

Б.Н. Парусов

ОСНОВЫ
БИОФИЗИКИ
и
БИОФИЗИЧЕСКОЙ
ХИМИИ

часть

I

Москва, издательство 1960

Борис Николаевич Тарусов

**ОСНОВЫ БИОФИЗИКИ
И БИОФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

Редактор *Ф. Б. Шапиро*

Технический редактор *Л. Л. Ежова*

Сдано в набор 21/I 1960 г.

Подписано к печати 1/VIII 1960 г.

Бумага 84×108¹/₃₂, 17 печ. л. 11,48 усл. печ. л.

Уч.-изд. л. 12,61 Тираж 4175 экз. Т—10606

Цена 7 р. 80 к. Зак. 60

Государственное издательство «Высшая школа».

Москва Б-62, Подсосенский пер., 20

1-я тип. «Трансжелдориздата» МПС
Москва, Б. Переяславская ул., д. 46

Проф. Б. Н. ТАРУСОВ

ОСНОВЫ БИОФИЗИКИ И БИОФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Часть I

Государственное издательство «Высшая школа»

Москва — 1960

БИОФИЗИКА И ЕЕ ЗАДАЧИ

Хотя попытки применить физические методы для изучения процессов, протекающих в живых клетках и тканях, делались уже давно, биофизика как дисциплина, начала оформляться только в течение последних двух десятилетий.

Термин «биофизика» появился в конце прошлого столетия наряду с названиями физико-химическая биология, химическая биофизика, молекулярная физиология и т. д. для характеристики направлений в биологии, использующих физико-математические методы для познания механизмов биологических процессов.

Часто биофизику определяют как науку, изучающую физические процессы в организме. Это неправильное определение. Чисто физические элементарные явления не определяют поведение биологических систем. Основным субстратом, в котором развиваются биологические процессы, являются крупные молекулы протеинов и липопротеинов. Жизненные явления зависят от химических и физико-химических превращений, происходящих в этих молекулах и на поверхностях фаз, которые они образуют. Однако физико-математические подходы играют большую роль в выявлении молекулярных биологических механизмов. Их роль определяется тем, что регистрация физико-химических процессов, происходящих, в отдельных живых клетках и их структурных единицах, недоступна методам химического анализа без повреждения этих клеток и структур. Суждение о физико-химических процессах может быть сделано только на основании изучения физических параметров клеток (элек-

тропроводности, потенциалов, оптических показателей и т. д.) и их изменений и требует математического анализа.

Биофизике приходится иметь дело и с чисто физическими явлениями. Например, при оценке биологического действия различных видов излучений необходимо учитывать и фотохимические процессы, возникающие в протоплазме, и количественные законы действия лучистой энергии на организмы, связанные с закономерностями поглощения, рассеивания и отражения фотонов. Однако физические явления в развитии биологических явлений — это только этапы, которые в конечном счете приводят к физико-химическим изменениям.

Имеется неправильная тенденция относить к биофизике все те работы, в которых применяются физические методы исследований, например, измерения биопотенциалов, проводимые физиологами, оптические исследования, которые ведутся биохимиками и морфологами и т. д. В этих случаях физические методы используются только для того, чтобы более четко зафиксировать внешние проявления физиологических и морфологических закономерностей. Основная же задача биофизики заключается в изучении молекулярных физико-химических явлений и превращений, которые лежат в основе первичных механизмов биологических процессов.

Часто биофизика трактуется очень широко и в нее включается весь комплекс дисциплин, изучающих физические, химико-физические и физико-химические процессы в живых организмах.

Попытки понять сущность физико-химических молекулярных процессов, которые происходят в протоплазме при возбуждении, делении клеток и т. п., а также исследовать структуру протоплазмы, делались уже давно. Эти попытки были тесно связаны с уровнем физико-химических знаний о строении молекул и часто носили примитивный характер.

Классики нашей отечественной физиологии И. П. Павлов, И. М. Сеченов, Н. Е. Введенский придавали большое значение этим попыткам и неоднократно писали о необходимости познания физико-химической сущности процессов, которые обуславливают внешние физиологические проявления. Однако широкое развитие биофизика смогла получить только в последнее время, когда появились более совершенные методы исследования и возникли новые представления о молекулярном строении вещества, разработан-

ные физикой и физической химией в последние десятилетия.

Биофизические исследования начали появляться в XVIII столетии. Они развивались параллельно развитию физики, поскольку всегда существовала тенденция использовать вновь открываемые закономерности для объяснения жизненных явлений.

