

Введение

Биофизика представляет собой пограничную науку, основанную на положениях и представлениях биологии, физики, физической химии с активным использованием математического аппарата. Это сочетание создает определенные трудности в усвоении основного материала курса «Биофизика», требующего достаточных знаний смежных наук. Многолетняя практика преподавания курса биофизики показывает, что для успешного освоения курса лекционный материал необходимо дополнить практическими занятиями по соответствующим разделам, в которых разъясняются основные теоретические положения биофизики.

В последние годы в связи с развитием биофизики возросла сложность необходимого материала и соответствующих ему задач. Для понимания природы молекулярных механизмов и построения адекватных физических моделей необходимо располагать сведениями о реальных молекулярных свойствах биологического объекта, полученных непосредственно в экспериментах. Именно в этом случае удается связать характеристики первичных молекулярных механизмов с особенностями конкретных биологических процессов, что, собственно, и составляет основную задачу биофизики. Отсюда вытекает принципиальная роль экспериментальных методов в биофизике.

В научных исследованиях используется целый ряд биофизических методов: математическое моделирование, спектроскопия в ультрафиолетовом, видимом и инфракрасном диапазонах, радиоспектроскопия, изучение ионной проницаемости биологических мембран, конфокальная и атомно-силовая микроскопии. Это вызывает необходимость расширить навыки в использовании современных представлений физики, физической химии и математики, а также в применении современных биофизических методов. Настоящее учебное пособие содержит описания практических задач, разработанных для студентов биологических специальностей, и включает примеры применения некоторых биофизических методов на практике. Из большого многообразия биофизических методов был выбран ряд наиболее информативных и неинвазивных методов

исследования биологических объектов. Так, оптическая спектроскопия представлена задачами по хемилюминесценции, быстрой и замедленной флуоресценции, адсорбционной спектроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния, а радиоспектроскопия — задачей по электронному парамагнитному резонансу. Математическое моделирование представлено на примере построения модели внутриклеточных колебаний кальция. Учебное пособие содержит также задачи по атомно-силовой спектроскопии и измерению потенциала возбудимой клетки. Кроме того, традиционные биофизические методы представлены задачами по изотопному анализу и рН-метрии.

Учебное пособие будет полезно для глубокого усвоения материала по курсу «Биофизика» и необходимо для развития биофизического мышления.

1. Модель внутриклеточных колебаний кальция

Л. Д. Тёрлова, Н. Е. Беляева, П. В. Фурсова, Г. Ю. Ризниченко

Теоретическое введение

Колебания в метаболических системах

Биологические системы являются *открытыми* термодинамическими системами — живой организм обменивается с внешней средой материей (веществами) и энергией. Для открытых систем характерны стационарные состояния с постоянными во времени значениями некоторых показателей.

Структура биологических систем неоднородна. Компартменты, характерные для структуры практически каждой биологической системы, — важное свойство строения, обеспечивающее гетерогенность биологических систем¹. Вследствие такого строения многие показатели существования различны в разных точках системы.

Следствием термодинамической открытости и гетерогенности биологических систем является существенная термодинамическая *неравновесность* многих биологических процессов. Отметим, что изолированные системы, изучаемые в термодинамике, самопроизвольно переходят в состояние термодинамического равновесия, когда все интенсивные параметры (например, температура, давление) выравниваются, становятся одинаковыми в пределах выбираемой системы.

В стационарных состояниях систем, находящихся далеко от термодинамического равновесия, уравниваются потоки вещества и энергии, но не происходит выравнивания градиентов.

С термодинамической точки зрения автоколебания возможны только в открытых неравновесных системах. Действительно, в метаболических системах могут проявляться автоколебания, когда концентрации и потоки будут представлять собой периодические

¹ К компартментам можно отнести не только органеллы клетки или органы тела растений и животных, но и любые выделенные в пространстве области, в которых внутренние связи между составляющими намного жестче, чем связи с компонентами из других выделенных областей. По этому принципу можно считать компартментом систему органов или частично изолированные ареалы обитания вида.

