

ВСТУП

[1], с.5-7, [2], с.9-13, [4], с.3-4, [6], т.1, с.6-8, [7], с.8-11

Фізика вивчає будову і властивості видів матерії – речовин і полів, та форми існування матерії – простір і час. Фізика складається з окремих розділів, кожний з яких вивчає певний клас питань і об'єктів. Деякі з них, в т.ч. біофізика, виділились в окремі науки.

Біофізика вивчає фізичні механізми і фізико-хімічні процеси, які лежать в основі життєдіяльності біологічних об'єктів. **Біофізика** – це фізика живих систем на всіх рівнях їх організації – молекулярному, мембранному, клітковому, органному, популяційному, біосфери.

Біофізика – наука, вивчаюча фізичні властивості біологічних об'єктів, фізичні і фізико-хімічні процеси, які відбуваються в цих об'єктах і лежать в основі їх функціонування.

Біофізика – наука про найпростіші і фундаментальні взаємодії, що лежать в основі біологічних явищ. Теоретичні побудови і моделі біофізики ґрунтуються на фізичних поняттях енергії, сили, типів взаємодії, термодинаміки, теорії інформації тощо. Ці поняття відображають природу основних взаємодій і законів руху матерії, що складає предмет фізики.

Біологічні закони базуються на загальних закономірностях фізики і хімії. Послідовний розгляд різних проявів життя з позицій цих наук зовсім не залишає місця для ідеалістичного та віталістичного трактування життя.

Біологічні форми руху складні, але вони включають простіші фізичні і хімічні форми. Фізика є дуже важливим ключем для вирішення багатьох проблем сучасної біології.

В.І.Ленін: "Прогрес у сучасному природознавстві полягає в наближенні до таких однорідних і простих елементів матерії, закони руху яких допускають математичну обробку".

Н.Бор: "Жоден результат біологічних досліджень не може бути однозначно описаний інакше, ніж на основі понять фізики і хімії".

Сучасна фізика не зустрічається з границями свого застосування до біологічних об'єктів і явищ. Розвиток **біофізики як частини сучасної фізики** свідчить про її необмежені можливості. Звичайно, доводиться вводити нові фізичні уявлення, але не нові принципи і закони.

Біофізика вивчає:

- 1) питання обміну енергії в біологічному субстраті;
- 2) роль субмікроскопічних і фізико-хімічних структур у життєдіяльності клітин і тканин;
- 3) виникнення збудження і походження біоелектричних потенціалів;
- 4) авторегуляцію фізико-хімічних процесів в живих організмах;
- 5) біологічну дію іонізуючого випромінювання;
- 6) проникність клітин і тканин.

Медична біофізика вивчає організм людини і процеси, пов'язані з порушенням життєдіяльності в організмі.

Завдання біофізики:

- 1) пізнання явищ життя;
- 2) одержання інформації про фізико-хімічну будову клітини і її біополімерів у тому виді, в якому вони існують при житті;

- 3) виявлення фізичних і фізико-хімічних параметрів, характерних для живих об'єктів;
- 4) виявлення фізико-хімічних причин появи і розвитку біоелектричних потенціалів, виявлення їх енергетичних джерел і відкриття шляху для глибшого аналізу фізико-хімічного стану клітин у нормі і в патології;
- 5) ослаблення радіаційного ефекту.

Методи біофізичних досліджень: електрофорез, ультрацентрифугування, калориметрія, малокутове розсіювання світла, рентгеноструктурний аналіз, нейтроноскопія, спектрофотометрія, спектрополяриметрія, люмінесцентний аналіз, ЯМР, ЕПР, електронна мікроскопія, мікроелектродна техніка, метод мічених атомів.

Методи дослідження можуть вносити певні зміни в досліджувані об'єкти. При дослідженнях можливе виникнення артефактів – структур і явищ, які відсутні в природних клітинах.

Завдяки біофізичним дослідженням вчені дізнались багато про будову і властивості біомолекул, про властивості і механізми дії клітинних структур (мембрани, біоенергетичні органели). Розробляються фізико-математичні моделі біопроцесів. Реалізовано загальнотеоретичні підходи до явищ життя, які ґрунтуються на термодинаміці, теорії інформації, теорії автоматичного регулювання.

Біофізика бере участь в розшифровці генетичних кодів.

Біофізика вперше вирішила проблему регуляції і управління біосистемами, трансформації енергії в біосистемах, мембранно-транспортні процеси.

Серед усіх біологічних дисциплін біофізика – найточніша наука. У біофізиці логічно строго доводиться кожне положення, кількісно описуються явища, широко використовується сучасна апаратура і методи дослідження, фізичне і математичне моделювання.

Біофізика нерозривно пов'язана з фізіологією, біохімією, екологією, генетикою.

Біофізика вносить великий вклад у вирішення важливих проблем сучасної біології: регуляція біосистем і управління ними, молекулярна динаміка і механізми функціонування біополімерів (ферментативний каталіз), трансформація енергії в біоструктурах, мембранні транспортні процеси, м'язове скорочення, біоконверсія сонячної енергії.

Біофізичні методи використовуються в клініці для діагностики захворювань: векторна кардіографія, ЯМР-томографія тощо.

Біофізика має досягнення і в проблемі ослаблення радіаційного ефекту: при введенні в організм перед опроміненням інгібіторів (радіопротекторів) здійснюється хімічний захист. Біофізика вивчає фізико-хімічні властивості молекул інгібіторів і дає методи їх підбору.

Біофізика вивчає проникність клітин і тканин, з чим пов'язана фармакологічна дія лікарських речовин і токсична дія отрут.

Біофізика вивчає фізико-хімічні властивості біологічних мембран і методи збільшення або зменшення їхньої проникності дією різноманітних агентів. Це має велике значення для лікувальних заходів, для застосування інсектицидів у сільському господарстві, при дезинфекції тощо.

ТЕРМОДИНАМІКА БІОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ

Тема 1. ТЕРМОДИНАМІКА РІВНОВАЖНИХ СТАНІВ

[1], с.8-18; [2], с.17-20, 289-294; [4], с.6-21; [6], т.1, с.82-85; [7], с.13-30; [8], с.79-95

Термодинаміка – наука про перетворення енергії.

1.1. ТЕРМОДИНАМІЧНІ СИСТЕМИ

Термодинамічна система – будь-який матеріальний об'єкт, що складається з великої кількості частинок. Область поза системою – *навколишнє середовище*.

Ізольована система – яка не обмінюється з навколишнім середовищем ні речовиною, ні енергією.

Замкнута система – обмінюється з навколишнім середовищем енергією, але обміну речовиною через границі системи не відбувається.

Це – **закриті системи**.

Відкрита система – обмінюється з навколишнім середовищем енергією та речовиною (*наприклад, живі організми*).

Термодинамічні параметри поділяються на **екстенсивні**, які залежать від кількості речовини (m , V), тобто адитивні, та **інтенсивні**, які не залежать від кількості речовини (p , T , концентрація n), тобто неадитивні.

Стан системи – набір термодинамічних параметрів.

Стан термодинамічної рівноваги закритої системи – якщо термодинамічні параметри не змінюються з часом і однакові по всьому об'ємі системи.

Якщо замкнута система не перебуває у стані термодинамічної рівноваги, то вона релаксує до рівноважного стану. **Час релаксації** – це час, протягом якого відхилення будь-якого параметру системи від рівноважного значення зменшується в e разів (e – основа натурального логарифма, $e \approx 2,7$).

Основне завдання термодинаміки – відшукування таких величин, які однозначно визначаються набором термодинамічних параметрів (функцій стану). Одна з функцій стану – **внутрішня енергія** U (сума кінетичних і потенціальних енергій молекул термодинамічної системи). Вона є функцією стану, тому що залежить тільки від взаємного розміщення та швидкостей молекул системи. Зміна внутрішньої енергії не залежить від того, яким шляхом змінювалась система, а тільки від початкового й кінцевого стану системи.

1.2. ОБОРОТНІ І НЕОБОРОТНІ ПРОЦЕСИ

Якщо система виведена зі стану рівноваги і залишена сама на себе, то вона з часом знову повертається у стан рівноваги. Процес переходу до рівноваги називається **релаксацією**. Але зі стану рівноваги система не може самостійно повернутись до нерівноважного стану.

Приклади: різниця температур між двома тілами самостійно не зростає, газ не скупчується в одній половині посудини, два гази не розділяються. Отже, в молекулярних системах можуть відбуватись необоротні процеси.

Оборотним процесом називається така зміна стану системи, яка будучи проведена у зворотному напрямку, повертає її в початковий стан, так щоб система пройшла через ті самі проміжні стани, що і в прямому процесі, але у зворотній послідовності, а стан тіл поза системою залишився незмінним. Процес повинен бути квазістаціонарним, тобто настільки повільним, щоб система на кожному етапі встигала релаксувати до рівноважного стану.

Процеси, які не задовольняють умову оборотності – **необоротні**. Приклади необоротних процесів: явища перенесення, розширення газу в пустоту, життєдіяльність організму.

Реальні процеси в природі завжди необоротні внаслідок кінцевої швидкості їх протікання й розсіювання енергії. Особливо це стосується живих організмів. Біохімічні процеси можуть тільки в тій чи іншій мірі наближатись до рівноважних і вважатись оборотними.

1.3. ПЕРШИЙ ЗАКОН ТЕРМОДИНАМІКИ, ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ ЩОДО БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ

В ізольованій термодинамічній системі повна енергія має постійну величину і може тільки перетворюватись з одного виду в інший.

Кількість теплоти, яка передається замкнутій системі, повністю витрачається на виконання роботи й зміну внутрішньої енергії системи:

$$\delta Q = \delta A + dU \quad (1.1)$$

Q і A не є функціями стану. І закон термодинаміки можна переписати інакше:

$$\delta A = \delta Q - dU$$

Звідси витікає, що робота може виконуватись або за рахунок зміни внутрішньої енергії системи, або за рахунок надання системі певної кількості теплоти.

В живій системі (організмі чи окремих органах) робота не може виконуватись за рахунок притоку тепла ззовні, тобто вона не може працювати як теплова машина. Робота виконується за рахунок зміни внутрішньої енергії системи при біохімічних процесах. Внутрішня енергія біосистеми в даному випадку – це енергія хімічних зв'язків високомолекулярних сполук. Тому І закон термодинаміки для біологічних об'єктів можна сформулювати так:

Внутрішня енергія, яка виділяється в організмі внаслідок біохімічних реакцій, повністю витрачається на виконання роботи й теплоту, що розсіюється в навколишнє середовище: $\Delta U = \Delta Q - A$ або $|\Delta U| = |\Delta Q| + A$, причому $\Delta U < 0$, $\Delta Q < 0$, $A > 0$.

При цьому зміна внутрішньої енергії всередині організму $\Delta U < 0$ (зменшується), зміна кількості теплоти $\Delta Q < 0$ (оскільки теплота виходить з організму).

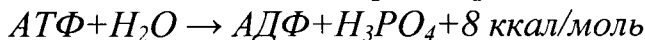
Роботу поділяють на роботу по зміні об'єму і корисну роботу (м'язове скорочення, перенос зарядів через мембрану, побудова тканин, біохімічні реакції тощо):

$$\delta A = p dV + \delta A_{\text{кор}}$$

Приклад перетворення енергії у живій клітині:

1) Сонце внаслідок ядерних реакцій втрачає частину внутрішньої енергії, яка перетворюється на енергію квантів $E = h\nu$;

- 2) Кванти світла перетворюються хлорофілом у хімічну енергію глюкози;
- 3) Хімічна енергія при окисленні глюкози перетворюється в тепло і в енергію аденозинтрифосфornoї кислоти (АТФ);
- 4) При гідролізі АТФ виділяється хімічна енергія, за рахунок якої і виконується механічна, хімічна, осмотична або електрична робота всередині організму:



1.4. ЕНТАЛЬПІЯ

Робота по зміні об'єму при $p = \text{const}$ (постійному тиску):

$$\delta A = p dV$$

Кількість теплоти, яка передається системі для виконання роботи по зміні об'єму при $p = \text{const}$ (якщо корисна робота не виконується):

$$\delta Q = p dV + dU = p dV + V dp + dU = d(U + pV) = dH \quad (1.2)$$

$H = U + pV$ – **ентальпія** або **тепловміст** системи. Ентальпія також є функцією стану (залежить тільки від термодинамічних параметрів). Її можна визначити за допомогою калориметра.

Наслідком I закону термодинаміки і того, що ентальпія є функцією стану, є **закон Гесса: тепловий ефект хімічної реакції не залежить від шляху реакції, а визначається тільки різницею ентальпій кінцевих і вихідних речовин.**

Застосування закону Гесса: для визначення енергетичної цінності продукту його спалюють до CO_2 і H_2O , тобто до тих кінцевих продуктів, які утворюються і в організмі. Вимірюють кількість теплоти, яка виділяється при цьому. Така ж кількість теплоти виділяється і в живому організмі в ході біохімічної реакції розщеплення даного продукту.

Крім роботи по зміні об'єму можуть виконуватись інші види роботи. В організмі, наприклад: м'язове скорочення, перенос зарядів через мембрану, побудова тканин (корисна робота $A_{\text{кор}}$). Отже:

$$\delta Q = dU + p dV + \delta A_{\text{кор}}$$

Звідси:

$$dH = \delta Q - \delta A_{\text{кор}}$$

Отже, зміна ентальпії рівна кількості теплоти, що виділилась, тільки в тому випадку, коли організм не виконує корисну роботу і в ньому не відбувається накопичення біомаси.

1.5. КАЛОРИМЕТРИЯ І ЇЇ ВИКОРИСТАННЯ ДЛЯ ВИМІРЮВАННЯ ТЕРМОДИНАМІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ БІОСИСТЕМ

Метод прямої калориметрії (дихальний калориметр):

Організм знаходиться в теплоізолюваній камері, в яку підводиться O_2 , а виділяються CO_2 і H_2O , яка випаровується (їхні маси вимірюються). Організм споживає продукти харчування (білки, жири, вуглеводи) і виділяє мочу і кал. Теплота, яка виділяється при розщепленні продуктів харчування (калоричні еквіваленти

Q^0), і їхні дихальні коефіцієнти $\delta = \frac{[\text{CO}_2]}{[\text{O}_2]}$ наведені в таблиці 1.

Таблиця 1. Калоричні еквіваленти і дихальні коефіцієнти основних продуктів харчування:

Речовина	δ	Q^0 , кДж/кг
Вуглеводи	1,00	17000
Білки	0,80	17000
Жири	0,71	39000

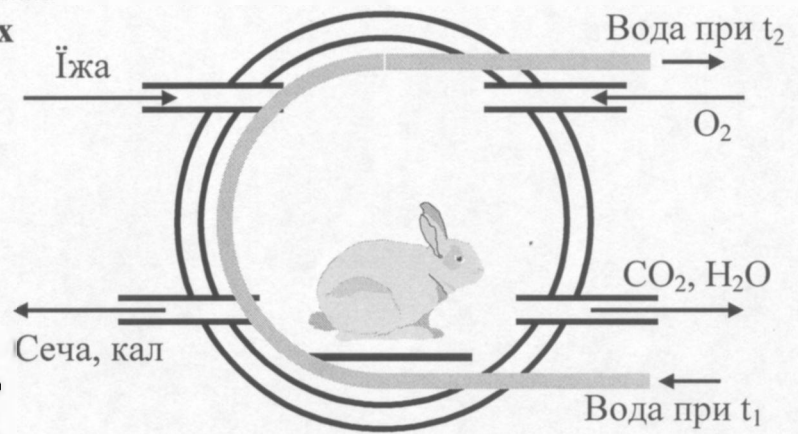


Рис. 1. Дихальний калориметр

В організмі безперервно проходять біохімічні реакції, внаслідок яких зменшується внутрішня енергія організму U і виділяється тепло Q . Лише тепло виводиться проточною водою (вимірюється її маса Δm і температури на вході t_1 і виході t_2). Теплота, виділена організмом, вираховується за формулою:

$$Q = c(t_2 - t_1)\Delta m + \lambda m_v$$

де m_v – маса випаруваної води.

Загальний об'єм газів зменшується (див. табл.1), отже над організмом виконується робота по зменшенню об'єму

$$\Delta A = p\Delta V < 0.$$

В результаті вимірювань складають енергетичний баланс для організму, перевіряють справедливості I закону термодинаміки, оцінюють загальний дихальний коефіцієнт. Кількість енергії, спожита організмом із продуктами харчування за добу, рівна виділеній за цей час теплоті. Це означає, що організм не є джерелом додаткової енергії.

Розрахунки дають хороше співпадіння у випадку, якщо організм не виконує корисної роботи і в ньому не відбувається накопичення маси (росту).

1.6. ДРУГИЙ ЗАКОН ТЕРМОДИНАМІКИ

Оборотні процеси можуть проходити в обох напрямках, тоді як необоротні – тільки в одному. I закон термодинаміки вимагає, щоб загальна енергія не змінилась, тоді як про напрям процесу він нічого не говорить. Напрямок процесів встановлює II закон термодинаміки.

Деякі формулювання:

- 1) Теплота не може самовільно передаватись від менш нагрітого тіла до більш нагрітого, якщо при цьому не відбувається ніяких змін у них або в навколишньому середовищі.
- 2) Неможливий вічний двигун II роду, який одержував би теплоту від нагрівача і перетворював би її повністю в роботу.

Найбільш загальне формулювання II закону термодинаміки можна зробити на основі поняття ентропії.

1.7. ЕНТРОПІЯ

Якщо замкнута система оборотно переходить із стану 1 у стан 2, то кількість теплоти Q , яку вона одержує з навколишнього середовища, залежить від шляху. Але, виявляється, що при цьому величина

$$\Delta S = \int_1^2 \frac{\delta Q}{T} \quad (1.3)$$

не залежить від шляху переходу з одного стану в інший, а тільки від початкового й кінцевого станів, тобто є функцією стану. Величина S називається **ентропією**. Одиниця вимірювання ентропії $[S] = \text{Дж/К}$. Елементарна кількість теплоти, яку одержує система в оборотному процесі:

$$\delta Q = T dS$$

При передачі теплоти Q системі її ентропія зростає на величину (1.3), а ентропія навколишнього середовища – зменшується на таку ж величину, тобто при оборотних процесах загальна ентропія ізольованої системи не змінюється.

При необоротних процесах загальна ентропія ізольованої системи завжди зростає, тобто знак зміни ентропії однозначно визначає напрям необоротного процесу. Ентропія системи змінюється не тільки за рахунок обміну теплотою з навколишнім середовищем, але й за рахунок незворотних процесів всередині самої системи. Тому елементарна кількість теплоти, яку одержує система від навколишнього середовища:

$$\delta Q < T dS \quad (1.4)$$

Загальна ентропія зростає, поки система не досягне термодинамічної рівноваги. Отже, нерівноважна система завжди прагне до максимуму ентропії.

Для необоротних процесів у закритих системах $dS > \frac{\delta Q}{T}$ і нерівність (1.4) можна представити так:

$$dS = \frac{\delta Q}{T} + \frac{\delta Q_i}{T} = dS_{\text{об}} + d_i S$$

де δQ_i – теплота, виникаюча в самій системі за рахунок необоротних процесів, $d_i S$ – необоротне зростання ентропії у системі.

Формулювання II закону термодинаміки:

В ізольованій системі ентропія зберігає постійне значення для оборотних процесів, зростає при необоротних процесах і досягає максимуму у стані термодинамічної рівноваги.

1.8. ІНФОРМАЦІЯ ТА ЇЇ ЗВ'ЯЗОК З ЕНТРОПІЄЮ

Поняття ентропії насправді значно ширше, ніж показане в (1.3), оскільки ентропія ізольованої системи може мінятися і без передачі теплоти. Якщо ізольована система перебуває у нерівноважному стані, то перехід у стан термодинамічної рівноваги – необоротний процес, і супроводжується зростанням ентропії.

Біомакромолекула – сильно впорядкована структура, вона складається з багатьох сотень атомів десятків різних елементів. Усі атоми одного виду однакові, отже дану макромолекулу можна скласти певною кількістю способів завдяки

можливим перестановкам однакових атомів. Кількість способів, якими можна зреалізувати даний стан, називається **термодинамічною ймовірністю**. Вона пропорційна математичній ймовірності випадкового розміщення атомів на своїх місцях. Зрозуміло, що найбільшу математичну й термодинамічну ймовірність має стан із хаотичним, невпорядкованим розміщенням атомів. Стан із найбільшою термодинамічною ймовірністю – найбільш ймовірний стан. Цей стан і є рівноважним станом. Біомакромолекула чи інша термодинамічна система, залишена сама на себе, необоротно переходить від упорядкованого стану в невпорядкований, при цьому її ентропія зростає. Ентропія є мірою безладдя.

Розглянемо посудину, у лівій половині якої – N_1 молекул, у правій половині – N_2 молекул. Якщо всі молекули нерозрізніми, то загальна кількість способів, якими реалізується стан $N_1 - N_2$:

$$W = \frac{(N_1 + N_2)!}{N_1! N_2!}$$

W – **термодинамічна ймовірність** – кількість способів, якими можна зреалізувати даний стан. Вона пропорційна математичній ймовірності.

Больцман установив зв'язок між термодинамічною ймовірністю та ентропією:

$$S = k \ln W \quad (1.5)$$

$k = 1,36 \cdot 10^{-23}$ Дж/К – стала Больцмана.

З (1.5) легко довести, що ентропія – адитивна величина.

Ізольована система завжди прагне до стану рівноваги, тобто стану з максимальною ентропією. Але навіть стану рівноваги притаманні **флуктуації** – невеликі відхилення параметрів від рівноважних значень.

Система з безладно перемішаних молекул має максимальну ентропію, а організм з упорядкованим розміщенням молекул – набагато меншу, причому у процесі росту його ентропія зменшується. Це стає можливим внаслідок того, що організм – не ізольована, а відкрита система. Ентропія організму зменшується за рахунок зростання ентропії навколишнього середовища, а в кінцевому підсумку – Сонця: його енергія, сконцентрована в межах небесного тіла, безперервно розсіюється в просторі.

Упорядковане розміщення молекул в організмі – це наявність певної інформації I (у розумінні впорядкованості), тоді як безладдя – її повна відсутність. Тому ентропію можна розглядати як величину, протилежну до інформації, тобто як міру недостатчі інформації про систему. При будь-яких процесах має місце закон збереження:

$$I + S = \text{const}$$

Одиниця кількості інформації – **біт** – інформація, яка міститься в достовірному твердженні, якщо кількість можливих станів $\omega = 2$, тобто математична ймовірність події $P = 1/2$. Взагалі:

$$I = -\log_2 P = \log_2 \omega \quad (1.6)$$

$$P = \frac{1}{\omega}$$

Порівнявши (1.5) і (1.6), маємо: $1 \text{ біт} = 10^{-23} \text{ Дж/К} = 0,22 \cdot 10^{-23} \text{ кал/К}$.

У людському організмі кількість інформації в основному визначається впорядкованим розміщенням $3 \cdot 10^{25}$ амінокислотних залишків в 7 кг білків, що дає

$1,3 \cdot 10^{26}$ біт інформації або 300 кал/К. Інші вклади: 150 г ДНК дає $6 \cdot 10^{23}$ біт, 10^{13} клітин – $4 \cdot 10^{14}$ біт, 10^8 молекул біополімерів в клітині – $2,6 \cdot 10^9$ біт.

1.9. ТЕРМОДИНАМІЧНІ ПОТЕНЦІАЛИ

З I і II законів термодинаміки при оборотному процесі випливає:

$$TdS = dU + \delta A = dU + pdV + \delta A_{\text{кор}}$$

Отже, корисна робота:

$$-\delta A_{\text{кор}} = dU + pdV - TdS$$

Якщо процес відбувається при $T = \text{const}$ і $V = \text{const}$:

$$-\delta A_{\text{кор}} = dU - TdS = dU - TdS - SdT = d(U - TS) = dF$$

$F = U - TS$ – *вільна енергія Гельмгольца*.

Зміна вільної енергії Гельмгольца дорівнює корисній роботі, яка виконується при оборотному ізотермо-ізохорному процесі.

Якщо процес відбувається при $T = \text{const}$ і $p = \text{const}$:

$$-\delta A_{\text{кор}} = dU + pdV - TdS = dU + pdV + Vdp - TdS - SdT = d(U + pV - TS) = dG$$

$G = U + pV - TS = H - TS$ – *вільна енергія Гіббса*. (1.7)

Зміна вільної енергії Гіббса дорівнює корисній роботі, яка виконується при оборотному ізотермо-ізобарному процесі.

Термодинамічні потенціали U , H , F , G – функції стану, вони є повними диференціалами.

Виконання корисної роботи при необоротному процесі супроводжується розсіюванням енергії $\delta Q_i = Td_iS$. Тому при необоротному ізотермо-ізохорному процесі корисна робота менша, ніж зміна вільної енергії Гельмгольца:

$$\delta A_{\text{кор}} < -(dF)_{TV}$$

а при необоротному ізотермо-ізобарному процесі процесі корисна робота менша, ніж зміна вільної енергії Гіббса:

$$\delta A_{\text{кор}} < -(dG)_{Tp}$$

тобто частина вільної енергії, крім виконання корисної роботи, витрачається на зростання ентропії системи.

Якщо процес при $T = \text{const}$, $V = \text{const}$ іде із зменшенням вільної енергії Гельмгольца F , то він – *самовільний*, із виділенням енергії. У цьому випадку можливе виконання системою корисної роботи. Для того ж, щоб процес супроводжувався збільшенням F , необхідно навпаки, виконувати роботу над системою. Такий процес є *несамовільний*, і відбувається з поглинанням енергії.

Якщо процес при $T = \text{const}$, $p = \text{const}$ іде із зменшенням вільної енергії Гіббса G , то він – *самовільний*, із виділенням енергії. У цьому випадку можливе виконання системою корисної роботи. Для того ж, щоб процес супроводжувався збільшенням G , необхідно навпаки, виконувати роботу над системою. Такий процес є *несамовільний*, і відбувається з поглинанням енергії.

У стані рівноваги термодинамічні потенціали F і G досягають мінімальних значень.

Оскільки зміни об'єму й тиску в біохімічних перетвореннях незначні, то $\Delta F \approx \Delta G$.

В біологічних системах процеси проходять при $p = \text{const}$, тому для розрахунків переважно використовується G . З (1.7):

$$dG = dU + pdV + Vdp - TdS - SdT$$

З І закону термодинаміки:

$$dU = \delta Q - \delta A$$

При оборотних процесах:

$$\delta Q = TdS$$

Якщо не виконується корисна робота, а тільки робота по зміні об'єму:

$$\delta A = pdV$$

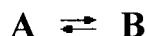
Отже:

$$dG = \delta Q - \delta A + pdV + Vdp - TdS - SdT = TdS - pdV + pdV + Vdp - TdS - SdT = Vdp - SdT \quad (1.8)$$

1.10. ЗМІНА СТАНДАРТНОЇ ВІЛЬНОЇ ЕНЕРГІЇ Й КОНСТАНТА РІВНОВАГИ. РІВНЯННЯ ВАНТ-ГОФА.

Хімічна реакція самовільно проходить у прямому напрямку в тому випадку, коли сумарна вільна енергія Гіббса продуктів реакції менша, ніж сумарна вільна енергія Гіббса реагуючих речовин, тобто $\Delta G < 0$.

Розглянемо хімічну реакцію



Речовина А не повністю перетворюється в речовину В, існують рівноважні концентрації, що відповідають мінімуму вільної енергії G і залежать від умов проходження реакції. Зміна вільної енергії ΔG також залежить від умов проходження хімічної реакції (Т, р, концентрації) і це утруднює порівняння хімічних перетворень. Якщо в даний момент часу концентрації [А] і [В] не відповідають рівноважним, то вільна енергія при повному проходженні реакції аж до досягнення рівноважних концентрацій зміниться на величину:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \cdot \ln \frac{[B]}{[A]}$$

$R = 8,317 \text{ Дж}/(\text{моль} \cdot \text{К}) = 2 \text{ кал}/(\text{моль} \cdot \text{К})$ – універсальна газова стала,

ΔG^0 – *зміна стандартної вільної енергії*, тобто зміна вільної енергії при стандартних початкових умовах проходження реакції (всі розчини речовин, які беруть участь в реакції (як реагентів, так і продуктів реакції) – 1-молярні, тиск $p_0 = 10^5 \text{ Па}$, $pH = 7$, $T = 298 \text{ К}$).

При досягненні рівноваги $\Delta G = 0$ (вільна енергія перестане мінятись), і тоді одержується вираз для ΔG^0 :

$$\Delta G^0 = -RT \cdot \ln \frac{[B]_{\text{рівн}}}{[A]_{\text{рівн}}}$$

Отже, *зміна стандартної вільної енергії* – це зміна вільної енергії при переході від 1-молярних концентрацій усіх реагуючих речовин до рівноважних.

Відношення рівноважних концентрацій $K = \frac{[B]_{\text{рівн}}}{[A]_{\text{рівн}}}$ називається **констан-**

тою рівноваги. Для випадку кількох реагентів і продуктів реакції:

$$K = [A_1]_{\text{рівн}}^{\nu_1} \cdot [A_2]_{\text{рівн}}^{\nu_2} \cdot \dots \cdot [A_r]_{\text{рівн}}^{\nu_r}$$

Стехіометричні коефіцієнти реакції $\nu_i < 0$ для реагентів, $\nu_i > 0$ для продуктів реакції (у формулі – *степені*).

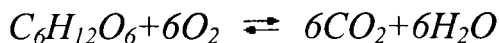
Рівняння Вант-Гофа:

$$\Delta G^0 = -RT \cdot \ln K \quad (1.9)$$

Воно дуже важливе, тому що, визначаючи експериментально K , дозволяє вираховувати ΔG^0 .

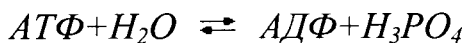
• Для реакції глюкозо-1-фосфат \rightleftharpoons глюкозо-6-фосфат $K=17$ при $pH=7$. Отже, $\Delta G^0 = -6828$ Дж/моль.

• Для реакції окислення глюкози:



$\Delta G^0 = -2870$ кДж/моль. Отже, $K = 1,6 \cdot 10^{517}$.

• Для реакції гідролізу АТФ:



$\Delta G^0 = -34,54$ кДж/моль. Отже, $K = 1,7 \cdot 10^6$. Знак "-" вказує на самовільність цих реакцій.

1.11. ХІМІЧНИЙ І ЕЛЕКТРОХІМІЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛИ

В ході біохімічної реакції концентрації різних компонент у системі змінюються. Молярні концентрації компонент (кількість молів в одиниці об'єму) n_i також є параметрами стану. Розглянуті нами функції стану U , S , H , F , G є функціями також і величин n_i , тобто при зміні n_i вони також змінюються, причому

$$\left(\frac{\partial U}{\partial n_i} \right)_{V,S,n_j} = \left(\frac{\partial H}{\partial n_i} \right)_{p,S,n_j} = \left(\frac{\partial F}{\partial n_i} \right)_{V,T,n_j} = \left(\frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{T,p,n_j} = \mu_i, \quad j \neq i$$

μ_i – хімічні потенціали компонент, $[\mu] = \text{Дж/моль}$.

Фізичний зміст **хімічного потенціалу** – зміна будь-якого термодинамічного потенціалу при зміні кількості речовини на 1 моль або робота, необхідна для переносу 1 моля іонів із безмежно віддаленої точки у вакуумі в розчин із даною концентрацією.

Хімічний потенціал залежить від концентрації речовини і термодинамічних параметрів і є функцією стану.

Зв'язок між хімічним потенціалом та ентропією:

$$\mu_i = -T \left(\frac{\partial S}{\partial n_i} \right) \quad (1.10)$$

Хімічний потенціал речовини в розчині менший, ніж хімічний потенціал чистої речовини, причому він зменшується із зменшенням концентрації розчину. Хімічний потенціал речовини у сильно розбавленому розчині можна виразити через її молярну концентрацію n :

$$\mu = \mu_0 + RT \cdot \ln \frac{n}{n_0} \quad (1.11)$$

де μ_0 – хімічний потенціал даної речовини в 1М розчині,
 $n_0 = 1$ М.

З врахуванням хімічних реакцій зміна вільної енергії Гіббса (1.8) запишеться:

$$dG = Vdp - SdT + \sum \mu_i dn_i \quad (1.12)$$

У клітині хімічні перетворення відбуваються при $T=\text{const}$ і $p=\text{const}$ і рівняння (1.12) спрощується:

$$dG = \sum \mu_i dn_i$$

У випадку переносу через мембрану іонів додатково виконується ще й електрична робота

$$A_{\text{ел}} = zF\phi$$

z – валентність іона з урахуванням знаку,

$F=96500$ Кл – число Фарадея,

ϕ – потенціал на границі розділу (мембрані).

Електрохімічний потенціал μ^* – це повний потенціал, враховуючий хімічний потенціал і електричну роботу по переносу іонів:

$$\mu^* = \mu_0 + RT \cdot \ln \frac{n}{n_0} + zF\phi \quad (1.13)$$

Отже, *електрохімічний потенціал* – це робота, необхідна для переносу 1 моля іонів із безмежно віддаленої точки у вакуумі у розчин із даною концентрацією і даним електричним потенціалом ϕ . Ця робота витрачається на подолання сил хімічної взаємодії і на перенос зарядів в електричному полі.

Тема 2. ТЕРМОДИНАМІКА НЕОБОРОТНИХ ПРОЦЕСІВ

[1], с.18-30, [2], с.294-319, 462-514, [4], с.21-37, [6], т.1, с.13-54, 85-109, [7], с.30-41, [8], с.51-79

У відкритих системах, на відміну від закритих, неперервно відбувається обмін енергією й речовиною з навколишнім середовищем, тому стану термодинамічної рівноваги бути не може. Може встановитись тільки **стаціонарний стан**, у якому параметри системи, в т.ч. й ентропія, не міняються, але ентропія не досягає максимуму. У відкритих системах можливі також нерівноважні стани та необоротні процеси. Термодинаміка необоротних процесів розглядає ці процеси.

2.1. ЗМІНА ЕНТРОПІЇ У ВІДКРИТИХ СИСТЕМАХ

Зміна ентропії у відкритій системі, в якій проходять необоротні процеси:

$$dS = d_e S + d_i S = \frac{dQ}{T} + d_i S \quad (2.1)$$

$d_e S$ – зміна ентропії системи за рахунок обміну з навколишнім середовищем, $d_i S > 0$ – продукція ентропії у самій системі внаслідок необоротних процесів (теплопровідність, дифузія, хімічні реакції).

Знак $d_e S$ залежить від конкретної ситуації. Для ізольованої нерівноважної системи $d_e S = 0$, $dS = d_i S > 0$ – ентропія зростає, система прямує до стану рівноваги. У випадку $d_e S = -d_i S < 0$, $dS = 0$, маємо стаціонарний стан – продукувана ентропія повністю йде у навколишнє середовище, ентропія всередині системи $S = \text{const}$. Система не переходить у рівноважний стан, тому $S \neq \text{max}$.

Приклади стаціонарного стану: космонавт у космічному кораблі; проходження тепла по провіднику між резервуарами з різними температурами T_1 і T_2 ; біосфера Землі на фоні процесу охолодження Сонця.

2.2. СПОРІДНЕНІСТЬ ХІМІЧНОЇ РЕАКЦІЇ

Обчислимо продукцію ентропії у системі при проходженні у ній хімічної реакції. Зміна маси й кількості молів i -ї компоненти суміші, яка бере участь у реакції, або продукту реакції:

$$\begin{aligned} dm_i &= \nu_i M_i d\xi \\ dn_i &= \frac{dm_i}{M_i} = \nu_i d\xi \end{aligned} \quad (2.2)$$

ν_i – стехіометричний коефіцієнт реагенту в реакції, вважаємо $\nu_i < 0$ для реагентів і $\nu_i > 0$ для продуктів реакції;

M_i – молекулярна маса;

ξ – **ступінь проходження реакції**, тобто зміна кількості молів будь-якої реагуючої речовини або продукту реакції, приведена до стехіометричного коефіцієнту відповідної речовини в реакції (поділена на нього); для прямої реакції $\xi > 0$, для зворотної – $\xi < 0$.

Ентропія – повний диференціал, тому:

$$d_i S = \sum \frac{\partial S}{\partial n_i} dn_i$$

Тут сума береться по всіх реагентах і всіх продуктах реакції.
Врахувавши (1.10):

$$d_i S = -\frac{1}{T} \sum \mu_i dn_i$$

Підставивши (2.2):

$$d_i S = -\frac{1}{T} \sum \mu_i \nu_i d\xi \quad (2.3)$$

Величина $A = -\sum \mu_i \nu_i$ називається *спорідненістю хімічної реакції* або її рушійною силою і являє собою різницю між сумарним хімічним потенціалом реагуючих речовин і сумарним хімічним потенціалом кінцевих продуктів реакції з врахуванням їх стехіометричних коефіцієнтів у даній реакції. У стані рівноваги $A=0$.

