На данном графике видно, что падение внутримолекулярной подвижности влечет за собой падение эффективности переноса электрона.

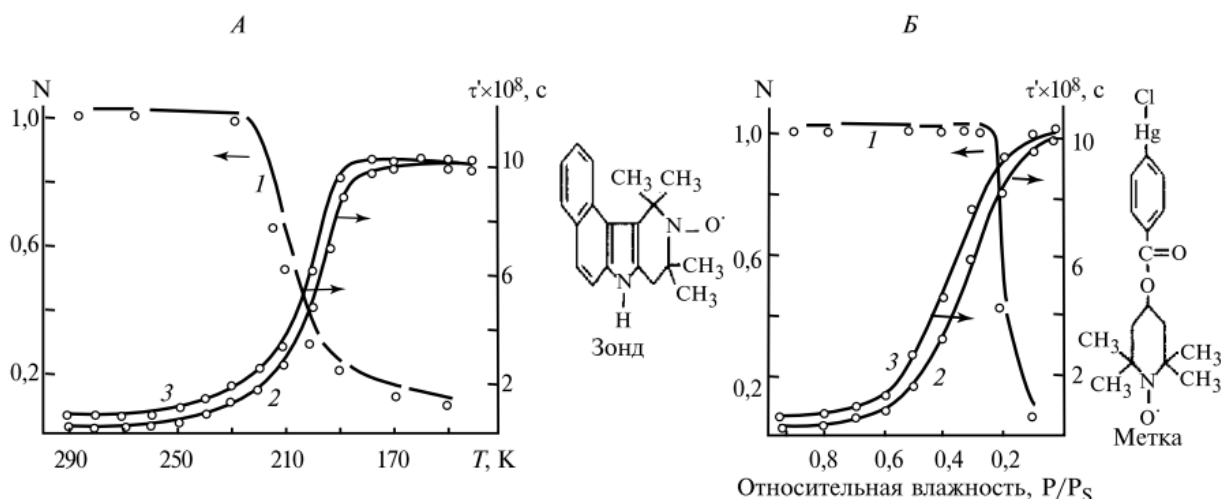


Рисунок 13.7. Эффективность переноса электрона (1) и конформационная динамика (2,3) реакционных центров в спин-меченых хромофорах в зависимости от температуры (А) и влажности (Б)

Также на рисунке изображены используемые спиновые метки, слева – гидрофобная, держится гидрофобными силами. Кроме того, подвижность может падать при высушивании (рис.13.7 Б). Когда подвижность уменьшается, время растет и эффективность падает.

На одной из прошлых лекций было рассказано о методе мессбауэровской спектроскопии, который позволяет смотреть смещение за счет энергии отдачи при поглощении и испускании  $\gamma$ -квантов. Рассмотрим рис. 13.8. По левой вертикальной оси отложено смещение, а по правой - эффективность переноса. Здесь видно, что при повышении температуры резко возрастает эффективность переноса. Если убирать воду из образца, ничего не получается, и перегиб не будет наблюдаться.

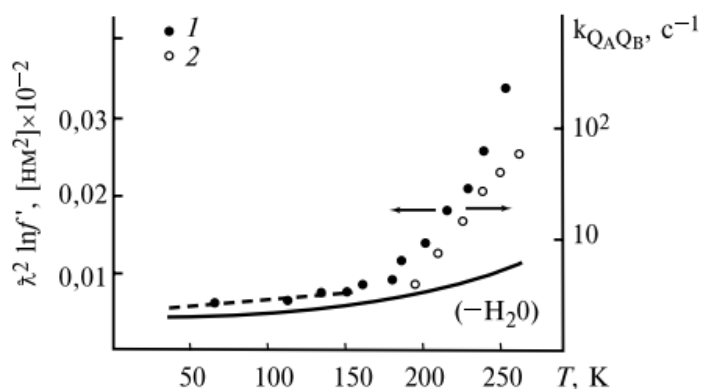


Рисунок 13.8. Температурная зависимость характеристик переноса электрона от первичного хинонного акцептора ко вторичному для хроматофоров.

