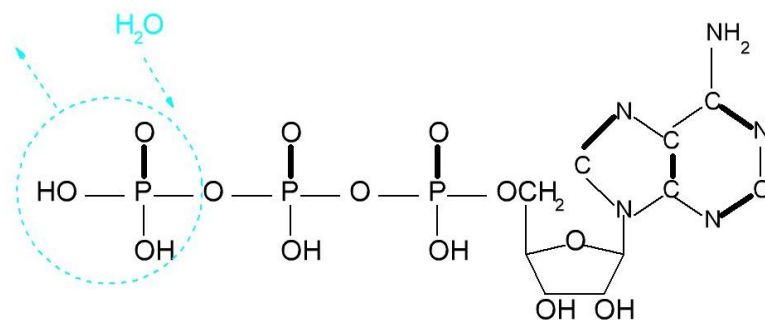


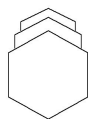
Химикотехнологичен и металургичен университет  
София

*Лекции*  
*и лабораторни*  
*упражнения по*  
**БИОФИЗИКА**

С. Недев, В. Лилова, Е. Лилев



катедра "ФИЗИКА"



<<<<<<< >>>>>>>

Материалите от физични основи на биофизиката: молекулна биофизика, физика на мембраните, биофизични методи на изследване, моделиране на биологичните процеси са в помощ на студентите от ХТМУ, София изучаващи биофизика. Лекциите са написани от доц. Недев; упражнения 1, 2 и 6 от доц. Ваня Лилова; 3, 7 и 8 от доц. Недев; 4 и 5 от доц. Емил Лилев.

доц. Светлозар Недев  
E-mail: nedev@uctm.edu

# BIOPHYSICS

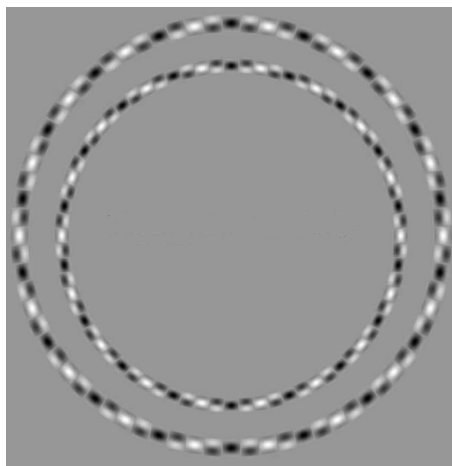
*Lectures and laboratory exercises*

by

*S. Nedev, V. Lilova, E. Lilov*

Department of Physics

UCTM, Sofia



# Съдържание

<b>I</b>	<b>Лекции</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Физични основи на биофизиката</b>	<b>2</b>
1.1	Място на физиката в естествознанието . . . . .	2
1.1.1	Физика и биология . . . . .	3
1.1.2	Физика и псевдонаука . . . . .	5
1.2	Място на биофизиката в естествознанието . . . . .	6
1.2.1	Жива и нежива природа . . . . .	7
1.2.2	Раздели и методи на биофизиката . . . . .	8
1.3	Основни направления в биотехнологиите . . . . .	9
1.3.1	Медицински биотехнологии . . . . .	9
1.3.2	Агробиотехнологии . . . . .	11
1.3.3	Екологически биотехнологии . . . . .	12
<b>2</b>	<b>Термодинамика на биологичните системи</b>	<b>13</b>
2.1	Класическа термодинамика . . . . .	13
2.1.1	Термодинамични системи и процеси . . . . .	13
2.1.2	Принципи на термодинамиката . . . . .	15
2.1.3	Термодинамични функции . . . . .	16
2.1.4	Уравнение за състоянието - идеален и реален газ . . . . .	18
2.2	Статистическа термодинамика . . . . .	19
2.2.1	Статистическа същност на ентропията . . . . .	20
2.3	Термодинамика на необратимите процеси в биологичните системи . . . . .	21
2.3.1	Принцип на Пригожин . . . . .	23
2.3.2	Трансформация на енергията в живите системи . . . . .	23
2.3.3	Дневен енергиен разход на човек . . . . .	24
<b>3</b>	<b>Физика на макромолекулите</b>	<b>26</b>
3.1	Строеж и свойства на биополимерите . . . . .	26
3.1.1	Полимери и биополимери . . . . .	26
3.1.2	Състояния на полимерите . . . . .	27
3.2	Еластичност на полимерите . . . . .	28
3.2.1	Ентропия на полимерна верига . . . . .	30
3.2.2	Ентропия на полимерна мрежа . . . . .	33
3.3	Вискозоеластичност . . . . .	35
3.3.1	Модел на рептацииите . . . . .	36
3.4	Взаимодействия между звената на макромолекулите . . . . .	36
3.5	Разтваряне на биополимерите . . . . .	39
3.5.1	Добър разтворител, лош разтворител, $\Theta$ -условия . . . . .	39
3.5.2	Бухване на полимерното кълбо в добър разтворител . . . . .	40
3.6	Полимерни кълба и глобули . . . . .	42
3.6.1	Фазови преходи в белтъците . . . . .	44
3.7	Осмотично налягане . . . . .	45

3.7.1	Осмотично налягане на полимерния разтвор . . . . .	45
3.7.2	Осмотично налягане при животни и растения . . . . .	46
3.8	Дифузия . . . . .	47
3.8.1	Брауново движение и дифузия . . . . .	48
<b>4</b>	<b>Физика на белтъците</b>	<b>49</b>
4.1	Строеж на белтъците . . . . .	49
4.1.1	Първична структура . . . . .	49
4.1.2	Вторична структура . . . . .	51
4.1.3	Третична и надмолекулна структура . . . . .	53
4.1.4	Четвъртична структура . . . . .	55
4.1.5	Моделиране на формата на макромолекули . . . . .	55
4.1.6	Къдренето на коса - пример за биохимична технология . . .	56
4.1.7	Хидрофобните взаимодействия и структурата на белтъците .	57
4.1.8	Влияние на разтворителя и температурата на разтворимост- та на белтъка . . . . .	59
4.2	Функции на белтъците . . . . .	59
4.3	Строеж на ДНК и РНК и синтез на белтъците . . . . .	63
4.3.1	Сгъване на белтъците . . . . .	66
4.3.2	Генна експресия на примера на бактерията Ешерихия коли .	68
4.3.3	ДНК анализ . . . . .	70
4.4	Таблица на аминокиселините . . . . .	74
<b>5</b>	<b>Физика на ензимите</b>	<b>76</b>
5.1	Основни понятия на химичната кинетика . . . . .	76
5.2	Кинетика на ензимните реакции . . . . .	77
5.2.1	Схема на Михаелис - Ментен . . . . .	77
5.2.2	Конкурентно и неконкурентно инхибиране . . . . .	79
5.2.3	Приложение на модела на Михаелис - Ментен при фотосин- тезата . . . . .	81
5.2.4	Приложение на модела на Михаелис - Ментен при фотораз- граждане на метиленово синьо . . . . .	81
5.2.5	Реакция с два еднакви центрове на активация . . . . .	82
5.3	Конформационни свойства на ензимите . . . . .	83
<b>6</b>	<b>Физика на мембраните</b>	<b>86</b>
6.1	Мембрани и клетки . . . . .	86
6.2	Устройство на мембраните . . . . .	88
6.3	Изкуствени мембранни структури . . . . .	90
6.4	Повърхностно напрежение на монослой . . . . .	92
6.5	Фазови преходи в мембраните . . . . .	93
6.6	Мембранен транспорт . . . . .	95
6.7	Електропроводимост на клетки и тъкани . . . . .	96
6.8	Електрокинетични явления . . . . .	98

<b>7</b>	<b>Биофизични методи за изследване</b>	<b>102</b>
7.1	Методи за изследване на макромолекулите в разтвори . . . . .	102
7.1.1	Ултразетрофугиране . . . . .	102
7.1.2	Измерване на вискозитета . . . . .	105
7.1.3	Електрофореза . . . . .	105
7.2	Спектроскопски методи за изследване . . . . .	107
7.2.1	Видове спектрометри . . . . .	108
7.2.2	ATR FTIR спектроскопия . . . . .	109
7.2.3	Луминисценция . . . . .	111
7.2.4	Импулсна спектроскопия . . . . .	112
7.2.5	Пулсова оксиметрия - измерване на насищането на кръвта с кислород . . . . .	114
7.2.6	Електронен парамагнитен резонанс . . . . .	116
7.2.7	Ядрен магнитен резонанс . . . . .	118
7.2.8	Позитронен томограф . . . . .	120
7.2.9	Мъосбауерова спектроскопия . . . . .	122
7.2.10	Масспектрометрия . . . . .	122
7.2.11	Метод на двойно маркираната вода . . . . .	124
7.3	Използване на рентгенови лъчи . . . . .	125
7.3.1	Рентгеноструктурен анализ . . . . .	125
7.3.2	Приложение на рентгеновите лъчи в медицината . . . . .	127
7.4	Микроскопски методи за изследване . . . . .	130
7.4.1	Оптичен микроскоп . . . . .	130
7.4.2	Трасмисионен електронен микроскоп . . . . .	131
7.4.3	Сканиращ електронен микроскоп . . . . .	132
7.4.4	Атомно силов микроскоп . . . . .	133
7.5	Използване на SQUID устройства на принципа на квантовата ин- терференция . . . . .	134
7.6	Биофизични методи за екологичен мониторинг . . . . .	136
7.6.1	Флуоресценция на хлорофила . . . . .	137
7.6.2	Забавена флуоресценция . . . . .	140
7.7	Биосензори . . . . .	141
<b>8</b>	<b>Моделиране на биологическите процеси</b>	<b>143</b>
8.1	Системи, структури, самоорганизация . . . . .	143
8.1.1	Дисипативни системи . . . . .	144
8.1.2	Автовълнови процеси . . . . .	145
8.2	Математически основи на динамиката на нелинейните процеси . . .	147
8.2.1	Основни типове особенни точки . . . . .	147
8.3	Моделиране на сгъването на белтъци с метода на молекулната ди- намика . . . . .	148
8.4	Моделиране на окраската на животни . . . . .	150
8.5	Някои прости модели . . . . .	152
8.5.1	Модел на Малтус . . . . .	152
8.5.2	Модел на Фертхюлст . . . . .	152
8.5.3	Модел на Лотка-Волгера . . . . .	153
8.5.4	Фармакокинетичен модел . . . . .	154

---

8.5.5	Модел на Кермак–Маккендрик (SIR модел) . . . . .	155
8.5.6	SEIR модел на епидемията от коронавируса в България . . . . .	156
<b>II</b>	<b>Упражнения</b>	<b>158</b>
1.1	Определяне на динамичния вискозитет на течности по метода на Оствалд . . . . .	159
1.2	Изследване на зависимостта на коефициента на повърхностното напрежение от температурата . . . . .	162
1.3	Изследване на дифузията на капка туш във вода с използване на компютър и WEB камера . . . . .	165
1.4	Определяне на йонната подвижност чрез електрофореза . . . . .	169
1.5	Влияние на температурата върху активността на катализата на клетки от дрожди . . . . .	171
1.6	Въртене на равнината на поляризация на светлината. Наблюдение на конформационните преходи $\alpha$ -спирала - статистическо кълбо . . . . .	175
1.7	Определяне на осмотичното налягане на клетките в картоф . . . . .	177
1.8	Определяне на клетъчното налягане чрез рефрактометър на Абе . . . . .	180
	<b>Библиография</b>	<b>183</b>
	<b>Предметен указател</b>	<b>185</b>

---

Часть I  
Лекции

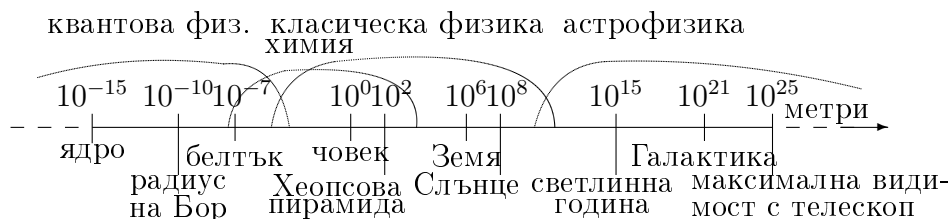
# Глава 1

## Физични основи на биофизиката

### 1.1 Място на физиката в естествознанието

Най общо естествознанието можем да определим като съвкупността от науките за природата. Тази дефиниция е твърде обща - например човешкото общество е част от природата, но науките които се занимават с изучаването на различни аспекти от него като история, икономика, социология, право, не се причисляват към естествознанието, така че тази дефиниция се нуждае от уточняване. Най-кратко различието може да изяснено чрез отношението на съответната наука към думата "закон". В единия случай законите, които изучава съответната наука са напълно независими от човека и не могат да се променят по никакъв начин (например закона за земното притегляне), докато в другия случай те могат да се променят (например закона за движение по пътищата).

Физиката е наука, изучаваща строежа и свойствата на материята. Тази дефиниция отново е твърде обща. Тя отъждествява физиката с цялото естествознание. Такава е била ситуацията по времето на Аристотел. В последствие настъпва диференциация - развиват се различни естествени науки имащи свои обекти и методи на изследване. Например химията изучава, използвайки методите на анализ и синтез, химическите реакции и превръщането на веществата. Физиката обаче образува теоретичната основа на химията. Химическата връзка и процесите протичащи в химичните реакции са физични процеси, които могат да бъдат обяснени от законите на квантовата и статистическата механика, които са дялове от физиката. Проблемът за редукцията т.е. сводимостта на една наука към друга е сложен философски въпрос, по който още се спори. В някои случаи нещата са ясни – теоретичната химия се свежда към физиката. Ние знаем, че физиката дава принципна възможност да се изчислят величините характеризиращи строежа и реакционната способност на сложните молекули. По-просто и бързо е обаче това да се направи с методите на химията.



Фигура 1.1: Размери в природата.

По такъв начин, физиката създава теоретичните основи на съвременното естествознание. С това не се отменя самостоятелността на различните естествени науки – те получават по - дълбока и единна основа.



Развитието на физичните теории е преминало през най-много етапи, затова историята на физиката служи като пример за развитието на другите науки. Физиката се състои от различни дялове отговарящи на различни аспекти на природата. Ние ще се спрем само на тези, които имат понастоящем приложение в биофизиката. На фиг.1.1 по оста  $x$  в логаритмичен мащаб са нанесени полженията, които заемат някои обекти в зависимост от размерите им. В зависимост от големината на обектите, които изучава, физиката се дели на:

- квантова физика – изучава микрочастиците;
- класическа физика – изучава макроскопичните тела.

В зависимост от скоростта на телата физиката се дели на:

- нерелативистка физика – описва движението на тела с малки скорости;
- релативистка физика – описва движението на тела със скорости близки до скоростта на светлината.

На фиг.1.1 двата края – на най-малкия и на най-големия наблюдаван размер се изучават от различни дялове на физиката, но помежду им има много общо – оказва се, че свойствата на микросвета определят свойствата на едро мащабните обекти във вселената, а изучаването на последните може да ни помогне да разберем свойствата на микрочастиците и тяхните взаимодействия.

Размерите на биологичните обекти са в интервала от нанометри до десетки метри, а разглеждайки биосферата като цяло размерите стават астрономически, затова при тяхното изучаване е необходимо да се използва както класическа, така и квантова физика. Скоростта им обаче е малка, затова биофизиката е нерелативистка.

Физиката е естествената наука, която понастоящем е получила най-голямо развитие За това има различни причини :

- фундаменталните физичните закони са прости;
- физичните обекти са постоянни, а явленията лесно възпроизведими, поради което се поддават на детайлно изучаване;
- резултатите от физичните изследвания намират бързо приложение в стопанската дейност на хората, което способства за финансирането им.

### 1.1.1 Физика и биология

В историята на физиката не веднъж се е случвало тя да достигне до границите на своята приложимост, които се преодоляват с построяването на нова теория. *A priori* не е изключено биофизиката да предизвика преразглеждане на някои положения във физиката – такъв случай вече е имало – Майер (по професия лекар) е стигнал независимо от Джаул до формулировката на закона за запазване на енергията при наблюдения над свои пациенти. Той е забелязал, че венозната кръв е по-ярка на цвят, при хора живеещи в тропиците, отколкото при хора живеещи в Европа. Майер е решил, че това се дължи на разликата между температурите

на околната среда и на човешкото тяло. Размишлявайки над този въпрос той е стигнал до идеята за способността на "силите на природата" да се превръщат една в друга.

През 1943г. един от основателите на квантовата механика Ервин Шрьодингер написва книгата "Какво е живота от гледна точка на физиката", която оказва голямо влияние на развитието на биофизиката и молекулната биология. В нея той разглежда пробема за съществуването на живите същества от гледна точка на основните физични принципи. На пръв поглед съществува противоречие между *втория закон на термодинамиката*, според който всяка изолирана система се стреми към състояние с максимална *ентропия*, т.е. засилва се безпорядъкът в системата, и биологичната еволюция, развиваща се от простото към сложното. Шрьодингер определил организмите като "хранещи се с отрицателна ентропия". Това означава, че организмите не са изолирани, а открити системи осигуряващи си намаляване на ентропията за сметка на околната среда. Другият проблем посочен от Шрьодингер е за структурта на организмите. Според него те са *апериодични кристали* т.е. високоподредени системи, аналогично на кристалите, но лишена от периодичността им. Това понятие е важно при разглеждане на живота от гледна точка на теорията на информацията.

Третият проблем е формулиран от Шрьодингер кратко по следния начин: защо атомите са малки? Разбира се въпросът е за размера на живите организми, има се предвид защо те имат макроскопични размери, т.е. изградени са от голям брой атоми – например най-малката бактериална клетка *Mycoplasma laidlawii* има  $10^9$  атома. Въпросът е свързан с проблема за мутагенеза. Според квантовата механика поведението на микрочастиците има по принцип непредсказуем вероятностен характер, ако размерите на един организъм биха били твърде малки, структурата му би се разрушавала от флуктуациите.

Книгата на Шрьодингер е повлияла на британският физик Франсис Крик, един от създателите на модела на ДНК. Допаднала му идеята, че носителите на наследствена информация, трябва да бъдат "едномерни апериодични кристали" - биологични полимери, състоящи се от различни мономери. По това време са получени сериозни доказателства, че ДНК е свързана с наследствеността – известно е било, че ако мъртви бактерии се добавят към културата от живи, те придобиват някои качества, характерни за мъртвите. Първоначално се е предполагало, че белтъците са отговорни за предаването на наследствени свойства, но скоро се е установило, че ДНК на бактериите предизвиква този ефект.

Пример за преразглеждане на физична теория под влиянието на биологията и геологията е спорът за възрастта на Земята възникнал в края на 19 век, когато Келвин на базата на термодинамични пресмятания, я оценява между 20 и 400 милиона години, което противоречи на на геологичните представи и на Дарвиновата теория, според които тази възраст е милиарди години. Същата оценка той е получил за възрастта на Слънцето, като е предположил, че енергията му на излъчване е резултат на гравитационното свиване. В началото на 20 век с откритието, че радиоактивните вещества отделят топлина е станало ясно, че има допълнителен източник на топлина, неотчетен в сметките на лорд Келвин. Финална точка в дискусиата слага теорията за термоядрения синтез, която обяснява природата на Слънцето с минимум предположения, като същевременно е в съответствие с оценките за възрастта на Земята с помощта на геоложки методи и

методите на радиоизотопното датиране.

Съвкупността от явления разглеждани в биофизиката понастоящем не показват никакъв намек за неприложимост на законите на физиката и необходимост от преразглеждане на някои закони. Напротив, развитието на биофизиката като част от съвременната физика свидетелства за нейните неограничени възможности. Разбира се в този процес и физиката се обогатява с нови представи, но нейните закони не се променят.

### 1.1.2 Физика и псевдонаука

Големият успех на физиката е породил желанието физичните понятия да се използват за обясняване на всички явления в природата, без обаче да се обръща внимание, че физичната терминология е точно дефинирана и използването ѝ извън дефиниционната ѝ област е некоректно. Например основните понятия във физиката *работа* и *енергия* имат точно количествено определение и се различават по смисъл от житейската представа за работа и вестникарската за енергия. Особено се спекулира с понятието *поле*. Полето е функция (скаларна, векторна, тензорна и пр.) дефинирана във всяка точка на пространството и времето. Физическото съдържание, което се влага в тази математическа дефиниция е сложно и е свързано с понятието за частица. Връзката между тези две основни понятия се изяснява в квантовата теория на полето.

Съвършено неясно е какво съдържание се влага в понятието *биополе*. Вероятно това е просто под влияние на голямата употреба на термина поле във физиката. Ако бяха живели през XVIII век, хората, които говорят за биополе сега, тогава биха говорили за *биофлуид*. Просто тогава парадигмата е била всяко явление в природата да се обяснява с действието на специален флуид: топлината това е проява на топлорода, горенето – на флогистона, светлината – на етера, и др. подобни.

За илюстрация на разликата между научния метод и псевдонаучния ще приведем един откъс от книгата на Ерик Роджърс „Физика за любознателни“. Разговорът се води между Вас – съвременен човек и Фауст по въпроса за природата на триенето. Фауст твърди, че търкалящото се топче спира поради действието на демони върху него:

Вие: Аз не вярвам в демони.

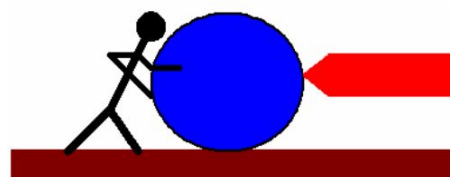
Фауст: А аз вярвам.

Вие: Аз не мога да си представя как демоните могат да създадат триене.

Фауст: Те просто застават пред предметите (фиг.1.2) и им пречат да се движат.

Вие: Но аз не мога да ги видя даже на грапава повърхност.

Фауст: Те са много малки и прозрачни.



Фигура 1.2: Сила на триене според Фауст.

Вие: На грапава повърхност триенето е по-голямо.

Фауст: Там има повече демони.

Вие: Маслото намалява триенето.

Фауст: Да, защото демоните се давят в него.

Вие: Ако полираме повърхността триенето се намалява.

Фауст: Защото демоните намаляват.

Вие: По-тежко топче изпитва по-голямо триене.

Фауст: Защото то натиска повече, чупи костите на демоните и те му оказват по-голямо съпротивление.

Вие: Ако поставя книга на масата и я бутам леко, тя няма да се помръдне докато не натисна по-силно.

Фауст: Демоните ви пречат да движите книгата, но тяхната сила е ограничена.

И т.н. на всеки ваш нов довод Фауст ще припише ново свойство на демоните. За да обясним явлението триене не достатъчно само да му дадем име и да опишем свойствата му. Ние трябва да го свържем с останалите физични понятия, които участват в други явления в природата. Тогава няма да бъде необходимо за всеки факт да измисляме различно обяснение.

Биофизиката свързвайки биологическите явления и понятия с добре известните физични понятия ги обяснява, на базата на физичните закони, без да се опитва да измисля "демони".

Теорията на триенето, която развива Фауст е пример за *феноменологична* теория (от *phenomenon* – явление). При този тип теории (такава е например класическата *термодинамика*) се разглежда определена съвкупност от явления, които се характеризират с определени параметри, базирани непосредствено на опита. Законите дават връзките между феноменологичните параметри. При *микроскопическите теории* всички явления се обясняват като резултат от движението на микрочастиците изграждащи телата. Така понятието за *температура*, която в термодинамиката се въвежда като феноменологична величина, в молекулярно кинетичната теория се извежда от хаотичното движение на молекулите като пропорционална на средната им енергия.

## 1.2 Място на биофизиката в естествознанието

Ситуацията, която е напълно ясна във химията, остава все още сложна в биологията. Може да се предположи, че в бъдеще теоретическата биология ще стане физика, но за сега това не е така. Живите организми и явленията свързани с тях са много по-сложни от телата и явленията от неживата природа. Това е главната причина за трудностите, които се изправят пред физиката, когато тя се опитва да опише живите тела. Даже основните понятия и определения в тази област все още са обект на дискусия.

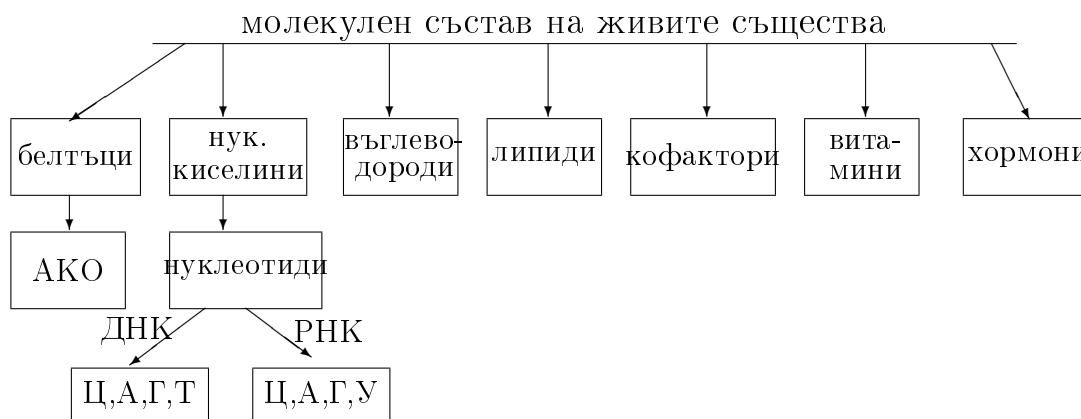
Ще приемем следното определение – биофизиката е физика на живата природа, физика на клетките, организмите и тяхната жизнена дейност. Цел на биофизиката

е изучаване на живота на основата на представата за строежа на материята с използване на законите на физиката. Това определение не е общоприето. Някои са склонни да разглеждат биофизиката като част от биологията, характеризира се преди всичко с използване на физически методи на изследване.

Биофизиката е наука на 20 век. Това не означава, че по-рано не са били правени опити, при това успешни, за обяснение на биологични явления – Максвел е построил теорията на цветното зрение, а Хелмхолц е измерил скоростта на разпространение на нервните импулси, но едва в наше време биофизиката пристъпи успешно към изучаване на фундаментални проблеми. Това разбира се стана възможно не само поради развитието на физиката, а поради общия напредък в естествознанието – в науката и техниката.

### 1.2.1 Жива и нежива природа

Физичните обекти – например електрон, атом, молекула имат неизменни физични свойства. Нещо повече микрочастиците са и неразличими. В една система от електрони един електрон не може да бъде белязан и различен от останалите. Фактът, че всички електрони са напълно еднакви толкова е удивлявал Уилър (научен ръководител на Файнман), че една нощ, когато му хрумнало интересно обяснение, той му позвънил за да сподели ”откритието” си, че всички електрони във Вселената това е всъщност един електрон, който се движи напред – назад във времето.



Фигура 1.3: Молекулен състав на живите същества.

Живите обекти, обаче притежават индивидуалност и изменчивост. Няма два еднакви организма на Земята, а броят на биологичните видове надхвърля  $3 \cdot 10^6$ , докато различните видове атоми са няколкостотин. В рамките на един вид атоми всички са еднакви, докато в рамките на един биологичен вид всички организми са различни.

Разбира се и в неживата природа има индивидуалност – няма два еднакви камъка, а и в живите организми има постоянни елементи – в крайна сметка биологическата изменчивост се определя от разнообразието в подреждането на гените – участъци от макромолекули ДНК, представляващи съполимери, построени от четири типа звена (фиг. 1.3).

Живият организъм е динамична, а не статична система. Той е принципно хетерогенен, построен е от различни големи и малки молекули.

## 1.2.2 Раздели и методи на биофизиката

В строежа на организмите има йерархия определена от размера, затова биофизиката се разделя, аналогично на физиката на няколко дяла:

- молекулна биофизика,
- физика на клетките,
- биомеханика,
- биофизика на сложните системи.

*Молекулната биофизика* е най-добре развитата от тях области. Това се обуславя от нейния обект биополимерите – белтъци и нуклеинови киселини, които е много по-лесно да бъдат изучавани, отколкото живите организми. Молекулната биофизика се опира от една страна на биологични и химични дисциплини като биохимия, молекулна биология, органична и неорганична химия, а от друга страна на физиката на молекулите.

Теоретичния апарат на молекулната биофизика включва равновесната термодинамика, статистическата механика и квантовата механика. За експериментално изследване на макромолекулите се използват физически методи за определяне на масата и формата им – седиментация при ултрацентрофугиране, облъчване със светлина и рентгенови лъчи и др.

Молекулната биофизика естествено преминава в *биофизика на клетката*, изучаваща строежа и функционирането им. Това е най-старата и традиционна област на биофизиката. Главният ѝ предмет понастоящем е изучаването на биологичните мембрани и биоенергетичните процеси. Биофизиката на клетката включва изучаване на генерацията и разпространението на нервните импулси, механохимичните процеси (в частност мускулните съкращения), фотобиологичните явления (фотосинтез, фоторецепция, механизма на зрението, биолуминисценцията). В тази област се използват същите експериментални методи.

Биомеханиката е възникнала по-рано от другите области на биофизиката. Още през 1840 г. Поазой е поставил и решил задачата за течението на флуид през кръгла тръба, с цел да опише движението на кръвта. Биомеханиката се състои от 3 части:

1. механика на макроскопичните движения на организма,
2. хидродинамика на кръвообращението и дишането,
3. механика на мускулното съкращение.

*Биофизика на сложните системи* условно се нарича предимно теоретичната област от биофизиката, която изучава големи физико-биологични системи с методите на математическото моделиране. Съвременните ѝ раздели включват:

1. Обща теория на дисипативните нелинейни динамични системи – термодинамиката на необратимите процеси.
2. Теория на биологичните колебателни процеси.
3. Обща теоретическа трактовка на биоенергетичните явления.
4. Моделиране на процесите на биологическата еволюция, онтогенеза, канцерогенеза, имунитета.

Математическото моделиране цели да опише качествено сложните процеси, като за целта се строят максимално опростени модели съставени от поне 2 уравнения. В случаите, когато качествено поведение е известно и е необходимо количествено описание на конкретни процеси се строят имитационни модели с много уравнения и параметри, които се определят при сравнение с експерименталните данни.

Всички раздели на биофизиката намират практическо приложение предимно в медицината, фармакологията и селското стопанство.

## 1.3 Основни направления в биотехнологиите

В тесния смисълна думата *биотехнологиите* представляват използване на живи организми в производството и преработването на различни продукти. От древни времена такива процеси се използват при приготвянето на хляба, виното, оцета, сиренето, преработването на кожи и др. Съвременните биотехнологии са основани предимно на култивирани микроорганизми (бактерии и микроскопични гъбички), животински и растителни клетки.

В широкия смисъл на думата биотехнологии се наричат технологиите, използващи живи организми или продуктите на тяхната жизнена дейност. Основните направления на развитие на съвременните биотехнологии са следните:

- медицински биотехнологии,
- агробиотехнологии,
- екологически биотехнологии.

### 1.3.1 Медицински биотехнологии

Медицинските биотехнологии се разделят на диагностични и лечебни. Диагностичните медицински биотехнологии се разделят на химически (определяне на диагностичните вещества и параметрите им на обмен) и физически (определяне на физическите полета на организма).

Определянето на физическите полета на човешкия организъм има голямо диагностично значение. Физическата диагностика е по-евтина и по-бърза, отколкото химическата, затова нейната роля ще нараства в бъдеще.

По-рано диагностичните химически биотехнологии са се свеждали към определяне на веществата имащи диагностично значение в тъканите и биологическите

течности. Такъв подход е статически. Понастоящем диагностиката използва измерването на скоростите на образуване и разпад на представляващите интерес вещества, а също и определяне на активността на ензимите, осъществяващи синтез и деградация на тези вещества. Това е динамически подход.

И накрая диагностиката започва да оценява влиянието върху метаболизма на диагностичните вещества на определени функционални въздействия. Такъв подход може да се нарече функционален. Той позволява разкриването на резервните възможности на организма. В древността за лечението на болните са използвали растения и минерали. От миналия век широко разпространение получиха синтетическите химически препарати и антибиотици. Сравнително неотдавна във фармакологията е започнало използването на индивидуални биологически активни съединения и съставянето на оптимални композиции, а също и използването на специфически активатори и инхибитори. Алтернатива на антибиотичите става изтласкването на патогенната микрофлора със сапрофитна микрофлора (използване на микробния антагонизъм).

Освен лекарствени методи на лечение в съвременната медицина се използват още и аромати (аромотерапия), механически въздействия (масаж) и въздействието на физически полета (физиотерапия). Физическите полета са интересни с това, че с тяхна помощ може да се лекуват най-различни заболявания. Най-голям интерес сега предизвикват топлинното въздействие, лазерното излъчване и електромагнитното излъчване в милиметровия диапазон.

Най-актуалните проблеми на съвременната медицина са борбата със сърдечно-съдовите заболявания (преди всичко с атеросклерозата), с онкологичните заболявания, с алергиите, старението и с вирусните инфекции (в това число и СПИН). В последно време се появиха ефективни средства за борба с атеросклерозата.

По мнението на ред специалисти, решението на проблемите на онкологичните заболявания ще бъде достигнато с помощта на имунологически методи, позволяващи избиращо да се унищожават раковите клетки. Решението на проблема с рака ще повиши средната продължителност на живота. Решението на проблема с алергическите заболявания се определя от развитието на имунологията и прогреса в изучаването на такъв фундаментален проблем на медицината, като възпалението. Човечеството все още много лошо се справя с вирусните инфекции въобще (както показва COVID пандемията), а не само със СПИНа. Химиотерапията и антибиотиците, позволяващи ефективната борба с бактериалните инфекции, не са ефективни по отношение на вирусите. Предполага се, че съществен прогрес в борбата с вирусните инфекции ще бъде достигнат за сметка на развитието на молекулната биология на вирусите, в частност изучаването на взаимодействието на вирусите със специфически за тях клетъчни рецептори.

Разшифроването на генома на човека и успехите в клонирането на животни откриват огромни перспективи в медицината. Но не всичко е така просто. Не е достатъчно да се знае структурата на конкретния ген, трябва да се знае и как да се регулира неговата активност. Интензивна работа в областта на регулацията на активността на генома в съчетание с усъвършенствването на методите на генното инженерство, ще обеспечат решаващ прогрес в лечението на заболявания, като диабет. Използването на метода на клонирането може да приведе до създаването на банка от "запасни части" за конкретни хора и значително удължаване на живота им. Против това обаче се издигат възражения от морален характер.



Още една революция в медицината ще предизвика изучаването на така наречените стволови клетки, т.е. клетките, които се явяват предшественици на другите типове клетки, включително нервните. Използването на стволовите клетки – това в перспектива е решаване проблема на регенерацията, т.е. радикалното лечение на инсулта, инфаркта, възстановяването на загубени крайници и т.н., а също и съществено продължение на живота.

Сега лидери на медицинската наука са медицинската генетика и имунология. Медицинската генетика може не само да предотвратява появата на генетически непълноценни деца чрез диагностика на генетическите заболявания, перспективата е присаждане на гени и управлението на тяхната активност. Имунологията позволява създаване на нови подходи към лечението на имунологическите заболявания (в това число имунодефицитните, автоимунните заболявания и алергиите), инфекциозните и онкологическите заболявания. Към настоящия момент са разработени множество ефективни методи за отстраняване на бръчките, повишаване еластичността на кожата, повишаване тонуса на мимическите мускули и др. Лечебната козметология е бурно развиваща се област на медицината.

По-рано медицината се е занимавала само с болни хора. Сега се е появила нова медицинска наука, която се занимава с укрепването и поддържането на здравето на здравите хора. Цяла нова област на индустрията – производството на хранителни добавки, обслужва преди всичко практически здравите хора. Много хора бягат за здраве и се занимават във фитнес центрове. Към технологиите за здравето спадат и спортните биотехнологии, преди всичко методиките на тренировка, възстановяването след натоварване, а също и спортните диети.

### 1.3.2 Агробиотехнологии

Зелената революция (т.е. рязкото повишаване на продуктивността на растениевъдството за сметка на използване на минерални торове, пестициди и инсектициди) рязко увеличи продуктивността на селското стопанство. Заедно с това се проявиха и отрицателните им последствия, например отравяне с нитрати. Сега основна задача на агробиотехнологиите е преодоляване на отрицателните последствия от зелената революция. При това се набляга на биологическите методи на възстановяване на плодородието на почвата, биологическите методи за борба с вредителите, създаване на високопродуктивни и имащи различни полезни свойства сортове културни растения. Новите сортове растения сега се получават и с помощта на генното инженерство (така наречените трансгенни растения). При създаването на високопродуктивни породи домашни животни се забелязва напредък, обусловен от метода на клонирането. Той позволява не създаването на нова порода, а просто тиражира в неограничено количество един удачен екземпляр. Ветеринарните науки се развиват паралелно на съответстващите медицински и имат сходна проблематика.

Към селскостопанските науки спада лесовъдството. Унищожаването на горите е проблем от планетарен мащаб. Горите за разлика от нефта и газа, представляват възобновяем природен ресурс, но възстановяването им не е просто и заема много време. На развитието на лесовъдството все по-голямо влияние оказва развитието на екологията. В селското стопанство се отглеждат не само продоволствени, но и технически култури, такива като памук, лен и др. Продоволствени-

те селскостопански култури служат за суровина за хранителната промишленост. Изготовянето на хранителни продукти от растителни и животински суровини, тяхното съхраняване и кулинарна обработка е също обект на биотехнологията.

### **1.3.3 Екологически биотехнологии**

Във връзка с нарастването на стопанската дейност на човека много актуални стават проблемите на екологията. Биотехнологиите се използват за унищожаване замърсяванията на обкръжаващата среда (например, пречистването на водата или пречистването от нефтени замърсявания), за възстановяване на разрушените биоценози (например, тропическите гори или северната тундра), за възстановяване на популацията на изчезващите видове или за аклиматизация на избрани видове в нови места на обитаване. Биолозите се борят за запазване на видовото разнообразие, защото то придава устойчивост на биоценозата и биосферата като цяло.

---

## Глава 2

# Термодинамика на биологичните системи

Термодинамиката изучава системите образувани от огромен брой частици. *Класическата термодинамика* е възникнала в началото на 19 век като феноменологична теория описваща топлинните явления. Тя се изгражда аксиоматично на основата на няколко принципа, формулирани въз основа на наблюденията на голям кръг явления. Такъв подход се нарича *феноменологичен* (от *phenomenon* – явление). Във втората половина на 19 век възниква и друг начин за описание на топлинните явление на основата на молекулно кинетичната теория, в който се използват статистически методи - *статистическата термодинамика*. Тяхното използване е възможно, тъй като в броят на молекулите във веществото е огромен.

## 2.1 Класическа термодинамика

### 2.1.1 Термодинамични системи и процеси

Термодинамичната система е набор от макроскопични тела, които могат да обменят енергия помежду си и с външната среда. Тя се характеризира с малък на брой параметри. Опитът показва, че ако термодинамичната система не взаимодейства с други, то след известно време, наречено време на релаксация, в нея се установява *термодинамично равновесие*, при което всички термодинамични параметри остават постоянни. Например ако системата е газ запълващ даден обем, то в равновесие има постоянно налягане и температура. Състояние, при което поне един от параметрите няма определена стойност, се нарича *неравновесно*.

Понятието *температура* се въвежда за да характеризира равновесието на системата. То се базира на така наречения *нулев принцип на термодинамиката*. Според него ако системите  $A$  и  $B$  са в термодинамично равновесие, а също  $B$  и  $C$ , то и  $A$  и  $C$  се намират в термодинамично равновесие.

Термодинамичният процес е преходът на система от едно състояние в друго. Такъв преход винаги е свързан с нарушаване на равновесието на системата. Ако той протича много бавно, можем да считаме, че отклонението на параметрите от равновесните им значения е пренебрежимо малко. Той може да се разглежда като непрекъснатата поредица от равновесни състояния ако е много по-бавен в сравнение с процесите на установяване на термодинамично равновесие в дадена система. При промяна на посоката на равновесния процес (например замяна на свиването на газа с разширение), системата ще премине през същите равновесни състояния, но в обратен ред. Следователно равновесните процеси са обратими.

Обратимият процес се характеризира с безкрайно бавна промяна на термодинамичните параметри (плътност, налягане, температура и т.н.), които определят равновесието на системата. Такива процеси се наричат квазиравновесни.

Понятията за равновесно състояние и обратим процес играят важна роля в термодинамиката. Всички количествени заключения на класическата термодинамика са приложими само за равновесни състояния и обратими процеси.

Термодинамично равновесие	Стационарно състояние
Няма материален поток и енергия към околната среда и обратно.	Постоянен обмен на енергия със заобикалящата среда.
За поддържане на това състояние не се изразходва свободна енергия.	Постоянно се изразходва свободна енергия за поддържането му.
Системата не може да извършва работа, термодинамичните потенциали са равни на нула.	Термодинамичните потенциали са постоянни и не са равни на нула
Ентропията е максимална.	Ентропията е постоянна, но не максимална.
В системата отсъстват градиенти.	Налице са градиенти.
Системата може да съществува вечно - състояние на смърт.	Системата може да съществува ограничено време.

Таблица 2.1: Сравнение между термодинамичното и стационарното състояние

Необратими термодинамични процеси са тези, които могат спонтанно да протичат само в една определена посока. Такива са например: процеси на дифузия, топлопроводност, термична дифузия, вискозен поток, разширяване на газ в кухня и др. В природата повечето процеси са необратими, а обратимите процеси могат да протичат само в състояние на термодинамично равновесие.

Ако параметрите на системата по време на нейното взаимодействие с околните тела не се променят с времето, тогава състоянието на системата се нарича стационарно. В различните части на система, която е в *стационарно състояние*, стойностите на параметрите обикновено се различават: температура в различни части на човешкото тяло, концентрация на дифундиращи молекули в различни части на биологичната мембрана и т.н. По този начин постоянните градиенти на някои параметри се поддържат в системата, при постоянна скорост на химическите реакции.

Стационарното състояние се поддържа благодарение на потоците от енергия и материя, преминаващи през системата. Ясно е, че системите, които или обменят както енергия, така и материя с околните системи (отворени системи) или само обменят енергия (затворени системи), могат да бъдат в стационарно състояние. В таблица 2.1 е направено сравнение между термодинамичното и равновесното състояние.

Термодинамична система, която не обменя нито енергия, нито материя с околните тела, се нарича изолирана. Една изолирана система в крайна сметка достига до състояние на термодинамично равновесие. В това състояние, както и в стационарното състояние, параметрите на системата остават непроменени във времето.

От съществено значение е, че в равновесно състояние параметрите, които не зависят от масата или броя на частиците (налягане, температура и т.н.), са еднакви в различните части на тази система.

В затворените системи необратимите процеси са съпроводени с нарастване на ентропията. В отворените системи (които могат да обменят енергия или материя с околната среда), при необратими процеси, ентропията може да остане постоянна или дори да намалее поради обмена на ентропия с околната среда.

### 2.1.2 Принципи на термодинамиката

Класическата термодинамика е аксиоматична теория. Тя се базира на три основни закони (принципи) формулирани на базата на огромен брой наблюдения.

В термодинамиката законът за запазване на енергията е прието да се нарича *първи принцип на термодинамиката*. Той гласи, че количеството топлина погълнато от една система е равно на сумата от промяната на вътрешната ѝ енергия и на извършената от нея работа:

$$\delta Q = dU + dA \quad (2.1)$$

Според първия принцип, приложен за живите системи, всички видове работа в тялото се извършват за сметка на еквивалентно количество енергия, освободено по време на окисляването на хранителните вещества. Промяната в системата е възможна само в резултат на обмен на енергия с външната среда.

Всички видове работа в тялото се извършват за сметка на еквивалентно количество енергия, освободено по време на окисляването на хранителните вещества. Промяната в системата е възможна само в резултат на обмен на енергия с околната (външна) среда.

*Вътрешната енергия*  $U$  е функция на състоянието на системата. Това означава, че нейната стойност не зависи от предисторията на системата. Промяната на вътрешната енергия зависи само от началното и от крайното състояние и не зависи от начина, по който се стигнало до него. От гледна точка на молекулярно кинетичната теория вътрешната енергия на тялото се състои от кинетичната енергия на транслационното и ротационното движение на молекулите, кинетичната и потенциалната енергия на вибрационното движение на атомите в молекулите и потенциалната енергия на взаимодействие между тях.

Количеството енергия, предадено от едно тяло на друго чрез пренос на топлина, се характеризира с *количеството топлина*  $Q$ . От това следва, че количеството топлина трябва да се измерва в същите единици (джаули в система СИ) като енергията или работата.

За разлика от вътрешната енергия, количеството топлина и работата зависят от начина, по който се е стигнало от началното до крайното състояние, т.е. те не са функции на състоянието.

Първият закон на термодинамиката не показва посоката на възможното протичане на процесите. Така например, според първия закон на термодинамиката, по време на пренос на топлина би било еднакво възможно както спонтанното прехвърляне на топлина от по-нагрятото тяло към по-малко нагрятото тяло, така и обратното, от по-малко нагрятото тяло към по-нагрятото тяло. От ежедневния опит обаче е добре известно, че вторият процес никога не се случва в действителност.

*Вторият закон на термодинамиката*, подобно на първия, е обобщение на експериментални данни. Има няколко формулировки на втория закон на термодинамиката, ето две от тях:

1. Формулировка на Клаузиус - невъзможен е процес, единственият резултат на който е предаването на топлина от по-студена система към по-гореща система.
2. Формулировка на Томсън - невъзможен е кръгов процес, единственият резултат на който е получаване на работа за сметка на охлаждане на тяло (вечен двигател от втория род е невъзможен).

Ако в реална система е извършена работа, тогава, за да се върне в първоначалното си състояние, е необходимо да се въведе енергия отвън, тъй като част от първоначалната енергия необратимо се е превърнала в топлина. Тази част от вътрешната енергия на системата, която по принцип може да се използва за извършване на работа, се нарича свободна енергия. Останалата част от енергията, която не може да се преобразува в работа, се нарича свързана енергия – тя се характеризира с величината *ентропия*. В класическата термодинамика тя се дефинира като:

$$dS = \frac{\delta Q}{T} \quad (2.2)$$

От тази формула се вижда, че ентропията е дефинирана с точност до константа. Нейното значение се уточнява във *третия закон на термодинамиката*. Във формулировката на Нернст той гласи, че когато температурата на една равновесна термодинамична система клони към нула, нейната ентропия престава да зависи от термодинамичните параметри и клони към константа, която се приема за нула. Причината за това се крие във формулата за ентропията, която се дава от статистическата физика  $S = k \ln P$  (формула 2.8, стр. 20), където  $P$  е вероятността системата да се намира в това състояние. При абсолютната нула, съгласно класическата статистическа термодинамика, движението на частиците е спряло, т.е. има само едно състояние, следователно  $P = 1$  и  $S = 0$ .

Трябва да се отбележи, че равенството (2.2)  $\delta Q = TdS$  е в сила само за системи, които са в равновесие или много близо до него. Най-общо казано, ентропията  $S$  може да се увеличи не само поради притока на топлина в системата, но и поради вътрешни процеси на смесване. Следователно в общия случай е валидно неравенството на Клаузиус:

$$dS \geq \frac{\delta Q}{T} \quad (2.3)$$

Същността на ентропията се разкрива при разглеждането ѝ в статистическата термодинамика.

### 2.1.3 Термодинамични функции

Изчисленията в термодинамиката се улесняват при използването на функции на състоянието, наречени термодинамични потенциали. Всеки набор от независими параметри има свой собствен термодинамичен потенциал, така че промените

им, които възникват по време на всякакви процеси, определят или работата, извършена от системата, или топлината, получена от системата. Термодинамичните потенциали са функции на състоянието. Следователно увеличението на всеки от потенциалите е равно на общия диференциал на функцията, чрез която е изразен. В таблица 2.2 са дефинирани термодинамичните потенциали и условията за равновесие на системата изразени чрез тях.

Процесите, протичащи в биологичните системи, най-често се извършват при постоянна температура и налягане. Следователно полезната работа в биосистемите се определя от промяната в термодинамичния потенциал на Гибс (понякога в литературата той се нарича свободна енергия на Гибс или просто свободна енергия).

Функция	Естествени променливи	Условие за самопроизволност	Условие за равновесие
$F = U - TS$ свободна енергия по Хелмхолц	$V, T = const$	$(dF)_{V,T} < 0$	$dF = 0, F = F_{min}$
$G = U - TS + pV$ свободна енергия по Гибс	$P, T = const$	$(dG)_{P,T} < 0$	$dG = 0, G = G_{min}$
$U = f(S, V)$ вътрешна енергия	$S, V = const$	$(dU)_{S,V} < 0$	$dU = 0, U = U_{min}$
$H = U + pV$ енталпия	$S, P = const$	$(dH)_{S,P} < 0$	$dH = 0, H = H_{min}$
$S = f(U, V)$ ентропия	$U, V = const$	$(dS)_{V,U} > 0$	$dS = 0, S = S_{max}$

Таблица 2.2: Термодинамични потенциали

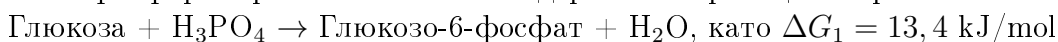
При  $TdS = 0$  процесът е обратим. При реални необратими процеси  $TdS > \delta Q$  затова използвайки този израз, може да се покаже, че процесите винаги протичат в посоката, в която намаляват свободната енергия на Хелмхолц и термодинамичният потенциал на Гибс. Тъй като тези величини винаги се стремят към минимална стойност, тогава в състояние на равновесие  $G = G_{min}$  и  $F = F_{min}$ , като е показано в таблица 2.2.

Критерий за способността на дадена система да извършва една или друга термодинамична трансформация е знакът на нарастването на термодинамичния потенциал, съответстващ на условията на процеса. Биоенергийните процеси, като правило, се характеризират с промяна в потенциала на Гибс. Когато  $dG < 0$  (или  $dF < 0$ ), процесът протича спонтанно с освобождаване на енергия, тъй като енергията на крайното състояние е по-малка от енергията на първоначалното. Промените в системата ще продължат дотогава, докато термодинамичният потенциал на Гибс достигне минималната си стойност. Химичните реакции, които протичат с намаляване на термодинамичния потенциал, се наричат *екзергонични*. Ако завършването на който и да е термодинамичен процес изисква увеличаване на енергията ( $dG > 0$ ), тогава такъв процес не може да се случи спонтанно и

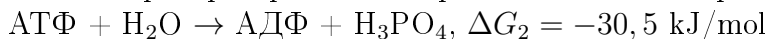
изисква приток на енергия от околната среда. Химичните реакции, протичащи с увеличаване на термодинамичния потенциал се наричат *ендергонични*.

По време на функционирането на биологичните системи протичат както екзергонични, така и ендергонични процеси. Последните процеси са термодинамично неблагоприятни и не могат да протичат без допълнителен приток на енергия, чийто източник в живия организъм са екзергоничните процеси. Ако енергията, освободена в хода на всеки екзергоничен процес, надвишава енергията, необходима за завършване на ендергоничния процес, тогава първият процес може да осигури енергия на втория. В този случай общата промяна в потенциала на Гибс остава отрицателна.

Ето един пример на това често срещано явление. Началната реакция на гликолизата - фосфорилиране на глюкоза е ендергонична реакция и протича по схемата:



Увеличаването на свободната енергия в този случай се компенсира чрез реакцията на хидролиза на аденозин трифосфат (АТФ) в аденозин дифосфат (АДФ), което е най-разпространената спрегната химическа реакция в живите системи:



Така общата промяна на свободната енергия по време на тези две реакции е:

$$\Delta G = \Delta G_1 + \Delta G_2 = 13,4 \text{ kJ/mol} - 30,5 \text{ kJ/mol} = -17,1 \text{ kJ/mol}$$

Явлението на химичното спрягане осигурява преобразуването на енергията на едни химични връзки в енергията на други, като по този начин се намаляват загубите на енергия под формата на топлина. Колкото по-ниска е стойността на дисипативната функция, толкова по-енергийно ефективно работи системата.

## 2.1.4 Уравнение за състоянието - идеален и реален газ

Състоянието на всеки газ се характеризира с три параметъра: обем, налягане и температура. Между тях съществува връзка, която се нарича *уравнение на състоянието*.

За много газове при обикновено атмосферно налягане и температура уравнението на състоянието може да се запише във вида:

$$pV = \frac{m}{M}RT \quad (2.4)$$

Константата  $M$  се нарича моларна маса. От молекулно-кинетична гледна точка това е масата на молекулата на газа, изразена във въглеродни единици. Уравнението (2.4) се нарича *закон за състоянието на идеалния газ*, а газовете, за които то е изпълнено се наричат идеални газове.

В молекулно-кинетичната теория уравнението за състоянието на идеалния газ се получава елементарно, като се приеме, че молекулите се движат хаотично, без да взаимодействат помежду си. То приема вида:

$$pV = NRT, \quad (2.5)$$

като абсолютната температура  $T$  се оказва свързана със средната кинетична енергия на молекулите:

$$\bar{E}_k = \frac{3}{2}kT$$



Реалните газове се описват с уравнението на състоянието на идеалния газ (2.4) само приблизително и отклоненията стават забележими при високо налягане и ниски температури, особено когато газът е близо до кондензация. За описанието им в по-широк интервал са предложени много уравнения. Едно от най-простите, което най-много прилича на (2.4) е *уравнението на Ван-дер-Ваалс*. За един мол то има вида:

$$\left(p + \frac{a}{V^2}\right)(V - b) = RT \quad (2.6)$$

Константите на Ван-дер-Ваалс се определят експериментално за всеки газ,  $b$  има смисъл на обема на молекулите в 1 mol, а членът  $a/V^2$  отчита взаимното им притегляне.

Характерно за уравнението на Ван-дер-Ваалс е, че то описва не само газовата, но и течната фаза на веществото.

Друго уравнение, което описва състоянието на реален газ е *вириалното уравнение*. За един мол то е:

$$pV = RT \left(1 + \frac{B}{V} + \frac{C}{V^2} + \dots\right) \quad (2.7)$$

*Вириалните коефициенти* зависят от температурата. Ако подходим към вириалното уравнение само като към емпирично уравнение на състоянието, тогава то има редица недостатъци, например същият набор от експериментални данни може да бъде описан по-точно с помощта на други емпирични уравнения с по-малко параметри. Значимостта на вириалното уравнение на състоянието се крие във факта, че то е единственото известно уравнение на състоянието, което има строга теоретична основа. Методите на статистическата физика позволяват теоретично да се изчислят стойностите на вириалните коефициенти, ако е известна формата на потенциала на междумолекулното взаимодействие. Статистическата теория на газовете показва, че коефициентите  $B$ ,  $C$  и т.н. характеризират отклонението от свойствата на идеален газ поради двойните, тройните и т.н. сблъсъци на молекулите.