З (2.3):

$$d_i S = \frac{A}{T} d\xi \geq 0 \quad (2.3')$$

2.3. ШВИДКІСТЬ ПРОДУКЦІЇ ЕНТРОПІЇ ТА ДИСИПАТИВНА ФУНКЦІЯ

З (2.1) маємо: швидкість продукції ентропії для відкритої системи дорівнює сумі потоку ентропії через відкриту систему й швидкості продукції ентропії у самій системі в результаті необоротних процесів:

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

У випадку, якщо продукція ентропії у системі компенсується відтоком ентропії у навколишнє середовище, тобто $d_e S/dt < 0$, $|d_e S/dt| = d_i S/dt$, то $dS/dt = 0$ і маємо стаціонарний стан.

З (2.3') можна записати вираз для швидкості продукції ентропії у самій системі:

$$\frac{d_i S}{dt} = \frac{A}{T} \cdot \frac{d\xi}{dt} = \frac{A}{T} \cdot v$$

$v = d\xi/dt$ – швидкість реакції.

$$T \frac{d_i S}{dt} = Av$$

Ліва частина останньої рівності називається *дисипативною функцією*.

Права частина – добуток причини хімічної реакції (хімічна спорідненість A виступає у якості сили, спонукаючої речовини до реакції) на наслідок (швидкість реакції v). Для стаціонарних процесів дисипативна функція $T \cdot d_i S/dt$ завжди є добутком сили X (причини) на швидкість процесу J (узагальнений потік) для будь-яких процесів і являє собою потужність процесу (потужність втрат):

- в механічних процесах у якості узагальненої сили – механічна сила F , у якості узагальненого потоку – швидкість руху тіла v : $N = Fv$;

- в електричних процесах у якості узагальненої сили – електрична напруга U , у якості узагальненого потоку – сила струму I : $N=UI$;
- у процесі фотосинтезу у якості узагальненої сили – освітленість рослини, у якості узагальненого потоку – кількість синтезованих вуглеводних одиниць.

В загальному можна записати:

$$T \frac{d_i S}{dt} = JX$$

В біологічних системах відбувається перетворення одного виду енергії в інший: хімічної в електричну у нерві, в механічну у м'язах, у світлову (біоломінесценція світляка), світлової у хімічну у хлоропласті, в електричну у сітківці ока, механічної в електричну у внутрішньому вусі.

Якщо в системі проходить кілька процесів:

$$T \frac{d_i S}{dt} = \sum_k J_k X_k \quad (2.4)$$

Система в цілому нерівноважна, але якщо виділити в будь-якому елементарному (малому) об'ємі підсистему, то припускається, що вона знаходиться у стані рівноваги – у цьому полягає **принцип локальної рівноваги**.

В елементарному об'ємі також продукується ентропія. Швидкість цього процесу називається **локальною швидкістю продукції ентропії** σ .

Тоді **швидкість продукції ентропії**:

$$\frac{d_i S}{dt} = \int_V \sigma dV$$

Рівняння (2.4) у диференціальній формі:

$$T\sigma = \sum_k J_k X_k \quad (2.5)$$

де величини J_k , X_k віднесені до одиниці об'єму.

Дисипативна функція $T\sigma=0$ тільки у випадку ідеальних оборотних процесів. Інакше: $T\sigma>0$. Але окремі члени суми (2.5) можуть бути <0 . Такий потік самостійно не може проходити, оскільки це б суперечило II закону термодинаміки. Але у спряженні з іншими потоками з $\sigma>0$ – може. Завдяки спряженню забезпечується проходження таких процесів, які неможливі в ізольованих системах.

Приклад 1. Суміш двох газів у посудині, протилежні стінки якої підтримуються при різних температурах. Тоді гази внаслідок термодифузії розподіляються в посудині нерівномірно: біля холодної стінки більша концентрація одного газу, біля теплої – іншого. Потік речовини ($\sigma_1<0$) спряжений з потоком тепла ($\sigma_2>0$), причому $\sigma_2>|\sigma_1|$, тобто дефіцит ентропії в одному процесі з надлишком компенсується продукцією ентропії в іншому процесі.

Приклад 2. Утворення пептидного зв'язку при поліконденсації амінокислот відбувається з виділенням молекули води. Але у клітині є надлишок води, тому $X_1<0$ і потік "поліконденсація" мав би проходити у протилежному напрямку (гідроліз), оскільки для прямого потоку $\sigma_1<0$. Якщо потік ізольований, то він проходити не буде. Проходить потік у спряженні з потоком "гідроліз АТФ", для якого $X_2>0$ і $\sigma_2>0$. АТФ тут виконує роль донора вільної енергії.

2.4. ОСНОВНЕ ПОЛОЖЕННЯ ЛІНІЙНОЇ НЕРІВНОВАЖНОЇ ТЕРМОДИНАМІКИ

Швидкість будь-якого процесу залежить від сили, спонукаючої цей процес, тобто узагальнений потік є функцією узагальненої сили. У рівноважному стані відповідна сила відсутня: $X=0$, тому немає й потоку: $J(0)=0$, а поблизу положення рівноваги між потоком і силою – приблизно лінійна залежність:

$$J= LX$$

Через те що поблизу положення рівноваги узагальнені потоки пропорційні до узагальнених сил, розділ термодинаміки, який розглядає такі процеси, називається *лінійною нерівноважною термодинамікою*.

Приклади лінійних нерівноважних процесів:

- 1) Закон Фіка (потік речовини пропорційний до градієнту концентрації):
 $dm/dt = -DS \cdot dc/dx$, D – коефіцієнт дифузії;
- 2) Закон Фур'є (потік теплоти пропорційний до градієнту температури):
 $dQ/dt = -kS \cdot dT/dx$, k – коефіцієнт теплопровідності;
- 3) Закон Ома (густина струму пропорційна до напруженості електричного поля): $j = \sigma E$, σ – електропровідність.

2.5. СПІВВІДНОШЕННЯ ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКУ ОНЗАГЕРА

У складній біологічній системі одночасно проходить багато процесів, які між собою взаємозв'язані, тобто потік (швидкість) кожного процесу залежить не тільки від "своєї" сили, але й від сил інших процесів. Для біології особливо важливе спряження хімічних реакцій між собою і з процесом дифузії. Для двох спряжених потоків:

$$\begin{aligned} J_1 &= L_{11}X_1 + L_{12}X_2 \\ J_2 &= L_{21}X_1 + L_{22}X_2 \end{aligned}$$

У загальному виді для багатьох потоків:

$$J_k = \sum_n L_{kn} X_n \quad (2.6)$$

Причому має місце співвідношення взаємозв'язку Онзагера: якщо потік k -го необоротного процесу залежить від сили n -го необоротного процесу через коефіцієнт L_{kn} , то потік n -го необоротного процесу залежить від сили k -го необоротного процесу через той самий коефіцієнт:

$$L_{kn} = L_{nk} \quad (2.7)$$

Підставивши (2.6) у дисипативну функцію (2.5), одержимо **основне рівняння лінійної нерівноважної термодинаміки**:

$$T\sigma = \sum_k \sum_n L_{kn} X_k X_n$$

2.6. ТЕОРЕМА ПРИГОЖИНА

Запишемо основне рівняння лінійної нерівноважної термодинаміки для відкритої системи, у якій проходять два необоротні спряжені потоки:

$$T\sigma = L_{11}X_1^2 + L_{12}X_2X_1 + L_{21}X_1X_2 + L_{22}X_2^2$$

Нехай J_1 – потік теплоти, J_2 – потік речовини. Врахувавши співвідношення взаємозв'язку Онзагера (2.7):

$$T\sigma = L_{11}X_1^2 + 2L_{12}X_2X_1 + L_{22}X_2^2, \quad (2.8)$$

причому $T\sigma > 0$.

Графік функції $T\sigma(X_1, X_2)$ – параболоїд з вершиною в початку координат $X_1=0, X_2=0$ (рис.2).

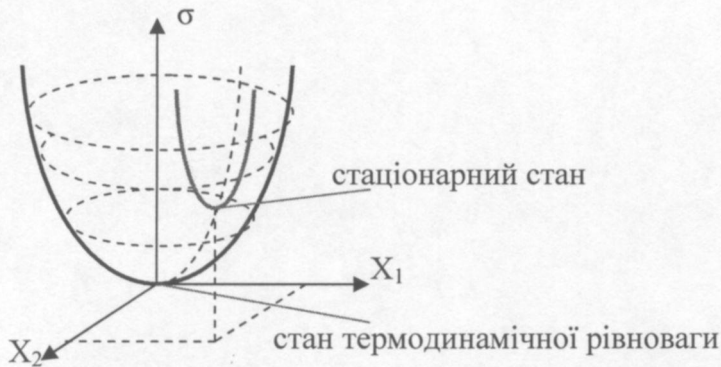


Рис.2. Фазова діаграма станів системи у вигляді параболоїда

У відкритій системі встановлюється стаціонарний стан, якщо деякі узагальнені сили зафіксовані, а інші можуть мінятися. Ентропія такої системи не досягає максимального значення. Нехай у біосистему поступають реагенти, відбувається біохімічна реакція, назовні виходять продукти реакції, причому кількість речовини, поступаючої у систему, рівна кількості речовини, яка виходить

із системи, тобто $J_2=0$. В ході біохімічної реакції виділяється теплота, яка переходить у навколишнє середовище, тобто потік теплоти $J_1 \neq 0$, причому різниця температур між системою і навколишнім середовищем підтримується постійною, тобто $X_1 = \text{const} \neq 0$. Дослідимо на екстремум величину σ в стаціонарному стані, для чого знайдемо похідну від σ по X_2 при $X_1 = \text{const}$:

$$T \frac{d\sigma}{dX_2} = 2L_{12}X_1 + 2L_{22}X_2 = 2J_2 = 0$$

$$T \frac{d^2\sigma}{dX_2^2} = 2L_{22} > 0$$

Одержано умову мінімуму. Отже, у стаціонарному стані при фіксованих деяких зовнішніх параметрах локальна продукція ентропії у відкритій системі прагне до мінімального значення – теорема Пригожина.

Усе вищесказане відноситься і до потоку теплоти, і до будь-якого іншого потоку. Якщо параметр X_1 – фіксований, то точка, відповідаюча стану системи, рухається по параболі, яка є перерізом даного параболоїда й площини $X_1 = \text{const}$, до вершини параболі, де переходить у стаціонарний стан. Якщо на параметри обмеження не накладаються, то ця точка прямує по поверхні параболоїда до його вершини – рівноважної точки з $\sigma=0$, де переходить у стан термодинамічної рівноваги.

2.7. КРИТЕРІЙ СТІЙКОСТІ СИСТЕМИ ПРИ ТЕРМОДИНАМІЧНІЙ РІВНОВАЗІ Й У СТАЦІОНАРНОМУ СТАНІ

Для закритої системи у стані термодинамічної рівноваги $S = \text{max}$. S є функцією параметрів системи, а параметри, при яких $S = \text{max}$, називаються рівноважними. Якщо якийсь із параметрів випадково відхилиться від рівноважного значення в той чи інший бік, ентропія системи тимчасово

зменшиться, але після цього система знову повернеться у стан термодинамічної рівноваги. Для всіх параметрів p_i у стані термодинамічної рівноваги $\frac{\partial S}{\partial p_i} = 0, \frac{\partial^2 S}{\partial p_i^2} < 0$. Це і є **критерієм стійкості системи при термодинамічній рівновазі**. Якщо ці умови не виконуються, то стан термодинамічної рівноваги нестійкий.

Термодинамічна система може відхилитись від стану рівноваги також під дією зовнішнього збурення. Якщо воно короткочасне, то система знову переходить у стан термодинамічної рівноваги, але вже відмінний від попереднього, з іншими параметрами. **Принцип стійкості Ле-Шательє: будь-яка система, яка відхилилася від стану рівноваги під дією зовнішнього збурення, прагне самовільно повернутись у рівноважний стан за рахунок зміни параметрів у напрямку, протилежному тому, який викликав це збурення.** Наприклад, при підвищенні температури хімічна стаціонарна рівновага зміщується у бік реакції, яка йде з поглинанням тепла, а при підвищенні тиску – у бік реакції, яка йде із зменшенням об'єму. В обох випадках приріст температури чи тиску буде менший за сподіваний.

Критерієм напрямленості еволюції у рівноважній термодинаміці є зростання ентропії ізольованої системи до максимального значення при досягненні стану термодинамічної рівноваги ($dS > 0, S \rightarrow \max$).

Стаціонарний стан також характеризується постійними параметрами, але, на відміну від стану термодинамічної рівноваги, ентропія не досягає свого максимуму, а продукція ентропії $\sigma = \min$. Якщо система по якійсь причині відхилиться від стаціонарного стану, то у ній виникнуть такі внутрішні зміни, які будуть намагатись наблизити її знову до стаціонарного стану. Ця властивість стаціонарного стану називається **автостабілізацією**.

Принцип мінімуму продукції ентропії: Якщо відкрита система в результаті зовнішнього збурення виведена зі стаціонарного стану, то у ній виникають сили, які будуть так змінювати у ній процеси, поки локальна продукція ентропії σ не досягне мінімального значення, тобто поки система не перейде у стан найменшої дисипації енергії.

Критерієм напрямленості еволюції у лінійній нерівноважній термодинаміці є зменшення продукції ентропії до мінімального значення при досягненні стаціонарного стану ($d\sigma < 0, \sigma \rightarrow \min$).

При фіксованих зовнішніх умовах система може перебувати у стаціонарному стані, в якому всі параметри залишаються сталими. Якщо якийсь із параметрів x системи випадковим чином відхилився від свого значення у стаціонарному стані x_0 (прийняв значення $x = x_0 + \xi$), то він і далі міняється в часі (може повернутися до стаціонарного значення або ще більше відхилитись від нього). Швидкість зміни параметра є функцією значення цього параметра в даний момент часу:

$$\frac{dx}{dt} = f(x)$$

$$\frac{d(x_0 + \xi)}{dt} = \frac{d\xi}{dt} = f(x_0 + \xi)$$

Функцію $f(x_0 + \xi)$ розкладемо в ряд Тейлора. Оскільки в стаціонарному стані $f(x_0) = 0$, то:

$$\frac{d\xi}{dt} = f(x_0) + \frac{df(x_0)}{dx} \xi + \frac{1}{2} \frac{d^2 f(x_0)}{dx^2} \xi^2 + \dots \approx \frac{df(x_0)}{dx} \xi$$

Ми одержали лінеаризоване дифрівняння. Його розв'язок:

$$\xi(t) = C \cdot \exp(\lambda t) \quad (2.9)$$

де параметр λ дорівнює першій похідній функції f по параметру x у стаціонарній точці x_0 : $\lambda = \frac{df(x_0)}{dx}$.

Користуючись розв'язком (2.9), можна сформулювати **критерій Ляпунова стійкості системи у стаціонарному стані**:

Якщо $\lambda < 0$, то при $t \rightarrow \infty$ $\xi \rightarrow 0$ і початкове відхилення x від стаціонарного значення самовільно затухає. Якщо $\lambda > 0$, то при $t \rightarrow \infty$ $\xi \rightarrow \infty$ і стан рівноваги нестійкий. Якщо $\lambda = 0$, то по першому наближенню не можна судити про стійкість системи.

Для прикладу розглянемо модель культиватора, у якому відбувається розмноження, загибель і приток ззовні бактерій з постійною швидкістю α . Нехай швидкість загибелі бактерій пропорційна їх концентрації c , а швидкість розмноження – квадрату концентрації. Кінетичне рівняння для концентрації бактерій:

$$\frac{dc}{dt} = \alpha - \beta c + \gamma c^2$$

Покладемо $\gamma = 1$. Знайдемо концентрацію бактерій у стаціонарному стані при $dc/dt = 0$. Розв'язками даного дифрівняння є 2 гілки параболі:

$$c_0^{(1)} = \frac{\beta}{2} + \sqrt{\frac{\beta^2}{4} - \alpha}$$

$$c_0^{(2)} = \frac{\beta}{2} - \sqrt{\frac{\beta^2}{4} - \alpha}$$

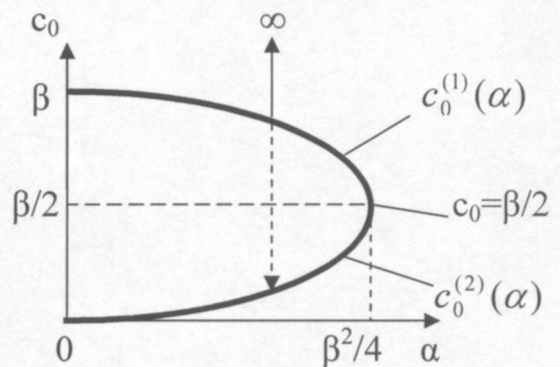


Рис.3. Залежність стаціонарної концентрації бактерій від швидкості притоку бактерій ззовні у моделі культиватора

Оскільки концентрації повинні бути дійсними числами, то видно, що:

- при $\alpha > \beta^2/4$ в системі не може бути стаціонарного стану;
- при $\alpha = \beta^2/4$ в системі існує один стаціонарний стан при $c_0^{(1)} = c_0^{(2)} = \frac{\beta}{2}$;
- при $\alpha < \beta^2/4$ в системі можуть існувати два набори стаціонарних станів, які відповідають двом гілкам параболі.

Для гілки $c_0^{(1)}(\alpha)$ $c_0 > \frac{\beta}{2}$ і тому $\lambda = \frac{df(c_0)}{dc} = -\beta + 2c_0 > 0$. Згідно критерію

Ляпунова, всі значення $c_0^{(1)}(\alpha)$ – нестійкі. При відхиленні концентрації від стаціонарної у більший бік вона почне необмежено зростати внаслідок зростання інтенсивності розмноження, у менший бік – зменшиться до $c_0^{(2)}$ як

показано на рисунку. Для гілки $c_0^{(2)}(\alpha)$ $c_0 < \frac{\beta}{2}$ і тому $\lambda = \frac{df(c_0)}{dc} = -\beta + 2c_0 < 0$.

Згідно критерію Ляпунова, всі значення $c_0^{(2)}(\alpha)$ – стійкі. При відхиленні концентрації у будь-який бік вона повернеться до стаціонарного значення.

2.8. РЕАКЦІЯ БЕЛОУСОВА – ЖАБОТИНСЬКОГО, МОДЕЛЬ ВОЛЬТЕРРА – ЛОТКА.

Реакція Білоусова – Жаботинського:

У пробірку зливають $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$, окислювач KBrO_3 , відновлювач $\text{CH}_2(\text{COOH})_2$ (малонова кислота) і додають кілька краплин фероїну (індикатор окисно-відновлювальної реакції). У розчині утворюються чітко розділені зони синього й червоного кольору. При неперервному підведенні реагентів і відводі продуктів реакції відбуваються циклічні зміни кольору з періодом 100 с. Це пов'язано з поперемінною зміною ступеня окиснення церію ($\text{Ce}^{3+} \rightleftharpoons \text{Ce}^{4+}$). Автокаталітичні реакції зі зворотним зв'язком.

Модель Вольтерра – Лотка:

Кількість травоядних – X , кількість хижаків – Y . Кінетичні рівняння:

$$\begin{cases} \frac{dX}{dt} = pX - qXY \\ \frac{dY}{dt} = qXY - rY \end{cases} \quad (2.10)$$

p – константа природного розмноження жертв,

q – константа взаємодії хижак – жертва,

r – константа природної смерті хижака.

У стаціонарному стані $\frac{dX}{dt} = 0$, $\frac{dY}{dt} = 0$, отже стаціонарна точка:

$$X_0 = \frac{r}{q}, \quad Y_0 = \frac{p}{q}$$

Розв'язок системи дифрівнянь (2.10):

$$\begin{cases} X = X_0 + x \cdot \exp(i\omega t) \\ Y = Y_0 + y \cdot \exp(i\omega t) \end{cases}$$

де $\omega = \pm\sqrt{pr}$.

Отже, популяції жертв і хижаків змінюються по еліптичній траєкторії навколо стаціонарної точки (X_0, Y_0) , яку називають **центром**.

Можливі фазові траєкторії даної системи – концентричні еліпси з центром в особливій точці. При віддаленні від центру еліпси все більше деформуються. Особлива точка типу "центр" є нестійкою, як і фазові траєкторії, оскільки будь-яка зміна ззовні чисельності приводить до зміни траєкторії.

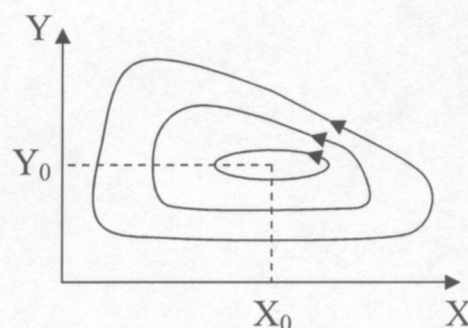


Рис.4. Фазова площина в моделі Вольтерра – Лотка.

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

Молекулярна біофізика вивчає структуру біологічно важливих макромолекул і фізичні процеси, які лежать в основі їх функціонування.

Тема 3. СТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ ТА КОНФОРМАЦІЇ БІО-МАКРОМОЛЕКУЛ

[1], с.63-78, [2], с.29, 54-59, 63-74, 80-85, 97-101, 106-111, [4], с.38-61, [6], т.1, с.118-122, 130-140, [9], с.84-101

3.1. КОНФОРМАЦІЇ БІОМАКРОМОЛЕКУЛ

Рівні структурної організації макромолекул:

- **первинна структура** – послідовність ланок у ланцюгу біополімеру, зв'язаних міцними ковалентними зв'язками;
- **вторинна структура** – локальне впорядкування окремих ділянок полімерного ланцюга;
- **третинна структура** – просторова укладка всього ланцюга;
- **четвертинна структура** – просторове розташування кількох компактно організованих полімерних ланцюгів з утворенням надмолекулярного комплексу;

Сусідні ланки можуть обертатись навколо одинарних (простих) зв'язків, що приводить до утворення різних поворотних ізомерів (конформацій). **Конформація** – це спосіб укладки полімерного ланцюга за рахунок утворення великої кількості слабких зв'язків, в результаті чого утворюється найбільш термодинамічно вигідна й стабільна просторова структура макромолекули. Інакше кажучи, конформація – одна з просторових форм, яку може приймати лінійна макромолекула при тепловому русі.

Природа високої еластичності – внутрішнє обертання зв'язків. Завдяки цьому макромолекулам властива гнучкість і легка згортваність ланцюжків.

Розглянемо макромолекулу, яка складається з однакових ланок (рис.5).

Нехай вектори \vec{a}_i – вектори між початком і кінцем i -ї ланки. Вектор \vec{h} , який з'єднує кінці макромолекули:

$$\vec{h} = \sum_{i=1}^z \vec{a}_i$$

z – кількість ланок у молекулі.

$$h^2 = \sum_{i=1}^z a_i^2 + 2 \sum_{i=1}^{z-1} \sum_{k=i+1}^z a_i a_k \cos \Theta_{ik}$$

Середня квадратична відстань:

$$\langle h^2 \rangle = za^2 + 2a^2 \sum_{i=1}^{z-1} \sum_{k=i+1}^z \langle \cos \Theta_{ik} \rangle$$

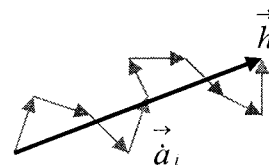


Рис.5. Макромолекула як послідовне розміщення ланок у полімерному ланцюгу

Внаслідок накопичення крутильних коливань існує такий $i+s$ -й зв'язок, який може знаходитись відносно i -го рівно ймовірно під будь-яким кутом у межах 180° , тобто буде статистично незалежним. Такий відрізок ланцюга називають **сегментом**. Сегменти еластомерів (гум) включають 3-10 ланок, жорстко ланцюгові полімери – сотні ланок.

Позначимо:

$$\sum_{k=i+1} \langle \cos \Theta_{ik} \rangle = A_i$$

При деякому $s=k-i$ напрямки ланок повністю незалежні, тобто $\langle \cos \Theta_{ik} \rangle = 0$. Тому можна відкинути всі доданки, для яких $k-i > s$:

$$\sum_{k=i+1}^{i+s} \langle \cos \Theta_{ik} \rangle = A_i$$

s – кількість ланок у сегменті макромолекули і характеризує жорсткість ланцюга. Дві ланки, розділені $s-1$ ланкою, статистично незалежні.

Остаточно одержимо:

$$\langle h^2 \rangle = za^2 + 2a^2 \sum_{i=1}^{s-1} A_i$$

Для всіх ланок $A_i = A = \text{const}$ за винятком ланок поблизу кінців ланцюга. Але для полімеру $z \gg s$, тому:

$$\langle h^2 \rangle = za^2 \left[1 - 2 \left(1 - \frac{1}{z} \right) A \right] \approx za^2 (1 + 2A)$$

При наявності валентного кута і вільному обертанні по конусу можна застосовувати формулу Ейрінга:

$$A = \frac{\cos \alpha}{1 - \cos \alpha}$$

Звідси:

$$\langle h^2 \rangle = za^2 \frac{1 + \cos \alpha}{1 - \cos \alpha}$$

Формула Ейрінга наближена, тому що не виконується для $\alpha=0^\circ$ і $\alpha=180^\circ$.

Молекулу можна розглядати як модель вільно з'єднаних сегментів. Для сегментів $\langle \cos \Theta_{ik} \rangle = 0$ і тому $A=0$ і тому:

$$\langle h^2 \rangle = nL^2$$

L – довжина сегмента,

n – кількість сегментів у ланцюгу.

Скористаємось моделлю з вільно з'єднаними сегментами (рис.6). Помістимо один кінець макромолекули в початок координат. Кінець 1-го сегмента буде на сфері радіусом L . Спроектуємо його на вісь x . Середнє значення квадрата проекції

довжини сегмента на вісь x : $\langle L_x^2 \rangle = \frac{L^2}{3}$.

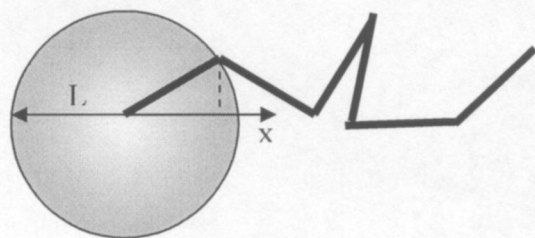


Рис.6. Модель вільно з'єднаних сегментів

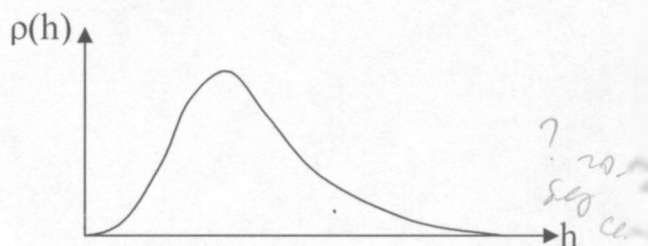


Рис.7. Розподіл макромолекул за довжинами (нормальний розподіл Гаусса)



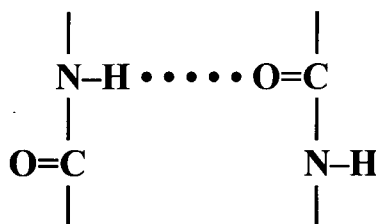
Індукційні взаємодії у тому випадку, якщо атомна група має власний дипольний момент, тоді вона може навести у сусідній неполярній атомній групі дипольний момент, величина якого залежить від діелектричної сприйнятливості неполярної групи.

Дисперсійні взаємодії виникають між неполярними групами, наприклад між неполярними залишками аланіну:

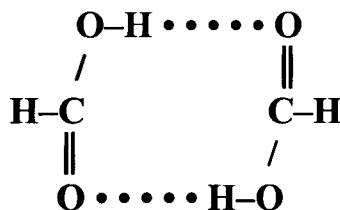


Водневі зв'язки:

Утворюються між полярними групами O–H, N–H, S–H і атомами O, N, S, F, Cl, які належать іншій або тій самій молекулі. Усі три атоми знаходяться на одній прямій. Природа водневих зв'язків: електростатичне притягання + ван-дер-ваальсові взаємодії + енергія делокалізації електронів. Водневі зв'язки виникають, наприклад, між пептидними групами:



Завдяки водневим зв'язкам утворюється димер мурашиної кислоти:



Молекула води містить 2 атоми водню, тому може утворити 2 водневі зв'язки із сусідніми молекулами води. Таким чином, кожний атом кисню намагається оточити себе 4-ма атомами водню, які при цьому утворюють тетраедр з атомом кисню в центрі. У рідкому стані утворенню тетраедрів заважає тепловий рух, тільки при замерзанні води атоми утворюють тетраедри, тому густина води більша, ніж льоду. Довжина зв'язку O–H – 0,096 нм, кут між ними – 104,52°.

У сірководні H₂S водневі зв'язки набагато слабші, що проявляється в набагато менших температурах замерзання (–83°C) і кипіння (–62°C).

Гідрофобні взаємодії:

Біополімери – білки і нуклеїнові кислоти – функціонують головним чином у воді. Між молекулами води і неполярними атомними групами виникають сили відштовхування – гідрофобні сили.

При розчиненні неполярних молекул у воді рухливість молекул води зменшується, вони впорядковуються у кластерні структури, а отже, ентропія системи зменшується, а вільна енергія зростає: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.

Це енергетично не вигідно, тому неполярні залишки виштовхуються з води. Отже, гідрофобні сили мають ентропійну природу.

Гідрофобні амінокислотні залишки: триптофаніл, ізолейцил, тирозил, фенілаланіл, проліл, лейцил, валіл, лізил, гістидил, метионіл; гідрофільні: аланіл,

Отже, кожний сегмент у середньому додає до проекції вектора \vec{h} на вісь x величину $+\frac{L}{\sqrt{3}}$ або $-\frac{L}{\sqrt{3}}$ з однаковою ймовірністю $W = \frac{1}{2}$. Дальші розрахунки показують, що довжина вектора \vec{h} (довжина макромолекули) відповідає нормальному закону розподілу Гаусса (рис.7).

3.2. РОЛЬ ВНУТРІШНЬОМОЛЕКУЛЯРНИХ ВЗАЄМОДІЙ У СТАБІЛІЗАЦІЇ ПРОСТОРОВОЇ БУДОВИ БІОМАКРОМОЛЕКУЛ

Тоді як хімічні (валентні) взаємодії визначають первинну структуру макромолекул, слабкі зв'язки, які мають електростатичну природу (кулонівські сили), визначають вищі порядки структури.

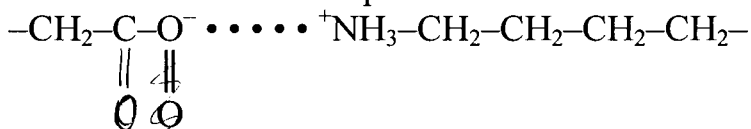
Електростатичні взаємодії:

Між двома ізольованими зарядами існує кулонівська сила взаємодії:

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon\epsilon_0} \frac{q_1 q_2}{r^2}$$

Атом складається з ядра й електронів, тому взаємодія між сусідніми атомами має складніший характер. Існує рівноважна відстань, на якій сили притягання між різнойменними зарядами точно компенсуються силами відштовхування між однойменними. При зближенні атомів переважають сили відштовхування, а при віддаленні – сили притягання. Завдяки цьому між ними у рідинах і твердих тілах зберігаються в середньому постійні відстані, атоми й молекули в основному коливаються біля своїх положень рівноваги.

Якщо бокові групи макромолекули наближаються одна до одної, то один атом може перетягнути на себе іон водню від іншого атома. Внаслідок цього ці атоми (групи атомів) заряджаються протилежними зарядами. Це особливо характерно для кислотних залишків $-\text{COOH}$, які легко віддають протон, та для аміногруп, які його приєднують. В області нейтральних рН негативно заряджені аспарагінова і глутамінова кислоти, позитивно заряджені бокові ланцюги лізину, аргініну. Взаємодія між залишками аспарагінової кислоти й лізину:



Взаємодія Ван-дер-Ваальса:

Сили Ван-дер-Ваальса відіграють велику роль в утворенні конденсованих рідин. Біологічні макромолекули також можна розглядати як конденсовану систему. В залежності від того, володіють взаємодіючі молекули власними дипольними моментами чи вони виникають внаслідок поляризації електронних оболонок, існують різні типи сил Ван-дер-Ваальса.

Орієнтаційні (диполь-дипольні) взаємодії: два диполі намагаються повернутись один до одного протилежними знаками. Цьому перешкоджає тепловий рух. Тому енергія взаємодії залежить від температури. Диполями в біомакромолекулах є полярні групи такі як гідроксильна та інші. Диполь-дипольні взаємодії виникають, наприклад, між залишками серину:

аргініл, цистеїніл, глутаміл, аспартил, треоніл, серил, гліцил, аспарагініл, глутамініл.

3.3. ВЗАЄМОДІЯ МАКРОМОЛЕКУЛ У РОЗЧИНІ (ТЕОРІЯ ДЕБАЯ – ХЮККЕЛЯ)

Біомакромолекули (білки, нуклеїнові кислоти) містять багато іонізованих груп, тому на їх поверхні є заряди. Потенціал ізолюваного точкового заряду q змінюється з відстанню за гіперболічним законом:

$$\varphi(r) = \frac{q}{4\pi\epsilon\epsilon_0 r}$$

Енергія взаємодії між зарядженими макромолекулами сильно залежить від наявності іонів у навколишньому середовищі. В іонному розчині заряджена макромолекула притягає до себе іони протилежного знаку, а відштовхує однойменні, тому потенціал поблизу неї міняється складнішим чином. Потенціал точкового заряду, навколо якого зосереджена хмарка заряду з густиною $\rho(r)$, встановлює рівняння Пуассона:

$$\frac{\partial^2 \varphi}{\partial r^2} = -\frac{\rho}{4\pi\epsilon\epsilon_0} \quad (3.1)$$

Нехай зосереджений на макромолекулі точковий заряд $q > 0$, отже він створює навколо себе позитивний потенціал $\varphi(r) > 0$. Нехай у розчині є два типи іонів із зарядами $+e$ і $-e$, середня кількість іонів кожного знаку в одиниці об'єму – c_0 , $[c] = \text{м}^{-3}$. Внаслідок теплових коливань іони розміщуються поблизу точкового заряду згідно розподілу Больцмана:

$$\begin{cases} c_+(r) = c_0 \exp\left(-\frac{e\varphi}{kT}\right) < c_0 \\ c_-(r) = c_0 \exp\left(\frac{e\varphi}{kT}\right) > c_0 \end{cases}$$

тобто концентрація катіонів при наближенні до точкового позитивного заряду поступово зменшується, а концентрація аніонів – зростає.

Сумарна густина заряду (в Кл/м³):

$$\rho(r) = \rho_+(r) - \rho_-(r) = e(c_+ - c_-) = ec_0 \left[\exp\left(-\frac{e\varphi}{kT}\right) - \exp\left(\frac{e\varphi}{kT}\right) \right]$$

$e\varphi$ – електрична енергія іона,

kT – теплова енергія іона.

Дебай і Хюккель зробили припущення:

- 1) розчин у цілому електронейтральний (повний заряд розчину $\sum e_i n_i = 0$);
- 2) електрична енергія іона значно менша його теплової енергії:

$$e\varphi \ll kT$$

Тоді можна експоненту розкласти в ряд і одержати:

$$\rho(r) = -\frac{2e^2 c_0}{kT} \varphi(r) \quad (3.2)$$

Підставивши (3.2) у (3.1):

$$\frac{\partial^2 \varphi}{\partial r^2} = \frac{2e^2 c_0}{4\pi\epsilon\epsilon_0 kT} \varphi(r) \quad (3.3)$$

Розв'язок дифференціального (3.3) шукаємо у вигляді:

$$\varphi(r) = \varphi_0 \exp(-\kappa r) \quad (3.4)$$

φ_0 – потенціал біля точкового заряду q .

Як видно з формули (3.4), при віддаленні від точкового заряду потенціал зменшується за експоненціальним законом. Підставивши (3.4) у дифференціального (3.3), одержимо:

$$\kappa^2 = \frac{2e^2 c_0}{4\pi\epsilon\epsilon_0 kT}$$

κ – *параметр Дебая – Хюккеля*, має розмірність $[\kappa] = 1/\text{м}$.

Отже, потенціал макромолекули зменшується з відстанню за експоненціальним законом. Відстань $r_0 = 1/\kappa$, на якій φ зменшується в e разів, називається *дебайівською довжиною або товщиною іонної оболонки*.

$$r_0 = \sqrt{\frac{4\pi\epsilon\epsilon_0 kT}{2e^2 c_0}}$$

Тепловий рух не дає можливості аніонам впритул наблизитись до точкового позитивного заряду, при зростанні температури розчину хмарка аніонів, що його оточують, дедалі більше розширюється, і це приводить до збільшення товщини іонної оболонки.

3.4. ІОННА СИЛА РОЗЧИНУ

Якщо у розчині є різнотипні іони, то *іонна сила розчину*:

$$\mathfrak{I} = \frac{1}{2} \sum q_i^2 c_i$$

q_i – заряд іона i -го типу, c_i – концентрація іона i -го типу.