Перегиб - очень хитрая точка, он очень часто наблюдается во всех крио-экспериментах с биологическими объектами. Ее называют по-разному: стеклование белка, изменение фазового состояния белка.

Есть два масштаба смещения. Вначале, когда происходит фиксация электрона, первоначальная потеря энергии, смещения – небольшие,  $< 0,01 \text{ \AA}$ . Это намного меньше Ван-Дер-Ваальсовского радиуса. Но, когда у нас происходят конформационные изменения, или иначе конформон - волна конформационных изменений, происходит большее смещение,  $> 1 \text{ \AA}$ . Это много в масштабах белка. Как вы помните, Ван-Дер-Ваальсовские радиусы -  $2-3 \text{ \AA}$ , длина химической связи -  $1,2-1,4 \text{ \AA}$ . Соответственно, резко меняются времена смещения и времена подвижности. Соответственно, когда у вас низкая температура - молекула «зажата», а когда она размораживается – появляются свободные места.

Краткий итог:

- Туннельный эффект — это подбарьерный перенос электрона с потерей части энергии для его фиксации и предотвращения обратного переноса.
- Этот эффект остается более эффективным и при комнатных, и при низких температурах, и при всех других, при которых возможен надбарьерный перенос.

Теперь попробуем схематически изобразить перенос электрона (рис. 13.9).

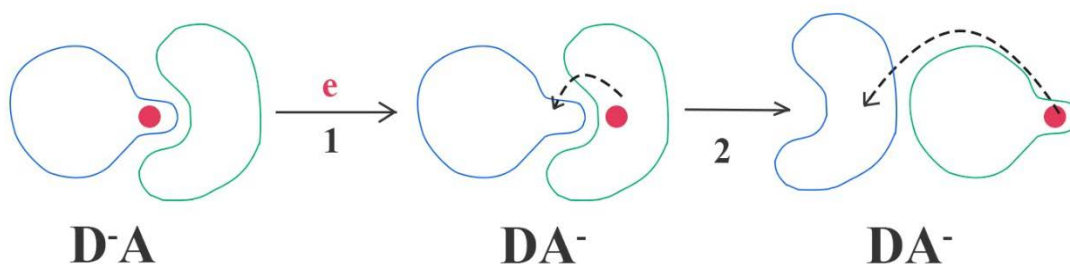


Рисунок 13.9. Схема переноса электрона в донорно-акцепторном комплексе.

1- туннелирование электрона, 2 - конформационные изменения

На схеме изображены изменения донорно-акцепторного комплекса, участвующего в ЭТЦ. Сначала происходит туннелирование и следующая за ним релаксация. Электрон может вернуться назад, но это маловероятный процесс, т.к. уже произошла его релаксация. Дальше идут конформационные изменения: донор опять принимает конформацию, в которой он может принять электрон от своего донора, т.е. его конформация без электрона и с электроном отличается. Акцептор тоже меняет свою конформацию, упрощающую дальнейшую передачу электрона по цепи. Однако, даже из такого состояния электрон может вернуться к донору, но с еще меньшей вероятностью, чем на предыдущем этапе. При замораживании комплексов в разном состоянии можно определить время обратного перехода электрона при разных состояниях комплекса. Также, в ходе этих экспериментов было установлено, что время конформационного переход (процесс 2 на рис. 13.9) составляет примерно 1 мс, что соотносится со временем обычной ферментативной реакции. В биохимии часто приводится аналогия переноса электрона с бегом или спуском шарика по ступенькам. Как и человек, который спускается по лестнице, электрон идет по цепи редокс-переносчиков. При этом энергия, которая уменьшается при каждом переходе, уходит в тепло. Но, например если мы сделаем сопряжение с работой АТФ-синтазы, то энергия уйдет на ее работу. При этом, чем меньше ступени этой лестницы, тем мы ближе к равновесию и тем КПД больше. Эту аналогию можно дополнить, если принять, что каждая ступень под весом человека немного наклоняется вниз для того, чтобы человеку было проще спускаться дальше вниз, чем подниматься обратно.