функции времени. То, что установившиеся автоколебания определяются свойствами системы, подчеркивается самим термином «автоколебания» (англ. self-sustained oscillations).

Биологические системы невозможно описать как простой объект (шарик, пружину, конденсатор и пр.), модели всегда служат лишь некоторым приближением. Но во многих случаях для выбранной системы можно выделить существенные характеристики и исследовать их динамику.

Например, можно выделить потоки, протекающие в обособленных компартментах или на их границах. Для потоков можно записать дифференциальные уравнения в соответствии с законами химической кинетики. Переменными такой модели процессов могут быть концентрации метаболитов (или определенные состояния сложной биомолекулы). Для анализа полученной модели можно воспользоваться математическим аппаратом качественной теории дифференциальных уравнений.

Существуют достаточно простые способы проведения подобного анализа с целью выявить возможность автоколебаний в метаболической системе. Простой пример потоков для двух интермедиатов (рис. 1.1), участвующих в необратимых реакциях, позволит выявить важные особенности системы метаболитов, в которой могут происходить устойчивые колебания сохранения.

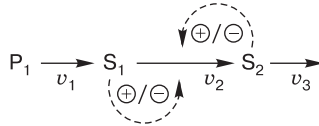


Рис. 1.1. Неразветвленный поток реакций двух метаболитов. P_1 — исходный метаболит; S_1 — метаболит, синтезируемый из P_1 со скоростью v_1 ; аналогично, S_2 — метаболит, синтезируемый из S_1 со скоростью v_2 ; v_1, v_2, v_3 — скорости реакций; направление реакций показано прямыми стрелками. Пунктирные стрелки показывают реакции автокатализа или автоингибирования (см. далее в тексте)

Пример колебаний в простой метаболической системе

На схеме, представленной на рис. 1.1, предполагается, что активность фермента, катализирующего реакцию 2, регулируется аллостерически метаболитами S_1 и/или S_2 , что показано пунктирными линиями. Активация и ингибирование отмечены знаками плюс и минус соответственно. Обратное воздействие метаболита на реакцию создаст петлю обратной связи, зависимость скорости реакции от концентрации метаболита/метаболитов станет нелинейной. Вследствие этого даже в столь простой системе потоков будут возможны устойчивые колебания.

В соответствии с приведенной выше схемой (см. рис. 1.1) система уравнений двух переменных описывает изменения концентраций метаболитов:

$$\begin{cases} \frac{dS_1}{dt} = v_1 - v_2, \\ \frac{dS_2}{dt} = v_2 - v_3. \end{cases} \quad (1)$$

Кинетические особенности реакций на рис. 1.1 позволяют предположить, что $v_1 = \text{const}$,

$$\frac{dv_3}{dS_1} = 0, \quad \frac{dv_2}{dS_1} > 0, \quad \frac{dv_3}{dS_1} > 0. \quad (2)$$

Для исследования свойств системы (1) воспользуемся аппаратом качественной теории дифференциальных уравнений [3, 7].

Поскольку мы ищем условия возникновения периодических колебаний в системе, нам необходимо выяснить характер поведения интегральных кривых, задаваемых системой (1) в окрестности стационарных точек системы.

Для этого мы проводим процедуру линеаризации системы (1): правые части уравнений раскладываем в ряд Тейлора в окрестности каждой стационарной точки. И далее ищем условия возникновения замкнутых траекторий в линеаризованной системе. Согласно теореме Андронова–Хопфа, в окрестности таких стационарных точек в нелинейной системе возможно установление режима автоколебаний.

Итак, коэффициенты линеаризации системы (1) образуют матрицу

$$\left\| \begin{array}{cc} -\frac{dv_2}{dS_1} & -\frac{dv_2}{dS_2} \\ \frac{dv_2}{dS_1} & \left(\frac{dv_2}{dS_2} - \frac{dv_3}{dS_2} \right) \end{array} \right\|, \quad (3)$$

определитель которой Δ записывается согласно (4):

$$\Delta = \frac{dv_2}{dS_1} \frac{dv_3}{dS_2}. \quad (4)$$

Исходя из выполнения условий (2), определитель матрицы линеаризации $\Delta > 0$. Это означает возможность существования в линеаризованной системе стационарных точек типа «узел», «центр» и «фокус»¹. В зависимости от значений параметров системы реали-

¹ Условие $\Delta < 0$ определяет существование стационарной точки по типу «седло» — всегда неустойчивой. Исследование условий возникновения колебаний показало, что при таком типе стационарной точки колебания никогда не возникают.