Для випадку двох типів іонів з одиничними зарядами $+e$ і $-e$ і однаковою концентрацією c :

$$\mathfrak{I} = e^2 c$$

Тоді: $r_0 = \sqrt{\frac{4\pi\epsilon\epsilon_0 kT}{2\mathfrak{I}}}$.

Отже, чим більша іонна сила розчину (тобто чим більша концентрація солі), тим тонша іонна оболонка. Різноманітні заряджені групи різних молекул зближуються. На малих відстанях завжди переважають ван-дер-ваальсові сили притягання. Тому при великій концентрації солі сили притягання переважають над силами відштовхування, макромолекули асоціюють і білок осаджується з розчину. Це явище називається *висолюванням*. Воно застосовується для екстрагування й очистки білків.

3.5. БІОФІЗИЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ МАКРОМОЛЕКУЛ

Осмометрія

Осмоз – одностороння дифузія розчинника крізь напівпроникну мембрану у більш концентрований розчин.

Якщо концентрація розчиненої речовини в лівій посудині менша ($c_1 < c_2$), то концентрація молекул води там більша (рис.8). Оскільки мембрана проникна тільки для молекул води, то вони частково переходять із лівої посудини з більшою концентрацією у праву посудину з меншою концентрацією. Внаслідок цього гідростатичний тиск у правій посудині зростає. Дифузія води відбувається доти, поки різниця гідростатичних тисків не зрівноважить силу, зумовлену різницею концентрацій.

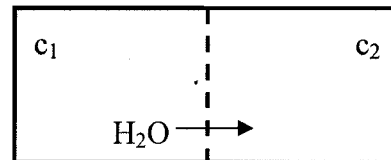


Рис.8. Посудина з напівпроникною мембраною

Осмотичний тиск – надлишковий гідростатичний тиск, створений внаслідок дифузії розчинника крізь напівпроникну мембрану. Він тим більший, чим більша концентрація розчину. Осмотичний тиск розчину визначають за допомогою *осмометра* відносно чистого розчинника (води). Якщо ж в обидвох посудинах міститься розчинена речовина, для якої мембрана непроникна (як розглянуто вище), то говорять про різницю осмотичних тисків між посудинами.

Розведені розчини добре підлягають законам ідеальних газів. Тому для ідеального розчину виконується **закон Вант-Гофа: осмотичний тиск розчину рівний тому тиску, який чинила б розчинена речовина, якби вона при тій же температурі перебувала у газоподібному стані і займала б об'єм, рівний об'єму всього розчину.**

Рівняння Менделєєва – Клапейрона для ідеального газу:

$$pV = \frac{m}{M} RT$$

M – молекулярна маса. Отже, осмотичний тиск:

$$\pi = \frac{cRT}{M} \quad \text{або} \quad \pi = nRT$$

$[c] = \text{г/м}^3$, $[n] = \text{моль/м}^3$.

Для неідеальних розбавлених розчинів, якими є розчини полімерів, осмотичний тиск не є прямо пропорційний концентрації:

$$\pi = \frac{cRT}{M} + Bc^2 + \dots$$

Змінюючи концентрацію розчину, вимірюють осмотичний тиск і будують графік залежності $\frac{\pi}{c}$ від концентрації. По ньому визначають молекулярну масу (екстраполюючи до $c \rightarrow 0$) і *віріальний* коефіцієнт B (за нахилом прямої).

Приклад: явище набухання й руйнування еритроцитів, поміщених у чисту воду. Це відбувається внаслідок проникнення великої кількості води всередину еритроцита.

Методом осмометрії визначено молекулярну масу гемоглобіну: 68000.

Осмотичний тиск крові людини – 7,8 атм – зумовлений в основному наявністю у ній іонів.

Віскозиметрія

В'язкість розчину визначають капілярним віскозиметром Оствальда, вимірюючи час, за який розчин витікає з певного об'єму. Закон Пуазейля:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\pi r^4}{8\eta l} \Delta p$$

Седиментація біомакромолекул. Метод швидкості седиментації

Седиментація – осадження частинок у рідині під дією сили тяжіння. Макромолекула не може опуститись на дно під дією сили земного тяжіння, оскільки енергія теплового руху kT набагато більша гравітаційної енергії mgh . Тому необхідно застосовувати ультрацентрифуги, які створюють прискорення до 350 000 g. Швидкість седиментації визначається оптичними методами. При ультрацентрифугуванні у кюветі утворюються області чистого розчинника, розчину полімеру і перехідна зона. Вимірюється швидкість переміщення границі між областями (швидкість седиментації) v . Молекулярну масу обчислюють за формулою Сведберга:

$$M = \frac{RTs}{D(1 - \rho_0 \Delta V)}$$

$s = \frac{v}{\omega^2 x}$ – коефіцієнт седиментації – відношення швидкості седиментації до нормального прискорення, $[s] = \text{сведберг} = 10^{-13} \text{ с}$,

ω – кутова швидкість обертання ротора,

x – відстань від осі обертання,

D – коефіцієнт дифузії,

ρ_0 – густина розчинника,

ΔV – парціальний питомий об'єм – зростання об'єму розчинника при розчиненні 1 кг сухої речовини в фіксованому об'ємі розчинника.

Густини розчинника й розчину знаходять пікнометричним методом – зважуванням фіксованих об'ємів.

Для визначення молекулярної маси за формулою Сведберга необхідно визначати D і s в однакових розчинниках, при однакових температурах, екстраполюючи одержані значення до безмежного розбавлення.

3.6. ЗВ'ЯЗОК ХАРАКТЕРИСТИЧНОЇ В'ЯЗКОСТІ З МОЛЕКУЛЯРНОЮ МАСОЮ ТА ФОРМОЮ МАКРОМОЛЕКУЛ

В'язкість розчину характеризує внутрішнє тертя, зумовлене міжмолекулярними взаємодіями. Розглянемо два шари рідини, відстань між якими dx , а різниця швидкостей – dv . Сила тертя між ними визначається за законом Ньютона:

$$F = \eta S \frac{dv}{dx}$$

Коефіцієнт в'язкості η є характеристикою розчину і залежить від форми макромолекул і температури середовища, $[\eta] = \text{Па} \cdot \text{с}$. В'язкість залежить від

концентрації розчину складним нелінійним чином. Важливим показником є **характеристична в'язкість** розчину полімеру – відносна зміна в'язкості розчину при додаванні мізерної кількості розчиненої речовини до чистого розчинника:

$$\eta^* = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 c}$$

η_0 – в'язкість чистого розчинника.

η^* залежить від M . Для розчину полімерних клубків:

$$\eta^* = AM^\alpha$$

де $0.5 < \alpha < 1$ в залежності від проникності клубка для розчинника.

Ще більше η^* залежить від форми макромолекул:

$$\eta^* = \frac{\nu}{\rho}$$

ν – **коефіцієнт Сімхі (фактор форми)**, $[\nu] = \text{г}$.

Для жорстких сфер $\nu = 2,5$, для несферичних макромолекул $\nu > 2,5$. Чим більше витягнутий еліпсоїд, тим більший коефіцієнт Сімхі. Для глобулярних білків (рибонуклеаза А, лізоцим, гемоглобін) $3 < \nu < 6$, для міозину (фібрилярний) $\nu = 300$.

3.7. ПОСТУПАЛЬНА Й ОБЕРТАЛЬНА ДИФУЗІЯ БІОМАКРОМОЛЕКУЛ

Поступальна дифузія

При русі макромолекули у розчиннику на нього діє сила тертя:

$$F = f v$$

Знаючи коефіцієнт внутрішнього тертя f (**фрикційний коефіцієнт**), можна оцінити розмір і форму макромолекул. Він пов'язаний з коефіцієнтом дифузії D :

$$D = \frac{kT}{f} \quad (3.5)$$

Для сферичних макромолекул за формулою Стокса:

$$f = 6\pi\eta r \quad (3.6)$$

η – коефіцієнт в'язкості розчину.

З (3.5) і (3.6) маємо формули для визначення радіуса макромолекули:

$$r = \frac{kT}{6\pi\eta} \frac{1}{D}$$

маси макромолекули:

$$m = \frac{4}{3}\pi r^3 \rho = \frac{\rho}{162\pi^2} \left(\frac{kT}{\eta} \right)^3 \frac{1}{D^3}$$

та молекулярної маси:

$$M = mN_A = \frac{N_A \rho}{162\pi^2} \left(\frac{kT}{\eta} \right)^3 \frac{1}{D^3} \quad (3.7)$$

Отже, для сферичних макромолекул $M \sim 1/D^3$.

Для експериментального визначення коефіцієнта дифузії розчинник нашаровують на концентрований розчин макромолекул і досліджують розмиття границі розділу оптичними методами:

- 1) вимірювання поглинання УФ білками і нуклеїновими кислотами;
- 2) вимірювання показника заломлення (він пропорційний концентрації).

Якщо відома молекулярна маса макромолекули, то по тому, чи справджується формула (3.7), можна визначити, сферична макромолекула чи фібрилярна.

Повертальна дифузія

Про форму довгих асиметричних молекул (міозин, ДНК тощо) за допомогою тільки поступальної дифузії одержати дані важко, оскільки формула (3.7) годиться тільки для глобулярних молекул, а для фібрилярних макромолекул, форма яких навіть відома, вивести вираз для коефіцієнта тертя важко. Тому вивчають їх обертання в розчині.

Розглянемо кутовий розподіл макромолекул $n(\Omega)$ у залежності від орієнтації їх осей. У стані рівноваги цей розподіл рівномірний і густина розподілу макромолекул на одиницю тілесного кута постійна: $\rho = \frac{dn}{d\Omega} = \text{const}$. Якщо ж по якійсь причині система макромолекул виведена зі стану рівноваги, то вона намагається знову до нього повернутись, причому швидкість зміни частки макромолекул заданої орієнтації пропорційна до градієнта густини їх кутового розподілу:

$$\frac{dn}{dt} = -\Theta \frac{d\rho}{d\Omega} = -\Theta \frac{d^2 n}{d\Omega^2}$$

Θ – коефіцієнт обертальної дифузії. Він залежить від властивостей розчинника, температури, а також форми макромолекул.

Для експериментального визначення коефіцієнта обертальної дифузії використовують *динамооптичний ефект Максвелла*. Розчин поміщають у *динамооптиметр* між коаксіальними циліндрами й обертають внутрішній циліндр відносно зовнішнього. Між циліндрами створюється круговий потік розчинника. Строгій орієнтації всіх макромолекул вздовж потоку розчинника перешкоджає тепловий рух, тому молекули полімеру орієнтуються вздовж потоку тим точніше, чим більше вони видовжені, тобто чим менший коефіцієнт обертальної дифузії фібрилярних молекул. Проти основ циліндрів встановлюють поляризатор і аналізатор. Оскільки полімери – оптично активні речовини, вони повертають площину поляризації, і кут повороту визначається орієнтацією макромолекул у розчині.

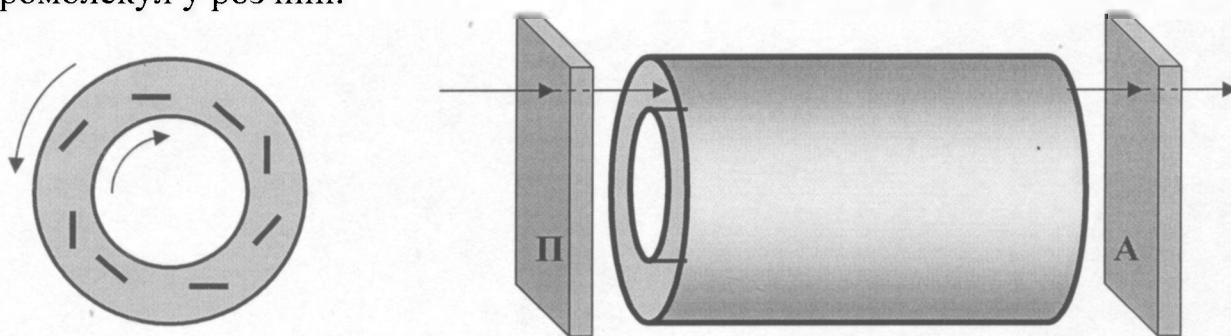


Рис.9. Схема динамооптимета Максвелла

Виміряні даним методом коефіцієнти обертальної дифузії для гемоглобіну (глобула) – $\Theta = 6 \cdot 10^6 \text{ с}^{-1}$, для міозину (фібрила) – $\Theta = 7 \text{ с}^{-1}$.

3.8. МЕТОД КВАЗІПРУЖНОГО РОЗСІЮВАННЯ СВІТЛА МАКРОМОЛЕКУЛАМИ

Розчин полімеру освітлюється монохроматичним пучком від лазера. Макромолекули в розчині рухаються в різних напрямках, тому вони розсіюють світло з дещо іншими довжинами хвиль внаслідок ефекту Доплера, і це дає можливість контролювати їхні рухи у розчині. Одержується розподіл інтенсивності розсіяного світла по кутах і частотах у вигляді піку певної ширини. За півшириною спектра можна визначити коефіцієнт поступальної дифузії, а з кутової й частотної залежностей інтенсивності розсіяного світла – коефіцієнт обертальної дифузії.

Метод квазіпружного розсіювання більш експресний (кілька хвилин) і точний (~1%), ніж гідродинамічні методи.

3.9. ЕЛЕКТРОФОРЕЗ БІОМАКРОМОЛЕКУЛ

Електрофорез – рух частинок у рідкій фазі під дією електричного поля. На макромолекулу із сумарним зарядом q діє кулонівська сила $F=qE$, під дією якої молекула набуває прискорення. Але із збільшенням швидкості зростає і сила опору $F=fv$. Коли ці сили зрівноважаться, настане стаціонарний стан:

$$qE=fv$$

Електрофоретична рухливість:

$$u = \frac{v}{E} = \frac{q}{F}, [u] = \frac{m^2}{B \cdot c}$$

Молекулярну масу білків можна визначити методом електрофорезу у присутності додецилсульфату натрію (ДСН) у поліакриламідному гелі. Білок обробляють

1% розчином ДСН, який є хорошим денатуруючим агентом, додають β -меркаптоетанол для розриву дисульфідних зв'язків. Кожна молекула ДСН має 1 негативний заряд. Поверхнева шуба з молекул ДСН усуває зарядові відмінності між білками. Після денатурації білку пептидний ланцюг має вигляд витягнутого циліндра з постійним діаметром 1,8 нм. Чим стержень довший, тим більша молекулярна маса білку і тим більший заряд він несе на собі.

Експериментально встановлена залежність між рухливістю і молекулярною масою макромолекули:

$$u = b - a \cdot \lg M$$

а і b – постійні, залежать від властивостей гелю.

Для визначення молекулярної маси досліджуваного білка треба побудувати калібровочну криву по маркерних білках (із відомими молекулярними масами).

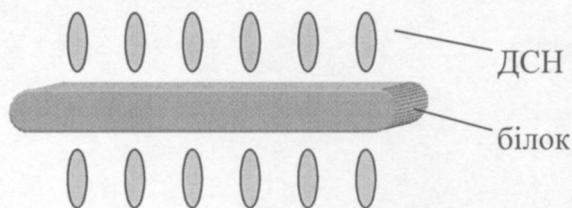


Рис. 10. Денатурована молекула білка у шубі з ДСН

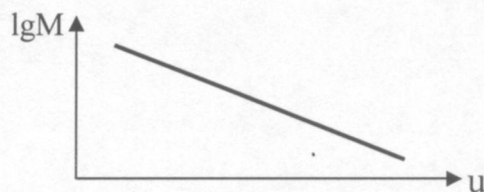


Рис. 11. Залежність між рухливістю і молекулярною масою макромолекули

Тема 4. БІОФІЗИКА БІЛКІВ

[2], с.25-27, 151-162, [4], с.61-97, [6], т.1, с.186-212, 250-253,
[9], с.210-222, 227-229



функції, які білки виконують в організмі:

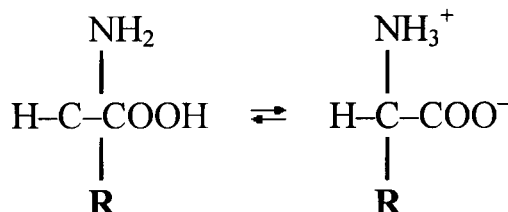
- утворення з'єднувальних тканин;
- генетичний апарат: реплікація, транскрипція, трансляція інформації;
- регуляторні процеси: гормони – носії сигналів, рецептори – узгають сигнали;
- імунологічна функція;
- транспортна;
- перенос електронів у мембранах мітохондрій при окисленні;
- м'язове скорочення;
- каталіз і регуляція метаболічних процесів ферментами.

Задача молекулярної біофізики: розшифрувати структуру білків і зрозуміти, як вони виконують свої функції.

4.1. ПЕРВИННА ТА ВТОРИННА СТРУКТУРИ БІЛКІВ

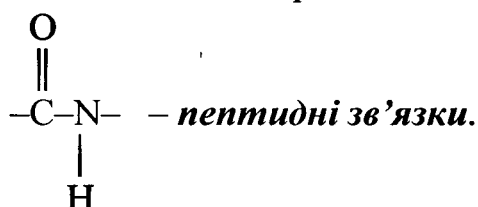
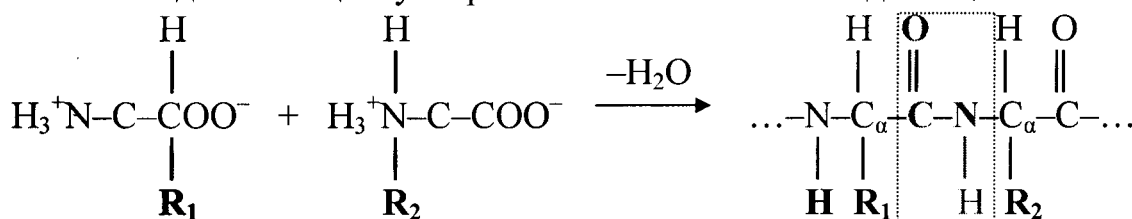
Первинна структура – послідовність амінокислот.

Формула амінокислот:



(їхня будова точніше виражається формулою дипольного іона). R – радикал, містить C, H, O, S, N.

Поліпептидний ланцюг утворюється шляхом поліконденсації амінокислот:



Усього відомо 20 амінокислот і відповідних їм кислотних залишків.

Пептидна група – плоска й жорстка. Вони між собою з'єднані через атом C_α. Довжина зв'язків C–N – 1,32 Å, C_α–N – 1,47 Å, C_α–C – 1,53 Å. Обертання навколо цих зв'язків не є повністю вільне.

Білки мають властивість скручуватись у спіраль. Тоді між пептидними групами виникають водневі зв'язки (взаємодіють пептидні групи, між якими є дві, тобто перша з четвертою і т.д.). Таким чином утворюється **вторинна структура**

білка – упорядковане розміщення поліпептидного ланцюга, стабілізоване водневими зв'язками.

Права α -спіраль найбільш енергетично вигідна і найчастіше зустрічається. Кількість амінокислотних залишків на 1 крок спіралі – 3,6, крок спіралі – 5,4 Å, радіус спіралі – 2,3 Å.

Інший тип вторинної структури – паралельні й антипаралельні β -складчасті листи (β -структура). Пептидні групи з'єднуються у виді складок (не більше 6 у ряд), наступний ряд іде поряд і т.д. Розміри листа: ширина 2,5 нм, довжина 2 нм. Більшість складчастих листів мають скручену форму. Скручування йде перпендикулярно до витягнутих ланцюжків.

Поліпептидні ланцюжки можуть перебувати також у неупорядкованій формі.

4.2. НАДВТОРИННА СТРУКТУРА

α -спіралі можуть скручуватись між собою, утворюючи *суперспіралі*. У тропоміозині, легкому мероміозині, параміозині скручені по 2 α -спіралі, в фібриногені – 3 α -спіралі. Суперспіраль стабілізується гідрофобними взаємодіями між окремими спіралями: гідрофобні залишки обох спіралей розташовуються всередині, уникаючи контакту з навколишньою водою.

Інші типи надвторинної структури: комбінації β -складчастих листів, комбінації β -складчастих листів з α -спіралями.

4.3. ТЕОРЕТИЧНІ МОДЕЛІ ПЕРЕДБАЧЕННЯ ВТОРИННОЇ СТРУКТУРИ БІЛКІВ

Передбачення вторинної структури білка можна робити, знаючи послідовність амінокислотних залишків. Використовуються два параметри: **частота зустрічання** амінокислотного залишку даного типу у вторинній структурі даного типу:

$$f = \frac{n'}{n}$$

де n' – частка амінокислотних залишків даного типу на ділянці ланцюга з певною вторинною структурою,

n – загальна частка залишків даного типу у всіх білках,

і **конформаційний параметр**

$$P = \frac{f}{\langle f \rangle}$$

де $\langle f \rangle$ – середнє значення по всіх типах залишків для даної структури.

Конформаційні параметри для всіх типів залишків – α -спіралі, β -структури, нерегулярної ділянки – вже визначені. На основі цих даних робиться висновок, що якщо на даній ділянці ланцюга переважають, наприклад, глутамінова кислота, аланін, лейцин, то ця ділянка має форму α -спіралі; якщо метіонін, ізолейцин, валін – β -структури; якщо пролін, гліцин – нерегулярна ділянка.

4.5. ДИСПЕРСІЯ ОПТИЧНОГО ПОВЕРТАННЯ БІЛКІВ

Дисперсія оптичного повертання (ДОП) і круговий дихроїзм (КД) – методи дослідження вторинної структури білків. У їх основі – взаємодія поляризованого світла з оптично активними молекулами. Оптичну активність викликають асиметричні атоми С, які входять в амінокислоти. Спектри ДОП і КД реєструються в УФ області в діапазоні 180-230 нм.

Плоскополяризоване світло можна представити як суму циркулярно поляризованих із лівою (L) і правою (R) поляризацією. Оптично активна речовина має для них різні показники заломлення n_L і n_R , отже швидкості поширення цих складових у речовині різні. Тому на вихід із кювети з такою речовиною ці складові приходять із різними фазами, і хоча в сумі вони знову дають плоскополяризовану хвилю, але вже з повернутою на певний кут площиною поляризації. Швидкості поширення складових, а отже і кут повороту для різних довжин хвиль – різний, у чому й полягає *дисперсія* оптичного повертання. Кут повороту:

$$\alpha(\lambda) = \frac{180^\circ}{\lambda} (n_L - n_R) d$$

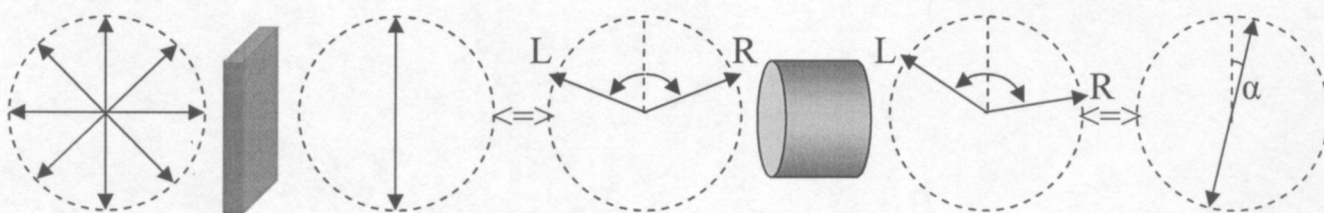


Рис.12. Дисперсія оптичного повертання

Питоме повертання – кут, на який повертає площину поляризації одиниця довжини розчину одиничної концентрації:

$$[\alpha](\lambda) = \frac{180^\circ}{\lambda c} (n_L - n_R)$$

c – концентрація,

d – товщина шару.

Спектри ДОП $[\alpha](\lambda)$ реєструються *спектрополяриметрами*.

4.6. КРУГОВИЙ ДИХРОЇЗМ БІЛКІВ

Оптично активна речовина по-різному поглинає ліво- і правополяризоване світло, тому насправді на виході не плоскополяризоване світло, а еліптично поляризоване, оскільки інтенсивності обох складових на виході з кювети різні. Еліптичність речовини вимірюється *дифрографом*. Перед досліджуваною речовиною знаходиться кристал, пропускаючий поперемінно L- або R-компоненту, а після кювети з речовиною вимірюється інтенсивність пройдені УФ хвилі. **Еліптичність:**

$$\Theta(\lambda) = \frac{180^\circ}{\lambda} (\epsilon_L - \epsilon_R)$$

ϵ_L , ϵ_R – коефіцієнти екстинкції (відстань, на якій інтенсивність променя зменшується в e разів),

Θ – кут, тангенс якого рівний відношенню малої й великої півосей еліпса.

Молярна еліптичність:

$$[\Theta](\lambda) = \frac{M}{dc} \Theta(\lambda)$$

M – молекулярна маса.

Крива $[\Theta](\lambda)$ – **спектр КД**.

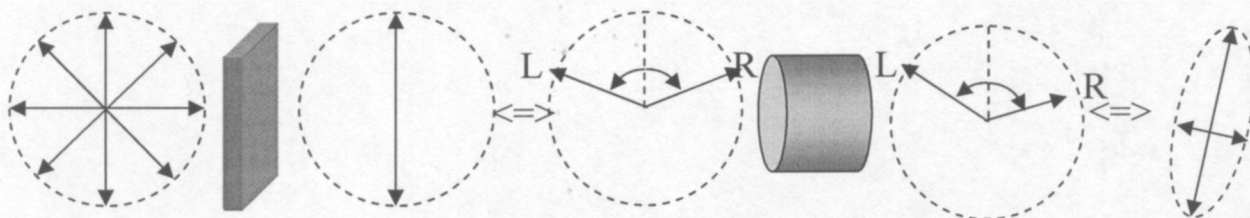


Рис.13. Круговий дихроїзм

Для визначення вторинної структури білка використовують відомі спектри маркерних білків, які перебувають тільки у формі α -спіралі, тільки у формі β -структури або тільки у неупорядкованій формі (у вигляді клубка), і структура яких точно встановлена методами рентгеноструктурного аналізу. Якщо позначити частки відповідних конформацій у досліджуваному білку через n_α , n_β , n_k , то його спектр КД:

$$[\Theta](\lambda) = n_\alpha [\Theta_\alpha](\lambda) + n_\beta [\Theta_\beta](\lambda) + n_k [\Theta_k](\lambda) \quad (4.1)$$

Якщо записати 3 такі рівняння для 3-х довжин хвиль, то розв'язок системи дасть частки кожного типу вторинної структури у досліджуваному білку.

Фібрилярні білки – високовпорядковані структури (тропоміозин має 93% α -спіралей). Глобулярні білки – менш упорядковані (хімотрипсин має 14% α -спіралей, 45% β -структур, 41% неупорядкованих структур).

Зміна температури, рН, додавання мочовини викликають зміни вторинної структури білків. Наприклад: полі-L-лізин при $pH < 12$ має вигляд неупорядкованого клубка, а при $pH = 12$ переходить у 100%-ну α -спіраль.

4.7. ТРЕТИННА Й ЧЕТВЕРТИННА БУДОВА БІЛКІВ

Третинна структура є термодинамічно найбільш вигідна форма. Нуклеаза стафілококів після денатурації повторно згортається всього лиш за 1 с.

Пояснює процес згортання *нуклеацінова модель*. Короткі сегменти поліпептидного ланцюга швидко згортаються незалежно один від одного, утворюючи α -спіралі і β -структури, потім зближуються, утворюючи компакту тривимірну структуру. Перехід спіраль – клубок відбувається за 10^{-6} – 10^{-8} с.

Білки з молекулярною масою $> 20\,000$ складаються з кількох глобулярних областей, слабо зв'язаних між собою – **доменів**. Домен згортається й розгортається незалежно один від одного. Доменна будова виявлена в імуноглобуліну G, міозину, фібриногені та ін.

4.8. ДИФЕРЕНЦІЙНА СКАНУЮЧА МІКРОКАЛОРИМЕТРІЯ ЯК МЕТОД ВИВЧЕННЯ ДОМЕННІЇ БУДОВИ БІЛКІВ

Принцип методу – вимірюється кількість теплоти, необхідна для збільшення температури. Одержується температурна залежність теплоємності, тобто *крива плавлення* білка. Різні домени мають різні температури плавлення і плаваються незалежно один від одного. За кількістю піків на кривій $C_p(T)$, площею під піками і їхніми висотами можна судити про кількість доменів у білку. Крива плавлення фібриногену (білок згортання крові, $M=340\ 000$) має 2 піки: при $T=328\text{ K}$ і $T=368\text{ K}$. Метод ДСМК виявив наявність у фібриногені 12 незалежних структурних доменів.

По кілька структурних доменів мають також імуноглобулін G, плазминоген, тропоміозин, міозин тощо.

4.9. ДИНАМІКА БІЛКОВОЇ СТРУКТУРИ

Найбільш прямий метод вивчення просторової структури білків – рентгено-структурний аналіз. Але при цьому одержується статична картина, відповідаюча усередненій структурі. Насправді, як показують результати ІЧ-спектроскопії, ЯМР, флуоресцентного аналізу, білки володіють динамічними властивостями. Атоми й групи атомів перебувають у постійному русі поблизу положень рівноваги.

У білку є області високої густини ($\rho=1,4\cdot 10^3\text{ кг/м}^3$) – ділянки з α -спіралями і β -структурами, та неупорядковані ділянки з низькою густиною ($\rho=0,5\cdot 10^3\text{ кг/м}^3$), куди переважно попадають гідрофобні залишки – т.зв. *гідрофобні кластери*. Останні виконують роль м'якого рідинно-подібного прошарку для руху впорядкованих доменів.

Типи молекулярних рухів у білках:

- Швидкі спонтанні флуктуації з часом релаксації $\tau < 10^{-7}\text{ с}$ мають локальний характер всередині макромолекул. Час релаксації обернено пропорційний до коефіцієнта повертальної дифузії і пропорційний кубу радіуса групи атомів. Для обертання бокових груп навколо одинарних зв'язків у поліпептидному ланцюгу (на кут $20\text{--}60^\circ$) $\tau=10^{-13}\text{ с}$, для обертання бокових груп амінокислот $\tau=10^{-9}\text{ с}$.
- Повільні рухи з часом релаксації $\tau > 10^{-7}\text{ с}$ пов'язані з переміщенням поліпептидних ланцюгів і доменів. Час життя фермент-субстратних комплексів – $10^{-2}\text{--}10^{-4}\text{ с}$.

4.10. ДИФЕРЕНЦІЙНА СПЕКТРОФОТОМЕТРІЯ БІЛКІВ

Спектр поглинання білка в УФ області визначається поглинанням ароматичних амінокислот – триптофану, тирозину, фенілаланіну. Основний закон абсорбційної спектrophотометрії – **закон Ламберта – Бера**:

$$I=I_0\exp(-\varepsilon l n)=I_0\exp(-\alpha l)$$

$[n]=\text{моль/л}$,

ε – *молярний коефіцієнт екстинкції*, $[\varepsilon]=\text{л}/(\text{м}\cdot\text{моль})$,

α – коефіцієнт поглинання, $[\alpha]=1/\text{м}$.

Закон Ламберта – Бера у логарифмічній формі:

$$D = \varepsilon l n = a l$$

D – оптична густина розчину, $D = \ln \frac{I_0}{I}$.

Залежність $D(\lambda)$ – **спектр поглинання**, реєструється спектрофотометром.

При конформаційних перебудовах білкових молекул зміщення спектра мале (<0.1 нм) і його важко реєструвати, тому використовується диференціальна спектрофотометрія. **Диференціальний спектр** – різниця між спектрами поглинання досліджуваної речовини і відомої.

Методи абсорбційної й диференціальної спектрофотометрії використовуються для визначення констант рівноваги дисоціації низькомолекулярних лігандів, констант швидкості асоціації субодиниць у білках, конформаційних змін у білках тощо.

4.11. ФЛУОРЕСЦЕНТНА СПЕКТРОСКОПІЯ БІЛКІВ

Флуоресцентна спектроскопія білків використовується для вивчення конформаційних станів білків у розчині.

Молекули поглинають кванти світла. При цьому електрони переходять на збуджений рівень із часом життя 10^{-8} – 10^{-9} с. Повернутись на основний рівень вони можуть різними шляхами:

- дисипація енергії у виді теплових коливань;
- випромінювання такого ж кванта світла (**флуоресценція**);
- внаслідок співударів збуджених молекул із сусідніми можлива переорієнтація спіну й перехід електрона на триплетний метастабільний рівень із часом життя від 10^{-7} с до кількох годин, і вже звідси – на основний (**фосфоресценція**).

Спектр флуоресценції – залежність інтенсивності флуоресценції від довжини випромінюваної хвилі. **Спектр збудження** – залежність інтенсивності флуоресценції від довжини падаючої хвилі. Спектр збудження переважно співпадає із спектром поглинання. За **законом Стокса**, спектр флуоресценції завжди розташований у більш довгохвильовій області, ніж спектр поглинання.

Квантовий вихід флуоресценції ϕ – відношення кількості випущених квантів до кількості поглинутих. Його визначають методом Паркера і Ріса. В однакових умовах вимірюються спектри флуоресценції еталонної й досліджуваної речовин і обчислюють квантовий вихід:

$$\phi = \phi_0 \frac{S}{S_0} \frac{D_0}{D}$$

S_0, S – площі під спектрами;

D_0, D – оптичні густини.

У якості еталона використовується розчин хініну бісульфату в 0,1 н H_2SO_4 із $\phi_0=0,55$ або флуоресцеїну в 0,1 н $NaOH$ з $\phi_0=0,92$.

4.12. ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДІВ ЯМР І ЕПР У БІОФІЗИЧНОМУ ЕКСПЕРИМЕНТІ

Ядерний магнітний резонанс (ЯМР) пов'язаний з магнетизмом атомних ядер.

Нуклони (протони й нейтрони) володіють **власним магнітним моментом (спіном)**. Величина магнітного моменту нуклона $\mu = \frac{1}{2} \gamma \hbar$, де γ – гіромагнітне відношення, \hbar – стала Планка. Магнітний момент нуклона – векторна величина, але він може мати тільки один із двох напрямків: уздовж довільно вибраної осі або проти. Відповідно спін нуклона I може приймати значення $-\frac{1}{2}$ або $+\frac{1}{2}$. Ядро атома також володіє власним магнітним моментом, який є сумою магнітних моментів нуклонів, які входять у нього. В багатьох ядрах із парною кількістю нуклонів таких як ^{12}C , ^{16}O спіни нуклонів взаємно компенсуються і такі ядра мають спін $I=0$. Але, наприклад, ядра ^2H , ^{14}N мають спін $I=1$. Зрозуміло, що некомпенсований спін мають всі ядра з непарною кількістю нуклонів. Ядра ^1H (протони), ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P мають спін $I = \frac{1}{2}$.

Найбільш інтенсивні сигнали ЯМР дають протони, тому ЯМР на протонах – найпоширеніший метод дослідження органічних сполук.

Спін протона чи іншого ядра можна виявити тільки у зовнішньому магнітному полі. Протони із спіном, співнаправленим із зовнішнім магнітним полем, мають меншу енергію, ніж протони з протилежно направленим спіном, тобто в магнітному полі відбувається розщеплення енергетичних рівнів. Різниця енергій між ними пропорційна до напруженості зовнішнього магнітного поля H_0 :

$$\Delta E = \gamma \hbar H_0 \quad (4.2)$$

Не всі протони знаходяться на нижчому енергетичному рівні, тому що частина з них поглинає енергію теплового руху. При низьких температурах більшість протонів знаходиться на нижчому рівні, але при зростанні температури дедалі більше їх переходить на вищий рівень. Співвідношення кількості протонів на нижчому (N_-) і вищому (N_+) енергетичних рівнях залежить від температури згідно розподілу Больцмана:

$$\frac{N_-}{N_+} = \exp\left(\frac{2\mu H_0}{kT}\right) > 1$$

Оскільки у слабких магнітних полях $\mu H_0 \ll kT$, то $N_+ \sim \frac{N}{2} \left(1 - \frac{\mu H_0}{kT}\right)$,

$$N_- \sim \frac{N}{2} \left(1 + \frac{\mu H_0}{kT}\right).$$

Якщо перпендикулярно до H_0 прикласти змінне слабе магнітне поле H_1 із резонансною частотою $\nu = \frac{\gamma H_0}{2\pi}$ (так щоб енергія кванта $E = h\nu$ дорівнювала

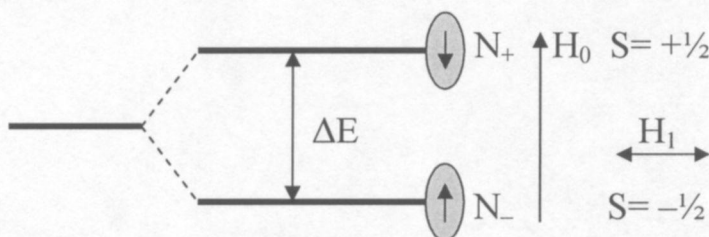


Рис.14. Енергетичні рівні протона

різниці енергій (4.2) між рівнями), то протони будуть інтенсивно переходити з нижчого рівня на вищий і навпаки. Переходи вгору і вниз відбуваються з однаковими, пропорційними до напруженості змінного магнітного поля H_1 , ймовірностями W (за одиницю часу), але через те, що протонів на нижньому рівні знаходиться більше, переходи вгору відбуватимуться частіше. При цьому поглинатиметься енергія змінного магнітного поля з потужністю

$$Q = Wh\nu(N_- - N_+) = WNH_0^2 \frac{\gamma^2 \hbar^2}{2kT}. \text{ Водночас із поглинанням енергії відбувається}$$

спін-граткова релаксація – повернення системи спінів у стан теплової рівноваги, тобто встановлюється стаціонарний стан, при якому потужність енергії, що поглинається – постійна в часі. Спін-граткова релаксація заважає встановленню насичення, при якому половина всіх протонів мала б перейти на вищий рівень і поглинання потужності змінного магнітного поля мало б припинитись.