## 2.2 Статистическа термодинамика

Когато имаме извънредно голям брой частици, които се движат хаотично, е невъзможно да се приложи метода от класическата динамика за описание на движението им. Тогава се използват статистически методи – основни понятия са: *вероятността* и *плътността на функцията на разпределение* на някаква величина. Величините, които се измерват се наричат *случайни величини*, понеже се получават като резултат от действието на много, различно действащи фактори. Такава величина е например скоростта на всяка молекула – поради многобройните удари между молекулите, тя непрекъснато се мени по големина и посока. Вместо да следим за движението на една молекула, да преброим колко молекули  $dN$  има в интервала по скорости  $(v, v + dv)$ . Отношението им  $\frac{dN}{N}$  към броят на всички молекули  $N$  ни дава представа за вероятността скоростта да има стойност  $v$  в този интервал. Такава вероятност се нарича *функция на разпределението* и

тя ни дава възможността да пресметнем средната стойност на съответната величина. По този начин се реализира основната идея на статистическата физика, че физичен смисъл имат не произволни точни стойности на някоя величина във всеки момент от време, а средната ѝ стойност за всички възможни разположения на молекулите и техните скорости.

*Статистическата физика* се занимава с равновесното положение на системите, частта от физиката, която се занимава с процесите възникващи при отклонение от равновесието се нарича *физическа кинетика*.

### 2.2.1 Статистическа същност на ентропията

Понятието *ентропия* се въвежда в класическата термодинамика на базата на втория закон на термодинамиката. В уравнение (2.1) придадената топлина не случайно е отбелязана с  $\delta$ , а не със знака за диференциал  $d$ .  $Q$  не е функция на състоянието като вътрешната енергия  $U$ , т.е. тя не зависи само от началното и крайното състояние, а и от пътя между тях, затова не може да се запише като пълен диференциал. Оказва се, обаче, че частното  $\frac{\delta Q}{T}$  е пълен диференциал  $dS$ . Тази величина се нарича ентропия (уравнение 2.2). Твърдението, че ентропията е функция на състоянието е математическата формулировка на втория закон на термодинамиката (формулировка на Каратеодори). Ентропията на една затворена система може само да се увеличава или да остава постоянна.

Ентропията, също като енергията, е едно от най-важните понятия във физиката. Нейната същност се разкрива при разглеждане на строежа на веществото. Всяка термодинамична система се състои от микроскопични частици, които се намират в непрекъснато движение, взаимодействайки помежду си и със стените на съда, в който са затворени. Системата може да се намира в най-различни състояния, например молекулите на един съд пълен с идеален газ могат да се намират събрани само в една част от съда, но вероятностите за реализирането им е различна. В нашия пример много по-вероятно е частиците да са разпределени равномерно по целия обем. Ентропията е именно мярка за тази вероятност. Уравнението, което дава връзката между вероятността  $P$  една *термодинамична система* да се намира в някакво състояние и ентропията ѝ  $S$  е получено от Болцман:

$$S = k \ln P, \quad (2.8)$$

където  $k$  е константата на Болцман. Това уравнение разкрива и причината, поради която системата се стреми да достигне състояние с максимална ентропия – това е най-вероятното ѝ състояние.

Ще покажем, че формула (2.8), с която се дефинира ентропията в статистическата термодинамика, е същата, като формула (2.2), с която се дефинира ентропията в класическата термодинамика.

Нека да разбием обема  $V$  на газа на елементарни обеми  $V_0$ , в един такъв обем може да се помести само една молекула. Целият обем е разделен на  $V/V_0$  части, следователно една молекула може да се разположи по  $\frac{V}{V_0}$  начина, и броят на възможните разположения е  $(V/V_0)^N$ . При промяна на обема на газа от  $V_1$  до  $V_2$ ,

вероятностите се променят от  $P_1$  до  $P_2$ , които се отнасят както:

$$\frac{P_2}{P_1} = \left(\frac{V_2}{V_1}\right)^N$$

и следователно изменението на ентропията ще бъде:

$$S_2 - S_1 = k \ln P_2 - k \ln P_1 = k \ln \left(\frac{V_2}{V_1}\right)^N = kN(\ln V_2 - \ln V_1)$$

$$dS = Nkd \ln V$$

До същата формула се стига ако приложим първият закон на термодинамиката  $\delta Q = dU + pdV$  към изотермичното свиване на идеален газ. При този процес  $dU = 0$ , тъй като вътрешната му енергия не се изменя (тя зависи само от температурата), затова:

$$pdV = \delta Q = TdS$$

От друга страна от уравнението за състоянието на идеалния газ  $pV = NkT$  получаваме:

$$dA = pdV = d(pV) - Vdp = d(NkT) - Vdp$$

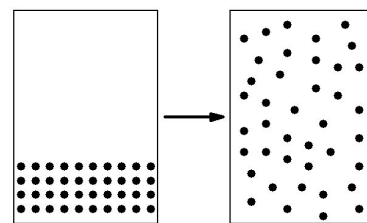
Понеже  $NkT = const$  и  $p = \frac{NkT}{V}$  то  $dA = NkT \frac{dV}{V}$  и за ентропията получаваме:

$$TdS = NkT \frac{dV}{V}, \quad dS = Nkd \ln V$$

т.е. стигаме до същия израз получен от формулата на Болцман.

Сега можем да разберем природата на неравенството на Клаузиус (формула 2.3, стр.16).

Нека си представим термично изолирана среда, съдържаща примеси, способни на дифузия които са концентрирани на едно място в началния момент (фиг. 2.1). Очевидно с течение на времето, поради дифузията, частиците ще се разпространят в средата, концентрацията им ще се изравни навсякъде, а ентропията ще се увеличи, тъй като броят на състоянията (позициите в пространството), налични за частиците, ще се увеличат. Така ще бъде изпълнено неравенството  $dS/dt > 0$ , докато поради топлоизолацията на системата  $\delta Q = 0$ .



Фигура 2.1: Нарастване на ентропията в затворена система.

## 2.3 Термодинамика на необратимите процеси в биологичните системи

В книгата си “Какво е живота от гледна точка на физиката?” Шрьодингер дава забележителна дефиниция: “Животът е работа на специално организирана система за намаляване на собствената си ентропия чрез увеличаване на ентропията на околната среда”.

Едно от условията за нормалното функциониране на отделната клетка и целия организъм е поддържането на постоянството на техните параметри (концентрации на вещество, електрически потенциали и други) и, ако е необходимо, промяната им в правилната посока. Това изисква обмен на материя и енергия с околната среда, трансформация на едни видове енергия в други, например при процеси на мускулна контракция, предаване на нервни импулси, зрително и слухово възприятие и др.

Реалните процеси и състояния в природата и технологиите са неравновесни и много системи са отворени. Тези процеси и системи се разглеждат в *неравновесната термодинамика*. Класическата термодинамика се занимава главно с равновесните състояния на система, в която параметрите не се променят с времето. В отворените системи обаче, реакциите и съответните енергийни трансформации протичат постоянно и затова е необходимо да се знаят скоростите на енергийна трансформация във всеки момент от времето.

Това означава, че факторът време също трябва да се вземе предвид при енергийните изчисления. Аналогично както в класическата термодинамика състоянието на равновесие е специално състояние, така и в неравновесната термодинамика стационарните състояния играят специална роля. Въпреки факта, че в стационарно състояние, необратимите процеси, протичащи в системата (дифузия, топлопроводимост и др.), увеличават ентропията, ентропията на системата не се променя. Как да разберем това противоречие?

Общото изменение на ентропии  $dS$  на отворена система може да протича или за сметка на процесите на обмен с външната среда  $dS_e$ , или вследствие на вътрешни необратими процеси  $dS_i$ . Така промяната в ентропията на системата можем да представим като сумата от два члена:

$$dS = dS_e + dS_i$$

Диференцирайки по времето получаваме:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{dS_e}{dt} + \frac{dS_i}{dt}$$

Първото събираемо  $dS_e/dt$  описва скоростта на обмен с околната среда. Ако е положително имаме приток на ентропия, ако е отрицателно – отток.

Второто събираемо  $dS_i/dt$  описва скоростта на изменението на ентропията поради процеси вътре в системата и се нарича производство на ентропия.

Необратимостта на процесите води до  $dS_i > 0$  (фиг. 2.1), стационарността на състоянието води до  $dS = 0$ , следователно  $dS_e < 0$ , затова:

$$\frac{dS_e}{dt} = -\frac{dS_i}{dt} < 0$$

Производството на ентропия компенсира точно оттока на ентропия в живия организъм. Както е казал Шрьодингер “Организмът се храни с отрицателна ентропия”. Разграждането на хранителни вещества води до освобождаване на свободна енергия, необходима за функциониране на системата.

### 2.3.1 Принцип на Пригожин

В равновесно състояние, ентропията е максимална. За стационарни състояния И. Пригожин също е посочил екстремална стойност на определена функция, формулирайки принципа на минимално производство на ентропия: в стационарно състояние на системата скоростта на нарастване на ентропията поради възникването на необратими процеси има минимална стойност при дадени външни условия които пречат на системата да достигне равновесно състояние:

$$\frac{dS_i}{dt} > 0 \rightarrow \min$$

Това е критерият за насоченост на необратими процеси в отворени системи, които са близки до равновесие. Намирането на системата в екстремум, съответстващ на минималното производство на ентропия, ѝ осигурява най-стабилното състояние. То съответства на минимално разсейване на свободна енергия (минимална загуба на енергия), тоест на максималната ефективност. Следователно можем да кажем, че в стационарно състояние коефициентът на полезно действие (КПД) на системата е най-висок.

Според принципа на Пригожин, в система в стационарно състояние, вътрешните неравновесни процеси (дифузия, топлопроводимост, химични реакции и др.) протичат по такъв начин, че ежесекундното увеличение на ентропията е минимално. Това означава, че системата не може да напусне стационарното състояние поради вътрешни необратими процеси. Така че, ако поради малки отклонения (флуктуации) системата се отклони малко от стационарното състояние, то стремежът на вътрешните процеси да намалят  $dS_i/dt$  ще върне системата отново в същото състояние.

Принципът на Пригожин, е валиден при зададени неизменни външни условия. При промяна на външното въздействие - потоци, влизащи и излизащи от системата, тя излиза от едно стационарно състояние и преминава в друго, ако новите външни условия се запазят във времето.

Примери за преходни процеси между стационарни състояния в биологичните системи са генерирането на нервен импулс, мускулна контракция и др.

### 2.3.2 Трансформация на енергията в живите системи

В техниката основният източник на енергия е изгарянето на гориво или преобразуването на ядрената енергия в топлинна. Част от топлината, получена в различни видове двигатели се използва за извършване на работа, а другата неизбежно се отделя в околната среда.

Живите организми се различават преди всичко по това, че ролята на промехудутъчно звено между източника на свободна енергия и работата в тях се изпълнява не от топлинна, а от химическа енергия. В живите организми не може да се извършва работа за сметка на топлинна енергия. Топлината винаги означава загуба по време на различни видове работа.

Важна особеност на биосистемите е тяхната способност да поглъщат енергия, да я преобразуват в различни форми, да я натрупват и използват в метаболитните процеси за осигуряване на растежа, развитието и размножаването.

Биоенергетиката изучава процесите чрез които клетките използват, запасяват и освобождават енергия. Понеже при тези процеси енергията преминава от един вид в друг, тези процеси трябва да се подчиняват на принципите на термодинамиката.

В живите организми свободната енергия, получена по време на асимилацията на храната, се освобождава почти изцяло по време на биологичното окисление, което става на вътрешните мембрани на митохондриите. Приблизително 50% от тази енергия се разсейва (освобождава се под формата на топлина в околната среда). Останалите 50% се изразходват за синтеза на вещества, които осигуряват енергия на всички клетки на тялото. Най-важното от тези вещества е аденозинтрифосфорната киселина (АТФ). Около 40% от енергията на АТФ се използва за извършване на работа, следователно  $0,5 \cdot 0,4 = 20\%$  от първоначалната енергия на храната се използва, а останалата част отново се превръща в топлина и напуска тялото. Така КПД на живия организъм е около 20%.

Първичният източник на енергия за всички живи организми на Земята е Слънцето. Фотосинтезиращите клетки на растенията поглъщат част от енергията на неговото лъчение чрез молекулите на хлорофила, трансформират я в енергия на електроните, а след това в енергия на химичните съединения аденозинтрифосфат (АТФ) и никотинамидадениндинуклеомидфосфат (НАДФ). Енергията на АТФ служи за синтезиране на органични съединения — глюкоза, нишесте, целулоза и др., като въглеродният диоксид от въздуха се редуцира с водород, получен от фотолиза на водата и редукция на НАДФ.

Организмите, които не могат да фотосинтезират, получават необходимата им енергия чрез окисление с атмосферен кислород на приетите продукти. Всички видове работа в организмите се извършват за сметка на определено количество енергия, отделено при окислението на хранителните вещества. В таблица 2.3 са дадени примери за трансформация на различни видове енергия в биологичните системи.

Видове енергия → трансформация	Място на трансформация
Химична → механична	Мускулна тъкан
Химична → електрична	Във всички клетки
Химична → светлинна	Светеци органи на риби и насекоми
Светлинна → електрична	Фоторецепторите в очите
Механична енергия на звука → електрична	Вътрешното ухо
Всички енергии → топлинна	Във всички клетки и тъкани

Таблица 2.3: Трансформация на енергията в живите системи

### 2.3.3 Дневен енергиен разход на човек

Енергийните нужди на човек зависят от редица фактори като пол, възраст, телесна и по-специално мускулна маса (свързани с основния метаболизъм), физическата ни ангажираност и дори храната, която консумираме. Дневният разход на енергия при хората се състои от три основни компонента:

- Основен метаболизъм - това е енергията, която се изразходва за поддържане на жизнените ни функции т.е. работата на мозъка, сърцето и всички органи

и системи в нашето тяло. Основният метаболизъм е най-големият компонент на дневния енергоразход.

- Енергоразход, породен от приема на храна - макар и да звучи малко странно, въпреки че храната е основният източник на енергия за нашето тяло, процесите свързани с нейната обработка и складирането на хранителни запаси в тялото също изискват енергия.
- Енергия за осъществяване на физическа активност - както личи от името, това е енергоразходът, свързан с нашата активност в ежедневието както спорт, така и всяко движение, което осъществяваме. Този трети компонент от дневния енергоразход е и най-вариабилен - при заседнал начин на живот може да е минимален, докато при спортисти, може двукратно да надхвърли основния метаболизъм.

Съществуват различни методи за точно определяне на индивидуалните енергийни нужди, като безспорно най-точният от тях е т.нар. директна калориметрия. Това е метод, посредством който директно се измерва отделената от тялото топлина и според нея се изчислява енергоразходът. Прилагането на директна калориметрия, обаче изисква специална апаратура и условията, при които може да се прилага са значително лимитирани.

По-достъпни и по-често използвани са методите на индиректна калориметрия. При тях енергийният разход се изчислява на базата на консумацията на кислород и изхвърлянето на въглероден диоксид от тялото. Съществуват различни апарати вариращи от респираторни камери с големина на стая, до компактни устройства за измерване количеството на вдишан кислород и издишан въглероден диоксид. Техниката за прилагане на тези методи е сравнително скъпа, изисква определени познания за боравене и правилно осъществяване на измерванията затова и те се използват главно с изследователска цел. Методът на двойно маркирана вода (стр.125) също е непряк метод, но има това предимство, че обектите, които се изследват са напълно свободни и не са свързани към някакъв апарат – при хората просто се изследва урината.

На базата на тези методи, обаче са създадени елементарни формули, посредством които всеки човек би могъл да изчисли енергията, която изразходва, с доста добра точност. Такава е например формулата на Харис - Бенедикт, която макар и създадена в началото на 20ти век, остава едно от най-точните и до днес. Според нея основният метаболизъм (Килокалории) за мъже и за жени е:

$$\text{Мъже} = 66,47 + 13,75 \cdot \text{тегло (кг)} + 5,0 \cdot \text{височина (см)} - 6,75 \cdot \text{възраст (години)}$$

$$\text{Жени} = 665,09 + 9,56 \cdot \text{тегло (кг)} + 1,84 \cdot \text{височина (см)} - 4,67 \cdot \text{възраст (години)}$$

Следователно основният метаболизъм на средностатистически мъж на 30 години, висок 185 см и тежак 75 кг е 1820 kcal.

За да получим цялостния енергоразход трябва да умножим получената стойност по т.нар. коефициент на физическа активност. За хора със заседнал начин на живот той се приема за 1.3 докато при активно спортуващи за 2.5. Следователно ако в нашия пример приемем, че човекът извършва редовно средна по интензивност работа и приемем, че коефициентът му на физическа активност е 1.7, дневният му енергоразход ще бъде 3000 kcal.

# Глава 3

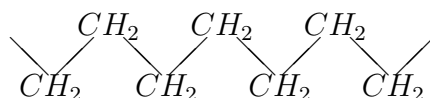
## Физика на макромолекулите

### 3.1 Строеж и свойства на биополимерите

#### 3.1.1 Полимери и биополимери

Бълтъчините, нуклеиновите киселини и полизахаридите са *макромолекули* с маса от  $10^3$  до  $10^{10}$ . Те се състоят от дълги вериги съставени от повтарящи се звена, затова се наричат *полимери* (от гръцки *polymeros* – състоящ се от много части). Първите полимери, с които са се запознали хората са от биологичен произход. Освен биологичните макромолекули това са веществата съдържащи се в сока на някои растения – каучук, гутаперча. В последствие химията е разработила методи за получаване на голям брой полимери, намиращи голямо приложение в техниката и бита. Това са синтетичния каучук, влакна, пластмаси. Физиката на полимерите е била развита преди всичко за изследване на свойствата на *синтетичните полимери*, но установените закономерности се оказват приложими и към биополимерите, следователно, синтетичните макромолекули, които имат по-прост строеж, могат да се използват за моделиране на някои свойства на биологичните вещества. В този смисъл физиката на *биополимерите* е част от физиката на полимерите.

Най-простите синтетични полимери са въглеводородите – например полиетилен:

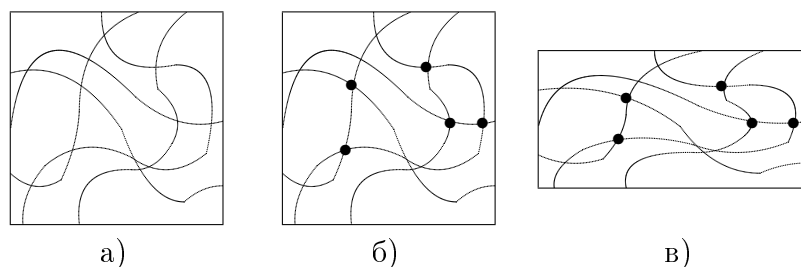


Трябва да отбележим, че за разлика от белтъците, синтетичните полимери се състоят от нееднородни макромолекули. Приведената формула е идеализирана – в реалните вериги се съдържат и други атоми, например някои атоми Н могат да бъдат заменени с метил  $\text{CH}_3$ , линейните вериги могат да бъдат разклонени. Всеки синтетичен полимер се състои от вериги с различна дължина, така че молекулната им маса е средна за цяла група полимери. Следователно синтетичните макромолекулни вещества не се подчиняват на един от основните закони на химията – за постоянния състав и строеж. В това отношение природата работи по-акуратно отколкото химикът в лабораторията. Всички молекули от даден белтък имат напълно определен състав и строеж.

Полимерната верига не представлява права линия, а гъвкава нишка заплетена на кълбо в пространството. Най-простият модел е на верижка, съставена от звена с дължина  $l$ , свободно въртящи се около свързващите ги шарнири.



Натуралният каучук представлява полимер със свойства на течност – под действието на тежест той започва да тече – явлението се проявява особено силно при повишаване на температурата. Получаването на стабилни материали от каучук се извършва при процес, наречен вулканизация. Тя води до внедряването сред макромолекулите (фиг.3.1 а) на двувалентни атоми на сярата, които свързват с ковалентни връзки полимерните вериги (фиг.3.1 б). Образува се полимерна мрежа, затова материалът не тече при високи температури. Мрежата не пречи на разтеглянето на вулканизирания каучук (фиг.3.1 в), затова еластичността му е много голяма.



Фигура 3.1: Полимер а) преди вулканизация, б) полимерна мрежа след вулканизация, в) разтеглена полимерна мрежа.

Дългите полимерни вериги се получават чрез синтез от нискомолекулни мономери. Използват се два основни начина – *полимеризация* и *поликондензация*. При полимеризацията мономерите се присъединяват последователно към растящата полимерна верига по схемата  $A_N + A \rightarrow A_{N+1}$ . Полимеризацията протича с преразпределение на валентните връзки и по правило без отделяне на излишни продукти. За започването ѝ са необходими активни центрове (свободни радикали или йони), към които се присъединяват мономерите. Образуването на активните центрове може да става под въздействието на топлина, светлина, радиоактивно облъчване или при въвеждане в системата вещества образувачи свободни радикали – *инициатори*.

При поликондензацията се извършва последователно обединение на участъци от веригата по схемата  $A_N + A_M \rightarrow A_{N+M}$ . В този случай се отделят нискомолекулни вещества. Под тяхно влияние може да настъпва и обратния процес – деструкция, затова е необходимо те да се отстраняват.

### 3.1.2 Състояния на полимерите

Пространствения строеж на макромолекулата се нарича *конформация* (от латински *conformatio* – разположение). Молекули, съставени от еднакви атоми, но с различно взаимно разположение имат различни конформации. Полимерите, които са изградени от еднакви мономерни звена се наричат *хомополимери*, но има и вериги изградени от звена от няколко типа – те се наричат *хетерополимери*. Най-известните и важни за нас са ДНК – изградени от 4 вида звена и белтъците – изградени от 20 вида.

В структурата на биополимерите се различават четири нива на организация :

1. *Первичната структура* – това е химичния строеж на молекулата. Тя пред-

ставява последователността от мономерни звена. В нея се включват химичните връзки между веригите и между отделните звена.

2. *Вторична структура* – спиралното разположение на мономерните звена в един или друг участък на веригата.
3. *Третична структура* – включва разположението на елементите на вторичната структура и свързващите ги участъци.
4. *Четвъртична структура* – разположението на отделните вериги (единици на третичната структура) в образувания от тях комплекс.

При полимерите не можем да говорим за традиционните агрегатни състояния – газообразно, течно и твърдо. Прието е следната класификация на състоянията им:

1. частично кристално;
2. стъклообразно;
3. вискоеластично;
4. вискозно течно.

Полимерите във *вискозготечно* състояние представляват течности от макромолекули със структура като на фиг.3.1 а). Дългите вериги могат да се придвижват свободно една спрямо друга, но поради силното им преплитане, течението им е затруднено, което води до големи стойности на вискозитета.

При съединяването на полимерните вериги с ковалентни химични връзки или по друг начин (сшивка), течението става невъзможно и полимерът става *вискоеластичен* (фиг.3.1 б). При охлаждане някои полимери преминават в *частично кристално* състояние, когато в определени области макромолекулите са подредени, а в други – не. При други полимери такава подреденост не възниква, топлинното движение в мащаби по-големи от звено престава. Такова състояние се нарича *стъклообразно*.

## 3.2 Еластичност на полимерите

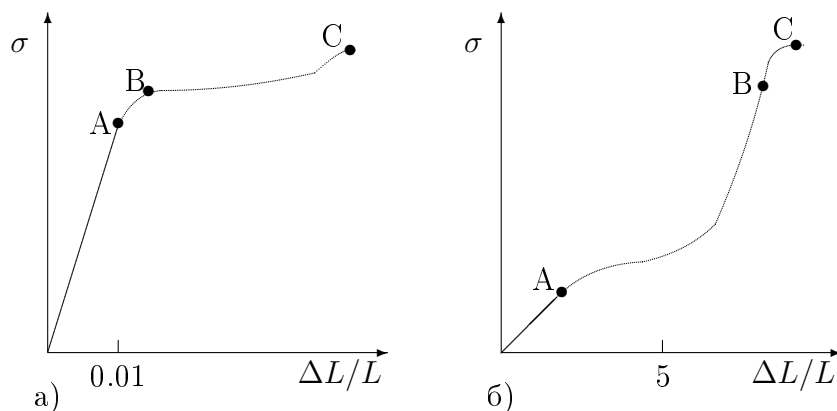
Ярка проява на спецификата на макромолекулите е тяхната *вискоеластичност* – свойство, което е присъщо само на полимерите. Вискоеластичността е способността за големи деформации при малък коефициент на еластичност.

*Еластични* са тези деформации, при които тялото възстановява формата си след премахване на силата причинила деформацията. При малки деформации е в сила *законът на Хук*:

$$\frac{f}{S} = \sigma = E \frac{\Delta L}{L} \quad ,$$

където  $\Delta L$  е удължението,  $L$  – дължината,  $S$  – площта на образеца,  $f$  е силата, която предизвиква удължението, а  $E$  се нарича *модул на Юнг*. На фиг. 3.2 е показана зависимостта на напрежението  $\sigma$  от *относителната деформация*  $\Delta L/L$ .

До точка А на двете графики деформациите са малки и зависимостта е линейна. След това тя става нелинейна, но деформациите все още са еластични до точка В, след което стават *пластични*. Тези деформации са необратими – след снемане на натоварването материалът не се връща в първоначалното си състояние. Накрая в точка С настъпва скъсване.



Фигура 3.2: Зависимост на напрежението от деформацията а) за стоманата, б) за каучука.

Въпреки, че на и на двете графики могат да се определят точките А, В и С, тяхното положение и мащабите на напреженията и деформациите съществено се различават. При стоманата необратимите деформации настъпват при удължаване от порядъка на 1%, докато каучука може да се разтегне до 8 пъти от първоначалната си дължина, без това да доведе до необратима деформация. За стоманата модулът на Юнг е  $E \sim 2 \cdot 10^{10} \text{ kg/m}^2$ , докато за каучука  $E \sim 0.2 - 8 \cdot 10^5 \text{ kg/m}^2$ . Еластичността на твърдите тела е резултат от взаимодействието между гравидните им частици – разтеглянето води до увеличаване на междумолекулните разстояния, затова са необходими големи сили, докато причината за еластичността на полимерите е ентропийна – резултат от промяна на броя на състоянията им. В този смисъл еластичността на каучукът е подобна на еластичността на идеалния газ при нормални условия. Тя се получава от уравнението за състоянието. За един мол :

$$pV = RT$$

При постоянна температура, диференцирайки двете страни ще получим :

$$dpV + pdV = 0$$

$$dp = -p \frac{dV}{V} = p \frac{\Delta L}{L}$$

Следователно в този случай роля на модул на Юнг играе атмосферното налягане, което е  $p = 1 = 10^5 \text{ kg/m}^2$ . Вижда се, че получената стойност е от същия порядък както при каучука.

Аналогията между идеалния газ и свойствата на каучука не се изчерпва само с това съвпадение. Те имат и аналогични термодинамични свойства. Вътрешната

енергия на каучука практически не зависи от неговото разтегляне, както и вътрешната енергия на идеалния газ не зависи от неговото разширение или свиване. При *адиабатно* разтегляне (адиабатен се нарича процес, при който тялото не обменя топлина с околната среда), каучукът се нагрява аналогично на нагряването на идеалния газ при свиване.

От показаното е ясно, че еластичните свойства на полимерите имат напълно различен произход в сравнение със свойствата на твърдите тела. При твърдите тела еластичността възниква поради промяна на междоатомните разстояния, което води до увеличение на вътрешната енергия. Работа извършвана за изотермична деформация на каучука може да се представи като :

$$dA = dU - \delta Q \quad (3.1)$$

$$\delta Q = TdS, \quad dA = dU - TdS$$

където  $U$  е вътрешната енергия, а  $S$  е *ентропията* на газа,  $\delta Q$  е придадената топлина,  $T$  е абсолютната температура. Работата може да се представи като :

$$dA = fdL \quad ,$$

затова :

$$f = \left( \frac{\partial U}{\partial L} \right)_T - T \left( \frac{\partial S}{\partial L} \right)_T$$

Както вече казахме, опита показва, че вътрешната енергия на каучука не се почти не се променя при разтягането му, затова :

$$\left( \frac{\partial U}{\partial L} \right)_T \approx 0$$

и следователно :

$$f = -T \left( \frac{\partial S}{\partial L} \right)_T \quad (3.2)$$

т.е. еластичната сила възниква поради промяна на ентропията.

### 3.2.1 Ентропия на полимерна верига

Полимерната верига показана на фиг.3.3 а) се състои от  $N$  еднакви звена, всяко с дължина  $l$ , които са ориентирани по случаен начин едно спрямо друго. Можем да запишем :

$$\vec{R} = \sum_{i=1}^N \vec{r}_i$$

Повдигаме двете страни на уравнението на квадрат и получаваме :

$$R^2 = \sum_{i=1}^N r_i^2 + \sum_{i \neq j}^N \sum_j^N \vec{r}_i \cdot \vec{r}_j$$

Средната стойност на скаларното произведение  $\langle \vec{r}_i \cdot \vec{r}_j \rangle = \langle r_i r_j \cos \theta_{ij} \rangle = l^2 \langle \cos \theta_{ij} \rangle$  във второто сума е нула, понеже средната стойност на косинуса е нула, затова

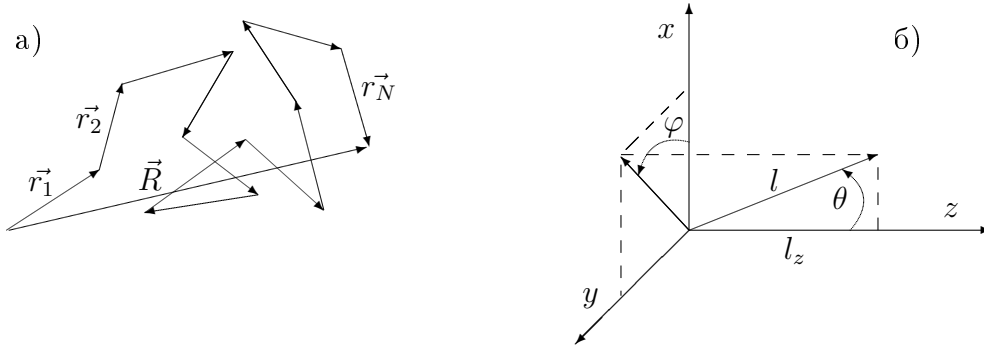
$$\langle R^2 \rangle = \sum_{i=1}^N \langle r_i^2 \rangle = Nl^2 = lNl = lL \quad ,$$

където с  $L$  сме означили пълната дължина на полимерната верига. Следователно средният размер на *стохастичното полимерно кълбо*  $R = \sqrt{\langle R^2 \rangle}$  е пропорционален на квадратен корен от дължината му.

$$R = \sqrt{lL} \quad (3.3)$$

В полимерна верига, където всички валентни ъгли, съединяващи звената са фиксирани и еднакви, а около единичните връзки е възможно въртене, средноквадратичния радиус е :

$$\langle R^2 \rangle = Nl^2 \frac{1 - \cos \theta}{1 + \cos \theta}$$



Фигура 3.3: Полимерното кълбо а), проекция на звено върху оста  $z$ .

Ние изведохме формулата за специален модел с независими сегменти. Може да се счита, че винаги съществува някаква ефективна дължина  $l_{ef}$ , такава, че участъкът по-къс от  $l_{ef}$  да се счита за практически твърд, а участъците с такава дължина за независими един от друг. Тя именно ще замени  $l$  във формула (3.3). Ефективните сегменти на конкретните полимерни вериги се различават силно – от 1nm за простите синтетични полимери, до 100 nm за ДНК. Дължината на човешката ДНК е от порядък на метър. От формула (3.3) се получава 0.3 nm. Това е твърде голям размер, като се има пред вид, че ДНК се намира вътре в клетъчното ядро с размер  $10^{-6}m$ , следователн ДНК е твърде силно опакована.

Размерът може да взема всички стойности от нула до максимално възможната. Ще намерим разпределението му. Да проектираме веригата върху оста  $z$ . При придвижване на една стъпка  $l$  в посока определена от пространствения ъгъл  $d\Omega$  (фиг.3.3 б), по  $z$  се придвижваме на разстояние  $l_z = l \cos \theta$ . Средно квадратичното на стъпката по  $z$  получаваме след осредняване по ъглите  $\theta$  и  $\varphi$ .

$$\langle l_z^2 \rangle = \frac{1}{4\pi} \int_0^\pi \int_0^{2\pi} (l \cos \theta)^2 d\Omega = \frac{l^2}{4\pi} \int_0^\pi \int_0^{2\pi} \cos^2 \theta \sin \varphi d\theta d\varphi = -\frac{l^2}{2} \int_0^\pi \cos \theta^2 d \cos \theta = \frac{l^2}{3}$$

$$\langle l_z^2 \rangle = \frac{l^2}{3} \quad (3.4)$$

Да предположим, че крайната ѝ точка се намира на разстояние  $ml_x$  от началото. Това може да стане при движение по  $N_+$  звена в положителна посока по  $x$  и  $N_-$  звена обратно, следователно :

$$\begin{aligned} N_+ + N_- &= N, & N_+ - N_- &= m \\ N_+ &= \frac{N+m}{2}, & N_- &= \frac{N-m}{2} \end{aligned}$$

Всички  $N$  звена могат да се подредят по  $N!$  начина. От тях ние можем да разбъркаме  $N_+!$  пъти "положителните" и  $N_-!$  пъти "отрицателните" звена, без да променим крайната конфигурация. Следователно всички възможности са :

$$\frac{N!}{N_+!N_-!}$$

Броят на всички възможности е :

$$\sum_{N_++N_-=N} \frac{N!}{N_+!N_-!} = \sum_{N_++N_-=N} \binom{N}{N_+} = (1+1)^N = 2^N,$$

следователно вероятността крайт да се намира на  $m$  звена от началото е :

$$P_m = \frac{N!}{2^N N_+! N_-!}$$

Като използваме, че  $m \ll N$  и формулата на Стирлинг :

$$N! \approx \sqrt{2\pi N} e^{-N} N^N$$

получаваме :

$$\ln P_m = \ln N! - \ln N_+! - \ln N_-! - N \ln 2$$

$$\ln N_{\pm} = \ln \left( N \left( 1 \pm \frac{m}{N} \right) \right) - \ln 2 = \ln N + \ln \left( 1 \pm \frac{m}{N} \right) - \ln 2 \approx \ln N - \ln 2 \pm \frac{m}{N} - \frac{m^2}{2N}$$

заместваме във формулата за  $\ln P_m$  и в крайна сметка получаваме :

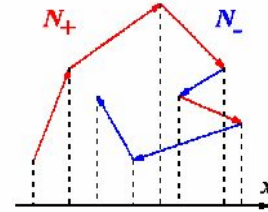
$$\ln P_m = \frac{1}{2} \ln 2 - \frac{1}{2} \ln(\pi N) - \frac{m^2}{2N},$$

следователно при не много големи стойности на  $m$  разпределението му е Гаусово :

$$P_m = \sqrt{\frac{2}{\pi N}} e^{-\frac{m^2}{2N}}$$

Аналогично разпределение се получава при проектиране на  $n$  звена върху оста  $y$  и  $k$  звена върху оста  $z$ . Трите оси  $x$ ,  $y$  и  $z$  са равноправни, затова :

$$\langle l_x^2 \rangle = \langle l_y^2 \rangle = \langle l_z^2 \rangle = \frac{1}{3} l^2$$



Фигура 3.4: Пресмятане на комбинациите.

съгласно формула (3.4). Като положим :

$$R^2 = m^2 l_x^2 + n^2 l_y^2 + k^2 l_z^2 = (m^2 + n^2 + k^2) l_z^2 = (m^2 + n^2 + k^2) \frac{l^2}{3},$$

където  $R^2$  е разстоянието от началото до края ще получим  $m^2 + n^2 + k^2 = 3R^2/l^2$  и затова :

$$P(R) = C e^{-\frac{3R^2}{2Nl^2}}$$

Константата  $C$  се определя от условието за нормировка. За ентропията получаваме :

$$S = k \ln P = -k \frac{3R^2}{2Nl^2} + const \quad (3.5)$$

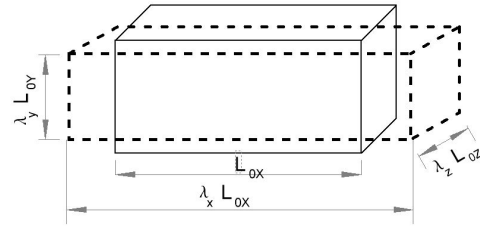
От уравнение (3.2) следва :

$$f = -T \left( \frac{\partial S}{\partial R} \right)_T = \frac{3kT}{Nl^2} R$$

т.е. еластичната сила е пропорционална на размера на полимерната верига, а модулът на Юнг е обратно пропорционален на броят на звената – за дългите молекули той е малък, пропорционалността му от температурата е следствие от ентропийната природа на еластичните сили.

### 3.2.2 Ентропия на полимерна мрежа

Реалните полимери са съставени не от отделни вериги, а от полимерни мрежи, показани на фиг.3.1, стр.27. Нека да си представим полимерната мрежа като паралелепипед, ориентиран по осите  $x, y, z$  на декартова координатната система. Нека да разтегнем мрежата по тези оси  $\lambda_x, \lambda_y, \lambda_z$  пъти (фиг.3.5). Предполагаме, че местата на свързване на отделните вериги (на фиг.3.1 в), стр.27 изобразени с черни кръгчета) се преместват пропорционално заедно с мрежата.



Фигура 3.5: Разтягане на полимерна мрежа.

Това означава, че ако  $\vec{R}_0$  е радиус векторът на края на една верига преди разтягането, след него той ще бъде  $\vec{R} = (\lambda_x R_{0x}, \lambda_y R_{0y}, \lambda_z R_{0z})$ . Съгласно уравнение (3.5) ентропията ще стане :

$$\Delta S = S(\vec{R}) - S(\vec{R}_0) = -\frac{3k}{2Nl^2} [(R_x^2 - R_{0x}^2) + (R_y^2 - R_{0y}^2) + (R_z^2 - R_{0z}^2)]$$

$$\Delta S = -\frac{3k}{2Nl^2} [(\lambda_x^2 - 1)R_{0x}^2 + (\lambda_y^2 - 1)R_{0y}^2 + (\lambda_z^2 - 1)R_{0z}^2]$$

За да получим ентропията на мрежата трябва да сумираме горния израз по всички полимерни вериги. Ако означим с  $\nu$  броят им в единица обем, пълният им брой в

обема  $V$  и  $\nu V$  и пълната ентропия се получава след сумиране по всички вериги и усредняване :

$$\Delta S = -\frac{3k\nu V}{2Nl^2} [(\lambda_x^2 - 1) \langle R_{0x}^2 \rangle + (\lambda_y^2 - 1) \langle R_{0y}^2 \rangle + (\lambda_z^2 - 1) \langle R_{0z}^2 \rangle]$$

В неразтегления образец :

$$R_0^2 = R_{0x}^2 + R_{0y}^2 + R_{0z}^2 = Nl^2$$

и понеже трите координати са напълно равноправни можем да запишем за средните стойности :

$$\langle R_{0x}^2 \rangle = \langle R_{0y}^2 \rangle = \langle R_{0z}^2 \rangle = \frac{1}{3} \langle R_0^2 \rangle = \frac{Nl^2}{3}$$

Получаваме окончателно :

$$\Delta S = -k\nu V(\lambda_x^2 + \lambda_y^2 + \lambda_z^2 - 3)/2$$

Вижда, се, че от крайния израз изчезнаха детайлите за мрежата  $(N, l)$ , което ни дава основание да смятаме, че полученото съотношение е универсално.

Да разгледаме какво ще се получи при разтягане на полимерен образец по една ос,  $\lambda_x = \lambda$ . Вискоеластичният полимер има поведение на течност – за да се измени обемът му с 1% е необходимо да се приложи голямо налягане от порядъка на 100 атмосфери. Затова при това разтягане можем да считаме обемът му за постоянен. Ако приемем, че  $\lambda_y = \lambda_z$  това води до :

$$\lambda_x \lambda_y \lambda_z = 1, \quad \lambda_y^2 \lambda = 1, \quad \lambda_y = \lambda_z = \lambda^{1/2}$$

Заместваме във формулата за ентропията и получаваме

$$\Delta S = -k\nu V \left( \frac{\lambda^2 + 2/\lambda - 3}{2} \right)$$

Силата, с която се разтегля полимера се пресмята по формула (3.2 стр.30), като използваме, че  $dL_x = L_{0x} d\lambda$

$$f = -\frac{T}{L_{0x}} \frac{dS}{d\lambda} = kT\nu \frac{V}{L_{0x}} (\lambda - \lambda^{-2})$$

За напрежението  $\sigma = f/S = f/(L_{0y}L_{0z})$  получаваме :

$$\sigma = kT\nu(\lambda - \lambda^{-2}) \quad (3.6)$$

Като използваме, че относителната деформация е  $\Delta L/L = (L_x - L_{0x})/L_x = \lambda - 1$ , а при малки деформации  $\lambda \approx 1$ , получаваме :

$$(\lambda - \lambda^{-2}) = \frac{\lambda^3 - 1}{\lambda^2} = \frac{(\lambda - 1)(\lambda^2 + \lambda + 1)}{\lambda^2} \approx 3(\lambda - 1)$$

и за модулът на Юнг  $E = 3\nu kT$ . Следователно варирайки броя на сшивките  $\nu$  между полимерните вериги можем да променяме модулът на Юнг. Уравнение



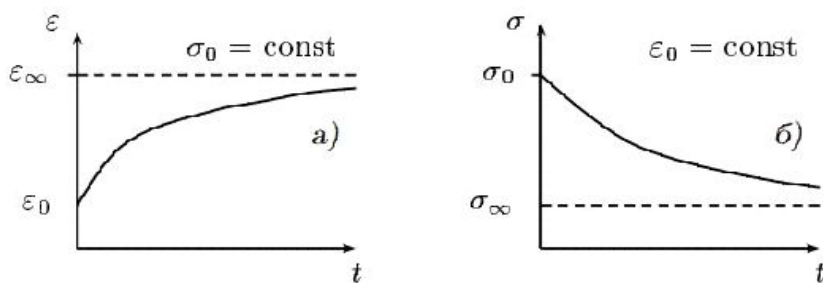
(3.6) ни дава не просто модулът на Юнг, то описва и нелинейната еластичност – участъка от точка А до точка В на фиг.3.2 б), стр.29. Формулата описва добре експерименталните резултати до стойности  $\lambda \sim 5$ . При по-големи стойности разпределението на размера на полимерното кълбо силно се отклонява от Гаусовото, понеже достига до максималната дължина на веригата, което променя формулата за ентропията.

Формула (3.6) води до интересен резултат - при увеличаване на температурата модулът на Юнг се увеличава, което означава, че една каучукова лента се сви-ва при нагряване. Този ефект е противоположен на удължаването на стоманена лента при нагряване. Разликата идва от начина по който се държат молекулите на полимера и атомите на кристалната решетка - при стоманата вследствие на анхармоничните колебания кристалната решетка увеличава размерите си при нагряване.

Изследванията на еластичността на полимерите показва, че свиването им в кълба се определя от верижния им строеж, т.е. едромащабният им строеж, а не от дребномащабните им особености на химическия им строеж и взаимодействието между отделните звена.

### 3.3 Вискозоеластичност

Експериментите, проведени през 19-ти век, показват, че редица тела притежават едновременно и еластични, и вискозни свойства. Такъв феномен е описан за пръв път от Вебер (1839), който решава да определи експериментално модула на Юнг на копринена нишка. За целта той прилага сила  $F_0$  и измерва съответната деформация. В момента на прилагането на силата се появява мигновена деформация  $\epsilon_0$ , което е естествено за всяко еластично тяло. Тя обаче не остава постоянна. За изумление на Вебер нишката започва да „тече“, в смисъл че при постоянна сила  $F_0$  деформацията започва да расте с времето, приближавайки се асимптотично към стойност  $\epsilon_\infty$ . Изменението на деформацията при неизменно натоварване, което днес се нарича *пълзене*, е характерно за редица тела, така че копринената нишка се оказва вискозоеластична среда - тяло, проявяващо едновременно и еластични, и вискозни свойства.



Фигура 3.6: Типични криви а) на пълзене и б) на релаксация на полимери.

Родствено на пълзенето е и явлението релаксация. При него се поддържа постоянна деформацията  $\epsilon_0$ , а се измерва напрежението  $\sigma$ , възникващо в опъната ниш-

ка. Ефектът на вискозоеластичността тук се проявява в намаляването на напрежението с течение на времето.

### 3.3.1 Модел на рептациите

В зависимост от честотата на външно то въздействие полимерите се държат или като обикновени нискомолекулни течности, или като еластични твърди вещества.

Основният факт е, че тъй като веригите не могат да преминават една през друга, всяка верига е уловена в някакъв вид тръба, създадена от средата, така че движението в посока, перпендикулярна на оста на тръбата е блокирано и единственият възможен тип движение е пълзене по тръбата.

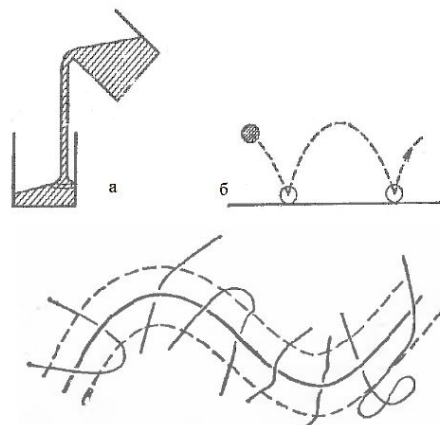
Движения като пълзене по тръбата се наричат *рептации* (от лат. reptatio - пълзене). Съответният модел на динамиката на полимерните течности се нарича рептационен модел.

Преди появата на модела на рептация, описаните експериментални данни са интерпретирани по следния начин. Смята се, че в достатъчно концентриран разтвор от полимерни вериги има така наречените квазисшивки на различни макромолекули. От обикновените постоянни сшивки, дължащи се например на валентни химични връзки, квазисшивките се отличават с това, че „живеят“ кратко време от порядъка на  $\tau^*$ , а след това релаксират, образуват се квазисшивки на нови места и т.н. В резултат на това при  $t \ll \tau^*$ , когато напречните връзки все още не са имали време да релаксират, пробата се държи като еластична, а при  $t \gg \tau^*$  започва да тече. Моделът на рептациите дава молекулно обяснение на квазисшивките.

## 3.4 Взаимодействия между звената на макромолекулите

Взаимодействията между атомите в биологичните молекули са преди всичко ковалентни химични връзки. Енергията за разкъсването една  $C-C$  връзка е 3.62 eV, а на  $N-C$  е 3.49 eV. Тяхната теория се дава от *квантовата химия*. Биологичните молекули не биха могли да съществуват обаче, ако освен тези силни взаимодействия не съществуваха по-слаби, които са невалентни, нехимически слаби сили. Те позволяват да се сформира по-висшата структура на белтъците, като същевременно позволяват на молекулите да имат по-голяма подвижност, необходима за извършването на тънката регулация за протичането на химичните реакции. Ще изброим видовете слаби взаимодействия в биологичните системи.

1. *Йонни сили*. Енергията на взаимодействие между два заряда  $q_1$  и  $q_2$  се дава



Фигура 3.7: а) Силикон изтича от съд б) силиконово топче отскача от повърхност.

от закон на Кулон

$$U = \frac{q_1 q_2}{4\pi\epsilon_0 \epsilon r}$$

Това взаимодействие възниква между заредените групи в белтъчините, например  $-$  и  $+$ .

2. *Йон-диполни взаимодействия* – определят се от заряда на йона и диполния момент на полярните групи в молекулите.
3. *Ориентационните сили* възникват между диполите. Енергията на взаимодействието е :

$$U = \frac{1}{4\pi\epsilon_0 \epsilon r^3} \left( \vec{p}_1 \cdot \vec{p}_2 - \frac{3(\vec{p}_1 \cdot \vec{r})(\vec{p}_2 \cdot \vec{r})}{r^2} \right)$$

Топлинното движение разрушава стремежът на диполите да се ориентира успоредно един на друг, усреднявайки по възможните ориентации, за енергията на взаимодействието се получава :

$$U \sim -\frac{p_1^2 p_2^2}{kT r^6}$$

4. *Индукционни сили*. Тяхната енергия има същият вид, обаче диполният момент на молекула или група атоми в молекула, възниква под действието на диполният момент на друга молекула.
5. *Дисперсионните сили* имат квантова природа. Енергията им отново зависи по същият начин от разстоянието.

Последните три вида сили се наричат *Ван-дер-Ваалсови*. Енергията им е от порядъка на 0.1 eV, която съответсува на енергията необходима за изпарение на течностите. Общият вид на енергията се дава от потенциалът на Ленард-Джонс :

$$U = \epsilon \left( \left( \frac{r_0}{r} \right)^{12} - \left( \frac{r_0}{r} \right)^6 \right) \quad (3.7)$$

който е показан на фиг.3.8.

6. *Водородните връзки* са специфични донорно-акцепторни взаимодействия, възникващи между атомите  $H$  в групите  $O-H$ ,  $N-H$ ,  $F-H$ ,  $Cl-H$  и понякога  $S-H$ . Водородните връзки, например определят свойствата и структурата на водата. Тя води до образуване на асоциации от молекули, водещи до съществено изменение на свойствата им, които биха имали без нея. Така например ако липсваха такива връзки, водата би кипяла при  $-80^\circ C$  при нормално налягане и би имала до два пъти по-нисък вискозитет. Така се обяснява и аномалното повишение на плътността при  $4^\circ C$ , когато асоциациите се разрушават в резултат на топлинното движение. Енергията ѝ е от порядъка на 0.03 eV.

7. *Хидрофобни взаимодействия.* Биополимерите функционират предимно във водни разтвори. Хидрофобните сили са сили на отблъскване, които възникват между атомни групи и водните молекули. Това е ентропиен ефект, определен от структурата на водата. Тези взаимодействия играят важна роля при формирането на структурата на белтъците, в мембраните и др.

Всички взаимодействия, които не се свеждат към ковалентни връзки със съседни по звено се наричат *обемни взаимодействия*. В първо приближение те могат да се пренебрегнат – така се получава моделът на идеалната полимерна верига, който разгледахме в предишната глава. Видяхме, че в неговите рамки може да се опише високоеластичността на полимерните материали. За обяснението на повечето явления в полимерните системи това приближение обаче е недостатъчно.

За да се разбере целият спектър от разнообразни свойства на реалните полимери е необходимо да се отчитат обемните взаимодействия – както взаимодействията между звената на различни макромолекули, така и между несъседните звена на една полимерна верига.

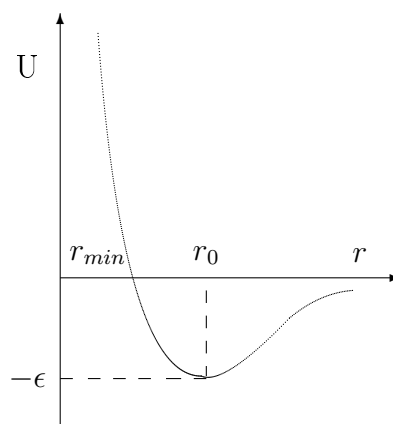
Общият вид на взаимодействието между звената има вида показан на фиг.3.8. При малки  $r$  енергията е голяма и положителна, съответстваща на силно отблъскване, което отговаря на непроницаемост на звената, т.е. всяко звено заема определен обем, недостъпен за другите звена – *изключен обем*. При големи  $r$  силите действащи между звената са на привличане, а на минимума на разстояние  $r_0$  (таблица 3.1) съответствува състояние на равновесие, когато силата е нула.

Ако характерната енергия на взаимодействието  $\epsilon$  (фиг. 3.8) е голяма в сравнение с енергията на топлинното движение  $kT$ , то силите на привличане играят основната роля и макромолекулите се свиват в сравнение с обема на идеалната молекула. Тя преминава в състояние на *полимерна глобула*.

Ако  $\epsilon$  е по-малка от  $kT$  притеглянето между звената играе по-малка роля и полимерното кълбо бухва. Тъй като отблъскването на малки разстояния е свързано с обема, който изключва едно звено от обсега на другите, бухването на кълбото се нарича *ефект на изключения обем*.

Когато полимерът е разтворен, енергията на взаимодействие между звената има същият вид като на фиг.3.8, в този случай тя включва и работата необходима за изтласкване на молекулите на разтворителя от пространството между звената. Функцията  $U(r)$  характеризира ефективното взаимодействие на звената през средата, например в закона на Кулон това става чрез относителната диелектрична константа  $\epsilon$  на разтворителя. Тя зависи от неговия състав и температурата.

Вследствие на обемните взаимодействия плътността и броя на звената в пространството заето от макромолекулата може да се изменя от точка в точка. Ако в нея нямаше обемни взаимодействия то флуктуациите на плътността щяха да



Фигура 3.8: Зависимост на енергията от разстоянието.

бъдат от порядъка на самата плътност. Такова състояние се нарича *полимерно кълбо*. Неговият среден размер се дава от формула (3.3), стр.31. Наличието на обемни взаимодействия води до това, че флуктуациите на плътността са малки в сравнение със самата плътност. Това плътно състояние, наречено *глобула*, има определена компактна пространствена структура. Сърцевината ѝ е пространствено еднородна с постоянна концентрация на звената.

Връзка	енергия $\epsilon$ , meV	$r_0$ Å	$r_{min}$ Å	атом	Ван дер Ваалсов радиус Å
H – H	5.2	2.4	2.0		
H – C	4.8	2.9	2.4	H	1.2
C – C	5.2	3.4	3.0	C	1.7
O – O	10	3.0	2.7	O	1.52
N – N	8.7	3.1	2.7	N	1.55
$CH_2 - CH_2$	22	4.0	3.0	$CH_2$	4.3

Таблица 3.1: Характерни параметри на Ван дер Ваалсовото взаимодействие.