зуются различные типы устойчивости стационарных точек. Выяснить, устойчива стационарная точка или нет, можно по знаку следа матрицы линеаризации. В данном случае задается выражением (5):

$$\sigma = - \left(\frac{dv_2}{dS_1} - \frac{dv_3}{dS_2} + \frac{dv_2}{dS_2} \right). \quad (5)$$

При анализе выявляются области значений параметров системы, в границах которых система проявляет апериодическое поведение в окрестности особой точки «узел» ($\sigma^2 - 4\Delta > 0$). Напротив, при $\sigma^2 - 4\Delta < 0$ возникают нарастающие (или затухающие) колебания в случае неустойчивой (или устойчивой) особой точки «фокус». В линейной системе переход от устойчивого к неустойчивому «фокусу» происходит через особую точку «центр» ($\sigma = 0$). При таких же значениях параметров в нелинейной системе бифуркация Хопфа приведет к возникновению предельного цикла.

Необходимое нам предположение $\sigma \geq 0$ с учетом условий (2) ведет к требованию:

$$\frac{dv_2}{dS_2} > 0,$$

то есть должна существовать обратная положительная связь (автокатализ) в реакции синтеза метаболита S_2 .

Это важное предположение выполняется, например, при описании реакции v_2 уравнением Михаэлиса–Ментен.

Вывод 1. Наличие положительной обратной связи в реакции по метаболиту S_2

$$\frac{dv_2}{dS_2} > 0$$

служит необходимым условием устойчивых колебаний в системе (1), описывающей реакции по схеме (см. рис. 1.1).

Вывод 2. Периодическое изменение величин представляет собой один из типов стационарного поведения системы.

История исследования колебаний в метаболических системах

Идея, что при неравновесном протекании реакции, когда есть постоянный приток субстрата и/или энергии в систему, могут возникнуть принципиально иные режимы, долго искала дорогу к признанию. И поэтому открытие Б. П. Белоусовым периодической реакции окисления броматом малоновой (лимонной) кислоты в присутствии серной кислоты было встречено не просто с недоверием, а с резким отрицанием. Примерно такой же была реакция на первые статьи И. Р. Пригожина по неравновесной термодинамике.

Вопрос о подчинении законам термодинамики процессов, протекающих в живых объектах, ставился еще Л. Больцманом. Ответ на него появился только в середине XX столетия — безусловно, подчиняются! Но для этих процессов требуется постоянный приток вещества и энергии, то есть они принципиально неравновесны. Значит, нельзя подходить к ним с мерками равновесной термодинамики. До полного понимания тонкостей неравновесных процессов еще очень далеко. В настоящее время мы научились описывать только процессы, происходящие в окрестности состояния термодинамического равновесия.

В математике были разработаны методы, позволяющие исследовать колебательные процессы, была показана возможность существования автоколебательных процессов и сформулированы математические требования, которым должны удовлетворять такие системы. Огромный вклад в разработку математической теории колебаний внесли математики французской (А. Пуанкаре, А. Лотка) и русской школы (прежде всего это физики и математики под руководством А. А. Андропова и Л. И. Мандельштама). Далее Д. А. Франк-Каменецким и его тогда еще аспирантом И. Е. Сальниковым были описаны процессы, происходящие в реакторах, где также наблюдались колебательные режимы. С конца 50-х гг. XX столетия в печати начали появляться статьи, описывающие автоколебательные процессы, наблюдаемые в биологических системах, в основном относящихся к области биохимии и популяционной экологии.