Різні протони оточені різними комбінаціями сусідніх ядер, які створюють навколо себе власні магнітні поля, в результаті чого магнітні поля на різних протонах дещо відрізняються від H_0 , а отже відрізняються і резонансні частоти. Таким чином, одержавши розподіл поглинутої потужності в залежності від частоти поля, можна робити висновки про оточення протонів.

Але змінювати частоту поля H_1 технічно важко, тому змінюють величину поля H_0 . Отже, резонанс для різних протонів в залежності від їх оточення настає при різних величинах поля H_0 . Експериментально одержують **лінію ЯМР** – залежність поглинутої потужності від напруженості поля H_0 , яка дає можливість дослідити найближче оточення атомів водню.

Спектр ЯМР може мати кілька піків, які відповідають різним сортам *еквівалентних ядер*, наприклад пік протонів груп CH_3 , пік протонів бензольного кільця тощо. Такий спектр називається **спектром ядерного магнітного резонансу високої роздільної здатності**. З нього можна робити висновки про будову молекул. Форма лінії ЯМР залежить і від відстаней, і від кута між магнітним вектором і напрямком орієнтації молекул, що дає можливість досліджувати процеси модифікації структури білків. Вивчення здатності до деформації дає можливість визначити орієнтацію ланцюгів. Методом ЯМР можна вивчити також характер з'єднання атомних груп.

Метод ЯМР дозволяє робити висновки про характер молекулярних рухів у полімерах. Він особливо чутливий до рухів неполярних бокових привісків (CH_3 -груп). Метод ЯМР дозволяє досліджувати окремі білки з виділенням ліній від метильних, метиленових, SH -груп, залишків триптофану, тирозину, гістидину. Спостереження резонансу ^{13}C дозволяє визначати окремі лінії карбонільних груп, залишків аргініну, аланіну. Дослідження спектрів від ^{31}P використовують для вивчення будови мембран.

Вивчення динаміки білкових структур ґрунтується на вимірюванні часу спін-граткової релаксації магнітних моментів ядер. Виявлено рухи окремих ділянок білків. Час релаксації для міоглобіну – 22 нс, для лізоциму – 13 нс, для гемоглобіну – 47 нс. у цих випадках час релаксації визначається броунівським обертанням молекули в цілому. Вуглеводні аліфатичних груп на поверхні РНК мають часи релаксації 0,1-0,3 нс.

Явище ЯМР використовується в **ЯМР-томографії**. Для цього у тканині створюють градієнт магнітного поля. Переважна більшість протонів в організмі належить воді, отже інтенсивність сигналу на певній частоті показує вміст води у відповідній частині тканини. Біологічний об'єкт проглядають у різних напрямках і за допомогою комп'ютера одержують зображення. Методом ЯМР-томографії можна визначати розміри й місцезнаходження пухлин в організмі, оскільки намагніченість пухлин виявляється більшою, ніж у нормальних тканин. Також можна одержувати зображення органів усередині грудної клітки або черепа.

Електронний парамагнітний резонанс (ЕПР) – розділ радіоспектроскопії, який вивчає магнітний резонанс, пов'язаний з електронним парамагнетизмом.

Теорія ЕПР подібна до теорії ЯМР. Але магнітні моменти атомних електронів на 3 порядки більші, ніж ядерні магнітні моменти, тому резонансні частоти на них відповідно більші. Зазвичай у молекулах вони скомпенсовані, оскільки молекули містять парну кількість електронів. Але радикали, іони тощо мають некомпенсовані магнітні моменти. Магнітний резонанс на неспареному електронному спіні називається електронним парамагнітним резонансом (ЕПР). Умова ЕПР:

$$h\nu = g\mu_B H_0$$

μ_B – магнетон Бора,

g – фактор спектроскопічного розщеплення, для вільного електрону $g=2,0023$.

За допомогою методу ЕПР показано, що біологічні системи містять вільні радикали з неспареним електроном. Вони утворюються в ході окисно-відновних реакцій в організмі типу:



У біофізичних дослідженнях використовується **метод спінових міток**. Він полягає у приєднанні до функціональної групи білку вільного радикала й вивчення його сигналів ЕПР. У якості міток використовуються нітроксильні радикали, які містять групу $\bullet N-O$. Неспарений електрон делокалізований між атомами N і O і взаємодіє з некомпенсованим спіном ядра N. Унаслідок цього лінія поглинання сигналу ЕПР розщеплюється на три складові, відповідні різним проекціям ядерного спіну азоту ($M = -1, 0, +1$) на напрям поля H_0 .

Мітка приєднується до поверхні білкової молекули й обертається, міняючи таким чином своє оточення. Це приводить до зміни положення, форми й ширини ліній ЕПР. По формі ліній ЕПР вивчають найближче оточення білкової молекули.

Вивчення біоструктур (білки, мембрани тощо) за допомогою спін-міток дає важливу інформацію про молекулярну динаміку.

ТЕМА 5. ВЗАЄМОДІЯ ФЕРМЕНТУ ІЗ СУБСТРАТОМ

[2], с.185-219, [4], с.97-117, [6], т.1, с.291-312

5.1. МОЛЕКУЛЯРНИЙ МЕХАНІЗМ ВЗАЄМОДІЇ ФЕРМЕНТУ ІЗ СУБСТРАТОМ

В живому організмі проходить багато оборотних реакцій: гідроліз, розщеплення хімічних зв'язків, ізомеризація, перенос електронів. Велика швидкість реакції досягається завдяки каталізаторам – ферментам. Вони дуже ефективні: підвищують швидкість реакції на 8-20 порядків. Практично всі каталітичні реакції протікають і без ферментів, але зі значно меншою швидкістю. Ферменти високоспецифічні: діють тільки на один тип субстрату або групу субстратів.

Молекулярна активність або **число оборотів ферменту** – кількість молів субстрату, які перетворюються молекулою ферменту за 1 хвилину при значному надлишку субстрату.

Субстрат безпосередньо взаємодіє з певною малою ділянкою молекули ферменту – **активним центром**. Більшість ферментів функціонує в комплексі з кофакторами, коферментами (наприклад, із вітамінами). Наприклад, креатинкіназа каталізує реакцію: $\text{АТФ} + \text{креатин} \rightleftharpoons \text{АДФ} + \text{фосфокреатин} + \text{H}^+$. Кофактор для цієї реакції – іони магнію. Важливу роль в активному центрі креатинкінази відіграє SH-група. Фермент інактивується йодацетатамідом і йодацетатом. У присутності іонів магнію SH-група захищена від дії цих блокувальників.

Ферменти стереоспецифічні: дзеркальний антипод даного субстрату не є субстратом для даного ферменту.

Ліганд (субстрат або інгібітор) зазвичай взаємодіє з ферментом т.ч.: він входить у порожнину ферменту і контактує з кількома його функціональними групами. При цьому спочатку утворюється **фермент-субстратний комплекс**, а після перетворення субстрату у продукт реакції останній відділяється від ферменту, і знову фермент готовий до приєднання наступної молекули ліганду.

Для ефективної дії ферментів необхідна наявність таких факторів:

- 1) Велика спорідненість ферменту й субстрату, тобто велика ймовірність утворення фермент-субстратного комплексу (**ефект зближення**).
- 2) Строга взаємна орієнтація реагентів, кофакторів і активного центру (**ефект орієнтації**).
- 3) Дія на субстрат нуклеофільних і електрофільних груп активного центру (**ефект синхронного кислотно-основного каталізу**). Наприклад, оксипіридин, який містить водночас кислотний і основний залишки, каталізує мутаротацію глюкози, розриваючи її шестичленне кільце. Та ж реакція за участю суміші піридину і фенолу відбувається в 7000 разів повільніше через те, що відповідні залишки належать різним молекулам, і ймовірність зустрічі трьох молекул водночас набагато менш ймовірна.
- 4) Активація субстрату шляхом перерозподілу електронної густини під дією активних груп ферменту (**ефект поляризації**).
- 5) Зміна конформацій білку і субстрату у фермент-субстратному комплексі (**ефект індукованого контакту**).

5.2. КОНФОРМАЦІЙНІ ПЕРЕБУДОВИ ФЕРМЕНТІВ ПРИ ВЗАЄМОДІЇ ІЗ СУБСТРАТАМИ

Теорія індукованої структурної відповідності ферменту й субстрату:

Субстрат викликає суттєві зміни геометрії ферменту при проникненні в його активний центр. В результаті конформаційної перебудови активного центру каталітичні групи ферменту точно орієнтуються. Проходять два процеси: зв'язування субстрату і його каталітичне перетворення.

Типи конформаційних перебудов ферментів:

- 1) **Локальні** конформаційні перебудови зачіпають тільки область активного центру. Зміщення – до 1,5 нм. Тирозиновий залишок 248 ферменту карбоксипептидази зміщується на 1,2 нм при захопленні ліганду.
- 2) **Крупномасштабні** конформаційні перебудови зв'язані з відносним рухом структурних доменів. Зміщення – більше 1,5 нм. Наприклад, при зв'язуванні лігандів гексокіназою два домени переміщуються один відносно другого, пептидний ланцюг виконує при цьому роль шарніру. Алькогольдегідрогеназа печінки також складається з 2-х субодиниць, у кожену з яких входять 2 домени, з'єднані поліпептидним ланцюгом. Алькогольдегідрогеназа може знаходитись у 2-х конформаціях – відкритій і закритій (тоді один із них зв'язаний з коферментом НАДН, відповідаючий за перенос електронів в електротранспортних процесах). Після завершення хімічної реакції домени знову розсуваються і продукти реакції виходять назовні. Кут повороту доменів – 30°. Невеликі високочастотні флуктуації білкової структури допомагають знизити високий потенціальний бар'єр (4200 кДж/моль).

5.3. МЕТОДИ ВИМІРЮВАННЯ ШВИДКИХ ФЕРМЕНТАТИВНИХ РЕАКЦІЙ

На початку ферментативної реакції перед встановленням стаціонарного стану проходить перехідна фаза, під час якої реагенти повинні рівномірно перемішатись в розчині. Якщо ж реакція відбувається надто швидко, то вони не встигають цього зробити, і стаціонарного стану, який можна було б дослідити, досягнуто не буде. Для вирішення цієї проблеми необхідно застосувати методи, які дають можливість рівномірно змішати реагенти протягом короткого порівняно з *характерним часом проходження реакції* проміжку часу. Хімічна реакція – релаксаційний процес, в якому концентрації реагентів зменшуються за експоненціальним законом. *Характерний час проходження реакції* – це час, протягом якого концентрації реагентів зменшуються в e разів. Реакцію називають *швидкою*, якщо характерний час її проходження $< 1\text{с}$.

Метод зупиненого потоку

Спеціальна установка дозволяє дуже швидко змішати розчини ферменту й субстрату і подати суміш у камеру спостереження. На все це йде кілька мілісекунд. Метод дозволяє вивчати кінетику ферментативних реакцій у мілісекундному інтервалі.

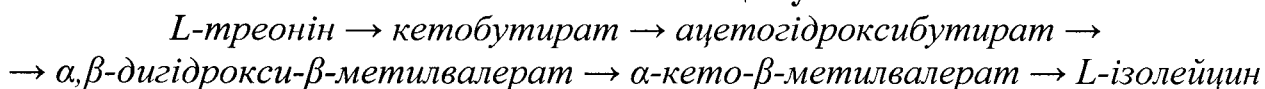
Метод температурного стрибка

Реагенти змішують і через суміш пропускають електричний розряд. Протягом 1 мкс температура підвищується на 10°. Такого підвищення температури достатньо для того, щоб почалась ферментативна реакція.

5.4. СТРУКТУРА АЛОСТЕРИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ

Алостеричні ферменти – ферменти, які мають спеціальні центри зв'язування ефекторів, просторово відділені від каталітичних центрів. Центри зв'язування ефекторів називаються **алостеричними**. Алостеричні ферменти регулюють, контролюють і каталізують ключові метаболічні реакції в організмі.

Синтез L-ізолейцину:



Перше перетворення каталізується треоніндезаміназою. Кінцевий продукт ланцюга реакцій L-ізолейцин інгібує треоніндезаміназу, тобто зменшує її каталітичну активність, що приводить до зменшення концентрації L-ізолейцину, це приводить до збільшення швидкості реакції і т.д., тобто активність ферменту регулюється за принципом негативного зворотного зв'язку. Треоніндезаміназа крім активного центру, де каталізується перетворення L-треоніну, має спеціальні центри зв'язування ефекторів (активаторів та інгібіторів), просторово віддалені від каталітичного центру.

Алостеричні ферменти як правило мають субодиничну будову. Фосфоліпаза складається з 2-х субодиниць, треоніндезаміназа – із 4-х. Аспартаттранскарбомуілаза (АТКаза) (М=300 000) складається з 2-х каталітичних тримерів і 3-х регуляторних димерів, тобто АТКаза містить 6 каталітичних і 6 алостеричних центрів.

5.5. КООПЕРАТИВНА КІНЕТИКА РЕАКЦІЙ З УЧАСТЮ АЛОСТЕРИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ. РІВНЯННЯ ХІЛЛА

Кооперативність полягає в тому, що зв'язування субстрату одним центром полегшує або утруднює зв'язування субстрату іншими центрами алостеричного ферменту.

Міоглобін (використовується для запасання кисню у м'язах) має тільки один центр зв'язування кисню. Відповідне рівняння реакції:



E – білок, не зв'язаний з лігандом (у даному випадку – із киснем),

X – ліганд,

EX – білок, зв'язаний з лігандом.

Ступінь насичення білка лігандом:

$$Y = \frac{[EX]}{[E] + [EX]}, \quad \text{або} \quad Y = \frac{K[X]}{1 + K[X]} \quad (5.2)$$

де $K = \frac{[EX]}{[E] \cdot [X]}$ – константа рівноваги реакції (5.1).

Гемоглобін не фермент, але на його прикладі розглянемо функціонування кооперативних ферментів. Він має 4 центри зв'язування кисню. Не обов'язково всі вони одночасно заповнені. Рівняння реакції кооперативного зв'язування h молекул кисню з гемоглобіном:



Ступінь насичення білка лігандом:

$$Y = \frac{[EX_h]}{[E] + [EX_h]}, \text{ або } Y = \frac{K[X]^h}{1 + K[X]^h} \quad (5.4)$$

де $K = \frac{[EX_h]}{[E] \cdot [X]^h}$ – константа рівноваги реакції (5.3).

Рівняння (5.2) і (5.4) – це **рівняння Хілла** для некооперативного й кооперативного зв'язування ліганда ферментом відповідно. Аlostеричні ферменти внаслідок кооперативності мають S-подібну залежність активності від концентрації субстрату. Залежності для міоглобіну (1) і гемоглобіну (2) (хоч він і не фермент, а білок-переносник) показано на рис.15.

Рівняння (5.4) можна перетворити до такого виду:

$$Y = 1 - \frac{1}{1 + K[X]^h}$$

$$1 - Y = \frac{1}{1 + K[X]^h}$$

$$\frac{Y}{1 - Y} = \frac{K[X]^h}{1 + K[X]^h} (1 + K[X]^h) = K[X]^h$$

$$\lg\left(\frac{Y}{1 - Y}\right) = \lg K + h \lg[X]$$

Одержана лінійна залежність називається **графіком Хілла** (рис.16). По ньому легко визначити константу рівноваги K (перетин прямої з віссю ординат) і коефіцієнт Хілла h , який характеризує ступінь кооперативності (за кутом нахилу прямої: $h = \operatorname{tg} \alpha$). Для гемоглобіну $h = 2,8 > 1$, тобто кооперативність позитивна. Якщо $h < 1$, то кооперативність негативна.

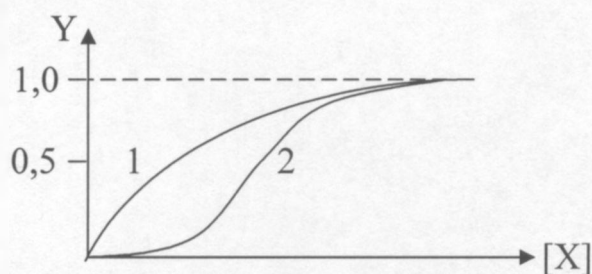


Рис.15. Залежність ступеня насичення білка від концентрації ліганда для некооперативного (1) і кооперативного (2) зв'язування.

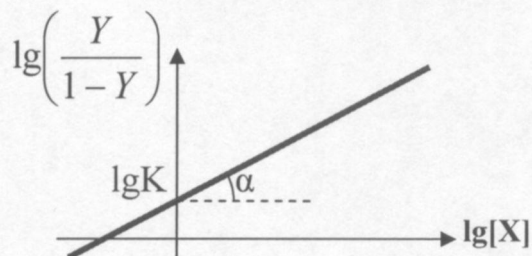


Рис.16. Графік Хілла

5.6. МОДЕЛІ ФУНКЦІОНУВАННЯ АЛОСТЕРИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ

Симетрична модель:

Аlostеричний фермент може існувати у 2-х конформаційних станах – **напруженому** з низькою спорідненістю до ліганда і **релаксованому** з високою спорідненістю до ліганда. Усі субодиниці білка мають однакову конформацію і при приєднанні чи від'єднанні лігандів змінюють свою конформацію одночасно. Модель дуже добре пояснює S-подібні криві.

Послідовна модель:

Ліганди приєднуються до ферменту послідовно, один за одним. Після приєднання першого ліганда індуються конформаційні зміни у другій субодиниці, що полегшує приєднання наступного ліганда і т.д. Модель пояснює також негативну кооперативність, коли приєднання першого ліганда індукує такі зміни інших субодиниць, які зменшують ймовірність приєднання наступних лігандів.

ТЕМА 6. КІНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНИХ РЕАКЦІЙ

[2],с.176-184, [4],с.101-106,108-112, [7],с.49-74

Кінетика вивчає динаміку і часові характеристики реакцій.

6.1. ШВИДКІСТЬ І КОНСТАНТА ШВИДКОСТІ РЕАКЦІЇ

Швидкість реакції – зміна концентрації реагентів або продуктів реакції за одиницю часу, приведена до їх стехіометричного коефіцієнта в даній реакції. Вона визначається ймовірністю одночасної зустрічі взаємодіючих молекул і отже пропорційна до концентрацій взаємодіючих речовин із врахуванням їх стехіометричного коефіцієнта в даній реакції. Розглянемо просту реакцію:



Для проходження реакції достатньо зустрічі двох молекул (А і В). **Кінетичне рівняння** даної реакції (рівняння для швидкості реакції) записується т.ч.:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k[A][B] \quad (6.2)$$

Коефіцієнт пропорційності k у кінетичному рівнянні називається **константою швидкості реакції**.

6.2. РЕАКЦІЇ НУЛЬОВОГО Й ПЕРШОГО ПОРЯДКУ

Порядок реакції визначається кількістю водночас взаємодіючих молекул. **Порядком реакції** називається сума показників степенів концентрацій реагентів у кінетичному рівнянні. Рівняння (6.2) – 2-го порядку, отже реакція (6.1) – реакція другого порядку. Якщо речовини В є в надлишку, то швидкість реакції практично не залежить від її концентрації і тоді реакція (6.1) має перший порядок. Якщо швидкість реакції не залежить від концентрацій реагентів, то така реакція – псевдонульового порядку (наприклад, ферментативні реакції з надлишком субстрату).

Розхід речовини А у реакції (6.1) – реакція першого порядку:

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k[A]$$

$$\frac{d[A]}{[A]} = -kdt$$

$$\int \frac{d[A]}{[A]} = -\int kdt$$

$$\ln[A] - \ln[A]_0 = -kt$$

$$[A] = [A]_0 \exp(-kt)$$

Отже, концентрація реагенту в ході хімічної реакції зменшується за експоненціальним законом.

6.3. ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ НА ШВИДКІСТЬ ХІМІЧНОЇ РЕАКЦІЇ. РІВНЯННЯ АРЕНІУСА

При зближенні реагуючі молекули повинні подолати потенціальний бар'єр висотою E_a , який називають **енергією активації**. При температурі абсолютного нуля молекули не можуть реагувати між собою, але при зростанні температури все більше молекул здатні набути достатньої для взаємодії енергії, причому кількість таких молекул зростає із зміною температури за експоненціальним законом, який виражається **рівнянням Ареніуса**:

$$k = A \exp\left(-\frac{E_a}{k_B T}\right) \quad (6.3)$$

k_B – стала Больцмана.

При зростанні температури до безмежності всі молекули, які зіткнулись, здатні вступати в реакцію і тоді $k=A$, тобто A – це **частота зіткнень** реагуючих молекул за одиницю часу. Отже, **множник Больцмана** $\exp\left(-\frac{E_a}{k_B T}\right)$ – це частка молекул, які беруть участь в реакції, тобто енергія яких достатня для цього.

6.4. ЕНЕРГІЯ АКТИВАЦІЇ ТА ЇЇ ВИЗНАЧЕННЯ

З (6.3) одержуємо лінійну залежність:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{k_B T}$$

Графік $\ln k$ від оберненої температури – пряма. З нахилу прямої легко знайти частоту зіткнень та енергію активації.

6.5. ТЕОРІЯ АБСОЛЮТНИХ ШВИДКОСТЕЙ РЕАКЦІЇ

Необхідною умовою проходження реакції є зменшення вільної енергії ($\Delta G < 0$). При зближенні реагуючі молекули повинні подолати потенціальний бар'єр висотою E_a і шириною d на відстані r_0 . Але якщо енергія активації E_a велика, то умови $\Delta G < 0$ недостатньо. Для пониження потенціального бар'єру служать каталізатори. За теорією, на відстані r_0 утворюється деякий **нестійкий активований комплекс** АВ із максимальною енергією, яка більша за енергію окремих молекул на величину E_a .

Після утворення комплексу він може або безрезультатно розпастись, або молекули прореагують з утворенням відповідного продукту реакції й виділенням енергії:



Константа рівноваги даної реакції:

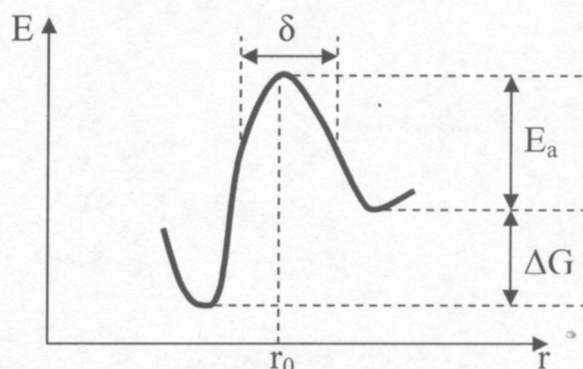


Рис. 17. Потенціальний бар'єр реакції.

$$K = \frac{[AB]}{[A][B]}$$

Квантово-механічні оцінки дають ширину бар'єра:

$$\delta = \frac{h}{\sqrt{2\pi m k_B T}}$$

Швидкості молекул підлягають розподілу Максвелла, тому їхня середня швидкість:

$$\langle u \rangle = \frac{\int u \exp\left(-\frac{mu^2}{2k_B T}\right) du}{\int \exp\left(-\frac{mu^2}{2k_B T}\right) du} = \sqrt{\frac{k_B T}{2\pi m}}$$

Середній час проходження через бар'єр:

$$\tau = \frac{\delta}{\langle u \rangle} = \frac{h}{k_B T} \sim 10^{-13} - 10^{-14} \text{ c}$$

Константа швидкості реакції обернено пропорційна до середнього часу проходження через енергетичний бар'єр. Тому швидкість реакції:

$$v = k[AB] = \frac{[AB]}{\tau} = [AB] \frac{k_B T}{h}$$

З іншого боку, маємо формулу (6.2) для швидкості реакції, із якої одержуємо вираз для константи швидкості даної реакції:

$$k = \frac{v}{[A][B]} = \frac{[AB]}{[A][B]} \frac{k_B T}{h} = \frac{k_B T}{h} K$$

6.6. РІВНЯННЯ ЕЙРІНГА

З рівняння Вант-Гофа (1.9) одержимо:

$$K = \exp\left(-\frac{\Delta G^0}{RT}\right)$$

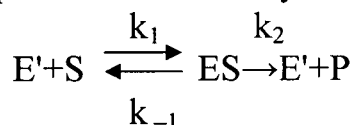
де $\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$ – стандартна вільна енергія активації.

Звідси легко одержати **рівняння Ейрінга**:

$$k = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^0}{RT}\right) = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta H^0}{RT}\right) \exp\left(\frac{\Delta S^0}{R}\right)$$

6.7. КІНЕТИКА ВЗАЄМОДІЇ ФЕРМЕНТУ Й СУБСТРАТУ

Розглянемо реакцію взаємодії ферменту E із субстратом S з утворенням короткоживучого фермент-субстратного комплексу ES:



E' – вільний фермент.

Загальна концентрація ферменту:

$$[E] = [E'] + [ES]$$

Звідси:

$$[E'] = [E] - [ES] \quad (6.4)$$

Кінетичне рівняння для швидкості утворення й розпаду фермент-субстратного комплексу ES:

$$v_1 = \frac{d[ES]}{dt} = k_1[E'][S] - (k_{-1} + k_2) \cdot [ES]$$

k_1 – константа швидкості перетворення $E' + S \rightarrow ES$,

k_{-1} – константа швидкості перетворення $ES \rightarrow E'$,

k_2 – константа швидкості перетворення $ES \rightarrow P$.

Після запуску ферментативної реакції деякий час концентрація фермент-субстратного комплексу ES залишається сталою (стаціонарний стан): $\frac{d[ES]}{dt} = 0$,

звідси:

$$k_1 \cdot [E'][S] - (k_{-1} + k_2) \cdot [ES] = 0$$

Підставивши сюди (6.4), одержимо вираз для концентрації фермент-субстратного комплексу у стаціонарному стані в залежності від концентрації субстрату:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M + [S]}$$

де $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ – **константа Міхаеліса**.

6.8. РІВНЯННЯ МІХАЕЛІСА – МЕНТЕН

Швидкість ферментативної реакції:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = \frac{k_2[E][S]}{K_M + [S]}$$

Максимально можлива концентрація фермент-субстратного комплексу рівна концентрації ферменту: $[ES]_{\max} = [E]$. Отже, максимальна швидкість реакції:

$$v_{\max} = k_2[E]$$

Таким чином одержуємо **рівняння Міхаеліса – Ментен**:

$$v = \frac{v_{\max}[S]}{K_M + [S]}$$

Звідси бачимо, що **константа Міхаеліса чисельно рівна тій концентрації субстрату, при якій швидкість реакції рівна половині максимальної швидкості**. При малій концентрації субстрату $[S]$

швидкість реакції $v \approx \frac{v_{\max}}{K_M} [S]$ і ми

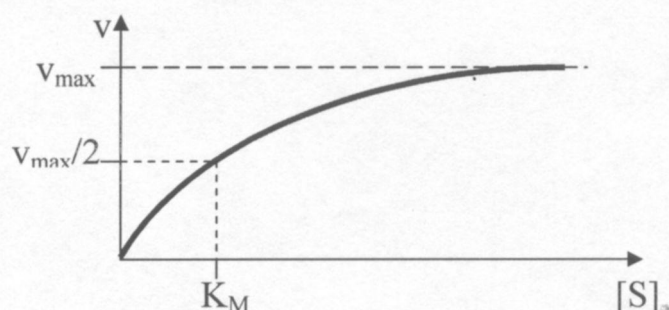


Рис.18. Графічна залежність швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату

маємо реакцію псевдопершого порядку. При великій концентрації субстрату $[S]$ швидкість реакції прямує до максимальної: $v \rightarrow v_{\max} = \text{const}$ і ми маємо реакцію псевдонульового порядку. Отже, при зростанні концентрації субстрату порядок даної реакції поступово змінюється від 1 до 0.

6.9. ГРАФІЧНИЙ МЕТОД ЛАЙНУЇВЕРА – БЕРКА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КІНЕТИЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ФЕРМЕНТАТИВНИХ РЕАКЦІЙ

З рівняння Міхаеліса – Ментен легко одержати лінійну залежність між оберненою швидкістю ферментативної реакції та оберненою концентрацією субстрату:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (6.5)$$

Графік цієї залежності – лінійний – *графік Лайнуївера – Берка*. З графіка легко одержати величини v_{\max} і K_M .

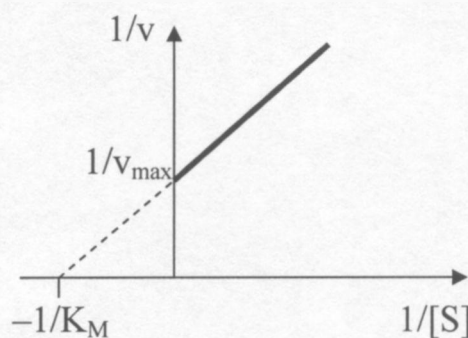


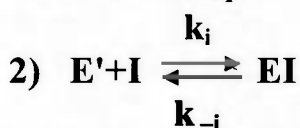
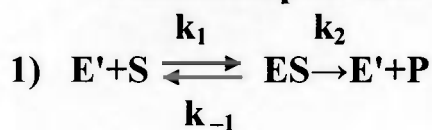
Рис.19. Графік Лайнуївера – Берка.

6.10. КОНКУРЕНТНЕ ІНГІБУВАННЯ ФЕРМЕНТАТИВНИХ РЕАКЦІЙ

Інгібітори – сполуки, які зменшують швидкість хімічної реакції.

Конкурентне інгібування – якщо інгібітор I з'єднується з тим самим активним центром ферменту E , що і субстрат S , з утворенням неактивного комплексу EI .

Рівняння реакцій:



E' – вільний фермент.

Відповідні кінетичні рівняння:

$$v_1 = \frac{d[ES]}{dt} = k_1[E'][S] - (k_{-1} + k_2)[ES]$$

$$v_2 = \frac{d[EI]}{dt} = k_i[E'][I] - k_{-i}[EI]$$

k_i – константа швидкості перетворення $E' \rightarrow EI$,

k_{-i} – константа швидкості перетворення $EI \rightarrow E'$.

Причому:

$$[E] = [E'] + [ES] + [EI]$$

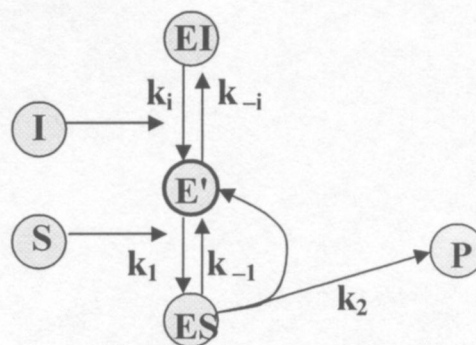


Рис.20. Схема конкурентного інгібування

Використавши умову стаціонарності $v_1=0$, $v_2=0$, знаходимо концентрацію фермент-субстратного комплексу при стаціонарному процесі:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M + \frac{K_M}{K_i}[I] + [S]}$$

K_i – константа інгібування, $K_i = \frac{k_{-i}}{k_i}$.

Швидкість ферментативної реакції:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = \frac{v_{\max}[S]}{K_M + \frac{K_M}{K_i}[I] + [S]}$$

Звідси можна одержати вираз для оберненої швидкості. Виявляється, вона і в цьому випадку лінійно залежить від оберненої концентрації субстрату:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} = \frac{K'_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (6.6)$$

Для порівняння різних випадків зручно побудувати для них графіки Лайнуївера – Берка (рис.21).

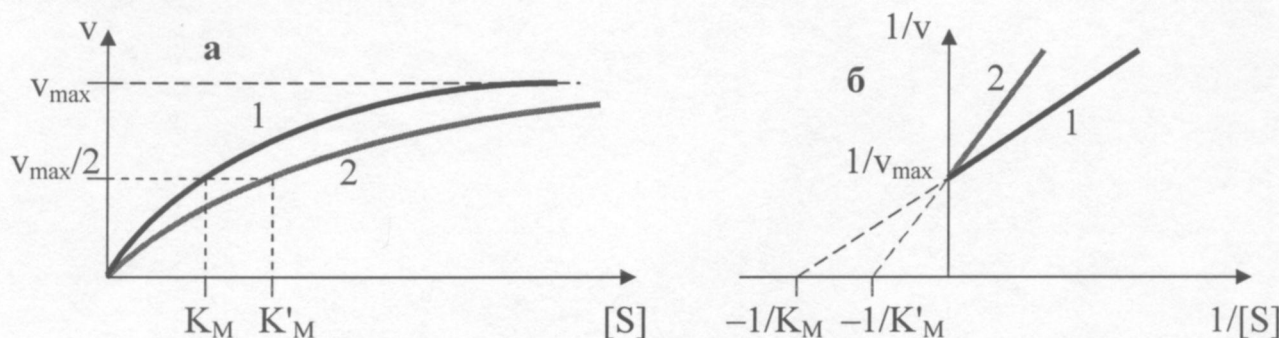


Рис.21. Графічні залежності швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату (а) та відповідні графіки Лайнуївера – Берка (б) без інгібітора (1) та з конкурентним інгібітором (2)

Порівнявши (6.6) із (6.5), бачимо, що конкурентний інгібітор збільшує константу Міхаеліса в $1 + \frac{[I]}{K_i}$ разів і тому для тієї ж швидкості реакції потрібна більша концентрація субстрату. Максимальна швидкість реакції при цьому типі інгібування не змінюється.

6.11. НЕКОНКУРЕНТНЕ ІНГІБУВАННЯ ФЕРМЕНТАТИВНИХ РЕАКЦІЙ

Неконкурентний інгібітор приєднується до фермент-субстратного комплексу ES і утворює неактивний (непродуктивний) комплекс ESJ із фермент-субстратним комплексом.

Рівняння реакцій:

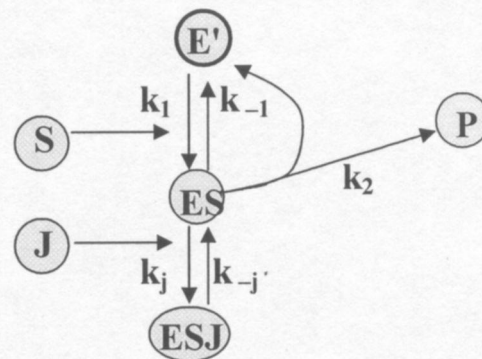
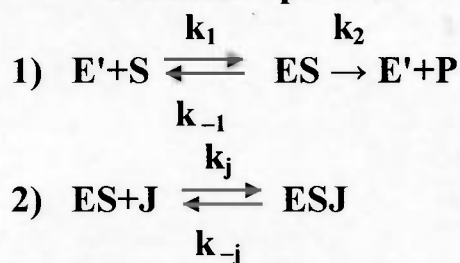


Рис.22. Схема неконкурентного інгібування

Відповідні кінетичні рівняння:

$$v_1 = \frac{d[ES]}{dt} = k_1[E'][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] - k_j[ES][J] + k_{-j}[ESJ]$$

$$v_2 = \frac{d[ESJ]}{dt} = k_j[ES][J] - k_{-j}[ESJ]$$

 k_j – константа швидкості перетворення $ES \rightarrow ESJ$, k_{-j} – константа швидкості перетворення $ESJ \rightarrow ES$.

Причому:

$$[E] = [E'] + [ES] + [ESJ]$$

Використавши умову стаціонарності $v_1=0$, $v_2=0$, знаходимо концентрацію фермент-субстратного комплексу при стаціонарному процесі:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M + \frac{[J][S]}{K_j} + [S]}$$

 K_j – константа інгібування, $K_j = \frac{k_{-j}}{k_j}$.