Уже в XVIII столетии делались попытки применить гидродинамические законы течения жидкостей по трубам для объяснения закономерностей движения крови по сосудам (Эйлер). Очень скоро после открытия первого закона термодинамики была установлена его применимость к жизненным процессам (Лавуазье). Большую роль в развитии биофизики сыграли работы Гельмгольца, вскрывшего механизм работы глаза, как оптической системы. Большое значение сыграли его работы по изучению скорости нервного проведения. Открытие пьезоэлектричества породило попытки объяснить этим явлением механизм мышечного сокращения (Рентген). Законы растворимости газов в жидкостях вызвали появление исследований по математическим закономерностям, определяющим дыхание клеток, при этом впервые на плазме крови было открыто существование нерастворяющегося пространства (Сеченов). Аррениус делал попытки применить открытые им законы классической кинетики к биологическим явлениям. Большим толчком для развития биофизики послужило возникновение физической химии и теории диссоциации электролитов. Исходя из новых представлений о состоянии ионов в растворах, Нернст построил количественную теорию возбуждения и вывел известный квадратичный закон. Важную роль сыграли работы Леба, создателя большой школы и автора многих исследований по изучению физико-химических механизмов элементарных жизненных процессов (роль мембран и их структуры в жизни клеток, физико-химические основы акта оплодотворения, количественные закономерности в ответных реакциях на внешние воздействия и т. д.). В СССР представителем этой школы был Д. Л. Рубинштейн.

В области биоэнергетики нервной и мышечной деятельности ведущую роль сыграли работы Хила и его учеников. Крупная биофизическая школа была создана в СССР П. П. Лазаревым. Большое значение имели его работы по ионной теории возбуждения и по механизмам цветного

зрения. Характерной особенностью творчества его школы было умение синтезировать физику с физической химией. В основанном им Институте биофизики в Москве проводились работы в различных областях биофизики (в области биомеханики — Шулейкин; квантовых процессов в зрительном акте — Вавилов и Кравков; проницаемости клеток — Ребиндер и т. д.).

Бурное развитие биофизики началось в последнее десятилетие в связи с достижениями физики и физической химии. Толчком к развитию биотермодинамики послужили исследования по термодинамике стационарных необратимых систем. Возникло целое направление по изучению возможности миграции энергии в биологических системах, главной целью которого является выяснение механизмов миграции энергии в белке. Эти механизмы играют большую роль в целом ряде жизненных процессов, например, в передаче лучистой энергии при фотосинтезе от пигмента к месту осуществления химической реакции.

Большое значение приобрело направление, изучающее кинетику молекулярных процессов в биологических системах, мощным стимулом для развития которого послужило применение меченых соединений.

Важной проблемой биофизики остается проблема проницаемости веществ в клетки из внешней среды. В объяснении этих явлений конкурируют теория мембранной проницаемости и теория, базирующаяся на сорбционных механизмах.

Одним из центральных вопросов биофизики является вопрос о механизме нервного возбуждения и мышечного сокращения на основе новых термодинамических представлений.

Широко изучаются новыми методами физико-химические структуры живых клеток и их электрические параметры, проводятся исследования по расшифровке молекулярных механизмов органов чувств. Значительный интерес представляет недавно выдвинутое положение о полупроводниковой природе биологических структур.

Современные достижения электрохимии послужили толчком для изучения природы биоэлектрических потенциалов. Расширяются исследования в области анализа механизмов действия лучистой энергии электромагнитных излучений, ультразвука и т. д.

Одно из центральных мест в биофизике занимает проб-

лема действия ядерных излучений, а именно первичный размен физической энергии на химическую.

Сильный отпечаток на современную биофизику наложило развитие кибернетики и теории информации, так как с помощью математического аппарата этих дисциплин становится возможным анализ процессов, происходящих в центральной нервной системе, а также молекулярных механизмов закрепления наследственных качеств.

По существу биофизика — это физическая химия и химическая физика живой протоплазмы. Однако биологическую физику нельзя полностью отождествлять с физической химией и ставить между ними знак равенства. Хотя биофизике приходится анализировать сущность физико-химических явлений, ее методы и подходы часто значительно отличаются от методов физической химии и приближаются больше к физическим. Задача биофизики и ее конечная цель — ответить на вопрос о сущности физико-химических процессов и их взаимосвязи в сложном комплексе белков, липоидов и электролитов, из которых построена протоплазма и ее органеллы. Биофизика не имеет права и возможности выделять отдельные компоненты этого комплекса, так как всякая попытка разделения приводит к гибели и исчезновению качественных свойств живого вещества. Биофизику приходится работать и делать выводы на системах, которые, с точки зрения физико-химии, являются «грязными» системами. Техника исследований в биофизике сильно ограничивается еще тем, что живая протоплазма очень лабильна.