## 3.5 Разтваряне на биополимерите

### 3.5.1 Добър разтворител, лош разтворител, $\Theta$ -условия

Разтварянето в разтворител зависи от вида на  $U(r)$ . Енергията на взаимодействие между звената на макромолекулата може да се разложи в ред по концентрацията – броят звена в единица обем  $n$ .

$$U = VkT(Bn^2 + Cn^3 + \dots) \quad ,$$

където  $V$  е обемът, а коефициентите  $B$  и  $C$  напълно определени от температурата и от функцията  $U(r)$ , се наричат *вириални коефициенти*,  $B$  се нарича втори  $C$  трети и т.н., по аналогия със разлагането, което се прави при уравнението на реалния газ. Първият член отговаря на взаимодействието на звената по двойки, затова той е пропорционален на  $n^2$ , вторият отговаря на тройните взаимодействия и т.н.

Да разгледаме звената намиращи се в обем  $V$  и да означим с  $w$  вероятността около едно звено да има друго, с което то да взаимодействува. Ако имаме  $N$  звена, то вероятността за двойни взаимодействия е пропорционално на  $Nw$ , на тройните  $Nw^2$  и т.н. за  $p$ -кратните взаимодействия вероятността ще бъде  $Nw^{p-1}$ . Ако означим собствения обем на едно звено с  $V_0$ , тогава частта от обема на макромолекулата заета от звената ще бъде  $\frac{NV_0}{V}$ .

Размерът на идеалната макромолекула определихме като  $\langle R_0^2 \rangle = Nl^2$ , затова  $V \sim R_0^3 \sim N^{3/2}l^3$  и оценката ни за частта на заетия обем става :

$$N^{-1/2} \frac{V_0}{l^3} \ll 1$$

Вероятността  $w$  е пропорционална на тази част, затова за вероятността за  $p$ -кратните взаимодействия получаваме :

$$Nw^{p-1} \sim N^{(3-p)/2} \left( \frac{V_0}{l^3} \right)^{p-1}$$

Тъй като  $N$  е голямо, при  $p > 3$  степента на  $N$  става отрицателна и вероятността за четирикратни и т.н. взаимодействия става пренебрежима.

При високи температури  $kT \gg \epsilon$ , следователно, преобладава отблъскването, това означава, че енергията  $U$  и следователно втория вириален коефициент  $B$  са положителни. При ниски температури  $U$  и  $B$  стават отрицателни. За тези два случая говорят като за добър и лош разтворител. В добрия разтворителят преобладава отблъскването и макромолекулите ще се разтворят в него, а ако доминира привличането, звената на макромолекулите ще се притеглят и ще се образува утайка.

При изменение на температурата или съставът на разтворителя качеството му се променя. Температурата  $\Theta$ , при която вторият вириален коефициент се нулира се нарича  $\Theta$  *температура*. В тази точка привличането и отблъскването се компенсират и полимерното кълбо има поведението на идеално. При  $T > \Theta$  разтворителят е добър, а при  $T < \Theta$  – лош. Съществуването на  $\Theta$  точка е възможно поради това, че останалите членове във вириалното разложение са малки. Това е резултат от малката концентрация  $n \sim N^{-1/2}$  на звената в полимерното кълбо. За сравнение – реалните газове при  $B = 0$  не стават идеални, при тях тройните взаимодействия остават некомпенсирани.

В случая, когато има обемни взаимодействия вътрешната енергия престава да зависи само от температурата – аналогично на реалните газове. В този случай термодинамичното равновесие на системата се достига не при максимум на ентропията, а при минимум на *свободната енергия* :

$$F = U - TS$$

Формулата за размера на полимер, съставен от  $N$  звена, всяко с дължина  $l$ , изведохме при предположение за случайно разположение на звената без да отчитаме техния обем, което предполага възможност за самопресичане. Получихме (формула 3.3), че  $\langle R_0^2 \rangle \sim N$ . Наличието на изключен обем води до забрана за самопресичането води до друга зависимост :

$$\langle R^2 \rangle \sim N^{6/5}.$$

Резултатът, получен чрез компютърно моделиране, показва, че в този случай макромолекулите става по-режави, а флуктуациите на концентрацията на звената се увеличават.

### 3.5.2 Бухване на полимерното кълбо в добър разтворител

За характеризирание на реалните макромолекули в разтвори се въвежда *коэффициент на бухване* определен от формулата :

$$\alpha^2 = \frac{\langle R^2 \rangle}{\langle R_0^2 \rangle},$$

където  $R_0^2$  се дава от (3.3, стр.31).

Коефициентът на бухване най напред е бил изчислен от Флори през 1949г. Факторите, които действувайки в различни посоки, водят до определянето на  $\alpha$ , са от една страна ентропията, която намалява поради намаляването на броя на възможните конфигурации, а от друга промяната на вътрешната енергия. Като се ограничим до втория вириален коефициент енергията става:

$$U(\alpha) = V k T n^2 B$$

Ако използваме следните оценки:

$$V \sim R^3, \quad n \sim \frac{N}{R^3}, \quad \alpha = \frac{R}{R_0} = \frac{R}{N^{1/2} l}$$

получаваме, че вътрешната енергия е:

$$U(\alpha) \sim k T B \frac{N^{1/2}}{l^3 \alpha^3} = K \frac{k T B N^{1/2}}{l^3 \alpha^3},$$

където с  $K$  сме означили точният, непресметнат от нас числов фактор, който е от порядъка на единица.

За ентропията на полимерната верига по-рано получихме уравнение (3.5, стр.33), което можем да изразим чрез  $\alpha$  във вида:

$$S = -k \frac{3R^2}{2Nl^2} + const = -\frac{3}{2} k \alpha^2 + const$$

За свободната енергия ще получим :

$$F(\alpha) = const + K \frac{k T B N^{1/2}}{l^3 \alpha^3} + \frac{3}{2} k T \alpha^2$$

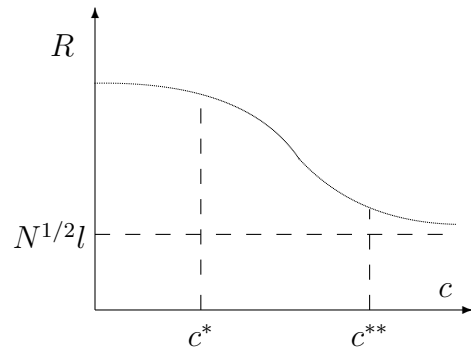
Минимумът ѝ се получава при стойност на  $\alpha$  :

$$\alpha^5 = \frac{K B N^{1/2}}{l^3},$$

следователно за средноквадратичния размер на макромолекулата получаваме същата зависимост от  $N$  както и в резултат на моделиране :

$$R^2 = \alpha^2 R_0^2 \sim N^{6/5} (B l^2)^{2/5} \quad (3.8)$$

Ситуацията, когато съществуват отделни изолирани полимерни кълба е характерна за разтворите. При някаква концентрация се достига до положение, когато средната концентрация на молекули в разтвора е малка, но от друга отделните кълба са заплетени едно в друго. Това се случва, когато тя стане по-голяма от средната концентрация  $c^*$  на звена в отделното кълбо. Такъв разтвор се нарича *полуразреден*.



Фигура 3.9: Размер на полимерното кълбо в зависимост от концентрацията.

Например въз основа на казаното в предишния раздел можем да пресметнем, че средната концентрация на звена, т.е. броят им в единица обем в случая на изключен обем е :

$$c^* = \frac{N}{V} \sim \frac{N}{R^3} = l^{-3}(B/l^3)^{-3/5}N^{-4/5} \quad ,$$

следователно при дълги вериги ( $N \gg 1$ )  $c^*$  е малко.

Средно квадратичният радиус  $R$  зависи от концентрацията на разтвора. При малки концентрации ( $c < c^*$ ) отделните кълба са разделени и размерът се дава от оценката (3.8), която получихме в случая на изключен обем. При големи концентрации ( $c > c^* \sim B/l^6$ ) бухването за сметка на изключения обем се прекратява и размерът става като при идеалния полимер  $R \sim N^{1/2}l$ . В частност бухване липсва и в полимерен разплав, когато разтворител въобще липсва и  $c$  приема максималното възможно значение.

### 3.6 Полимерни кълба и глобули

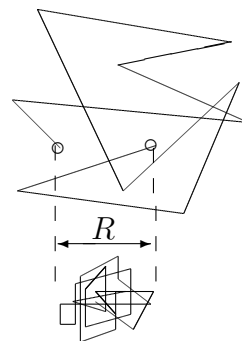
Когато говорим за полимерно кълбо, не трябва да си представяме кълбо прежда. Нишката прежда прилича на полимерна верига, но в кълбото прежда тя е навита много плътно, без празнини между слоевете, докато полимерната верига се разполага доста свободно в пространството.

В предишния раздел видяхме, че при понижаване на температурата на полимерен разтвор или добавяне на вещество предизвикващо утаяване, се достига до  $\Theta$  точка, при прехода на която започва да играе по-голяма роля привличането между звената. Когато то стане достатъчно силно, в макромолекулата настъпва преход от типа газ – течност, участъци от полимерната верига спонтанно "кондензират" и в резултат възниква плътно опакована *глобула*. Този преход се нарича *преход кълбо – глобула*.

Интересът към полимерните глобули и преходът кълбо – глобула е бил предизвикан от потребностите на молекулната биофизика. Макромолекулите на белтъците – ферменти, които са едни от най-важните биологични макромолекули, обикновено съществуват в живата клетка под формата на плътни глобули.

При нагриване или изменение на състава на разтворителя те могат да се *денатурират*, при което рязко променят биохимичната си активност. Денатурацията е рязък кооперативен конформационен преход. Тя може да бъде обратима и необратима. Обратният процес на денатурация се нарича *ренатурация*.

Първите изследователи са предполагали, че изучаването на прехода кълбо-глобула ще помогне за разбирането на механизма на денатурацията на белтъците, тъй като и в двата случая става разрушаване на плътната структура на макромолекулата. В последствие се изяснило, че не може да се направи еднозначно



Фигура 3.10: Полимерно кълбо и глобула.



съответствие между двата процеса. Въпреки това интересът към изучаване на прехода кълбо–глобула не е намалял. Сега ние знаем, че глобулярните състояния често се срещат не само при белтъците, но и в други системи – от ДНК до макроскопичните полимерни мрежи, и че много явления – от образуването на компактна форма на ДНК до колапса на полимерните мрежи, може да се опише като преход кълбо–глобула.

На стр.33 ние получихме формула (3.5) за ентропията на полимерно кълбо. Тя обаче е в сила само за него, т.е. когато коефициентът на бухване  $\alpha > 1$ . Формулата е неприложима, когато  $\alpha < 1$  защото за да се получи ентропията на глобулата не е достатъчно само двата края на полимерната верига да са на разстояние  $R$ , а и цялата макромолекула да бъде вътре в област с такъв размер, както е вижда от фиг.3.10. На нея началото и краят на полимерното кълбо са показани с кръгчета.

Пресмятанията показват, че в този случай ентропията е пропорционална не на  $\alpha^2$ , а на  $\alpha^{-2}$ . С отчитането на тази особеност свободната енергия на макромолекулата се описва с функцията :

$$F(\alpha) = kT(\alpha^2 + \alpha^{-2}) + kT \frac{BN^{1/2}}{l^3\alpha^3} + kT \frac{C}{l^6\alpha^6} \quad (3.9)$$

В тази формула са изпуснати коефициентите от порядъка на единица, които отчетохме по-рано и е включен третият вириален член. Тя е справедлива както при  $\alpha > 1$ , т.е. в областта на бухването на полимерното кълбо, така и при  $\alpha < 1$ , т.е. в областта на прехода кълбо – глобула. При минимизацията на тази функция е възможно да се получат няколко минимума – получава се крива аналогична на изотермите на реалния Ван дер Ваалсов газ.

За разлика от идеалния полимер, когато  $R \sim N^{1/2}$  и от случая на изключен обем, когато  $R \sim N^{3/5}$ , в случая на глобула  $R \sim N^{1/3}$ , което означава, че плътността  $N/R^3$  става постоянна, по което глобулата прилича на свойствата на течна капка. Данните от рентгеноструктурния анализ показват, че атомите в белтъчните глобули са разположени плътно, като в кристал, всеки на своето място. Тъй като обаче липсва периодичност в тяхното подреждане, то се използва термина аперодичен кристал, взет от книгата на Шрьодингер "Какво е животът от гледна точка на физиката". Аргумент в полза на описанието на белтъчните глобули като квазитвърдо тяло е и тяхният модул на Юнг – за влажен белтък той е от порядъка на  $10^9 Pa$ , при дехидратация той се повишава 5 – 6 пъти, а при денатурация се намалява хиляда пъти.

Изследването на динамиката на белтъците с метода на Мьосбауеровата спектроскопия, която позволява да се регистрират атомни премествания на части от ангстрьома ( $10^{-10}m$ ) за време от порядъка на наносекунди е показало, че те се проявяват едновременно и като твърди тела и като течности. Тези изследвания са потвърдили компютърните модели, които показват, че движението в глобулата се осъществяват подобно на движение в течност. С помощта на мьосбауеровата спектроскопия може да бъде измерен вискозитетът на тази квазитечност. Оказва се, че при стайна температура той е  $10 Pa \cdot s$ , а при  $-100^\circ$  той нараства 100 пъти. Подобен вискозитет има в горещ ден капка борова смола. За сравнение при стайна температура вискозитетът на водата е 0.001, а на чистият глицерин е  $1 Pa \cdot s$ .

Моделът на белтъчната глобула като механична система се състои от твърд спирален скелет с модул на елестичност  $10^9 Pa$ , потопен в течност с вискозитет

$10Pa \cdot s$ . Характерните времена на флуктуациите на усукване на скелета с амплитуда от няколко ангстрьома са от порядъка на микросекунди. Ролята на течността изпълняват странични за скелета групи, трептящи с период от порядъка на наносекунди.

Подобна двойствена природа не е нещо уникално за белтъчната глобула. Всички тела в някаква степен притежават вискозно–еластични свойства. Нашите усещания за тях са обусловени от характерното време, за което структурата на материала се преустройва под действието на определена сила. Това характерно време  $\tau$  се определя от отношението на вискозитета към модула на Юнг  $\tau = \eta/E$ . За стоманата  $\eta \approx 10^{21} Pa \cdot s$ , а  $E \approx 10^{11} Pa$ , затова времето ѝ на релаксация е  $\tau \approx 10^{10} s = 3 \cdot 10^4$  години, докато за белтъчната глобула то е  $\tau = 10^{-8} s$  - това е характерното време за конформационна релаксация на белтъка.

### 3.6.1 Фазови преходи в белтъците

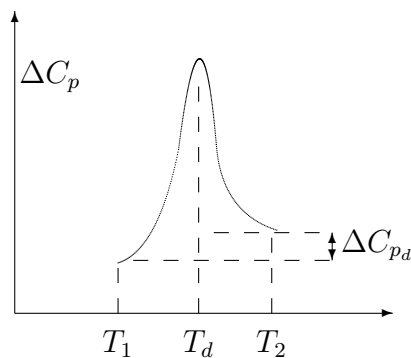
Преходите между състоянията кълбо–глобула са преходи между различни фази, което е съпроводено с изменение на агрегатното състояние на макромолекулите. *Фазовите преходи* от първи род са свързани с топлинни ефекти, при тях ентропията, вътрешната енергия и специфичния обем се менят със скок, в следствие на отделянето на крайно количество топлина при прехода. Пример за такъв преход е топенето на леда. Фазовите преходи от II вид протичат без термични ефекти, при тях топлемността се променя със скок, а ентропията, вътрешната енергия и специфичния обем са непрекъснати.

Пример за такъв процес е прехода феромагнетик – парамагнетик при преминаване през точката на Кюри. При него ориентацията на спиновете на електроните в металната решетка става хаотична – структурата се променя със скок, а с това и магнитните свойства.

Белтъчните молекули претърпяват преходи от типа ред – безпорядък в относително малък температурен интервал и в този смисъл напомнят фазов преход от първи род. Калориметричните измервания позволяват да се изследва зависимостта на специфичната топлемност от температурата.

При измерванията, към образеца поставен в калориметър, се подава топлина със скорост  $dQ/dt = v_Q$  и се регистрира скоростта на изменение на температурата му  $dT/dt = v_T$ . Топлемността  $C_p$  при постоянно налягане се определя по формулата  $C_p = \frac{v_Q}{v_T}$

Целият температурен интервал  $(T_1, T_2)$  се разделя на две области – денатурационна  $(T_1, T_d)$  и неденатурационна  $(T_d, T_2)$ . В процеса на топлинна денатурация протича изменение на топлемността на биополимера при прехода от спирално (глобула) състояние към денатурирано (кълбо) (фиг. 3.11). Експериментите показват, че денатурационното изменение е доста съществено и достига  $\Delta C_{pd} = 400\text{--}600 \text{ J/kgK}$ , като в разтвори се намалява до 2 пъти.



Фигура 3.11: Изменение на топлемността на биополимери.

Преходът къ̀лбо–глобула протича плавно, но в тесен температурен интервал. Изследването на минимума на уравнение (3.9) води до извода, че преходът става при малко по–ниска температура от  $\theta$ , като :

$$\frac{\theta - T}{\theta} \sim N^{-1/2} \ll 1$$

При преминаване от глобула към къ̀лбо, т.е. при доближаване отдолу до  $\theta$  температурата вторият вириален коефициент клони към нула и глобулата разбухва.

Експериментално прехода къ̀лбо–глобула се изследва с различни методи – измерване на вискозитета, осмотичното налягане, разсейване на неутрони, разсейване на лазерно лъчение, поляризирана луминисценция.

## 3.7 Осмотично налягане

### 3.7.1 Осмотично налягане на полимерния разтвор

Много важни свойства на полимерите в разтвора се обясняват с големия размер на молекулите. Те не преминават през полупропускливи мембрани, през които преминава разтворителя и веществата с ниско молекулно тегло. Например, правят се целофанови мембрани, които се използват за отстраняване на вещества с ниско молекулно тегло от разтвори, които съдържат протеини - това е метода на диализата.

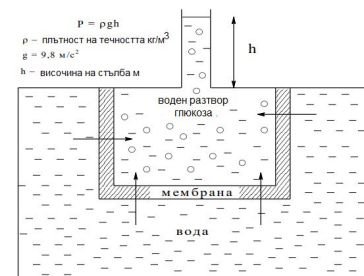
Ако разделим разтвора от чистия разтворител с полупропусклива мембрана, тогава се наблюдава *осмоза* – молекулите на разтворителя преминават през мембрана, докато концентрацията от двете страни се изравни. Това създава допълнително налягане върху преградата – *осмотично налягане*.

В разреден разтвор ( $c \ll c^*$ ) на неприпокриващи се къ̀лба, осмотичното налягане е допълнителното налягане, дължащо се на налягането на макромолекулите върху преградата. Тъй като броят на къ̀лбата в единица обем е пропорционален на  $c/N$ , осмотичното налягане  $\pi = \frac{c}{N}kT$ ,  $N \gg 1$  (броят на звената). Когато концентрацията на полимерния разтвор достигне  $c^*$ , къ̀лбата започват да се смесват и в полуразредения разтвор при  $c \gg c^*$  отблъскването на звената допринася по–силно за налягането, отколкото трансляционното брауново движение на цели къ̀лба. Къ̀лбото има само един характерен макроскопичен размер  $R$ , следователно има само една характерна концентрация  $c^* \sim \frac{N}{R^3}$  и затова :

$$\pi = \frac{c}{N}kTf\left(\frac{c}{c^*}\right)$$

В полурзреден разтвор т.е. при  $c \gg c^*$  е установено, че:

$$f\left(\frac{c}{c^*}\right) \sim \left(\frac{c}{c^*}\right)^{5/4}$$



Фигура 3.12: Измерване на осмотично налягане.

Причината за несъответствието е, че колебанията в концентрацията на звената не са взети предвид. Разредените и неразредените разтвори на полимерни кълба се колебаят силно и пренебрегването на колебанията за тези системи води до значителни грешки. С увеличаването на концентрацията разликата между тези резултати намалява. Това показва, че ролята на флукуациите намалява с концентрацията - в концентриран разтвор те обикновено са незначителни.

### 3.7.2 Осмотично налягане при животни и растения

Осмотичното налягане в клетките на животните, растенията, микроорганизмите и в биологичните течности зависи от концентрацията на веществата, разтворени в техните течни среди. Солевият състав на биологичните течности и клетки, характерен за организмите от всеки вид, се поддържа от селективната пропускливост на биологичните мембрани за различни соли и активния транспорт на йони. Относителното постоянство на осмотичното налягане се осигурява от водно-солевия метаболизъм, т.е. абсорбцията, разпределението, консумацията и екскрецията на вода и соли.

При т.нар. хиперосмотични организми вътрешното осмотично налягане е по-голямо от външното, при хипоосмотични организми то е по-малко от външното; при изоосмотичните вътрешното осмотично налягане е равно на външното. В първия случай йоните се абсорбират активно от тялото и се задържат в него, докато водата навлиза през биологичните мембрани пасивно, в съответствие с осмотичния градиент. Хиперосмотичната регулация е характерна за сладководните организми, морските хрущялни риби (акули, скатове) и всички растения.

Организмите с хипоосмотична регулация имат адаптации за активно отделяне на соли. При костните риби йоните  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ , преобладаващи в океанските води, се отделят през хрилете, при морските влечуги (змии и костенурки), а при птиците - чрез специални солни жлези, разположени в областта на главата.  $\text{Mg}^{2+}$  йони, се секретират в тези организми през бъбреците.

Осмотичното налягане в хипер- и хипоосмотични организми може да се създаде както от йони, преобладаващи във външната среда, така и от метаболитни продукти. Например при акули и скатове 60% от осмотичното налягане се създава от урея и триметиламоний; в кръвната плазма на бозайници - главно поради  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  йони; в ларви на насекоми - поради различни нискомолекулни метаболити. Морските едноклетъчни, бодлокожите, главоногите мекотели, миксините и други изоосмотични организми, при които осмотичното налягане се определя от осмотичното налягане на външната среда и е равно на него, нямат механизми на осморегулация (с изключение на клетъчните).

Диапазонът на средните стойности на осмотичното налягане в клетките на организми, които не са в състояние да поддържат осмотична хомеостаза, е доста широк и зависи от вида и възрастта на организма, вида на клетките и осмотичното налягане на околната среда. При оптимални условия осмотичното налягане на клетъчния сок на сухоземните органи на блатните растения варира от 2 до 16 atm, а в степните растения - от 8 до 40 atm. В различните клетки на растението осмотичното налягане може да варира драстично (например в мангровите дървета осмотичното налягане на клетъчния сок е около 60 atm, а осмотичното налягане в съдовете на ксилема не надвишава 1 — 2 atm). При хомоосмотични организми, т.е.

способни да поддържат относително постоянство на осмотичното налягане, средната стойност и диапазонът на колебанията в осмотичното налягане са различни (земни червеи - 3,6–4,8 atm, сладководни риби - 6,0 – 6,6, океански костни риби - 7,8 – 8,5, акули - 22,3 – 23,2, бозайници - 6,6 – 8,0 atm). При бозайниците осмотичното налягане на повечето биологични течности е равно на осмотичното налягане на кръвта (с изключение на течностите, отделяни от някои жлези - слюнка, пот, урина и др.). Осмотичното налягане, създадено в животинските клетки от макромолекулни съединения (протеини, полизахариди и др.), е незначително, но играе важна роля в метаболизма.

Прилагането на разтвори за инжекции, чието осмотично налягане се различава от осмотичното налягане на кръвната плазма, причинява остра болка, колкото по-голяма е осмотичната разлика, толкова по-силно е усещането. Затова се използват изотонични разтвори. Това са разтвори, които имат осмотично налягане, равно на осмотичното налягане на физиологичните телесни течности. Нормалното осмотично налягане на кръвната плазма при човека е 7,4 atm ( $7,28 \cdot 10^5$  Pa). Физиологичните разтвори с 0,9% NaCl и 5% глюкоза имат такова налягане.

Поради силното осмотично налягане, водата от тялото на морските риби се стреми да напусне тялото ѝ. Освен това в техните тъкани концентрацията на сол е три пъти по-малка отколкото в морската вода. Ако не бяха механизмите за отделяне на солта, рибите не биха могли да живеят дълго и бързо биха умрели от дехидратация. Това обаче не се случва – за да попълнят запасите от влага, рибите пият морска вода и я „обезсоляват“ вътре в тялото, като премахват излишните соли през червата и отново през хрилете. За това са отговорни така наречените клетки на Case-Wilmer, в мембраните на които има специални протеини, които пренасят йони на солта във външната среда. При сладководните риби същите протеини работят в обратна посока, улавяйки йони на солта от водата. Най-интересното е, че при рибите, които сменят морето с река за хвърляне на хайвера си или обратното, тези протеини могат да превключват от един режим на друг. Например, при речната змиорка, по време на миграцията от морска вода към прясна вода, голямо количество вода започва да тече през кожата.

### 3.8 Дифузия

В разтвор, където съществува градиент на концентрацията молекулите се преместват от местата с по-висока към места с по-ниска концентрация. Това явление се нарича *дифузия*. Тя е резултат от стремежа на системата към увеличаване на ентропията, т.е. към намаляване на порядъка в системата. Дифузията се подчинява на *закона на Фик*:

$$\frac{dc}{dt} = -SD \frac{dc}{dx}$$

Скоростта на дифузията се определя от *коэффициента на дифузия D*. Той зависи от размера и формата на молекулата, както и от съпротивлението, дължащо се на вътрешното триене (вискозитета на молекулите). За сферични макромолекули коефициентът на дифузия зависи от масата им:

$$D \sim \frac{1}{R} \sim \frac{1}{M^{1/3}}$$

Коефициентът на дифузия е свързан с подвижността на молекулата  $\mu$ , която се определя от връзката между силата, действаща върху молекулата  $F$  и нейната скорост  $v$ :

$$\mu = \frac{v}{F}$$

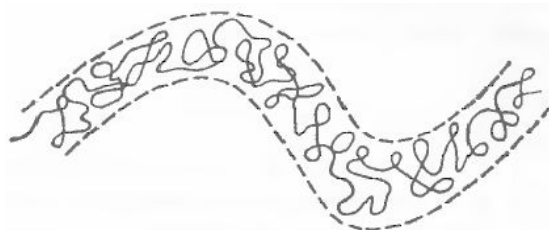
### 3.8.1 Брауново движение и дифузия

Брауновото движение представлява хаотично движение на една макромолекула под действието на молекулите на разтворителя. При движение със скорост  $v$  и подвижност  $\mu$  на една частица действа сила  $F = -\mu v$ .

Дифузията е свързана с брауновото движение. Коефициентът на дифузия  $D$  е важна величина. Той определя средноквадратичното изместване  $\langle x^2 \rangle$  (по една от координатните оси) на дифундиращата браунова частица за време  $t$  като  $\langle x^2 \rangle = 2Dt$ .

Коефициентът на дифузия е свързан с коефициента на триене  $\mu$  за движението на частицата. Точното количествено съотношение между тези величини е получено в началото на 20 век от Айнщайн и носи неговото име. Според това съотношение:

$$D = kT/\mu \quad (3.10)$$



Фигура 3.13: Дифузия на полимерна верига.

За дифузионното движение на полимерна верига с  $N$  звена  $D = kT/(N\mu)$ . Ако си представим, че молекулата се движи в тръба на разстояние  $L$  за максималното време на релаксация се получава  $t = L^2/D$  ( $N^3/N_e$ ) $t_m$ , където  $t_m$   $l^2\mu/kT$  е времето за релаксация на нискомолекулна течност, което за  $l = 5 \cdot 10^{-10}$  m и  $D = 2 \cdot 10^{-7}$  m<sup>2</sup>/s дава  $t_m \sim 10^{-12}$  s. При полимерна верига с  $N = 10^4$  и  $N_e = 10^2$  се получава  $t \sim 10^{-2}$  s, т.е. напълно макроскопично време. Ако междумолекулните взаимодействия са много силни това време може да нарастне до секунди.

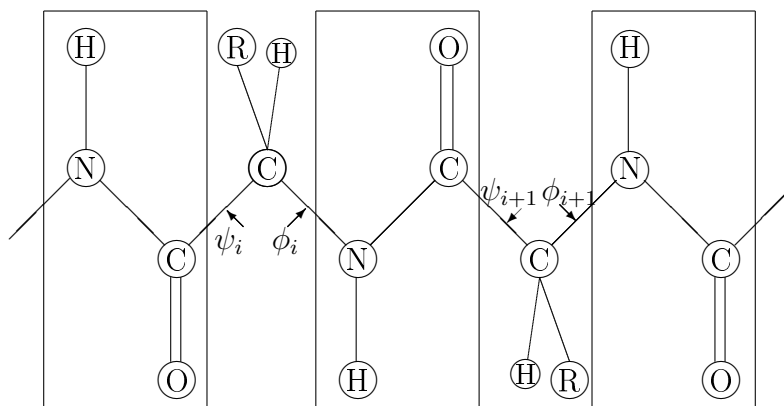
# Глава 4

## Физика на белтъците

### 4.1 Строеж на белтъците

#### 4.1.1 Първична структура

*Белтъците* изпълняват всички жизнено важни функции в организма. Те са катализатори, управляващи цялата химия на живия организъм, всички биохимични процеси. Те пренасят кислород, служат за основа на движението и за опорни вещества на тъканите и т.н., общо взето могат да правят всичко, само не могат да се възпроизведат. Главната особеност на макромолекулите на белтъците, *рибонуклеиновата киселина* (РНК) и *дезоксирибонуклеинова киселина* (ДНК) е, че те не само изграждат организмите, но са и своего рода автомати, извършващи определени операции. Освен това белтъците – регулатори контролират експресията на гените, рецепторните белтъци (намиращи се в липидните мембрани) обезпечават възприемането на междуклетъчните сигнали. Иmunните белтъци опознават и свързват "чуждите" молекули и "своите" клетки. Транспортните белтъци пренасят други молекули – белтъците пренасящи електрони и протони през мембраната обезпечават цялата биоенергетика – поглъщането на светлина, дишането, производството на АТФ. Други белтъци "изгаряйки" АТФ обезпечават механохимичната дейност – те работят в мускулите или преместват елементите на клетките. При цялото това разнообразие работата на белтъците се базира на специфическо взаимодействие (като на ключ с ключалка) с обработваната молекула. Затова пространствената структура трябва да бъде достатъчно "твърда" и биологическата функция на белтъците е тясно свързана с тримерната им структура. Не само разрушението, а и не голямото ѝ изменение води до рязко изменение на активността им.



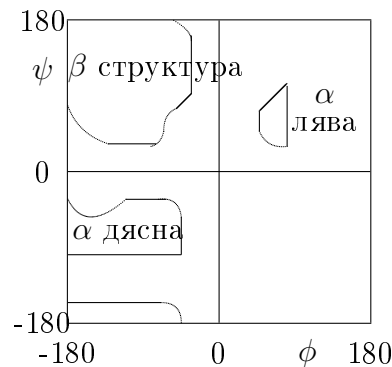
Фигура 4.1: Устройство на белтъците, със стрелки са показани връзките, около които може да се извършва въртене.

Белтъчините (протеините) са биополимери. Звената им, така наречените аминокиселинни остатъци, имат структура  $-\text{CO}-\text{CHR}-\text{NH}-$ , където с R е означен един от 20-те вида радикали. В най-простият случай това е атомът на водорода, тогава съответният аминокиселинен остатък се нарича *глицил*. В останалите 19, радикала R има по-сложен строеж:  $-\text{CH}_3$  аланил,  $-\text{CH}_2\text{OH}$  серил,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$  метионил,  $-\text{CH}_2-\text{COO}^-$  аспартил,  $-(\text{CH}_2)_4-\text{N}^+\text{H}_2$  лизил и др. От последните две се вижда, че в белтъчните вериги може да има както положително, така и отрицателно заредени звена.

Пространствения строеж на звената на белтъчината верига е показан на фиг.4.1. Връзката  $-\text{CO}-\text{NH}-$  съединяваща специфичните за всяко звено групи  $-\text{CHR}-$  се нарича *пептидна*, затова белтъчната верига се нарича *полипептидна*. Особеност на връзката е че 4 атома N, H, C, O се намират в една равнина. Последователността от аминокиселинни остатъци по белтъчната верига, можем да оприличим на текст, написан с 20 буквена азбука. Това е именно първичната структура на белтъка. Тя се формира при биосинтеза и не се разрушава при от топлинното движение. Биополимерите са построени от азот, водород, въглерод, кислород, фосфор и сяра. Голяма роля играят йони като  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ . Освен това значително влияние имат малки количества метали като *Fe*, *Zn*, *Cu*, *Mg*.

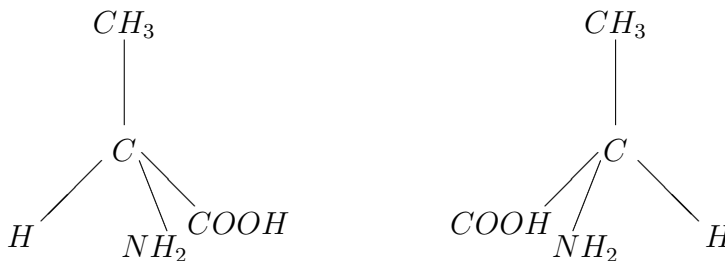
Най-важната особеност на пептидната връзка е нейният частично двоен характер. Рентгенографските изследвания са показали, че нейната дължина от 0.132 nm е по-малка от 0.147 nm, характерна за единичната CN връзка и по-голяма от 0.125 nm на двойната CN връзка. Причината е в това, че двойката  $2s^2$  електрони на азота стават общи за въглерода и азота, давайки примес на двойна връзка между тях, при което електрона от двойната  $\pi$  връзка CO се изтласква към кислорода – настъпва изместване на електронната плътност в посока  $\text{N} \rightarrow \text{C} \rightarrow \text{O}$ .

Поради двойния характер на пептидната връзка въртенето около нея е затруднено и затова се отчита само въртенето на ъгъл  $\phi$  около връзката N–C, и на ъгъл  $\psi$  около връзката C–C (фиг.4.1). Пептидната група CO–NH се върти около тези връзки като едно цяло, като всичките ѝ атоми остават в една равнина.



Фигура 4.2: Рамачандран плот.

Фигура 4.3: Ляв и десен аланин.





При въртенето около връзките принадлежащи на един и същи въглероден атом има корелация в рамките на една двойка  $\phi_i, \psi_i$  но такава отсъства за двойките  $(\phi_i, \psi_{i+1})$  или  $(\psi_i, \psi_{i+1})$ . Това позволява да се сведе взаимодействието от близък порядък до взаимодействие между съседните пептидни единици. Преходът от една конформация към друга се осъществява чрез въртене около единичните химични връзки с преодоляване на няколко потенциални бариери. Вземайки пред вид това и отчитайки Ван дер Ваалсовите сили, Рамачандран е построил диаграми, позволяващи да се определят допустимите значения на ъглите  $\phi$  и  $\psi$ , при които даден остатък не изпитва силно припокриване с другите атомни групи. Потенциалната енергия на вътрешното въртене се дава от израза:

$$U(\psi, \phi) = \frac{U_0}{2} (1 - \cos 3\phi) + \frac{U_0}{2} (1 - \cos 3\psi) + \sum U(r_{ij}) + U_c \quad (4.1)$$

Всички аминокиселини без глицина могат да съществуват във две форми – лява (L) и дясна (D). Тези две структури се огледални отражения една на друга (фиг. 4.3) - хиралност. Те влизат в напълно еднакви химични реакции със симетрични молекули, имат еднаква плътност и др. Когато химикът синтезира във колба вещество състоящо се от асиметрични молекули и синтезът протича без намесата на някакъв асиметричен фактор се образуват еднакви количества от леви и десни молекули. Не е така обаче в случая, когато веществата се синтезират от живи организми – те използват само леви аминокиселини, а молекулата ДНК има дясноориентирана спирала.

Каква е причината за това? Според една от хипотезите това е асиметрия в началните условия – при възникване на живота случайно са взели превес левите аминокиселини. Друга хипотеза се опитва да изведе асиметрията от много по-фундаментална причина – асиметрията между лявото и дясното при слабите взаимодействия.

Между двете форми са възможни преходи – например остатъкът на аспаргиновата аминокиселина, който се съдържа в метаболически неактивни белтъци (например в зъбния емайл и дентина), който се намира в L форма, с времето спонтанно преминава в D форма със скорост около 0,1% за година. Това дава възможност за определяне на възрастта на млекопитаещите.

Първичната структура е зададена генетически – определена е от състава и редът на следване на аминокиселините.

## 4.1.2 Вторична структура

Белтъчините се отличават от обикновенните полимери с наличието на специфични групи в аминокиселинните остатъци, способни да образуват химически, електростатически, водородни и ван-дер-ваалсови сили. Видяхме, че полимерните вериги в разтвори се стремят да се свият в безпорядъчно кълбо, както диктува вторият закон на термодинамиката. Белтъчините във всеки организъм се намират във водно обкръжение. Ако те бяха прости полимерни кълба нямаше да имат определен пространствен строеж и щяха непрекъснато да флукутират. В действителност биологически функционалните *нативни* белтъци (от native – природен) имат структура, а свободата на завъртане на звената им е ограничена. Причината за това са водородните връзки, които определят *вторичната структура на*

*белтъците*. Познати са два основни типа вторична организация при белтъците – структура на “надипления лист” и спирална структура. Основавайки се на законите на пептидните връзки и на данни от рентгеноструктурния анализ, Лайнус Полинг и Кори са установили, че белтъчната верига може да съществува в няколко устойчиви конформации. Те предложили модел на полипептидна верига, наречена  $\alpha$ -спирала. В нея пептидните групи са свързани през три, една с друга по веригата, образувайки спирала. По този начин връзките са в само в рамките на една макромолекула, поради което структурата на  $\alpha$ -спиралата се запазва и в разтвор. За спиралата има две възможности – да бъде завита като ляв или като десен винт. Оказва се, че болшинството случаи тя е дясна.

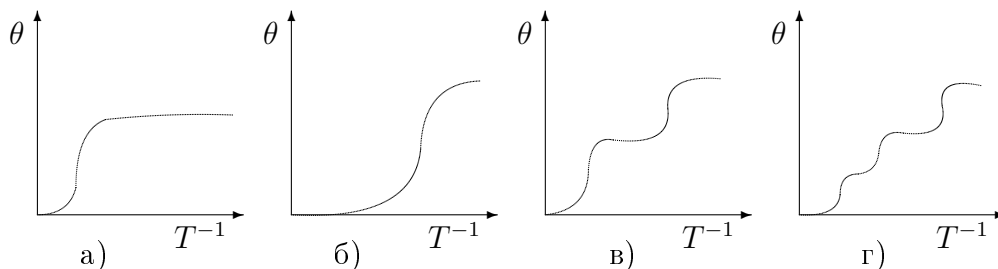
Съществува и друга форма на пептидните вериги, когато пептидните групи от отделни вериги се свързват помежду си с водородни връзки, разположени перпендикулярно спрямо веригите. Това е  $\beta$ -формата на белтъците. Такава структура имат природните влакна изготвяни от копринената буба и изкуствените полиамидни влакна найлон и капрон, които се отличават с голяма здравина. Други фибрилярни белтъци са *колагена* влизащ в състава на кожата и *кератина* в перата на птиците и космите на млекопитаещите. Освен това в белтъците се срещат участъци без регулярна структура. Например в хемоглобина 75% от аминокиселините са десни спирали, а в останалите участъци от веригите няма порядък. Според обкръжението, в което “живеят” белтъците и общият тип на строежа им те могат да се разделят на три класа.

1. Фибрилярните белтъци образуват огромни агрегати, тяхната структура е силно подредена в резултат на взаимодействието на различните вериги.
2. Мембранните белтъци се намират в мембраните, където няма вода, но частите им се показват от мембраната във водата. Вътремембранните части са силно подредени, но размерът им е ограничен от дебелината на мембраната.
3. Водоразтворимите, живеещи във вода глобулярни белтъци са най-малко подредени, тяхната структура се определя от взаимодействията на звената от веригата помежду им.
4. Накрая неголемите или бедни на въглеродородни групи полипептиди могат да нямат фиксирана структура, а да я добиват при взаимодействието си с други макромолекули. Понякога белтъка може да се състои от фибрилярна опашка и глобулярна глава.

Понастоящем са известни стотици хиляди аминокиселинни последователности. Тяхната структура се пази в компютърни бази данни, например SwissPort.

Какво става с белтъците, когато увеличаваме температурата, например, когато варим яйце при температура 100° С ? При нея енергията на топлинното движение не е достъпна за да разкъса химичните връзки в белтъчните вериги, но настъпват изменения в по-слабите връзки, в резултат на които *нативните белтъци* се превръщат в *денатурирани*.

Увеличаването на температурата или добавянето към водата на някои нискомолекулни съединения могат да доведат до развиване на спиралата – денатурация, при което молекулата става кълбо. Преходът от спирала към кълбо се нарича



Фигура 4.4: Криви на топене на а) хомополимер А, б) хомополимер В, в) съполимер АВ, г) хетерополимер.

топене на спиралата, тъй като спиралната верига е твърда, а деспирализираната е гъвкава. Аналогията с топенето на обикновенното вещество е и в това, че преходът спирала – кълбо става в тесен температурен интервал и е съпроводен с поглъщане на топлина (фиг.3.11, стр.44), която отива за разкъсването на водородните връзки. Разликата от истинското топене, например на леда, е че спирализираните и деспирализираните участъци не се разделят помежду си, и остават размесени, поради което от гледна точка на теоретичната физика прехода не е фазов. Оказва се, обаче, че все пак този преход може да се разглежда като фазов, но на едномерен кристал, при който е невъзможно разделяне на фазите.

На фиг.4.4 са показани кривите на топене – зависимостта на степента на спиралност  $\theta$ , т.е. частта на спирализираните звена, от реципрочната стойност на температурата  $T^{-1}$ . Еднородните хомополимери, да ги означим с  $-A-A-A-$  и  $-B-B-B-$  се топят рязко, но при различни температури (фиг.4.4 а) и б). Съполимера  $-A-A-B-B-$  се топи на два етапа (фиг.4.4 в), а реалния хетерополимер със сложно редуване на звената А и В се топи постепенно.

При денатурацията се разкъсват водородните връзки между звената, но не е възможно да се освободи едно звено от веригата без да се засегнат останалите – то е затиснато от съседите си. Следователно звената могат да се освобождават и движат само кооперативно – съгласувано.

### 4.1.3 Третична и надмолекулярна структура

Третичната структура е начин за разполагане в пространството на веригата като цяло. Докато в образуването на вторичната структура участвуват близки във веригата звена, то третичната структура формират участъци, които се намират далеко един от друг по веригата.

Не цялата верига се намира в спирално състояние, тя се прекъсва от неподредени участъци. В резултат белтъчната молекула се свива в пространствена структура, която се нарича *глобула*. Глобулата не е безпорядъчно полимерно кълбо. Кълбото е подвижна, флукутираща система, лишена от подреденост. В глобулата се запазва известна подвижност на звената на белтъчната верига, но като цяло, тя има напълно определен строеж, определено разположение на подредените и неподредените участъци в пространството. Звената са опаковани в глобулата доста плътно. Те са свързани по различни начини – с водородни връзки, междумолекулярни сили, химически връзки. Глобулярни са много белтъци – преди всичко

ферментите. Глобулярна структура имат белтъците съществуващи и функциониращи в разтвори като отделни молекули. Белтъчините образувачи тъканите в организмите обикновено не са глобулярни, а *фибрилярни*, т.е. имат формата на влакна.

Нативния т.е. фигуриращият в организма и изпълняващ своите биологични функции белтък е структурно организирана система. На това не противоречи непълната спирализация при ред белтъци например в хемоглобина и миоглобина. Първичната структура на всяка белтъчна верига е строго фиксирана. Тя е еднозначно генетично определена, закодирана е в ДНК. За изготвянето на белтъчните вериги с правилна първична структура в клетките има специално “устройство” – *рибозома*. Съществува ли подобен механизъм за формиране на третичната структура? Отговор на този въпрос с непосредствени опити е дал американският биофизик Карл Анфинсен, получил за това Нобелова награда.

Вече споменахме, че с нагриване или чрез въвеждане в разтвор на нискомолекулни добавки, може да се предизвика денатурация на белтъците – рязък конформационен преход, проявяващ се в загубата на биохимичната активност на белтъка и разрушаването на пространствената му структура. Анфинсен успял да върне денатурирания белтък в нативни условия и показал, че при съблюдаването на определени технически условия (бавен процес, малка концентрация и др.) вън от живата клетка протича *ренатурализация* – самопроизволно възстановяване на правилната третична структура.

Следователно за създаването на третичната структура не е необходим никакъв специален механизъм – тя има свойството за *самоорганизация*. Външно това явление изглежда много просто – една верига с фиксирана последователност на звената, ако се намира в подходящи условия, винаги се свива еднакво. Това явление няма други аналогии във физиката и повече от четвърт век се явява предизвикателство пред физиката.

Тримерната структура на белтъка при обикновена температура е строго центрирана и има голяма плътност  $1.33 - 1.42 \text{ g/cm}^3$ , която е близка до плътността на кристалите на нискомолекулните органични съединения. Еднозначността на пространствената структура сродява белтъчната глобула с кристалите. За разлика от тях, където има строга периодичност, глобулата е геометрически неправилна и нееднородна. По последното тя прилича на стъклото. *Стъкло* във физиката се нарича вещество "замразено" в неравновесно състояние. Стъклото има гигантско време за релаксация, то "помни" структурата на атомите в момента на "замразяването" му. И така третичната структура се възстановява като кристал и е нерегулярна като стъкло. За сега обаче не е отговорено на въпроса – може ли по първичната структура да се предскаже третичната.

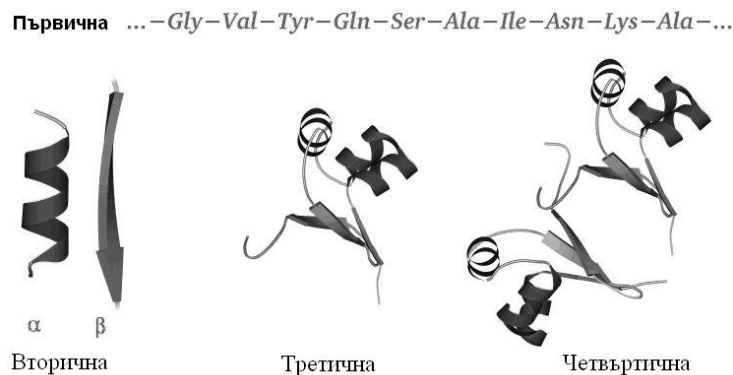
Денатурираната белтъчна глобула, след възвръщането на нормалните температурни условия и отстраняването на денатуранта от разтвора, възстановява първоначалната си нативна структура само за няколко минути. Да предположим, че белтъкът се състои от примерно 100 аминокиселинни остатъка, всеки с по 4 конформационни степени на свобода. Да допуснем, че на всеки ъгъл на завъртане на остатъка има 3 локални минимума. Тогава общия брой на всички възможни конформации на полипептидната верига ще бъде от порядъка на  $3^{400} \sim 10^{191}$ . За да си представим това число, да предположим, че конформациите се изпробват с честота  $10^{13} \text{ Hz}$  – честотата на атомните трептения. Даже при тези свръхблагоп-

риятни условия ще са необходими  $10^{178} s \sim 10^{170}$  години, за сравнение възрастта на Вселената е около  $10^{10}$  години. Възникналото несъответствие се нарича *парадокс на Левентал* и е резултат от допускането за случаен характер на възстановяването на белтъчната глобула. Очевидно, че този процес няма случаен характер. Не всички полипептидни вериги с някакво подреждане на аминокиселинни остатъци имат свойството да образуват уникална третична структура.

Този проблем в последните години се изучава с метода на компютърното моделиране. Последните изследвания показват, че голяма роля в този процес играят възникващите още в началото "ядра на свиване".

#### 4.1.4 Четвъртична структура

Понякога белтъците имат и *четвъртична структура*. Някои белтъци – ферменти се състоят от няколко глобули залепнали една за друга. Така например молекулата на хемоглобина се състои от четири вериги нагънати в четири глобули. Веригите са в  $\alpha$  и  $\beta$  форма, в равни количества, заедно с хем – химична група съдържаща желязо. Хемоглобинът е белтък служещ за пренасяне на кислорода. Някои хора страдат от генетично заболяване – бета таласемия. При тях в хемоглобина липсва бета глобин, което води до гибел на еритроцити.



Фигура 4.5: Структура на белтъците.

Съществува гледна точка, според която природните белтъци и съответстващите им аминокиселини имат особени свойства, които им придават уникалното свойство за бърза ренатурализация. Това означава, че избраните, в резултат на еволюцията природни белтъчини, са много по-малко ( $10^5$ ) от техния възможен брой. По вероятно е, че те имат някакви фундаментални свойства, които ги отличават от другите неприродни последователности.

#### 4.1.5 Моделиране на формата на макромолекули

Формата на белтъка има пряко отношение към неговата функция и е ключов компонент при откриването на лекарства, но за да се разкрие бяха нужни години експерименти. Сега е възможно с много голяма точност по известна първична

структура да се моделира с помощта на изкуствен интелект вторичната и третичната структура.

Между програмите за определяне на 3D структурата на протеини се ежегодно се провежда състезание Critical Assessment of protein Structure Prediction (CASP - Критична оценка на предсказването на структурата на протеина) – прави се сравнение между известната експериментално определената структура на 100 протеина и компютърно генерираната. С годините резултатите се подобряват – например през 1994 г. средният резултат е бил около 20 успешно моделирани протеина, през 2016 е нараснал до 40. През 2018г. компанията DeepMind достига 60, а през 2020г. резултатът е 92.

Програмата AlphaFold разработена в лабораторията за изкуствен интелект DeepMind използва невронни мрежи за извършване на дълбоко самообучение, идентифицирайки модели в последователности и структури на протеини, открити в глобална база данни. Тъй като се обучава, с течение на времето, програмата може да идентифицира структурата на протеина за минути.

Десетилетия наред бавни експерименти са разкрили структурата на повече от 194 000 протеина, които се намират в Protein Data Bank. През 2021 г. в рамките на проекта AlphaFold са публикувани прогнозни структури за около 1 милион протеина, включително почти всички известни човешки протеини. През 2022 година базата данни AlphaFold публикува предсказани структури за повече от 200 милиона белтъка. Прогнозите са по-точни за някои протеини, отколкото за други. Грешните прогнози могат да накарат някои учени да си мислят, че разбират как работи даден протеин, докато всъщност не го разбират, така, че експерименти продължават да са от решаващо значение за разбирането на начина на съгване на протеините.

В Интернет съществува онлайн игра, наречена Foldit (<https://fold.it>). В нея играчът трябва да определи правилния конформация на протеина според неговата първична последователност.

Условията на играта са прости: дава се аминокиселинна последователност и играчът я огъва и завърта, докато придобие оптималната триизмерна структура. За тренировка на начинаещите, има няколко учебни пъзела, които, когато бъдат решени, помагат за разбиране основите на играта. За стимулиране на дейността на участниците има класация на най-добрите играчи.

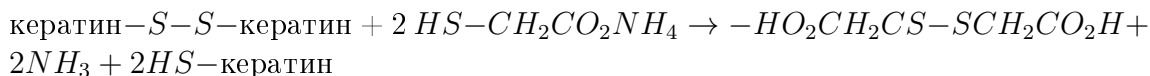
#### 4.1.6 Къдренето на коса - пример за биохимична технология

Косата е изградена предимно от протеин, наречен кератин, който присъства и в ноктите. В косата, кератиновите макромолекули са подредени в прави снопове. Те се държат заедно от дисулфидни връзки ( $-S-S-$ ), които придават здравина на косъма. Дисулфидните връзки се създават от аминокиселина, наречена цистеин. Цистеинът на една кератинова молекула образува дисулфидна връзка с цистеина на съседната кератинова молекула. Колкото повече дисулфидни връзки има в един кичур коса, толкова по-прав е той.

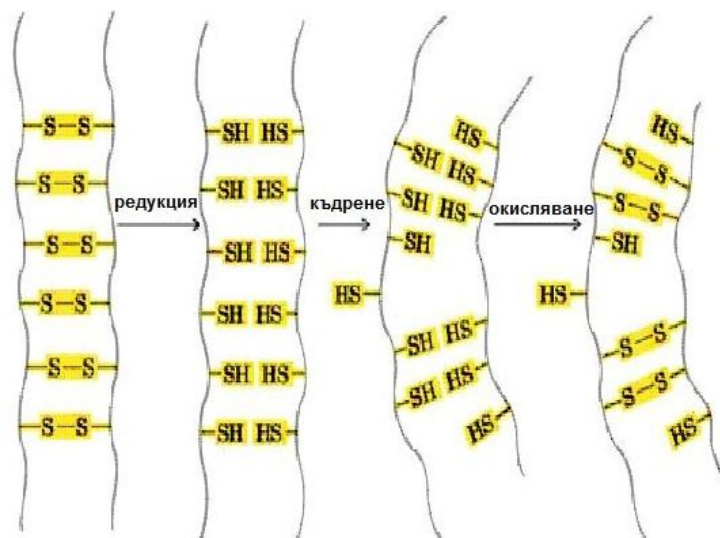
За перманентно накъдряне на косата се преминава през следните етапи:

1. В права коса,  $\alpha$ -спиралните кератинови вериги са подравнени по права линия и стабилизирани от напречни дисулфидни връзки.

2. За да се направи косата къдрава, напречните връзки се разрушават от редуциращ агент (амониев тиогликолат  $HSC_2CO_2NH_4$ ), под действието на който цистеин дисулфидните връзки се превръщат в тиолови групи от цистеинови остатъци, разположени в две съседни вериги). Тиоловата група замества един от серните атоми в дисулфидната връзка така:



3. Косата се огъва механично, усуквана около ролки. При огъването на полипептидните вериги, тиоловите групи, съответстващи една на друга, се изместват.
4. При окисляване (използва се водороден пероксид  $H_2O_2$ ) на тиоловите -SH групи възникват нови напречни цистеинови връзки - те правят получените къдрици на косата "постоянни":



Фигура 4.6: Етапи в къдренето на косата.

#### 4.1.7 Хидрофобните взаимодействия и структурата на белтъците

Всички аминокиселинни остатъци, влизащи в състава на полипептидната верига условно се разделят на две групи :

- неполярни (хидрофобни)
- полярни (хидрофилни)

Степента на хидрофобности на остатъка се определя от разликата на свободните енергии на разтворената аминокиселина в слабополярен разтворител и във вода (обикновено се използва етилов спирт).