Швидкість ферментативної реакції:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = \frac{v_{\max}[S]}{K_M + \frac{[S]}{K_j}[J] + [S]}$$

Звідси можна одержати вираз для оберненої швидкості. Виявляється, вона і в цьому випадку лінійно залежить від оберненої концентрації субстрату:

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + \frac{[J]}{K_j}}{v_{\max}} + \frac{K_M \left(1 + \frac{[J]}{K_j}\right)}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (6.7)$$

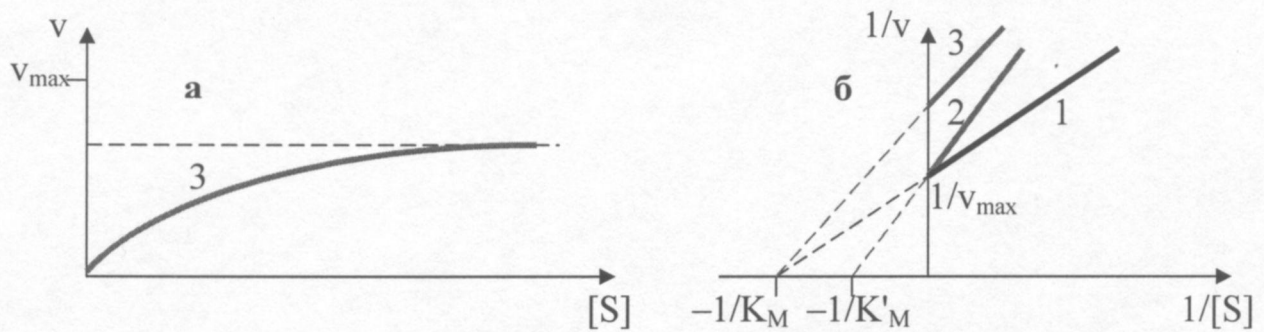


Рис.23. Графічна залежність швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату (а) та графіки Лайнуївера – Берка (б) без інгібітора (1), з конкурентним інгібітором (2) та з неконкурентним інгібітором (3)

Як бачимо з (6.7), неконкурентний інгібітор зменшує максимальну швидкість реакції у $1 + \frac{[J]}{K_j}$ разів, але константа Міхаеліса при цьому залишається незмінною.

ТЕМА 7. БІОФІЗИКА НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

[2], с.221-232, 258-269, [4], с.117-128, [6], т.1, с.161-169

У клітинах є 2 типи нуклеїнових кислот – ДНК і РНК. ДНК міститься в прокаріотичних клітинах, ядрах, мітохондріях, пластидах еукаріотичних клітин, РНК синтезується в ядрах, але її функція здійснюється в цитоплазмі.

В результаті **транскрипції** інформація, записана в ДНК, переписується в РНК і переноситься до рибосом. На них відбувається **трансляція** – синтез білку відповідно інформації, записаній на **матричній РНК** (мРНК). **Транспортна РНК** (тРНК) пізнає вільні амінокислоти і приєднує їх до ростучого на рибосомі поліпептидного ланцюга. Таким чином, РНК – посередник між ДНК і білком.

7.1. РЕНТГЕНОГРАФІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРИ ДНК

При опроміненні рентгенівськими променями кристалів, в тому числі орієнтованих кристалічних ниток ДНК, одержується рентгенограма. З рентгенограми легко одержати період кристалічної ґратки, користуючись умовою Вульфа – Бреґа:

$$2b \cdot \sin \Theta = n\lambda$$

де b – відстань між упорядкованими площинами.

В В-ДНК виявлено т.ч. 2 періоди ґратки: 3,4 нм (крок спіралі) і 0,34 нм (відстань між комплементарними парами). **Комплементарні (уотсон-кріковські) пари:** аденін (А) – тимін (Т) і гуанін (Г) – цитозин (Ц).

Отже, на один крок спіралі приходить 10 комплементарних пар. Сусідні пари повернуті одна відносно одної на кут 36° .

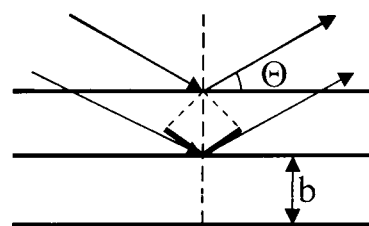


Рис.24. Дифракція рентгенівських променів від кристалічної ґратки

7.2. ПРОСТОРОВА БУДОВА ДНК

Майже всі РНК складаються з одного полінуклеотидного ланцюга довжиною від 80 до 200000 ланок (нуклеотидів).

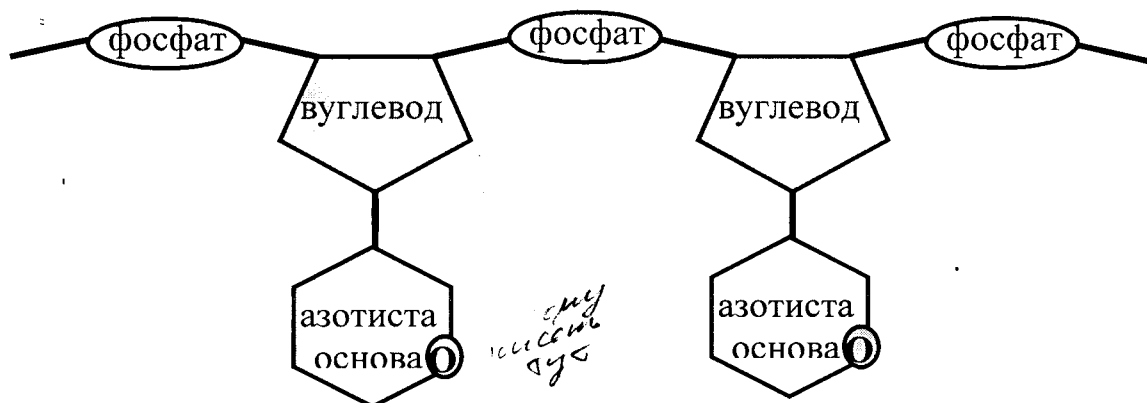


Рис.25. Будова ланцюга нуклеїнових кислот:

Вуглевод – рибоза в РНК або дезоксирибоза в ДНК;

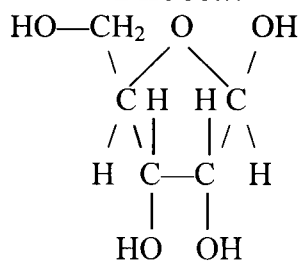
фосфат – залишок фосфорної кислоти;

азотисті основи – пуринова (аденін А або гуанін Г) або піримидинова (цитозин Ц, тимін Т в ДНК або урацил У в РНК).

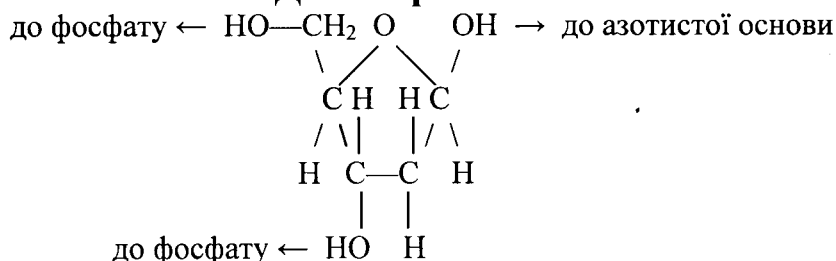
Більшість ДНК складаються з 2-х полінуклеотидних ланцюгів, закручених один відносно другого. Довжина: від 1000 до 10^8 ланок.

В ДНК: А, Г, Ц, Т; в РНК: А, Г, Ц, У.

Рибоза:



Дезоксирибоза:

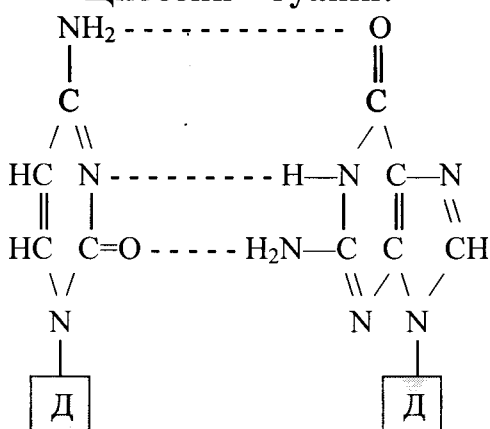


Протилежно напрямлені ланцюги ДНК утворюють праву подвійну спіраль, подібну до гвинтових сходів. Вони з'єднані між собою комплементарними парами. Між нитками подвійної спіралі – спіральні борозенки (виїмки) на поверхні макромолекули.

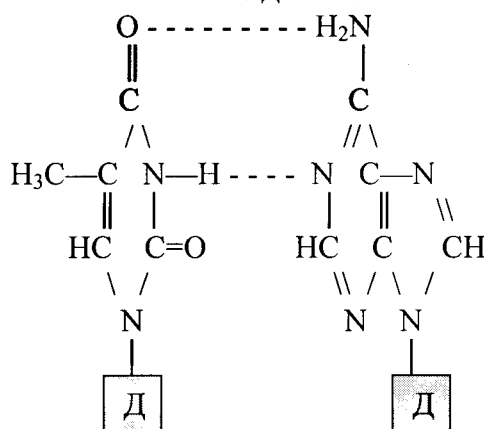
7.3. ХАРАКТЕР СИЛ, ЯКІ СТАБІЛІЗУЮТЬ СТРУКТУРУ ДНК

Азотисті основи в комплементарних парах з'єднуються за допомогою водневих зв'язків (*горизонтальні взаємодії*). Цитозин із гуаніном з'єднуються за допомогою 3-х водневих зв'язків, тимін з аденіном – за допомогою 2-х:

Цитозин – гуанін:



Тимін – аденін:



Д – дезоксирибоза.

Стекінг-взаємодії (stacking) – вертикальні взаємодії сусідніх азотистих основ (тобто тих, які знаходяться на суміжних витках спіралі), напрямлені вздовж осі спіралі. Зумовлені взаємодією між індукованими диполями, утвореними π -електронами основ, а також гідрофобними взаємодіями. Водне середовище завдяки гідрофобним взаємодіям відіграє винятково важливу роль у стабілізації подвійної спіралі ДНК.

7.4. ОПТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ. ГІПЕР-ХРОМНИЙ ЕФЕКТ І КРИВІ ПЛАВЛЕННЯ ДНК

Завдяки азотистим основам нуклеїнові кислоти поглинають УФ, утворюючи суцільну широку смугу поглинання з максимумом при $\lambda_{\text{max}}=260$ нм. Поглинання на цій довжині хвилі пов'язано з $\pi-\pi^*$ -переходами.

При зростанні температури від кімнатної (298 K) до 355 K (82°C) відбувається тепла денатурація ДНК. Денатурація – це перехід спіраль → клубок. При цьому оптична густина збільшується на 30%. Це явище називається **гіперхромним ефектом**. Зменшення поглинання препаратів ДНК називається **гіпохромним ефектом**.

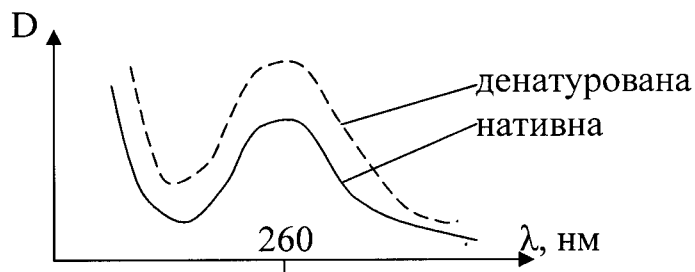


Рис.26. Гіперхромний ефект ДНК

Залежність оптичної густини ДНК при $\lambda_{\max}=260$ нм від температури називається кривою плавлення ДНК. Теплова денатурація ДНК відбувається у вузькому температурному інтервалі і супроводжується гіперхромним ефектом. По кривій плавлення ДНК можна визначити її **температуру плавлення**. Це – температура, при якій гіперхромний ефект досягає половини своєї величини.

Температура плавлення є важливим показником упорядкованості і температурної стійкості ДНК. Експериментально встановлено, що температура плавлення T_p лінійно залежить від молярної частки X ГЦ-пар в ДНК:

$$T_p = T_{AT} + (T_{GC} - T_{AT})X$$

T_{AT} – температура плавлення АТ-пар,

T_{GC} – температура плавлення ГЦ-пар.

Екстраполяція до $X=0$ дає $T_{AT}=342$ K (69°C). Екстраполяція до $X=1$ дає $T_{GC}=383$ K (110°C). Чим більша частка ГЦ-пар, тим стійкіша ДНК до денатурації.

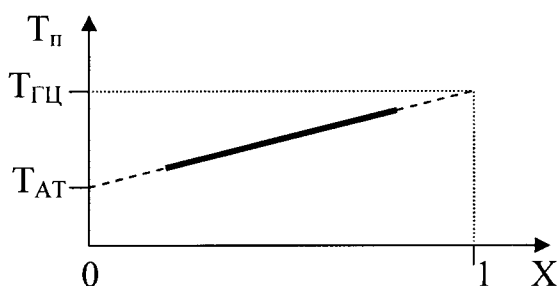


Рис.27. Залежність температури плавлення ДНК від молярної частки ГЦ-пар

7.5. КРУГОВИЙ ДИХРОЇЗМ ДНК

Рентгеноструктурний аналіз дозволяє визначати просторову структуру спіралі ДНК у кристалічному стані, але не дає можливості вивчати її структуру в розчині. Найбільш придатний для цього метод – метод КД.

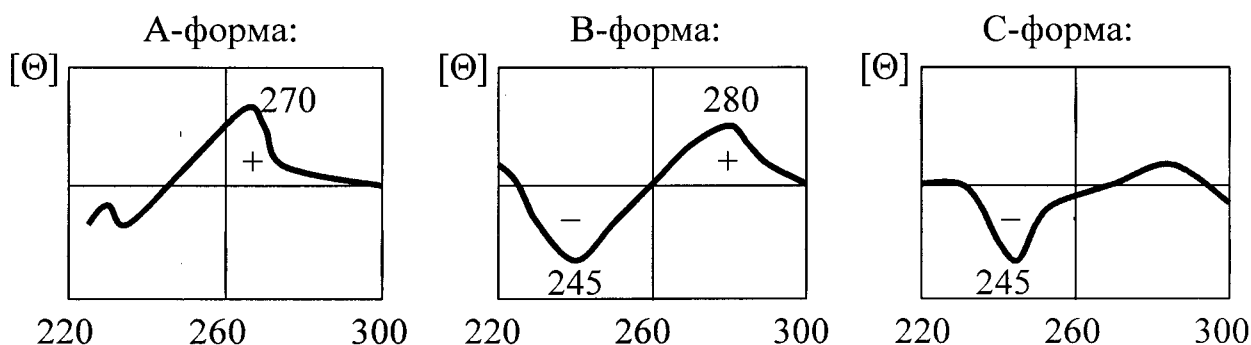


Рис 28. Спектри КД різних форм ДНК

КД плівок ДНК змінюється при зміні вологості та іонної сили. За спектром КД невідомої ДНК, користуючись формулою (4.1), можна визначити частку кожної з форм ДНК, які входять у макромолекулу.

7.6. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОКАЗИ РІЗНИХ КОНФОРМАЦІЙ ДНК

Конформації ДНК можливі за рахунок невеликих змін у фуранозному кільці дезоксирибози. За допомогою рентгеноструктурного аналізу встановлено, що кільце не є абсолютно плоским. Атоми C_2 і C_3 можуть відхилятися від площини кільця на 0,03-0,06 нм.

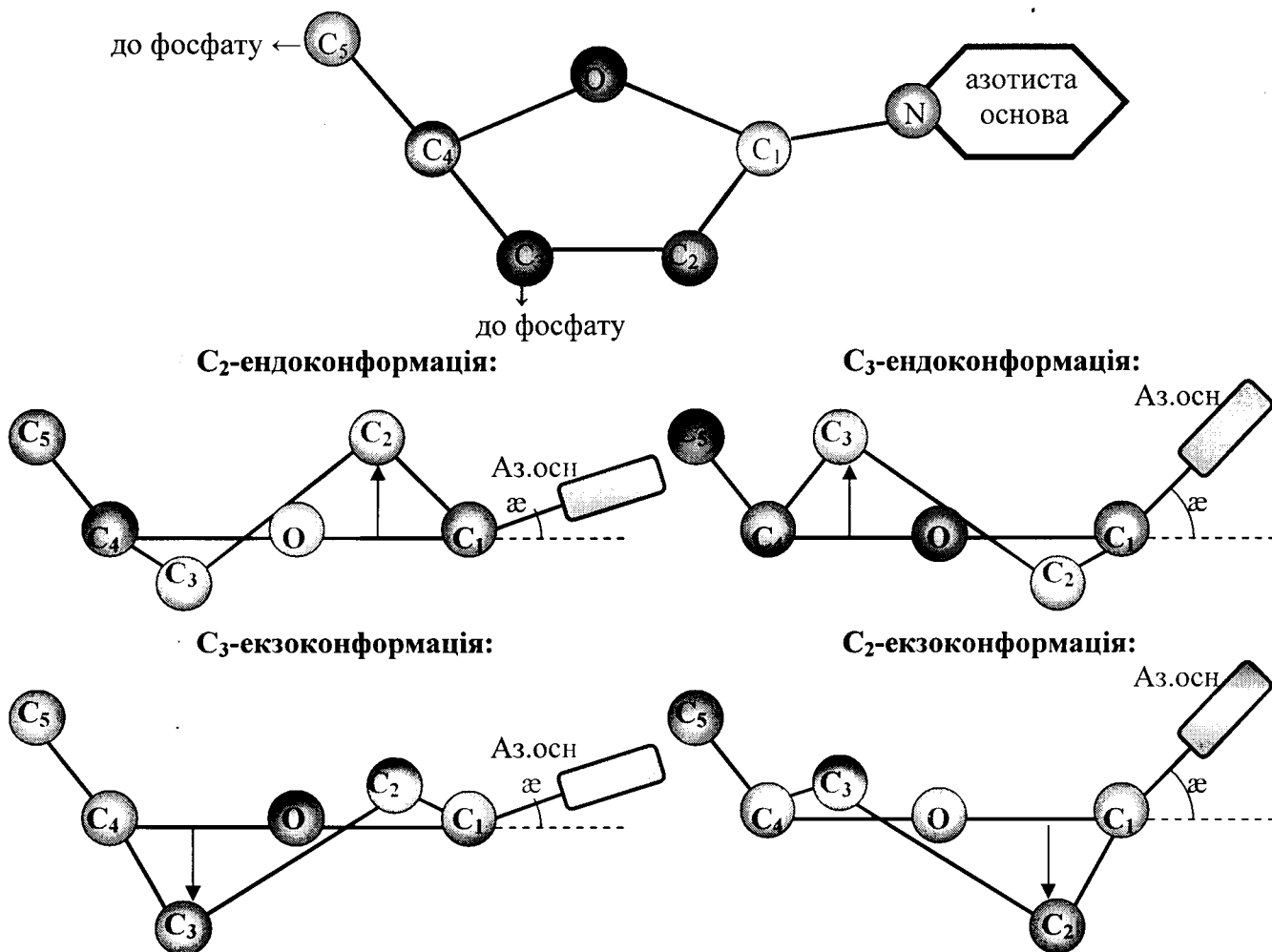


Рис.29. Конформації ДНК за рахунок змін у фуранозному кільці дезоксирибози

Якщо C_2 відхиляється в бік C_5 , і лінія, яка сполучає C_2 і C_3 , проходить між C_5 і O , то утворюється так звана **C_2 -ендоконформація**. Якщо ж C_3 відхиляється в бік C_5 , то утворюється **C_3 -ендоконформація**. Якщо ж C_2 відхиляється в бік протилежний до атома C_5 , то утворюється **C_2 -екзоконформація**. Якщо ж C_3 відхиляється в бік протилежний до атома C_5 , то утворюється **C_3 -екзоконформація**. Це призводить до зміни кута α між площинами кільця і азотистої основи.

Якщо C_2 -ендоконформація або C_3 -екзоконформація, то одержується В-сімейство ДНК (В-, С-, Т-форми ДНК), $\alpha=2-6^\circ$, комплементарні пари майже перпендикулярні до осі спіралі. Якщо C_3 -ендоконформація, то одержується А-сімейство ДНК (А-форма ДНК, А-форма РНК), α збільшується, комплементарні пари розташовуються під кутом 20° до осі спіралі.

Конформаційні переходи можуть бути викликані зміною вологості кристалічних препаратів ДНК, концентрації солі в буфері, додаванні у водяний розчин етанолу.

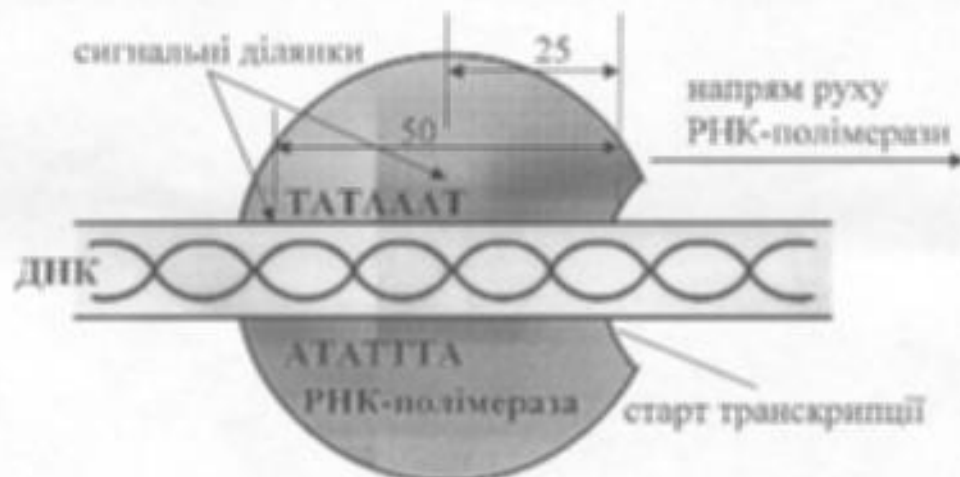
Різні форми ДНК мають різні кроки спіралі (В – 3,36 нм, С – 3,1 нм, Т – 2,72 нм, А – 2,81 нм) і різні відстані між комплементарними парами (В – 0,336 нм, С – 0,332 нм, Т – 0,34 нм, А – 0,255 нм), і це виявляється рентгеноструктурним аналізом. Про конформаційні зміни свідчать також вимірювання КД.

7.7. БІЛКОВО-НУКЛЕЙНОВЕ ПІЗНАВАННЯ

Білки і нуклеїнові кислоти утворюють різноманітні **нуклеопротеїдні комплекси**. Нуклеосома хроматину ($M=240\,000$) містить 45% білку, в ній одна молекула ДНК взаємодіє з 9 білками 5-ти типів; вірус трютонової мозаїки ($M=40\,000\,000$) містить 95% білку, в ньому одна молекула РНК взаємодіє з 2130 білками одного типу. Білки, які входять у комплекс, зв'язуються з певними ділянками нуклеїнової кислоти.

У ядрі відбувається синтез мРНК за допомогою ферменту РНК-полімерази-ІІ (**транскрипція** тексту ДНК у текст РНК). При цьому РНК-полімераза унаслідок послідовності нуклеотидів ДНК сигнальні ділянки, які передують початку транскрипції, тобто початку гена: дві короткі послідовності, одна починається за 50 нуклеотидів

до точки транскрипції, друга – за 25. Подвійна спіраль ДНК у цьому місці розплітається і до звільненого нуклеотиду підходить комплементарний.



При цьому **Рис.30. Синтез мРНК за допомогою ферменту РНК-полімерази** ДНК конформують з В-форми в А-форму. Потім звільняється наступний – і до нього підходить комплементарний і т.д.

По закінченні транскрипції гена синтезована мРНК прямує з ядра до рибосом, де відбувається синтез відповідного білка (**трансляція**). Рибосома приєднується до кінця мРНК і рухається вздовж поліпептидного ланцюга, читаючи текст кодон за кодоном. Трансляція починається з **ініціації** – синтезу першого пептидного зв'язку. Першою до мРНК приєднується N-формілметіоніл-тРНК – до кодона АУГ (аденін-урацил-гуанін) мРНК. До наступного кодона приєднується наступна тРНК. Амінокислотні залишки з'єднуються – і перша тРНК виходить за межі рибосоми по наступний залишок. Процесом керує рибосомна РНК (рРНК).

Пізнавання білком потрібних послідовностей у нуклеїнових кислотах здійснюється завдяки утворенню максимальної кількості водневих зв'язків між боковими групами амінокислотних залишків і розташованими в певній послідовності азотистими основами. Для пізнавання потрібна стерична відповідність певних структурних ділянок білку і нуклеїнової кислоти. Відповідні ділянки ферменту розміщуються у відповідному жолобку ДНК.

БІОФІЗИКА КЛІТИННИХ ПРОЦЕСІВ

Тема 8. СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ОРГАНІЗАЦІЯ БІО-МЕМБРАН

[1], с.96-108, [2], с.322-327, [4], с.146-162, [6], т.2, с.6-16, 30-32, 37-42, [7], с.165-167, [8], с.139-140

Мембрани – високоорганізовані структури клітини. Відділяють клітину від навколишнього середовища. Здійснюють обмін інформацією між ними (внаслідок дії хімічних речовин на мембрану відбувається рух бактерії до їжі). Мембрана – бар'єр із високоселективною проникністю. У мембранах містяться молекулярні транспортні системи. У внутрішніх мембранах хлоропластів відбувається фотосинтез, у внутрішніх мембранах мітохондрій – окислювальне фосфорилування (синтез АТФ). В мембранах відбувається генерація біопотенціалів. Отже, біофізика клітини – це перш за все фізика мембран.

8.1. ВИВЧЕННЯ СТРУКТУРНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ МЕМБРАН

Товщина мембран – біля 10 нм, але внаслідок щільної упаковки молекул і великої площі вони складають більше половини сухої маси клітини.

Склад мембран: білки, ліпіди, вуглеводи (10-15%).

Будова молекул мембранних ліпідів: невелика полярна гідрофільна головка і довгі незаряджені гідрофобні вуглеводні ланцюги.

Більшість мембраноутворюючих ліпідів практично не розчиняються у воді, а розтікаються по її поверхні, утворюючи мономолекулярний шар у вигляді плівки. При малій щільності молекули ліпідів розташовуються на поверхні води лежачи, причому вуглеводні ланцюги схильні до взаємопроникнення (стан двохвимірному газу, розтягнута рідка плівка), при більшій – розташовуються вертикально, головками вниз (конденсована рідка плівка, твердоконденсований стан), при ще більшій – стан колапсу.

Гортер і Грендель екстрагували з еритроцитів ліпіди ацетоном, виміряли мінімальну площу моношару, сформованого ліпідами, і порівняли її з площею поверхні клітини. Висновок: ліпіди у клітинній мембрані утворюють бімолекулярний шар. Строге доведення цього зроблено завдяки дифракції X-ray.

Поверхневий натяг клітини вимірювали методом розплющування під дією власної ваги й методом зовнішнього тиску. Виявлено, що поверхневий натяг клітини на кілька порядків менший, ніж у масла. За допомогою методу мікроскопічного центрифугування обчислено коефіцієнти поверхневого натягу (для яєць морського їжака $\sigma=0,0002$ Н/м). Малий коефіцієнт поверхневого натягу клітини означає наявність у її поверхні білків (для води $\sigma=0,07$ Н/м).

За допомогою методів поляризаційно-оптичного й рентгеноструктурного аналізу виявлено, що ліпіди в мембрані розташовані радіально, хвостами досередини, а білки – тангенціально до поверхні клітини.

Вимірявши ємнісну складову сумарного опору еритроцитів, обчислили товщину бімолекулярного шару ліпідів за формулою:

$$C = \frac{\epsilon \epsilon_0 S}{d}$$

Даний метод дає занижений результат: $d=32 \text{ \AA}$.

За даними інших методів: $d=100 \text{ \AA}$ (поляризаційно-оптичний аналіз), $d=400 \text{ \AA}$ (по запізненні поляризованого променя).

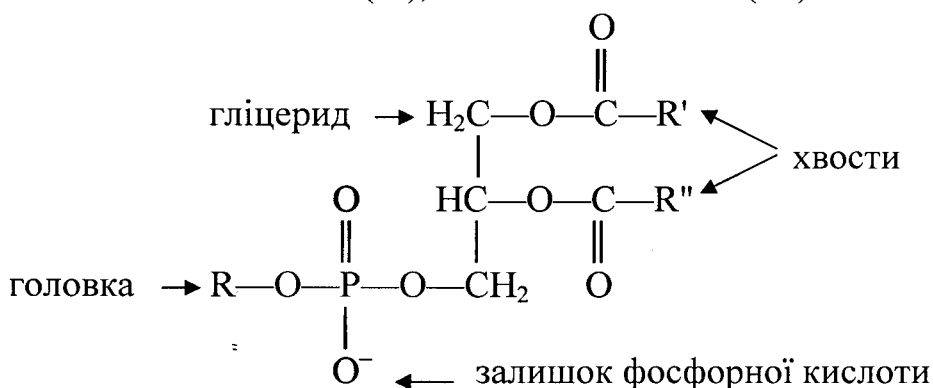
8.2. ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ МЕМБРАН

Електронна мікроскопія – основне джерело інформації про будову клітин і мембран. Для одержання знімків препарати відтінюються OsO_4 , KMnO_4 тощо. При цьому, правда, не виключені артефакти.

Важливі результати одержано методом сколювання в замороженому стані. Мембрани швидко заморожують при азотній температурі і розколюють ножом мікротома у вакуумі. Лід сублімує. Злом відбувається вздовж внутрішньої гідрофобної області мембрани (посередині бішару). На зразок наплюють шар вугілля або платини і досліджують під електронним мікроскопом. При цьому в мембрані еритроцита виявлено глобулярні частинки діаметром до $7,5 \text{ нм}$ – білки. Поверхні сколу мієлінової мембрани в основному гладкі.

8.3. ХАРАКТЕРИСТИКА МЕМБРАННИХ ЛІПІДІВ

Фосфоліпіди: головка – фосфогліцерид, складається із залишку спирту (R), фосфорної кислоти й гліцериду, два хвости з довголанцюгових жирних кислот, одна з яких насичена (R'), інша – ненасичена (R''):



В залежності від спирту розрізняють кілька класів фосфогліцеридів.

Кардіоліпін міститься у внутрішній мембрані мітохондрій, є подвійним фосфогліцеридом.

При $pH=7$ залишок фосфорної кислоти заряджений негативно. Спиртові групи головок можуть нести кілька електричних зарядів.

Фосфоліпіди виконують важливі фізіологічні й біохімічні **функції** такі як:

- арахідонова кислота, яка входить у їх склад, є попередником фізіологічних посередників – простагландинів, тромбоксанів, лейкотрієнів;
- фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат відіграє важливу роль у передачі сигналів, від рецепторів мембрани всередину клітини;
- у суміші з білками кальцієвого насоса фосфоліпіди можуть утворювати пухирці, здатні накопичувати кальцій у присутності АТФ;

- створюють негативний поверхневий заряд мембрани, що запобігає злипанню мембран і сприяє зв'язуванню органічних і неорганічних іонів.

Сфінголіпіди не містять гліцеролу. Складаються із залишку довголанцюгової жирної кислоти, залишку довголанцюгового аміноспирту сфінгозину або його похідного і залишку спирту полярної головки. Полярна головка приєднана до гідроксильної групи сфінгозину, а жирна кислота утворює амідний зв'язок з аміногрупою.

Три класи сфінголіпідів: сфінгомієліни, цереброзиди, гангліозиди.

Сфінгомієліни – найпростіші й найпоширеніші сфінголіпіди. Наявність фосфохоліну або фосфоетаноламіну в головці, тому їх можна віднести до фосфоліпідів. За своїми основними властивостями вони близькі між собою, мають однаковий електричний заряд. Присутні у більшості мембран тваринних клітин, особливо в мієлінових оболонках нервових волокон.

Цереброзиди мають один або кілька залишків цукру в полярній головці. **Галактоцереброзиди** містяться головним чином у мембранах клітин мозку, **глюкоцереброзиди** – в мембранах інших клітин.

Гангліозиди – найскладніші сфінголіпіди. Дуже великі полярні головки утворені кількома залишками цукрів. Містяться у сірій речовині мозку. Гангліозиди – важливі компоненти специфічних рецепторних ділянок, розміщених на поверхні клітинних мембран, де відбувається зв'язування нейромедіатора у процесі хімічної передачі імпульсу від однієї клітини до іншої.

8.4. БІЛКИ МЕМБРАН

Мембранні білки здійснюють транспорт, передачу інформації, перетворення енергії. Поділяються на ферментативні, транспортні, регуляторні, опорно-будівельні. В залежності від ступеня гідрофобності білки частково або повністю занурені в ліпідний шар мембран. **Периферійні** білки утримуються в мембрані за рахунок слабких взаємодій, **інтегральні** – сильно зв'язані. Периферійні білки мембран часто приєднуються до поверхні інтегральних білків.

Мієлін (ізолююча оболонка нервових волокон) в основному складається з ліпідів із хорошими ізоляційними властивостями, білку містять 18%. У внутрішніх мембранах мітохондрій і хлоропластів, які більш активні і містять насоси, канали, рецептори, міститься до 75% білку.

Периферійні білки можна виділити методами м'якої обробки (екстрагування розчином NaCl), інтегральні – тільки за допомогою детергенту (додецилсульфат натрію тощо) або органічного розчинника.

На поверхні інтегральних білків знаходяться гідрофобні групи амінокислотних залишків. На поверхні периферійних білків – гідрофільні групи, за допомогою яких вони притягаються до поверхні мембрани.

Деякі білки одержано у чистому вигляді і зберігають свою активність у розчині з детергентом (фоторецепторний білок родопсин із мембрани сітківки).

8.5. МІЖМОЛЕКУЛЯРНІ ВЗАЄМОДІЇ У МЕМБРАНАХ

Ліпід-ліпідні взаємодії виникають у мембранних системах внаслідок неоднорідності ліпідного складу. Розглянемо систему з двох компонент А і В.

Якщо енергії взаємодії між однаковими ліпідами та між різними – однакові, то в системі компоненти будуть розподілені рівномірно, в іншому випадку ліпіди будуть розділятися у групи і таким чином зростатиме впорядкованість системи. Оскільки основний вклад в енергію взаємодії ліпідів зумовлений взаємодією вуглеводних ланцюгів, то ефект розділення ліпідів буде найбільший, якщо різні компоненти сильно відрізняються довжиною вуглеводних ланцюгів. Також погано змішуються насичені ліпіди з ненасиченими. У цих випадках спостерігаються два фазові переходи при різних температурах. Між фазовими переходами в системі знаходиться розчин кристалічних доменів одного сорту в рідкокристалічній матриці іншого сорту. В гомогенному розподілі відбувається тільки один фазовий перехід.

Ліпід-білкові взаємодії зумовлені міжмолекулярними електростатичними силами і водневими зв'язками. Проявляються при утворенні всередині мембрани специфічного ліпідного оточення навколо білкових молекул. Такі ліпіди називаються зв'язані або анулярні. Активність ферментів залежить від того, які ліпіди входять у їх оточення. Наприклад, функціональна активність родопсину залежить від довжини вуглеводних ланцюгів ліпідів; взаємодія аденілатциклази (у мембрані печінки) із певними ліпідами мембран необхідна для прояву активності каталітичного центру й утворення активного гормон-рецепторного комплексу.

Білок-білкові взаємодії проявляються у виді оборотної внутрімембранної агрегації мембранних білків, яка супроводжується зміною функціональної й ферментативної активності системи. Так у мембранах еритроцитів білки агрегують при $pH < 5.5$. Цикли агрегації – дезагрегації відбуваються на деяких стадіях кліткового циклу, при взаємодії й злитті мембран тощо. В основі агрегаційних взаємодій – електростатичні сили.

8.6. МОДЕЛЬНІ МЕМБРАННІ СИСТЕМИ

Плоскі бішарові мембрани (унітарні) складаються з двох суцільних ліпідних шарів із гідрофобними хвостами, повернутими досередини, і полярними головками, повернутими назовні. По обидва боки ліпідного бішару – мономолекулярні шари білків. Таку будову мають мембрани еритроцитів, деяких бактерій, плазматичні мембрани нервових закінчень щурів. У дійсності на поверхні мембрани знаходяться тільки гідрофільні білки, а гідрофобні проникають у мембрану, взаємодіючи з хвостами ліпідів.

Мюллер одержав плоскі бішарові мембрани товщиною 5-7 нм і діаметром 1 мм штучно. Він помістив краплину розчину фосfolіпідів мозку у гептані в отвір у тефлоновій перегородці, який знаходився у воді. Після того як розчинник покинув внутрішню частину краплини, залишився бішар. Процес тоншення плівки можна спостерігати у відбитому світлі. Коли товщина плівки стає співрозмірною з довжиною хвилі падаючого світла, на поверхні мембрани виникають кільця Ньютонів – кольорові плівки. Бішарові структури ж виглядають

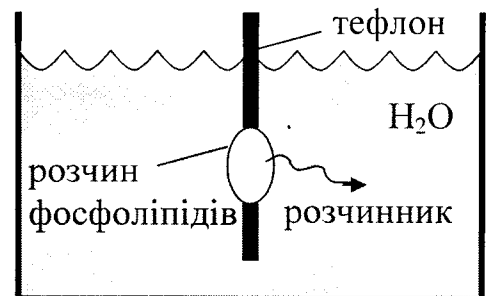


Рис.31. Метод Мюллера одержання плоских бішарових мембран

чорними внаслідок того, що вони дуже тонкі і різниця фаз між хвилями, відбитими від передньої й задньої поверхонь, рівна $\pi/2$. Тому їх називають "чорними".