Методы исследований физико-химической структуры, при которых используется лучистая энергия, электрический ток и т. п., в том виде, в котором они применяются в физической химии, в большинстве случаев оказываются совершенно непригодными для анализа живых систем, так как они влияют на живой субстрат и вызывают в нем физико-химические изменения.

Ряд методов, сыгравших большую роль в изучении молекулярной структуры, оказывается мало пригодным для биологических объектов. Например, рентгеноструктурный анализ, плодотворно применявшийся при изучении структуры органических и неорганических веществ, имеет пока очень ограниченное применение в биологии вследствие того, что протоплазма может функционировать только когда она содержит воду. Наличие воды (рассеивание) не

позволяет получить достаточно четкие дифракционные картины, которые могли бы дать представление о структуре живого вещества. При гибели клеток в протоплазме и ее оргanelлах возникают различные ориентированные структуры в результате развития агрегационных процессов, которые не свойственны живым клеткам. Эта же причина сильно затрудняет интерпретацию картин, которые получаются при помощи электронного микроскопа. В связи с этим биофизике приходится видоизменять физико-химические методы для решения своих задач и заимствовать новые методы у физики. Разработка новых методов исследования в биологии является одной из основных задач биофизики.

ТЕРМОДИНАМИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Живые системы для поддержания своего существования должны производить работу. Работа и выделение тепла осуществляется за счет энергии химических связей. Энергетические превращения, происходящие в живых организмах, так же как и превращения в неживых системах, подчиняются общим законам термодинамики.

Термодинамика определяет основные закономерности процессов обмена энергии и превращения одних ее видов в другие. На основании законов термодинамики можно делать прогнозы в отношении возможности осуществления того или другого процесса и можно определять направление, в котором данный процесс будет развиваться. В то же время классическая термодинамика не определяет скоростей развивающихся энергетических превращений и фактор времени не входит в ее основные уравнения.

Физическая термодинамика изучает закономерности энергетического обмена при физических процессах. Хотя основную роль в энергетике биологических реакций играет химическая термодинамика, однако биологической термодинамике приходится считаться и с наличием физических процессов. Диффузионные процессы при обмене веществ, квантовые процессы при действии лучистой энергии, электрические явления и влияния и т. д. являются в ряде случаев важными звеньями энергетического взаимодействия организмов с внешней средой.

В большинстве случаев биологической термодинамике приходится иметь дело с аппаратом химической термодинамики, которая разбирает механизмы энергетических

превращений при химических и физико-химических процессах.

Весьма существенно то, что энергетические процессы, протекающие в биологических системах, развиваются в гетерогенной среде, отдельные фазы которой формируются высокомолекулярными соединениями.

Первый закон термодинамики — закон превращения и сохранения энергии — устанавливает, что энергия в замкнутой системе не может увеличиваться или уменьшаться, а только может превращаться из одного вида в другой.

$$\Delta U = q - A,$$

где ΔU — изменение энергии системы; под энергией системы понимается общий запас энергии всех видов (химической, тепловой, электрической и т. д.) в данной системе;

q — количество сообщенной системе теплоты;

A — выполненная системой работа.

Следствием первого закона термодинамики является постоянство отношения

$$\frac{A}{q} = \text{const},$$

равное механическому эквиваленту тепла.

Применимость первого принципа термодинамики к организмам неоднократно проверялась опытным путем и обычно не вызывала никаких сомнений.

Первое доказательство этому было представлено в XVIII в. Лавуазье. Он исследовал отношение между энергией, поступающей с пищей, и теплом, которое выделяет живой организм. С помощью калориметрии Лавуазье установил, что количество тепла, которое выделяется организмами, пропорционально количеству выделившейся углекислоты и эквивалентно количеству сжигаемого углерода. Более поздние исследования как его самого, так и других ученых показали, что в его первоначальных расчетах содержался ряд ошибок: в частности не было учтено сжигание водорода, процесс, который играет энергетическую роль в биосистемах. Правильный же суммарный ответ Лавуазье получил потому, что, в силу случайности, ошибки взаимно погасили друг друга.

Для понимания и вычисления валовых балансов процессов, протекающих в сложных условиях и через ряд

реакций большую роль сыграл закон Гесса, установленный им еще до окончательной формулировки принципов классической термодинамики. Согласно этому закону тепловой эффект процесса, развивающегося через ряд последовательных реакций, не зависит от промежуточных стадий, а определяется лишь начальным и конечным состояниями. Тепловой эффект равен сумме теплот сгорания исходных веществ за вычетом суммы теплот сгорания конечных продуктов реакции

$$\Delta H = \sum (\Delta H)_{\text{исх.}} - \sum (\Delta H)_{\text{конечн.}}$$

Закон Гесса сыграл большую роль в развитии биоэнергетики. Однако необходимо учитывать, что он применим к процессам, осуществляющимся за счет химической энергии, при которых U гораздо выше A , и мало применим для тех случаев, когда A больше U , так как величина работы A зависит от пути.