Одна из первых работ, посвященных колебательным явлениям, принадлежит американскому биохимику Б. Чансу. Он исследовал процесс гликолиза. Как известно, процесс гликолиза проходит в несколько стадий. Колебания реагентов обнаружены в центральной стадии (превращение фруктозо-6-фосфата во фруктозо-1,6-бифосфат), катализируемой ферментом фосфофруктокиназой.

Как известно, в процессе гликолиза происходит синтез АТФ. Следовательно, в ходе реакции должны наблюдаться колебания в синтезе АТФ. Колебания, наблюдающиеся в ходе этой реакции, имеют период около минуты.

Далее были обнаружены колебания в различных процессах, связанных с синтезом и гидролизом АТФ. Были найдены колебательные явления в гепатоцитах, в процессах, связанных с сигнальными системами, прежде всего зависимых от кальция [1, 2, 6].

Ca²⁺-зависимые метаболические системы

Универсальная и широко распространенная регуляторная система связана с ионами Ca²⁺. Ионы кальция образуют плохо растворимые

комплексы с фосфатами, которых много в клетке по причине их участия в образовании и накоплении богатых энергией соединений. Существование в цитоплазме фосфатов и Ca^{2+} в высокой концентрации привело бы к выпадению в осадок солей фосфата кальция и парализовало бы деятельность клетки. Клеткой были созданы специальные транспортные системы, обеспечивающие удаление Ca^{2+} из цитоплазмы.

В состоянии покоя концентрация Ca^{2+} в цитоплазме очень мала, и любое увеличение концентрации воспринимается клеткой как сильный сигнал (концентрация ионов кальция в цитоплазме составляет примерно 50–100 нМ, в межклеточном пространстве — примерно 3 мМ) [1, 2, 4, 5, 6].

Системы, удаляющие Ca^{2+} из цитоплазмы и поддерживающие низкий уровень этих ионов в состоянии покоя, встроены в мембраны. В наружной плазматической мембране расположена Ca^{2+} -АТФаза — насос, выкачивающий Ca^{2+} против осмотического потенциала кальция из клетки во внешнюю среду за счет гидролиза АТФ, — и специальный $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник, который в зависимости от условий может обменивать внутриклеточный кальций на внеклеточный.

На мембранах эндоплазматического ретикулума (ЭР) расположена Ca^{2+} -АТФаза, которая за счет гидролиза АТФ перемещает Ca^{2+} из цитоплазмы в цистерны ЭР. Кроме того, в митохондриях также находится специальная транспортная система, перемещающая кальций из цитоплазмы в матрикс. Предполагается, что на основе систем, выводящих ионы кальция из клетки и контролирующих их концентрацию внутри клетки, появились кальций-зависимые сигнальные системы.

Гормонально-зависимая система транспорта ионов кальция в клетках

При связывании определенных гормонов с рецепторами на поверхности клетки активируется путь регуляции поступления в клетку ионов Ca^{2+} посредством инозитол-1,4,5-трифосфата (IP_3). Данные о потоках кальция в компартментах клетки, которые участвуют в формировании IP_3 -зависимых процессов, приведены на рис. 1.2.

В исследованиях часто используют Ca^{2+} -чувствительные флуоресцентные индикаторы для наблюдения за цитоплазматическим Ca^{2+} после IP_3 -активации. Всплески Ca^{2+} отражают локальное открывание в ЭР отдельных Ca^{2+} -каналов или их небольших групп, когда IP_3 связывается с рецептором на мембране ЭР.

Поскольку различные Ca^{2+} -связывающие белки служат буфером и ограничивают диффузию Ca^{2+} , сигнал часто остается локализо-