## Работа АТФ-синтазы

Напомним строение АТФ-синтазы (рис. 13.10). мембранная часть состоит из ротора и статора, ротор, в составе которого от 10 до 14 с-субъединиц, вращается, приводя в движение  $\gamma$ -субъединицу. Последняя связана с роторной частью и вращается внутри цитоплазматического комплекса.

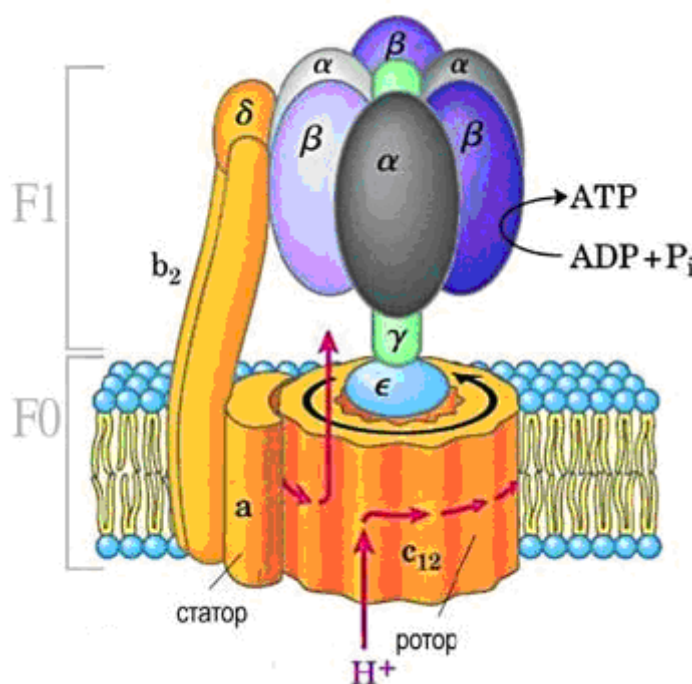


Рисунок 13.10. Строение АТФ-синтазы

Кроме того, в АТФ-синтазе выделяют две компоненты:

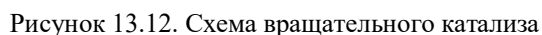
- Мембранную -  $F_0$
- Цитоплазматическую -  $F_1$

В составе  $F_1$  есть субъединицы  $\alpha$  и  $\beta$ , несущие активные центры.

Рассмотрим движущую силу вращения и его биологический смысл. Японские ученые показали, что в ходе работы АТФ-синтазы происходит вращательный катализ (рис. 13.11). В ходе эксперимента они прикрепили к белку нить актина с флуоресцентной меткой, по которой можно было отслеживать повороты.



Рассмотрим, как происходит вращение. В  $\beta$ -субъединицах находятся активные центры. Работа белка состоит в том, что из АДФ и фосфата образуются АТФ и вода. Происходит это схематически таким образом: внутри  $\alpha\beta\beta_3$ -участка вращается  $\gamma$ -субъединица. Вначале входят в активный центр АДФ и фосфат, после – из АДФ и фосфата образуется АТФ, и, в конце, сродство к АТФ должно упасть и активный центр высвобождает АТФ и вместо него присоединяет АДФ (рис. 13.12). Важно понимать, что эти переходы происходят в активных центрах под действием вращения, но  $\alpha\beta\beta_3$ -участок закреплён, движется именно  $\gamma$ -субъединица. Движущая сила всех этих вращений определяется  $\Delta pH$  и  $\Delta\psi$ .



Давайте посмотрим, в чем состоит фактически механизм вращения. В белке есть полуканалы, которые забирают протоны из зоны низким рН и передают их наружу, при

этом совершая полный оборот. Первоначально проводилась аналогия этого механизма с водой, которая бьет по лопастям турбины и соответственно, заставляет ее крутиться. Это - общая теория, значит из общих соображений, соответственно, она и опровергается: наши протоны не находят в ускорителе, мы не можем использовать их кинетическую энергию, это - конденсированная среда и никакого свободного пробега по всему каналу нет.