Штучні бішарові ліпідні мембрани за електричними характеристиками та іншими фізико-хімічними властивостями близькі до природних. Мають нижчу провідність, позбавлені метаболічної активності та селективності, але шляхом введення у їх склад різних активних з'єднань можна добитись зростання цих параметрів. На таких мембранах вивчають іонну проникність, електричний опір, генерацію електричного потенціалу, механізм дії переносників іонів.

Шляхом струшування сухих фосфоліпідів у водно-сольовому буфері можна одержати фосфоліпідні бульбашки (*везикули*), тобто замкнуті сферичні частинки, які називаються *ліпосомами*. Це енергетично вигідно, оскільки досягається мінімум площі контакту гідрофобної поверхні з водою. Таким чином одержуються багатошарові (мультиламелярні) ліпосоми. Вони осмотично активні, з їх допомогою можна вимірювати проникність ліпідного шару для тієї чи іншої речовини.

Струшуванням ультразвуком можна одержати моноламелярні ліпосоми діаметром до 100 нм.

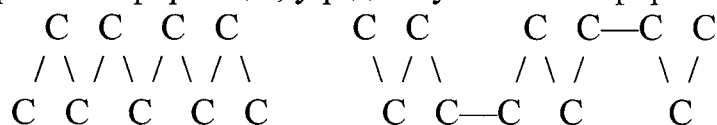
Ліпосоми використовують у біологічних і медико-біологічних дослідженнях. Їхня будова близька до будови мембран мітохондрій, плазматичних мембран різних клітин.

Багато мембранних білків і фрагменти мембран легко можуть бути включені у склад штучних везикул, які називаються *протеоліпосомами*. Ефективність таких включень залежить від ліпідного складу мембран, сольового складу, рН, температури тощо, зростає у присутності детергентів.

Протеоліпосоми надають широкі можливості для дослідження функціонування багатьох важливих компонент мембран. Одержання протеоліпосом – останній етап перед повною реконструкцією функціонуючої мембрани.

8.7. ФАЗОВІ ПЕРЕХОДИ В МЕМБРАНАХ

Природні й штучні мембрани можуть знаходитись у двох станах: твердого двохмірного кристала (*гель*) і рідкої плівки (*рідкокристалічному*). В обох станах – бімолекулярна структура, молекули ліпідів мають щільну гексагональну упаковку, але з різною щільністю. Молекула фосфатидилхоліну у твердому бішарі займає площу 0,46-0,48 нм², у рідкому – 0,6-0,8 нм² в залежності від структури жирних кислот. Товщина бішару у рідкому стані менша. Стани відрізняються в'язкістю, розчинністю різних речовин у ліпідній фазі, формою сигналів ЕПР тощо. Причина відмінностей – різні конформації жирнокислотних ланцюгів. У твердому стані – трансконформація, у рідкому – гошконформація:



Стан залежить від температури, хімічного складу ліпідів, ступеня насиченості жирнокислотних ланцюгів.

Фазовий перехід – кооперативний процес, тобто односортні ліпіди переходять в іншу фазу одночасно. Кількість молекул, які входять у таку ділянку мембрани – **розмір кооперативної одиниці**. Під час фазового переходу різко зростає теплоємність.

При наявності в мембрані різносортих ліпідів відбувається послідовне виморожування більш тугоплавких, в результаті чого утворюються домени в рідкій фазі. Вони мають різний хімічний склад, низькомолекулярні сполуки й білки витісняються в рідку фазу. Температурна залежність теплоємності має кілька різких максимумів. Таке явище розділення фаз при заморожуванні може супроводжуватись незворотними змінами в мембранах і бути причиною зниження життєздатності клітин при консервації методом глибокого заморожування.

Температура фазового переходу (температура плавлення) – при якій половина молекул ліпідів входить у рідку, а половина – у тверду фазу.

Природні ліпіди містять ненасичені ланцюги, тому їхня температура плавлення <0 , у штучних – >0 .

При розчиненні у воді ліпіди утворюють із водою впорядковані фази з періодичною структурою. В залежності від кількості води фази переходять одна в одну – **ліотропний поліморфізм**. Фази ліпідів у воді: ламелярна (рідинна або кристалічна), гексагональна, інвертована гексагональна (вода знаходиться в міцелах). Гексагональну структуру утворюють однохвості ліпіди або двохвості, у яких відбулось окислення одного ланцюжка або його відщеплення під дією ферменту фосфоліпази A_2 , тоді молекула змінює свою форму з циліндричної на конічну. Такі дефектні ліпіди, збираючись разом, здатні формувати пори, що підвищує проникність мембрани для води та іонів. Отже, мембрана втрачає свої бар'єрні властивості. Таке явище характерне для деяких хвороб.

Подібні фазові переходи відбуваються і при зміні температури – **термотропний поліморфізм**.

8.8. ДИНАМІКА ЛІПІДІВ І БІЛКІВ У МЕМБРАНІ

У твердому стані ліпідні молекули майже не переміщуються у площині мембрани. У рідкому стані ліпідні молекули швидко переміщуються у площині мембрани – **латеральна дифузія**. Коефіцієнт латеральної дифузії фосфоліпідів у мембранах везикул при 298 K – $1,8 \cdot 10^{-8}$ см²/с, тобто сусідні молекули міняються місцями 10^7 разів за секунду.

Ліпіди перескакують і між шарами (**флін-флон**), але набагато повільніше.

Деякі білки майже такі ж рухливі, як і ліпіди (родопсин), інші – практично нерухомі (фібрoneктин).

8.9. ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ СПІНОВИХ МІТОК ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ДИНАМІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕМБРАН

Сигнал ЕПР дає тільки неспарений електрон, тому у фосфоліпідний шар вводять **спінові мітки** – нітроксильні радикали. За формою сигналу ЕПР можна точно визначити переміщення ділянки хвоста, до якої прикріплена мітка. У якості зонда використовується стеаринова кислота з нітроксильною групою тощо.

При зростанні температури збільшується рухливість молекул, вони частіше міняють своїх сусідів, в результаті локальне магнітне поле на неспареному електроні усереднюється (електрон не встигає поглинути квант магнітного поля, частота якого сильно відхиляється від резонансної). Тому лінія ЕПР звужується. При зменшенні температури молекули мають різне, але стабільне оточення, і кожна з них поглинає квант магнітного поля власної резонансної частоти. Тому лінія ЕПР уширюється.

За допомогою методу ЕПР визначена швидкість латеральної дифузії фосфоліпідів у мембранах везикул.

8.10. ГІПОТЕЗА КІНКІВ

Розташовані поряд гош-конформації можуть утворювати порожнини – **кінки**, у які попадають різні молекули. Зміна конформації ланцюгів приводить до руху кінків разом із включеннями у площині мембрани або впоперек мембрани.

Таким чином може здійснюватись транспорт речовин крізь мембрану.

При утворенні кінка ефективна довжина ланцюга зменшується на 0,127 нм, частина ланцюга відсувається на 0,15 нм, загальний об'єм молекули ліпиду зростає на 0,025-0,05 нм³.

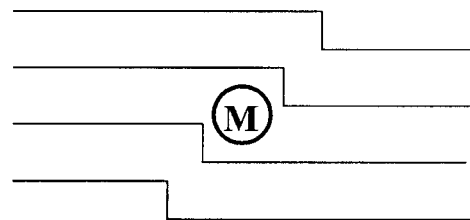
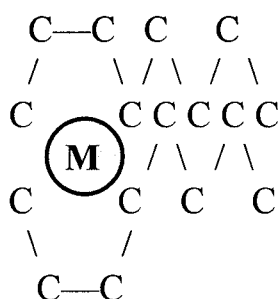


Рис.32. Кінки з молекулами всередині них.

8.11. МОДЕЛІ СТРУКТУРНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ МЕМБРАН

Рідинно-мозаїчна модель: ліпідний бішар (матрикс) знаходиться в рідкому стані, у ньому плавають частково занурені інтегральні білки, а периферійні – по поверхні. На поверхні інтегральних білків – гідрофобні групи амінокислотних залишків. Вуглеводи приєднані до білків і ліпідів, але тільки на зовнішній поверхні мембрани.

Методом електронної мікроскопії одержано знімки мембран у виді тришарових структур товщиною 10 нм. Згідно з цим створено **модель асиметричної тришарової мембрани**: білки розгортаються на поверхні біліпідного шару, а на зовнішній поверхні – ще й молекули глікопротеїнів.

ТЕМА 9. ТРАНСПОРТ РЕЧОВИН ЧЕРЕЗ БІОМЕМБРАНИ

[1], с.22-23, 122-123, [2], с.80, 329-331, [4], с.27-30, 162-169, [6], т.2, с.50-54, [7], с.161-165, 177-185, 277-286, [8], с.101-111, [12], с.211-212

Пасивний транспорт не пов'язаний із затратою клітиною хімічної енергії. Перенос неелектролітів зумовлений градієнтом хімічного потенціалу, перенос іонів – градієнтом електрохімічного потенціалу.

Типи пасивного переносу:

- 1) проста дифузія через ліпідний бішар;
- 2) перенос через пори (канали);
- 3) за допомогою переносників за рахунок дифузії переносника разом із речовиною (рухливий переносник) або естафетної передачі речовини від одного переносника до іншого по тимчасовому ланцюгу впоперек мембрани.

Приклад пасивного транспорту: рух іонів Na^+ і K^+ через цитоплазматичну мембрану нервових волокон при поширенні потенціалу дії.

9.1. ТРАНСПОРТ ВОДИ

Проникність клітин для води дуже велика.

Проникнення води здійснюється:

- 1) Внаслідок **дифузії через пори**, сформовані інтегральними білками мембрани. Швидкість дифузії вимірюється при однакових осмотичних тисках всередині й зовні клітини. Для вимірювання константи проникності використовують важку воду: DHO , D_2O , TNO або H_2O^{18} . Швидкість дифузії пропорційна площі пор.

Коефіцієнт проникності: $P = \frac{\pi r^2 n D}{l}$, де n – кількість каналів на одиницю площі мембрани.

- 2) За рахунок різниці осмотичних тисків – **фільтрація**. Швидкість переносу води вимірюється за приростом ваги або об'єму клітини. Згідно закону Пуазейля:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\pi r^4}{8\eta l} \Delta p$$

константа фільтраційної проникності пропорційна 4-му степеню радіуса пор.

Якщо радіус пор $< 5\text{\AA}$ – дифузія переважає над фільтрацією, якщо радіус пор $> 5\text{\AA}$ – навпаки. Після вприскування жабі пітуїтрину (гормону задньої доли гіпофізу) зростає діаметр пор шкіри, фільтрація зростає сильніше, ніж дифузія, і маса жаби збільшується за рахунок проникнення всередину води – реакція Брюнна.

- 3) У напрямку, протилежному осмотичному градієнтові, за рахунок різниці гідростатичних тисків – **ультрафільтрація**.

Осмотичний тиск крові становить 7,8 атм. Водночас з осмотичним тиском між кров'ю й лімфою існує гідростатичний тиск внаслідок роботи серця. Вони врівноважуються в центральній частині капіляра. В артеріальній ділянці капіляра гідростатичний тиск переважає над осмотичним, тобто переважає ультрафільтрація, і молекули води витісняються назовні; у венозній – навпаки, переважає фільтрація, і капіляр збагачується молекулами води.

Такий стаціонарний стан може порушуватись:

- у гіпертонічному стані підвищується гідростатичний тиск;
- при втратах крові, шоківих станах, опіках, променевій хворобі падає

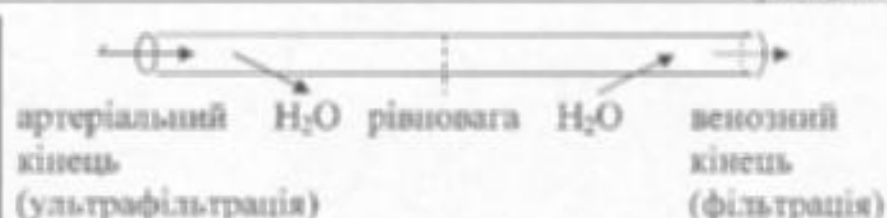


Рис.33. Схематичний показ руху води відносно капіляра

осмотичний тиск крові. Променева хвороба викликає деполімеризацію мукополісахаридів та зростання проникності стінок капілярів, в результаті чого високомолекулярні сполуки проходять із крові у міжклітинний простір.

4) За рахунок електричного градієнта – **електроосмос**.

На межі розділу двох середовищ може відбуватись адсорбція. На межі розділу тверде тіло – рідина можлива молекулярна або іонна адсорбція. Внаслідок дисоціації у воді при кімнатній температурі міститься по 10^{-7} моль іонів H^+ і OH^- на 1 моль розчину. Якщо поверхня адсорбента заряджена, то на ній адсорбуються іони протилежного знаку. Якщо ж ні, то згідно з правилом Кіонна позитивно заряджається та з контактуючих поверхонь, яка має більшу діелектричну проникність. Для води $\epsilon=81$, для більшості твердих речовин $\epsilon \approx 1$, отже при контакті води з твердим тілом вода заряджається позитивно, а тверде тіло – негативно внаслідок адсорбції OH^- . Таким чином на поверхні розділу середовищ виникає подвійний електричний шар.

Явище електроосмосу відкрите Ф.Рейссом в 1808 р. Він перегородив порожню частину U-подібної трубки з водою кварцовим піском і ввів у трубки електроди. При цьому вода внаслідок свого позитивного заряду піднялась у трубці з катодом. Виникла різниця гідростатичних тисків.

Явище електроосмосу має широке практичне застосування у процесах зневоднення пористих матеріалів. У медицині електроосмос використовують для зневоднення перев'язочного матеріалу.

5) Кінки.

9.2. КОНСТАНТА СТАВЕРМАНА

Розглянемо посудину з розчином речовини у воді, розділену посередній мембраною. Нехай концентрації розчиненої речовини в посудинах $n_1^A > n_1^B$, причому, вони

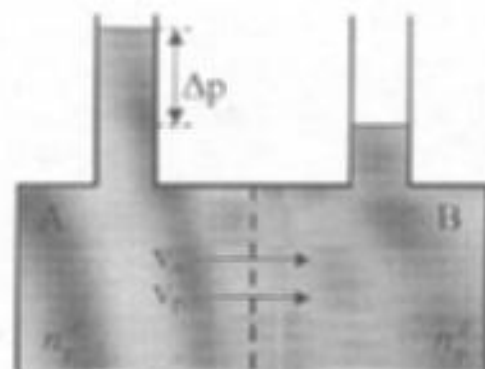


Рис.34. Посудина з розчином, розділена мембраною

мало між собою відрізняються, а рівень розчину в лівій посудині перевищує рівень розчину у правій посудині. Внаслідок цього на речовину і на воду діють сили, зумовлені різницею концентрацій і різницею гідростатичних тисків.

Сила, яка діє на речовину за рахунок різниці концентрацій, віднесена до одиниці площі мембрани, рівна різниці осмотичних тисків у двох посудинах, і напрямлена зліва направо:

$$\frac{F_p}{S} = \Delta\pi$$

Сила, яка діє на воду за рахунок різниці концентрацій, віднесена до одиниці площі мембрани, також рівна різниці осмотичних тисків у двох посудинах, але напрямлена у протилежний бік:

$$\frac{F_b}{S} = -\Delta\pi$$

Сили, які діють на речовину й воду за рахунок різниці гідростатичних тисків, віднесені до одиниці площі мембрани, рівні між собою і співнаправлені:

$$\frac{F}{S} = \Delta p$$

Отже, на речовину діє сумарна сила $\Delta p + \Delta\pi$, яка спричиняє потік речовини через мембрану, причому швидкість v_p потоку залежить від пропускної здатності мембрани для речовини. На воду діє сумарна сила $\Delta p - \Delta\pi$, яка спричиняє потік води через мембрану, причому швидкість v_b потоку залежить від пропускної здатності мембрани для води.

Система посудин володіє вільною енергією, яка поступово перетворюється в роботу при переміщенні речовини та води з однієї посудини в іншу, тобто відбувається її **дисипація**. Дисипативна функція, як відомо з теми 2, дорівнює потужності процесу дисипації енергії:

$$\int T \sigma dx = (\Delta p + \Delta\pi) v_p + (\Delta p - \Delta\pi) v_b$$

Її можна переписати інакше:

$$\int T \sigma dx = \Delta p (v_p + v_b) + \Delta\pi (v_p - v_b) = \sum_k J_k X_k$$

Отже, якщо у якості узагальнених сил вибрати Δp і $\Delta\pi$ (що більш природно), то в якості узагальнених потоків слід вибрати:

$$\begin{cases} J_v = v_p + v_b \\ J_D = v_p - v_b \end{cases} \quad (9.1)$$

J_v – так званий **об'ємний потік**, який виникає внаслідок різниці гідростатичних тисків, тобто повний потік розчину через мембрану,

J_D – так званий **дифузійний потік**, який виникає внаслідок різниці концентрацій, тобто потік речовини відносно води.

Якщо б ці потоки були незалежні, то об'ємний потік був би пропорційним до своєї узагальненої сили, тобто до різниці гідростатичних тисків, а дифузійний потік був би пропорційним до своєї узагальненої сили, тобто до різниці осмотичних тисків. Але потоки J_v і J_D – спряжені, тому кожний з них залежить ще й від іншої узагальненої сили:

$$\begin{cases} J_v = L_{vv} \Delta p + L_{vD} \Delta\pi \\ J_D = L_{Dv} \Delta p + L_{DD} \Delta\pi \end{cases} \quad (9.2)$$

Причому, згідно співвідношенню Онсагера (2.7):

$$L_{vD} = L_{Dv}$$

Розглянемо такі випадки:

1) Нехай гідростатичні тиски однакові по обидва боки мембрани: $\Delta p = 0$. Тоді:

$$\begin{cases} J_v = L_{vD} \Delta \pi \\ J_D = L_{DD} \Delta \pi \end{cases}$$

Отже, різниця осмотичних тисків викликає не тільки дифузійний потік (потік речовини відносно води), але й додатковий об'ємний потік, який називають **осмотичним потоком**. L_{vD} – **коефіцієнт осмотичного потоку**, а L_{DD} має зміст швидкості потоку речовини відносно води при різниці осмотичних тисків $\Delta p = 1$ Па.

- 2) Нехай концентрація речовини однакова по обидва боки мембрани: $\Delta n_p = 0$. Тоді $\Delta \pi = 0$ і:

$$\begin{cases} J_v = L_{vv} \Delta p \\ J_D = L_{Dv} \Delta p \end{cases} \quad (9.3)$$

Отже, різниця тисків викликає не тільки об'ємний, але й дифузійний потік, який приводить до перерозподілу речовини (**ультрафільтрація**). L_{vv} – **коефіцієнт фільтрації** (приріст швидкості розчину на одиницю різниці гідростатичних тисків), L_{Dv} – **коефіцієнт ультрафільтрації** (приріст швидкості потоку речовини відносно води на одиницю різниці гідростатичних тисків).

Константою Ставермана називається відношення коефіцієнта осмотичного потоку або коефіцієнта ультрафільтрації до коефіцієнта фільтрації, взяте з протилежним знаком:

$$\sigma = -\frac{L_{vD}}{L_{vv}} = -\frac{L_{Dv}}{L_{vv}}$$

Розглянемо детальніше випадок 2:

- 2.1) Якщо мембрана однаково проникна для речовини і для води, то у випадку $\Delta n_p = 0$ маємо:

$$v_p = v_B$$

При цьому весь об'єм розчину проходить крізь мембрану без зміни концентрації:

$$\begin{aligned} J_D &= L_{Dv} \Delta p = 0 \\ L_{Dv} &= 0 \end{aligned}$$

Дифузійний потік $J_D = 0$ – це означає, що переміщення потоку речовини відносно води не відбувається. Константа Ставермана у цьому випадку $\sigma = 0$.

- 2.2) Якщо мембрана абсолютно непроникна для речовини (ідеальна напівпроникна мембрана), то при будь-яких Δp і Δn_p маємо:

$$\begin{aligned} v_p &= 0 \\ J_v &= v_B \\ J_D &= -v_B \end{aligned}$$

Як бачимо, об'ємний потік зумовлений виключно потоком води, а дифузійний – потоком нерухомої речовини відносно рухомого потоку води.

З (9.2) маємо:

$$J_v + J_D = (L_{vv} + L_{Dv}) \Delta p + (L_{vD} + L_{DD}) \Delta \pi = 0 \quad (9.4)$$

Оскільки за умовою Δp і $\Delta \pi$ – будь-які, то рівність (9.4) виконується при умові:

$$L_{Dv} = -L_{vv}$$

Звідси:

$$\alpha = -\frac{L_{DV}}{L_{VV}} = 1$$

Легко бачити, що у цьому випадку $L_{VD} = -L_{DD}$ і $\Delta\pi = -\Delta p$, тобто осмотичний тиск за величиною рівний гідростатичному і діє в протилежний бік (вони компенсують один одного).

2.3) Якщо проникність мембрани для води краща, ніж для речовини; то у випадку $\Delta\pi_p = 0$ маємо:

$$v_p < v_B$$

З (9.1) і (9.3) одержимо:

$$L_{VV} = \frac{v_p + v_B}{\Delta p}$$

$$L_{DV} = \frac{v_p - v_B}{\Delta p} < 0$$

Отже:

$$\alpha = \frac{v_B - v_p}{v_B + v_p}$$

причому:

$$0 < \alpha < 1$$

Отже, константа Ставермана – це коефіцієнт відбивання речовини мембраною по відношенню до відбивання води. Константа Ставермана є мірою селективності мембрани. Для мембрани, яка ідеально пропускає воду:

$$0 \leq \alpha \leq 1$$

Коефіцієнт відбивання мочовини на мембрані еритроцитів людини $\alpha = 0,62$, етиленгліколю – 0,63, ацетаміду на мембрані клітин шкіри жаби – 0,89, тіомочовини – 0,98.

2.4) Якщо мембрана абсолютно непроникна для води, то при будь-яких Δp і $\Delta\pi_p$ маємо:

$$v_B = 0$$

$$J_V = v_p$$

$$J_D = v_p$$

Як бачимо, об'ємний потік зумовлений виключно потоком речовини, а дифузійний – тим самим потоком рухомої речовини відносно нерухомої води.

З (9.2) маємо:

$$J_V - J_D = (L_{VV} - L_{DV})\Delta p + (L_{VD} - L_{DD})\Delta\pi = 0 \quad (9.5)$$

Оскільки за умовою Δp і $\Delta\pi$ – будь-які, то рівність (9.5) виконується при умові:

$$L_{DV} = L_{VV}$$

Звідси:

$$\alpha = -\frac{L_{DV}}{L_{VV}} = -1$$

2.5) Якщо проникність мембрани для води гірша, ніж для речовини, то у випадку $\Delta\pi_p = 0$ маємо:

$$v_p > v_B$$

З (9.1) і (9.3) одержимо:

$$L_{VV} = \frac{v_p + v_B}{\Delta p}$$

$$L_{DV} = \frac{v_p - v_B}{\Delta p} > 0$$

Отже:

$$\alpha = \frac{v_p - v_B}{v_B + v_p}$$

причому:

$$-1 < \alpha < 0$$

Цей випадок реалізується при від'ємному аномальному осмосі.

9.3. РІВНЯННЯ ТЕОРЕЛЛА. РІВНЯННЯ ФІКА

Рівняння Теорелла:

Потік речовини = Рухливість \times Концентрація \times Повна рушійна	(9.6)
--	-------

У випадку простої дифузії повна рушійна сила – градієнт хімічного потенціалу $\frac{d\mu}{dx}$. Тоді рівняння Теорелла запишеться так:

$$J = -Un \frac{d\mu}{dx}$$

$$J - \text{потік, } [J] = \frac{\text{моль}}{\text{м}^2 \cdot \text{с}},$$

$$U - \text{рухливість, } [U] = \frac{\text{м}^2 \cdot \text{моль}}{\text{Дж} \cdot \text{с}},$$

$$n - \text{молярна концентрація речовини, } [n] = \frac{\text{моль}}{\text{м}^3},$$

знак "-" – тому що потік напрямлений протилежно до градієнту хімічного потенціалу.

Продиференціювавши вираз (1.11) для хімічного потенціалу, маємо:

$$d\mu = RT \frac{dn}{n}$$

З врахуванням цього вираз для потоку у випадку простої дифузії запишеться:

$$J = -UnRT \frac{dn}{dx} \frac{1}{n} = -URT \frac{dn}{dx}$$

$$URT = D - \text{коефіцієнт дифузії, } [D] = \text{м}^2/\text{с}.$$

Таким чином одержуємо рівняння Фіка:

$J = -D \frac{dn}{dx}$

9.4. КОЕФІЦІЄНТ ПРОНИКНОСТІ БІОМЕМБРАН

При стаціонарному транспорті речовини через мембрану градієнт концентрації всередині мембрани вважається постійним. Тоді:

$$J = -D \frac{\Delta n_m}{h}$$

Δn_m – різниця концентрацій речовини на границях мембрани,
 h – товщина мембрани.

Концентрації речовини на границях мембрани відрізняються від концентрацій у розчині. Тому

$\Delta n_m < \Delta n$. Величина $\beta = \frac{\Delta n_m}{\Delta n} < 1$ на-

зивається **коефіцієнтом розподілу речовини між розчином і мембраною**.

Вираз для потоку можна записати через коефіцієнт розподілу:

$$J = -D\beta \frac{\Delta n}{h} = -P\Delta n$$

де $P = \frac{D\beta}{h}$ – **коефіцієнт проникності мембрани**, $[P] = \text{м/с}$.

Отже, проникність мембрани визначається не тільки коефіцієнтом дифузії через мембрану, але й розподілом речовини у прилягаючих до мембрани шарах. Шари біля поверхонь мембрани створюють додатковий бар'єр для проникнення речовини.

Коефіцієнт проникності мембрани можна обчислити, знаючи густину потоку J і різницю концентрацій Δn .

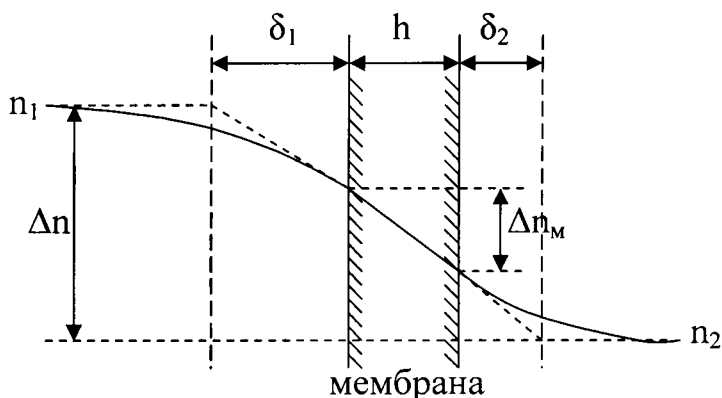


Рис. 35. Профіль зміни концентрації речовини біля поверхні мембрани;
 δ_1, δ_2 – ефективна товщина підшарів.

9.5. ТРАНСПОРТ НЕЕЛЕКТРОЛІТІВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНИ

Основні шляхи проникнення молекул у клітину:

- 1) через заповнені водою пори проникають розчинні у воді молекули, іони;
- 2) шляхом розчинення у ліпідному бішарі і дифузії проникають нерозчинні у воді органічні молекули.

Для дифузії розчинних у воді молекул, радіус яких не перевищує радіуса гексоз, є **рівняння Товєрта**:

$$D\sqrt{M} = \text{const}$$

З нього бачимо, що коефіцієнт дифузії зростає, а отже, молекули легше дифундують крізь мембрану, із зменшенням їх молекулярної маси.

Для проникнення органічних молекул крізь ліпідний шар є **правила Овертона – Джекобса**:

- 1) електрично симетричні (неполярні) радикали полегшують проникнення молекул (метилові, етилові, фенілові групи);

2) електрично несиметричні (полярні) радикали ($-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$) утруднюють проникнення молекул.

Рівняння Товерта справедливе для проникнення більшості органічних молекул крізь ліпідний шар. З рівняння Товерта можна одержати:

$$\lg(D\sqrt{M}) = \text{const}$$

$$\lg\left(\frac{Ph}{\beta}\sqrt{M}\right) = \text{const}$$

$$\lg(P\sqrt{M}) = \lg \beta + \text{const}$$

Більшість речовин задовольняють останнє рівняння і на залежності $\lg(P\sqrt{M})$ від $\lg(\beta)$ лягають біля прямої (етанол, пропіленгліколь, мочовина, гліцерин тощо). Як виняток, деякі неелектроліти знаходяться набагато вище цієї прямої (вода, метанол, формамід). Причина в тому, що малі молекули можуть проникати крізь мембрану не тільки шляхом дифузії, але й через пори, які пронизують мембрану.

9.6. ПОЛЕГШЕНА ДИФУЗИЯ

Незаряджені молекули можуть транспортуватись через мембрану також за допомогою різного транспорту. Якщо для цього не потрібна затрата енергії, то – **полегшена дифузія**. Транспорт здійснюється протеїнами мембрани. Вони здатні впізнавати певні речовини і транспортувати їх через мембрану.

Риси пасивного транспорту:

- 1) Висока стереоспецифічність (через біомембрани проникають тільки певні ізомери, наприклад: D-ізомери цукрів і L-ізомери амінокислот);
- 2) Явище насичення (із зростанням концентрації транспортованої речовини швидкість транспорту зростає тільки до деякої граничної величини);
- 3) Чутливість до низьких концентрацій інгібіторів, взаємодіючих із переносниками.

Інгібітори транспортних систем мають структурну подібність до транспортованих молекул. Флоридзин конкурентно інгібує транспорт глюкози, не проникаючи через мембрану, D-галактоза конкурентно інгібує транспорт D-глюкози, проникаючи через мембрану.

Деякі переносники мають два центри зв'язування. Тоді транспорт однієї речовини залежить від присутності іншої (сумісний перенос деяких амінокислот і Na^+ в еритроцитах та епітеліальних клітинах кишечника).

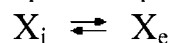
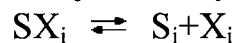
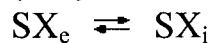
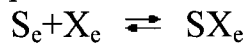
Рушійна сила транспорту за участю переносника – градієнт хімічного або електрохімічного потенціалу. Градієнт може підтримуватись довгий час за рахунок споживання або утворення проникаючих молекул.

Тема 10. ІОННА ПРОНИКНІСТЬ БІОМЕМБРАН

[1], с.128-129, [4], с.168-174, 193-199, [6], т.2, с.58-68, 88-95

10.1. МЕХАНІЗМ ПАСИВНОГО ТРАНСПОРТУ ІОНІВ ЧЕРЕЗ БІОМЕМБРАНИ

Механізм полегшеної дифузії (пасивного транспорту): субстрат S утворює на зовнішньому боці мембрани комплекс із переносником X, який проникає в мембрану, і з внутрішнього боку субстрат вивільнюється, а переносник повертається назовні. Відповідні реакції:



Потік субстрату через мембрану описується рівнянням, подібним до рівняння Міхаеліса – Ментен:

$$J = \frac{J_{\max} [S]}{K_T + [S]}$$

Константа K_T дорівнює концентрації субстрату, при якій $J = J_{\max}/2$.

10.2. СЕЛЕКТИВНА ІОННА ПРОНИКНІСТЬ КЛІТИННИХ МЕМБРАН

Функції іонних каналів подібні до функцій ферментів. *Риси іонних каналів:*

- 1) Специфічність (селективність);
- 2) Явище насичення;
- 3) Конкурентне пригнічення транспорту іонами-блокаторами.

Канали можуть *переходити з відкритого стану у закритий і навпаки* внаслідок:

- 1) зміни мембранного потенціалу (тоді каналом управляє сенсор напруги – структура, яка реагує на зміну напруженості електричного поля);
- 2) взаємодії з певними речовинами (при їх взаємодії зі спеціальними рецепторами останні відкривають канал – безпосереднє управління каналом за допомогою хімічного сигналу; або при їх взаємодії зі спеціальними рецепторами утворюється вторинний посередник, наприклад, циклічний аденозинмонофосфат цАМФ, активуючий протеїнкіназу, яка каталізує приєднання до іонного каналу фосфату, що приводить до його відкриття);
- 3) специфічного фосфорилування.

Через канал може пройти 10^6 – 10^9 іонів за секунду.

Заряджений іон Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ або Cs^+ утворює навколо себе оточення з дипольних молекул води. За гіпотезою Мюллінса, іон тільки тоді може пройти крізь пору, коли його діаметр з одним шаром гідратації рівний діаметру пори. Тоді стінки пори, взаємодіючи з іоном, доповнюють гідратну оболонку, і іон переходить із розчину в мембрану.

Теорія Ейзенмана ґрунтується на енергетиці іонного обміну. За цією теорією, при великому діаметрі пори послідовність іонів лужних металів щодо рухливості в порі:



При малому діаметрі пори:



Для проміжних випадків є ще 9 послідовностей. Це підтверджується експериментально.

10.3. ПОВЕРХНЕВИЙ ЗАРЯД МЕМБРАНИ

Розглянемо границю вода – неполярний розчинник (наприклад, масло або мембрана). У воді розчинений електроліт A^+B^- . Різні іони мають різну **ліпофільність** (розчинність у маслі). Краще розчиняються у ліпідному шарі негативні іони. Тоді приповерхневий шар водного розчину зарядиться позитивно, а мембрани – негативно. На границі розділу середовищ внаслідок цього виникне різниця потенціалів.

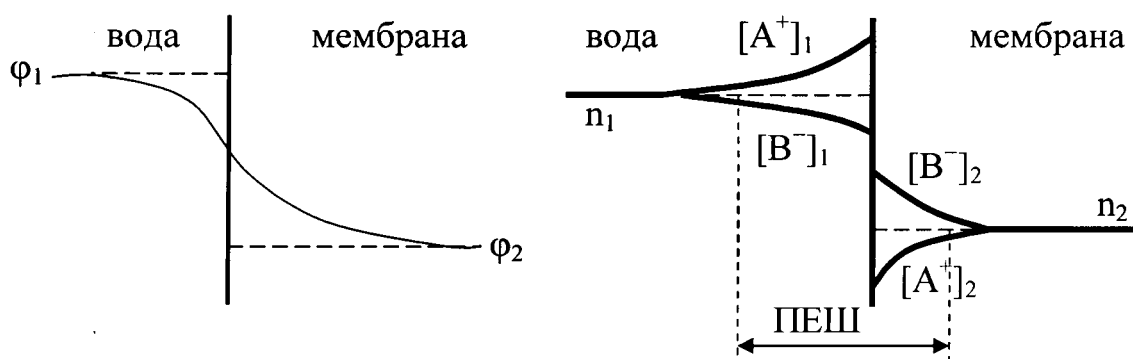


Рис.36. Розподіл потенціалу та концентрацій іонів поблизу поверхні розділу середовищ, а також схема дифузійних шарів та подвійного електричного шару.

Поблизу поверхні розділу виникають дифузійні шари, у яких потенціал і концентрації іонів плавно міняються. Міжфазна різниця потенціалів пов'язана з концентраціями іонів біля поверхні мембрани таким чином (для одновалентних іонів):

$$\Delta\varphi = \varphi_1 - \varphi_2 = \frac{RT}{2F} \ln \frac{[A^+]_1^{нов} [B^-]_2^{нов}}{[A^+]_2^{нов} [B^-]_1^{нов}}$$

Міжфазний стрибок потенціалу виникає тільки у тому випадку, коли коефіцієнти розподілу катіонів і аніонів різні. При однакових коефіцієнтах розподілу їхні концентрації всюди однакові, розчин всюди електронейтральний, а отже міжфазна різниця потенціалів відсутня.

Усі еукаріотичні клітини мають негативно заряджену поверхню мембрани завдяки залишкам сілової кислоти, які знаходяться на кінцях вуглеводних бокових ланцюгів (групи COO^-). Отже, вони мають фіксований негативний поверхневий заряд.

Наявність поверхневих зарядів клітинних мембран приводить до утворення біля мембрани подвійного електричного шару (ПЕШ) у розчині: щільний шар біля самої поверхні (товщина співрозмірна з розмірами іонів) і дифузійний шар із змінною концентрацією іонів товщиною від ангстремів до мікрометрів залежно від концентрації розчину. ПЕШ виникає внаслідок дії протилежних факторів: електростатичного притягання і теплового руху.

Співвідношення між густиною поверхневого заряду мембрани σ , потенціалом біля поверхні мембрани відносно потенціалу в об'ємі розчину φ і рівноважною концентрацією електроліту в розчині n встановлює **рівняння Гуї – Чепмена** (для випадку $n^+ = n^- = n$ і $z^+ = -z^- = z$):

$$\sigma = \sqrt{2\varepsilon\varepsilon_0 RTn} \cdot \left[\exp\left(\frac{ze\varphi}{2kT}\right) - \exp\left(-\frac{ze\varphi}{2kT}\right) \right]$$

Рівняння Гуї – Чепмена дає можливість за відомою густиною фіксованого поверхневого заряду мембрани обчислити потенціал її поверхні.