Хипотезата за определящата роля на хидрофобните взаимодействия е била доказана през 1944 година. Идеята се състояла в това, че гъвкавата молекула на белтъка във вода се свива в глобула (понеже полярните остатъци на белтъка се стремят към максимален контакт с водното обкръжение, а неполярните – към минимален контакт). От геометрията е известно, че минимална повърхност при зададен обем има кълбото. Стремелът на неполярните остатъци да образуват вътре в белтъка някакво подобие на кръгла капка, а на полярните да се съсредоточат на повърхността ѝ, води до образуването на компактно тяло – глобула с хидрофобно ядро и хидрофилна повърхност.

През 1964 г. Фишер установил, че знаейки общия брой на аминокиселинни остатъци в ядрото и отношението на полярните към неполярните, може да се предскаже формата на глобулата. За простота ще считаме, че всички остатъци имат еднакви обеми. Да намерим отношението на броя на полярните остатъци към неполярните, който ще означим с  $b_s$ . Ще считаме, че радиусът на глобулата е  $r_0$  и тя е покрита с мономолекулярен слой полярни остатъци с дебелина  $d$  (Фишер е считал, че  $d \sim 4 - 5 \text{ \AA}$ ). При направените допускания отношението на броя на полярните и неполярни остатъци е равно на отношението на обемите на сферическият слой и на централното ядро :

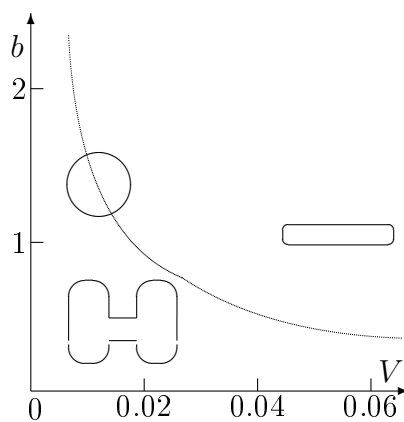
$$b_s = \frac{V_{pol}}{V_{nonpol}}$$

Ако предположим, че хидрофилната обвивка има дебелина  $d$  и площ  $S$  то  $V_{pol} = dS$ . Обемът  $V_{nonpol}$  се получава като извадим от целия обем  $V$  полярния  $V_{pol}$ , затова:

$$b_s = \frac{dS}{V - dS} = \frac{S}{V/d - S}$$

Кривата на Фишер, пресметната при  $d = 4 \text{ \AA}$  е показана на фиг.4.7. Глобулата може да бъде сферическа само при  $b = b_s$ . Ако  $b > b_s$ , тоест броят полярни остатъци в белтъка е повече отколкото е необходимо за това, за да покрие хидрофобното ядро с хидрофилен слой, то глобулата се разтегля във вид на елипсоид и има по-голяма повърхност отколкото в случая на сфера. При  $b < b_s$  хидрофилните остатъци не покриват напълно хидрофобното ядро и хидрофобното взаимодействие между такива открити участъци води към агрегации на белтъците и възникване на надмолекулярни структури.

По такъв начин, белтъците, за които стойността на  $b$  лежи над кривата на Фишер, представляват елипсоиди и фибрили (фиг.4.7), ако лежи на кривата белтъците представляват глобули. Под кривата се разполагат белтъци, образувачи



Фигура 4.7: Крива на Фишер.



надмолекулна структура. Формирането на хидрофобни ядра в глобулярните белтъци има принципно значение за тяхното функциониране. Белтъците при тяхната огромна молекулна маса имат сравнително компактна структура преди всичко, благодарение на хидрофобните взаимодействия.

Водородните връзки в белтъчната верига, във водно обкръжение, носят ентропичен, а не енергетичен характер. При откъсване на водните молекули от белтъка веднага се свързват една с друга, така че енергията се компенсира, а печалбата за свободната енергия идва за сметка на промяната на броя на състоянията.

На повърхността на белтъчната глобула са концентрирани главно полярни и заредени атоми, които взаимодействат с водната среда. Именно групите на основните вериги и заредените атоми на страничните вериги, както и полярните странични вериги са на повърхността. Между противоположно заредените групи се образуват солеви мостове (йонни връзки). Дисулфидните връзки могат да бъдат разположени както вътре, така и на повърхността на глобулата. Вътрешността на протеиновата глобула е неполярна среда, защитена от контакт с разтворителя чрез плътна опаковка от атоми.

#### 4.1.8 Влияние на разтворителя и температурата на разтворимостта на белтъка

Добавянето на органичен разтворител (етанол, ацетон) към водата намалява разтворимостта на повечето протеини до такава степен, че те се утаяват. Установено е, че разтворимостта на протеините при определени стойности на рН и йонна сила зависи от диелектричната константа на средата и от способността на добавения разтворител да понижи степента на хидратация на йонните групи. При намаляване на диелектричната константа се увеличава силата на привличане между два противоположни заряда, след което се създават условия за образуване на йонни двойки. Етанолът, чиято диелектрична константа е по-малка от тази на водата, допринася за агрегирането на протеини, т.е. намалява тяхната разтворимост. Може да се използва за изолиране и разделяне на белтъците.

В диапазона от 0 до 40° С, разтворимостта на белтъците се увеличава. Има обаче изключения – при температура от 40- 50° С, повечето протеини денатурират (губят стабилност), а денатурацията е придружена от рязко намаляване на разтворимостта в областта на неутралното рН.

## 4.2 Функции на белтъците

Белтъците изпълняват следните функции:

1. транспортни: транспортиране и съхранение на кислород, мазнини, желязо, мед и други елементи;
  2. хормонални: хормоналните белтъчини регулират метаболизма. (Например, протеини на хипофизата, панкреаса);
  3. каталитични: белтъчините са ензими;
-

4. защитни (имунни): белтъчините са антитела на имунните процеси -  $\gamma$ -глобулините участват в хуморален имунитет, лимфоцитите участват в клетъчния имунитет, които изпълняват функциите си благодарение на белтъчините, разположени върху лимфоцитните мембрани.
5. белтъчините в кръвта допринасят за нейната коагулация.
6. структурни (поддържащи): белтъчините са компоненти на съединителната тъкан (колаген), кожата, косата (кератин), кръвоносните съдове (еластин) и хрущялите. Заедно с въглехидратите, протеините влизат в състава на секретите (гликопротеини). Те са компоненти на лигавиците, връзките, сухожилията.
7. контрактилни (механохимичен): белтъчините превръщат енергията на АТФ в механична енергия.
8. сигнална: осигуряване на приемане и предаване на химични сигнали, участващи в разпространението на нервните импулси.
9. регулаторни (белтъчините осигуряват обратна връзка в метаболитните вериги).
10. белтъчини влизат в състава на рецепторните системи на тялото, прекодирайки външни сигнали в електрохимичен импулс.
11. енергийни (хранителна): белтъчините са източници на хранене за развитието на плода (казеин).
12. Много белтъчини са токсини, които предпазват организма от вредно въздействие.
13. Белтъчини поддържат рН (буфери) и задържат онкотичното (осмотично) налягане в кръвните клетки.

Има много други специални функции на протеините.

- Хормонална функция

Всеки белтък изпълнява една високоспециализирана функция и само в някои случаи изпълнява няколко взаимосвързани функции. Хормонът на надбъбречната медула - адреналин навлиза в кръвта, увеличавайки консумацията на кислород, повишавайки кръвното налягане; от друга страна повишава кръвната захар и стимулира метаболизма. При студенокръвните животни адреналинът е медиатор на нервната система.

- Каталитична функция

Биохимичните реакции в организма често протичат при леки условия (при температура около  $40^{\circ}\text{C}$  и рН около 7). Но при тези условия скоростта на по-голямата част от биохимичните реакции е ниска, следователно, за да се осъществят те, в организма са се развили биологични катализатори - ензими. Ензимите са или белтъци, или комплекси от белтъци с някакъв кофактор

(метален йон или някаква органична молекула). Ензимите имат висока селективност на действие, която се основава на определена конформация на протеинова молекула. Всяко отклонение ще доведе до намаляване на селективността и съответно до влошаване на катализата.

- Транспортна функция

Много вещества трябва да влязат в клетката (както строителния материал, така и енергия), а биомембраните са изградени на единен принцип: двоен слой липиди, в които се вградени различни протеини, докато хидрофилните участъци на макромолекулите са разположени на повърхността на мембраната, а хидрофобната опашка на протеина е разположена във вътрешността на мембраната. Такава структура на мембраната е непроницаема както за големи молекули (аминокиселини, захари), така и за относително малки (метални йони). Проникването им става чрез транспортни белтъчини.

В многоклетъчните организми съществува и друга система за транспорт на вещества. Това е кръвния хемоглобин или серумен албумин (който има способността да образува силен комплекс с мастни киселини, с хидрофобни аминокиселини (триптофан), със стероидни хормони, с лекарства (аспирин, пеницилин) и да ги прехвърля в различни органи), трансферинът осигурява прехвърлянето на железни йони, церуплазмина – медни йони.

- Рецепторна функция.

За функционирането на тялото голямо значение имат рецепторните протеини, вградени в плазмената мембрана на клетките, които служат за възприемане и преобразуване на сигнали, влизащи в клетката (както от околната среда, така и от съседните клетки). Например рецепторите за ацетилхолин са разположени в междуневронни контакти върху клетъчната мембрана, включително в мозъчната кора. Тези протеини специално взаимодействат с ацетилхолин. Това взаимодействие води до такава промяна в протеиновата конформация, в резултат на което предаването на сигнал в клетката става възможно. След получаване и преобразуване на сигнала, невротрансмитерът (ацетилхолин) се отстранява и клетката се подготвя да възприеме следващия сигнал. За да напусне, има специален ензим – ацетилхолин естераза, който катализира хидролизата на ацетилхолин до ацетат и холин.

Много хормони не проникват в целевата клетка, а се свързват със специфични рецептори на повърхността на тези клетки. Това свързване вече е сигнал за задействане на физиологичен процес в клетката.

- Защитна функция

Имунната система има способността да реагира на появата на чужди частици в организма чрез производството на лимфоцити, а от друга страна, да реагира на производството на протеини (имуноглобулини). В първия случай говорим за клетъчен имунитет (осъществява се от клетки), във втория - за хуморален (осъществява се от безклетъчна телесна течност). По време на клетъчния имунитет лимфоцитите унищожават чужди клетки, патогенни

бактерии, ракови клетки, вируси; във втория случай В-лимфоцитите произвеждат имуноглобулини или антитела, които, свързвайки се с чужди молекули (антигени) премахват ефекта от своето действие. Ако голяма молекула действа като антиген, тогава антитялото не разпознава цялата молекула, а нейната специфична област и тази област се нарича антигенен детерминант. Понеже имуноглобулините взаимодействат с малка част от антигена, това позволява на лимфоцитите да произвеждат антитела, които разпознават специфични малки молекули дори от синтетичен характер. Според съвременните концепции всеки тип имуноглобулин, произведен от В-лимфоцити, получени от един общ прекурсор (вещество, предхождащо образуването на друго вещество, се нарича клон.

- Структурна функция.

Наред с протеините, които изпълняват специализирани функции, има протеини, които изпълняват структурни функции (сила, еластичност и други свойства на отделните тъкани на тялото: колагенът е основният белтъчен компонент на съединителната тъкан (при бозайниците той съставлява до 25% от теглото на белтъците). Синтезира се във фибробластите. Първоначално той се проявява под формата на проколаген, който се подлага на определена обработка (окисляване на остатъци от пролин и лизин до хидроксипролин и хидроксилизин) във фибробластите. Колагенът е три полипептидни вериги, усукани в спирала. Излизайки от фибробластите, тези спирали се комбинират в колагенови фибрили (влакна) и образуват колагенови нишки, които могат да се наблюдават под микроскоп.

Екип изследователи открили в скелет на Т. Рекс на 68 милиона години влакнести и гъвкави тъкани в бедрената кост. Това позволило да се изолират от тях структурни протеини от съединителните тъкани, колагени. Сравнение на протеиновите структури с протеините на съществуващи биологични видове показало, че колагенът на динозавъра е по-близо до протеиновите последователности, характерни за тритони, пилета и жаби и това съответства на установената представа, че съвременните земноводни, вглечуги и птици са потомци на динозаврите.

- Двигателни белтъци.

Мускулните съкращения са процес, при който се превръща химическата енергия, съхранявана в пирофосфатните връзки на АТР молекулите, в механична работа. Участват два протеина актин и миозин.

Миозинът се състои от дълга нишковидна част (опашка) и две кълбовидни глави. Общата дължина на една молекула е около 1600 nm, около 200 nm са главите. Миозинът е под формата на хексомер, образуван от две вериги с молекулно тегло 200 хиляди и четири леки вериги с молекулно тегло около 20 хил. Тежките вериги са усукани спираловидно една около друга и образуват опашка. В единия край на нишката са кълбовидни глави, свързани с леки вериги. На главите на миозина има два функционални центъра: първият е каталитичен (осъществява разделяне на пирофосфатната връзка на

АТФ), вторият център осигурява на миозина способността специфично да се свързва с друг мускулен протеин - актин.

Актинът е глобуларен протеин с молекулно тегло 42 хиляди (G-актин в глобуларна форма). G-актинът има способността да полимеризира, за да образува дълга структура на F-актин. В тази форма тя може да взаимодейства с миозиновата глава и това взаимодействие е силно зависимо от наличието на АТФ. При висока концентрация на АТФ комплексът от актин и миозин се разрушава. След настъпване на хидролиза на АТФ под действието на миозинага атефаза, комплексът се възстановява отново. Този процес често се наблюдава в разтвор, съдържащ и двата протеина. Без АТФ това е вискозно съединение с високо молекулно тегло, добавянето на АТФ незабавно намалява вискозитета и тъй като АТФ се разгражда, отново възниква комплексобразование (кондензация). Тези трансформации са важни за мускулните съкращения.

### 4.3 Строеж на ДНК и РНК и синтез на белтъците

Молекулите на ДНК са най-големите, тяхното тегло достига  $10^9$ . Нуклеиновите киселини са наречени така, понеже се получават от ядрото (nucleus). Веригите на ДНК са построени от редуващи се звена от остатъци на фосфорна киселина (поради които тя е отрицателно заредена) и захар (дезоксирибоза). Към всеки захарид е закрепен една група от четири вида нуклеотиди: *аденин, цитозин, гуанин и тимин*.

Аналогично са устроени и веригите на РНК, само че при нея вместо тимин се използва *урацил*. По такъв начин текстовете в тях са записани с четирибуквена азбука. Химически РНК са много близки до ДНК – и двете са линейни полимери от нуклеотиди. Принципно макроструктурно различие между тях е, че ДНК е двойна спирала, а РНК се свива в компактна глобула, пространствените свойства на която се определят от нуклеотидната ѝ последователност.

През 1953 г. Уотсън и Крик чрез рентгеноструктурен анализ са установили, че пространствено макромолекулата на ДНК представлява две комплементарни вериги – аденинът от едната отговаря на тимина от другата, а гуанинът на цитозина. Втората верига не кодира нова информация, тя само помага за възпроизводството като стабилизира цялата молекула. На някакъв етап от развитието на клетката настъпва разделяне на двойната спирала. Към отделените се вериги се прикрепят нови комплементарни мономери от обкръжаващата среда. В резултат от една изходна двойна спирала се получават две тъждествени с нея. Двойната спирала на ДНК се среща основно в две форми, наречени А и В, различаващи се по разположението на връзките и стъпката на спиралата. Енергетически по-изгодната е В формата (*модел на Уотсън и Крик*).

Всъщност във вида, в който най-често се изобразява молекулата на ДНК тя пребивава само в определен етап от деленето на клетката, през повечето време тя е силно компактифицирана – навита е около специални белтъци, *хистони*, което позволява хромозомите да заемат много малко място. По късно са открити и други форми на двойната спирала. В зависимост от влажността, съдържанието на сол и последователността на нуклеотидите в конкретно място, ДНК може да се

удължи още повече (Е-ДНК) или свие (С и D-ДНК), да включи йони на метали (М-ДНК) или да се разтегнат така, че вместо азотни основи в центъра на спиралата да се окажат фосфатни групи (S-ДНК). Всички известни досега 21 *форми на ДНК* са приведени в таблицата.

A-ДНК –	двуверижна, малко по-дебела от В
B-ДНК –	<b>построена от Уотсън и Крик</b>
C-ДНК –	двуверижна, 9,3 нуклеотида на оборот
D-ДНК –	двуверижна, тясна, 8 нуклеотида на оборот, има много тимини
E-ДНК –	двойноверижна, по-тясна: 15 нуклеотида на два оборота
G-ДНК –	четворна спирала с гуанинови тетради
H-ДНК –	тройна спирала
I-ДНК –	две двойни спирали, задържани чрез привличането на цитозини
J-ДНК –	тройна спирала образувана от повторения на АЦ
K-ДНК –	трипанозомна ДНК, особено богата на аденини
L-ДНК –	основава се на L-дезоксирибоза (а не D, както обикновено)
M-ДНК –	B-ДНК в комплекс с двувалентни метали
N-ДНК –	ядрена ДНК
O-ДНК –	началната точка на удвояването на ДНК в бактериофага $\lambda$
P-ДНК –	тройната спирала аналогична на предложената от Полинг и Кори
R-ДНК –	рекомбинантна ДНК (чрез вграждане на чужд фрагмент)
S-ДНК –	двуверижна, разтегната 1,6 пъти повече от B-формата
T-ДНК –	подобна на D-формата, открита в бактериофага T2
W-ДНК –	синоним на Z-ДНК
X-ДНК –	двойноверижна спирала, образувана от повторения АТ
Z-ДНК –	двуверижна, лявозавъртяна

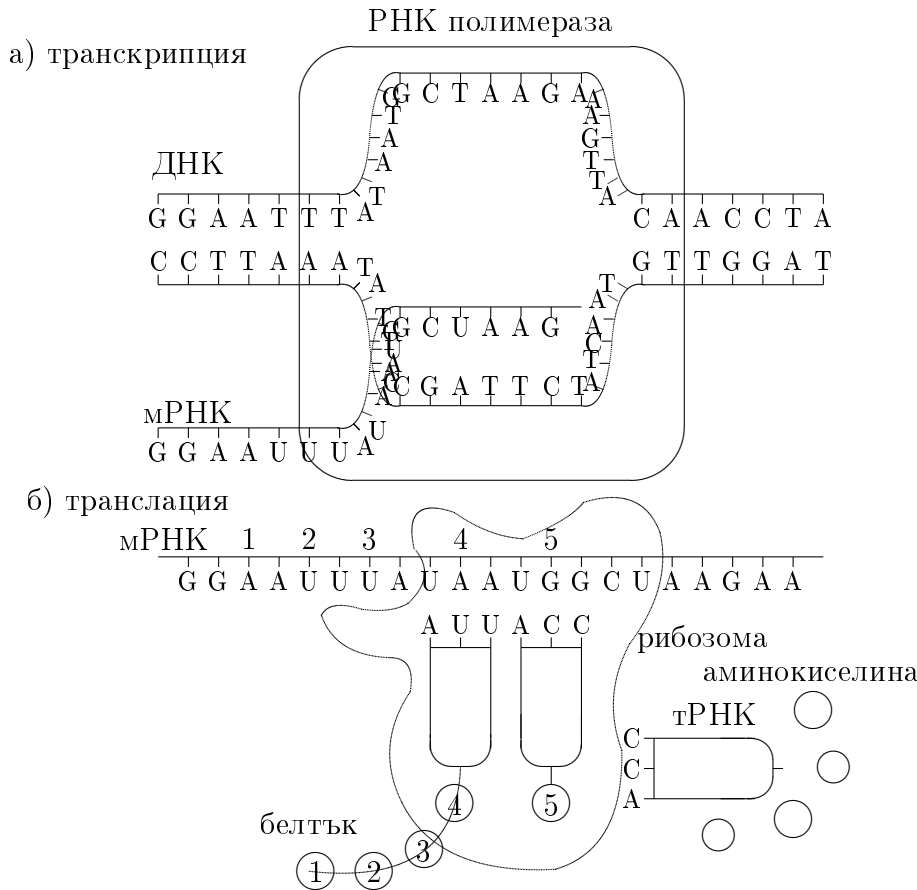
Таблица 4.1: Форми на ДНК

Откритието на вторичната структура на ДНК – двойната спирала на Уотсън и Крик е едно от най-големите открития на ХХ век. Двуспиралната ѝ структура дава просто обяснение на способността на живите организми към възпроизвеждане – те служат като матрици за създаване на две идентични копия.

Хромозомите, на които са разположени гените, съдържащи ДНК се намират в ядрото на клетката (при еукариотите), а синтезът протича извън ядрото, в цитоплазмата, следователно по някакъв начин информацията трябва да се предаде навън. За целта на една от двете вериги на ДНК се синтезира друга нуклеинова киселина, наречена *матрична РНК* (мРНК). Тя се отличава от ДНК само по това, че вместо тимин има урацил и вместо дезоксирибоза съдържа рибоза, която съдържа вместо *H* хидроксилната група *ОН*.

мРНК преминава в цитоплазмата и се свързва с *рибозомите* – структурни частици на клетката, състоящи се от белтък и *рибозомна РНК* (рРНК). Образува се *полизома*, наподобява нишка със нанизано на нея мънисто - рибозомата. Полизома е матрицата за синтеза на белтъците.

Всяка аминокиселина реагира с богато на енергия вещество АТФ (аденозин трифосфорна киселина) и образува аминокиселинациладенилат. Реакцията протича с участието на специален фермент. След това аминокиселинациладенилатът с помощта



Фигура 4.8: Транскрипция и транслация.

на същия фермент реагира с молекулата на *транспортната РНК* (тРНК), която е сравнително къса – с молекулно тегло около 25000 за разлика от мРНК, която има молекулно тегло от порядъка на 500000.

Молекулата на тРНК, носеща нуклеотиден остатък се присъединява с водородни връзки към нуклеотидите на мРНК в рибозомата, а аминокиселината напуска ензима и дифундира, докато достигне някоя рибозома. Рибозомата се премества по веригата на мРНК, "четейки" нуклеотидния текст, след това се присъединява следващата тРНК със следващата аминокиселина и т.н. Аминокиселините се обединяват и се получава белтъчна верига, в която е реализирана последователността закодирана в ДНК. Когато рибозомата с нарастналата на нея белтъчна верига достигне края на нишката на мРНК белтъчната верига се освобождава и постъпва в разтвора.

Тези процеси са показани схематично на фиг.?? По време на *транскрипцията* ферментът РНК - полимераза временно разединява веригите на двойната ДНК спирала. Една от тях служи за матрица, по която той строи мРНК (фиг.?? а). При транслацията молекулите на тРНК транспортират аминокиселините в рибозомата към мястото на синтеза, като разпознаването коя тРНК да се присъедини в нужния момент се определя от *генетичния код*. В мРНК нуклеотидите са групирани по тройки – *кодони*, на които в тРНК отговарят *антикодони*. След като рибозомата се придвижи към следващият кодон, тРНК се отделя и освобождава мястото за друга.

Описаният механизъм се нарича *основна догма на молекулната биология*. През 1970 г. е било открито, че онкогенните РНК вируси синтезират ДНК на своята РНК като на матрица. Този процес се нарича *обратна транскрипция*, а вирусите *ретровируси*. Всеки такъв вирус съдържа две еднакви РНК вериги и не голям брой вирусни ферменти. Обвивката на вируса се състои от клетъчна мембрана на хазяина с вирусен белтък, който служи за закрепване към клетката. След преминаване на двете РНК в клетката хазяин, специален фермент катализира обратната транскрипция в ДНК, която се премества в клетъчното ядро и се вмъква в хромозомата. При деленето на клетката хазяин, тази ДНК се предава в дъщерните клетки и от нея се синтезират вирусни белтъци и РНК, които се събират заедно и се отделят заедно с част от клетъчната мембрана. Такива ретровируси се използват в *генното инженерство* за пренасяне и внедряване на "правилни" участъци ДНК в човешките клетки. Такава конструкция се нарича *вектор*.

В реалните биологични системи като клетките и вирусите, генетичният материал се намира в такъв малък обем, в който кълбото на двойната спирала на ДНК не може да се побере – следователно тя се намира в състояние на глобула. Някои участъци на ДНК образуват вторични структури, които се отличават от модела на Уотсън и Криг. Например в първичните структури се срещат участъци *палиндроми*, които се четат еднакво отляво надясно и отдясно наляво.

### 4.3.1 Сгъване на белтъците

От средата на 50-те години на миналия век представата ни за това как се сгъват протеините се оформя от експерименти, проведени с малки протеини от изследователя от Националния институт по здравеопазване Кристиан Анфинсен. Той открива, че ако разгъне малък белтък, той спонтанно ще се върне в същата форма, и стига до заключението, че указанията за това са кодирани в аминокиселинната последователност на протеина. За това откритие Анфинсен получава Нобелова награда за химия през 1972 г. Тридесет години по-късно изследователите откриват, че специализирани клетъчни машини, наречена шаперони, помагат на протеините да се сгъват, но преобладаваше мнението, че функцията им се ограничава до подпомагане на протеините да извършват спонтанното си сгъване, като ги предпазват от улавяне или слепване.

Ново изследване на учени от Националната ускорителна лаборатория SLAC и Станфордския университет оспорва това разбиране. То разкрива процеса, чрез който малка клетъчна машина, наречена TRiC, контролира сгъването на тубулина - човешки протеин, който е в основата на микротубулите, действащи като структурна опора и транспортна система на клетките.

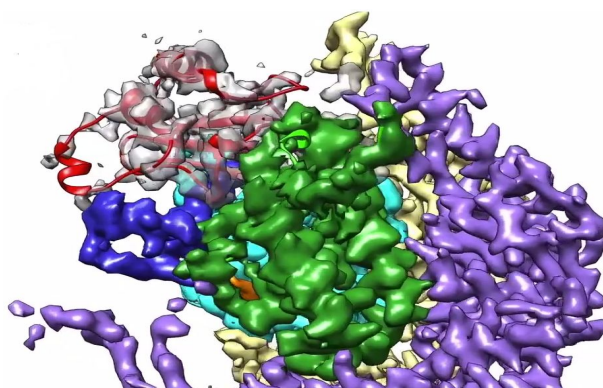
Камерата на TRiC е уникална, тъй като се състои от осем различни субединици, които образуват два подредени пръстена. Дълга, тънка нишка от тубулинов протеин се доставя в отвора на камерата от помощна молекула с форма на медуза. След това капакът на камерата се затваря и започва сгъването. Когато то приключи, капакът се отваря и завършеният сгънат тубулин (фиг. 4.9) напуска камерата.

Тъй като тубулинът не може да се сгъне без TRiC, се оказва, че TRiC може да прави нещо повече от пасивно подпомагане на спонтанното сгъване на тубулина. Но как точно става това? Това ново изследване дава отговор на този въпрос и



показва, че поне за протеини като тубулина концепцията за „спонтанно сгъване“ не е приложима. Вместо това TRiC директно организира пътя на сгъване, водещ до правилно оформен протеин.

Сгъването на тубулина сава на четири междинни стъпки при сгъването на човешкия протеин, като всички те се направляват от вътрешните стени на клетъчната машина (TRiC). Процесът започва, когато една нишка тубулин влиза в камерата на TRiC. Единият ѝ край се закача за вътрешната стена на камерата, след това другият край се закача на друго място и се сгъва, последван от първия край и още две сгъвания на средните участъци. Сгъването се насочва от областите с електростатичен заряд върху вътрешната стена и от „опашките“ на протеина, висящи от вътрешната стена, които задържат и стабилизират протеина в правилната конфигурация за следващата стъпка в сгъването. Ядрото на белтъка съдържа джобове, в които се включва GTP - молекула, която съхранява и освобождава енергия за работата на клетката.



Фигура 4.9: Тубулин - човешки протеин, който е в основата на микротубулиите, действащи като структурна опора и транспортна система на клетките.

Смята се, че до 10% от протеините в нашите клетки, както и тези в растенията и животните, получават практическа помощ от шаперони при сгъването им в крайната им активна форма. Шапероните принадлежат към три семейства протеини, така наречените протеини на топлинния шок. Тез са получили името си, защото синтезът им се увеличава с повишаване на температурата и други форми на стрес. В същото време те изпълняват функцията за защита на белтъците от денатурация.

Системата за сгъване е еволюирала в еукариотните клетки, от които се състоят растенията, животните и хората, но не и в по-простите клетки като тези на бактериите и археите. Изследователите предполагат, че в един момент, когато протеините са ставали все по-сложни, за да обслужват нуждите на еукариотните клетки, те не са могли да се сгъват във формите, необходими за изпълнението на по-сложни задачи, без малко помощ. Еукариотните протеини и тяхната шаперонова камера вероятно са еволюирали заедно, започвайки от последния общ предшественик на всички еукариотни организми преди около 2,7 милиарда години.

Съществува обаче и белтъци, които пречат на сгъването. В края на 20-ти век бяха открити протеини, които причиняват заболявания като „луда крава“, наречени приони. Веднъж попаднали в тялото, такива протеини променят начините

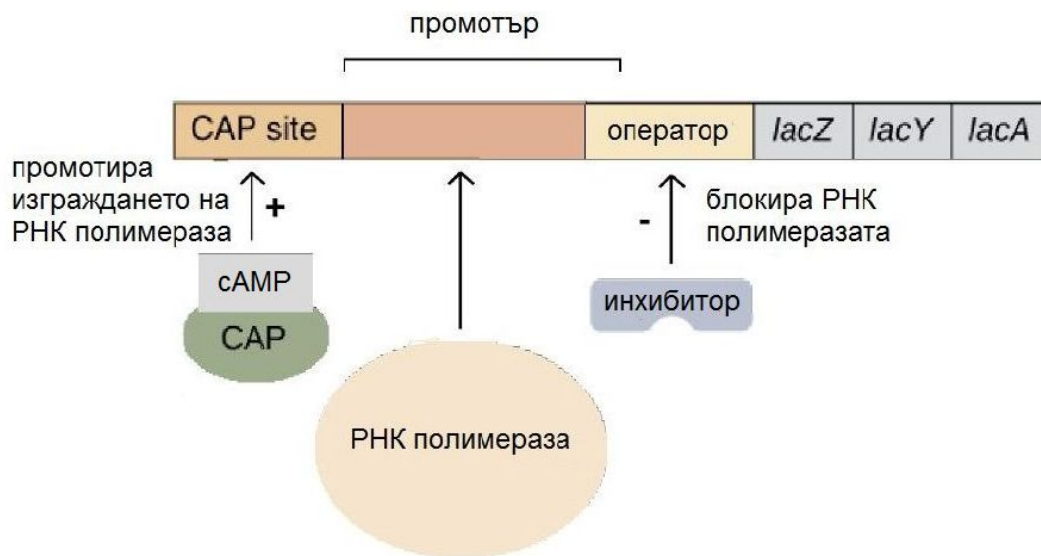
за формиране на пространствената структура на протеина, синтезиран в тялото. Този протеин с променена пространствена структура се натрупва в мозъчните клетки и води до смърт.

### 4.3.2 Генна експресия на примера на бактерията *Ешерихия коли*

В ДНК се съдържа информация за всички възможни белтъци, които може да синтезира клетката, но не всеки от тях ѝ е необходим - в определени случаи тя може да има нужда от едни, а в други случаи от други белтъци. Съществуват механизми, които стимулират или подтискат синтеза на определен белтък. Този процес се нарича *генна експресия*. Генната експресия е процесът, чрез който ДНК насочва синтеза на протеини.

Клетките могат да регулират генната експресия на различни етапи. Това позволява на организмите да генерират различни видове белтъчини и позволява на клетките да се адаптират към вътрешни и външни фактори. Всяка клетка в организма съдържа една и съща ДНК и следователно един и същи набор от гени. Въпреки това, не всички гени в клетката са включени или използвани за синтез. За един ген се казва, че е експресиран, когато белтъкът, който кодира, се произвежда от клетката.

Генната експресия се регулира, за да се гарантира, че протеините се генерират правилно в определени клетки в определени моменти. Различни вътрешни и външни механизми регулират генната експресия преди и по време на транскрипция.



Фигура 4.10: Строеж на *lac* оперона на *Ешерихия коли*.

Бактерията *Ешерихия коли* (*E. coli*) често се среща в храната, околната среда и в чревната флора както на хората, така и на животните. Въпреки че има лоша репутация повечето ѝ щамове са безвредни, а някои дори и полезни, защото подпомагат производството на витамин К и витамин В12.

Бактерията предпочита за храна глюкозата, тъй като тя изисква по-малко стъпки и по-малко енергия за разграждане от лактозата, но когато тя липсва

се задейства група от гени – *оперон*, които позволява на бактерията да използва лактозата като енергиен източник.

Лас оперонът е група от три гена: *lacZ*, *lacY* и *lacA*. Те се транскрибират като единични мРНК, под контрола на един промотър. Гените в оперона кодират протеини, които позволяват на бактериите да използват лактозата като източник на енергия (фиг. 4.10):

- генът *lacZ* кодира ензим, който разделя лактозата на глюкоза и галактоза (монозахариди);
- генът *lacY* кодира транспортер, който помага за пренасянето на лактозата през мембраната на клетката;
- генът *lacA* кодира ензим, известен като трансацетилаза, който свързва определена химична група към целевите молекули. Не е ясно дали този ензим действително играе някаква роля в разграждането на лактозата.

В допълнение към трите гена, лас оперонът съдържа и редица регулаторни ДНК последователности. Това са региони на ДНК, към които могат да се свържат определени регулаторни протеини, контролиращи транскрипцията на оперона (фиг. 4.10).

- Промоторът е мястото на свързване за РНК полимеразата, която извършва транскрипцията.
- Операторът е отрицателен регулаторен сайт - когато лас инхибиторът е свързан към него, РНК полимеразата не може да се свърже с промотора и да започне транскрипция.
- Протеинът на катаболитния активатор CAP (Catabolite Activator Protein) действа като сензор за глюкоза. Той активира транскрипцията на оперона, но само когато нивата на глюкозата са ниски. CAP усеща глюкозата индиректно, чрез молекулата сАМР (cyclic AMP), която действа като на "сигнал за глад". Мястото на свързване CAP е положителен регулаторен сайт.

За да използват лактоза, бактериите трябва да експресират гените на лас оперона, които кодират ключовите ензими за усвояването и метаболизма на лактозата. За да бъде възможно най-ефективен, Ешерихия коли трябва да експресира лас оперона само когато са изпълнени две условия:

- налична е лактоза и
- няма глюкоза.

В откриването на нивата на лактоза и глюкоза участват два регулаторни протеина:

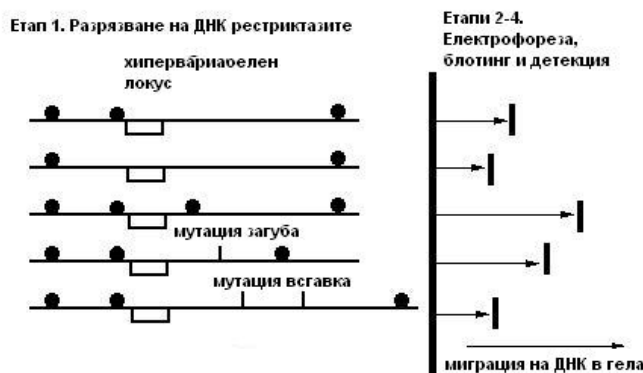
- единият, лас инхибиторът, действа като сензор за лактоза;
  - другият, катаболитният активиращ протеин (CAP), действа като сензор за глюкоза.
-

Тези протеини се свързват с ДНК на *lac* оперона и регулират неговата транскрипция въз основа на нивата на лактоза и глюкоза. Когато нивото на глюкоза е ниско се продуцират молекули сАМР, които се свързват с САР и променя формата му, което позволява РНК полимеразата да се свърже и да започне транскрипцията на ензимите. Когато няма лактоза, *lac* инхибиторът се свързва плътно с оператора, предотвратявайки транскрипцията от РНК полимеразата. Въпреки това, когато лактозата присъства, *lac* инхибиторът губи способността си да свързва ДНК. Той изплува извън оператора, освобождавайки пътя на РНК полимеразата да транскрибира оперона.

### 4.3.3 ДНК анализ

Познавайки генетичната изключителност на всеки човек, криминалистите отдавна мечтаят за възможността да използват това свойство за идентификация. Практическото осъществяване на мечтите им обаче стана възможно едва след 1985 година. Как протича процесът на идентификация, ако двама души са генетично различни един от друг средно само 0,01%?

Всъщност да се установят такива малки разлики би било доста трудно, ако те бяха разпределени равномерно в целия геном. За щастие, задачата на криминалистите значително се улеснява от факта, че въпросните различия са локализирани в определени региони (локуси) на хромозоми. Такива локуси се наричат *хипервариабилни* участъци. Те обикновено са разположени в зони с не-гена (некодираща или junk) ДНК, и следователно не са гени, т.е. не кодират протеини или РНК.



Фигура 4.11: Принцип на метода RFLP.

Анализът на полиморфизма на дължината на рестрикционния фрагмент RFLP, описан за първи път от Алек Джефрис, създаде предпоставката за идентифициране на човек въз основа на индивидуални генетични различия. Този метод е интегрален и разкрива промени както в броя, така и в местоположението на конкретни места за разпознаване на рестриктазите (така наречените, рестрикционни участъци), също и измененията (удължаване или скъсяване) на самите хиперпроменливи участъци. В резултат на такива редки „неуспехи“ ДНК на различни хора се разрязва с рестрикционни ензими на различни неравномерни „парчета“ (както е показано на фигура 4.11).

Появата на нови или изчезването на съществуващи рестрикционни участъци, възниква поради мутации: замествания на отделни нуклеотиди, както и инверсии ("превъртане"), делеции (загуби) и вмъквания (вложки) на ДНК участъци. Промените в дължината на хипервариабилните региони се дължат на по-сложни геномни реорганизации: транспозиции, неравномерни рекомбинации и „подхлъзване“ на комплекса ДНК полимераза.

Както показват изследванията на Джефрис, хипервариабилни ДНК региони са структури, известни като VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) и широко се използват за целите на идентифицирането до момента.

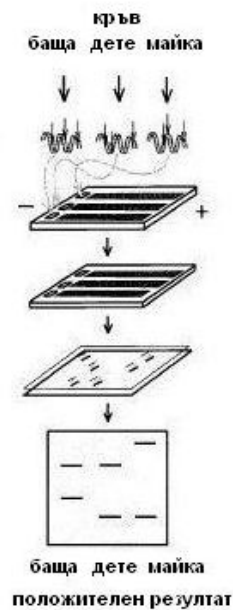
Всеки VNTR локус съдържа от 500 до 10 000 нуклеотидни двойки. Особеността на VNTR е, че те се състоят изцяло от една или две ключови нуклеотидни последователности, обикновено от 15 до 35 базови двойки, които непрекъснато се повтарят голям брой пъти (затова цялата VNTR последователност се нарича тандем). Именно такива тандемни VNTR последователности се избират за откриване по метода RFLP.

Броят на повторенията в този конкретен VNTR е различен за различните хора. В човешката популация има до сто или повече известни видове (алели) с дължина за всеки VNTR. В същото време никой от тях не е особено широко разпространен, поради което е възможен огромен брой отклонения в дължините на различни VNTR между индивидите, които се проявяват по време на RFLP.

Тази специфична VNTR последователност може да бъде или уникална в генома (т.е. разположена само на едно място), или разпръсната в няколко ДНК места. Съответно, анализът с помощта на сонда за уникална последователност (монолокален анализ) ще доведе до една или две ивици на ДНК пистата.

Схематично RFLP анализът може да бъде представен по следния начин: след третиране с рестрикционни ензими, различни ДНК проби се поставят на различни участъци в гел и се подлагат на електрично поле (процесът се нарича гел електрофореза). Електрическото поле ги кара да се движат, като по-малките фрагменти се движат по-бързо от големите и съответно изминават по-голям път. На следващо място, фрагментите се прехвърлят към нитроцелулозната мембрана (процес на блотиране), с която се свързват здраво. Мембраната се поставя в разтвор, съдържащ радиоактивна ДНК проба, където пробата е хибридиизирана с уникални последователности от хипервариабелни области. След това мембраната се прилага върху рентгеновия филм и получава радио – автограф, на който радиоактивните елементи се наблюдават под формата на серия ивици, чийто брой и положение са различни за всеки индивид.

Освен радиоактивни, има и други методи за откриване, като флуоресцентно



Фигура 4.12: ДНК тест за родители.

изображение, хромогенни имунохимични реакции и др. Независимо от това коя ДНК сонда е била използвана, на последния етап от анализа се образува графично изображение – напречно набраздено с редуващи се ивици.

Една ивица се образува, ако бащата и майката на изследвания индивид притежават един и същи вид от този хипервариабилен регион на VNTR. Мутилокусният (мутилокусов) анализ обаче ще даде по-сложна картина на много редуващи се ивици.

Използването на VNTR анализ също е много удобно за установяване на бащинство. За да се направи проверка, се изследват онези локуси, при които детето е хетерозиготно, тоест когато вариантите на VNTR, получени от него от бащата и от майката, са различни. В този случай позицията на всяка от ивиците трябва да съвпада с ивицата на родителя, от който е наследен съответният VNTR.

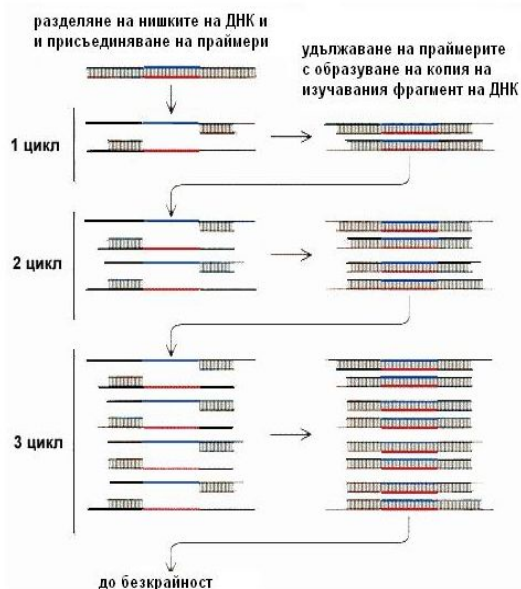
В някои случаи използването на VNTR не е възможно. Такива ситуации възникват, например, ако няма достатъчно проба за анализ. VNTR анализът често е неприемлив за идентифициране на останки след дълъг период от време, както и силно повредени останки (в резултат на бедствия и др.). Следователно в такива случаи е обичайно да се изучават фрагменти от друг тип - STR (Short Tandem Repeats). Подобно на VNTR, STR се състоят от тандемни повтаряния на няколко нуклеотида дълги (обикновено 3 до 5 базови двойки), само че, броят на тези повторения е по-малък и следователно има по-малко разновидности на всеки локус (7 до 15 на локус). Но точно поради малкия им размер е удобно да се изследват с помощта на полимеразната верижна реакция (PCR).

Откритието на *полимеразната верижна реакция* (PCR) (1983-1984, Кари Б. Мулис, 1993 Нобелов лауреат по химия) направи революция в молекулярната биология и е трудно да се изброят всички различни клонове на фундаменталната наука и практическата медицина, които използват този метод в момента. Благодарение на PCR е възможно да се работи с единични молекули на ДНК, увеличавайки техния брой милиони пъти.

Полимеразната верижна реакция е процес на контролирано "молекулярно копиране" на ДНК, което позволява да се генерира (умножава) произволно голям брой ДНК последователности, които представляват интерес.

Процесът на умножаване наподобява процеса на възпроизвеждане на ДНК, който се случва в клетка преди нейното делене, като единствената разлика е, че не се копира цялата хромозома, а само малък фрагмент от нея.

Всеки от реакционните етапи изисква оптимален температурен режим и, разбира се, селекцията на праймери за PCR се извършва по такъв начин, че те да се



Фигура 4.13: Принцип на полимеразната верижна реакция (PCR).

свързват точно с последователностите, които ограничават анализирания хипер-вариабилни локуси (т.е. тези последователности трябва да бъдат известни).

Амплифицираните STR фрагменти, също като VNTR фрагментите, се фракционират в гел и се визуализират с помощта на различни методи за откриване. Напоследък за тези цели е обичайно да се използват флуоресцентни маркери, възбудени от лазерно лъчение, тъй като този метод, въпреки че изисква специално оборудване и значителни материални разходи, е най-чувствителният и позволява изследването да се извършва в реално време. Освен това, благодарение на многоцветните флуоресцентни маркери, е възможно да се анализират няколко локуса едновременно.

PCR анализът е многоетапен процес. На първия етап се извършва температурна денатурация на ДНК, в резултат на което двуверижните сегменти се разделят на отделни вериги. Тогава се получава хибридизация на едноверижни фрагменти с праймери - къси (20 - 25 нуклеотиди) ДНК сегменти. Хибридизацията на праймерите се извършва с комплементарните им ДНК участъци, разположени по фланговете на интересуващата ни двустранна последователност. По нататък, протича "дострояване" на дъщерната полинуклеотидна верига върху ДНК матрицата в границите, ограничени от праймерите, с използване на ензима ДНК - полимераза.

PCR анализът се извършва обикновено в рамките на 24 часа, което значително намалява времето за изследване. Той е много удобен в случаите, когато има нищожно количество проба.

Чувствителността на PCR е и нейната слабост. В случай на проба, замърсена с външна ДНК, могат да се направят много копия от нея: процесът на амплификация е толкова ефективен, че дори няколко произволни молекули ДНК, попаднали в пробата, са достатъчни, за да стигнат до неверни заключения.

Грешки могат да възникнат на всеки етап от изследването - от събирането на проби до окончателното заключение. Не е трудно да се прехвърля ДНК от едно място на друго, да се смесват проби и т.н., тоест да се фалшифицират резултатите от криминалистично проучване. Освен това, допуснатите грешки могат да се обърнат както към вреда, така и в полза на заподозрения.

#### 4.4 Таблица на аминокиселините

аминокиселина	структурна формула
глутаминова кис.	$-CH_2-CH_2-\begin{array}{l} \diagup O \\ C \\ \diagdown O \end{array}$
аспаргин	$-CH_2-\begin{array}{l} \diagup O \\ C \\ \diagdown NH_2 \end{array}$
глутамин	$-CH_2-CH_2-\begin{array}{l} \diagup O \\ C \\ \diagdown NH_2 \end{array}$
тирозин	$-CH_2-\begin{array}{c} CH-CH \\ \diagdown \quad \diagup \\ CH-CH \\ \diagup \quad \diagdown \\ CH-OH \end{array}$
лизин	$-CH_2-CH_2-CH_2-NH_3$
аргинин	$-CH_2-CH_2-CH_2-NH-\begin{array}{l} \diagup NH_2 \\ C \\ \diagdown NH_2 \end{array}$
пролин	$\begin{array}{c} O=C \\ \diagdown \\ HO \end{array} \begin{array}{c} CH-CH_2 \\   \\ H-N-CH_2 \\   \\ CH_2 \end{array}$
триптофан	$-CH-\begin{array}{c} CH \\ \diagdown \\ C \\ \diagup \\ CH \\ \diagdown \\ C \\ \diagup \\ N \end{array} \begin{array}{c} CH \\ \diagdown \\ CH \\ \diagup \\ CH \\ \diagdown \\ CH \\ \diagup \\ N \end{array}$
хистидин	$-CH_2-C=\begin{array}{c} CH \\   \\ NH \\ \diagdown \\ N \\ \diagup \\ CH \end{array}$



аминокиселина	структурна формула
глицин	$—H$
аланин	$—CH_3$
валин	$  \begin{array}{c}  CH_3 \\  \diagup \\  —CH \\  \diagdown \\  CH_3  \end{array}  $
левцин	$  \begin{array}{c}  CH_2 \\  \diagup \\  —CH_2—CH \\  \diagdown \\  CH_3  \end{array}  $
изолевцин	$  \begin{array}{c}  CH_2 \\  \diagup \\  —CH \\  \diagdown \\  CH_3  \end{array}  $
фенилаланин	$  \begin{array}{c}  CH—CH \\  \diagup \quad \diagdown \\  —CH_2—CH \quad CH \\  \diagdown \quad \diagup \\  CH—CH  \end{array}  $
серин	$—CH_2—OH$
треонин	$  \begin{array}{c}  CH_3 \\  \diagup \\  —CH \\  \diagdown \\  OH  \end{array}  $
цистеин	$—CH_2—SH$
метотин	$—CH_2—CH_2—S—CH_3$
аспаргинова кис.	$  \begin{array}{c}  O \\  \parallel \\  —CH_2—C \\  \diagdown \\  O  \end{array}  $

Таблица 4.2: Строеж на аминокиселините.

# Глава 5

## Физика на ензимите

През 19 век Луи Пастър, изучавайки превръщането на въглехидратите в етилов алкохол под действието на дрождите, стига до извода, че този процес (ферментация) се катализира от някаква жизнена сила, намираща се в клетките на дрождите. Той влиза в спор с Либих и Бертло относно природата на алкохолната ферментация. Въведените преди повече от сто години термини *ензим* и *фермент* отразяват различни гледни точки в теоретичния им спор. Всъщност ферменти (от латински *fermentum* - закваска) са били наречени „организираните ензими“ (т.е. самите живи микроорганизми), а терминът ензим е предложен през 1876 г. от Кюне за „неорганизираните ензими“, секретирани от клетките, напр. в стомаха (пепсин) или червата (трипсин, амилаза). Две години след смъртта на Л. Пастър през 1897 г. Бухнер публикува труда „Алкохолна ферментация без клетки от дрожди“, в който експериментално доказва, че безклетъчният сок от дрожди извършва алкохолна ферментация по същия начин, както неунищожените клетки от дрожди. През 1907 г. той получава Нобелова награда за тази работа.

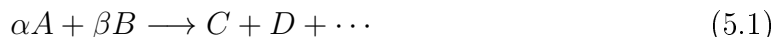
### 5.1 Основни понятия на химичната кинетика

Една от най-важните роли, която играят белтъците в организмите е на ензими. Ензимите служат за катализатори на всички биохимични реакции. *Катализаторът* е такова вещество, което взема участие в реакцията, но количеството му в края и в началото на реакцията остава постоянно. Различават се *хетерогенни* и *хомогенни* каталитични реакции. При хетерогенните се образуват две *фази* и реакцията протича на границата между тях. Процесът започва с *адсорбция* на реагентите на тази повърхност, а след реакцията с десорбцията на продуктите от повърхността. При хомогенните, и катализаторът, и реагентите се намират в една фаза - например в разтвор. Катализаторът образува промеждутъчно съединение с реагентите, което се разпада на катализатора и продуктите на реакцията.

Ензимите действуват или в разтвори или в надмолекулярни структури. Адсорбцията на реагентите, които се наричат *субстрати* става на повърхността на някоя голяма белтъчна молекула. По това ензимния катализ прилича на хетерогенния, но и белтъка - ензим и молекулите на субстрата се намират в една и съща фаза - в разтвора. При взаимодействието, като правило, една белтъчна глобула взаимодействува с една молекула на субстрата, при което се образува *ензимно - субстратен комплекс*. Неговите свойства се изучават с физични и химични методи - използват се както за изучаването на молекулната структура на ензима и комплекса, така и за кинетиката на ензимните реакции.

Основно понятие на кинетиката е *скоростта на химичната реакция*. Тя се определя като скоростта на изменение на концентрацията на един от продуктите

й. Например за реакцията :



това може да бъде  $v = \frac{dC}{dt}$ , като със  $C$  сме означили както продукта на реакцията, така и концентрацията му.

Ако стехиометричното уравнение (5.1) отразява правилно механизма на реакцията, т.е., че за да настъпи реакция е необходимо да се срещнат едновременно  $\alpha$  молекули  $A$  и  $\beta$  молекули  $B$ , то скоростта ще зависи от концентрацията по закона :

$$\frac{dC}{dt} = kA^\alpha B^\beta \quad (5.2)$$

Коефициентът на пропорционалност  $k$  се нарича *константа на скоростта на реакцията*, тя зависи силно от температурата по *формулата на Арениус* :

$$k = ae^{-E^*/RT} \quad (5.3)$$

Болцмановия фактор в горната формула отчита факта, че не при всеки удар между молекулите протича реакция, необходимо е да се преодолее потенциална бариера, характеризираща се с *енергията на активация*  $E^*$ . Предекспоненциалният множител се определя от броя на ударите между молекулите за единица време, той зависи по-слабо от температурата. Развити са квантовомеханични модели, които позволяват изчисляването на константата на скоростта ако е известна енергията на взаимодействието  $U(r)$ .

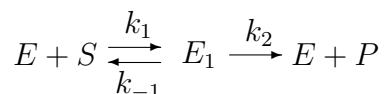
Теорията на ензимния катализ не е формулирана все още в окончателен вид в съвременната биофизика.

## 5.2 Кинетика на ензимните реакции

Стехиометричното уравнение (5.1) може да не отразява действителният механизъм на реакцията. Между началното и крайното състояние може да лежи верига от междинни взаимодействия, следователно уравнението (5.2) няма да отразява правилно кинетиката на процеса. Също така може да се окаже, че срещата на две молекули не е просто сблъскване и преминаване на потенциална бариера, а протича чрез образуване на междинно състояние. Оказва се, че в много случаи ензимните реакции, въпреки тяхната сложност, могат да бъдат описани простият модел на Михаелис - Ментен.

### 5.2.1 Схема на Михаелис - Ментен

Да разгледаме реакцията, протичаща по схемата на Михаелис - Ментен :



където с  $S$  е означен субстрата, с  $E$  ензима, с  $P$  продукта на реакцията, а с  $E_1$  ензимно - субстратния комплекс.