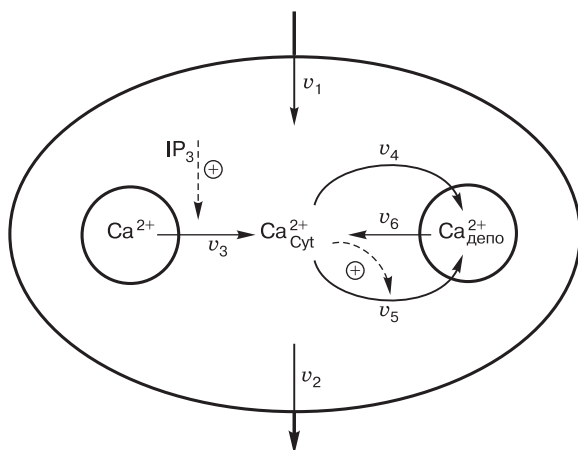


Рис. 1.2. Схема IP_3 -зависимых потоков ионов Ca^{2+} в клетке. Обобщение данных, показанных на рис. 1.3, для формирования минимальной модели потоков ионов кальция. Обозначения метаболитов и скоростей см. в тексте. По [1]

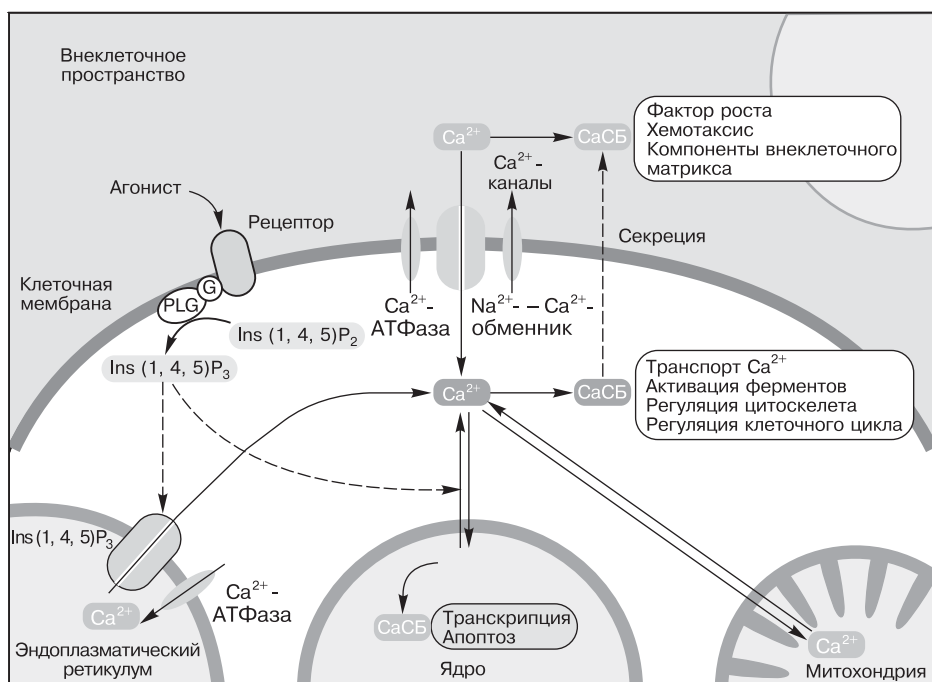


Рис. 1.3. Участие Ca^{2+} -связывающих белков при передаче сигнала в клетке [4]. $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ — инозитол-1,4,5-трифосфат (далее в тексте IP_3); $\text{PtdIns}(1, 4, 5)\text{P}_2$ — фосфатидилинозитол (4,5) дифосфат; CaSB — кальций-связывающие белки. По [4, 5]

ванным в месте входа Ca^{2+} в цитозоль. Однако, если внеклеточный сигнал достаточно сильный и продолжительный, этот локальный сигнал Ca^{2+} может распространяться по цитозолю как самоподдерживающаяся волна Ca^{2+} . Колебания Ca^{2+} могут продолжаться столько времени, сколько рецепторы на поверхности клетки остаются активированными. Считается, что, по крайней мере частично, волны и колебания зависят от сочетания положительных и отрицательных обратных связей между кальцием и IP_3 -рецепторами и риадиноновыми рецепторами. Высвобождаемый Ca^{2+} сначала стимулирует дальнейшее выделение Ca^{2+} обоими типами рецепторов в процессе, носящем название Ca^{2+} -индуцированного высвобождения кальция, но затем, как только его концентрация становится высокой, Ca^{2+} ингибирует высвобождение, и такая отрицательная обратная связь с задержкой приводит к колебаниям.