Опыты на животных и растениях достаточно убедительно показали, что общая сумма тепла, выделенного организмами при отсутствии внешней работы, равна тому теплу, которое необходимо затратить для сжигания входящих в состав пищи органических веществ до углекислоты и воды. Совпадение полученных в подобных исследованиях величин значительно; например, в известных опытах Этюотера (Atwater, 1904) на человеке было обнаружено, что при введении с пищей 1879 б. кал выделенное тепло составляло 1859 б. кал. Эти прямые расчеты и определения нуждаются в поправке в тех случаях, когда организмы производят большую работу или накапливают энергию в виде прироста массы (синтез веществ):

$$U = q + M,$$

где M — прирост массы.

Небольшие расхождения, наблюдаемые между количеством заданной химической энергии и энергии отданной, послужили основой для неоднократно высказываемого мнения о том, что потребителем энергии, помимо веществ, претерпевающих энергетические превращения, является основная структура протоплазмы, определяющая основные особенности живых систем. Эта структура лабильна и для ее поддержания необходима непрерывная подача энергии. Делались попытки уловить энергию этой структуры, т. е. определить в абсолютных единицах ту теплоту, которая

выделяется как при естественном отмирании клеток и тканей, так и при действии различных токсических агентов.

Варбургу (Warburg, 1914) не удалось обнаружить выделения дополнительного тепла при разрушении структуры эритроцитов. Ему же не удалось уловить признаков наличия какой-либо «структурной энергии», когда при неизменном энергетическом уровне реакции обмена приостанавливали процесс деления дрожжевых клеток, т. е. приостанавливали структурообразование.

В то же время другой исследователь — Гилл (Hill, 1930) отметил, что при отмирании мышцы происходит выделение тепла в количестве 4 кал на грамм.

В качестве аргумента в пользу того, что структура протоплазмы требует дополнительной энергии, выдвигается следующий факт: гибель клетки, например при действии кислот, сопровождается появлением ориентированных мезокристаллических, а иногда и кристаллических структур. Появление этих структур объясняется тем, что при гибели клетки энергия молекул становится минимальной, и должно происходить выделение энергии. Подобные представления не являются убедительными, так как известно, что при гибели клеток от различных других причин происходит как раз обратное явление — структуры, имеющиеся в клетке, разрушаются (см. гл. 4).

Так же мало убедительны и опыты Гилла, поскольку при длительном процессе отмирания в разных субстратах могут развиваться самые различные реакции экзотермического типа, например окисление свободных липидов.

В литературе ранее неоднократно поднимался вопрос о правомочности применения оценки теплотворной способности различных соединений в калориях на грамм сжигаемого вещества для подведения общего энергетического баланса живых организмов.

Как известно, в изотермических условиях, т. е. в таких условиях, при которых развиваются энергетические превращения у высших организмов, теплота не может переходить в работу и поэтому известная часть энергии должна быть связанной. В энергетическом обмене принимает участие не вся энергия, а только энергия свободная. Поэтому и указывалось, что при биоэнергетических расчетах необходимо учитывать только свободную энергию, а не общую. Однако экспериментальные исследования показали, что величина свободной энергии при биоэнергетических превращениях

очень близка к величине полной энергии и поэтому ошибка в расчетах бывает крайне незначительной. Приблизительное совпадение величин полной и свободной энергии в условиях изотермичности объясняется тем, что работа в организмах осуществляется не за счет энергии тепловых градиентов, а за счет энергии химических градиентов.

Второй закон термодинамики

Вопрос о применимости второго закона термодинамики к биологическим процессам вызывал большие дискуссии. Второй закон термодинамики имеет ряд формулировок. Его основное положение заключается в том, что в закрытых системах реакции могут развиваться только в направлении от более высокого уровня к более низкому. Для того чтобы система производила работу необходимо наличие градиента (теплового, электрического, концентрационного). При соприкосновении концентрированного раствора с разбавленным самопроизвольная диффузия молекул растворенного соединения идет только от более концентрированного в менее концентрированный. Эта диффузия происходит до тех пор, пока не наступит выравнивание концентраций и система не придет в состояние термодинамического равновесия, при котором сумма всех составляющих изменений энтропии равна 0.

$$\sum dS = 0.$$

Системы из неустойчивого состояния стремятся перейти в это устойчивое состояние. Работоспособность системы (P) на пути этого перехода определяется величиной градиента и выражается общим уравнением:

$$P = RT \ln \frac{A_1}{A_2},$$

где A_1 и A_2 — значения, характеризующие концентрационные и другие градиенты. При $A_1 = A_2$ работоспособность равна 0.