Кинетиката на тази ензимно - каталитична реакция се описва с диференциалните уравнения :

$$\begin{aligned}\frac{dE_1}{dt} &= k_1ES - (k_{-1} + k_2)E_1 \\ \frac{dE}{dt} &= -k_1ES + (k_{-1} + k_2)E_1 \\ \frac{dS}{dt} &= -k_1ES + k_{-1}E_1 \\ \frac{dP}{dt} &= k_2E_1\end{aligned}\quad (5.4)$$

Събираме първото, третото и четвъртото уравнение и получаваме :

$$\frac{dE_1}{dt} + \frac{dS}{dt} + \frac{dP}{dt} = 0$$

следователно общата концентрация на субстрата (началната концентрация)  $S_0$  е постоянна :

$$S_0 = E_1 + S + P$$

Предполагаме, че концентрацията на субстрата е много по-голяма от концентрацията на ензима, затова можем да запишем :

$$S \approx S_0$$

Аналогично, събираме първото и второто уравнение

$$\frac{dE_1}{dt} + \frac{dE}{dt} = 0$$

и получаваме, че общата концентрация на ензима  $E_0$  е постоянна:

$$E_0 = E + E_1 = const$$

Прибавяме и изваждаме от дясната страна на първото уравнение  $k_1E_1S_0$ , заместваме  $S$  със  $S_0$  и получаваме :

$$\frac{dE_1}{dt} = k_1E_0S_0 - (k_{-1} + k_2 + k_1S_0)E_1$$

При стационарно състояние  $\frac{dE_1}{dt} = 0$  и затова  $E_1 = \frac{E_0S_0}{S_0 + K_M}$ , където  $K_M$  се нарича *константа на Михаелис*

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Да запишем диференциалното уравнение във вида :

$$\frac{dE_1}{k_1E_0S_0 - (k_{-1} + k_2 + k_1S_0)E_1} = dt$$

Интегрираме, като вземем пред вид началното условие  $E_1(0) = 0$

$$\int_0^{E_1} \frac{dE_1}{k_1 E_0 S_0 - (k_{-1} + k_2 + k_1 S_0) E_1} = t$$

$$E_1 = \frac{E_0 S_0}{S_0 + k_M} (1 - e^{-t/\tau}) \quad ,$$

където  $\tau = 1/(k_{-1} + k_2 + k_1 S_0)$  е времето на релаксация.

Стационарното състояние се достига по-бързо, когато  $\tau$  е по-голямо, а това може да стане като се увеличи концентрацията на субстрата. Скоростта, с която се получава продукта се дава от уравнение (5.4), в което като заместим с израза за  $E_1$  получаваме (фиг.5.1), в стационарно състояние :

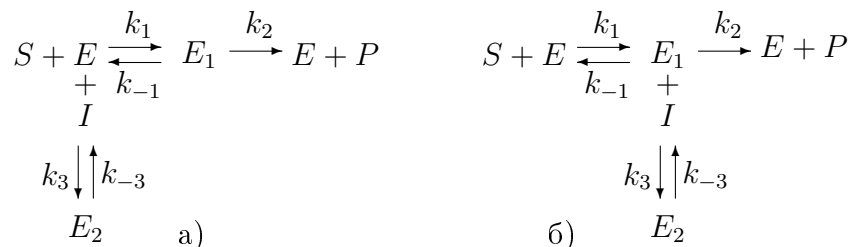
$$v = \frac{dP}{dt} = \frac{k_2 E_0 S_0}{S_0 + k_M} = v_{max} \frac{S_0}{S_0 + K_M} \quad (5.5)$$

Скоростта на реакцията се стреми асимптотично към  $v_{max} = k_2 E_0$ . Експериментално константата на Михаелис  $K_M$ , скоростта на реакцията  $k_2$  и отношението на правата и обратна реакция  $\frac{k_1}{k_{-1}}$  могат да се определят от линеализираната зависимост (5.5)

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_M}{v_{max}} \frac{1}{S_0}$$

## 5.2.2 Конкурентно и неконкурентно инхибиране

Ако в разглежданата система добавим вещество - *модификатор*, което може да се свързва обратимо с активния център на ензима, скоростта на реакцията може да се измени. Ако тя се забавя то веществото се нарича *инхибитор*, а ако се ускорява - *активатор*.



Фигура 5.2: Схеми на процеси с конкурентно а) и неконкурентно б) инхибиране.

Да означим инхибитора и концентрацията му с  $I$ . Има два възможни начина, чрез които инхибиторът забавя реакцията (фиг.5.2 а) и б):

- *конкурентно инхибиране* - той може да се свърже с активния център на ензима и да образува неактивен комплекс  $E_2$ , по този начин конкурирайки се с ензимно - субстратния комплекс;
- *неконкурентно инхибиране* - в този случай комплексът  $E_2$  се образува при свързване на инхибитора с ензимно - субстратния комплекс.

Уравненията на стационарната кинетиката при  $S \gg E$  и  $I \gg E$  във първия случай имат вида:

$$\begin{aligned} dE/dt &= -(k_1S + k_3I)E + (k_{-1} + k_2)E_1 + k_{-3}E_2 = 0 \\ dE_1/dt &= k_1ES - (k_{-1} + k_2)E_1 = 0 \\ dE_2/dt &= k_3IE - k_{-3}E_2 = 0 \end{aligned}$$

Началната концентрация на ензима е  $E_0 = E + E_1 + E_2$ . В допълнение към  $S \approx S_0$ , използваме приближението  $I \approx I_0$ , според което малка част от молекулите на инхибитора са свързани. От второто и третото уравнение се получават равновесните концентрации :

$$E_1 = \frac{k_1S}{k_{-1} + k_2}E, \quad E_2 = \frac{k_3I}{k_{-3}}E,$$

а след заместване във първото

$$E_0 = \left( 1 + \frac{k_1S}{k_{-1} + k_2} + \frac{k_3I}{k_{-3}} \right) E$$

За скоростта на реакцията се получава

$$v = k_2E_1 = \frac{k_2S_0E_0}{S_0 + K_M + K_M K_I I},$$

където  $K_I = k_3/k_{-3}$ . Максималната скорост  $v_{max} = k_2E_0$  не се променя, но поради допълнителния член в знаменателя скоростта намалява.

При неконкурентното инхибиране :

$$\begin{aligned} dE/dt &= -k_1SE + (k_{-1} + k_2)E_1 = 0 \\ dE_1/dt &= k_3IE - (k_{-1} + k_2 + k_3I)E_1 + k_{-3}E_2 = 0 \\ dE_2/dt &= k_3IE_1 - k_{-3}E_2 = 0 \end{aligned}$$

Решението за скоростта има вида

$$v = \frac{k_2S_0E_0}{S_0 + K_M + K_I S_0 I}$$

при това максималната скорост намалява

$$v_{max} = \frac{k_2E_0}{1 + K_I I}$$

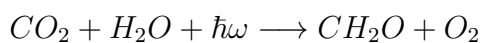
### 5.2.3 Приложение на модела на Михаелис - Ментен при фотосинтезата

Уравненията на кинетиката на реакциите в нестационарно състояние, даже в най-простите практически случаи са нелинейни, затова те не могат да бъдат решени аналитично. Използуването на числени методи позволява моделирането на реакциите и определяне на концентрациите на реагентите.

Скоростта на *фотосинтезата* може да се представи с формула, подобна на (5.5) формулата на Михаелис - Ментен :

$$v = \frac{(k_E/n)EI}{K + I} \quad (5.6)$$

Сумарното уравнение на фотосинтезата има вида :



Скоростта на фотосинтеза зависи от интензитета на светлината  $I$ . Опитът показва, че за получаване на една молекула  $O_2$  са необходими  $n \approx 8$  молекули от някакъв субстрат. На един ензимен комплекс се пада около 300 молекули *хлорофил* (50 при фотосинтезиращите бактерии), затова концентрацията на ензима  $E = C_{hl}/300$ , където със  $C_{hl}$  сме означили концентрацията на хлорофила. Константата  $k_E$  се определя като се измери количеството  $O_2$  при импулсно осветление с различна продължителност на импулса. Средното време за превръщане на една молекула субстрат е  $\approx 0.02$  секунди, затова  $k_E = 50s^{-1}$ . За максималната скорост на фотосинтеза от (5.6) се получава  $v_{max} = k_E E/n \approx 0.02C_{hl}$  - максималната скорост на фотосинтеза при постоянно осветление е една молекула  $O_2$  на молекула хлорофил за 50 секунди.

Разбира се фотосинтезата е сложен процес, който протича на няколко стадия и формула (5.6) е емпирична, и скоростта на реакциите не винаги се представя с формулата на Михаелис - Ментен . На кривите, описващи зависимостта на скоростта от концентрацията на субстрата се наблюдават инфлексни точки, максимуми, плато. Като правило тези особености се обясняват с наличието на четвъртична структура на ензимите и взаимодействие на различни субединици. На фиг.(5.5) е показана зависимостта на  $v(S)$  за аспарат - транскарбамилазата без (крива 1) и при наличие на модификатор - ЦТФ (крива 2). Кривата 1 има S - образна, а не хиперболична форма.

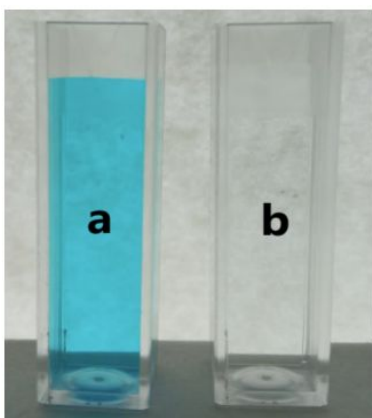
### 5.2.4 Приложение на модела на Михаелис - Ментен при фоторазграждане на метиленово синьо

Фотокатализата, базирана на оксидни наноматериали, е един от най-ефективните и икономически приемливи методи за пречистване на замърсена вода от органични замърсители под действието на видима или ултравиолетова светлина.

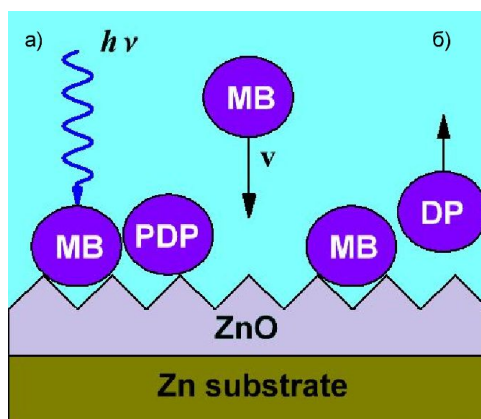
Метиленовото синьо ( $C_{16}H_{18}ClN_3S$ ) е ароматно съединение, катионна боя, широко използвана за боядисване на памук, вълна и коприна. Тя е стабилна и в отпадъчните води може да доведе до изгаряне на очите, гадене, повръщане, отравяне при вдишване и контакт с кожата. Следователно е необходимо да се премахват

такива опасни багрила от промишлените отпадъчни води, преди да са замърсили близките сладководни потоци.

ZnO е един от най-важните фотокатализатори поради своите уникални предимства, като ниската цена, високата фотокаталитичностактивност и нетоксичност (фиг. 5.3). Недостатъкът на този катализатор обаче е, че неговата каталитична активност все още е недостатъчно висока за търговски приложения, затова се провеждат изследвания с получени по различни начини повърхности с ZnO. Моделът на Михаелис - Ментен описва процеса на фотокатализа на метиленово синьо (MB) върху такава повърхност:



Фигура 5.3: Кювета с метиленово синьо: а) преди и б) след фоторазграждане.



Фигура 5.4: Каталитично фоторазграждане на метиленово синьо върху повърхността на анодизиран Zn при „светли“ - (а) и „тъмни“ - (б) условия.

На фигура 5.4 е показан процесът на фоторазграждане на метиленово синьо върху повърхността на анодизиран Zn при „светли“ - (а) и „тъмни“ - (б) условия. С *PDP* и *DP* са означени продуктите на разграждане при светли и тъмни условия.

### 5.2.5 Реакция с два еднакви центрове на активация

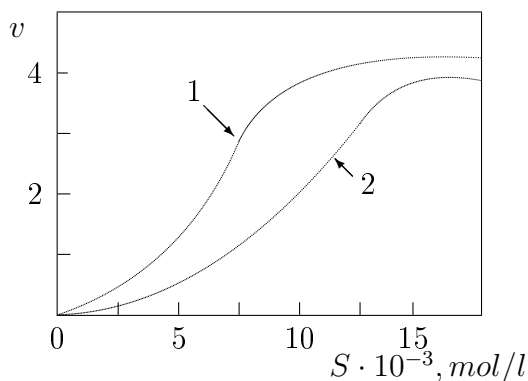
На фиг.(5.6) е показан прост модел на кинетиката на реакция, в която ензима се състои от две взаимодействащи тъждествени субединици. Всяка субединица има активен център. Молекулата на ензима може да съществува в три състояния :

- $E_{00}$  - двата центъра са свободни;
- $E_{10}, E_{01}$  - единият център е зает от субстрат, а другият е свободен;
- $E_{11}$  - двата центъра са заети от субстрат.

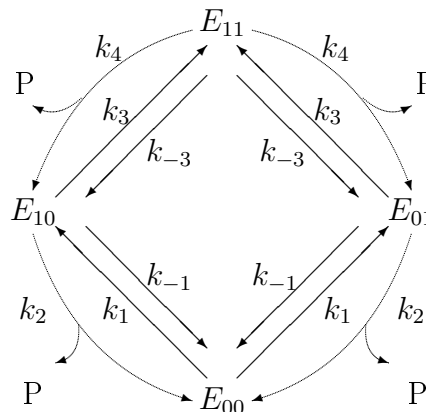
Уравненията за кинетиката на центровете са :

$$\begin{aligned} dE_{00}/dt &= -2k_1SE_{00} + 2(k_{-1} + k_2)E_{10} &= 0 \\ 2dE_{10}/dt &= 2k_1SE_{00} - 2(k_1 + k_2 + k_3S)E_{10} + (k_{-3} + k_4)E_{11} &= 0 \\ dE_{11}/dt &= 2k_3SE_{10} - 2(k_{-3} + k_4)E_{11} &= 0 \end{aligned}$$





Фигура 5.5: Зависимост  $v(S)$  за ас-партат - транскарбамилаза.



Фигура 5.6: Схема на реакция на ензим състоящ се от две тъждествени субединици.

Сумата на трите уравнения е нула, защото сумарното количество на ензима се запазва :

$$E_0 = E_{00} + 2E_{10} + E_{11} = \text{const}$$

Скоростта на образуване на продукта е :

$$\frac{dP}{dt} = v = 2k_2E_{10} + 2k_4E_{11}$$

За скоростта се получава :

$$v = 2k_2E_0S_0 \frac{\alpha S_0 + \beta K}{S_0^2 + 2\beta K S_0 + \beta K^2},$$

където  $\alpha = k_1/k_2$ ,  $K = (k_1 + k_2)/k_1$ ,  $\beta = (k_{-3} + k_4)/(Kk_3)$ . При  $\alpha = \beta = 1$  се получава формулата на Михаелис - Ментен, при  $\alpha < 0.5$  се получава максимум.

### 5.3 Конформационни свойства на ензимите

Ензимите се синтезират в клетките като протеинови вериги по разгледаната схема ДНК → РНК → белтък, но много ензими претърпяват модификации след синтеза, без които не показват своята активност в пълна степен. Такива модификации се наричат посттранслационни (процесинг). Един от най-често срещаните видове модификация е добавянето на химични групи към страничните остатъци на полипептидната верига. Друг често срещан тип посттранслационни модификации е разцепването на полипептидната верига.

Ензимите могат да бъдат разделени на две групи в зависимост от строежа им:

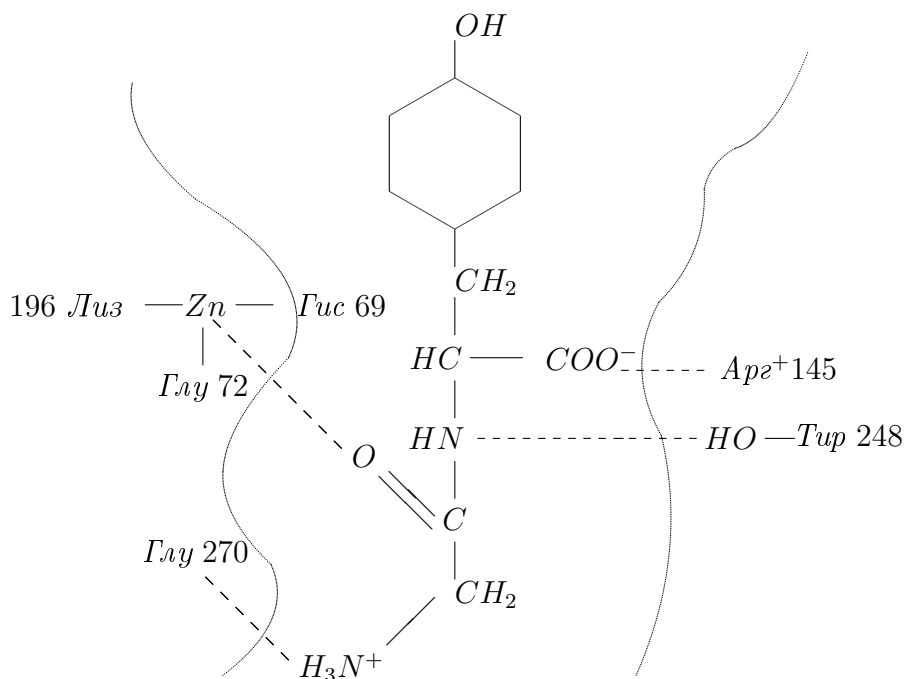
1. Еднокомпонентни, състоящи се изключително от белтък - представляват изцяло полипептидни вериги и при хидролиза се разграждат изключително на аминокиселини. Тези ензими (прости протеини) са хидролитични ензими, по-специално пепсин, трипсин, папаин, уреаза, лизоцим, рибонуклеаза, фосфатаза и др.

2. Двуконпонентни, състоящи се от белтък и небелтъчна част. Повечето ензими принадлежат към класа на сложните протеини, съдържащи, освен полипептидни вериги, някой небелтъчен компонент (*кофактор*), чието присъствие е абсолютно необходимо за каталитична активност.

Кофакторите могат да имат различна химична природа и се различават по силата на свързване с полипептидната верига. Ако константата на дисоциация на сложен ензим е толкова малка, че в разтвор всички полипептидни вериги са свързани с техните кофактори и не се разделят по време на изолиране и пречистване, тогава такъв ензим се нарича *холоензим*, а кофакторът е група, разглеждана се като неразделна част от ензимната молекула. Полипептидна част на ензима обикновено се нарича *апоензим*.

За разбиране на ензимната активност е необходимо да се разгледа конформационното поведение на макромолекулата на белтъка. В някои конформации той по-ефективно свързва субстрата като се извършва и отбор на конформациите на субстрата, така се реализира структурното съответствие на ензима и субстрата.

Моделът, предложен от Фишер се нарича *модел ключ-ключалка*. Според него ензимът и субстрата са “твърди” структури, като субстрата пасва към ензима така, както ключът към ключалката. Има, обаче редица факти, които не могат да се обяснят от този модел. Взаимодействието субстрат - ензим има по-скоро динамичен отколкото статичен характер.



Фигура 5.7: Схема на активен център на карбоксипептидаза.

Кошланд е предложил модела *ръка-ръкавица*. При него ензимът има много ниска твърдост на веригата и е в състояние да приеме формата на комплементарна реактивна конфигурация на субстрата, т.е. „обвива“ го като ръкавица. Ефективността на катализата се увеличава само поради конфигурационната ентропия на субстрата (ентропийна катализа).

Рентгенограмите на ензим - субстратните комплекси дава пряка информация за конформационните преобразувания. Те показват наличието на кухини, в които се разполагат субстратите, при което настъпва изменение в самата кухина - тя се "свива" около субстрата. На фиг.5.7 е показано взаимодействието между ензима карбоксипептидаза и субстрата на глицилтирозина. Активния център представлява дълбока кухина с такава форма, че да насочи субстрата към кофактора - атома  $Zn$ . Едната връзка се образува между  $NH$  групата и тиразин 248 от ензима, другата е между карбоксила и положително заредения аргинил 145, третата между аминната група и отрицателния глутамил. Изследванията показват, че вътрешната повърхност на кухината е образувана предимно от неполярни остатъци, което облекчава електрическите взаимодействия - привличането във водна среда е  $\epsilon \approx 80$  пъти по слабо, следователно в кухината то е 80 пъти по силно и съответно води до снижаване на енергията на активация.

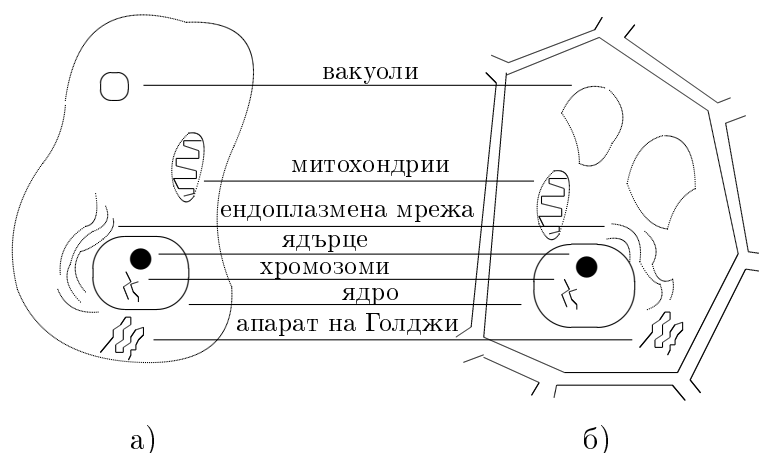
Йоните на металите играят важна роля при протичането на много биологични процеси. Йоните  $Zn^{2+}$  фигурират в активните центрове на редица ензими, в частност в ДНК и РНК полимераза. Йоните  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  и  $Mo^{2+}$  се съдържат в редица важни белтъци. Йона  $Co^{2+}$  се съдържа във витамина  $B_{12}$ . Йоните на желязото  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$  играят важна роля във хемоглобина и миоглобина, а  $Na^+$  и  $K^+$  участвуват в предаването на нервните импулси. Йоните  $Mg^{2+}$  са съществени за мускулните съкращения. Почти винаги те са не във формата на металоорганични съединения, съдържащи връзката метал - въглерод, а под формата на координационни съединения.

# Глава 6

## Физика на мембраните

### 6.1 Мембрани и клетки

Всички живи организми (растения, животни) се състоят от “елементарни атоми” – клетки. Те представляват автономни функционални единици, в които става преобразуване на химическата енергия на храната в механична, електрична, осмотична и други форми на енергия. В ДНК на клетките се пази генетичната информация, в тях протичат химичните реакции, водещи до обмена на веществата – *метаболизма*. Той протича с участието на ферменти – катализатори на реакциите. В процеса на метаболизма клетката поддържа вътрешната среда постоянна. *Хомеостазът* е възможен поради наличието на канали за отрицателна обратна връзка.



Фигура 6.1: Устройство на а) животинската и б) растителната клетка.

Всяка клетка се състои от външна мембрана и вътрешна среда – цитоплазма. Основната част от цитоплазмата е разтвор от различни химически вещества. В нея се намират различните структурни единици. Те са изградени от четири вида органични молекули: аминокиселини, нуклеотиди, захари, мастни киселини. Най-важните части на клетката (органели) са:

- *Ядро* – в него става синтеза на РНК и се намира ДНК. Обвивката му, пронизана от пори има двойна мембрана, свързана с грубия ендоплазмен ретикулум. Ядра съдържат само еукариотите, прокариотите нямат ядро, тяхното ДНК се намира в цитоплазмата.
- *Цитоплазма* – полутечна среда, която представлява колоиден разтвор на различни соли и органични вещества. Пронизана е от системата от проте-

инови нишки, която се нарича цитоскелет. Тя обединява ядрото и всички органели в едно цяло, осигурява тяхното взаимодействие.

- *Ендоплазмен ретикулум* (ЕР) – представлява мрежа от тръбички и мехурчета с развита мембранна система. Грубият (зърнест) ЕР е домакин на рибозоми, където се осъществява синтеза на протеини, гладкият ЕР съдържа липидни везикули и участва в синтеза на липиди и стероиди. ЕР също участва в добавянето на въглехидрати към протеините, сплайсинга (снаждането) и сгъването на пептиди и опаковането на протеини в липидни везикули за транспортиране до други части на клетката.
- *Митохондрии* – универсален комплект от клетки, в които става синтез на аденозин трифосфат (АТФ). Те съдържат собствена ДНК.
- *Хлоропласти* – специализирани органели в растителните клетки, в които става фотосинтезата. Намират се растителните клетки.
- *Везикули* – (мехурчета): малки сферични двуслойни контейнери, те се сливат или изпускат от мембраната на клетката.
- *Вакуоли* – гигантски везикули без определена форма. Изолират вредните вещества и отпадъчните продукти, спомагат за поддържане на правилното хидростатично налягане.
- *Лизозоми* – везикули с ензими лизозими за разграждане или усвояване на по-големи молекули.
- *Рибозоми* – голям комплекс от протеини, ензими и рибозомна РНК. Служат за синтез на протеини на базата на мРНК.
- *Апарат на Голджи* – подобен на гладък ЕР (сгъната мембрана). Служи за обработка и опаковане на липиди и протеини и разграждане на въглехидрати и липиди.
- *Мембрана* – отделя клетката от външния свят, състои се от двоен слой, позволяващ веществата да влизат и излизат от клетката.

Мембраната задава външната граница на клетката. Тя удържа вътре във нея необходимите компоненти, предотвращава (за сметка на голямото вътрешно съпротивление) утечката на нискомолекулни разтворими вещества.

Тънката регулация на вътреклетъчните процеси се основава на пространственото разделение на органелите на клетките. Това става с вътрешноклетъчни мембрани.

*Биологическите мембрани* са молекулни системи, чийто размер в две измерения значително надвишава размерът им в третото, който е от порядъка на  $10\text{nm}$ . Всички механизми, отговорни за биологическата функционалност на мембраните са локализиращи именно в тази дебелина.

На таблица (6.1) са изброени най-важните явления протичащи в мембраните. Рецепцията – механична, акустична, обонятелна, вкусова, зрителна се осъществява с участието на мембрани, разпространението на нервния импулс е мембранен

Явление	светлина	ел. пот.	ел. ток	ел. транспорт	АТФ
фотосинтеза	+	+	+	+	синтез и разпад
дишане	–	+	+	+	синтез и разпад
зрение	+	+	+	–	разпад
нервен импулс	–	+	+	–	разпад
мускулни съкр.	–	+	+	–	разпад

Таблица 6.1: Най–важни биологични процеси протичащи в мембраните.

процес. Най – важните процеси в клетките са съпроводени със транспорт на вещество реализиращ се през мембраните.

Мембранната физика и биология имат важно значение както за теорията, така и за приложенията ѝ в медицината и фармакологията. Основните проблеми третирани във физиката на мембраните са :

1. строеж на мембраните, динамически свойства;
2. пасивен и активен мембранен транспорт;
3. свойства на възбудимите мембрани;
4. биоенергетика на мембраните;
5. физика на процесите на рецепция.

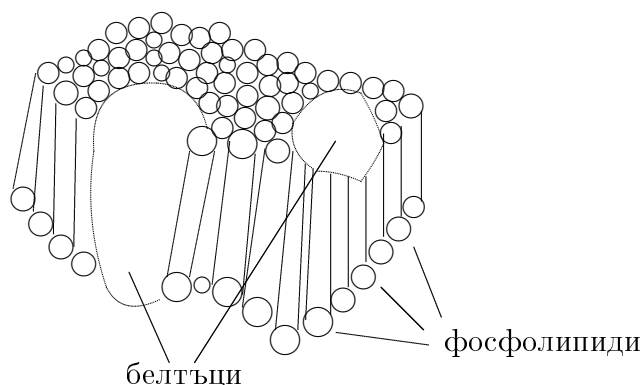
## 6.2 Устройство на мембраните

Мембраните се състоят основно от *липиди* и белтъчини. Природните мазнини, спадащи към липидите представляват триглецириди на мастните киселини. Те съдържат дълги “опашки” от неполярни въглеродородни остатъци и силно полярни “глави” с групи  $—O—CO—$ . Липидите на клетъчните мембрани имат сложен строеж, включващ и въглеродни, аминни и алкиламинни групи. Редица важни съединения спадат към фосфолипидите. Във вътрешните мембрани преобладават фосфолипидите, а в плазмическите се съдържат и неутрални липиди. Съдържанието на различни видове липиди и белтъчини е разнообразно, има обаче мембрани изградени само от един вид белтък, например *пръчиците*, с чиято помощ ние виждаме на тъмно, са изградени само от един белтък – родопсин.

Още през 1935г Даниели и Давсон са предложили така наречения *унитарен модел* на биологическата мембрана. Според него те се състоят от двоен липиден слой, като хидрофобните “опашки” са обърнати към вътрешността на мембраната, а “главите” им се намират на повърхността, където взаимодействуват с външните мономолекулярни белтъчни слоеве.

Унитарният модел не веднъж се е модифицирал. Понастоящем най – правдоподобен е *мозаичния модел* на мембраната, показан на фиг.6.2. В него освен двойният липиден слой се отчита наличието на белтъчини. Белтъците участващи в строежа

на мембраната биват два вида. Тези, които са хидрофобни проникват във вътрешността и взаимодействуват с хидрофобните “опашки” на липидите. Хидрофилните белтъци са свързани на повърхността на мембраната.



Фигура 6.2: Устройство на мембраната.

Липидите в мембраната се държат като *течни кристали*. Течните кристали са промеждутъчно състояние между течностите и кристалите. Те текат и имат вискозитет като течностите, но притежават анизотропия като кристалите. В случая с липидите анизотропията е резултат от еднопосочната им ориентация (фиг.6.2). Белтъчините като че ли плуват в липидното море, като някои от тях се простират от едната до другата повърхност, образувайки канали през мембраната. При изменение на температурата настъпва топене на липидите като настъпва полимеризация на въглеродните вериги. Това води до освобождаване на места в мембраната, през които може да протича бърза дифузия. Конформационните изменения играят важна роля при взаимодействието на мембраната с веществата, което е съществено за физиологията и фармакологията.

Течнокристалното състояние на мембраната позволява липидите и белтъците да се преместват в нейната равнина. Това преместване се нарича *латерална дифузия* и протича с доста висока скорост с характерно време  $10^{-8} - 10^{-7}$ s. Между различни домени на бислоя се извършва преразпределение на липидни молекули, което показва, че те лесно мигрират по неговата повърхност. Скоростта на латералната дифузия рязко спада при преход на бислоя от течнокристално състояние в кристално.

Възможно е преместване и от единия монослой в другия. Това преминаване през бислоя се нарича напречна дифузия или за него се използва термина *flip-flop*, тъй като прескачането на една липидна молекула в едната посока се придружава от прескачане на друга молекула в другата посока. За разлика от латералната дифузия, напречната е много бавна. Като мярка за нейната скорост се въвежда величината полупериод на напречната дифузия. Той се дефинира като време, за което половината от липидните молекули на единия монослой преминава в другия. Полупериодът е от порядъка на няколко часа и даже дни. Причината за изключително бавния flip-flop е неговата енергийна неизгодност, тъй като полярната глава на липидната молекула трябва да премине през хидрофобната област на бислоя.

Мембраната е жизнено необходимо образувание и нейното разрушение води до загиване на клетката. Тя не представлява просто обвивка на клетъчното съдържимо, а регулира постъпването и отделянето на молекули и йони от и към околната среда т.е. служи като бариера. Освен това, в мембраната се намират различни ензими и рецептори, природата на които зависи от особеностите на всеки вид клетка. Мембраните се различават в зависимост от функциите си, но всички мембрани притежават няколко общи функции:

- *Бариерна функция* – ниска проницаемост за йони ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ) – концентрационни градиенти.
- *Транспортна функция* - белтъчни канали, преносители или помпи за активен транспорт.
- *Структурна функция* – компартменти в клетката (изолиран с мембрана участък), клетъчната форма, връзка със съседните клетки в тъканите.
- *Рецепторна* – специфично свързване на определени (сигнални) молекули от външната среда (лиганди – хормони, медиатори) - приема информация от околната среда и я предава в клетката.
- *Ензимна* - вградени в мембраната ензими - мембраната на хлоропластите, синтеза на АТФ в митохондриалната мембрана.
- *Защитна* - защитна преграда срещу вредни физични, химични и биологични фактори.

### 6.3 Изкуствени мембранни структури

Изкуствените липидни мембрани, получени при контакт с вода на смес от фосфолипиди и неутрални липиди, разтворени в органични разтворители, имат свойства близки до тези на биологичните мембрани. Те имат двуслоен строеж и дебелина по-малка от  $10\text{nm}$ , но са лишени от метаболитната активност и високата селективност на биологичните мембрани.

За да се проучат многото свойства на мембраните, като пропускливост за различни вещества (включително лекарства), електрическа проводимост, механизма за образуване на трансмембранни потенциали и други, е удобно да се използват изкуствени, а не естествени мембрани. Известно е, че липидите, отложени на повърхността на водата, не се смесват с нея, а образуват филм. Чрез прилагане на определено количество липиди върху повърхността на водата може да се получи мономолекулен слой. Благодарение на амфифилното свойство, на границата между вода и въздух, хидрофилните „глави“ на липидите се обръщат към водата, а хидрофобните „опашки“ към въздуха.

На способността на липидите да образуват мономолекулярни слоеве на границата на хидрофобната и хидрофилната фаза се основава действието на миешете препарати. Сапунът се състои от липидни молекули, които във вода обграждат



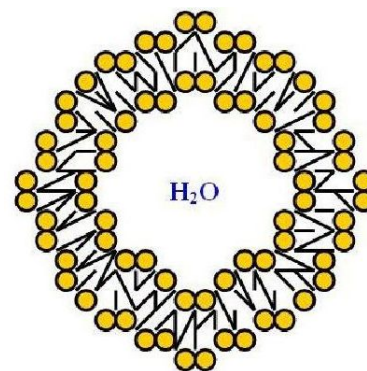
мазните зони. Хидрофобните фрагменти от замърсяването са вътре в капсула, заобиколени от монослой сапунен молекули. Отвън такава капсула има хидрофилни групи и затова лесно се отмива с вода.

Монослоевите имат съществен недостатък: те се състоят от един слой липиди, докато естествените мембрани са формирани от два слоя. Изкуствените мембранни структури като липозоми и плоски двуслойни липидни мембрани са лишени от този дефицит. Липозомите се образуват чрез прибавяне на фосфолипиди към полярен разтворител. В този случай възниква спонтанно образуване на двуслойни затворени структури, тъй като именно тази структура съответства на състоянието с минимална енергия (фиг.6.3).

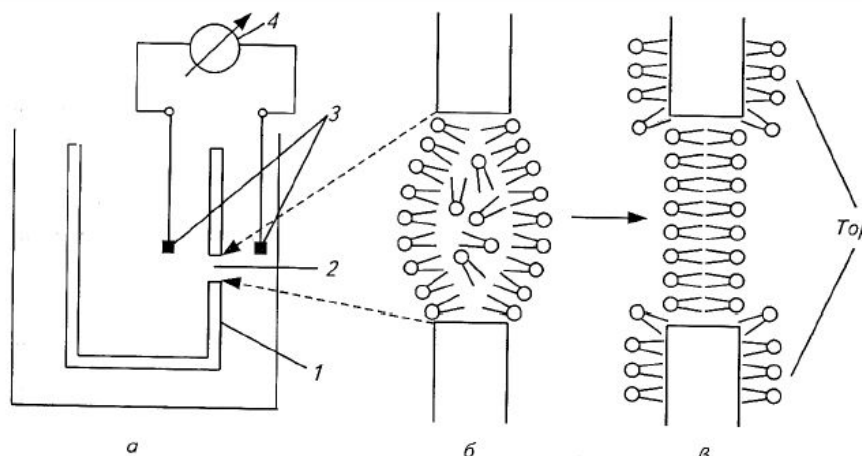
Използвайки липозоми, можете да се определи пропускливостта на мембраната за определено лекарство. За това липозомите се получават в разтвор, съдържащ изследвания препарат. Част от лекарството се намира вътре в липозомите, след което останалата част се отстранява от околния разтвор и скоростта на неговото освобождаване се определя от количеството на лекарството, изтичащо от липозомите в разтвора за определено време.

Липозомите могат да се използват не само в научните изследвания, но и в практиката.

С въвеждането на лекарство в липозомите се улеснява неговото доставяне и проникване в тъкани или органи. Съставът на липозомните липиди може да бъде избран по такъв начин, че такава обвивка да бъде напълно нетоксична. В козметологията например в състава на кремове се включват липозоми, съдържащи биологично активни вещества.



Фигура 6.3: Липозома.



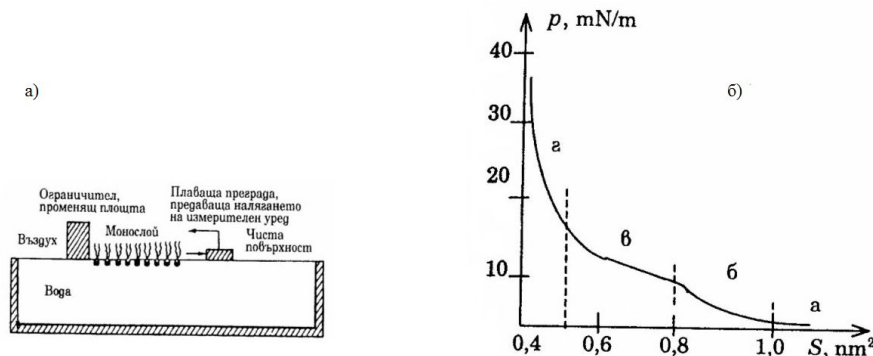
Фигура 6.4: Образуването на двуслойна липидна мембрана: а - клетка за получаване на ДЛМ и изследване на нейните свойства; б и в - последователни етапи на формиране на ДЛМ; 1 - чаша от флуоропласт; 2 - дупка в стената на чашата; 3 - електроди; 4 - волтметър.

Плоски двуслойни липидни мембрани (ДЛМ) могат да бъдат получени чрез нанасяне на капка липиден разтвор на въглеродород (например хептан) върху

малка дупка с диаметър около 1 mm в тънка флуоропластова пластинка, поставена във вода (фиг.6.4). Разтворителят дифундира в разтвора, образува се плътен липиден филм, който спонтанно изтънява в рамките на 5–20 минути, докато се получи билипдна мембрана с дебелина 5–7 nm. Изтъняването на филма се улеснява от силите на повърхностно напрежение и силите на ван дер Ваал–Ваалс, привличащи слоеве от двете страни на филма. Излишните липидни молекули се натрупват върху ръба на дупката в пластмасовата чаша, образувайки тор.

## 6.4 Повърхностно напрежение на монослой

Ако няма ограничения монослоят от липиди заема максимално възможна площ и има характеристика на двумерен газ. Липидните молекули се движат свободно по повърхността без да си взаимодействат. При свиване на монослоя се увеличава силата на единица дължина  $p$  (фиг. 6.5). При увеличение на плътността на монослоя молекулите започват да си взаимодействат и тогава се образува двумерна течност. При по-нататъшно свиване главите са плътно една до друга, опашките са изправени, но имат известна подвижност – кондензиран монослой. След още по-голямо свиване – монослоят става твърд, практически несвиваем, а всяка молекула заема минимална площ. След това се извършва колапс на монослоя и молекулите се качват една върху друга.



Фигура 6.5: Изследване на монослой а) везна на Ленгмюир, б) Зависимост на повърхностното напрежение от площта.

Повърхностното напрежение се дефинира като силата приложена на единица дължина на повърхността на течността. То може да се измери с везната на Ленгмюир (фиг. 6.5 а). На фиг. 6.5 б) е получената зависимост, която може да се апроксимира с формулата  $S = S_0 + \frac{b}{p}$ . В нея  $S$  е площта на повърхността, а  $b$  е свиваемостта на монослоя, която зависи от вида на липида. Ако веригата е наситена  $b$  е по-голяма, а при наличие на двойни връзки е по-малка. Върху  $b$  оказват влияние белтъците.

Свойствата на монослоя лежат в основата на процеса на миене със сапун. Молекулите на миещите вещества имат дълга хидрофобна опашка и малка хидрофилна глава. Сапунът се състои от химичното вещество натриев стеарат, което е повърхностно активно.

Молекулите на повърхностно активните вещества в граничната си повърхност са подредени така, че хидрофилните групи са насочени към водата, а хидрофоб-

ните се отблъскват от нея. В резултат на това, цялата повърхност на водата се покрива с преграда от молекулите на повърхностно активните вещества. Такава водна повърхност има по-малко повърхностно напрежение, което води до по-бързо и пълно намокряне на замърсените повърхности. За сметка на намаляването на повърхностното напрежение на водата, се увеличава способността ѝ да намокря. Покритата с молекулите на повърхностно активните вещества частиците мръсотия (и вирусите) се отделят от тъкани, кожа и други повърхности и под формата на емулсия или суспензия преминават в разтвора, благодарение на което те могат впоследствие лесно да се премахват, заедно с водата.

Такива биологично важни обекти като плазма и кръвен серум имат способността да възстановяват първоначалната стойност на повърхностното напрежение, което намалява в резултат на добавянето на повърхностноактивни вещества. Това е много важно свойство, необходимо за поддържане на хомеостазата на кръвта. Тази способност на разтворите да възстановяват първоначалната стойност на повърхностното напрежение се нарича повърхностно буферирание. Повърхностното буферирание на кръвния серум се обяснява с наличието на калциеви йони в него, които, реагирайки с повърхностно активни мастни киселини, образуват с него неразтворими соли, които вече не могат да променят повърхностното напрежение. Съществена роля в поддържането на постоянството на повърхностното напрежение на плазмата и кръвния серум играят съдържащите се в тях протеини, които адсорбират повърхностно активни вещества.

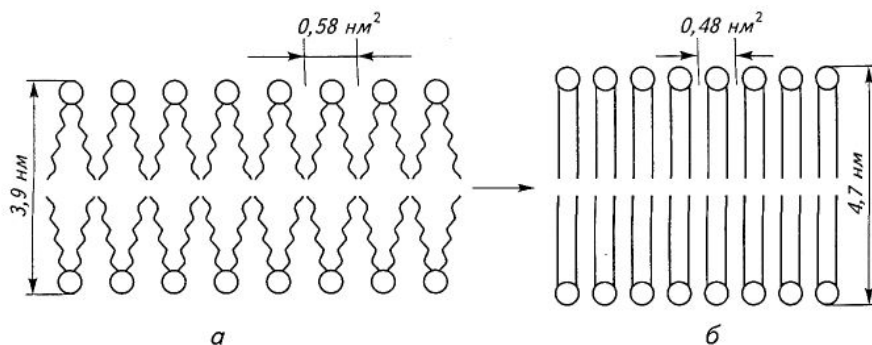
## 6.5 Фазови преходи в мембраните

При нормални физиологични условия мембраните са в течно състояние, но за разлика от течностите те имат строго подредена пространствена структура. Поради тези свойства състоянието на мембраната се нарича течнокристално.

От анализите, като рентгенов дифракционен анализ, микрокалориметрия (измерване на топлинния капацитет) и други, биологичните мембрани са способни да изпитват фазов преход от първи ред. С понижаване на температурата мембраните се прехвърлят от течнокристално състояние в твърдо кристално състояние (състояние на гел). При такъв преход се запазва цялостната структура на мембраната: липидите продължават да образуват двоен слой с обърнати навътре хидрофобни „опашки“, но редът в системата е още по-стар: „опашките“ на липидите са опънати строго успоредно един на друг (фиг.6.6), колебанията им са ограничени. Ако в течно състояние площта на мембраната за една липидна молекула е  $0,58 \text{ nm}^2$ , тогава в състояние на гел тази стойност намалява до  $0,48 \text{ nm}^2$ . Дебелината на мембраната по време на прехода към твърдо състояние се увеличава, но поради намаляването на площта обемът на мембраната като цяло намалява. Подвижността на липидните молекули и в двете фазови състояния е значително различна. В състояние на гел липидите са в състояние да правят само колебания на ставите или въртеливи движения. В течно състояние липидните "опашки" имат много по-голяма свобода, особено в средата на мембраната.

Наскоро е доказано, че по време на фазови преходи от състояние на течен кристал в състояние на гел и обратно в мембраните се образуват пори с диаметър 2-6 nm. Тоест, по време на фазовия преход пропускливостта на мембраната към йони

и нискомолекулни съединения, които могат да преминават през такива пори, се увеличава. По-долу ще бъде показано, че провеждането на нервен импулс се определя от промяната на пропускливостта на мембраната за определени йони. Беше предположено, че механизмите на термоцепция (чувствителността на клетките на нервните рецептори към температурните промени) могат да бъдат определени чрез фазов преход в рецепторните мембрани, което допринася за появата на нервен импулс. Тъй като фазовият преход може да има и химическо естество (например мембранните липиди могат да се гелират поради увеличаване на концентрацията на  $\text{Ca}^{2+}$  от 1 до 10 mmol/l в междуклетъчната течност), възможно е тези процеси да определят и хеморецепция (чувствителност към химикали).



Фигура 6.б: Фазов преход на мембранни липиди от течнокристално състояние (а) в състояние на гел (б) с намаляваща температура.

Фазовият преход в мембраните не става моментално, а в определен температурен диапазон. Температурата на фазовия преход е температурата, при която половината от мембраните липиди са в течно-кристално състояние, а другата половина са в твърдо-кристално състояние.

Температурата на фазовия преход зависи от липидния състав на мембраните: колкото повече са двойните връзки в опашките на липидите (а техният брой в едната опашка на молекулата може да варира от нула до четири), тоест, колкото по-голяма е степента на ненаситеност на остатъците от мастни киселини, толкова е по-ниска температурата на фазовия преход. За мембраните, състоящи се от наситени липиди, тази стойност е  $+60^{\circ}\text{C}$ , а за мембраните, състоящи се от ненаситени липиди, тя намалява до  $-20^{\circ}\text{C}$ . Подобна разлика в точките на топене се обяснява с факта, че ненаситените мастни киселини в цис-конформацията насърчават отстраняването на липидните молекули една от друга и съответно намаляват адхезивните сили между тях. Колкото по-слаба е връзката между молекулите, толкова по-ниска е температурата на прехода на мембраните в течната фаза.

Живите организми, които живеят в различни климатични условия, имат различно съотношение на наситени и ненаситени връзки в липидните молекули, което осигурява тяхното адаптиране към студ или топлина, в зависимост от местообитанието им. Освен това, това съотношение варира за различните части на тялото на един и същи организъм.

Фазовите преходи на мембранните липиди имат кооперативен характер, тоест колкото повече липиди са направили фазов преход, толкова по-лесно ще бъде да

се направи останалото. В идеалния случай, ако в един регион една липидна молекула се прехвърли от твърда в течна кристална фаза, тогава неизбежно следва фазов преход на всички липиди от този региона (законът за всички или нищо). Такъв участък се нарича кооперативна единица, а броят на молекулите в него се нарича размер на кооперативната единица  $n$ . За липидните мембрани  $n$  може да достигне няколко десетки. Колкото по-голяма стойността на  $n$ , толкова по-хомогенен е химичният състав на мембраните. За да се намали еднородността на липидния състав на мембраната, животинските клетки съдържат големи количества холестерол, например, в еритроцитите на бозайниците той варира от 40 до 60%. Това значително намалява размера на кооперативната единица и намалява разликите между твърдата и течната фаза.

Един от най-разпространените методи за изследване на фазови преходи в мембраните е методът на микрокалориметрията, който ни позволява да определим количеството топлина  $Q$ , погълната по време на топенето на вещество, съдържащо  $\nu$  мола.

## 6.6 Мембранен транспорт

Съществуват различни начини за избиращен транспорт на вещества през мембраната. Разделят ги обикновено на два вида – неспецифични и специфични. Към неспецифичните спадат дифузията и осмозата – те са чисто физически процеси. Специфичните се осъществяват с помощта на специализирани структури в мембраната. Тези процеси се наричат *транспорт*. Той може да бъде активен или пасивен.

*Пасивният транспорт* се осъществява благодарение на градиента на концентрацията. Скоростта в случая е по-голяма от обикновенната дифузия (около  $10^5$ – $10^6$  пъти) и за разлика от нея се извършва с помощта на специални белтъци преносители. Този механизъм ще поясним на примера на пренасянето на D-глюкоза през мембраните на кръвните клетки – еритроцитите. В преноса участва белтък, образуващ в мембраната П-образна пора. Отворената ѝ част може да се ориентира навътре или навън. Центровете на свързване на глюкозата се намират вътре в пората. При завъртане на  $180^\circ$  молекулата на глюкозата автоматично се оказва на вътрешната или на външната страна на двуслойната мембрана. Интересно е, че в транспорта на глюкозата участвуват само  $10^5$  молекули белтък-преносител. Към системата на пасивния транспорт спадат *йонните канали* и *йонофорите*.

Ще поясним работата на каналите с примера за електровъзбуждането на мембраната. При нервните и мускулните клетки то е свързано с изменението на проницаемостта на мембраната за йоните на натрия, калия и калция. Затова в мембраните на клетките има три различни транспортни системи, които се наричат натриев, калиев и калциев канал.

Ако движението на веществото става против градиента на концентрацията, то съответните устройства се наричат системи за активен транспорт.

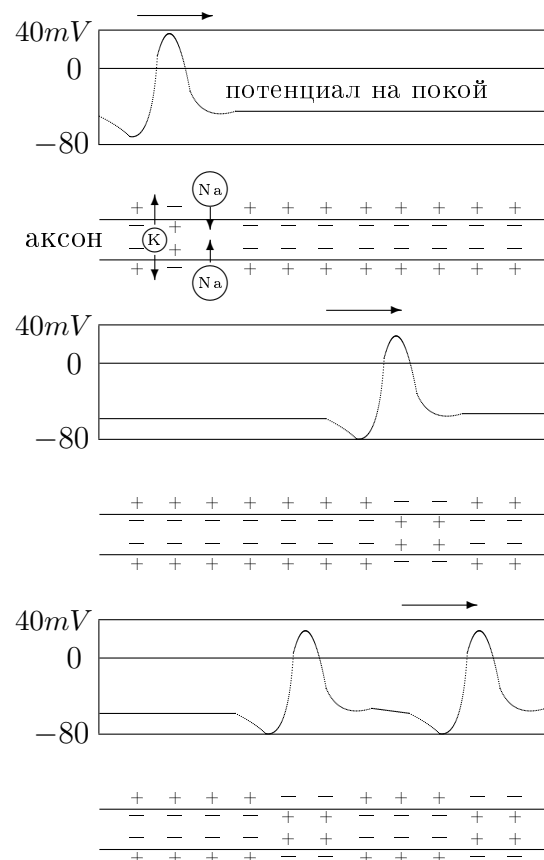
За нервните клетки е характерно неравномерното разпределение на йоните на натрия и калия от двете страни на плазмическата мембрана, в резултат на което възниква потенциална разлика от около 80 mV. Нервния импулс представлява

изменение на този потенциал по дължината на нервното влакно. В процеса на възбуждането поток от натриеви йони влизат в клетката през отворените канали, предизвиквайки *деполяризация* на вътрешната повърхност на мембраната, в резултат на което възниква ново състояние на канала, водещо до затварянето му. В същото време се откриват калиевите канали, обуславящи втория стадий на процеса на предаване на възбуждането – *реполяризацията* на мембраната и възстановяването на потенциала ѝ. Процесът на деполяризация – реполяризация по дължината на аксона на нервната клетка определя предаването на електрическия сигнал по нервното влакно. Това е свързано с преместването на малки количества натриеви и калиеви йони – от порядъка на  $10^4$ – $10^6$  на  $1 \text{ mm}^2$ .

Според един от моделите йонния канал се състои от водна пора, *йонен филтър* и “врата”, която в зависимост от потенциала мени своето конформационно състояние, водещо до отваряне или затваряне на пората. Йоните преминават канала съпроводени от молекули вода, които се задържат в най-тесното място на йонния филтър, действащ като механично сито.

*Активният транспорт* е характерен само за живите организми. Енергията необходима за преносът на вещество при него се осигурява от хидролизата на АТФ. Теорията на активния транспорт понастоящем не излиза от рамките на най-простите феноменологични модели. Според моделът на “малката въртележка” преносителят циркулира вътре в мембраната, залавяйки йони по едната граница и предавайки ги на другата. В моделът на “голямата въртележка” взаимодействието с йоните става в несмесващи се слоеве на разтвора близо до границите на мембраната.

В “щифетния” модел предаването става по канал, като предаваните йони се свързват последователно с различни центрове разположени по канала.



Фигура 6.7: Разпространение на нервния импулс по аксон.

## 6.7 Електропроводимост на клетки и тъкани

Електричните свойства на биологичните системи се делят на пасивни и активни. Пасивните се проявяват при външно прилагане на електрично напрежение, а активните са резултат от вътрешни процеси и водят до възникване на биопотенциалите. Електропроводимостта е пасивно свойство, това е способността на

системата да пропуска (провежда) електричен ток. Характеризира се с величината специфична електрична проводимост  $\sigma = 1/\rho$ , която е равна на реципрочната стойност на специфичното електрично съпротивление  $\rho$ . Изучаването на електропроводимостта на живите тъкани и клетки е метод за изследване на техните физични свойства, функционално състояние и структура. Изследванията показват, че въпреки високото съдържание на неорганични йони в клетките и в извънклетъчната течност, тъканите имат ниска електропроводимост. Това се дължи на диелектричните свойства на мембраните и диелектричната им поляризация. Ако върху суспензия от клетки в проводящ разтвор е приложено постоянно напрежение, електричният ток протича през клетките. Това с известно приближение се отнася и за тъканите, но при постоянно напрежение големината на тока бързо намалява с времето докато се установи на ниво стотици или хиляди пъти по-малко от началното. Това намаление на тока в биологичните тъкани се обяснява с появата на поляризационно напрежение, с посока противоположна на приложеното. То също се мени във времето, бързо расте до определено ниво. Ако говорим за състава на биологичните тъкани, те са изградени предимно от белтъци, липиди и течни електролити. Белтъците и липидите имат незначителна, а електролитите относително висока йонна проводимост, която се дължи главно на йоните на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{P}^{3-}$ . Електрични заряди пренасят и белтъците, в които някои аминокиселини са йонизирани.

Високото съпротивление на клетките и тъканите за постоянен ток се обяснява с тяхната хетерогенна структура и диелектрични свойства на мембраните. Затова при променлив ток говорим, че те имат както активно съпротивление, така и капацитивно (като на кондензатор). Най-общо капацитивното съпротивление на клетките се обяснява чрез сравнение на техния строеж с този на електрическия кондензатор. Липидната мембрана на клетката има същата функция като диелектрика на кондензатора, а проводящите среди от двете и страни (цитоплазма и извънклетъчна течност) са аналози на неговите метални пластинки. Неговият капацитет не може да се пресметне само като се изходи от площта, дебелината и диелектричната проницаемост на мембраната. Това е статичен капацитет ( $C_s$ ), който е много по-малък от поляризационния капацитет ( $C_p$ ), който се получава в резултат от поляризацията протичаща извън мембраната. Поляризационният капацитет е най-голям при постоянен ток или при променлив с ниска честота, при повишаване на честотата над 10 kHz той става няколко порядъка по-малък от статичния. Тъй като двата капацитета са свързани последователно, сумарният капацитет при високи честоти се определя от по-малкия, т.е. от поляризационния. Като еквивалентна електрическа схема на жива клетка най-често се използва представянето и като последователно свързани активно и капацитивно съпротивление, тогава импедансът ще бъде:

$$Z = \sqrt{R^2 + \frac{1}{\omega^2 C^2}}$$

Честотната зависимост на електричния импеданс дава възможност за оценка на жизнеспособността на биологичните тъкани. Импедансът на живата тъкан намалява с увеличение на честотата, а на мъртвата остава неизменен. Причина е загиването на “живите кондензатори” – мембраните.