Катіони лужних металів і двохвалентні катіони в розчині тільки екранують поверхневий заряд мембрани, тоді як іони H^+ і деякі інші адсорбують у мембрану і протонують відповідні групи аніонів безпосередньо в ній. Тому їх називають потенціалвизначаючими іонами.

10.4. ДЕБАЙВСЬКА ДОВЖИНА (ДОВЖИНА ЕКРАНУВАННЯ)

Розглянемо плоску границю розділу між водним розчином іонів і біомембраною. Нехай у мембрану продифундувало більше аніонів, ніж катіонів, тоді мембрана заряджається негативно. Іони в розчині розподіляються таким чином: біля мембрани розміщується більше катіонів, ніж в об'ємі розчину, і менше аніонів. Густина заряду є функцією тільки координати x . Внаслідок розподілу зарядів потенціал розчину також є функцією тільки координати x . Зв'язок між потенціалом і густиною заряду $\rho(x)$ встановлює **рівняння Пуассона**:

$$\frac{\partial^2 \varphi}{\partial x^2} = -\frac{\rho}{\varepsilon\varepsilon_0} \quad (10.1)$$

Нехай у розчині є два типи іонів із зарядами $+e$ і $-e$, середня кількість іонів кожного знаку в одиниці об'єму – c_0 , $[c] = m^{-3}$. Внаслідок теплових коливань іони розміщуються поблизу границі розділу згідно **розподілу Больцмана** (його легко можна одержати з умови рівності електрохімічних потенціалів у будь-якій точці розчину):

$$\begin{cases} c_+(x) = c_0 \exp\left(-\frac{e\varphi}{kT}\right) \geq c_0 \\ c_-(x) = c_0 \exp\left(\frac{e\varphi}{kT}\right) \leq c_0 \end{cases}$$

Тут $\varphi(x)$ – потенціал у розчині на відстані x від мембрани відносно потенціалу в об'ємі розчину (далеко від границі).

Сумарна густина заряду:

$$\rho(x) = \rho_+(x) - \rho_-(x) = e(c_+ - c_-) = ec_0 \left[\exp\left(-\frac{e\varphi}{kT}\right) - \exp\left(\frac{e\varphi}{kT}\right) \right]$$

$e\varphi$ – електрична енергія іона,

kT – теплова енергія іона,

$$[\rho] = \frac{Kл}{м^3}.$$

У випадку, якщо різниця потенціалів між границею фаз і об'ємом невелика, можна експоненту розкласти в ряд і одержати:

$$\rho(x) = -\frac{2e^2 c_0}{kT} \varphi(x) \quad (10.2)$$

Підставивши (10.2) у (10.1), одержуємо диференціальне рівняння:

$$\frac{\partial^2 \varphi}{\partial x^2} = \frac{2e^2 c_0}{\varepsilon \varepsilon_0 kT} \varphi(x) \quad (10.3)$$

Розв'язок диференціального рівняння (10.3) шукаємо у вигляді:

$$\varphi = \varphi_0 \exp(-\kappa |x|)$$

φ_0 – потенціал на границі розділу фаз відносно потенціалу в об'ємі фази. Отже:

$$\kappa^2 = \frac{2e^2 c_0}{\varepsilon \varepsilon_0 kT}$$

κ – *параметр Дебая – Хюккеля*, має розмірність $[\kappa] = 1/\text{м}$.

Отже, потенціал змінюється з відстанню від границі фаз за *експоненціальним законом*. Відстань $\lambda = 1/\kappa$, на якій φ змінюється в e разів, називається *дебайівською довжиною* або *довжиною екранування*.

$$\lambda = \sqrt{\frac{\varepsilon \varepsilon_0 kT}{2e^2 c_0}}$$

В залежності від концентрації електроліту довжина екранування становить від ангстремів до мікрометрів. У присутності двохвалентних іонів довжина екранування зменшується.

Оскільки концентрація іонів у неполярному розчиннику (мембрані) набагато менша, ніж у водному розчині, то довжина екранування у мембрані набагато перевищує довжину екранування у водному розчині.

10.5. МОДЕЛЮВАННЯ ІОННОЇ ПРОНИКНОСТІ НА ШТУЧНИХ МЕМБРАНАХ

У якості моделей використовуються штучні двошарові ліпідні мембрани: ліпідні пухирці (*ліпосоми*) та плоскі мембрани.

Одержання ліпосом: водна суспензія фосфатиділхоліну або іншого ліпіду обробляється ультразвуком або розчин ліпідів в етанолі швидко змішується (для цього вводять розчин ліпідів через тонку голку, при цьому утворюються пухирці правильної сферичної форми діаметром 50 нм).

Всередині ліпосом – вода. Якщо одержувати ліпосоми у присутності в розчині іонів чи молекул, то вони опиняться всередині ліпосом. В 0.1 молярному розчині гліцину при утворенні ліпосом діаметром 50 нм всередину попадає 2000 молекул гліцину. Шляхом вимірювання швидкості виходу гліцину з ліпосом можна визначити проникність мембрани для гліцину.

Ліпосоми здатні зливатися з мембранами клітин. Це дає можливість введення в клітини організму різних речовин, не здатних самотійно проникати крізь мембрану. Вибіркове злиття ліпосом із клітинами певного типу використовується для контрольованої доставки лікарських речовин.

Методика Мюллера одержання плоских мембран (чорних мембран) описана в питанні 8.6. За допомогою такої мембрани вивчають електричні явища. Електропровідність бішару визначають, помістивши електроди у воду по обидва боки мембрани. Іонну проникність визначають, вимірюючи залежність величини струму, який проходить через мембрану, від прикладеної напруги.

Ліпідна бішарова мембрана має дуже малу проникність для іонів і полярних молекул. Виключення – вода. Na^+ і K^+ проходить через мембрану в 10^9 разів повільніше, ніж вода. Триптофан (який при $\text{pH}=7$ є біполярним іоном) проходить через мембрану в 1000 разів повільніше, ніж подібний за структурою індол (неполярний).

Механізм проходження низькомолекулярних сполук крізь мембрану: молекули втрачають оточуючі їх гідратні оболонки, розчиняються у вуглеводному шарі мембрани, дифундують крізь внутрішній шар до іншого боку мембрани.

10.6. ТРАНСПОРТНІ АНТИБІОТИКИ

Транспортні антибіотики – створюють іонну проникність двошарових ліпідних мембран.

Переносники іонів: валіноміцин, нігерицин, нонактин, А 23187, іономіцин та ін.

Каналоутворювачі: грамїцидин А, ністатин, амфотерицин Б, аламецитин, моназоміцин та ін. Вони формують канал, але самі не рухаються.

Розрізняють ці групи так. Вимірюють температурну залежність іонної проникності мембрани в температурному інтервалі, що містить температуру фазового переходу. Каналоутворювач транспортує іони однаково і при твердому стані ліпідного шару, і при рідкому, а ефективність переносника при твердненні ліпідного шару різко зменшується. Проникність мембрани, що містить валіноміцин, змінюється при цьому в 1000 разів.

Провідність плоскої мембрани з малою кількістю каналоутворювача змінюється з часом ступінчато (рис.37).

Стрибки провідності означають спонтанне утворення й дисоціація каналів. Час життя каналу, утвореного грамїцидином А для Na^+ – 30-60 мс, за цей час по ньому проходить $3\text{--}6 \cdot 10^5$ іонів.

По каналу може пройти більше 10^7 іонів за секунду, переносник може транспортувати тільки 1000 іонів за секунду.

Для молекул переносників характерна порожнина, оточена 6-ма або 8-ма атомами кисню, які зв'язують іон металу, а також вуглеводнева периферійна частина, яка дозволяє антибіотику розчинятись у ліпідах мембран (рис.38). Каталітична дія антибіотиків-переносників полягає в тому, що вони переводять іони у розчинну в ліпідах форму.

Валіноміцин зв'язує K^+ у 1000 разів краще, ніж Na^+ , тому що K^+ слабше притягає молекули води, а отже потрібна менша енергія, щоб їх відділити від іона.

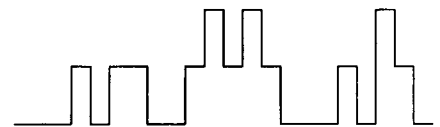


Рис.37. Стрибкоподібна зміна провідності мембрани з малою кількістю каналоутворювача.

Каналоутворювач *граміцидин А* – поліпептид із відкритим ланцюгом, складається з 15 амінокислотних залишків. На одному кінці – атом С, на іншому – N. Чергуються L- і D-амінокислоти. Погано розчиняється у воді. Канал утворюється з 2-х молекул, з'єднаних азотними кінцями, і згорнутих у спіраль. Діаметр каналу – 0,4 нм. За даними рентгеноструктурного аналізу, при зв'язуванні катіона канал стає ширшим і коротшим. Граміцидиновий канал – катіонселективний. Призначений для переносу іонів натрію. Виконує естафетну передачу. Селективність граміцидинового каналу:



Гідрофобний
боковий ланцюг

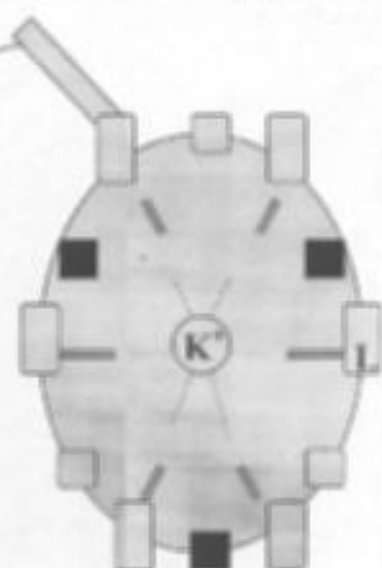






Рис.38. Молекула валіномицину:

-  – D-валін,
-  – L-валін,
-  – L-молочна кислота,
-  – D-гідроксиізовалеріанова кислота.

Тема 11. АКТИВНИЙ ТРАНСПОРТ ІОНІВ

[1], с.129-135, 143-144, [4], с.184-177, [6], т.2, с.102-109

Активний транспорт – перенос неелектролітів та іонів проти градієнту хімічного або електрохімічного потенціалу. На нього витрачається енергія за рахунок гідролізу АТФ або енергії окисно-відновних реакцій.

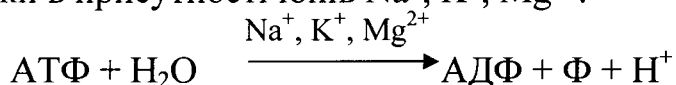
Відомо 4 *системи активного транспорту іонів*: перенос K^+ і Na^+ за допомогою спеціального фермента-переносника Na^+-K^+-ATP -ази, перенос Ca^{2+} за допомогою $Ca^{2+}-ATP$ -ази, перенос протонів за допомогою H^+-ATP -ази (усі три – за рахунок енергії гідролізу АТФ), перенос протонів при роботі дихальних ланцюгів мітохондрій за рахунок енергії окисно-відновних реакцій.

11.1. Na^+-K^+ -ПОМПА І ЇЇ ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Na^+-K^+ -помпа – система, яка відповідає за перенос цих іонів через кліткову мембрану.

Активний транспорт іонів Na^+ і K^+ застосовується для підтримки електричної збудливості нервових і м'язових клітин, є рушійною силою для транспорту цукрів, амінокислот, іонів кальцію. У стані спокою на нього витрачається третина всієї АТФ, яка утворюється у клітині.

Na^+-K^+-ATP -аза – фермент, інтегральна частина Na^+-K^+ -насосу. Він гідролізує АТФ тільки в присутності іонів Na^+ , K^+ , Mg^{2+} :



Na^+-K^+-ATP -аза – тетрамер із молекулярною масою 270 000. Велика субодиниця ($M=95\ 000$) містить ділянку, яка здійснює гідроліз АТФ, і ділянку, яка зв'язує інгібітори. Мала субодиниця ($M=40\ 000$) містить вуглеводні групи.

За іншими даними, Na^+-K^+-ATP -аза складається з 2-х поліпептидних ланцюгів із молекулярними масами 84000 і 5700, які утворюють велику й малу субодиниці білка.

При гідролізі молекули АТФ відбувається транспорт 2-х іонів калію у клітину й виведення 3-х іонів натрію з клітини.

11.2. МОДЕЛЬ Na^+-K^+ -ПОМПИ

Згідно *моделі Ярдецького*, структура білка, функціонуючого в якості помпи, повинна задовольняти таким умовам:

- 1) мати порожнину, у якій би поміщались іони,
- 2) повинен існувати у 2-х конформаціях: в одній з них порожнина відкрита всередину клітини, в іншій – назовні,
- 3) конформації повинні мати різну спорідненість до транспортованих іонів.

Великий поліпептид Na^+-K^+-ATP -ази пронизує мембрану наскрізь, а глікопротеїн знаходиться із зовнішнього боку. Іоннообмінні порожнини заповнюються іонами. Внаслідок конформаційної перебудови ферменту мала субодиниця входить у мембрану й обмінюється іонами з великою. Мала

субодиниця виходить на зовнішній бік мембрани й іони натрію виходять назовні, а велика – відкривається всередину клітини й іони калію переходять всередину.

Згідно теоретичних розрахунків, 4 атоми О можуть утворити натрій-специфічну комірку, а 6 атомів О – калій-специфічну комірку. Припущення: іон-зв'язуюча порожнина великої субодиниці містить 12 атомів О, як показано на рис.39.

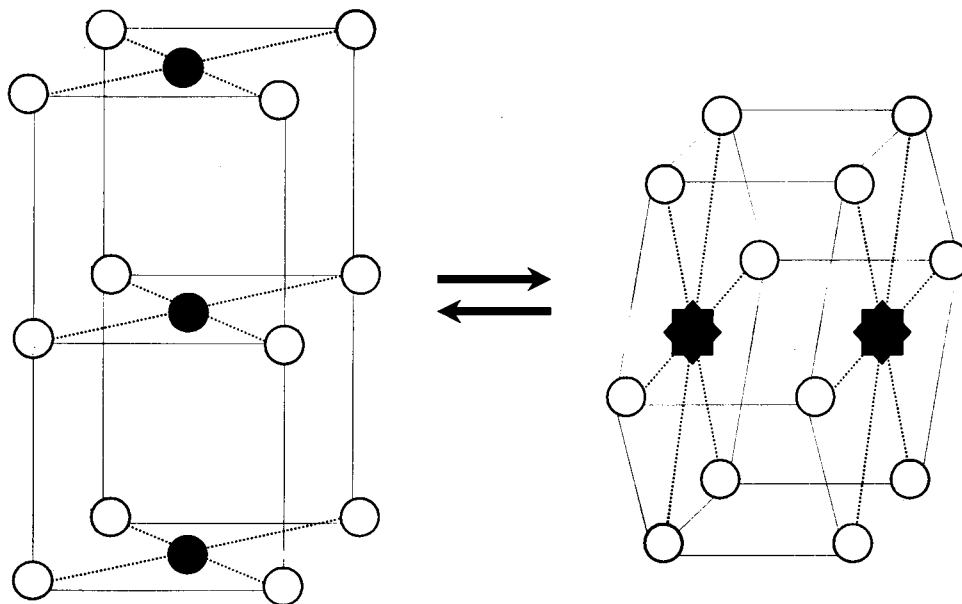


Рис.39. Модель $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -помпи Ярдецького:

- – атоми О,
- – атоми Na,
- ★ – атоми К.

11.3. ЕЛЕКТРОГЕННІСТЬ $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ПОМПИ

При роботі помпи відбувається обмін 3-х іонів натрію на 2 іони калію, тобто генерується електричний струм через мембрану. При цьому виникає додаткова різниця потенціалів. За 1 сек проходить 100 циклів. Сила струму становить $1,6 \cdot 10^{-17}$ А.

Тема 12. МЕМБРАННИЙ ПОТЕНЦІАЛ

[1], с.148-151, [4], с.174-183, [6], т.2, с.58-76, [7], с.240-248, 254-256, [10], с.85-86, 111-113

12.1. ПРИРОДА МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦІАЛУ

Нехай два в цілому електронейтральні розчини з різною концентрацією різних іонів розділені напівпроникною мембраною, яка вибірково пропускає деякі іони. Іони намагаються вирівняти свої концентрації по обидва боки мембрани, тому по один бік мембрани накопичується більше катіонів, по інший – більше аніонів. Таким чином виникає *мембранний потенціал спокою*.

Таблиця 2. Іонний склад нервової клітини:

Іони	всередині клітини, ммоль/л	У зовн. середовищі, ммоль/л
K ⁺	400	20
Na ⁺	50	440
Cl ⁻	120	550
Органічні	350	–

З таблиці 2 видно, що нервова клітина містить більше іонів калію, ніж натрію й хлору. Іони калію всередині клітини не зв'язані з білками чи іншими молекулами. Крім того, мембрана нервової клітини у стані спокою у 20 разів більш проникна для іонів калію, ніж натрію, і непроникна для інших іонів. Внаслідок дифузії іонів калію назовні всередині клітини виникає від'ємний потенціал відносно зовнішнього середовища. Якщо вважати, що мембранний потенціал визначається тільки дифузією іонів калію, то розрахунок за рівнянням Нернста (див. нижче) для нервової клітини дає –75 мВ. Потенціал спокою різних клітин становить від –50 до –100 мВ. Він близький до рівноважного потенціалу для калію, тому що проникність калію набагато більша, ніж інших іонів. Відмінність тому, що не враховано дифузію інших іонів.

Якщо нервову клітину збуджувати електрично, хімічно чи механічно, проникність мембрани для іонів натрію зростає в 400 разів. Протягом 0,1 мс мембранний потенціал змінюється від –75 мВ до +50 мВ. Таке раптове підвищення потенціалу називають *потенціалом дії*. Передається потенціал дії по аксону із швидкістю 1-150 м/с. Як тільки потенціал дії віддаляється від точки збудження, мембрана у цій точці знову готова до збудження. Це можливе тому, що за один раз аксон поглинає дуже малу кількість: $3 \cdot 10^{-12}$ моль Na⁺/см² і віддає таку ж кількість іонів калію. Це не вносить суттєвих змін в іонне середовище.

Потенціали дії створюють струм, тому два електроди, прикладені до різних ділянок тіла, реєструють різницю потенціалів. На цьому ґрунтується електрокардіографія, електроенцефалографія, електроміографія та інші методи діагностики.

12.2. МЕМБРАННИЙ ПОТЕНЦІАЛ У ВИПАДКУ ІОННОЇ РІВНОВАГИ. РІВНЯННЯ НЕРНСТА

Хімічний потенціал (молярний) речовини у розчині:

$$\mu = \mu^0 + RT \cdot \ln \frac{n}{n_0}$$

де μ_0 – хімічний потенціал даної речовини в 1М розчині,

n – молярна концентрація речовини у розчині, $[n]=\text{моль/м}^3$,
 $n_0=1 \text{ М}$.

Якщо по обидва боки мембрани концентрація іонів різна, то між фазами виникає різниця хімічних потенціалів. У випадку, якщо мембрана проникна тільки для одного типу іонів, ці іони проникають із фази з більшою концентрацією у фазу з меншою концентрацією, створюючи різницю електричних потенціалів між ними. Перехід іонів буде відбуватись доти, поки між фазами не вирівнюються електрохімічні потенціали:

$$\mu^0 + RT \cdot \ln \frac{n_e}{n_0} + zF\varphi_e = \mu^0 + RT \cdot \ln \frac{n_i}{n_0} + zF\varphi_i$$

Тут індекс e відноситься до зовнішнього середовища, а індекс i – до вмісту клітини.

Звідси одержуємо **рівняння Нернста** для мембранного потенціалу:

$$\Delta\varphi = \varphi_i - \varphi_e = \frac{RT}{zF} \ln \frac{n_e}{n_i} \quad (12.1)$$

Для одновалентних іонів при 20°C рівняння Нернста:

$$\Delta\varphi = 58 \cdot \lg \frac{n_e}{n_i}$$

(тут мембранний потенціал у мВ).

Клітинна мембрана у стані спокою пропускає в основному тільки іони калію. Оскільки концентрація калію зовні менша, ніж всередині клітини, то $\Delta\varphi < 0$ (потенціал зовні клітини більший, ніж всередині).

12.3. МІКРОЕЛЕКТРОДНА ТЕХНІКА ДЛЯ РЕЄСТРАЦІЇ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦІАЛУ

Спочатку мембранний потенціал виміряли тільки для гігантського аксона кальмара (до 1 мм у діаметрі і кілька см у довжину). Пізніше розробили метод виготовлення скляних капілярних мікроелектродів діаметром $< 1 \text{ мкм}$. Скляний капіляр заповнюють 3М розчином KCl для забезпечення електропровідності і з'єднують із підсилювачем. Потенціал вимірюють мілівольтметром.

Для дослідження залежності мембранного потенціалу від концентрації іонів роблять **перфузію** аксона. Гумовим валиком з аксона видавлюється аксоплазма і за допомогою піпетки заповнюється потрібним розчином, при цьому властивості мембрани не порушуються.

Експериментально встановлено, що при зміні концентрації іонів калію зовні або всередині клітини в 10 разів потенціал змінюється приблизно на 58 мВ у

відповідності з рівнянням Нернста. Якщо зовнішня концентрація калію рівна внутрішній (у діапазоні 10-540 мМ) – потенціал зникає, якщо переважає – потенціал міняє знак. Для зміни внутрішньої концентрації калію з гігантського аксона видавлюють аксоплазму і заповнюють його потрібним розчином. Такий аксон генерує нервові імпульси, хоча у ньому вже немає білків.

12.4. РІВНОВАГА ГІББСА – ДОННАНА

Біомембрани пропускають не тільки іони калію, але й інші іони, хоча й гірше. Випадок, коли мембрана пропускає іони калію та іони хлору, а всередині клітини знаходяться органічні аніони, для яких мембрана непроникна, моделюється за допомогою рівноваги Гіббса – Доннана.

Розглянемо систему з двох відсіків, розділених напівпроникною мембраною. Один містить аніони A^- , які не можуть пройти крізь мембрану, та іони калію (**доннанівська фаза**). Другий містить розчин KCl, іони здатні проходити крізь мембрану.

1	2
K^+Cl^-	K^+A^-
Доннанівська фаза	

Частина іонів хлору переходить у доннанівську фазу, оскільки їх там спочатку немає взагалі. Внаслідок цього потенціал доннанівської фази стає негативним і це призводить до переходу туди ж іонів калію. Рівновага настає при рівності електрохімічних потенціалів обох сортів іонів.

Рис.40. Рівновага Гіббса – Доннана.

Умова рівності електрохімічних потенціалів в обох фазах:

$$\begin{aligned}\mu_{K^+}^0 + RT \cdot \ln \frac{[K^+]_1}{n_0} + F\varphi_1 &= \mu_{K^+}^0 + RT \cdot \ln \frac{[K^+]_2}{n_0} + F\varphi_2 \\ \mu_{Cl^-}^0 + RT \cdot \ln \frac{[Cl^-]_1}{n_0} - F\varphi_1 &= \mu_{Cl^-}^0 + RT \cdot \ln \frac{[Cl^-]_2}{n_0} - F\varphi_2\end{aligned}$$

Звідси:

$$\Delta\varphi = \varphi_2 - \varphi_1 = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_1}{[K^+]_2} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Cl^-]_2}{[Cl^-]_1}$$

Отже, одержимо:

$$\boxed{\frac{[K^+]_2}{[K^+]_1} = \frac{[Cl^-]_1}{[Cl^-]_2} = r} \quad (12.2)$$

r – **відношення Доннана**, причому $r > 1$.

Як бачимо, у випадку рівноваги Гіббса – Доннана відношення концентрацій катіонів в обох фазах протилежне відношенню концентрацій аніонів в обох фазах. Вираз (12.2) можна переписати інакше:

$$[K^+]_1 \cdot [Cl^-]_1 = [K^+]_2 \cdot [Cl^-]_2$$

(добутки концентрацій катіонів і аніонів в обох фазах однакові).

Враховавши умови електронейтральності у кожній фазі, можна одержати зв'язок між концентраціями іонів. Концентрації іонів калію й хлору у лівій посудині повинні бути приблизно однаковими:

$$[K^+]_1 \approx [Cl^-]_1$$

З (12.2) бачимо, що концентрація іонів калію у доннанівській фазі більша в g разів, ніж у лівій посудині, а концентрація іонів хлору у доннанівській фазі менша у стільки ж разів, ніж у лівій посудині. Відношення Доннана g залежить від концентрації всіх присутніх у розчинах іонів.

Внаслідок переходу іонів у доннанівській фазі виникає осмотичний тиск, який можна вирахувати, використавши формулу Вант-Гофа.

Різні мембрани мають різну проникність для різних іонів. Потенціал спокою гігантського аксона кальмара -60 мВ, м'яза жаби -92 мВ, еритроцита людини від -6 до -10 мВ.

12.5. ЕЛЕКТРОХІМІЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ І РІВНЯННЯ ЕЛЕКТРОДИФУЗІЇ НЕРНСТА – ПЛАНКА

В *електродифузійній моделі* мембрана розглядається як неперервне однорідне середовище, у якому відбувається дифузія точкових невзаємодіючих частинок. Концентрації іонів по обидва боки мембрани підтримуються постійними.

При наявності градієнту електрохімічного потенціалу виникає потік іонів, напрямлений протилежно до нього. Запишемо для густини струму позитивних іонів рівняння Теорелла (9.6):

$$I = -un \frac{d\mu^*}{dx}$$

u – *електрофоретична рухливість* іонів, $[u] = \frac{m^2}{B \cdot c}$,

n – молярна концентрація іонів у площині x , $[n] = \frac{\text{моль}}{m^3}$,

$[I] = A/m^2$.

Тоді рівняння Теорелла для потоку іонів запишеться так:

$$J = - \frac{un}{|z|F} \frac{d\mu^*}{dx} \quad (12.3)$$

$[J] = \frac{\text{моль}}{m^2 \cdot c}$.

Продиференціювавши вираз (1.13) для електрохімічного потенціалу, маємо:

$$d\mu^* = RT \frac{dn}{n} + zF \cdot d\varphi \quad (12.4)$$

Підставивши (12.4) у (12.3), одержимо **рівняння електродифузії Нернста – Планка** для позитивних іонів:

$$J = - \frac{uRT}{zF} \frac{dn}{dx} - un \frac{d\varphi}{dx} \quad (12.5)$$

Перший доданок описує вільну дифузію, другий – міграцію іонів в електричному полі.

Для опису дифузії заряджених частинок розв'язується система двох рівнянь: рівняння електродифузії Нернста – Планка й рівняння Пуассона.

12.6. ТЕОРІЯ ПОСТІЙНОГО ПОЛЯ

Нехай крізь мембрану здатні проникати тільки іони одного сорту (катіони), причому їх концентрації й потенціали всередині клітини і в зовнішньому середовищі підтримуються сталими. **Припускається, що напруженість електричного поля й градієнт потенціалу всередині мембрани постійний по всій товщині h мембрани (рис.41).**

$$E = -\frac{d\varphi}{dx} = \frac{\Delta\varphi}{h} = \text{const}$$

(тут $\Delta\varphi = \varphi_i - \varphi_e$).

Ця умова виконується для тонких мембран із малою концентрацією носіїв заряду і великою товщиною подвійного електричного шару, тобто у випадку дифузії іонів через ліпідні бішари і клітинні мембрани.

При цій умові рівняння (12.5) перетворюється у лінійне неоднорідне диференціальне рівняння. Розв'язком цього диференціального рівняння є **рівняння Гольдмана** для сумарного потоку іонів через мембрану:

$$J = \frac{zFP}{RT} \cdot \frac{n_i \exp\left(\frac{zF}{RT} \Delta\varphi\right) - n_e}{\exp\left(\frac{zF}{RT} \Delta\varphi\right) - 1} \Delta\varphi \quad (12.6)$$

де $P = \frac{uRT}{zFh}$ – **коефіцієнт проникності** мембрани, $[P] = \text{м/с}$.

Причому якщо $J > 0$, то потік іонів направлений назовні з клітини (див. рис.41), а якщо $J < 0$, то всередину.

12.7. СПІВВІДНОШЕННЯ УССІНГА

Потік (12.6) складається з двох доданків, отже потік іонів можна розділити на два: направлений всередину клітини J_i і направлений назовні J_e :

$$J_e = \frac{zFP}{RT} \cdot \frac{n_i \exp\left(\frac{zF}{RT} \Delta\varphi\right)}{\exp\left(\frac{zF}{RT} \Delta\varphi\right) - 1} \Delta\varphi$$

$$J_i = \frac{zFP}{RT} \cdot \frac{n_e}{\exp\left(\frac{zF}{RT} \Delta\varphi\right) - 1} \Delta\varphi$$

Входячий потік залежить (лінійно) тільки від концентрації іонів у зовнішньому розчині, а виходячий – тільки від концентрації іонів всередині клітини, тобто ці потоки у наближенні постійного поля – незалежні. Між собою ці потоки зв'язані **співвідношенням Уссінга**:

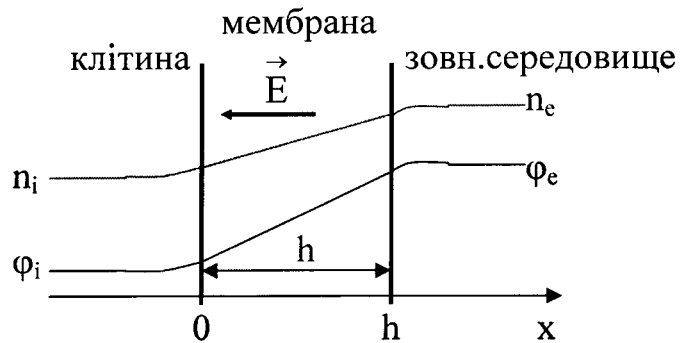


Рис.41. Мембрана в теорії постійного поля.

$$\frac{J_i}{J_e} = \frac{n_e}{n_i \exp\left(\frac{zF}{RT} \Delta\varphi\right)} \quad (12.7)$$

Виконання співвідношення Уссінга є критерієм пасивного транспорту, при якому потік іонів зумовлений тільки градієнтом концентрацій і дією електричного поля. Відхилення від рівняння (12.7) указує на участь системи активного транспорту в переносі іонів через мембрану або на порушення незалежності іонних потоків, наприклад, при дифузії через вузькі канали в мембрані.

Односторонні потоки визначають за допомогою радіоактивних ізотопів, додаючи їх в один із розчинів і вимірюючи швидкість поступання ізотопів в інший розчин, відокремлений мембраною.

12.8. ВОЛЬТ-АМПЕРНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕМБРАНИ

Згідно рівняння Гольдмана (12.6), трансмембранний потік іонів залежить від різниці потенціалів на мембрані нелінійно, і тільки при великій різниці потенціалів асимптотично наближається до пропорційної залежності:

- при $\Delta\varphi \rightarrow -\infty$ $J = \frac{zFP}{RT} n_e \Delta\varphi < 0$, результуючий потік напрямлений всередину,
- при $\Delta\varphi \rightarrow +\infty$ $J = \frac{zFP}{RT} n_i \Delta\varphi > 0$, результуючий потік напрямлений назовні.

Тільки у випадку $n_e = n_i$ $J \sim \Delta\varphi$ і пряма $J(\Delta\varphi)$ проходить через початок координат (це видно з рівняння (12.6)). При $n_e > n_i$ крива $J(\Delta\varphi)$ проходить нижче початку координат, при $n_e < n_i$ крива $J(\Delta\varphi)$ проходить вище (рис.42).

У стані рівноваги $J=0$. Як слідує з (12.6), рівноважна різниця потенціалів:

$$\Delta\varphi = \frac{RT}{zF} \ln \frac{n_e}{n_i}$$

Якщо крізь мембрану може проходити кілька типів одновалентних іонів, наприклад іони K^+ , Na^+ , Cl^- , то для рівноважної різниці потенціалів є **формула Гольдмана для мембранного потенціалу**:

$$\Delta\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_e + P_{Na} [Na^+]_e + P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_e} \quad (12.8)$$

Найбільший вплив на мембранний потенціал справляє той іон, який має найбільший коефіцієнт проникності.

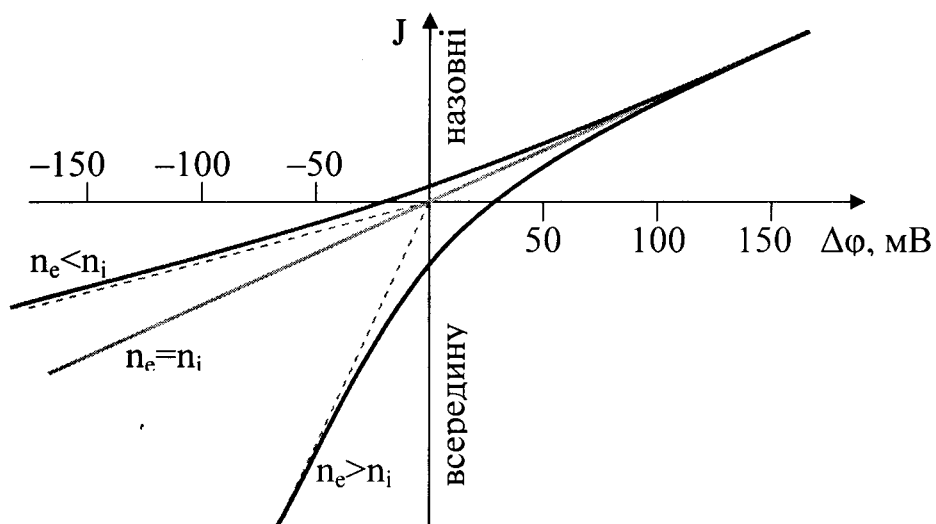


Рис.42. Залежність величини іонного потоку від мембранного потенціалу для різних співвідношень між концентраціями іонів по обидва боки мембрани.

Тема 13. ЕЛЕКТРИЧНА ЗБУДЛИВІСТЬ КЛІТИН

[1], с.156-158, 167-168, [2], с.351, 359-369, [4], с.199-201, 206-214, 218-233, [6], т.2, с.113-128, [7], с.262-271, [8], с.163-206

13.1. ПОТЕНЦІАЛ ДІЇ

У плазматичній мембрані нервових і м'язових клітин є іонні канали, які управляються мембранним потенціалом – **потенціалзалежні канали**. При позитивному зміщенні мембранного потенціалу до деякого **порогового значення** канал відкривається (переходить із непровідного у провідний стан). Виникає іонний струм, внаслідок чого відкриваються сусідні канали. Т.ч. створюється **потенціал дії**.

Потенціал спокою гігантського аксона кальмара становить -60 мВ. Потенціал дії виникає при зміщенні мембранного потенціалу до порогового значення -45 мВ. При цьому опір мембрани зменшується від $0,1$ до $0,004$ Ом·м² (в 25 разів).

Потенціал дії має тривалість $1-2$ мс і поширюється із швидкістю $1-150$ м/с. Амплітуда: $100-120$ мВ.

13.2. РОЛЬ ІОНІВ НАТРІЮ ТА КАЛІЮ В ГЕНЕРАЦІЇ ПОТЕНЦІАЛІВ ДІЇ

Відносні проникності мембрани у стані спокою для іонів становлять:

$$P(K):P(Na):P(Cl)=1:0,04:0,45$$

Розрахунок мембранного потенціалу за формулою Гольдмана (12.8) із врахуванням концентрацій іонів K^+ , Na^+ , Cl^- зовні і всередині нервової клітини дає $\Delta\phi = -50$ мВ. Оскільки в клітині і поза нею присутні й інші іони, потенціал спокою $\Delta\phi = -60$ мВ.

При зовнішньому подразненні провідність натрієвих каналів на відповідній ділянці мембрани зростає, внаслідок чого іони Na^+ переходять всередину клітини, підвищуючи мембранний потенціал. Якщо подразнення достатньо сильне і потенціал зростає до порогової величини, процес підвищення потенціалу продовжується: потік іонів Na^+ зростає – це приводить до ще більшого зростання потенціалу мембрани – це приводить до відкривання інших натрієвих каналів і т.д., тобто відбувається взаємне підсилення. Таким чином потенціал зростає до $+(40...50)$ мВ, а відносні проникності мембрани для іонів:

$$P(K):P(Na):P(Cl)=1:20:0,45$$

тобто проникність мембрани для іонів Na^+ зростає в 500 разів. При таких проникностях розрахунок рівноважного потенціалу для натрію за формулою Нернста дає $\Delta\phi = +55$ мВ, а розрахунок для іонів K^+ , Na^+ , Cl^- за формулою Гольдмана – $\Delta\phi = +43$ мВ.

При наближенні мембранного потенціалу до максимального значення, крім активації натрієвих каналів, відбуваються дещо повільніші процеси зростання провідності калієвих каналів та інактивації (зменшення кількості) функціонуючих натрієвих каналів. Це приводить до поступового повернення мембранного потенціалу до початкового значення, оскільки іони K^+ виходять за межі клітини в силу позитивного мембранного потенціалу та різниці концентрацій. Тривалість потенціалу дії становить $1-2$ мс.