Модель гормональной регуляции потоков ионов кальция в клетке

Минимальная модель потоков ионов Ca^{2+} в клетке оперирует двумя переменными: S_1 для кальция в цитозоле и S_2 в гормон-нечувствительном депо (гормон-нечувствительном пуле). На рис. 1.2 концентрациям S_1 и S_2 соответствуют обозначения $\text{Ca}_{\text{Cyt}}^{2+}$ и $\text{Ca}_{\text{депо}}^{2+}$.

Модель включает IP_3 -зависимые потоки ионов Ca^{2+} на границах компартментов, показанных выше на рис. 1.2: внеклеточная среда, цитозоль клетки, гормон-чувствительный ЭР и депо гормон-нечувствительного ЭР. В модели этим потокам сопоставлены скорости, формирующие баланс метаболитов S_1 и S_2 .

1. Приток и отток цитозольного кальция через плазматическую мембрану со скоростями v_1 и v_2 соответственно.
2. Гормонально активируемое высвобождение кальция из внутриклеточного пула, чувствительного к гормону (v_3).
3. Активный транспорт цитозольного кальция в гормон-нечувствительный пул (v_4).
4. Высвобождение кальция из гормонально-нечувствительного пула, которое активируется цитоплазматическим кальцием (механизм Ca^{2+} -индуцированного высвобождения кальция, скорость v_5).
5. Свободный отток кальция из гормон-нечувствительного пула в цитозоль (v_6).

Модель состоит из двух дифференциальных уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dS_1}{dt} = v_1 - v_2 + v_3 - v_4 + v_5 + v_6, \\ \frac{dS_2}{dt} = v_4 - v_5 - v_6. \end{cases} \quad (6)$$

Внеклеточная концентрация Ca^{2+} значительно превышает цитозольную и полагается постоянной (буфер). Поэтому скорость потока v_1 неизменна. Более того, подробное рассмотрение системы (6) позволяет считать скорость v_3 постоянной и объединить эти две скорости в модели $v_0 = v_1 + v_3$. Скорость v_3 постоянна по причине быстрого заполнения кальцием гормонально-чувствительного депо ЭР. К тому же эта скорость зависит только от величины IP_3 -стимула в системе. Поэтому далее в исследовании модели скорость v_0 можно принимать за параметр (интенсивность стимула), определяемый условиями эксперимента по стимулированию клетки.

$$\begin{cases} \frac{dS_1}{dt} = v_0 - v_2 - v_4 + v_5 + v_6, \\ \frac{dS_2}{dt} = v_4 - v_5 - v_6. \end{cases} \quad (7)$$

Рассмотрим детальные механизмы всех скоростей модели (7), используя для них достаточно простые предположения, как показано в табл. 1.1.

Таблица 1.1

Механизмы скоростей, предлагаемые для схемы процессов на рис. 1.2

Скорость	Механизм	Процессы, от которых зависит v_i
v_0	$v_1 + v_3$	Потоки кальция в цитоплазму в ответ на стимул
v_2	$k_2 S_1$	Процессы, протекающие с затратой энергии, — активное удаление кальция из цитоплазмы за счет гидролиза АТФ. Ca^{2+} -АТФаза за счет гидролиза АТФ перемещает ионы кальция против осмотического потенциала из цитоплазмы в межклеточное пространство (v_2) или в нечувствительное к гормону депо (v_4), например ЭР. В эти же потоки включен пассивный отток кальция из цитоплазмы
v_4	$k_4 S_1$	
v_5	$\frac{k_2 S_2 S_1^n}{K_{0,5} + S^n}$	Уравнение Хилла. $K_{0,5}$ — константа полунасыщения скорости по механизму Михаэлиса–Ментен, n — коэффициент Хилла
v_6	$k_6 S_2$	Пассивный поток кальция в цитоплазму через мембрану ЭР или клеточную мембрану

После подстановки выражений для скоростей v_i получим систему (8) для математической модели внутриклеточных колебаний концентраций кальция.