Подобно е поведението на диелектричната проникваемост в зависимост от честотата, тази зависимост се нарича дисперсия на диелектричната проникваемост и при увеличение на честотата тя намалява, например рязко намаляване се случва при честоти над 1 kHz. Обяснява се с релаксационните времена на различните видове поляризация – електронна, йонна, диполна, микроструктурна, повърхностна. Приема се, че при ниски честоти под 1 kHz променливият ток протича основно през извънклетъчната течност, докато при по-големи честоти проводимостта на клетката преобладава. При много големи честоти (1 GHz) основен принос има ориентационната поляризация на водните молекули.

## 6.8 Електрокинетични явления

Електрокинетичните явления се проявяват в движението на хетерогенна система под въздействието на наложено й постоянно електрическо поле, както и формирането на потенциална разлика в нея. Поради факта, че клетките и тъканите на биологичните обекти са сложни хетерогенни колоидни системи, изследването на електрокинетичните явления, които се срещат в тези системи, представлява голям интерес при изучаването на физикохимичните свойства на биологичните структури.

Електрофореза е движението на частици от дисперсна фаза в постоянно електрическо поле към противоположно зареден електрод. Електроосмоза е движението на дисперсионна среда в постоянно електрическо поле към електрод, зареден със същият заряд като частиците от неподвижна дисперсна фаза.

В колоидни разтвори при наличие на разлика в хидростатичното налягане или градиент на гравитация между дисперсираната фаза и дисперсионната среда може да възникне потенциална разлика. Тези потенциали се наричат: потенциал на течението (проточни) и потенциали на седиментацията (утаяващи). Потенциалите на течението възникват в резултат на движението на течност през капиллярите или порите на порестата преграда под влияние на разликата в хидростатичното налягане. Потенциалите за утаяване могат да възникнат в хетерогенна среда под влиянието на гравитацията между горния и долния слой на системата.

Въз основа на гореизложеното следва, че потенциалите на утаяване и токове са явления, противоположни на електрофорезата и електроосмозата. Всички електрокинетични явления по някакъв начин са свързани с появата на потенциална разлика, възникваща между дисперсираната фаза и дисперсионната среда. Такъв потенциал се нарича електрокинетичен, или дзета потенциал ( $\zeta$  потенциал). Електрокинетичният потенциал възниква само в резултат на движението на фазите на хетерогенна система; потенциална разлика се образува на границата между най-тънкия воден филм (т. нар. адсорбционен слой или адсорбционен филм), който се адсорбира от всяка суспендирана частица и останалата част от течната маса. При еритроцитите електрокинетичният потенциал варира от 7 до 22 mV за различните животни, за човека той е около 16 mV. Разликата в електрокинетичния потенциал е дала възможност за пръв път да бъдат разграничени двата вида левкоцити Т и В.

Появата на потенциал на границата на две фази винаги е свързан с наличието на електрически заряд на повърхността на разделяне. Електрически заряд върху



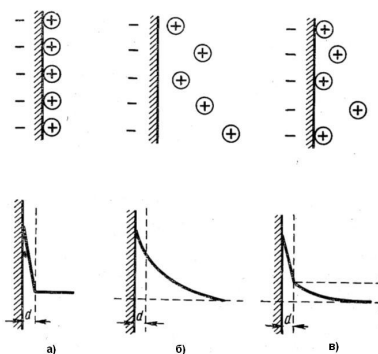
повърхността на клетките и биосубстратите възниква в някои случаи в резултат на адсорбцията на йони на повърхността на частици, които сами по себе си не са в състояние да образуват йони (нейонни частици), а също така може да се образува поради йонизацията на дисоцииращите групи на диспергираната фаза. Появата на заряди върху нейонни повърхности (например масла, целулоза, холестерол и др.) е принципно възможна поради адсорбцията както на катиони, така и на аниони, обаче предимно се адсорбират анионите. Това се обяснява с факта, че анионите са по-малко хидратирани от катионите и следователно е необходима по-малко енергия за отстраняване на аниони от разтвора и последващата им адсорбция.

Появата на повърхностен заряд поради йонизация може например да възникне в протеини и други органични електролити, съдържащи карбоксил, хидроксил, амин и други полярни групи.

Наличието на заряд на границата между две фази се дължи на асиметричното разпределение на йоните. Йони с един знак са здраво свързани с повърхността на частиците, а йони с противоположния знак се намират в дисперсионната среда. Такава система от йони, обикновено електрически неутрална, се нарича двоен електрически слой. Структурата на двойния електрически слой не зависи от механизма на появата на заряд върху повърхността на частиците: дали заряд се образува чрез дисоциация на йонни групи от молекули или поради преобладаващата адсорбция на йони от разтвора. Структурата на двойния електрически слой зависи от плътността на подреждането на зарядите по повърхността на частицата.

При рядко разположение на заряди върху повърхността на частица около всеки заряд, в разтворите възниква йонна атмосфера. В случай на гъсто разположение на зарядите, наложените йонните атмосфери образуват структурата на истински двоен слой.

Концепцията за двоен електрически слой е претърпяла значителни промени в цялата история на проучването на електрокинетичните потенциали. Най-старата идея е на Хелмхолц, според който двойният електрически слой се формира от два противоположно заредени слоя подобно на кондензатор (фиг.6.8 а)). Гуи е отчел топлинното движение на йоните, чиято плътност е Болцманово разпределена (фиг.6.8 б)). Според съвременните представи част от йоните се намират на молекулно разстояние от повърхността, образувайки плътен адсорбционен Хелмхолцов слой, другата част на противойоните, които не са в адсорбционния слой, остава в дисперсионната среда, образувайки така наречения дифузионен слой. Адсорбционният слой се придвижва заедно с частиците от дисперсната фаза, а дифузионният слой може да изостава от движението на частицата. Равнината, която разделя йоните от двойния електричен слой, които се движат заедно с частицата, от йоните които се движат независимо от частицата във външно поле



Фигура 6.8: Диаграма на двоен електрически слой. Местоположението на йоните е посочено в горната част, а кривите на потенциалния спад са отдолу: а) - според Хелмхолц; б) - според Гуи; в) - според Щерн;  $d$  - адсорбционен слой.

се нарича равнина на прехлъзване.

Електрокинетичният потенциал се формира в много тънък слой течност, непосредствено съседна на дисперсната фаза и освен това в посока, перпендикулярна на посоката на движение на фазата (или средата). В тази връзка,  $\zeta$  – потенциалът не може да бъде открит директно с помощта на електроди. Стойността на  $\zeta$  – потенциала може да се изчисли само косвено чрез измерване на фазовата скорост в електрическо поле по формулата на Смолуховски:

$$\zeta = \frac{4\pi\epsilon v}{\epsilon E},$$

където,  $\eta$  е коефициентът на вискозитет на дисперсионната среда,  $v$  е скоростта на фазата,  $\epsilon$  е диелектричната проницаемостна средата,  $E$  е градиентът на потенциала на външното електрическо поле.

Познавайки силата на външното поле  $E$ , диелектричната константа и коефициента на вискозитет на средата и като емпирично се определи скоростта на движение на дисперсната фаза, се изчисляват стойностите на електрокинетичния потенциал.

Според формулата на Смолуховски, електрофоретичната скорост на придвижването на фазата не зависи от размера и формата на частицата.

Всички фактори, които влияят върху двойния електричен слой влияят на знака и големината на електрокинетичния потенциал  $\zeta$ . Най-силно е влиянието на:

- концентрацията на водородните йони  $H^+$ , изразена чрез водородния показател  $pH = -\lg[H^+]$ ;
- йонната сила на средата  $I = \frac{1}{2} \sum c_i Z_i^2$  дефинира се като полусумата от произведенията на концентрацията на всеки вид йон  $i$  с квадрата на заряда му  $Z_i$ . За еднозарядни йони  $Z_i = 1$  и при еднаква концентрация  $c_i = c$ ,  $I = c$ .
- влияние на рН върху електрофоретичната подвижност Това влияние се обяснява с промяна на повърхностния заряд поради различна степен на дисоциация на киселинни и алкални групи. Чрез измервания в различни буферни среди е доказано, че при ниски стойности на рН  $\zeta$  потенциалът е положителен, а с нарастване на рН той намалява и променя знака си. Тази промяна на знака съответства на промяна на повърхностния заряд. Стойността на рН, при които  $\zeta$  потенциалът става нула се нарича *изоелектрична точка*. Тогава броят на положително заредените групи от клетъчната мембрана е равен на броя на отрицателно заредените групи и клетките не се движат в електрично поле. В такова изоелектрично състояние живите клетки загиват.
- влияние на йонната сила на средата върху електрофоретичната подвижност При постоянен повърхностен заряд и постоянна стойност на рН електричният потенциал на клетките и частиците зависи от йонния състав на дисперсната среда. Тази зависимост е свързана с намаляване на дебелината на дифузионния слой.

От дебелината на двойния електричен слой и големината на  $\zeta$  потенциала в голяма степен зависи стабилността на суспензиите на заредени колоидни частици или клетки. На разстояния между частиците, при които дифузионните части на

---

двойните им електрични слоеве се припокриват се проявяват силите на електростатичното отблъскване. Тези сили пречат на частиците да се доближават толкова, че от тях да се получат агрегати.

---

# Глава 7

## Биофизични методи за изследване

### 7.1 Методи за изследване на макромолекулите в разтвори

Физическите свойства на изолирани макромолекули се изучават в разтвори – това е начинът да получим изолирани макромолекули, тъй като те се разлагат при нагряване. Полимерите се разтварят в органични разтворители, като при това се получават истински, а не колоидни разтвори. В тях могат да се измерени следните основни физични характеристики :

1. молекулното тело и с това степента на полимеризация;
2. размерите на макромолекулите и с това тяхната термодинамична еластичност;
3. формата на макромолекулите;
4. оптичестката анизотропия на макромолекулите;
5. електрическият диполен момент;
6. степен на йонизация за тези молекули, които могат носят електрични заряди.

#### 7.1.1 Ултрацентрофугиране

Най-просто молекулната маса се определя чрез *седиментация* в ултрацентрофуга. Идеята за този метод, предложена от шведския учен Сведберг е следната.

Цилиндрична, прозрачна кювета пълна с разтвор на полимер се върти в ултрацентрофуга с кръгова честота  $\omega$ , над 1000 оборота в секунда. В кюветата се образуват две области – чист разтворител и разтвор на полимера. Между тях се образува преходна зона, в която концентрацията му се мени от нула до максималната. Границата се мести с времето от оста на центрофугата към дъното на кюветата. На фиг.7.1 а) е показан роторът, който се прави от алуминиева сплав, с отвори за поставяне на *седиментационната клетка* – фиг.7.1 б).

Под действието на центробежно ускорение  $a = \omega^2 x$ , молекулата намираща се на разстояние  $x$  ще се движи с постоянна скорост  $v$ , която се определя от силата на триенето  $\eta kv$ . Освен тези две сили му действа и Архимедовата сила  $\rho Va$ , където  $\rho$  е плътността на разтвора, а  $V$  е обема на макромолекулата. Ако означим с  $\rho'$  плътността  $\eta$  то

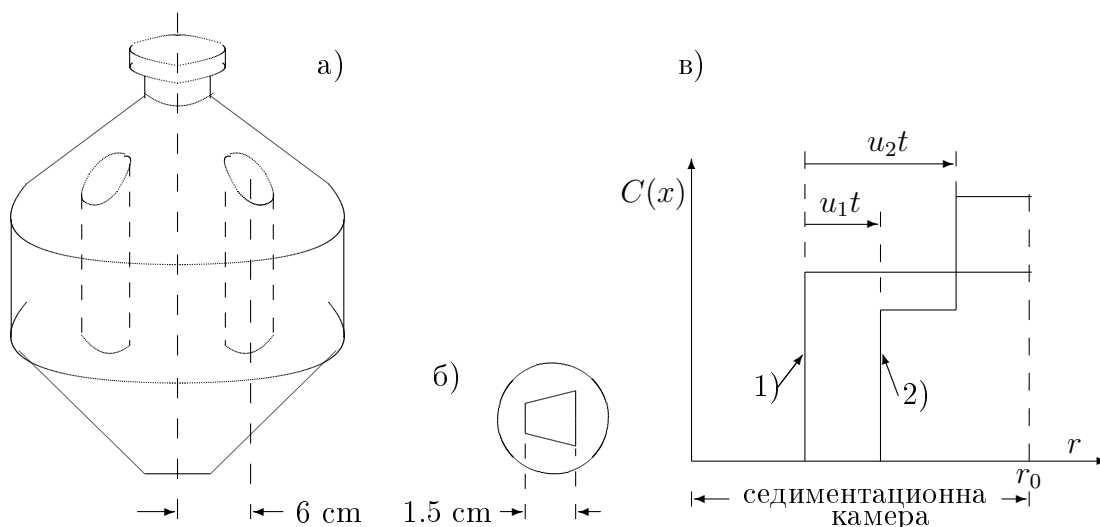
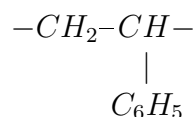
$$\eta kv = \rho'Va - \rho Va = \rho'V \left(1 - \frac{\rho}{\rho'}\right) = M \left(1 - \frac{\rho}{\rho'}\right)$$

Да положим  $\alpha = 1 - \frac{\rho}{\rho'}$ , тогава  $v = \frac{dx}{dt} = \frac{M\alpha\omega^2 x}{\kappa}$

Молекулно тегло $M$	брой мономери	$\langle R \rangle, \text{\AA}$	$\langle R \rangle / \sqrt[3]{M}$	$\langle R \rangle / \sqrt{M}$
$3.2 \times 10^6$	30800	497	3.35*	0.276*
$1.77 \times 10^6$	17000	437	3.61	0.33
$1.63 \times 10^6$	15700	414	3.51	0.32
$1.32 \times 10^6$	12700	367	3.34	0.32
$0.94 \times 10^6$	9000	306	3.12	0.32
$0.524 \times 10^6$	5040	222	2.75	0.31
$0.23 \times 10^6$	2200	163	2.66	0.34

\* в циклохексан

Таблица 7.1: Средно квадратичен радиус на вериги полиестирен, разтворен в витанол при температура  $22^\circ$ . Мономерът на полистирена има молекулно тегло  $M_0=104$  и вида :



Фигура 7.1: Ултрацентрифуга а) ротор; б) седиментационна камера; в) граница между разтвора и буфера – 1) в началния момент, 2) след известно време.

Коефициентът на триене  $\kappa$  зависи от формата и размера на молекулата (например за сфера с радиус  $R$  той се дава с закона на Стокс  $\kappa = 6\pi\eta R$ , където  $\eta$  е вискозитета на течността). Той може да бъде определен като се измери коефициента на дифузия на макромолекулите  $D$ . Връзката между тях се дава от формулата на Айнщайн :

$$D = \frac{kT}{\kappa}$$

Като заместим със стойността на  $D$  получаваме формулата на Сведеберг :

$$M = \frac{kTs}{(1 - \rho/\rho')D},$$

където  $s$  се нарича *коэффициент на седиментацията*.

$$s = \frac{1}{\omega^2 x} \frac{dx}{dt} = \frac{1}{\omega^2} \frac{d}{dt} (\ln x)$$

Размерността на  $s$  е секунда, но обикновено той се мери в *сведеберги*  $1S = 10^{-13}s$ . Величината  $s$  зависи от концентрацията на разтвора. Значението ѝ, екстраполирано към нулева концентрация се нарича *константа на седиментацията*. Тя е по-голяма при по-голяма молекулна маса. При миоглобина тя е  $2S$ , при хемоглобина  $4.5S$ , при фикоеритрина  $12S$ . Съответните значения на  $M$  са 17600, 68000 и 290000. Градиентът на концентрацията и скоростта ѝ на изменение се определят с оптични методи, след което се изчислява  $D$ . Измервайки  $v$ ,  $x$ ,  $\omega$ ,  $\rho$  и  $\rho'$  и  $\kappa$  можем да изчислим молекулната маса  $M$ .

Друг метод е измерването на *осмотичното налягане*  $\pi$ . В идеалните разтвори е в сила *закона на Вант-Хоф* :

$$\pi = \frac{RT}{M}c,$$

където  $c$  е концентрацията на разтвореното вещество. Разтворите на полимерите са неидеални, за тях :

$$\pi = \frac{RT}{M}c + Bc^2 + Cc^3 + \dots,$$

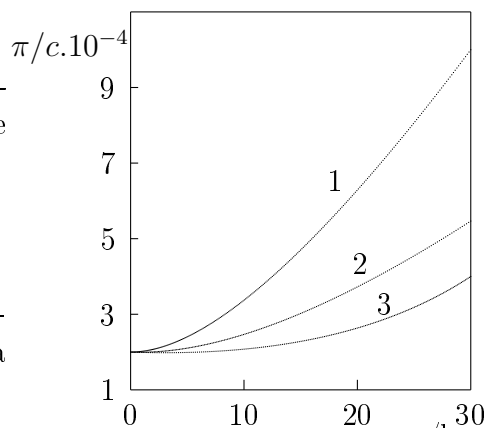
където  $B$  и  $C$  са вторият и третият вириален коэффициент.

В този случай се строи график (фиг.7.2) на зависимостта на  $\frac{\pi}{c}$  от  $c$  и намира пресечната точка  $\frac{RT}{M}$  на получената крива с оста  $y$  от което се изчислява  $M$ .

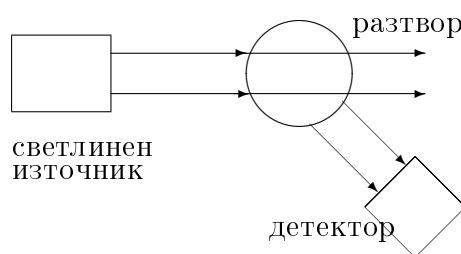
Друга група методи се основават на изследване на оптичките свойства на разтворите. При преминаване на светлина през среда интензитетът ѝ  $J$  намалява по закона

$$J = J_0 e^{-\chi x}$$

Коефициентът на *екстинкция*  $\chi$  е пропорционален на молекулната маса и зависи от коефициентите на пречупване на разтвора и разтворителя.



Фигура 7.2: Зависимостта на  $\pi/c$  за разтвор на полимерметакрилата в 1) хлороформ, 2) тетраhydroфуран, 3) диетилкетон.



Фигура 7.3: Измерване разсейването на светлината от разтвор на макромолекули.

Средноквадратичният радиус на макромолекулите  $R_0^2$  може да бъде определен като се измери зависимостта на интензитета  $I$  на преминалата през разтвор на макромолекули светлина и ъгълът  $\theta$  под който тя се наблюдава.

$$I(\theta) = I_0 \left( 1 - \frac{16\pi^2}{3} \frac{R_0^2}{\lambda^2} \sin^2 \frac{\theta}{2} \right)$$

Схемата на експеримента е показана на фиг.7.3. Използува се натриева лампа ( $\lambda = 589nm$ ).

### 7.1.2 Измерване на вискозитета

Най-простия, но не и абсолютен метод за определяне на молекулната маса, е чрез измерване на вискозитета  $\eta$  на разтвори с низка концентрация  $c$  и вискозитет  $\eta_0$  на разтворителя.

Вискозитетът характеризира триенето между пластове на една течност. Той се увеличава при наличие на разтворено вещество. Увеличението зависи от концентрацията и други структурни свойства на разтвореното вещество, следователно информация за тях може да бъде получена от измерения вискозитет.

Измерването може да се направи с вискозиметър на Оствалд, показан на (фиг.7.4). Измерва се времето за което определен обем течност  $V$  изтича през капилярка с дължина  $l$  и радиус  $r$ . Използва се уравнението на Поазъой и вискозитета се пресмята по формулата:

$$\eta = \frac{\pi \rho g r^4 t}{8lV}$$

Както показва опита, *характеристическия вискозитет* :

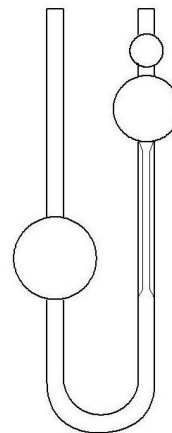
$$\eta_c = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 c} = KM^a$$

зависи от молекулната маса  $M$ . Показателят  $a$  зависещ от проницаемостта на макромолекулата от молекулите на разтвора. За проницаемо полимерно кълбо  $a = 1$ , за непроницаемо  $a = 0.5$ .

Накрая големите макромолекули могат да се наблюдават в електронен микроскоп.

### 7.1.3 Електрофореза

Електрофорезата заема централно място сред методите да изследване на протеини и нуклеинови киселини. В научната литература рядко се среща статия, в



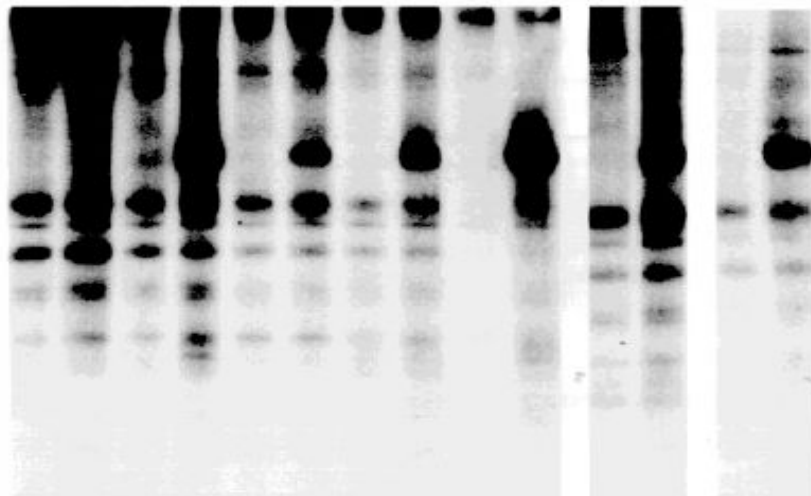
Фигура 7.4: Измерване на вискозитет по метода на Освалд.

която би в някакъв етап на фракциониране или характеризирание на биополимерите да не е използвана електрофореза. Методът позволява да се отделят макромолекули, които се различават по такива важни параметри като размери (или молекулно тегло), пространствена конфигурация, вторична структура и електрически заряд, като тези параметри могат да действат отделно или заедно.

Физическият принцип на метода е следният. Намиращите са в буферен разтвор макромолекули имат определен общ електрически заряд, чиято големина и знак зависят от рН на средата. Ако електрически ток започне да преминава през този разтвор, затворен в канал от изолационен материал, като например стъклена тръба, тогава по канала ще се установи определен градиент на напрежението, т.е. ще се образува електрическо поле. Под действието на полето макромолекулите мигрират в посока на катода или анода в съответствие със заряда им, а триенето им спрямо околната среда ограничава скоростта на придвижване. В зависимост от големината на заряда и размера на молекулата, те придобиват различни скорости и това е същността на процеса на електрофореза. Постепенно изходният препарат, състоящ се от различни молекули, се разделя на зони с еднакви молекули, мигриращи с еднаква скорост. С течение на времето тези зони се разпределят по дължината на канала. Установяването на постоянна скорост се дължи на уравновесяването на силите действащи върху макромолекулата: електричното поле  $F = qE$  и на вътрешното триене  $F = 6\pi\eta rv$ , според закона на Стокс.

Йонна или *електрофоретична подвижност*  $\mu$  се дефинира като скоростта на насочено движение на йон или заредена частица придобита под действие на електрично поле с големина 1 V/m:

$$\mu = \frac{v}{E} \quad (7.1)$$



Фигура 7.5: Пример за гел електрофореза: всяка колона е с различна смес. Тъмните ленти отговарят на молекули с определен размер или заряд присъстващи в сместа.

Понастоящем не се използват разтвори, поради проблеми с конвекцията, а почти изключително полиакриламидни гелове (РААГ) и агарозни гелове. Чрез промяна на концентрацията на полимера могат да се получат гелове с много широк



диапазон на размерите на порите. Освен това е възможно да се променят електрическите заряди на макромолекулите чрез промяна на рН на буфера и тяхната конфигурация чрез въвеждане на денатуриращи агенти или детергенти в буфера. Всичко това дава на метода на електрофорезата изключителна гъвкавост.

Използват се различни видове електрофореза:

- *Микроелектрофореза* – тя е метод за определяне на електрофоретичната подвижност и електрокинетичния потенциал на отделни частици в колоидни разтвори и на клетки в клетъчни суспензии. Под действие на електрично поле те се преместват в електрофоретична камера и с помощта на микроскоп се определя скоростта им. Нарича се още клетъчна електрофореза. Така са изследвани много клетки. Например установено е, че при грип електрофоретичната подвижност на еритроцитите пада с 50
- *Макроелектрофореза* – следи се движението на макроколичества, а не на отделни частици. Използва се главно с аналитична, препаративна и физиотерапевтична цел.
- *Аналитичната електрофореза* е мощен метод за разделяне на белтъци, пептиди, аминокиселини и други по-малки молекули и неорганични йони.
- *Препаративната макроелектрофореза* се използва за приготвяне на количества от отделни фракции на смеси.
- *Лекарствената електрофореза* е метод за внасяне на лекарствени вещества през кожата и лигавиците с помощта на електрично поле. Обикновено се използват водни разтвори, в които веществата са под формата на йони и затова методът е известен като йонофореза. Йоните с лечебно действие се внасят като разтворът се поставя на определено място от кожата под едноименно заредения електрод. Така например катионите на Ca, Mg, Li, Zn, Hg, хинин, новокаин, адреналин, стрептомицин се внасят с анода, а анионите на J, Br, Cl, пеницилин и др. се внасят с катода. Масата на внесеното вещество е пропорционална на пренесеното количество електричество и на площта, през която се внася.

$$m = KQS$$

където  $m$  е йонофоретичната проницаемост за определено място от кожата за определен вид йон,  $Q$  е пренесеният електричен заряд, а  $S$  е площта, през която се пренася. Този метод дава възможност за локално, нетравматично и ефективно лечение на някои заболявания, тъй като позволява лекарството да достигне бързо необходимата концентрация на определено място от човешкото тяло.

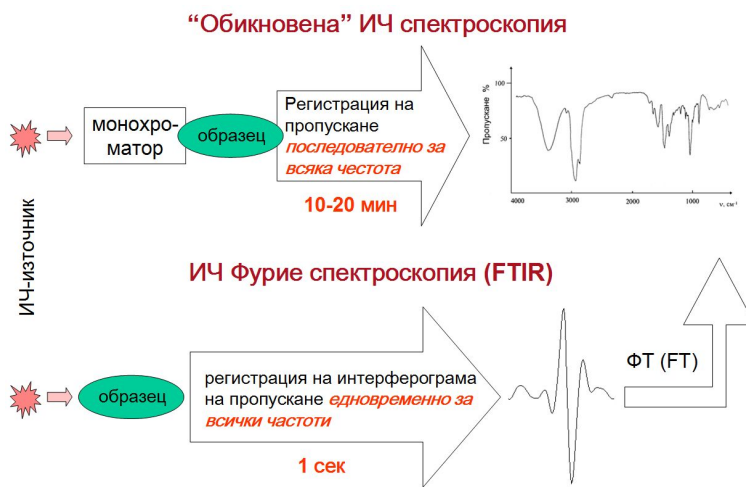
## 7.2 Спектроскопски методи за изследване

При облъчване на веществото с електромагнитни вълни (поток от фотони) се наблюдава тяхното поглъщане, а впоследствие и излъчване, на определени дължини на вълните, които са характерни за това вещество. Спектроскопският метод

се базира на анализа на преминалите или отразени вълни, които носят информация за състава на веществото. Разпределението им по дължина на вълната се нарича *спектър*. Ако енергията фотоните е достатъчно голяма тя може да предизвика преход електрони с голяма енергия от вътрешните нива на атомите. Този диапазон се изучава с методите на рентгеновата спектроскопия. При по ниска енергия настъпват преходи от външните електронни нива, което отговаря на излъчване или поглъщане в ултравиолетовата и видимата област. При по-ниски енергии настъпват промени в ротационното и вибрационното състояние състояние на молекулите. Излъчваните и поглъщаните фотони в резултат на тези преходи са обект на инфрачервената спектроскопия. Най-дългите вълни, които се използват за анализ на веществото са в областта на радиовълните и се използват в ядрено магнитния резонанс и в парамагнитния резонанс.

### 7.2.1 Видове спектрометри

Спектрометърът е инструмент, с който се измерва спектъра на светлината, разсеяна, излъчена или погълната от атоми и молекули. Фигура 7.6 показва двете схеми, които се използват за получаване на спектъра на изследвана проба.



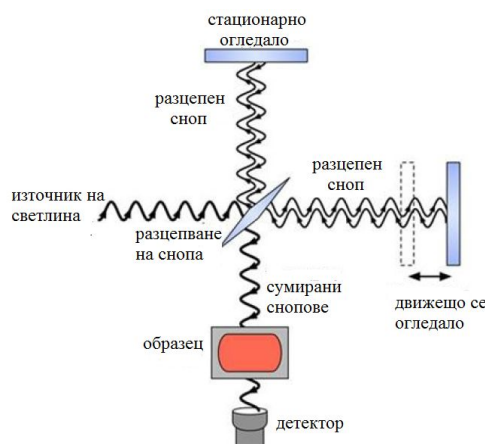
Фигура 7.6: Методи за измерване на спектъра.

Лъчението от източник излъчващ в изследвания диапазон по дължина на вълната се насочва към проба. В повечето спектрометри светлината, предавана, излъчена или разсеяна от пробата, се събира от огледала или лещи и разлага, най-често от *дифракционна решетка*, който разделя излъчването на различни честоти. След това интензитетът на светлината при всяка честота се анализира от подходящ детектор. Този метод е показан на фигура 7.6 като „обикновена спектроскопия“.

Съвременните спектрометри, особено тези, работещи в инфрачервения и близкия инфрачервен диапазон, сега почти винаги използват техники на *трансформация на Фурие* за спектрален анализ. Сърцето на спектрометъра с трансформация на Фурие е интерферометър на Майкелсън, изобретен от Майкелсън и използван от него в класическите експерименти за откриване на „етерния вятър“.

Използва се немохроматичен източник на светлина (фиг.7.7), която се разделя на два снопа –единият се отразява от неподвижно огледало, а другият от движещо се огледало. Отразените лъчи отново преминават през сплитера и се събират в детектора.

Интерфериралата светлина, преминала през пробата, съдържа информация за всички дължини на вълните, включително и на абсорбцията, съдържащи информация за пробата. Интерферограмата (фиг.7.6) се записва на компютър и спектъра на инфрачервено поглъщане или преминаване, вариращ в зависимост от честотата или дължината на вълната, се получава след компютърно бързо преобразуване на Фурие. Интензитета на светлината върху детектора е резултат от сумирането на вълните с всички дължини на вълните върху детектора:



Фигура 7.7: Схема на Фурие спектроскопия.

$$I_d(p) = \int I(\nu)(1 + \cos \omega p \nu) d\nu$$

Спектъра на светлината се намира с обратно преобразуване на Фурие:

$$I(\nu) = \int (I_d(p) - \frac{1}{2}I_d(0)) \cos \omega p \nu dp$$

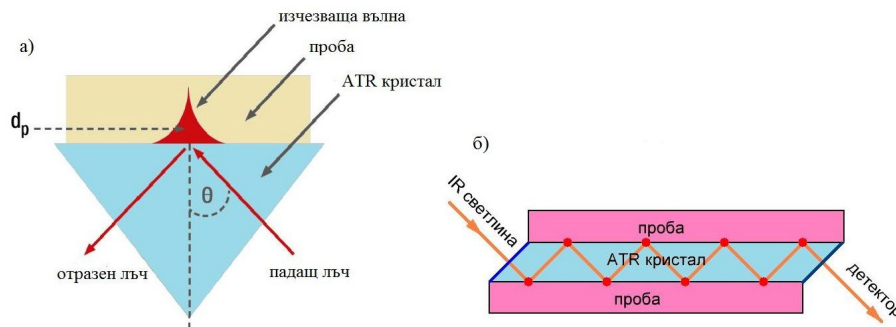
За точно измерване на движението на подвижното огледало съвременните спектрографи на Фурие са оборудвани с референтен оптичен канал. Лъчът светлина в този канал се получава обикновено от хелиево-неонов лазер (в по-евтините модели - от полупроводников лазер). Интерферограмата на еталонния лъч се получава с помощта на допълнителен фотодетектор.

## 7.2.2 ATR FTIR спектроскопия

Намаленото пълно отражение (Attenuated Total Reflectance), заедно с предаването, една от най-често срещаните техники за изследване на проби при инфрачервена (FTIR) спектроскопия. ATR се основава на пълно вътрешно отражение, където инфрачервена (IR) светлина и пробата взаимодействат само в точката, където се отразява светлината. IR светлина преминава през ATR кристал, върху който е сложена проба. Поради разликите в показателите на пречупване на двата материала се получава пълно вътрешно отражение. Това отражение образува така наречената „изчезваща вълна“, която навлиза в пробата (фиг.7.8 а).

Малка част от инфрачервената светлина се абсорбира в пробата, когато затихващата вълна взаимодейства с нея, което води до леко отслабено пълно отражение. За да се засили ефекта се използва многократно отражение (фиг.7.8 б).

Инфрачервената спектроскопия се използва широко в изследването на молекулната структура и химичния състав на веществата като „молекулни пръстови отпечатъци“. От положението, интензитета и формата на честотните ивици,



Фигура 7.8: ATR – намаленото пълно отражение.

получена от молекулата след абсорбция на инфрачервена светлина, както и от съотношението между абсорбционната лента, температурата, агрегатното състояние и т.н., може да се определи пространствената конфигурация на молекулата и константата на силата, могат да се получат дължината на връзката и ъгъла на свързване на химичната връзка. От гледна точка на спектралния анализ, характеристикната честота на поглъщане се използва главно за извод за съществуването на определена група или връзка в молекулата, а съседната група или връзка се определя от промяната на честотата  $\nu$ , а след това се определя химичната структура на молекулата. Смесите и съединенията могат също така да бъдат количествено анализирани чрез промяната в интензитета на характерните абсорбционни ивици.

Инфрачервените спектрометри с трансформация на Фурие понастоящем се използват в следните области:

1. Полупроводникови материали
2. Фармацевтична и химическа промишленост
3. Изследване на полимерни материали
4. Нефтохимическа промишленост
5. Минералогия
6. Биомедицински изследвания
7. Криминалистична идентификация
8. Газов анализ
9. Мониторинг на атмосферната среда

ATR е много гъвкава, лесна за използване техника за изследване чрез FTIR, тъй като почти няма подготовка на пробата. Взаимодействието с IR светлина е ограничено до малки обеми. Затова ATR методът е много разпространен.

### 7.2.3 Луминисценция

Флуоресцентната спектроскопия е една от най-широко използваните спектроскопски техники в биохимията и молекулната биофизика. Въпреки, че тя не дава детайлна структурна информация, този метод е много популярен поради чувствителността му към промени в структурата и динамичните свойства на биомолекулите. Подобно на другите методи, флуоресцентната спектроскопия може да бъде прилагана на различни нива – от най-простите измервания на интензивността на излъчването до най-сложната импулсна спектроскопия.

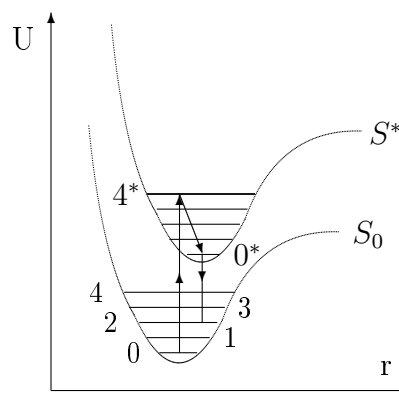
Фотопроцесите в биологичните системи се съпровождат с възникването на възбудени електронни състояния, характеризиращи се с определена енергия, време на живот, структурни свойства. В сравнение с поглъщането, изпускането на светлина става за по-голямо време. При това в молекулите настъпват изменения, които оказват влияние на спектрите, което дава възможност за получаване на информация за възбудените състояния.

Поглъщането на фотон от молекула я привежда във възбудено състояние, при което един електрон преминава на по-високо енергетично ниво. Обратният преход – от възбуденото във основното състояние е съпроводено със изпускане на квант светлина, което се проявява като *луминисценция*. В зависимост от продължителността на процеса луминисценцията се дели на бързозатихваща *флуоресценция* и бавнозатихваща *фосфоресценция*.

Най-често такива фотоелектрони във сложните органични молекули са  $\pi$ -електроните, така че преходите са между основното  $S_0$  и така нареченото синглетно възбудено състояние  $S^*$ . Кривите на потенциалните им енергии са показани на фиг.7.9.

Потенциалната енергия на електроните включва кулоновското взаимодействие между електроните и ядрото и между самите електрони. Масата на електрона е 1836 пъти по-малка от масата на нуклона, затова те се движат много по-бързо от ядрата, което ни дава основание да смятаме, че електроните се движат в полето на неподвижните ядра (*адиабатично приближение*). Следователно междуядреното разстояние  $r$  може да се разгледа като параметър, от който зависи електронната енергия  $U(r)$ .

Разделянето на вътрешно молекулните движения на бързи електронни и бавни ядрени обуславя един от фундаменталните закони на спектроскопията. Всяко електронно състояние  $S_0$ ,  $S^*$  се характеризира със своя потенциална крива (фиг.7.9). Движението на самите ядра протича в полето създадено от бързо движещите се електрони и  $U(r)$  е потенциалната енергия за движението на ядрата. Решението на квантово механичната задача води до квантуване и на тяхната енергия, също като енергията на електроните. Съответните им нива са показани на фиг.7.9. Поглъщането на светлината става много бързо, за време  $10^{-15}$  –  $10^{-16}$



Фигура 7.9: Потенциална енергия на основното  $S_0$  и синглетното възбудено състояние  $S^*$  на двуатомна молекула.

секунди, така че тежките ядра не успяват да изменят положението си (*принцип на Франк – Кондон*). При този преход обаче (прехода  $0 \rightarrow 4^*$ ) ядрото се оказва във възбудено състояние ( $4^*$  на фиг.7.9), понеже кривите  $U(r)$  и  $U^*(r)$  не съвпадат. Излишният запас на енергия на възбуждане на ядрото се разсейва за време  $10^{-11} - 10^{-12}$  секунди и ядрата попадат в основно състояние (прехода  $4^* \rightarrow 2^*$ ), и от там става прехода към основното ниво  $S_0$  с изпускане на фотон на флуоресценция. Ядрото обаче отново е във възбудено състояние, така че му трябва време  $10^{-11} - 10^{-12}$  секунди за да се върне в основното състояние.

Освен чрез изпускане на флуоресцентна светлина състоянието  $S^*$  може да се дезактивира и по друг начин. Например възможно е преход без излъчване, когато цялата енергия преминава във топлина. Заедно със синглетните, молекулата има и триплетни състояния ( $T$ ), които са с по-ниска енергия. Възможни са преходи без излъчване  $S^* \rightarrow T$ , при което обаче става промяна на спина на електрона. Такава промяна става и при прехода  $T \rightarrow S_0$ , вероятността за такива преходи е малка, затова времето на живот на триплетното състояние ( $10^{-6} - 10^{-2}$ ) секунди е много по-голямо отколкото на синглетното. Поради голямото време на живот триплетната молекула може да погълне нов фотон и да премине на второ триплетно ниво. Това излъчване се нарича *фосфоресценция*. Молекулата намираща се в триплетно състояние може да има голяма реакционна способност, понеже пребивава в него дълго време. Освен това електроните ѝ са разпределени в по-голям обем, поради което нараства вероятността за обмен с най-близкото обкръжение. При наличието в разтвора на молекули с несдвоени електрони не могат да реагират с молекулите в триплетно състояние. Този процес протича при много ниски концентрации и се нарича *гасене*

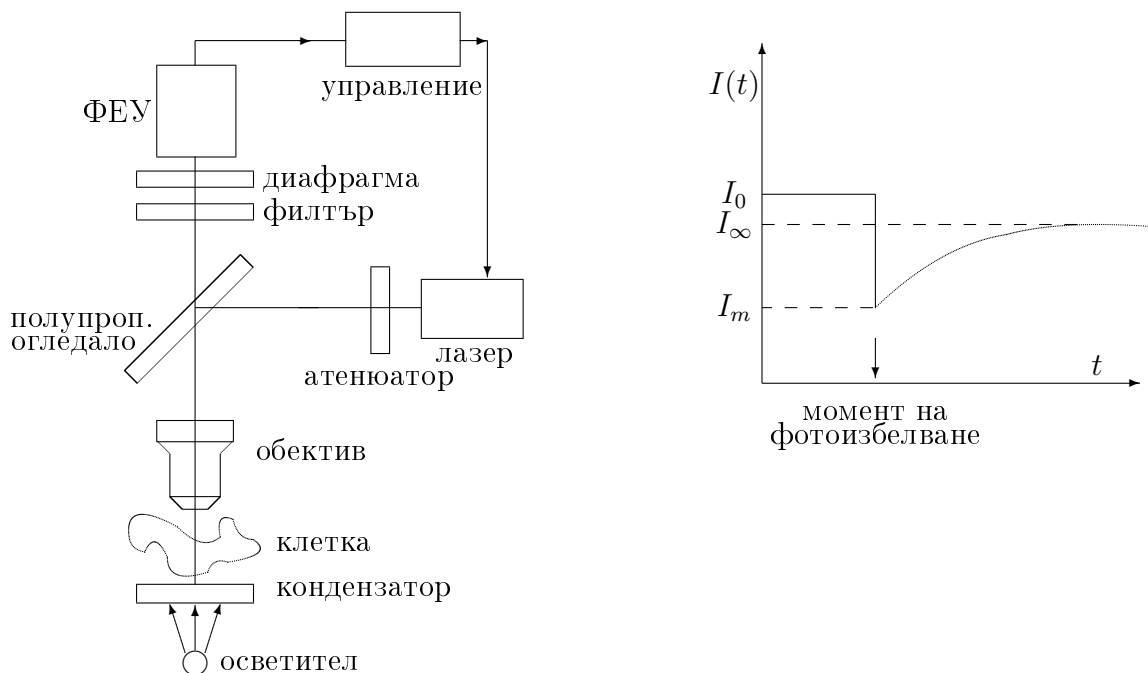
Пълната енергия на молекулата  $E$  е сума от енергията на възбуждане на електроните  $E_e$ , енергията на трептенето  $E_v$  и енергията на въртенето  $E_r$  ѝ, които отговарят на честоти  $10^{10}$ ,  $10^{13}$  и  $10^{15}$  Hz.

Изследването на *спектъра*, зависимостта на интензитета на излъчването от дължината на вълната  $I = f(\lambda)$ , позволява извършването на качествен и количествен анализ на различните компоненти на биологичните системи. По положението на максимума в спектъра на флуоресценцията може да се съди за големината на енергията запасена в молекулата на дадения компонент, сравнението между спектрите на излъчване и поглъщане дават информация за преноса на енергия в системата, скоростта на затихване позволява да се съди за времето за запазване на енергията в системата. Измерването на поляризираната флуоресценция дава информация за размера, конформацията, вътрешната подвижност на макромолекулите. Като правило интензивността на флуоресценцията на биологичните обекти е незначителна, което изисква увеличаване на чувствителността на измервателната апаратура.

## 7.2.4 Импулсна спектроскопия

За изследване кинетиката на бързопротичащите фотопроекти се използва методът на импулсната спектроскопия. При осветяването на обекта с кратковременни мощни импулси се създават възбудени състояния, които са преимуществено населени. Ако след това обектът се осветява с по-слаба светлина то може да се регистрира кинетиката на изменението на поглъщането на кратко живущите

компоненти. С подобни методи е установено например, че времето за пренос на електрона по електрон-транспортната верига при фотосинтеза е  $10^{-5} - 10^{-2}$  с. По-голям диапазон от  $10^{-12}$  до  $10^1$  с. може да се изследва с помощта на пикосекундната и наносекундната лазерна спектроскопия.



Фигура 7.10: Схема на експеримента по определяне на коефициента на дифузия в мембраната на клетка по метода на възстановяването на флуоресценцията след фотоизбелване.

На фиг.7.10 е показана схемата на експеримент по определяне на коефициента на дифузия в мембраната на клетка. Мембраните на клетките, поместени под обектива на микроскоп, се оцветяват с флуоресцентни белези. Светлината от осветителя се формира в успореден сноп от кондензатор и преминавайки през обектива, полупропускливо огледало, светофилтър и диафрагма попада върху фотоелектронен умножител (ФЕУ). Клетките могат да се осветяват от лазерен лъч (използува се аргонов лазер с  $\lambda = 488nm$ ), който може да бъде отслабен с помощта на атенюатор. С помощта на диафрагмата може да се избира светлина идваща от участък от клетката с площ няколко квадратни микрометра. В началото лазерният е с много малка интензивност и ФЕУ регистрира флуоресценция с интензивност  $I_0$ . В един момент с помощта на атенюатора интензитета на лазерния лъч рязко се увеличава, това предизвиква загуба на способността за флуоресценция – фотоизбелване. В резултат на това регистрираната флуоресценция рязко спада до  $I_m$ . Тъй като флуоресцентните белези могат да се придвижват в мембраната, то интензитета ще започне експоненциално да се увеличава достигайки  $I_\infty$ . Определяйки времето за полувъзстановяване  $t_{1/2}$  по формулата на Айнщайн за средноквадратичното преместване  $\langle r^2 \rangle = 4Dt$  може да се пресметне коефициента на дифузия

$$D = \frac{r^2 \gamma_D}{4t_{1/2}}$$

където  $r$  е радиусът на отбелвания участък, а  $\gamma_D$  е константа от порядъка на единица, зависеща от профила на лъча. Описаният метод се нарича метод на възстановената флуоресценция след фотоизбелване.

вид излъчване	тип на прехода	честота	$\lambda$
гама	ядрени преходи	$10^{19}$	$0.03nm$
рентгеново	преходи на ел. от вътр. обвивка	$10^{17}$	$3nm$
ултравиолетово	преходи на валентните електрони	$10^{16}$	$> 30nm$
видима област	преходи на валентните електрони	$10^{14}$	$< 3000nm$
инфрачервено	колебателни преходи	$10^{13}$	$< 30\mu m$
далечна инфр. обл.	скелетни, усукващи колебания	$10^{12}$	$300\mu m$
микровълнова обл.	въртеливи колебания	$10^{11}$	$3mm$
къси радиовълни	ЯМР, ЕПР	$10^6 - 10^{10}$	$0.03 - 300m$

Таблица 7.2: Основни характеристики на спектроскопските методи.

### 7.2.5 Пулсова оксиметрия - измерване на насищането на кръвта с кислород

Кислородът е един от елементите, които са много важни за човешкото тяло, затова информацията относно нивата на кислород, свързан в кръвта е много важна, особено за пациентите в интензивно отделение и пациентите с анестезия.

Хемоглобинът се състои от четири субединици (2 алфа и 2 бета) (стр.55) и съществува в две форми, опънато (taut -  $T$ ) състояние и отпуснато (relaxed -  $R$ ) състояние.  $T$  състоянието е с нисък афинитет към кислорода и способства освобождаването му.  $R$  състоянието или кислородната форма на хемоглобина има висок афинитет към кислорода и благоприятства свързването му.  $T$  и  $R$  конфигурациите водят до различно поглъщане и различно излъчване на светлина, като състоянието  $T$  абсорбира видимата червена светлина и отразява невидимата инфрачервена светлина, докато състоянието  $R$  отразява видимата червена светлина и абсорбира невидимата инфрачервена светлина (фиг. 7.11).

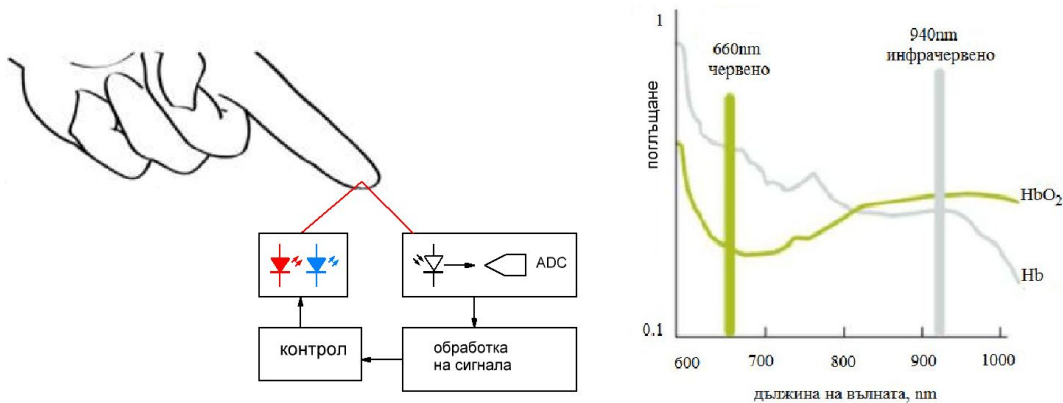
Сензорите за пулсова оксиметрия използват светлина за измерване на насищането с кислород. Те се поставят на тънки телесни тъкани като върховете на пръстите или ушите. Начинът, по който работи този уред, е чрез сравняване на интензитета на светлината, абсорбирана от фотосензора след преминаване през върховете на пръстите и взаимодействие с червените кръвни клетки, които текат през тях. Интензитета на червената и инфрачервената светлина, която преминава през тъканите, намалява по различен начин. Графиката на абсорбцията на светлина от хемоглобина е показана на фиг. 7.11. Намаляването на интензитета на светлината от червена и инфрачервена светлина се сравняват и обработват, за да се получи процентна стойност на насищане с кислород в кръвта ( $SpO_2$ ). Кислородното насищане в артериите се определя като съотношението на общия хемоглобин ( $Hb$  и  $HbO_2$ ), наличен в артериите. Насищането се дефинира от уравнението:

$$SpO_2 = \frac{[HbO_2]}{[HbO_2] + [Hb]}$$



където  $SpO_2$  е процентът на кислородното насищане,  $[HbO_2]$  е концентрацията на хемоглобина съдържащ кислород, а  $[Hb]$  е концентрацията на хемоглобина не съдържащ кислород.

Устройствата за пулсова оксиметрия използват червени и инфрачервени светодиоди (диоди, излъчващи светлина) заедно с фотосензори за измерване на интензитета на светлината, преминала през върха на пръстите.



Фигура 7.11: Метод за измерване на насищането на кръвта с кислород. Абсорбционни спектри на оксигемоглобина ( $HbO_2$ ) и деоксигемоглобина ( $Hb$ ).

Намаляването на интензитета на светлината от венозния кръвен поток и тъканта произвежда относително стабилен сигнал, който е постоянен ( $DC$ ) сигнал. Намаляването на интензитета на светлината от артериалния кръвен поток произвежда относително нестабилен сигнал, който е променлив ( $AC$ ) сигнал. Абсорбцията на червена светлина над инфрачервена светлина е индикация за ниска наситеност с кислород и обратното, абсорбцията на инфрачервена светлина над червена светлина е индикация за висока наситеност с кислород.

Сигналът от преминалата или отразената светлина (в зависимост от конструкцията на уреда) се измерва с фототранзистор, чувствителен към обхвата (550 - 1100 nm) по дължина на вълната. Стойността на оксиметрията може да се изчисли чрез намиране на стойността на  $R$ , която е отношението на абсорбцията на червена и инфрачервена светлина, която произвежда  $AC$  и  $DC$  компоненти:

$$R = \frac{AC_{red}DC_{infrared}}{AC_{infrared}DC_{red}}$$

Тук с  $AC$  и  $DC$  са означени съответните напрежения получени от сензорите. Стойността на насищането на кръвта с кислород  $SpO_2$  се пресмята в проценти по формулата:

$$SpO_2 = 110 - 25R$$

Стойности от 95-99% се считат за нормални за здрав индивид. По-ниските нива на кислород могат да бъдат опасни, особено, когато стойностите са под 90%. Има случаи, при които стойностите на  $SpO_2$  са 100%, което се случва само в болници, където на пациента се подава кислород поради специална терапия, но това също е опасно понеже може да засегне централната нервна система.

### 7.2.6 Електронен парамагнитен резонанс

Методът на *електронния парамагнитен резонанс* широко се използва за изучаване на структурата на парамагнитните частици и кинетиката на процесите, в които те участвуват. Примери за парамагнитни частици са свободните радикали, възникващи в хода на биохимичните реакции, в резултат на действието на радиация, при фотохимическото окисление на хлорофила. Свободните радикали и йоните на парамагнитните метали са най-разпространените в биологичните системи парамагнитни частици.

Парамагнитни са веществата, чиито атоми или молекули имат постоянен магнитен момент. При металите като Fe, Co, Ni, Cu, Mn това е резултат от наличието на несдвоени електрони в електронните им обвивки. Методът на парамагнитния резонанс се използва не само при наличието на парамагнитни частици, а и когато в хода на процесите, например при фотобиологическите реакции, възникват триплетни състояния. Голямо разпространение е получил *методът на спиновите белези*, когато в изследваната система (биомембрана или макромолекула) се вкарват свободни радикали, по характеристикните спектри на които може да се съди за структурата и динамиката на самата система.

Магнитния момент на електрона е сума от орбиталния и спиновият им магнитен момент. В повечето случаи орбиталният магнитен момент е нулев ( $S$  състояние), затова ефекта на парамагнитния резонанс е резултат от спиновия момент.