Если заморозить АТФ-синтазу, то движения в ней остановятся. Значит, движущие силы вращательного катализа – тепловые движения, а тепловые движения представляют из себя колебания. В нашем же случае есть определенный вектор вращения. Демон Максвелла, который отбирает горячие и холодные молекулы, не работает.

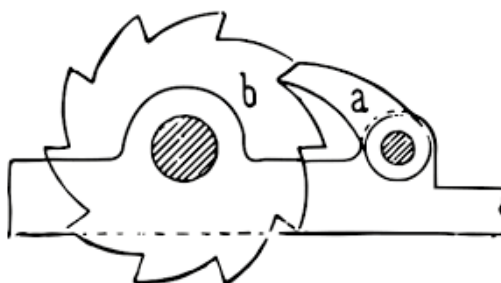


Рисунок 13.13. Схема храпового механизма

Чтобы показать возможность придания векторного характера этому движению, рассмотрим модель храповика (13.13). Храповик - зубчатое колесо, которому специальная защелка не дает крутиться в обратную сторону. Допустим, мы ее крутим туда-сюда, вперед – идет, назад – нет. При таком движении, колесо храповика может двигаться в определенном направлении. Значит, никакого нарушения закона термодинамики нет.

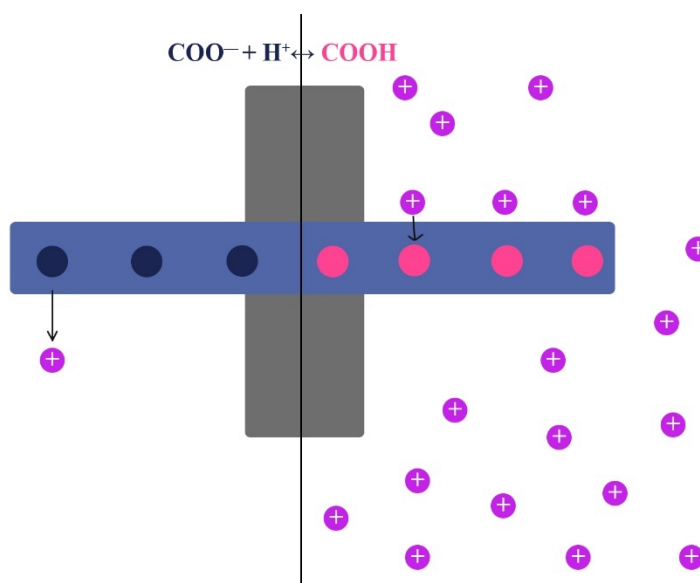


Рисунок 13.14. Иллюстрация к примеру с перемещением стержня через мембрану

Теперь представим себе гидрофобную мембрану, через которую проходит легкий стержень, такой, что тепловые флуктуации будут пытаться вращать его в разные стороны. Храповик из подобного стержня можно сделать следующим образом: по обе стороны мембраны установим разный pH, а в стержень поставим аминокислоты, несущие COOH-группы. В кислой среде, карбоксигруппы будут находиться в недиссоциированном состоянии, равновесие будет сдвинуто в сторону нейтральных форм, а при переходе в зону с высоким pH будут диссоциированы, и они будут снова в заряженном состоянии.

Теперь вы знаете, что ионы не проникают в гидрофобную мембрану, потому что энергия иона прямо пропорциональна заряду, обратно пропорциональна радиусу иона и обратно пропорциональна диэлектрической постоянной среды. Это значит, что энергия иона в мембране велика, она будет примерно в 20-40 раз больше. При этом протон, связанный COO<sup>-</sup> - группой будет компенсировать заряд этой группы и в таком составе она спокойно пересечет мембрану. Нарушения закона термодинамики нет, почему потому что вся работа происходит за счет изменения pH.