В самому кінці потенціалу дії провідність калієвого каналу підвищена порівняно із станом спокою, а натрієві канали до цього моменту практично повністю закриті, тому мембранний потенціал зменшується майже до -75 мВ (*слідова гіперполяризація*). Після потенціалу дії настає *рефрактерний період* тривалістю кілька мілісекунд, коли нервово волокно незбудне.

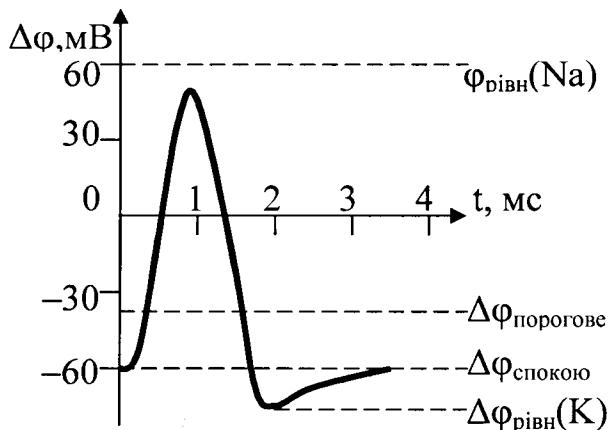


Рис. 43. Розвиток потенціалу дії

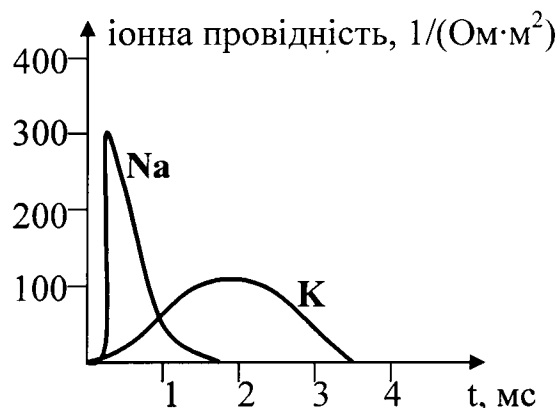


Рис. 44. Зміна проникності натрієвих і калієвих каналів під час потенціалу дії

В результаті потенціалу дії деяка кількість лишніх іонів натрію попадає всередину клітини, а іонів калію – назовні. Це настільки малі кількості (порядку 10^{-12} моль/см²), що на концентрацію іонів це не впливає. Але після потенціалу дії ці лишні іони перекачуються за допомогою натрій-калієвої помпи: по 3 іони Na^+ назовні і 2 іони K^+ всередину клітини за один цикл.

Мембранна теорія підтверджується експериментами на перфузованих аксонах. Перфузія безкалієвим розчином дає потенціал спокою $\Delta\varphi=0$, при заміні 50% K^+ на Na^+ проведення збудження припиняється.

13.3. ВИМІРЮВАННЯ ІОННИХ СТРУМІВ ЗА ДОПОМОГОЮ МЕТОДІВ ФІКСАЦІЇ ПОТЕНЦІАЛУ

Іонні канали пропускають струм (краще чи гірше) при будь-якому значенні мембранного потенціалу, тобто вони мають певний опір, залежний від мембранного потенціалу. Крім того, іонні канали можна розглядати як джерела власного струму, Е.Р.С. яких зумовлена різницею концентрацій відповідних іонів по обидва боки мембрани:

- натрієвий канал має Е.Р.С., напрямлену в бік аксоплазми, оскільки концентрація іонів натрію більша у зовнішньому розчині;
- калієвий канал має Е.Р.С., напрямлену в бік зовнішнього розчину, оскільки концентрація іонів калію більша в аксоплазмі;
- хлорний канал має Е.Р.С., напрямлену в бік зовнішнього розчину, оскільки концентрація іонів хлору більша у зовнішньому розчині, а заряд іонів хлору негативний.

Величини електрорушійних сил визначаються за **рівнянням Нернста** (12.1):

$$\mathcal{E}_{Na} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Na^+]_e}{[Na^+]_i};$$

$$\mathcal{E}_K = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_e}{[K^+]_i};$$

$$\mathcal{E}_{Cl} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Cl^-]_i}{[Cl^-]_e}.$$

Методика вимірювання:

мембранний потенціал на обмеженій ділянці мембрани зміщують до заданої величини $\Delta\phi$ і утримують на цьому рівні за допомогою електронної схеми з зворотнім зв'язком (фіксують). Струм, який проходить через цю ділянку, вимірюють за допомогою підсилювача. Щоб усунути проходження струму вздовж волокна і заставити цілу мембрану аксона збуджуватись синхронно, всередину аксона вводять металевий електрод.

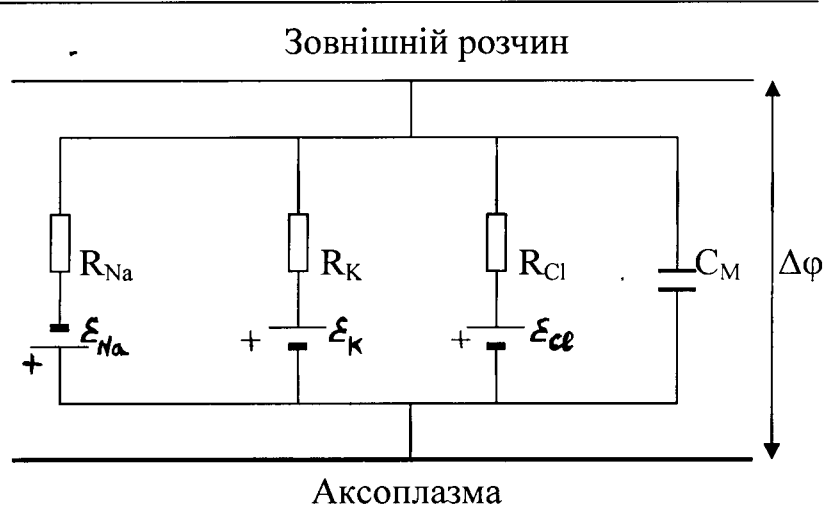


Рис.45. Еквівалентна електрична схема ділянки мембрани

Мембрана має деяку ємність. Відразу після примусової зміни мембранного потенціалу через ємність проходить короткочасний додатковий струм зарядки або розрядки конденсатора. Струм, який проходить через мембрану після припинення ємнісного струму, зумовлений тільки переносом іонів.

Загальний вираз для трансмембранного струму:

$$I = I_{Na} + I_K + I_{Cl} + C_M \frac{d\phi}{dt}$$

Експеримент підтвердив, що натрієві й калієві канали – різні структури. Додаток до аксоплазми тетродотоксину (ТТХ) повністю пригнічує натрієвий струм, тетраетиламонію (ТЕА) – пригнічує калієвий струм.

13.4. ВОЛЬТ-АМПЕРНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДЛЯ НАТРІЄВОГО І КАЛІЄВОГО СТРУМУ

Вольт-амперні характеристики знімають в умовах **фіксації мембранного потенціалу**.

Якщо на мембрані – потенціал спокою, то **калієвий струм** відсутній у силу рівності електрохімічних потенціалів калію по обидва боки мембрани. Іншими словами, сила, зумовлена різницею концентрацій, яка штовхає іони калію назовні клітини, зрівноважена силою, зумовленою різницею потенціалів, яка штовхає іони калію всередину клітини. При більшому мембранному

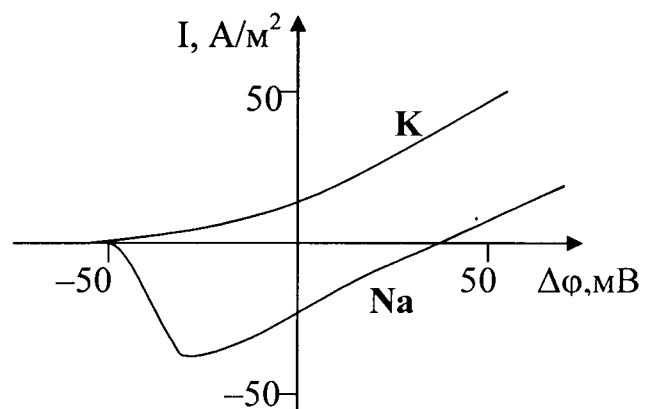


Рис.46. Вольт-амперні характеристики для натрієвого і калієвого струму. I – густина струму, напрямленого зсередини клітини назовні

потенціалі друга сила стає меншою, а при позитивному мембранному потенціалі взагалі напрямлена назовні клітини, тому іони калію виходять назовні клітини тим інтенсивніше, чим більший мембранний потенціал. Отже, калієвий струм зростає при зростанні мембранного потенціалу.

Якщо на мембрані – потенціал спокою, то *натрієвий струм* відсутній, оскільки натрієві канали закриті. При пороговому значенні мембранного потенціалу частина каналів відкриваються, і натрій поступає в клітину, оскільки обидві сили діють у цьому напрямку. Чим більший мембранний потенціал, тим більше натрієвих каналів відкрито, а сила, зумовлена різницею потенціалів, менша, тому натрієвий струм, поступаючий всередину клітини, спочатку зростає, а потім спадає. При позитивному значенні мембранного потенціалу сила, зумовлена різницею потенціалів, протилежно напрямлена до сили, зумовленої різницею концентрацій, тому натрієвий струм малий незважаючи на те, що більшість натрієвих каналів відкриті. При мембранному потенціалі біля +40 мВ ці сили врівноважуються, і натрієвий струм припиняється. А при мембранному потенціалі більше +40 мВ сила, зумовлена різницею потенціалів, переважає силу, зумовлену різницею концентрацій, і тому натрій виходить із клітини.

13.5. ПЕРФУЗІЯ ІЗОЛЬОВАНИХ НЕЙРОНІВ, МЕТОД "ПЕТЧ-КЛЕМП". РЕЄСТРАЦІЯ СТРУМІВ ПООДИНОКИХ КАНАЛІВ

Струми різних іонів накладаються один на одного. Для їх розділення необхідна зміна іонного складу всередині клітини. Для цього розроблено *метод перфузії* ізольованих нейронів. Вміст нейрона видавлюють гумовим валиком, а натовість заповнюють його розчином із заданою концентрацією іонів. До ізольованої клітини підводять піпетку, при цьому утворюється щільний контакт між піпеткою й мембраною. Мембрана всередині піпетки руйнується й відкривається доступ до вмісту клітини. Через піпетку можна вводити всередину нейрона електрод. Таким чином є можливість одночасної перфузії й вимірювання потенціалу.

При певних умовах мембрана всередині піпетки не руйнується, а утворює з нею щільний гігаомний контакт, ізольований від решти мембрани. Т.ч. можна досліджувати дуже малі мікрофрагменти мембрани, які містять один іонний канал – *метод "петч-клемп"*. При цьому фіксуються струми величиною до 10 пА, створені рухом поодиноких іонів. Такі дослідження дають безпосередню інформацію про особливості функціонування білкових макромолекул, які виконують функцію іонних каналів. Аналіз флуктуацій провідності окремих іонних каналів дозволив визначити середній час життя й провідність каналу.

13.6. ВОРІТНІ МЕХАНІЗМИ ПОТЕНЦІАЛО-ЗАЛЕЖНИХ ІОННИХ КАНАЛІВ

Всередині мембрани є рухливі заряджені частинки, які під дією електричного поля (при зміні потенціалу) перерозподіляються в мембрані і переводять канал із непровідного у провідний стан і навпаки. При цьому заряджені групи лиш незначно зміщуються у ворітному пристрої каналу. Швидше всього, відбувається кооперативна зміна орієнтації диполів на внутрішній поверхні каналу. Прохо-

дження іона через канал залежить від його взаємодії з дипольними групами. Їх орієнтація в каналі може впливати також на геометрію каналу.

При переміщенні заряджених частинок всередині мембрани проходить струм зміщення, так званий **ворітний струм**. Оскільки густина ворітного струму становить тільки $0,1 \text{ А/м}^2 = 0,1 \text{ пА/мкм}^2$, то для того, щоб його зареєструвати, необхідно усунути вплив ємнісного та іонних струмів. Для виключення іонного струму аксон кальмара перфузували зсередини й зовні розчинами непроникних іонів із вмістом блокаторів іонних струмів – тетродотоксину й тетраетиламонію. Ємнісний струм буде однаковим при прикладанні до мембрани однакових гіперполяризуючих і деполяризуючих імпульсів. Різниця струмів, що виникають у цих 2-х випадках, дає величину ворітного струму. Виявилось, що цей струм залежить від часу експоненціально.

Кожний тип каналу – калієвий, натрієвий, кальцієвий – має свій ворітний струм.

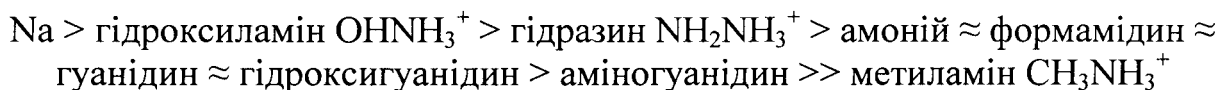
Ворітний струм пригнічується іонами Zn, введеними всередину клітини, а також УФ 280 нм.

13.7. СЕЛЕКТИВНІСТЬ КАНАЛІВ

Проникність натрієвих каналів для катіонів лужних металів:

$$P(\text{Li}):P(\text{Na}):P(\text{K}):P(\text{Rb}):P(\text{Cs})=1,1:1:0,083:0,025:0,016$$

Натрієві канали також проникні для іонів амонію NH_4^+ і деяких невеликих органічних катіонів:



Легше проходять канал менші іони. Заміщення OH^- або NH_2 -групи метильною (CH_3) значно знижує проникність іона.

Згідно *моделі Хіллі* вхід у натрієвий канал має прямокутну форму $3 \times 5 \text{ \AA}$, оточений 8 атомами кисню. В каналі є карбоксильна кислотна група, яка створює сильне електричне поле і забезпечує селективність каналу. У водному розчині катіон оточений атомами кисню молекул води, в каналі він також оточений атомами кисню, одні з яких належать молекулам води, інші зв'язані з каналом.

Проникність калієвих каналів:

$$P(\text{K}):P(\text{Rb}):P(\text{NH}_4):P(\text{Li}):P(\text{Na})=1:0,92:0,13:0,018:0,01$$

Діаметр вузької частини каналу – 3 \AA , тому через нього не можуть пройти великі іони. Такі іони як Na^+ ($1,9 \text{ \AA}$) і Li^+ ($1,4 \text{ \AA}$) проходять погано, оскільки вони не взаємодіють належним чином з атомами кисню каналу.

13.8. БЛОКАТОРИ ІОННИХ КАНАЛІВ

Блокатори натрієвих каналів:

- 1) Отрута паралітичної дії **тетродотоксин** – міститься в печінці японської риби фугу, внутрішніх органах риби-кулі та в організмі деяких видів тритонів. Зв'язується із зовнішнім входом каналу і пригнічує виникнення потенціалу дії у нервах і м'язах.
- 2) **Сакситоксин** – міститься в джгутикових *Gonyaulax catanella* (червоний планктон). Дія аналогічна. Ці отрути паралізують нервову провідність.

3) Місцеві анестетики (*новокаїн* та ін.) в нейтральній формі, розчиняючись у ліпідному шарі мембрани, проникають всередину нервового волокна і блокують канал зсередини. В зарядженій формі (протонована аміногрупа) анестетик може проникнути всередину клітини тільки через відкритий натрієвий канал, тому ефективність таких анестетиків підвищується при ритмічній стимуляції нерва.

4) *Іони Ca^{2+}* .

Блокатори калієвих каналів:

- 1) *Тетраетиламоній* блокує канал зсередини клітини. При цьому значно зростає тривалість потенціалу дії.
- 2) *Іони цезію, Na, Li*, введені всередину клітини.
- 3) *Іони Ca^{2+}* .
- 4) *Токсини*, які містяться в отруті деяких видів скорпіонів.

Блокатори кальцієвих каналів:

Верапаміл, D-600, ніфедипін, дильтиазем використовуються як антиаритмічні і судиннорозширюючі засоби.

Існують сполуки, які, навпаки, пригнічують інактивацію натрієвих каналів: протеолітичні ферменти, проназа, N-бромацетамід, танінова кислота, йодат тощо. Отрута скорпіонів і морських анемон збільшує тривалість потенціалу дії у сотні разів.

Деякі токсини здатні розчинятися в ліпідному шарі мембрани і продовжувати тривалість відкритості натрієвих каналів: батрахотоксин (міститься в секреті шкіряних залоз південноамериканської жаби), ДДТ.

13.9. МАТЕМАТИЧНА МОДЕЛЬ ХОДЖКІНА – ХАКСЛІ ОПИСУ ПРОЦЕСУ ЕЛЕКТРИЧНОЇ ЗБУДЛИВОСТІ

На основі дослідів Ходжкін і Хакслі сформулювали *принципи*:

- 1) Перенос іонів натрію й калію здійснюється різними незв'язаними структурами (каналами);
- 2) Зміна струмів є наслідком зміни проникності мембрани для різних іонів;
- 3) Пропускна здатність мембрани управляється електричним полем.

У своїй моделі вони припустили, що канал активується при проходженні деяких заряджених частинок крізь потенціальний бар'єр всередині мембрани.

Припустимо: якщо заряджена частинка перебуває у лівій потенціальній ямі (у стані інактивації), то канал закритий, а якщо у правій (у стані активації) – то відкритий (рис.47). У стані динамічної рівноваги постійно відбуваються переходи зі стану активації у стан інактивації і навпаки, але загальні кількості частинок у кожному стані при цьому не змінюються. Нехай у початковий момент часу частка частинок у стані активації (або іншими словами, ймовірність перебування частинки у стані активації) становить n_0 , а частка частинок у стані інактивації (або іншими словами, ймовірність перебування частинки у стані інактивації) становить $1-n_0$. При зміні мембранного потенціалу ці величини

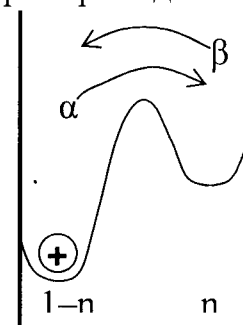


Рис.47. Потенціал всередині іонного каналу

змінюються. Кінетичне рівняння для швидкості зміни частки частинок у стані активації:

$$\frac{dn}{dt} = \alpha(1 - n) - \beta n \quad (13.1)$$

α , β – константи швидкостей (ймовірності) відповідних переходів.

Розв'язок дифрівняння (13.1) дає експоненціальну залежність $n(t)$. Середня провідність іонних каналів пропорційна до кількості відкритих каналів:

$$\sigma = n\sigma_{\max} \quad (13.2)$$

(σ_{\max} – максимальна провідність, коли відкриті всі іонні канали),

отже також повинна змінюватись по експоненті.

Але насправді динаміка зміни провідності **калієвих іонних каналів** не зовсім відповідає простій залежності (13.2), тому Ходжкін і Хакслі припустили, що активація калієвого каналу відбувається при переході 4-х однакових частинок. У цьому випадку ймовірність відкривання каналу (частка відкритих каналів) становить n^4 . Тоді провідність відповідає експериментальній залежності, наведеній на рис.48 для випадку, коли в початковий момент часу всі канали закриті, а після зміни мембранного потенціалу всі канали відкриваються:

$$\sigma = n^4 \sigma_{\max}$$

Частинки, які управляють проникністю калієвих каналів, називають **n-частинками**.

Експонента в 4-му степені має вигляд, подібний до зображеного на рис.48. Провідність зростає не по експоненті, а з деяким періодом затримки. Швидке зростання провідності калієвих каналів починається тільки після досягнення $n > 0,7$.

Динаміка зміни провідності **натрієвих іонних каналів** ще складніша – спочатку активація, а потім інактивація. Тому було зроблено припущення, що натрієвий канал відкривається при переході через бар'єр 3-х т.зв. m-частинок, а закривається – при переході 1-ї т.зв. h-частинки, тобто в активованому стані натрієвий канал перебуває тільки за умови наявності 3-х m-частинок і відсутності h-частинки на певній ділянці. Т.ч. рівняння для провідності натрієвого каналу:

$$\sigma = m^3 h \sigma_{\max}$$

m – ймовірність перебування m-частинки у стані активації;

h – ймовірність відсутності h-частинки на даній ділянці.

Математична модель Ходжкіна – Хакслі дозволила з високою точністю змодельювати нервовий імпульс при різних експериментальних умовах.

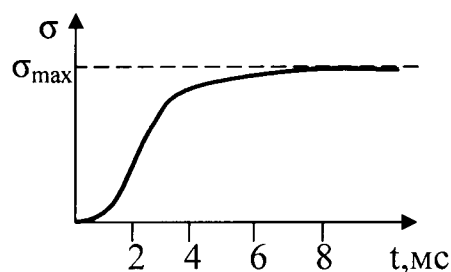


Рис.48. Динаміка зміни провідності калієвих іонних каналів

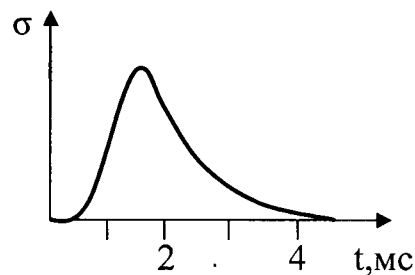


Рис.49. Динаміка зміни провідності натрієвих іонних каналів

Тема 14. ПОШИРЕННЯ ЗБУДЖЕННЯ

[1], с.170-171, [2], с.356, [4], с.201-206, [6], т.2, с.139-144, [8], с.170-171

14.1. ЛОКАЛЬНІ СТРУМИ ТА САЛЬТАТОРНЕ ПРОВЕДЕННЯ ЗБУДЖЕННЯ

Нервовий імпульс має властивість поширюватись вздовж волокна без затухання з постійною швидкістю. Внаслідок деполяризації ділянки мембрани виникають **локальні струми** між збудженою й незбудженою ділянками (рис.50). При досягненні на незбудженій ділянці порогового потенціалу вона також переходить у збуджений стан. У протилежний бік сигнал не поширюється, оскільки ділянка мембрани після збудження на деякий час втрачає здатність збуджуватись (**рефрактерний період**).

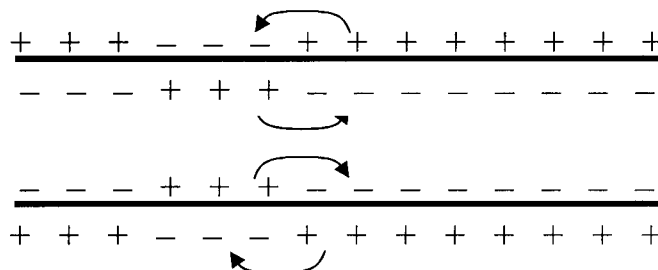


Рис.50. Локальні струми вздовж нервового волокна під час потенціалу дії.

В нервових волокнах хордових потенціал дії виникає тільки в **перехватах Ранв'є**, між якими поверхня покрита **мієліном**, утвореним лемоцитами (шванівськими клітинами), який є ізолятором. Відстань між перехватами – 2 мм. Збудження передається стрибками між перехватами Ранв'є з більшою швидкістю і з меншими затратами, ніж у немієлінованих волокнах, тому що електрична ємність мієлінової оболонки мала і на її перезарядку витрачається значно менше енергії. Таке проведення імпульсу називають **сальтаторним**. Мієлінізація забезпечила хордовим еволюційну перевагу, оскільки для досягнення заданої швидкості поширення збудження мієлінізоване волокно може бути в 25 разів тонше.

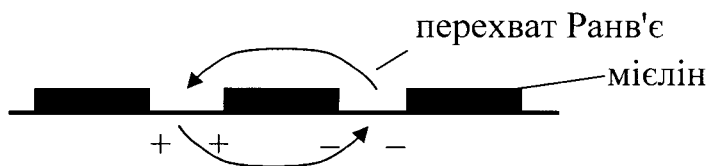


Рис.51. Сальтаторне проведення збудження між перехватами Ранв'є

14.2. КАБЕЛЬНА ТЕОРІЯ

Вважається, що провідність зовнішнього середовища достатньо велика. Але аксоплазма має певний опір, тому при проходженні по ній струму потенціал аксоплазми по відношенню до зовнішнього середовища падає, тобто він є максимальним у точці збудження і його амплітуда зменшується по мірі віддалення від неї. Потенціал аксоплазми відносно потенціалу зовнішнього середовища при проходженні струму по волокну називають **електротонічним потенціалом**.

Нервовоє волокно можна розглядати як кабель із недосконалими електричними властивостями: низька електропровідність аксоплазми, недостатні ізолюючі властивості мембрани, велика мембранна ємність.

Зовнішнє середовище має великий об'єм і велику провідність, тому можна в ньому вважати $\phi_c = \text{const}$ (потенціал постійний). Приймемо, що $\phi_c = 0$. Внутрішній (поздовжній) опір одиниці довжини аксоплазми – r_n (Ом/см). Поперечний опір одиниці довжини мембрани – r_m (Ом·см).

За нормальних умов потенціал аксоплазми $\varphi_a < 0$. Нехай у т.А виник потенціал дії $\varphi_0 > 0$. Тоді по аксоплазмі піде поздовжній струм I_n . Розглянемо ділянку кола АВ довжиною Δx . За законом Ома, різниця потенціалів на ділянці кола рівна добутку сили струму на опір даної ділянки кола:

$$\Delta\varphi = -I_n r_n \Delta x$$

Знак "-" – оскільки при $\Delta x > 0$ $\Delta\varphi < 0$. Звідси:

$$I_n = -\frac{1}{r_n} \frac{d\varphi}{dx}$$

Але водночас поздовжній струм постійно зменшується внаслідок поступового відтоку зарядів крізь мембрану в середовище (мембранний струм). За I законом Кірхгофа, мембранний струм, який пронизує одиницю довжини мембрани, дорівнює зменшенню поздовжнього струму на цій одиниці довжини:

$$I_m = -\frac{dI_n}{dx} = \frac{1}{r_n} \frac{d^2\varphi}{dx^2}$$

$[I_m] = \text{А/м}$.

З іншого боку, за законом Ома, мембранний струм:

$$I_m = \frac{\varphi}{r_m}$$

де φ – електротонічний потенціал аксоплазми в даній точці x .

Одержуємо диферівняння:

$$\frac{r_m}{r_n} \frac{d^2\varphi}{dx^2} = \varphi$$

Його розв'язок:

$$\varphi(x) = \varphi_0 \exp\left(-\frac{x}{\lambda}\right)$$

де $\lambda = \sqrt{\frac{r_m}{r_n}}$.

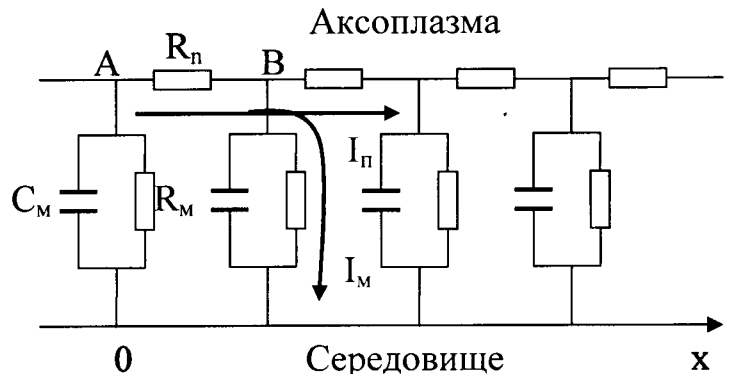


Рис.52. Еквівалентна електрична схема аксона

14.3. КОНСТАНТА ДОВЖИНИ КАБЕЛЯ

Як видно з розв'язку диферівняння, сигнал експоненціально затухає з відстанню. **Константа довжини кабеля** λ – відстань, на якій електротонічний потенціал аксоплазми відносно середовища зменшується в e разів.

Якщо питомий опір одиниці площі мембрани – σ_m (Ом·см²), а питомий опір 1 см³ аксоплазми – ρ_a (Ом·см), то:

$$r_m = \frac{\sigma_m}{\pi D}; \quad r_n = \frac{4\rho_a}{\pi D^2}$$

$$\lambda = \sqrt{\frac{D\sigma_m}{4\rho_a}} \sim D$$

Аксон діаметром 30 мкм із $\sigma_m=5$ кОм·см² і $\rho_a=50$ Ом·см має $\lambda=2,7$ мм. У клітин харових водоростей діаметром 1 мм із $\sigma_m=10$ кОм·см² константа довжини – кілька сантиметрів.

При збудженні питомий опір мембрани різко зменшується (в 1000 разів), тому зменшується і константа довжини, а отже, сигнал мав би затухати набагато швидше. Насправді сигнал при поширенні вздовж нервового волокна не затухає, оскільки вздовж волокна розташовані "*молекулярні генератори*": при досягненні потенціалом порогового значення провідність натрієвих каналів різко зростає, що викликає підсилення сигналу, який поступив на дану ділянку волокна, до потрібної величини.

14.4. ОПІР І ЄМНІСТЬ МЕМБРАНИ

Нервові й м'язові тканини – циліндричні провідники. Аксоплазма має малий питомий опір – $\rho_a=30-200$ Ом·см, що при діаметрі 30 мкм становить $r_n=4-30$ МОм/см (для порівняння – питомий опір 10%-го розчину NaCl – 1 Ом·см, питомий опір н/п Ge при 0°C – 5000 Ом·см. Мембрана має великий питомий опір – $2 \cdot 10^9$ Ом·см, що при товщині мембрани 20 Å становить $\sigma_m=400$ Ом·см² або $r_m=40$ кОм·см (для порівняння – питомий опір скла – 10^{11} Ом·см, питомий опір хімічно чистої води – 10^8 Ом·см).

Електрична ємність чистого бімолекулярного ліпідного шару – 0,8 мкФ/см², ємність мембрани різних клітин – біля 1 мкФ/см². Діелектрична проникність ізолюючої частини бішару, яка складається з вуглеводних ланцюгів – $\epsilon=2$. За формулою плоского конденсатора

$$C = \frac{\epsilon \epsilon_0 S}{d}$$

можна обчислити товщину мембрани: $d=22$ Å.

Ємність – важливий параметр. Знаючи ємність мембрани, можна вирахувати кількість зарядів, необхідну для виникнення заданого зміщення мембранного потенціалу, обчислити загальну площу поверхні клітини.

Тема 15. МЕХАНІЗМИ МІЖКЛІТИННИХ ВЗАЄМОДІЙ

[2], с.369-372, [4], с.235-255

15.1. ЩІЛИННІ З'ЄДНАННЯ

Щілинне з'єднання проходить крізь дві плазматичні мембрани сусідніх клітин і з'єднує їхні цитоплазми. Канал утворений двома **конексонами**, які складаються з 6 білкових субодиниць кожен.

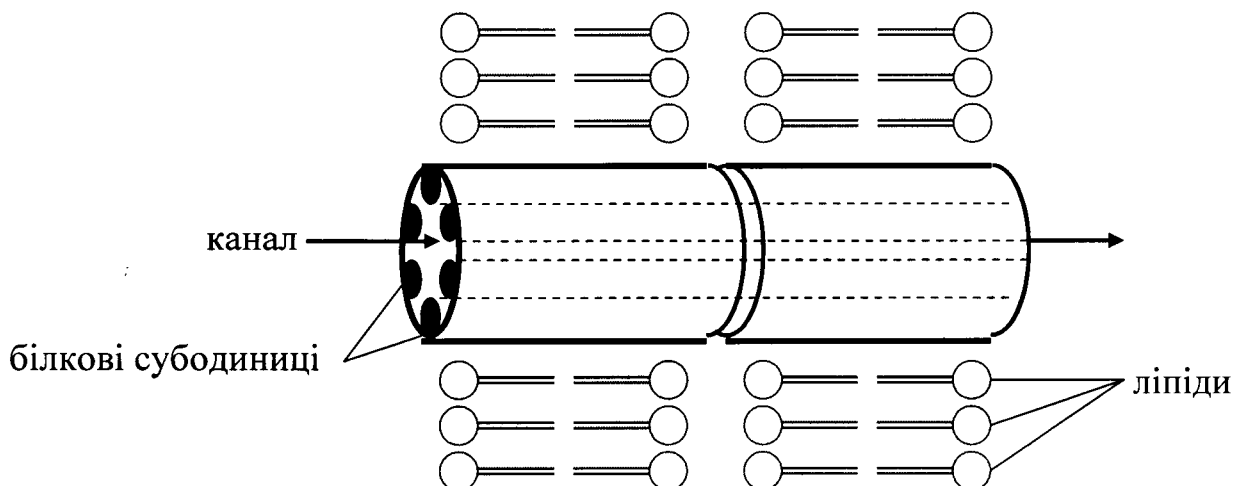


Рис.53. Схема щілинного з'єднання

Ефективний діаметр каналу – 15-20 Å. Він може пропускати речовини з молекулярною масою до 1000-1500: неорганічні іони, цукри, амінокислоти, нуклеотиди.

Щілинні з'єднання забезпечують **синхронізацію** скорочення клітин серцевого м'яза й клітин гладкої мускулатури. Завдяки їм потенціал дії поширюється між клітинами без затримки.

Щілинні з'єднання відіграють важливу роль в **ембріогенезі**: крізь них поживні речовини розподіляються між клітинами до того, як розвинеться система кровообігу.

Проникність щілинних з'єднань регулюється іонами кальцію: при внутрішньоклітинній концентрації кальцію $<10^{-7}$ М/л канали повністю відкриті, при концентрації кальцію $>10^{-5}$ М/л – повністю закриті. При загибелі або пошкодженні клітини іони кальцію або входять крізь пошкоджену мембрану, або накопичуються через те, що клітина не здатна ефективно відкачувати кальцій з цитозолу, внаслідок чого клітина швидко втрачає зв'язок із сусідніми клітинами і від'єднується від них.

Проникність щілинних з'єднань швидко й оборотно зменшується також внаслідок зменшення рН всередині клітини.

Проникність щілинних з'єднань потенціалзалежна. Це виявлено при вивченні випрямляючого електричного синапсу в нервовій системі річкового рака, клітин ембріонів амфібій на ранніх стадіях розвитку.

15.2. СИНАПТИЧНА ПЕРЕДАЧА

Синапси – спеціалізовані контакти між нервовими клітинами й клітинами-мішенями.

У ссавців – переважно **хімічні синапси**. Нервові закінчення (**пресинаптична область**) має внутріклітинні синаптичні пухирці діаметром 20-80 нм із високонцентрованим нейромедіатором. Пухирець містить кілька тисяч молекул медіатора. При поступанні потенціалу дії у нервові закінчення синаптичні пухирці наближаються до **синаптичної щілини** (її ширина – 10-50 нм) і нейромедіатор, дифундуючи через щілину, взаємодіє з рецептором, який знаходиться в **постсинаптичній області**. При цьому в ній виникає **постсинаптичний потенціал**. Сигнал передається тільки в одному напрямку. В результаті може відбуватись збудження або гальмування в клітині-мішені. **Синаптична затримка** (час між прибуттям потенціалу дії у пресинаптичну область і виникненням постсинаптичного потенціалу) у ссавців становить 0,3 мс, але в деяких випадках може бути значно більшою. *Примітка: ширина синаптичної щілини – це відстань між пресинаптичною й постсинаптичною областями.*

В **електричних синапсах** пухирці відсутні. Ширина щілини – 2-3,5 нм. Практично повністю відсутня синаптична затримка. Електричні синапси – переважно збуджуючі. Щілини здебільшого двосторонні (можуть передавати сигнал в обидва боки), але трапляються і з чітко вираженими випрямляючими властивостями. Переважно застосовуються для швидкого зв'язку між нейронами.

Хімічні синапси кращі тим, що при частому використанні котрогось із них передача по ньому покращується, т.ч. вони беруть участь у процесах навчання й пам'яті.

15.3. ПОСТСИНАПТИЧНІ ПОТЕНЦІАЛИ

Постсинаптичні потенціали – **деполяризуючі** (збуджуючі) і **гіперполяризуючі** (гальмуючі). Виникають внаслідок взаємодії нейромедіатора з рецептором. Якщо при взаємодії нейромедіатора з рецептором активізуються натрієві або закриваються калієві канали, то виникає збуджуючий потенціал, при цьому мембранний потенціал міняє свій знак. Якщо активізуються хлорні або калієві канали, то виникає гальмуючий потенціал, при цьому мембранний потенціал ще більше зменшується.

Для вивчення властивостей іонних каналів, активованих нейромедіаторами, використовують реєстрацію струмів через одиночні канали в умовах фіксації потенціалу (метод петч-клемп).

Наприклад: нейромедіатор ацетилхолін діє у збуджуючих синапсах нервово-м'язових з'єднань хордових. Після виникнення у м'язі потенціалу дії ацетилхолін гідролізується ацетилхолінестеразою (протягом 40 мкс), і постсинаптична мембрана відновлює свою поляризованість за частку мілісекунди).