При внасяне в постоянно магнитно поле с интензитет  $B_0$  спиновете на електроните се ориентират по посока на полето, като енергетичните им нива се разцепват на две поднива с разлика в енергиите :

$$\Delta E = g\mu_B B_0,$$

където  $\mu_B$  е фундаментална константа наречена *магнетон на Бор*, пресмятана по формулата

$$\mu_B = e\hbar/(2m_e c),$$

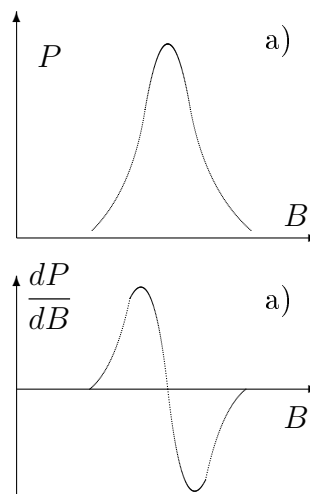
а  $g$  е така нареченият *g фактор*, който за свободния електрон е почти 2, а за свързания към атома електрон зависи от структурата на електронната обвивка. Отношението между заселеността на горното ниво (брой на електроните  $N_2$ ) и на долното ниво (брой на електроните  $N_1$ ) се дава от закона на Болцман:

$$\frac{N_1}{N_2} = e^{\Delta E/kT},$$

следователно  $N_1 > N_2$ .

Ако наложим допълнително по-слабо магнитно поле с честота  $\nu$ , перпендикулярно на основното поле  $B_0$  то ще се индуцират преходи между нивата с еднаква вероятност в двете посоки и понеже  $N_1 > N_2$ , то преходите от по-ниското към по-високото ниво ще преобладават. Ако честотата удовлетворява условието :

$$h\nu = \Delta E$$



Фигура 7.12: Линия на поглъщане – а) и нейната първа производна – б).

ще настъпи резонансно поглъщане на енергията на променливото поле.

Освен от вероятността за преход между нивата, населеността им зависи от вероятността за взаимодействие с обкръжението (по аналогия с кристалите се нарича спин – решетъчно взаимодействие), като вероятността за преход  $P_2$  от по-високото към по-ниското ниво е по-голяма отколкото вероятността за обратния преход  $P_1$ .

В най-простият случай резонансното поглъщане представлява тясна *Лоренцова крива* (фиг. 7.12 а), най-често обаче, се получава сложна крива, поради това, че електроните взаимодействат не само със външното поле, но и с вътрешните полета, източници на които са съседните несдвоени електрони, а също и ядрата с ненулев момент.

Сигналът получаван от спектрометрите за парамагнитен резонанс се регистрира като първа производна от погълнатата мощност, затова изглежда като на фиг. 7.12 б).

Ако означим с  $w$  вероятността за преход между двете нива, то без отчитане на спин-решетъчното взаимодействие бихме имали :

$$\frac{dN_1}{dt} = (N_2 - N_1)w$$

$$\frac{dN_2}{dt} = (N_1 - N_2)w$$

Изваждаме двете уравнения и като положим  $n = N_1 - N_2$  получаваме :

$$\frac{dn}{dt} = -2wn \quad (7.2)$$

Аналогично ако имахме само спин-решетъчно взаимодействие ще имаме :

$$\frac{dN_1}{dt} = (N_2P_2 - N_1P_1)$$

$$\frac{dN_2}{dt} = (N_1P_1 - N_2P_2)$$

$$\frac{dn}{dt} = -2(N_1P_1 - N_2P_2)$$

Броя на всички електрони  $N = N_1 + N_2$  е постоянен затова можем да запишем (използвайки, че  $N_1 = 1/2(N + n)$  и  $N_2 = 1/2(N - n)$ ) :

$$\frac{dn}{dt} = N(P_2 - P_1) - n(P_1 + P_2)$$

При равновесие  $dn/dt = 0$ , затова

$$n_0 = N \frac{P_2 - P_1}{P_2 + P_1}$$

$$\frac{dn}{dt} = -(n - n_0)(P_1 + P_2) = -\frac{n - n_0}{T}, \quad (7.3)$$

където  $1/T = P_1 + P_2$ . Като обединим двете уравнения (7.2) и (7.3), с което ще отчетем едновременно и двата ефекта получаваме :

$$\frac{dn}{dt} = -2wn - \frac{n - n_0}{T}$$

В стационарно състояние  $dn/dt = 0$ , затова  $n = n_0/(1 + 2wT)$ . Вероятността  $w$  зависи от квадрата на амплитудата на високочестотното поле, затова при слабо поле  $wT \ll 1$  и  $n \sim n_0$ , така че равновесната населеност не се нарушава и ширината на линията се определя от  $T$ . От принципа за неопределеност ще получим, че ширината на линията  $\Delta E$  е :

$$\Delta ET \geq \hbar/2$$

Поради спин–решетъчното взаимодействие, което води до разширяването на линията на ЕПР и до намаляване на сигнала, при изследването на металосъдържащите съединения се налага те да се охлаждат до много ниски температури. Болшинството органически свободни радикали могат да се изследват при стайни температури.

Понастоящем за изучаване на свободните радикали се използват спектрометри с магнитно поле  $B \sim 0.3$  Т, при което честотата е от порядъка на  $10^{10}$  Hz, а дължината на вълната е  $\lambda \sim 3$ cm, т.е. излъчването става в диапазона на свръхвисоките честоти. Резонансното поглъщане може да се наблюдава или като се променя честотата  $\nu$  на електромагнитното излъчване при постоянно магнитно поле  $B$  или като се променя полето при постоянна честота. Поради технически причини се предпочита вторият метод.

При наличието на ядра с ненулев магнитен момент възниква допълнително взаимодействие с него, което води до ново разцепване на всяко ниво, това взаимодействие се нарича *свързфино взаимодействие*.

Чрез метода на парамагнитния резонанс са били изследвани редица ферментни системи, в редица случаи се е оказало възможно да се наблюдават процесите, в които участвуват йоните на металите, влизащи в активните центрове на ферментите. Методът също се използва за изследване процесът на фотосинтеза.

ЕПР се използва за решаване на една от най важните задачи на радиационната биофизика – биодозиметрично изследване на населението с цел определяне на погълнатите дози. В основата на биодозиметрията стои факта, че под действието на йонизиращото лъчение в някои биологични тъкани се натрупват парамагнитни центрове, чието количество е пропорционално на погълнатата доза. Такива центрове, които се отличават с изключителна стабилност, се образуват в емайла на зъбите. Това може да стане индивидуално, като образец от емайла се облъчи с допълнителна (известна) доза и измереният отново ЕПР сигнал се екстраполира към нулата.

### 7.2.7 Ядрен магнитен резонанс

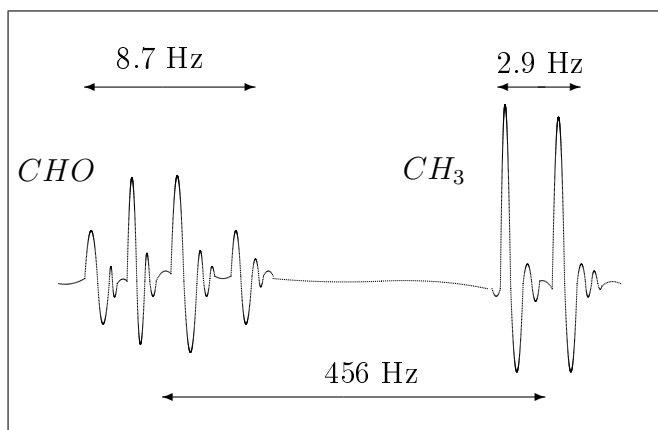
*Ядрено магнитния резонанс* е подобен на парамагнитния. При него взаимодействието между постоянното външно магнитно поле  $B$  води до разцепване на

енергетичните нива  $\Delta E = g_N \mu_N B$ , като ядрения магнетон се пресмята по аналогична формула като магнетона на Бор, но вместо масата на електрона се използва масата на протона. При налагането на перпендикулярно променливо магнитно поле с честота  $\nu$  възниква резонанс на поглъщането на енергията при изпълнение на условието  $h\nu = \Delta E$ . Тъй като масата на протона е 1876 пъти по-голяма от масата на електрона то за резонансната честота при  $B = 1$  Т се получава  $\nu = 42.6$  kHz, което е в метровия диапазон на радиовълните.

Магнитното поле, което действа върху ядрото е резултат от сумата на външното поле и магнитното поле резултат от обкръжаващите го електрони и ядра. Влиянието на локалните полета води до отместване на резонансната честота. Това се нарича *химическо отместване* и действието им се отчита като в условието за резонанс се добавя параметъра  $\sigma$ :

$$h\nu = g_N \mu_N (1 - \sigma) B,$$

който е от порядъка  $\sim 10^{-6}$ . Химическите отмествания в органичните вещества обикновено се измерват относно някаква еталонна линия на стандартното инертно съединение  $Si(CH_3)_4$  (тетраметилсилан). Химическите отмествания се измерват в безразмерни единици – милионни части  $= (\Delta\nu/\nu_0) \cdot 10^6$ . При биополимерите тя варира от -0.5 до -2 милионни части. В англоезичната литература тя се бележи с ppm (parts per million).



Фигура 7.13: Ядрено магнитен спектър на ацеталдехида ( $CH_3CHO$ ).

При ядрено магнитния резонанс също се наблюдава свръхфинно взаимодействие, което за разлика от химичното отместване не зависи от външното магнитно поле.

На фиг.7.13 е показан спектър на ацеталдехида в зависимост от външното магнитно поле. Вижда се, че в него има две групи линии с различна интензивност, разделени от химичното отместване. Разцепването във всяка група се дължи на свръхфинното взаимодействие. Така разцепването на линиите на метиловата група ( $CH_3$ ) на 2 линии се дължи на двете възможни състояния на протона от алдехидната ( $CHO$ ) група.

До появата на спектрометри, работаещи в импулсен режим, болшинството изследвания се изпълнявали с използване на ЯМР от ядрата на водорода (протони

$^1H$ ) и флуора  $^{19}F$ . Тези ядра имат идеални за ЯМР спектроскопията свойства:

- високо естествено съдържание на "магнитния" изотоп ( $^1H$  99.98%,  $^{19}F$  100%), за сравнение – естественото съдържание на "магнитния" изотоп на въглерод  $^{13}C$  е само 1.1%;
- голям магнитен момент;
- спин  $I = 1/2$ .

Внедряването на импулсните ЯМР спектрометри съществено е разширило експерименталните възможности на ЯМР спектроскопията. В частност станал е възможен записът на ЯМР спектри от  $^{13}C$  най – важният за химията изотоп. Ядрено магнитен резонанс се получава и от ядрата на изотопите  $^{15}N$ ,  $^{31}P$ , които дават по-слаби сигнали. Наблюдаването на резонанса от  $^{13}C$  позволява да се определят отделните линии на карбонилните групи, остатъците на аланина, аргинина. Напоследък широко разпространение получават изследванията на спектрите от  $^{31}P$  на живи клетки, с цел изучаване на строежа на мембраните.

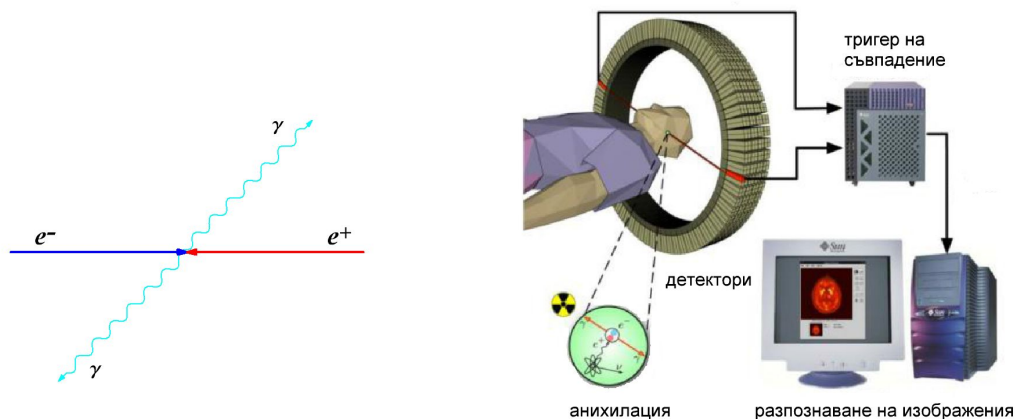
ЯМР-те спектри с високо разрешение обикновено се състоят от тесни, добре отделени линии (сигнали), съответстващи на магнитните ядра в различно химическо обкръжение. Интензивността (площта) на сигналите са пропорционални на броя на магнитните ядра във всяка групировка, което дава възможност да се извършва количествен анализ по ЯМР спектрите без предварителна калибровка. Още една особеност на ЯМР е влиянието на обмените процеси, в които участвуват резониращите ядра, на положението и ширината на резонансните сигнали. По такъв начин, по ЯМР спектри може да се изучава природата на такива процеси. ЯМР линиите в спектрите на течностите обикновено имат ширина 0,1 - 1 Hz (ЯМР с високо разрешение), докато същите ядра, изследвани в твърда фаза, водят до появата на линии с ширина 1 – 104 Hz (оттук и понятието за ЯМР с широки линии). В спектроскопията на ЯМР с високо разрешение има два главни източника на информация за строежа и динамиката на молекулите:

- химическото отместване;
- константите на спин-спиновото взаимодействие.

## 7.2.8 Позитронен томограф

Позитронният емисионен томограф (PET) е образна диагностична техника за измерване на метаболитната активност на клетките в човешкото тяло. Разработен е в средата на 70-те години на миналия век и е първият метод за сканиране, който дава функционална информация за мозъка. Той се базира на процеса на *анихиляция* между електрони и позитрони. Позитронът е античастица на електрона, която се отличава от него само по заряда си – положителен.

При среща на позитрон и електрон те напълно се унищожават (анихилират), което води до преобразуване на цялата им маса в енергия. Като резултат се раждат два фотона (гама лъчи), изобразени с вълнисти линии на фиг.7.14. Поради запазването на енергията и импулса, всеки фотон има енергия от 511 keV, а двата фотона летят в противоположни посоки, на  $180^\circ$  един спряма друг (фиг.7.14).



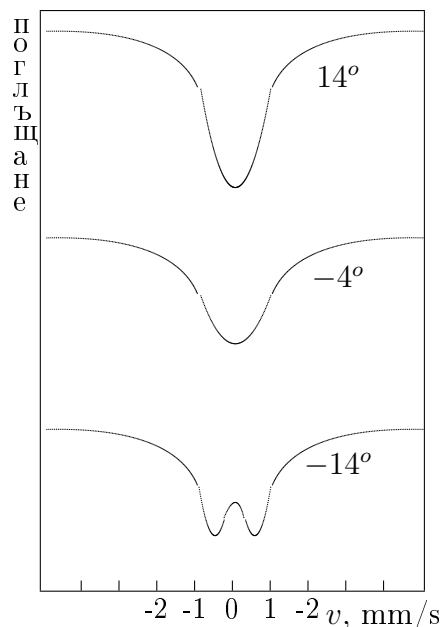
Фигура 7.14: Аниhilация на електрон и позитрон. Схема на PET скенер.

Едновременното регистриране (тригер) на тези два фотона с тази енергия, силно подтииска всички фоновы събития и дава ясен сигнал, че е настъпила аниhilация. За да може да се използва тази реакция в изследвания орган преди сканирането се въвежда радиоактивното вещество под формата на интравенозна инжекция. След това се изчаква приблизително 30 - 90 минути докато веществото премине през тялото и се натрупа в изследваната тъкан. Тъй като радиоактивността е много краткотрайна, излагането на радиация е ниско. Количеството на веществото е толкова малко, че не влияе на нормалните процеси в организма. Тъй като радиоактивното вещество се разпада бързо и е ефективно за кратък период от време, то трябва да бъде произведено в лаборатория близо до PET скенера.

- PET сканирането на мозъка позволява откриването на тумори.
- PET сканирането на сърцето се използва за определяне на притока на кръв към сърдечния мускул и помага за оценка на признаци на коронарна артериална болест.
- PET сканирането на сърцето може също да се използва, за да се определи дали областите на сърцето, които показват намалена функция, са живи, а не са белязани в резултат на предишен сърдечен удар, наречен инфаркт на миокарда.
- В комбинация с изследване на миокардна перфузия, PET сканирането позволява разграничаване на нефункциониращ сърдечен мускул от сърдечен мускул, който е подходящ за процедура като коронарен байпас.
- Използва се за определяне дали има нови или напреднали ракови заболявания чрез анализ на биохимични промени.
- Използва се за изследване на ефектите от лечението на рак чрез характеризирание на биохимичните промени от него. PET сканирането може да се извърши на цялото тяло.

### 7.2.9 Мьосбауерова спектроскопия

При поглъщане на светлинен квант от атом, енергията му се преразпределя за възбуждане на атома и за кинетична енергия (откат) на атома. Преразпределението на енергията се определя изцяло от закона за запазване на енергията и импулса. Атомите се движат с различни топлинни скорости, така че поглъщането се получава при различни честоти на светлината. Ефекта се наблюдава като уширение на спектралната линия на поглъщането. При поглъщане в твърдо тяло (кристал) е възможно импулса на падащият фотон да се предаде на решетката на кристала като цяло, което води до това, че енергията на отката е нула, следователно линията на поглъщане става много тясна. В това се състои *ефекта на Мьосбауер*. Той позволява да се измерват много малки скорости на преместването, а в биофизиката за изучаването на динамиката на белтъците.



Фигура 7.15: Мьосбауерови спектри на поглъщане на  $^{57}\text{Fe}$  на воден глицеринов разтвор на човешки албумин при различни температури.

### 7.2.10 Масспектрометрия

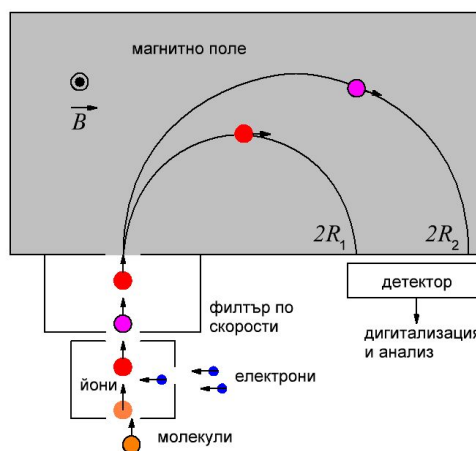
Масспектрометрията е метод за анализ, основан на йонизация на молекулите на веществото, разделяне на образуващите се йони с магнитно поле и тяхната регистрация.

- Методът позволява да се регистрира молекулната маса на съединението, която е неговата индивидуална характеристика.
- Масспектрометрията с висока разделителна способност предоставя информация за елементния състав на съединението.
- Структурната информация за веществата става достъпна благодарение на набор от фрагментни йони, образувани по време на разпадането на изходните молекули. За получаване на структурна информация може да се използва като компютърни библиотеки за масови спектри така и извършване на ръчно разшифроване на спектъра, използвайки известни закономерности на фрагментация.
- Простота и надеждност на получената информация. Масовият спектър позволява да се идентифицира съединението, а площта на пика - да се оцени количеството на това съединение в пробата.



- Съвременните масспектрометрични техники позволяват да се определят молекулните тегла на много сложни съединения. Записаният рекорд е 110 000 000.
- Директен анализ на най-сложните смеси от органични съединения (до няколко хиляди съединения) без тяхното предварително разделяне. Входът е неизвестна смес, изходът е информация за качествения и количествения и? състав.
- Масспектрометрията има феноменална чувствителност. За количествено определяне на стандартно оборудване са необходими  $10^{-12}$ g от отделното съединение. Рекордът за чувствителност е  $10^{-18}$ g.

Молекулите на изследваното вещество се йонизират. Това може да стане по най – различен начин, на фиг.7.16 това става чрез удари на електрони. Йонизираните частици се ускоряват в електрично поле и се пропускат през селектор на скорости, от който излизат само частици с фиксирана скорост  $v$ . Преминалите йони навлизат перпендикулярно в магнитно поле, което ги отклонява по окръжности с радиуси  $R = mv/qB$  зависещи от специфичния им заряд  $q/m$ , описват полуокръжност и попадат върху детектор. По положението се определя специфичния заряд, а по плътността – концентрацията на частиците.



Фигура 7.16: Схема на масспектрограф.



Фигура 7.17: Винена киселина: молекулна маса 60, молекулна формула  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ , структура  $\text{CH}_3\text{COOH}$ .

Съществуват спектрометри с най различна конструкция, на фиг.7.16 е показан един от ранните масспектрографи - на Бейнбридж. Ключов елемент за всички

системи за масспектрометрия е типът детектор, използван за преобразуване на тока от разделените йони в измерим сигнал. В миналото са използвали фотоплака, а сега често използваните типове включват електронни умножители, Фарадееви чаши, преобразуващи диоди за фотоумножители и решетки. Полученият електричен сигнал се преобразува, дигитализира и записва на компютър.

На фигура 7.17 е показан спектър получен от винена киселина. Тя се йонизира на йони с различно съотношение  $m/q$ . Височините на пиковете са пропорционални на количеството йони от съответния тип.

### 7.2.11 Метод на двойно маркираната вода

*Двойно маркирана вода* (ДМВ - Doubly labeled water) е тази, в която и водородът и кислородът са частично или напълно заменени с изотопи с цел проследяването им. На практика, почти всички приложения на метода използват тежки, но нерадиоактивни форми на елементите (деутерий  $H^2$  и кислород  $O^{18}$ ).

Този метод се използва за измерване на средната дневна метаболитна скорост на даден организъм за определен период от време. Това се прави чрез прилагане на доза ДМВ, след което се измерва количеството на отделени на деутерий и кислород  $^{18}O$  от организма за определено време чрез вземане на проби от слюнка, урина или кръв. Необходими са поне две проби: първоначална проба след като изотопите са достигнали равновесие в тялото и втора проба известно време по-късно. Времето между тези проби се подбира според размера на животното. При малки животни периодът може да бъде само 24 часа, а при по-големи животни (или възрастни хора), периодът може да бъде дълъг до 14 дни.

Методът е изобретен през 50-те години на миналия век от Нейтън Лифсън и колеги от Университета на Минесота. Използването му обаче е било ограничено до 1980 г. поради високата цена на изотопа  $O^{18}$ . Напредъкът в масспектрометрията през 1970-те и началото на 1980-те години намали количеството на необходимия изотоп, което направи възможно прилагането на метода към по-големи животни, включително хора. Първото приложение при хора е през 1982 г. от Дейл Шьолер, повече от 25 години след първоначалното откриване на метода.

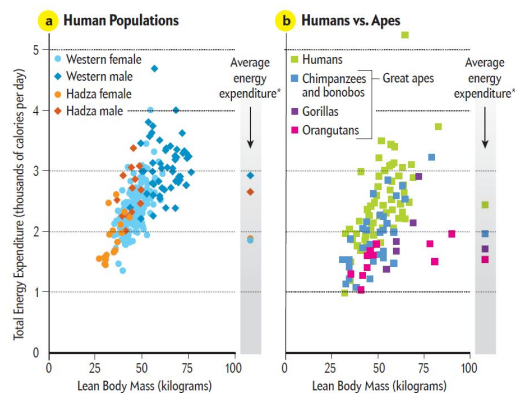
Методът се основава на въглеродния метаболизъм в телата. Когато клетъчно-то дишане разгражда молекули, съдържащи въглерод, за да освободи енергия, въглеродният диоксид се освобождава като страничен продукт. Той съдържа два кислородни атома и само един въглероден атом, но хранителните молекули като въглехидратите не съдържат достатъчно кислород, за да осигурят и двата кислородни атома в  $CO_2$ . Оказва се, че един от тях е от телесната вода. Ако кислородът във водата е маркиран с  $O^{18}$ , тогава издишваният  $CO_2$  ще съдържа белязан кислород. Освен това, докато  $CO_2$  се движи от мястото на дишане през цитоплазмата на клетката, през интерстициалните течности, в кръвния поток и след това в белите дробове, част от него обратимо се превръща в бикарбонат. И така, след консумация на вода, маркирана с  $O^{18}$ , той се уравнива с телесния бикарбонат и разтворения въглероден диоксид (чрез действието на ензима карбоанхидраза). Тъй като въглеродният диоксид се издишва,  $O^{18}$  се губи от тялото. Освен това,  $O^{18}$  се губи и чрез загуба на вода от тялото (като урина и изпаряване на течности). Деутерият (вторият маркер в двойно белязаната вода) се губи само когато телесната вода се губи. По този начин загубата на деутерий във водата на

тялото с течение на времето може да се използва за пресмятане на загубата на  $O^{18}$  по пътя на загубата на вода. Това оставя само оставащата нетна загуба на  $O^{18}$  във въглероден диоксид. Това измерване на количеството загубен въглероден диоксид е отлична оценка за общото производство на въглероден диоксид. След като това е известно, общата скорост на метаболизма може да бъде оценена от опростени предположения относно съотношението на кислорода, използван в метаболизма (и следователно генерирана топлина), към елиминирания въглероден диоксид.

Използването на този метод от тримата антрополози Херман Понтцер, Дейв Райхлен и Брайън Ууд, за изследване на традиционните ловци-събирачи от племето хадза, които водят тежък, изпълнен с физически усилия живот, стига до парадоксалният извод, че те изгарят същия брой калории като хората с достъп до съвременни удобства.

На фиг. 7.18 са показани енергетичните загуби в зависимост от телното за различни групи хора и примати. Вижда се, че хората консумират и изразходват стотици калории на ден повече от големите маймуни

Антрополозите стигат до извода, че "противно на общоприетото мнение, хората са склонни да изгарят еднакъв брой калории, независимо от това колко са физически активни. И все пак сме еволюирали да изгаряме значително повече калории, отколкото нашите братовчеди примати. Тези резултати помагат да се обяснят два пъзела, които в началото може да изглеждат различни, но всъщност са свързани: първо, защо упражненията като цяло не успяват да помогнат за загуба на тегло и второ, как са възникнали някои от уникалните черти на човечеството".



Фигура 7.18: Изразходвана енергия в зависимост от телното. ("The Exercise Paradox", Sc. Amer. 316,2)

## 7.3 Използване на рентгенови лъчи

Още от своето откриване в края на 19 век рентгеновите лъчи имат две основни приложения – в медицината, където се използва поглъщането им за да се получи изображение на изследваният обект и за анализ на строежа на веществата, където се използва разсейването и интерференцията им.

### 7.3.1 Рентгеноструктурен анализ

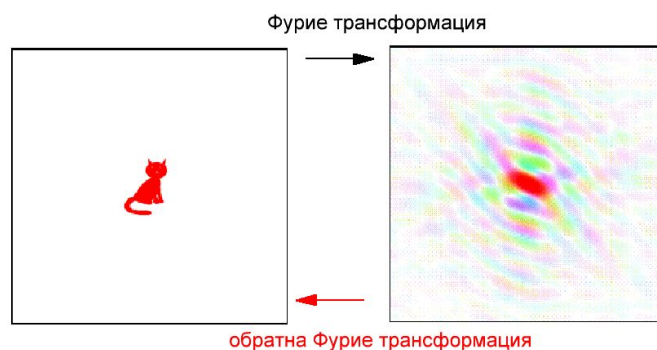
Разсейването на електромагнитни вълни от атомите на кристал и последвалата интерференция води до възникване на дифракционна картина, която носи в себе си информация за структурата на кристала. Тъй като разстоянията между атомите е от порядъка на ангстрьоми, то дифракционна картина може да се получи само с използване на рентгенови лъчи. Разкриването на структурата на ДНК

през 1953г. е станало възможно след като от Розалин Франклин е била получена дифракционна картина на кристал на ДНК, която е била възпроизведена от предложенията от Уотсън и Крик модел на двойна спирала. Рентгеновата кристалография успешно се използва за разкриване на структурата на белтъците.

За разлика от йонните кристали, които са изградени от силни ковалентни или йонни връзки, кристалите на биологичните материали са изградени от слаби водородни или Ван дер Ваалсови сили, което ги прави обикновено меки и крехки в сравнение с неорганичните вещества. Друга разлика е размерът. Биологичните и органичните молекули обикновено образуват много малки кристали (приблизително  $1 \text{ nm}^3$ ) в сравнение с неорганичните материали (около  $1 \text{ cm}^3$ ). Биокристалите обикновено се израстват от разтвор и могат да имат голямо съдържание на разтворител. Това е особено вярно за кристали от макромолекули като белтъци и нуклеинови киселини, където разтворителят може да заеме до 80% от кристала. За да се отгледат кристали на който и да е разтвор, той трябва да бъде доведени до свръхнасищане. За да се получат добри кристали без дефекти с размер, подходящ за рентгенов анализ, това трябва да се контролира много внимателно и за това са разработени различни техники.

Процесът на събиране на пълен набор от рентгенови дифракционни данни от кристал се състои в измерване на интензитета на дифрагиращия лъч. Експерименталната постановка се състои от източник на рентгенови лъчи, гониометър, върху който да се монтира кристалът, и детектор за измерване на интензитета на отразения рентгенов лъч. Източникът на рентгенови лъчи обикновено е тръба, в която електроните се ускоряват докато се ударят в метален анод, обикновено мед или молибден за биологични проби. Получават се рентгенови лъчи с дължина на вълната  $1,5418 \text{ \AA}$  за Cu и  $0,7107 \text{ \AA}$  за Mo. Този процес произвежда огромно количество топлина, затова тръбата трябва да се охлажда. След това колимираният лъч рентгенови лъчи пада върху кристала, монтиран на гониометър. Това е устройство което позволява да се позиционира кристалът в различни ориентации, за да се получат различни набори от отразяващи равнини.

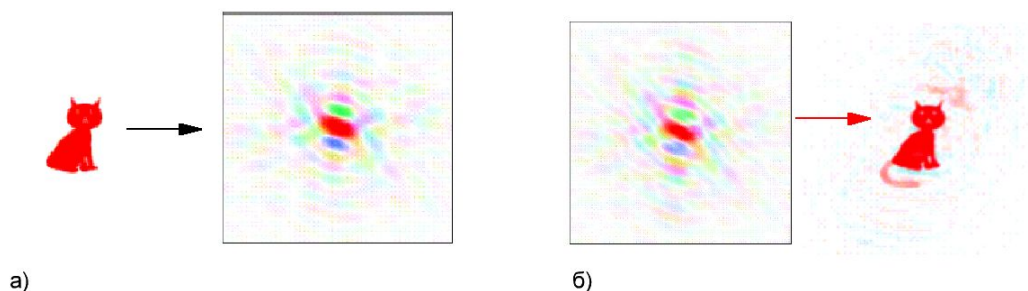
$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F(h, k, l)| e^{-2\pi i(hx+ky+lz)+i\alpha_{hkl}} \quad (7.4)$$



Фигура 7.19: Фурие трансформация на котка.

Образът, който се получава при дифракцията е всъщност Фурие преобразование (на фиг.7.19 е показана картината, която се получава след Фурие преобразуване на изображение на котка с опашка), а позицията на всяко дифракционно

петно се определя от размера и формата на елементарната клетка и присъщата симетрия в рамките на кристала. Интензитетът на всяко дифракционно петно се записва и е пропорционален на квадрата на амплитудата на структурния фактор. Структурният фактор  $F_{hkl}$  е (векторната) сума на разсейването на всеки атом в единичната клетка. Във всяко отражение има информация за всички атоми. Структурният фактор  $F_{hkl}$  и електронната плътност  $\rho(xyz)$  са свързани чрез обратната трансформация на Фурие:



Фигура 7.20: а) Фурие трансформация на изображение на котка без опашка. б) Обратна Фурие трансформация с използване на структурния фактор от изображението на котка с опашка и фази получени от а).

От формула 7.4 следва, че за да възстановим разпределението на електронната плътност трябва да познаваме както структурния фактор, така и фазите. От дифракционната картина може да се изчисли  $F_{hkl}$  (от интензитета на петната), но не и фазите  $\alpha_{hkl}$ . Само интензитета е недостатъчен за да се определи структурата на непознат обект. Има различни начини да се реши този проблем.

Можем да предположим и да вземем подобен обект, от който да се пресметнат фазите. С пресметнатите фази и истинският интензитет вече можем да заместим във формула (7.4) и да възстановим структурата. Ако фазите са приблизително верни ще се появят неправилни части. Това е показано на 7.20, където на фиг. 7.20 а) е показана котка без опашка и нейното Фурие изображение. Фазите от това изображение са използвани заедно със структурния фактор получен от изображението на котка с опашка показан на фигура 7.19. Резултатът е показан на фиг. 7.20 б) – вижда се, опашката на котката се е появила, но има и допълнителни части. На фигурите 7.19 – 7.20 фазите са изобразени с различен цвят.

Използват се различни методи за определяне на неизвестните фази. След като се определят приблизителните стойности на фазите, следващата стъпка е да се прецизират. Това обикновено се прави чрез извършване на трансформацията на Фурие и прецизиране на оценяване позиции на атомите, получени чрез включване на други известни данни. Например при начален модел за структурата може да изчисли електронната плътност и обратно към структурата. Този метод работи, ако моделът е от 30 до 40% идентичен с верния отговор.

### 7.3.2 Приложение на рентгеновите лъчи в медицината

Рентгеновата диагностика позволява без нарушаване на кожата (с изключение на т.нар. интервенционални процедури) и без значителна намеса във физиологичните процеси на тялото, да се изследват положението, формата, размерите,

състоянието на повърхността и вътрешната структура на почти всички човешки органи и системи, а в някои случаи и за оценка на тяхното функционално състояние. В същото време се откриват и идентифицират дори малки нарушения в морфологията и функцията на органите, които може да не се проявяват клинично по никакъв начин. Основният принцип на рентгеновата диагностика е качествен (обикновено визуален) и/или количествен (с помощта на компютърни технологии) анализ на пространствено-времето разпределение на рентгеновото лъчение, преминало през тялото на пациента. Неговата целева функция е откриване, оценка и идентифициране на патологични промени в тялото.

В съвременната рентгенова диагностика се използват приемници на изображения (позиционно-чувствителни детектори) от няколко различни типа. Те се различават един от друг по принципите на преобразуване на енергията на рентгеновите фотони, падащи върху детектора и в резултат на това по техните характеристики на изображение. Най-старият детектор е рентгеновата плака (филм), а най-новите са позиционно чувствителни детектори, базирани на полупроводникови матрици с голям размер

Приложението на рентгеновата диагностика обхваща:

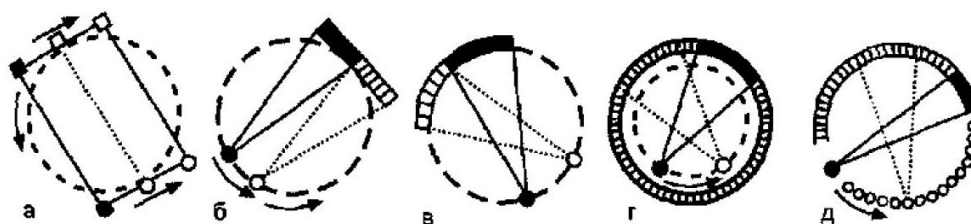
- *Флуорографията* е фотография на рентгенови изображения върху фотографски филм с малък формат от фосфорен екран с помощта на леща или огледална оптична система, инсталирана между екрана и филмовата касета.
- *Мамографията* е основният метод за диагностика на ракът на гърдата. Ултразвуковата ехография, ядрено-магнитния резонанс и статичната сцинтиграфия се използват само за уточняване на диагнозата при съмнителни резултати от мамография.
- *Рентгеновите снимки в денталната медицина* са най-специализираните и широко използвани в медицинската практика: от общия брой рентгенови снимки, направени годишно в целия свят, около 40% са дентални рентгенографии – те представляват почти 50% от общото облъчване.
- *Остеоденситометрия* (абсорбциометрия) е важна за навременната диагностика на остеопорозата, патологично състояние, при което костната плътност намалява, което води до повишен риск от фрактури. Откриването на остеопороза и оценката на нейната тежест се извършва с помощта на рентгенова остеоденситометрия, която позволява не само да се подчертаят контурите на изследваната кост, но и да се определи нейната плътност.
- *Ангиографията* е рентгеново изследване на кръвоносните и лимфните съдове, което се извършва с помощта на рентгеноконтрастни вещества. В зависимост от вида на контрастирания съд се разграничават артериография, венография (флебография) и лимфография. Сравнително наскоро се формира и вече се използва широко технологията на дигиталната диференциална (субтракционна) ангиография, която може значително да подобри качеството на визуализация на кръвоносните съдове след въвеждането на рентгеноконтрастно вещество (интравенозно или интраартериално). Цифровите рентгенови изображения на изследваната област на тялото се записват преди и след инжектирането на рентгенов контраст и се въвеждат в паметта на

компютъра; освен това първото от тях се използва като маска за изваждане от второто и следващите изображения. На диференциалните изображения съдовете се визуализират много по-добре, отколкото при конвенционалната ангиография.

- *Интервенционалната радиология* е комбинация от диагностични (радиологични) и терапевтични мерки. На първия етап се определя характерът и тежестта на поражението чрез рентгеново изследване. На втория етап, обикновено без прекъсване на изследването, рентгеновият хирург извършва необходимите медицински манипулации, като взема предвид информацията, получена на първия етап. Всички те, като правило, се извършват с въвеждане на специални инструменти (игли, катетри, сонди, проводници, стентове и др.) под постоянен рентгеноскопски контрол.
- *Компютърната томография* (КТ) може да се характеризира като една от многото рентгенови диагностични техники, но обемът, съдържанието и съдържанието на диагностична информация на КТ изследванията се оказва толкова високи и в някои случаи дори уникални, че КТ трябва да се разглежда като отделен и независим метод за медицинско използване на рентгеновото лъчение.

Основната разлика между КТ и традиционните техники за получаване на сенчести рентгенови изображения е процедурата за реконструкция на триизмерното разпределение на плътността на тъканите на изследвания обект.

Във всеки компютърен томограф има четири групи устройства: за генериране, колимиране и регистриране на рентгенови лъчения със сканиращи блокове и позиционно чувствителна детекция; за полагане, позициониране, обездвижване и движение на пациента; за обработка на резултатите от измерванията и компютърна реконструкция на КТ изображения; за визуално представяне и получаване на хартиени копия на тези изображения.



Фигура 7.21: Схеми на сканиране за компютърни томографи от първо до пето поколение: а – паралелно, б – паралелно - ветрилообразно, в – векторно - ветрилообразно, г – ветрилообразно - кръгово, д – електронно лъчево.

Според конструктивните особености, взаимното разположение и движенията в системата „излъчвател-пациент-детектор” компютърните томографи могат да бъдат разделени на седем вида, условно наречени поколения, пет от които са показани на фиг.7.21

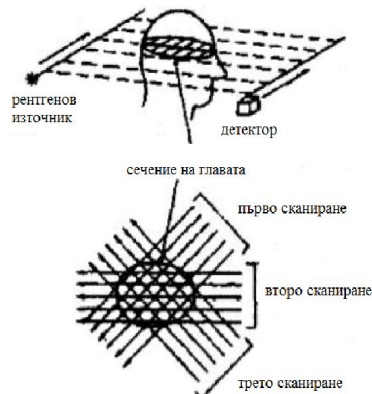
Основната част на компютърния томограф е компютърен скенер, устройство с голям отвор, вътре в който се поставя тялото или само главата на пациента,

за да се получи изображение (фиг. 7.22). Източникът образува силно насочен рентгенов лъч, чиито параметри се измерват от детектор. Тази двойка източник - приемник последователно измерва паралелни проекции, движещи се линейно през изследвания обект.

След заснемане на всяка проекция рамката, върху която са монтирани източникът и детекторът, се завърта на определен ъгъл, за да се получи следващата проекция. Времето за работа на такава система е доста дълго - около 4 минути.

Скенерът от четвърто поколение е оборудван със стационарен пръстен от 1000 детектора, като само един източник се върти, създавайки ветрилообразен лъч от рентгенови лъчи. Такъв томограф работи в режим на сканиране. Времето за изследване е около 0,1 s, което позволява да се "замразят" изображения на движението на фазите на сърцето и др.

Областта на приложение на компютърната томография в медицината бързо се разширява. Те успешно се прилагат за решаване на все по-сложни проблеми - да извършват диференциална диагноза на заболявания, включително надеждно разграничаване между доброкачествени и злокачествени тумори, откриване на рецидиви на заболяването, оценка на клиничната ефективност на лечението и т.н. Компютърните томографи постепенно се превръщат в основно средство за осигуряване на лъчева терапия за тумори с различни локализации, заменяйки обичайно използваните за тази цел рентгенови симулатори на терапевтично облъчване. Доказано е, че в резултат на използването на КТ топометрия обемът на облъчените здрави тъкани около туморния фокус се намалява с 20–45% в сравнение с традиционната технология за използване на рентгенови симулатори, тази печалба е особено забележима при планиране на облъчването на малки тумори.



Фигура 7.22: Сканиране с първо поколение томограф.

## 7.4 Микроскопски методи за изследване

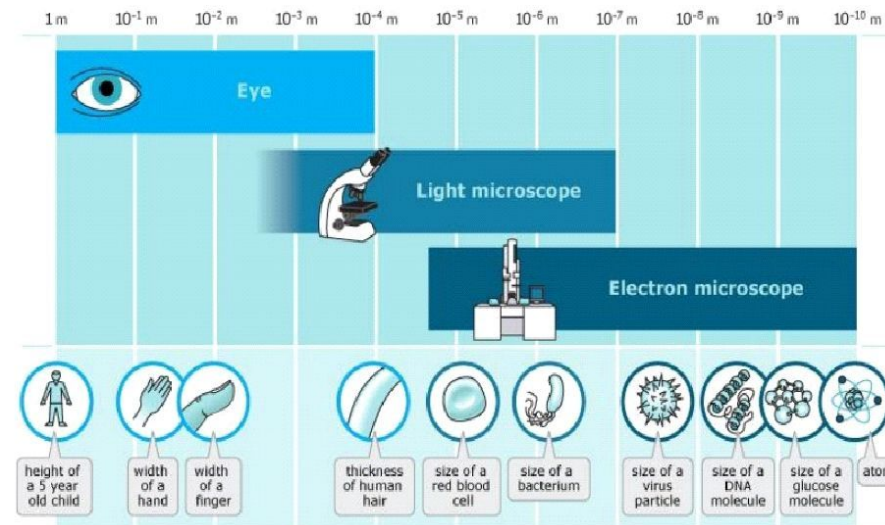
### 7.4.1 Оптичен микроскоп

От изобретяването си в началото на 17 век, чак до 20 век оптичният микроскоп е бил единственият уред, с който е можело да се изследват микроскопични обекти. Лъовенхук е първият учен, който го е използвал за изучаване на биологични обекти, за това е известен като баща на микробиологията. Той е първият документирал микроскопски наблюдения на мускулни влакна, бактерии, сперматозоиди, червени кръвни телца, кристали в подагрени тофи, и притока на кръв в капиляри.

Принципът на действие на който и да е оптичен микроскоп се основава на осветяване на изучавания обект със видима светлина и увеличаване на образа с оптични лещи. Поради дифракцията на светлината не могат да бъдат разрешени обекти с размери от порядъка на дължината на вълната, която за видимата



светлина е в интервала 380-750 nm. Тази граница се преодолява в електронния микроскоп, в който се използват вълновите свойства на електроните, което позволява достигане на много по-малки размери. На фигура 7.23 са показани размерите и обектите, които могат да бъдат наблюдавани с различни видове микроскопи.



Фигура 7.23: Разрешение на различните видове микроскопи.

## 7.4.2 Трасмисионен електронен микроскоп

Исторически това е първият вид електронен микроскоп конструиран в 1931г.

Вместо светлина в него се използват електрони, ускорявани с високо напрежение  $U$ , в резултат на което достигат скорост  $v$ :

$$v = \sqrt{\frac{2eU}{m}}$$

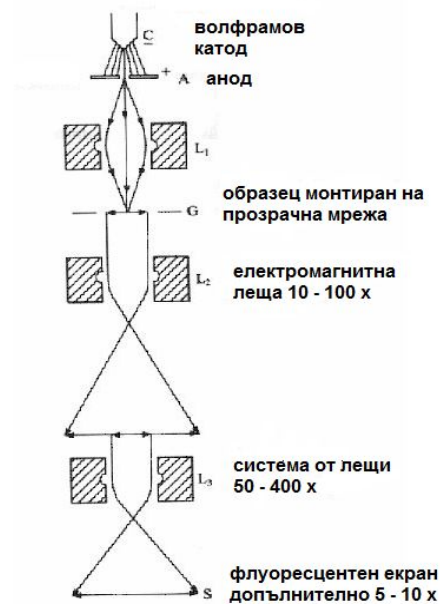
Съгласно принципа на дьо Бройл, такава частица има дължина на вълната:

$$\lambda = \frac{h}{mv} = \frac{h}{\sqrt{2meU}}$$

От тази формула се вижда, че с увеличаване на ускоряващото напрежение  $U$  могат да се достигнат много малки дължини на вълните, например при  $U = 100$  kV се получава  $\lambda = 0.04$  ангстрьома.

Вместо стъклени лещи, формирането на образа става чрез електромагнитни лещи върху флуоресцентен екран.

На фиг.7.24 схематично е показано устройството на ТЕМ микроскопа. Първият електронен микроскоп е конструиран от Ернст Руска.



Фигура 7.24: Схема на електронен трасмисионен микроскоп (ТЕМ).

Необходимостта от развитие на техниките за фиксиране и рязане на биологични обекти е причина електронният микроскоп да намери приложение чак след 1950 г. Това довежда до революционни открития за финия строеж на клетката.

Преди изследване обектът се обработва чрез различни вещества – процес, наречен химическо фиксиране. При електронния микроскоп се разглеждат мъртви клетки, а не живи, както при оптичния микроскоп. Тъй като обектите са невероятно малки (обикновено с дебелина около 50 nm), се използват специални уреди за рязане – ултрамикротомии. При разглеждането често се добавят контрастни вещества, които помагат за разпознаването на различните структури. Без тях изображението е бледо и се различава трудно.

### 7.4.3 Сканиращ електронен микроскоп

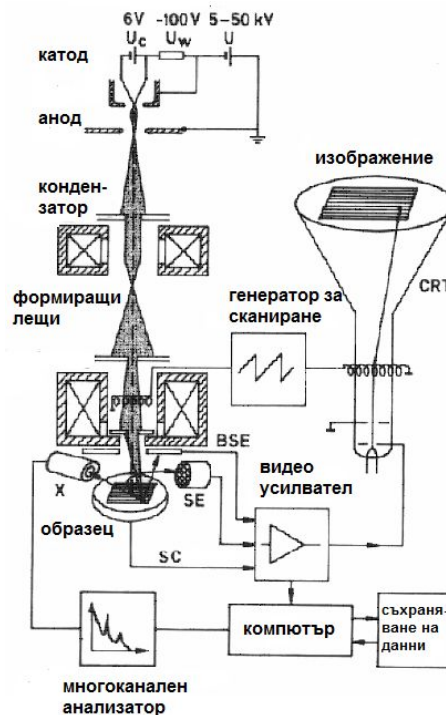
Сканиращият електронен микроскоп (Scanning Electron Microscope - SEM) е вид електронен микроскоп, който се използва за изучаване на повърхности, които се сканират (обхождат се точка по точка) от електронен сноп. Това налага покриването на непроводящите образци с тънък слой въглерод (под формата на графит) или благороден метал (злато, злато-паладий, платина). Работи се с пониско напрежение от трансмисионния електронен микроскоп (30-40 kV).

На фиг.7.25 схематично е показано устройството на ТЕМ микроскопа. Както и при трансмисионния микроскоп се използва сканиращ електронен лъч, но за разлика него, при който се използват само преминалите електрони, при сканиращият микроскоп се събира много по-подробна информация като се детектират:

- обратно разсеяните електрони, което дава информация за структурата на образеца (BSE на фиг.7.25);
- вторичните електрони избити от повърхността на образеца, което дава информация за топографията ѝ (SE на фиг.7.25);
- тока през образеца, който дава информация за вътрешната му структура (SC на фиг.7.25);
- рентгенови лъчи, носят информация за химическия състав (X на фиг.7.25);

Всички тези сигнали се преобразуват, отцифроват, обработват от компютър и получените данни се записват. Също като при трансмисионния микроскоп, цялата колона на микроскопа се намира във вакуум.

Образът, който се получава е обемен, тъй като детекторът за избитите или отразени електрони е поставен в единия край на тръбата и ако електроните се отклонят в друга посока, съответната точка се отчита като „тъмна“, а ако отклонението е в посока на детектора – като „светла“. Това е предимство пред оптич-



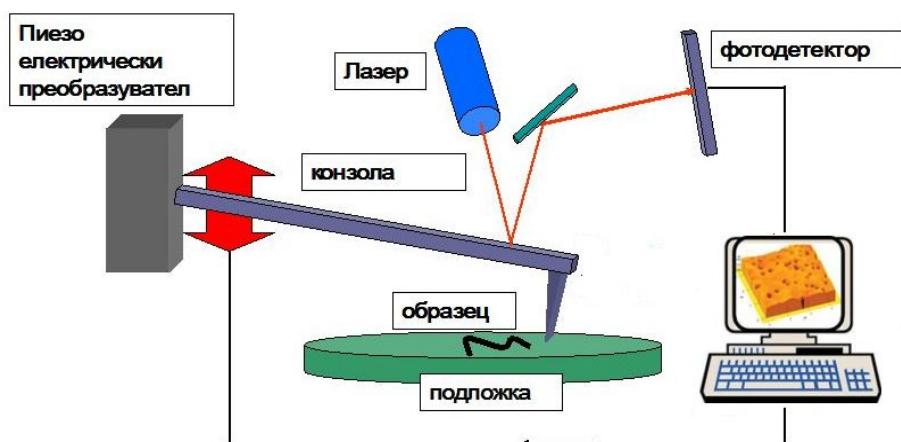
Фигура 7.25: Схема на сканиращ трансмисионен микроскоп (SEM).

ния микроскоп, при който изображението се получава чрез фокусиране в една равнина. Поради тази причина SEM се използва за качествени снимки с по-ниско увеличение, което попада в обхвата на оптичните микроскопи.

За детектиране на електроните, както на SE така и на BSE се използват твърдотелни детектори.

#### 7.4.4 Атомно силов микроскоп

Атомният силов микроскоп също се използва за изследване на повърхността на обекти. Той намира особено широко приложение в биомедицинските изследвания, при което вече става въпрос не само за изследвания на молекулно и атомно ниво, но и за осъществяване на т. нар. нанобиоманипулации. Този изключително прецизен метод за изследване намира приложение в биофизичната химия на клетките, дава възможност да се получават изображения на отделни белтъци при физиологични условия, както и пряко наблюдение на техните конформационни изменения. Особено интензивно се развива в последно време приложението на атомно-силовата микроскопия в изследванията на раковите клетки, както и ефекта на лекарствени средства върху техните мембрани.



Фигура 7.26: Схема на атомен силов микроскоп (AFM).

Принципът на действие на атомно-силовия микроскоп е изключително прост — над образца за изследване е разположена еластична пластина (кантилевер), закрепена неподвижно в единият си край към основата, по отклонението на която може да се отчита еластичната сила на взаимодействието ѝ с изследвания образец (фигура 7.26). Образецът може да се премества в три взаимно перпендикулярни направления. При приближаване на сондата към него, в зависимост от разстоянието между тях, ще действат сили на привличане или на отблъскване, като в първия случай атомно-силовия микроскоп ще работи в т. нар. режим на контактно сканиране, а при втория — безконтактно сканиране.

В контактен режим сондата преминава на толкова малко разстояние от образца, че практически има физичен контакт. Възникващата при това сила на отблъскване се уравнива от еластичната сила на кантилевера. Релефът на изследваната повърхност се формира по два основни начина: режим на постоянна височина (измерва се отклонението на кантилевера във всяка точка при

хоризонталното му движение над образеца), или в режим на постоянна сила (с използването на обратни връзки се поддържа постоянна по големина сила на взаимодействие на сондата с образеца).

При безконтактният режим на сканиране действат Ван-дер-Ваалсовите сили на привличане. За да се възпрепятства „слепването“ на сондата с образеца в този режим е необходимо константата на еластичност на кантилевера да бъде голяма, което налага използването на по-чувствителна система за детектиране на вертикалното му преместване.

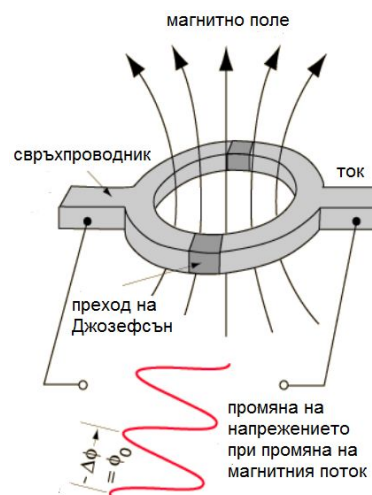
Приложението на AFM в биологията включва:

- Изучаване на разгъването на протеини.
- Изобразяване на биомолекули.
- Измервания на силите в среди на реални разтворители.
- Изследвания за свързването на антитяло-антиген.
- Изследвания за свързване на лиганд-рецептор.
- Измерване на свързващите сили на допълващи се ДНК вериги.
- Изучаване на повърхностните сили на триене.
- Локализация на йонни канали.

## 7.5 Използване на SQUID устройства на принципа на квантовата интерференция

Устройството за свръхпроводяща квантова интерференция (SQUID) се използват за измерване на изключително слаби сигнали, като фини промени магнитното поле на човешкото тяло (фиг. 7.28). Детекторът на магнитно поле е базиран на прехода на Джозефсън. Той състои от свръхпроводник, разделен от изолационен слой, толкова тънък, че през него могат да преминават електрони. На (фиг. 7.27) е показан свръхпроводящ пръстен с два прехода. Електроните проявяват квантови свойства като преминават едновременно през двата и интерферират. SQUID са използвани за различни цели, които изискват изключителна чувствителност, включително инженерно, медицинско и геоложко оборудване. Тъй като измерват промените в магнитно поле с такава чувствителност, не им се налага да влизат в контакт със система, която тестват.