Вернемся к строению АТФ-синтазы. Каждый полуканал имеет аминокислоту Asp-61, которая присоединяет протон, нейтрализуя свою группу. Когда происходит толчок, полуканал входит в мембрану, а когда за счет толчков полуканал доходит до полукружного канала статора, протон высвобождается в зону с высоким pH и Asp-61 переходит в заряженную форму. Рядом, в статоре, сидит аргинин, его заряд – положительный, он

придерживает диссоциированный Asp-61, но недостаточно сильно, чтобы предотвратить его сдвиг при новом толчке. Назад ротор не пойдет по той же причине, что и не идет назад стержень из прошлого примера.

Далее обсудим смысл вращения. Гамма-субъединица, при вращении, последовательно меняет состояние активных центров. Аналогия к этому процессу – курица на вертеле. Курица вращается на вертеле (гамма-субъединице), подставляя свои бока огню – белковым субъединицам. Кроме того, гамма-субъединица вращается не симметрично, т.к. ее бока не равнозначны. Молекулярно-динамические расчеты показывают, как происходят эти движения, а их смысл именно в регулировании активных центров.

При работе АТФ-азы происходит разложение молекул АТФ, т.к. за счет нее происходит вращение  $\gamma$ -субъединицы. Когда в  $\beta$ -субъединицу попадает АТФ,  $\beta$ -складка толкает гамма-субъединицу. Механизм заключается в том, что АТФ образует водородные связи с белковым окружением  $\beta$ -складки, сжимая ее. Стягиваясь, она толкает гамма-субъединицу, после чего происходит гидролиз АТФ и поэтому говорят, что процесс идет за счет энергии АТФ.

Формально мы можем написать, что энергия, которая освобождается, это - логарифм концентрации. Если мы возьмем 7 килокалорий на моль, на одну молекулу мы получим порядка 0,2-0,3 эВ. Важно понимать некоторую условность этого способа энергетической оценки, не привязанной к конкретному механизму как таковому. Связь - в том, что логарифм отношения констант прямой и обратной реакции равен  $\Delta G$  – тепловому эффекту реакции. Тот факт, что скорость реакции пропорциональна тепловому эффекту значит, что чем больше тепловой эффект, тем больше разность между уровнями начальных и конечных продуктов, а чем меньше константа обратной реакции, тем общая скорость больше будет. Это связано с тем, что правило преодоления активационного барьера работает для каждой из молекул.

## Меланосома

По микротрубочке меланосому тащит кинезин, моторный-белок (рис.13.15). Происходит данный процесс за счет энергии АТФ. Оказывается, когда идет гидролиз АТФ и АДФ покидает белок, изменяется подвижность спиновой метки и связь ее с микротрубочкой

различная. Когда АТФ связан с ножкой кинезина или нуклеотида нет, подвижность маленькая. Когда АДФ есть, подвижность большая.