В живых клетках, как правило, всегда существуют концентрационные градиенты. В период работы всегда, например, существует ионный концентрационный градиент. Так, концентрация ионов натрия во внешней среде в 25—100 раз превышает его концентрацию внутри клеток, и, наоборот, концентрация ионов калия внутри клеток обычно в 20—100 раз превышает их концентрацию во внешней

среде (см. гл. 3). В живых клетках также всегда существует отрицательный градиент кислорода по отношению к внешней среде (см. гл. 3). Разности электрических потенциалов, возникающие в живых клетках, свидетельствуют о наличии градиентов. При отмирании клеток градиенты уменьшаются. Мертвые клетки отличаются от живых отсутствием градиентов — их внутренняя среда становится вполне идентичной внешней среде. В мертвых клетках отсутствуют концентрационная и электрическая гетерогенность (см. гл. 4).

Перемещение вещества в соответствии с принципами термодинамики возможно только по градиентам. Важнейшую роль при этом играет концентрационный градиент. Так называемое движение против градиента возможно только в тех случаях, когда на существующий градиент накладывается другой, более сильный. Например, движение против концентрационного градиента возможно при наложении электрического градиента обратно направленного (суперпозиция градиентов) по отношению к заряженным электрически ионам или молекулам. Афанасьев (1952) сделал попытку объяснить с позиций стационарного равновесия движение воды против осмотических сил. Он предположил, что при этом возникает дополнительный градиент давления, векторно направленный тургор клеток, поддерживаемый за счет затрат энергии обмена в условиях стационарного равновесия на постоянном уровне.

Разные исследователи неоднократно пытались рассматривать энергетическое поведение клеток и биосистем с точки зрения классических принципов термодинамики. Многие из этих попыток заканчивались тем, что авторы приходили к выводу о неприменимости второго закона термодинамики к биологическим системам. При этом главным аргументом было то, что, в противоположность неживым системам, живые системы способны создавать свободную энергию и накапливать ее в клетках в виде богатых энергией соединений, вопреки второму закону термодинамики.

На заре развития термодинамики известный физик Гельмгольц высказал предположение, что своеобразная структура живого вещества может обеспечить условие, при котором движения молекул в системе, находящейся в равновесии, стали бы упорядоченными. В таком случае система могла бы совершать работу. Подобное положение, конечно, невозможно, так как вероятность наступления таких упорядоченных движений ничтожно мала. Однако значительно

позже, в 40-х годах, этот вопрос снова начал дебатироваться. Вероятность возникновения флуктуаций повышается с уменьшением количества молекул в системе. В связи с тем, что протоплазма клеток построена из высокомолекулярных соединений, было высказано предположение, что в протоплазме могут создаваться статистические отклонения от равновесия, т. е. возникать упорядоченность в тепловом движении белковых молекул. Предполагалось, что эти флуктуационные отклонения от равновесного состояния могут использоваться организмами и давать работу вопреки второму принципу термодинамики. Однако простые расчеты показывают, что даже у высокомолекулярных соединений типа белков вероятность возникновения подобных флуктуаций очень мала. Например, вероятность отклонения в системе, содержащей высокомолекулярные соединения с молекулярным весом около 10^{-6} , выражается величиной порядка 10^{-12} .

Кажущееся несоответствие между вторым законом термодинамики и энергетическим поведением живых систем объясняется тем, что биологические системы являются открытыми системами, обменивающимися с внешней средой не только энергией, но и веществом. Поэтому законы термодинамического равновесия, сформулированные для закрытых систем, где происходит обмен только энергией, но не веществом и для изолированных систем, в которых нет обмена ни энергией, ни веществом, не применимы к биологическим системам.

Открытые системы

Теория открытых систем сыграла большую роль в понимании биоэнергетических процессов, которые трудно объяснить с точки зрения термодинамического равновесия.

Живые системы находятся в неравновесном состоянии. Это состояние поддерживается благодаря непрерывному поступлению свободной энергии из внешней среды. Поэтому в живых системах происходит непрерывное рассеивание энергии

$$\sum dS > 0.$$

Благодаря поступлению свободной энергии, в живых клетках непрерывно поддерживаются различные градиенты, и клетки сохраняют свою работоспособность.