$$\begin{cases} \frac{dS_1}{dt} = v_0 - k_2 S_1 - k_4 S_1 + \frac{k_5 S_2 S_1^n}{K_{0,5}^n + S_1^n} - k_6 S_2, \\ \frac{dS_2}{dt} = v_4 - \frac{k_5 S_2 S_1^n}{K_{0,5}^n + S_1^n} - v_6. \end{cases} \quad (8)$$

С помощью модели (8) можно исследовать поведение системы потоков кальция в зависимости от величины параметра v_0 (суммарного поступления кальция через плазматическую мембрану и гормонально активируемого высвобождения кальция из внутриклеточного пула). Окончательно существование устойчивых колебаний подтверждается численным интегрированием системы уравнений при условии выбора параметров из диапазона $\sigma > 0$.

Исследуем систему двух дифференциальных уравнений (8) в общем виде, не детализируя зависимости скоростей v_i от концентраций S_1 и S_2 .

Разумно считать, что скорости v_2 и v_4 двух $\text{Ca}^{2+}/\text{АТФ}$ -зависимых насосов активируются цитозольным кальцием (то есть зависят от концентрации S_1), в то время как они не зависят от концентрации запасенного кальция S_2 . С математической точки зрения это означает, что

$$\begin{aligned} \frac{dv_2}{dS_1} > 0, \quad \frac{dv_4}{dS_1} > 0, \\ \frac{dv_2}{dS_2} = 0, \quad \frac{dv_4}{dS_2} = 0. \end{aligned} \quad (9)$$

Для скорости пассивного потока v_6 можно считать, что

$$\frac{dv_6}{dS_1} = 0, \quad \frac{dv_6}{dS_2} > 0. \quad (10)$$

Формально пассивное поступление кальция в гормонально-нечувствительный пул можно учесть в потоке v_4 .

В стационарном состоянии распределение скоростей реакций для системы (7):

$$\begin{cases} v_0 = v_2, \\ v_4 = v_5 + v_6. \end{cases}$$

Тип особой точки определяем исходя из коэффициентов линеаризованной системы:

$$\begin{bmatrix} \frac{dP}{dS_1} & \frac{dP}{dS_2} \\ \frac{dQ}{dS_1} & \frac{dQ}{dS_2} \end{bmatrix},$$

где P и Q — правые части уравнений системы (7). С учетом соотношений (9) и (10) получаем:

$$\begin{aligned} \frac{dP}{dS_1} &= -\frac{dv_2}{dS_1} - \frac{dv_4}{dS_1} - \frac{dv_5}{dS_1}, \\ \frac{dP}{dS_2} &= \frac{dv_5}{dS_2} + \frac{dv_6}{dS_2}, \\ \frac{dQ}{dS_1} &= \frac{dv_4}{dS_1} - \frac{dv_5}{dS_1}, \\ \frac{dQ}{dS_2} &= -\frac{dv_5}{dS_2} - \frac{dv_6}{dS_2}. \end{aligned}$$

Таким образом,

$$\begin{aligned} \sigma &= -\left(\frac{dv_2}{dS_1} + \frac{dv_4}{dS_1} + \frac{dv_5}{dS_2} + \frac{dv_6}{dS_2}\right) + \frac{dv_5}{dS_1}, \\ \Delta &= \frac{dv_2}{dS_1} \left(\frac{dv_5}{dS_2} + \frac{dv_6}{dS_2}\right). \end{aligned}$$

Поскольку нас интересует ситуация, когда в системе происходят автоколебания (то есть существует предельный цикл), выпишем необходимые условия: $\sigma > 0$ и σ меняет знак. Поскольку в наших предположениях

$$\frac{dv_2}{dS_1} > 0,$$

$\sigma > 0$ всегда, и необходимым условием бифуркации Хопфа служит неравенство $\sigma \geq 0$. А это означает, что:

$$\frac{dv_5}{dS_2} + \frac{dv_6}{dS_2} > 0.$$

Далее, для того чтобы σ меняла знак, необходимо выполнение неравенства:

$$\frac{dv_5}{dS_1} > 0.$$

[. . .]