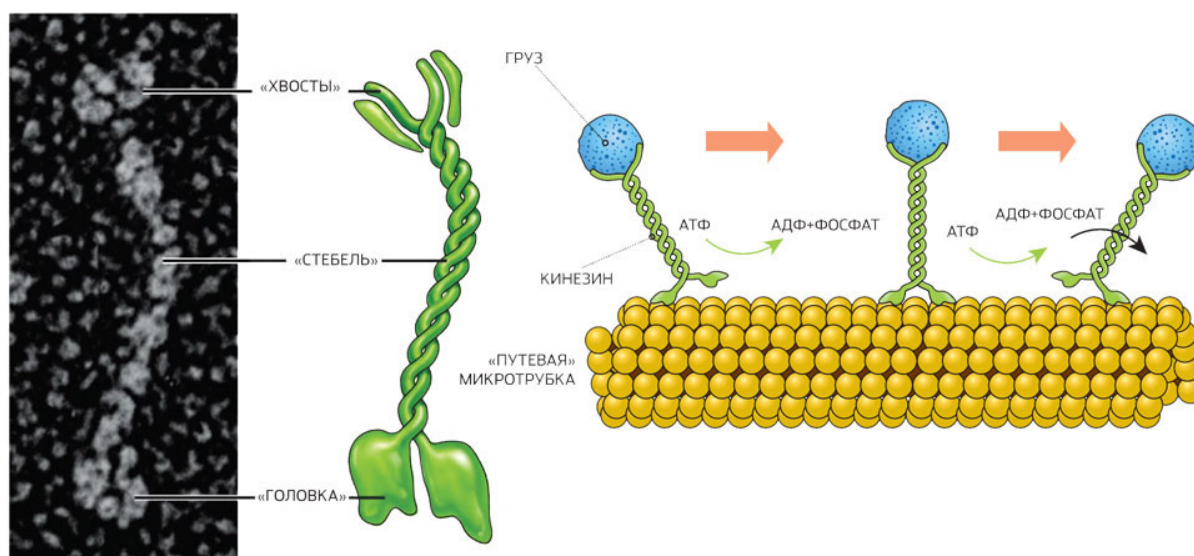


Рисунок 13.15. Строение и схема работы кинезина

При движении нужно производить две вещи: закреплять одну ножку в начале и дать возможность двигаться второй ноге.

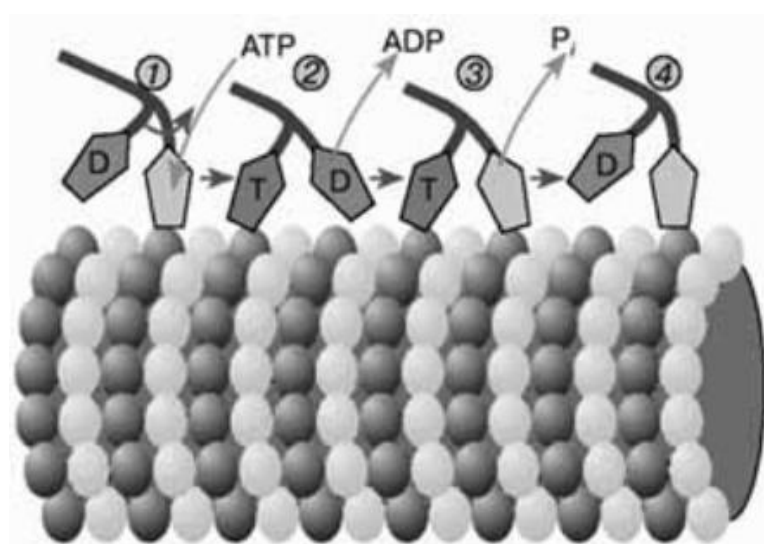


Рисунок 13.16. Механизм работы кинезина

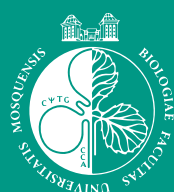
За счет энергии АТФ меняется сродство (рис. 13.16). Это показывают данные ЭПР. Видимо, водородные связи играют ведущую роль в актах движения кинезина.

## Роль АТФ

Роль АТФ — это глубокая вещь. На первой лекции мы говорили о том, что представления физхимии надо как-то интерпретировать, и очень много тайн связано в простых движениях. В этом курсе были показаны примеры, когда происходит векторный характер стохастических толчков.

АТФ - универсальная энергетическая валюта клетки, включает в себе 7 килокалорий. Она везде влезает, все делает. Безусловно, большую роль играют водородные связи в этой молекуле.

Это похоже на то, что в гостинице у каждого есть ключ от своего номера и соответственно свой номер, а есть еще отмычка у администратора. Вас нет, но он может прийти и открыть ваш номер. АТФ - это такая отмычка, которая лезет во все места и везде она может делать чего хочет.



БИОЛОГИЧЕСКИЙ  
ФАКУЛЬТЕТ  
МГУ ИМЕНИ  
М.В. ЛОМОНОСОВА



*teach-in*  
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