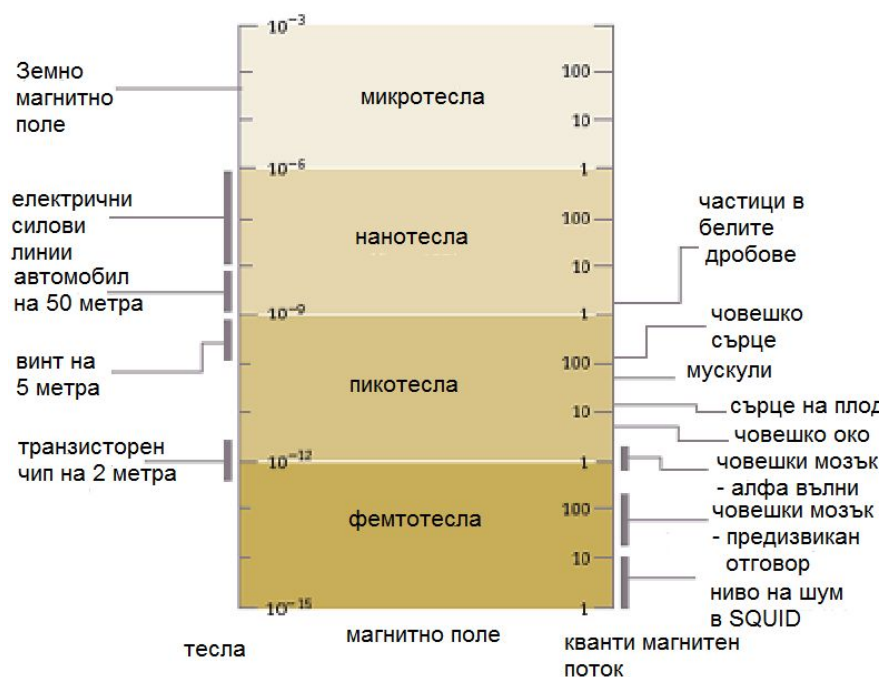
Използват се два вида SQUID. Радиочестотният SQUID, който е по-лесен за изработка и по-евтин, се състои от един Джозефсонов преход, който е монтиран



Фигура 7.27: Двоен преход на Джозефсън.

на свръхпроводящ пръстен. Осцилиращ ток се прилага към външна верига, чието напрежение се променя в резултат на взаимодействието между него и пръстена. След това се измерва магнитният поток. SQUID с постоянен ток (DC), който е много по-чувствителен, се състои от два Джозефсонови прехода, използвани успоредно, така че електроните, тунелиращи през преходите, да демонстрират квантова интерференция, зависеща от силата на магнитното поле в контура. DC SQUID демонстрират устойчивост в отговор дори на много малки вариации в магнитното поле, което е позволява откриването на такива малки промени.

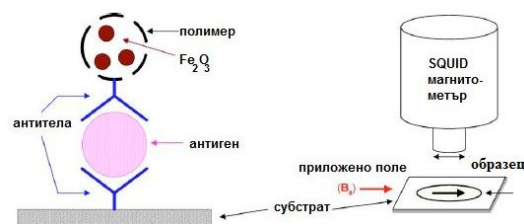
SQUID обикновено се изработват или от оловна сплав (с 10% злато или индий) и/или от ниобий, като често се състоят от тунелна бариера, поставена между основен електрод от ниобий и горния електрод от оловна сплав.



Фигура 7.28: Сила на магнитното поле на различни материали.

Фигура 7.29 илюстрира метода на магнитоимуноанализ. Антитяло е прикрепено към маркер с магнитни частици, например  $Fe_2O_3$ , вградени в полимерно ядро. То се използва за откриване на антиген, който селективно се свързва с него. Фигурата показва улавянето върху повърхност с имобилизирана молекула за един домейн (епитоп) на мишената и свободен маркер, свързан към друга молекула, за откриване на друг специфичен епитоп на мишената.

При наличие на цел маркерът се залепва към повърхността за улавяне, а в отсъствието на ѝ, несвързаният маркер може да се измие. Откриването става след измерване на наличието или отсъствието на маркера върху повърхността.



Фигура 7.29: Схематична диаграма на магнитоимуноанализно измерване.

Едно от най-обещаващите приложения на устройството е в магнитоенцефалографията (MEG), процес на измерване на магнитни полета, което даде възможност за изобразяване на органи. Физически процеси, като мускулна или невронна активност, при хората (и други животни) създават магнитни полета, малки като хиляда милиардна от тесла (за сравнение, магнитът за хладилник генерира около една десета от тесла (фиг. 7.28)). DC SQUID, съдържащи се в подобно на каска устройство, измерват токовете, създадени от невронната активност. Възможните приложения на SQUID в неврологията са безброй. Скорошно проучване използва магнитоенцефалография с активиран SQUID, за да измери изненадващо високото ниво на активност в мозъците на потребителя, което се предизвиква от избора между (например) марки кетчуп.

Електрическите измервания на физиологичните потенциали са добре установени в клиничната диагностика. По същество всеки явлението в електрофизиологията има магнитен аналог тъй като магнитното поле е свързано с всеки електрически ток. Аналогични измервания на физиологични магнитни областите обаче са относително непознати за изследователите и клиницисти. Биомангнитните изследвания обхващат много от основните органи на тялото, включително сърцето, мозък, черен дроб, бели дробове и мускули. Няколко нови диагностични процедури и инструменти са резултат от тази работа. Тези измервания се оказват от голямо значение.

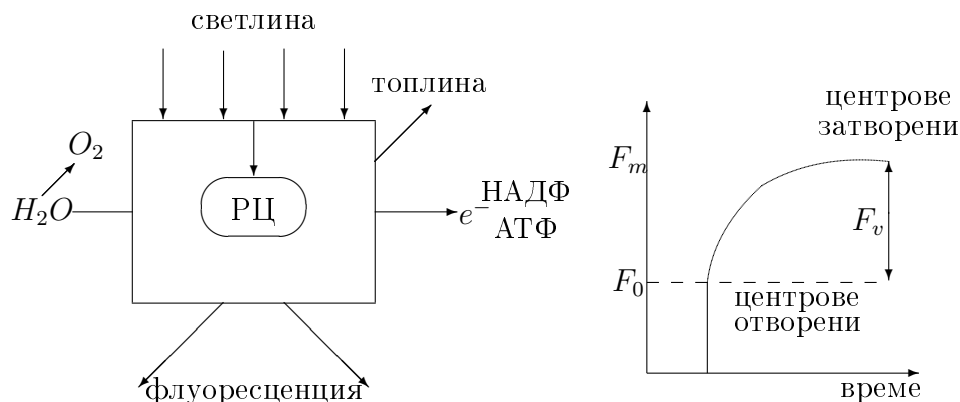
## 7.6 Биофизични методи за екологичен мониторинг

В съвременните условия на силно антропогенно въздействие върху външната среда голямо значение има екологичния мониторинг. Неговото успешно използване позволява да се прогнозира изменението на характеристиките на отделните звена на екологичната система и на тази основа да се предскаже по-нататъшната еволюция на екосистемата във времето. Принципно важно е да се получи тази информация още преди резултатите от външните въздействия на организмите да се проявят във видими признаци, такива като изменение на формата и забавяне на ръста на клетките, намаляване на клетъчната популация и общата биомаса.

Най-голямо развитие в последните години са получили различни спектрални и луминисцентни методи, които се използват предимно за диагностика на състоянието на клетките на микроводораслите под влиянието на факторите на средата във водните екосистеми. Спектралните методи се използват отдавна при екологичните изследвания. Известно е например, че от изменението на оптичните свойства на растителната покривка, регистрирано чрез снимки от изкуствени спътници на Земята, може да се съди за състоянието на растителните масиви. Например, продължителните въздействия на недостига на влага, сушата, солеността на почвата, водят до характерни изменения на спектрите на поглъщане на хлорофила от растителната покривка и позволява да се направи извод за неблагоприятното състояние на растенията. Обаче тези ефекти се наблюдават след значителни периоди от време, когато нарушенията на състоянието на растенията вече са станали, като правило, необратими. В отличие от това луминисцентните методи отразяват такива изменения в фотосинтезния апарат, които протичат на началния етап на външните въздействия. Понастоящем в много лаборатории,

занимаващи с разработка на нови методи за екологичен мониторинг, тези направления се развиват усилено.

### 7.6.1 Флуоресценция на хлорофила

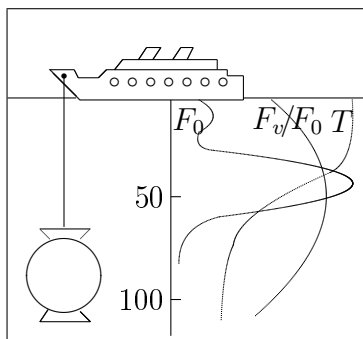


Фигура 7.30: Конверсия на светлинната енергия във фотосистема II с образуване на АТФ и възстановяване на НАДФ. Отдясно - изменението флуоресценцията във времето при затворени центрове (переходът  $F_0 \rightarrow F_m$ ). РЦ е реакционен център на фотосистема II. Флуоресценциите  $F_0$  и  $F_m$  са съответно при активни и неактивни реакционни центрове на фотосистема II.

В природните водоеми различните антропогенни замърсявания могат да окажат съществено влияние на фотосинтезния апарат на водораслите, което в крайна сметка намалява продуктивността на цялата водна екологична система. Регистрацията на действието на външните фактори на състоянието на фотосинтезните мембрани на клетките на микроводораслите, позволява по този начин да се следи и за състоянието на водната среда. Основната идея на такъв подход се състои в това, че хлорофила, намиращ се във фотосинтезните мембрани, служи като природен датчик за състоянието на клетките на водораслите и висшите растения. При нарушаване на състоянието на фотосинтезните мембрани под въздействието на външен фактор, протичат определени изменения на оптичните свойства на хлорофила, които служат като източник на информация за експрес диагностика на състоянието на клетките в природни условия.

Поглъщането на квант светлина привежда молекулата на хлорофила във възбудено състояние, чиято енергия при отсъствие на фотосинтеза преминава или в топлина, или във флуоресценция. Енергия на електронното възбуждане на хлорофила се използва в реакционите центрове (РЦ) за генерация на поток електрони в първичния стадий на фотосинтеза, необходими за възстановяване на НАДФ (никотин амид дифосфат) и образуване на АТФ (аденозин триифосфат). Първичните процеси на фотосинтеза на висшите растения се осъществява при участието на две фотосистеми, функциониращи последователно. Фотосистема II разлага водата с отделяне на свободен кислород и отдаване на електрон през верига от преносители на фотосистема I, която вече възстановява НАДФ. В клетката основно флуоресцира хлорофила, принадлежащ на фотосистема II, и именно изменението на

неговата флуоресценция говори за състоянието на реакционните центрове на тази фотосистема. При активна фотосинтеза, когато всички РЦ се намират в открито работно състояние, в условията на слабо осветление, почти цялата погълната светлинна енергия се използва в процесе на фотосинтеза. Затова интензивността на флуоресценцията на хлорофила в клетката е много по-ниска, отколкото в разтвор (фиг.7.30). Обаче и тук неголяма част от енергията на електронното възбуждене (не повече от 3%) преминава в енергия на светлинна флуоресценция във вид на така наречената *фонова флуоресценция*  $F_0$ . Като правило, в нормални условия  $F_0$  малка, което говори за активно използване на енергията на погълнатата светлина от клетките. Но ако при някакви въздействия състоянието на фотосинтезните мембрани се наруши, то центровете (РЦ) преминават в неактивно (затворено) състояние, което прекратява потока от електрони в първичните процеси на фотосинтез. В тези условия погълтаната светлинна енергия вече не може да се използва при фотосинтеза, затова и флуоресценцията на хлорофила нараства. РЦ може напълно да се изключат под действието на инхибитор (диурона) на потока на електрони. В този случай флуоресценцията силно нараства и се приближава до максималното си значение  $F_m$ . Центровете могат да се затворят и като се създаде също излишна осветеност на клетките, когато произтича светлинно насищане на фотосинтеза. Фотосинтезната верига на пренос на електрони, както че ли се задавя от излишък на погълната светлинна енергия, превръщайки все по-голяма част от погълнатата енергия във флуоресценция. Може да се намери разликата между интензивността на флуоресценцията на хлорофила при затворени и отворени РЦ ( $F_v = F_m - F_0$ ), която се нарича променлива флуоресценция на хлорофила в клетките (виж фиг.7.30). На практика се оценява отношението  $F_v/F_m$ , което е тясно свързано с първичната продуктивност на фитопланктона в природните водоеми. Тя добро корелира с фотосинтезната продукция на клетките, определена с класическите методи по възстановяването на  $^2$  с помощта на радиоактивния изотоп <sup>14</sup>.

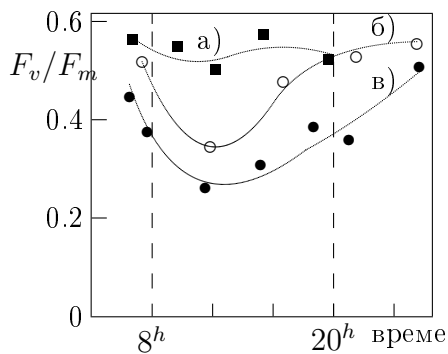


Фигура 7.31: Схема на морско сондиране на фитопланктона с използване на потопяем двумимпулсен флуориметър. Отдясно се показани резултатите от изменения на  $F_0$  при различна дълбочина, фотосинтетичната активност ( $F_v/F_0$ ) и температурата на водната среда. Вижда се, че най-голямо количество и активност на клетките се наблюдава на дълбочина 50 м. В повърхностните слоеве фотосинтезът се подтиска поради твърде голямата интензивност на слънчевата светлина.

За изследование флуоресценцията на фитопланктона в природните водоеми се използва специален прибор (потопяема сонда - флуориметър), позволяващ да се измерват величините  $F_0$  и  $F_m$  във водоемите на различни дълбочини (до 200 м).



Принципът му на действие е показан на фиг.7.31. Първоначално, чрез осветяване със слаба светкавица на порция фитопланктон, в сондата се измерва фоновата флуоресценция  $F_0$ . След това под действието на втора мощна светкавица, в клетките протича кратковременно насищане на всички РЦ, които не са успели да преработят погълнатата енергия и в резултат на това преминават в затворено състояние. При тези условия флуоресценцията на хлорофила нараства до максималното си значение  $F_m$ . По такъв начин може да се определи значението на променливата флуоресценция  $F_v = F_m - F_0$  и отношението  $F_v/F_m$ , които отразяват ефективността на запасената светлинна енергия на началните етапи на фотосинтез. Понеже величината  $F_0$  зависи от количеството хлорофила в клетките, то това може да се използва за определяне на концентрацията му. От  $F_0$  може също и да се определи и количеството биомаса на фитопланктона, което е пропорционално на съдържанието на хлорофила в клетките. Определянето на  $F_0$  и  $F_v/F_m$  позволява да се определи кога във водоемът има много фитопланктон ( $F_0$  е голямо), но неговата активност е неголяма поради неблагоприятните условия. Въз основа на тези данни може да се получи сравнителна информация за разпределението както на самия фитопланктон ( $F_0$ ), така и на неговата фотосинтетична активност ( $F_v/F_m$ ) по дълбочина, и чрез хоризонтален разрез на водоема да се пресметне фотосинтетичната продукция. На фиг.7.31 е приведен профилът на разпределение на фитопланктона и неговата активност по дълбочина.



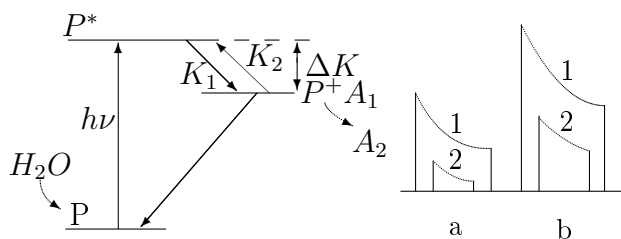
Фигура 7.32: Типични денонощни изменения на променливата флуоресценция на хлорофила на фитопланктона в повърхностните слоеве на водата - а) вода с ниска, б) средна и в) голяма концентрация на биогенни елементи. вижда се, че активността на биосинтез в сутрешните часове е висока, към средата на деня във водоемите бедни на минерални елементи активността пада и след това се възстановява във вечерните часове.

Неблагоприятните фактори на средата, влияещи на състоянието на клетките на микроводораслите и фотосинтетическата продуктивност на фитопланктона включват силната светлина, неблагоприятните температури, недостатъчното минерално съдържание, антропогенните замърсявания (фиг.7.32). Светлината като източник на енергия е необходима за процеса на фотосинтез, но твърде силната светлина може да бъде увреждащ фактор. При повишена интензивност на светлината настъпва преустройство на фотосинтезния апарат. Като защитен механизъм протича разпад на белтъка на РЦ, което води до прекратяване на фотосинтеза. При по-благоприятни условия този белтък се регенерира и фотосинтеза възстановява. Обаче при дълго интензивно осветяване се стига до необратимо повреждане на РЦ.

### 7.6.2 Забавена флуоресценция

Друг източник на информация за характера на функциониране на фотосинтезния апарат е процеса на забавена флуоресценция (ЗФ), открита от Арнон и Стрелер през 1951 г. Явлението се състои в това, че след светлиното възбуждане във фотосинтезиращите клетки се наблюдава слабо, дълго затихващо светене, изпускано от хлорофила. Това светене възниква след прекратяване на флуоресценцията  $F_0$  за сметка на енергията, отделяна в хода на реакцията на тъмно от първичните фотопродукти на фотосинтеза в РЦ (фиг.7.33).

Да разгледаме опростената схема на този процес. При поглъщане на квант светлина ( $h\nu$ ) се възбужда молекула хлорофил в реакционния център  $P$  ( $P \rightarrow P^*$ ). След това настъпва преход на електрон от  $P^*$  към първичния акцептор на електрона  $A_1$  (възстановяването на първичния акцептор на електрони става по веригата  $A_1 \rightarrow P^*A_1 \rightarrow P + A_1^-$ ). Едновременно става окисление от фотоактивния хлорофил на РЦ ( $P$ ) (фиг.7.33) :  $PA_1 \rightarrow P^*A_1 \rightarrow P^+A_1^-$ . След това електрона преминава от акцептора  $A_1$  по нататък във веригата на преносители и в края на краищата попада на окислена молекула НАДФ<sup>+</sup>. Окисленият РЦ на ФС II ( $P^+$ ), на свой ред, се възстановява за сметка на електрона, получен при разлагането на водата. Тези етапи се отговорни за генерацията на първичен пряк поток електрони (фиг.7.30). Обаче съществува неголяма вероятност за обратен пренос на електрон в РЦ от  $A_1^-$  към  $P^+$ , при който става рекомбинация с  $P^+$  с регенерация на възбуденото състояние  $P^*$ . В резултат клетките изпускат забавено светене с известна задръжка във времето  $P^* \rightarrow P + h\nu$ .



Фигура 7.33: Схема на възникване на забавената флуоресценция на хлорофила на листата и водораслите при връщането от  $A_1^-$  към  $P$ .  $K_1$  - пряк пренос на електрони  $P^*A_1 \rightarrow P^+A_1^-$ ;  $K_2$  - обратен пренос на електрони  $P^+A_1^- \rightarrow P^*A_1 \rightarrow P + h\nu$ , съпровождащ забавената флуоресценция. Крива 1 - сигнали на забавена флуоресценция: а - листа на граха (нормално растение (1) и мутант с нарушения в реакционния център на фотосистема II (2)); б - зелени водорасли хлорела: контрол (1) и под действие на замърсяване  $CuSO_4$  (2). Вижда се, че въздействията, влияещи на реакционните центрове на фотосистема II, инхибират забавената флуоресценция.

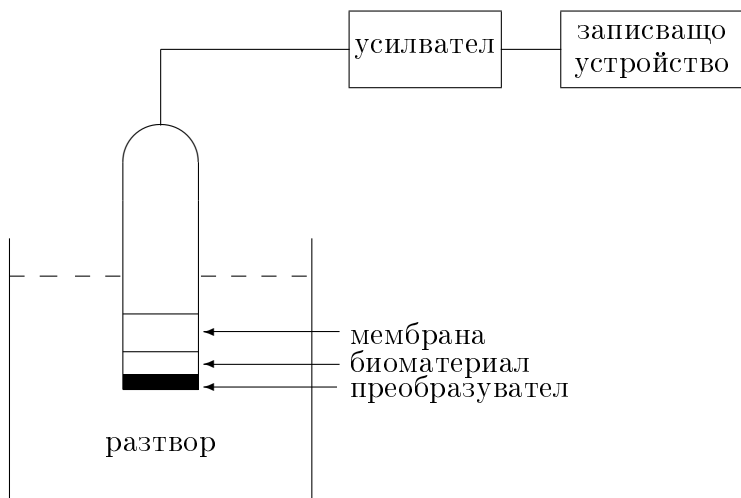
Очевидно, интензивността на забавената флуоресценция е пропорционална на количеството РЦ в състояние  $P^+A_1^-$  с разделени заряди. Под действието на повреждащи фактори върху фотосинтетическия апарат, концентрацията на РЦ в състояние  $P^+A_1^-$  може да се измени. Това позволява използването на ЗФ за откриване на замърсявания във водна среда (фиг.7.33 а), б) криви 2). Освен това, оказва се, че интензивността на ЗФ се увеличава за сметка на енергията на трансмембрания електрохимически потенциал на мембраните на хлоропластите, необходим за

синтеза на молекулите АТФ. Това позволява също методът на ЗФ да се използва за оценка на степента на енергизация на мембраните на хлоропластите и свързаната с нея фотосинтетическа продуктивност на фитопланктона.

## 7.7 Биосензори

В последното десетилетие на миналия век възникна ново научно направление - *биоелектроника*. Първа стъпка в тази област е създаването на нови устройства за анализ и преработка на информация, наречени биосензори.

Под *биосензор* се разбира устройство, в което чувствителен слой, съдържащ биологичен материал: ензими, тъкани, бактерии, антигени, липозоми, органели и др., непосредствено реагиращи на определяния компонент, генерира сигнал, функционално свързан с концентрацията на този компонент. Конструктивно биосензорът представлява комбинирано устройство, състоящо се от два преобразувателя, (*трансдюсери*) намиращи се в контакт един с друг. На фиг.7.34 е показана общата схема на това устройство. Биотрансдюсера преобразува информацията за определяния компонент, а физическият преобразувател го фиксира. Наличието на биоматериал с уникални свойства позволява да се определи нужното съединение във сложен по състав разтвор без да се прибегва към допълнителни операции свързани с използването на допълнителни реагенти. Поради това този метод се нарича *безреагентен метод на анализ*.



Фигура 7.34: Схема на биосензор.

Понятието за биосензор или *биочип* е сравнително ново, появило се е през 60-те години. Принципът на действието им е сравнително прост. Определяното вещество дифундира през полупроницаемата мембрана в тънкия слой на биокатализатора, в който протича ензимна реакция. Продукта на тази реакция се определя с помощта на електрод, на повърхността на който е закрепен ензима, поради което такова устройство се нарича *ензимен електрод*.

Основна задача при създаването на такъв електрод е запазване на действието на ензима за дълго време. Работата е в това, че нативният ензим запазва своите свойства си за кратко време, затова се използва специална операция - имобилизация

на ензима състояща се в "закрепването" му или на повърхността на адсорбенти или във вмъкването му в поръзен полимерен слой, или ковалентното му, т.е. с помощта на химически връзки, пришиване към подложка. При това подвижността му се ограничава, той не се отмива от биослоя и каталитичното му действие се запазва дълго.

В таблица 7.3 са показани преобразувателите използвани в биосензорите. Едни от тях генерират потенциал на специален електрод, на повърхността на който е нанесен слой биоматериал, други генерират електричен ток от реакцията на продукта на превръщането на определяемото вещество, при други се изменя поглъщането на светлината в областта на биослоя. Успехите в областта на микроелектрониката са подтикнали разработчиците да използват така наречената планарна технология (фотолитография, полупроводникова техника на покритие и др.), по която може да се изготви биочип, обединяващ сензорна система, трансдюсер, аналогово цифров преобразувател и микропроцесор.

биослой (биоло- гичен елемент на разпоз- наване)	{ <ul style="list-style-type: none"> <li>цели организми</li> <li>живи тъкани</li> <li>клетки</li> <li>органели</li> <li>мембрани на клетки</li> <li>ензими</li> <li>рецептори</li> <li>нуклеинови киселини</li> </ul>	физически преобра- зувател	{ <ul style="list-style-type: none"> <li>потенциометрични</li> <li>амперометрични</li> <li>импедансометрични</li> <li>оптически</li> <li>акустични</li> <li>топлини</li> <li>механични</li> </ul>
---	---	----------------------------------	---

Таблица 7.3: Типове чувствителни елементи и физически преобразуватели в биосензорите

Най-разпространеният понастоящем биосензор е амперометрическият биосензор за определяне на захарта в кръвта. В качеството на физически трансдюсер в него се използва така нареченият *електрод на Кларк*.

# Глава 8

## Моделиране на биологическите процеси

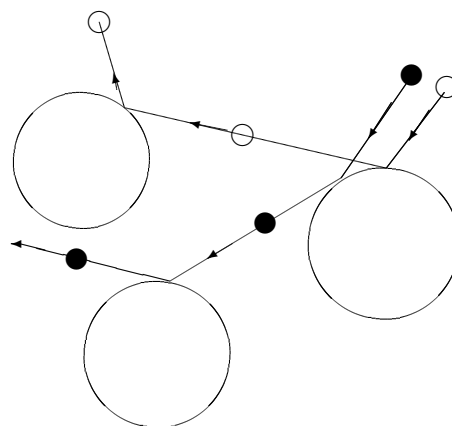
### 8.1 Системи, структури, самоорганизация

Почти всичко на този свят е изградено от елементи, които се намират във връзка помежду си и си взаимодействуват по някакви закони. Такава съвкупност от елементи си нарича *система*. Вътре в системата могат да съществуват различни структури. *Структурата* е видът на подреждане и свързване на определени елементи или връзки между тях. Съществуват най-различни структури – пространствени, времеви, функционални. *Структурообразуването* е процес, при който възниква нова структура в системата, а *организация* на системата е структурообразуване в резултат на външни въздействия. *Самоорганизация* е когато управляващите въздействия са част от самата система. Едни от най-изучените са термодинамичните системи. Ако една термодинамична система се изолира след известно време настъпва състояние на термодинамично равновесие и в нея се прекратяват макроскопичните изменения. Възникващата равновесна структура се нарича *консервативна*. Такива системи са неустойчиви – малка промяна на началните условия може да доведе до големи промени с времето.

Друг интересен клас структури са *дисперсивните*. Пример за такива системи са солитоните. Те представляват специални решения на нелинейните вълнови уравнения, които описват развитието на локализирани структури с голямо време на живот. Дисперсивните системи възникват в случаите, когато дисперсията се компенсира от нелинейност. За разлика от консервативните те не са произволно делими.

Повечето структури на този свят не са нито консервативни, нито дисперсивни. Живите организми представляват *дисипативни системи*. Те се разпознават по наличието на следните признаци :

1. Отвореност на системата и непрекъснат обмен на енергия и вещество с околната среда. По сложните системи могат да обменят със средата и информация.
2. Нелинейност на системата.
3. Способност за усилване на подходящите флуктуации.



Фигура 8.1: Неустойчивост на траекторията на малко топче, отразяващо се от големи топки.

4. Кооперативност на микропроцесите.

5. Възможност за достигане на критични стойности за неголям брой параметри, начало на експорт на ентропия.

Последното изискване е поставено в основата на *синергетиката*. Основната ѝ концепция е, че в системи състоящи се от много кооперативно взаимодействащи си подсистеми, могат да се появят макроскопични структури, които могат да се опишат с малко на брой параметри, наречени параметри на подреждане. Под кооперативно взаимодействие се разбира съвместно действие на много подсистеми, в резултат на което на макрониво възниква структура.

Оказва се, че колкото и да е сложна системата и съответният ѝ математически модел, от големият брой уравнения могат да се отделят няколко уравнения за малко на брой величини и от тях да се определят характерните за дадената система точки наречени *бифуркационни*. Под бифуркация се разбира броят и устойчивостта на на решенията на дадено диференциално уравнение.

Философите от векове се занимават с въпроса дали наистина сме свободни да избираме действията си. Сега проучванията в областта на генетиката, невронауката и еволюционната биология хвърлят нова светлина върху този въпрос. Поведението на прости животни като плодовите мушици обикновено се приема за силно детерминирано, включващо рефлексивни реакции на външни стимули. Изследването на моделите на летене на плодови мушици, поставени в бял барабан без визуални сигнали - за да се премахнат всички възможни стимули показва, че движението на мухите не е нито детерминирано, нито случайно, а носи математическите белези на хаотичните системи и е невъзможно да бъде предсказано. Неотдавна, през 2021 подобни признаци на хаос са открити в невроните, които управляват кога морските охлюви *Aplysia* започват да се хранят с водорасли. Подобни системи могат да действат и в човешкия мозък, когато вземаме решения. Ако е така, това не би доказало, че имаме свободна воля, но поне би опровергало аргумента, че при достатъчно информация би било възможно да се предвидят всички наши решения - не бихме могли да предвидим дори движенията на една плодова мушица.

### 8.1.1 Дисипативни системи

В биологията се срещаме с няколко типа явления, непосредствено свидетелстващи за нелинейността на съпътстващите ги процеси.

- Това са всички тригерни, прагови процеси, превключването на системата от едно състояние в друго, например генерацията на нервен импулс или мускулното съкращение.
- Поведението на клетките и организмите на всички нива се контролират и регулира, което се осъществява с помощта на обратни връзки, отсъстващи в линейните системи.
- На всички нива на организация – от макромолекулно до популационно, в биологичните системи протичат незатихващи колебания на характеристичните параметри.

- Биологичните системи от клетките до биосферата като цяло се изменят необратимо, еволюционират. Развитието означава възникване на нови структури, създаване на нова информация.

Математическата оптимизация чрез селекцията на най-добрия елемент според определен критерий - например максимално оградено пространство върху плоскост с използване на минимум материал се реализира както в неживата, така и в живата природа. Дисипацията (разсейването) на енергия в течности зависи от отношението на площта на клетката към обема ѝ (специфичната повърхност) – колкото е по-малко това отношение, толкова е по-малка дисипацията. Това се постига при шестостенната клетка. Поради тази причина, при нагряване, обемите на течности и газове се разбиват на *клетки на Бенар*. Образуването на шестостенни стълбовидни структури при базалти и гранити (фиг. 8.2а) е резултат от такъв процес.

Но и живите същества действат оптимално (фиг. 8.2б). Чарлз Дарвин смята, че пчелите строят пчелни пити съставени от шестоъгълници, тъй като тази форма произвежда най-големите клетки за съхранение на мед с най-малко количество енергия за производство на восък.



Фигура 8.2: а) Шестостенни структури при базалти и гранити.  
б) Шестоъгълни пчелни пити.

Термодинамическата основа на самоорганизацията в отворена система се състои в отток на ентропия в обкръжаващата среда. *Синергетиката* е област от физиката изучаваща такива процеси на организация каквито виждаме в космологията (образуване на галактики, звезди и планети), в атмосферата, в химията (*реакции от типа на Белоусов – Жаботински*) и във всички разнообразни биологични явления. За описание на тези системи е необходимо моделиране основано на динамически модели.

### 8.1.2 Автовълнови процеси

Системи, в които състоянието се променя в различните точки от пространството, а между отделни точки има „дифузни връзки“ или поток от вещества се наричат пространствено разпределени. В тях промяната на концентрацията на веществата във времето протича поради два процеса: химични трансформации, описани от „точкови“ кинетични модели и дифузия на вещества от области с високо концентрация към области с по-ниска концентрация. Всички биологични сис-

теми (активни мембрани, клетки и тъкани, общности на организми) принадлежат към класа на активните разпределени системи. Преобразуване на веществата и трансформация на енергия в тях произтичат в отделни елементарни обеми, които са свързани помежду си е дифузен пренос на материя.

Сред особените динамични явления в такива системи голямо значение има разпространението самовъздържащи се вълни на възбуждане, които запазват своите характеристики (амплитуда, период, форма, скорост) заради разпределени в околната среда на енергийни източници. Именно поради това свойство такива системи се наричат активни разпределени системи.

В биологичните системи ролята на разпределен източник на енергия, който поддържа разпространението на вълните, се изпълнява от определени биохимични вещества. Оказа се, че редица основни динамични свойства на биологичните системи са присъщи на тях поради факта, че те принадлежат към активните разпределени системи. Динамичните явления в активно разпределените системи е прието да се наричат автовълнови процеси (АВП), включващи цял клас пространствени ефекти (вълни на възбуждане в нервната тъкан, сърдечния мускул).

В химическите системи беше открит клас от процеси, по време на които се наблюдават почти всички основни видове АВП. Най-важната е реакцията на Белоусов - Жаботински – окислително-възстановителна реакция, включваща бромомалонова киселина, където цезиевите и манганови йони служат като катализатор. Промяната във валентността на тези йони води до локални промени в цвета на разтвора, което дава нагледен визуален начин за наблюдение на пространствените явления в реакционния съд.

В живите системи АВП са най-добре проучени в възбудимите мембрани на нервните влакна. В мрежите от неврони е показано разпространение на вълни на възбуждане, които са свързани с промени в извънклетъчната концентрация на йони  $K^+$  и  $Ca^{2+}$ . Вълните от електрически потенциали под формата на бягащи импулси се разпространяват през влакната на сърдечния мускул. Патологичните състояния тук възникващи под формата на аритмии и фибриляция (несинхронизирана мускулна активност) се определят от появата на автономни реверберационни вълнови източници.

Други видове АВП ясно се проявяват в процесите на морфогенезата (фиг.8.5) по време на тъканна диференциация. Материалната основа тук се състои от генетичните системи на биосинтеза на протеини и активен транспорт на вещества през клетъчните мембрани. В общността на организмите в някои случаи взаимодействието на клетките се осъществява посредством освободени вещества атрактанти (цикличен АМФ). Взаимното движение на клетките към източника на сигнали и тяхното агрегиране има вълнов характер. В ембрионалните структури този механизъм до голяма степен определя движението на клетките по време на формирането на тъканите. Основата на движението в стените на каналите на кръвоносните съдове, механичните движения на клетките по равна повърхност също са АВП.



## 8.2 Математически основи на динамиката на нелинейните процеси

### 8.2.1 Основни типове особенни точки

Методът за изучаване на биологична система чрез построяване на математически модел се състои в нейното описание чрез диференциални уравнения и изследване на тяхните решения. Общата форма на математическия модел има вида :

$$\begin{aligned} \frac{dx_1}{dt} &= f_1(x_1, \dots, x_N) \\ \dots & \dots \\ \frac{dx_N}{dt} &= f_N(x_1, \dots, x_N) \end{aligned}$$

където  $x_1, x_2, \dots, x_N$  са физическите променливи, характеризиращи системата, зависещи от времето и началните условия,  $f_1, f_2, \dots, f_N$  са в общия случай нелинейни функции на променливите.

Обичайният метод за изследване на нелинейни уравнения е в тяхната линеаризация. Търсят се стационарни значения на променливите  $x_1^0, x_2^0, \dots, x_N^0$ , а след това се изследват уравненията относно променливите  $x_i - x_i^0$  при малки отклонения относно стационарните значения. Ще покажем как се прави изследването на особените точки за системи от втори ред. Имаме две нелинейни диференциални уравнения :

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= a_1x + a_2y + X_2(x, y) \\ \frac{dy}{dt} &= b_1x + b_2y + Y_2(x, y), \end{aligned}$$

където  $X_2$  и  $Y_2$  са полиноми съдържащи членове от втори и по-висш порядък. Десните части на системата се нулират в началото на координатната система, следователно тази точка отговаря на стационарно състояние  $\dot{x} = 0, \dot{y} = 0$ . Ограничавайки се с линейно приближение имаме :

$$\frac{dx}{dt} = a_1x + a_2y, \quad \frac{dy}{dt} = b_1x + b_2y$$

Разделяме двете уравнения и получаваме за интегралните криви :

$$\frac{dy}{dx} = \frac{a_1x + a_2y}{b_1x + b_2y}$$

Търсим решения във вида :

$$x = Ae^{\lambda t}, \quad y = Be^{\lambda t}$$

Заместваме в горната система и получаваме еднородна система с две неизвестни  $A$  и  $B$ .

Тя има ненулево решение ако детерминантата е нула.

$$\begin{vmatrix} a_1 - \lambda & a_2 \\ b_1 & b_2 - \lambda \end{vmatrix} = 0$$

Получава се квадратно уравнение с два корена  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$ . Общото решение е:

$$\begin{aligned}x &= A_1 e^{\lambda_1 t} + B_1 e^{\lambda_2 t} \\y &= A_2 e^{\lambda_1 t} + B_2 e^{\lambda_2 t},\end{aligned}$$

където  $A_1, B_1, A_2, B_2$  се определят от началните условия.

Общата класификация на особените точки, дадена от Пуанкаре се основава на поведението на интегралните криви в близката околност на особената точка. Видът им е показан на фиг.8.3.

Ако дискриминантата  $D \geq 0$  то и двата корена са реални. В този случай :

1.  $\lambda_1, \lambda_2 < 0$ . Решението има вид на намаляващи с времето експоненти, т.е., отклонената от равновесното положение система се връща в него. Особената точка е от типа *устойчив възел*.

2.  $\lambda_1, \lambda_2 > 0$ . Системата се отдалечава от равновесието. Точката е *неустойчив възел*.

3. Ако двата корена имат различни знаци особената точка е неустойчива и се нарича *седло*. През нея минават две интегрални криви, наречени сепаратриси. Останалите фазови траектории отиват към безкрайност, заобикаляйки особената точка.

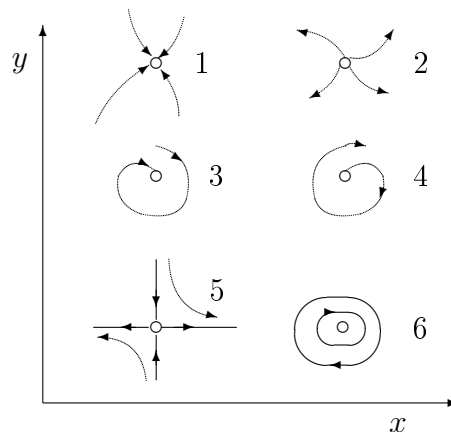
4. Ако единият от корените е нула, то не се получава особена точка, а права.

Ако  $D < 0$  то и двата корена са комплексно спрегнати. В този случай :

5. Ако реалните части на  $\lambda_1, \lambda_2$  са отрицателни, особената точка е от типа *устойчив фокус*.

6. Ако реалните части на  $\lambda_1, \lambda_2$  са положителни, особената точка е от типа *неустойчив фокус*.

7. Ако  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$  са чисто имагинерни, точката е от типа *център*.



Фигура 8.3: Типове особени точки. 1 – устойчив възел, 2 – неустойчив възел, 3 – устойчив фокус, 4 – неустойчив фокус, 5 – седло, 6 – център.

### 8.3 Моделиране на сгъването на белтъци с метода на молекулната динамика

Според известният физик Ричард Файнман, за да се разберат принципите на функциониране на живата материя, е достатъчно да се приеме, че “всичко е направено от атоми и всичко, което се случва в живия обект, може да бъде представено от гледна точка на трептения и премествания на атомите”. С други думи, познаването на динамичното поведение на една молекулна система ни позволява да хвърлим светлина върху механизма на нейното функциониране.

От гледна точка на физиката, най-правилното описание на еволюцията на една молекулярна система във времето е квантово-механичното представяне. Въпреки това, получаването на решение на уравнението на Шрьодингер, дори като се

вземе предвид съвременното ниво на компютърните технологии, е практически възможно само за атом на хелий, но не и за по-големи системи. Съществуват квантовомеханични подходи, които използват различни приближения и така наречените полуемпирични методи на квантовата химия, които обаче са също много трудоемки в случай на големи системи от атоми. В същото време има алтернативен начин - да се разгледа молекулната система от позицията на класическата механика. Той се основава на численото решение на уравненията на Нютон за набор от атоми:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} = -\vec{\nabla} U, \quad (8.1)$$

където  $U$  е потенциалната енергия, която има вида (4.1), стр. 51 с параметри като дължини на енергийни межатомни, валентни връзки, ъгли и др., получени експериментално или с помощта на методите на квантовата химия.

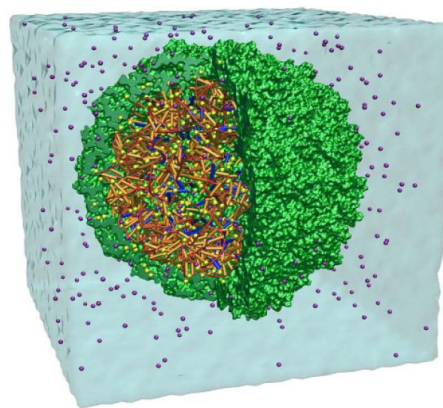
При синтеза на белтъците видяхме, че в резултат на трансляцията се получава само първичната структура, като за достигане на нативната форма на белтъка той трябва допълнителна да се сгъне (стр. 67). За да се разбере как става този процес и какви свойства има даден белтък се използва компютърно моделиране по *метода на молекулната динамика*. При този подход се смята, че отделните атоми са твърди топки, с известни сили на взаимодействие помежду им. При зададено начално положение и скорости цялото им движение може да се пресметне като се използват законите на класическата механика (8.1).

При численото решаване на съответните диференциални уравнения на движението се избира традиционно стъпка от 1 фемтосекунда.

Това позволява да се отчетат най-бързите атомни вибрации и да се избегнат грешките от дискретизацията. За всяка времева стъпка се изчислява преместването на всеки атом. Дори за малка протеинова молекула това дава много хиляди операции. Една наносекунда е милион времеви стъпки и десетки милиарди операции и всички те трябва да бъдат извършени, за да се симулира как структурата на протеина едва започва да се формира.

Още първата статия по тази тема, публикувана през 1977 г., съобщава за симулация на малка протеинова глобула на само за 9 пикосекунди (9000 стъпки). За толкова малко време не е възможно да се види никакво движение на протеина – в статията само се отбеляза, че някои атоми доста бързо оптимизират своето положение спрямо съседите.

Две години по-късно беше симулиран вече почти 100 пикосекундно разгъване на същата молекула. След това, с развитието на изчислителната мощност, времето за симулация и наличните молекулни размери нарастваха стабилно. През 90-те



Фигура 8.4: Моделиране на вирус на тютюнева мозайка във воден разтвор (P. Freddolino et al., 2006. “Molecular Dynamics Simulations of the Complete Satellite Tobacco Mosaic Virus”).

години бяха достигнати наносекунди, но това е все още недостатъчно за достигане на пълното сгъване на протеина. През 2000-те години вече беше постигнат диапазонът от наносекунди.

Пробив в тази област беше с използване на суперкомпютъри, специално създадени за моделиране на протеини. В статия от 2010 г бяха докладвани милисекундни симулации на няколко малки протеини наведнъж. За първи път изследователите наблюдаваха не само пълноценно сгъване на протеин, но също така, проследиха всички основни етапи от неговата еволюция - от оптимизирането на страничните вериги в пикосекундния диапазон до прехода между различни конфигурации на гръбнака на наносекундната скала. В допълнение към увеличаването на продължителността на симулацията, учените увеличават и обема, тоест те изучават поведението на много голям брой атоми, макар и за не толкова дълъг период от време.

И тук има впечатляващи постижения. Например през 2005 г в мащабното моделиране с повече от два милиона молекули са проследени 2 наносекунди от живота на рибозома, беше проследено как точно рибозомата извършва критични операции по време на декодирането на РНК, какво точно се в нея се завърта, в кой момент и каква е поредицата от тези действия. Година по-късно беше публикуван друг интересен пример: 50 наносекундна симулация на сателитен вирус на тютюнева мозайка във воден разтвор. Наред с други неща бяха проследени някои етапи от “физиологията” на вируса: потокът на вода в и извън капсидната обвивка, движението на йони вътре в капсида и прикрепването на магнезиевите йони към вирусната РНК и т.н.

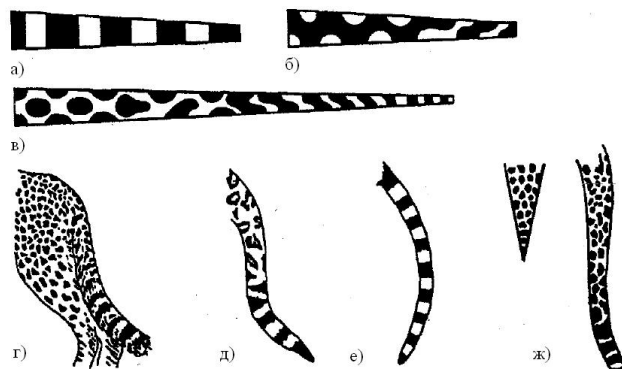
В този смисъл, можем да кажем, че животът, засега само в облика на вирус, стана достъпен за компютърно моделиране.

## 8.4 Моделиране на окраската на животни

Пионерът на информатиката Алън Тюринг е разработил през 50-те години на миналия век модел, в който има две молекули “активатор”, стимулиращ производството на пигмент, и молекула “инхибитор”, и тези две молекули се смесват в една и съща тъкан. Ако има два процеса, които действат (като активатор и инхибитор), винаги може да се получи като резултат периодичен модел. Моделът на Тюринг описва всякакъв растеж на биологичните системи, при които размножаващите се на едно място клетки се разпространяват (дифундират) в съседните области. Ето как той обяснява окраската на животните.

Още в ранния зародиш кожата на леопарда (или тигъра, зебрата, жирафа ...) се покрива с равномерно смеланоцити (клетки пигмент). Тези клетки могат да са ведно от двете състояния: различаваща се (D) и неразличима (U). Цветът се произвежда само в D-клетките. Освен това, D-клетките отделят два морфогена: активатор (A) и инхибитор (I) - обратното на активатор. Двата химикала се разпръскват от всяка D-клетка и тяхната концентрация намалява с отдалечаване от D-клетката. A-концентрацията е най-голяма около D-клетката, но отслабва по-бързо от I-концентрацията. Така наизвестно разстояние от D-клетката, I-концентрацията започва да превишава A-концентрацията от тази клетка. Всяка клетка постоянно се изпълва с A и I морфогени от всички съседни D-клетки. Ако

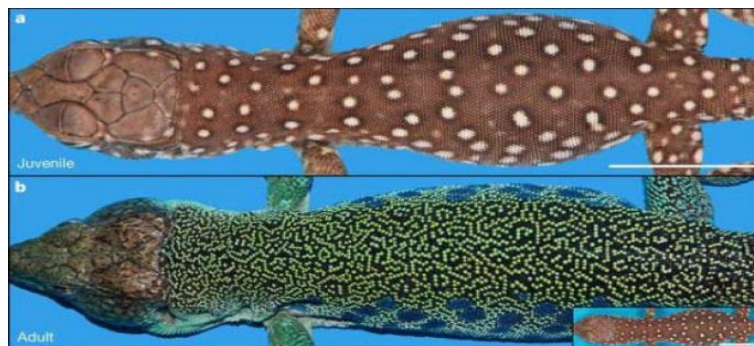
в U-клетката, A-концентрацията превишава I-концентрацията, клетката става D и започва сама да отделя морфогени. Ако в D-клетката, I-концентрацията превишава A-концентрацията, клетката става U и престава да произвежда морфогени. Смята се, че еволюцията на окраската на животинските кожи е форма на самоорганизация на D-клетките и произтича от току-що описаните химически цикли. Благодарение на този механизъм, за да се предава по наследство окраската на кожата е необходимо да се предава само специфичната за вида концентрация на инхибитора.



Фигура 8.5: Примери на резултатите от моделиране (а – в) и естествената окраска (г – ж) на опашката на ягуар.

Тюринг публикува изследванията си през 1952г., но първото експериментално потвърждение на идеите му става през 1998г. Следват серия от други доказателства и днес статията Тюринг вече се е превърнала в класика.

В някои случаи е възможно по-просто моделиране на окраската. Всяка люспичка на гуцера *Timon lepidus*, влечуго, срещано се в Югозападна Европа, може да бъде зелена или черна (фиг. 8.6). Докато гуцерът става все по-възрастен, отделните люспи се променят от един цвят в друг, като в крайна сметка образуват змиеста, лабиринтна мозайка в зряла възраст. Търсейки по-просто описание е предложен модел, подобен на антиферромагнитния модел на Изинг, при който атомите или молекулите в материала се преобръщат, така че съседните частици да имат противоположни спинови състояния.



Фигура 8.6: Оцветяване на гуцера *Timon lepidus* а) младо животно, б) възрастно. S. Zakany, “Lizard skin patterns and the Ising model”, *Phys. Rev. Lett.* 128, 2022.

Този модел точно отразява начина, по който люспите на гуцера *Timon lepidus* променят цвета си с течение на времето. Той пресъздава еволюцията във време-

то на цветовете на люспите, лабиринтният характер на техните крайни окраски и преобладаващия баланс на зелени и черни люспи. В модела тенденцията на люспите да избягват да бъдат от същия цвят като твърде много от съседите им е аналогична на взаимодействието между спиновете в антиферромагнетика, докато външно принудително въздействие, аналогично на магнитно поле, генерира леко предпочитание към черните пред зелените люспи.

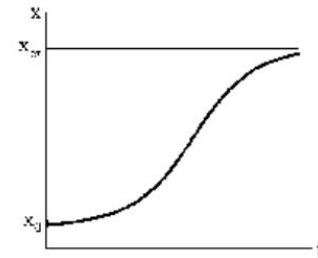
## 8.5 Някои прости модели

### 8.5.1 Модел на Малтус

Това е модел на естествения прираст, при който се предполага, че има само една популация, в която няма борба за храна и хищници. Да означим с  $x$  броят на членовете на популацията (микроорганизми, зайци, хора) в момента  $t$ . Скоростта  $\frac{dx}{dt}$ , с която се променя популацията е пропорционална на броят им в този момент – характеризира се с константата  $a$ , свързана с размножаването, а константата  $b$  характеризира смъртността.

$$\frac{dx}{dt} = ax - bx = (a - b)x \quad (8.2)$$

Очевидно решението е експоненциално  $x = e^{kx}$ , като в зависимост от знака на  $k = a - b$  има или експоненциален ръст (при  $k > 0$ ) или намаляване на популацията (при  $k < 0$ , когато смъртността преобладава над раждаемостта). При  $k = 0$  броят остава постоянен.



Фигура 8.7: Изменение на популацията с отчитане на конкуренцията.

### 8.5.2 Модел на Ферхюлст

В този модел също се разглежда само една популация, но се отчита конкуренцията между членовете ѝ. За целта в уравнение (8.2) се добавя още един член, отчитащ конкуренцията:

$$\frac{dx}{dt} = ax - bx - cx^2 = kx - cx^2 \quad (8.3)$$

Това е нелинейно диференциално уравнение, което се интегрира непосредствено и има решение:

$$x = \frac{kx_0}{(k - cx_0)e^{-kt} + cx_0},$$

като в началния момент  $x = x_0$ . Вижда се, че за разлика от модела на Малтус, ръстът на популацията е ограничен и достига стационарно състояние при  $x = k/c$  (фиг. 8.7).

Тези два модела са в основата на моделирането на процесите в биотехнологиите (например за установяване на оптималните режими за израстване на различни микроорганизми).

### 8.5.3 Модел на Лотка–Волтера

През 1920г. Лотка е разработил модел на автокаталитична химична реакция, а през 1930г. Волтера е предложил моделът "хищник – жертва". И двата модела се описват с едни и същи диференциални уравнения, затова говорим за модела на Лотка–Волтера. За взаимоотношения от типа хищник – жертва или паразит – гостоприемник системата уравнения приема вида:

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= a_1x - b_{12}xy \\ \frac{dy}{dt} &= -a_2y + b_{21}xy,\end{aligned}$$

тук с  $x$  е означен броят на жертвите, а с  $y$  броят на хищниците. Жертвите обитават ограничен ареал, с неограничено количество храна. Хищниците се хранят само с жертвите. Константата  $a_1$  характеризира размножаването на жертвите,  $a_2$  на естествената гибел на хищниците, константата  $b_{12}$  е свързана с гибелта на жертвите в резултат на среща с хищници, а  $b_{21}$  е константа характеризираща размножаването на хищниците, свързана с броя на жертвите.

Това е сложна система нелинейни диференциални уравнения. Стационарното ѝ състояние се определя от  $\frac{dx}{dt} = 0$ , и  $\frac{dy}{dt} = 0$ . Да ги означим с  $x_s$  и  $y_s$ . Да предположим, че са станали малки отклонения  $u$  и  $v$  от стационарното състояние:

$$\begin{aligned}x &= x_s + u \\ y &= y_s + v\end{aligned}$$

Заместваме и като пренебрегнем членовете от втори и по-висок порядък получаваме:

$$\begin{aligned}\frac{du}{dt} &= -b_{12}x_s v \\ \frac{dv}{dt} &= b_{21}y_s u,\end{aligned}$$

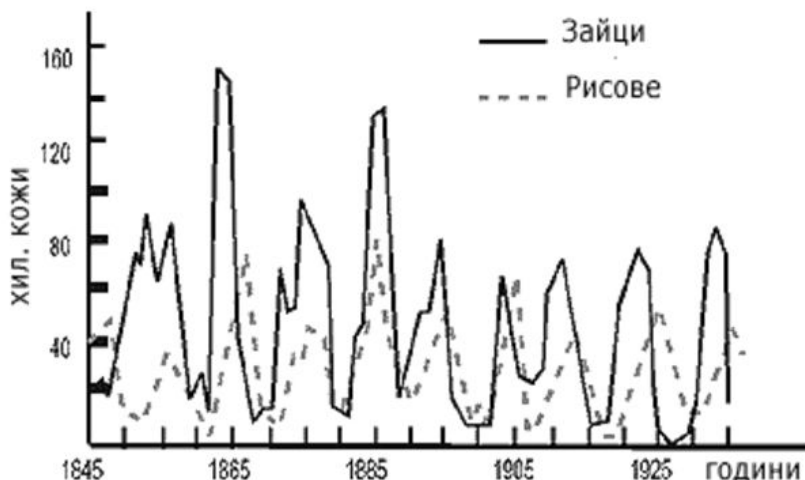
които се свеждат до диференциалното уравнение на хармоничния осцилатор за  $u$  и  $v$  с кръгова честота  $\omega^2 = b_{12}b_{21}$ , с решения:

$$\begin{aligned}u &= u_m \cos \omega t \\ v &= v_m \cos(\omega t + \phi_0)\end{aligned}$$

Вижда се, че системата жертва–хищник изпитва хармонични колебания около равновесното положение.

На фиг.8.8 са показани данните за добитите кожи на зайци и рисове в Канада от 1845 до 1935. Ясно се вижда периодичния характер на изменение на броя на хищниците и жертвите, както и отместването по фаза между тях. Разбира се, реалния случай на територията на Канада има повече от два животински вида, така, че моделът е твърде прост, но въпреки това е адекватен на действителността.

Трябва да отбележим, че тази система описва и автокаталитичната реакция на Белоусов – Жаботински, което още веднъж доказва единството между законите, управляващи живата и нежива природа.



Фигура 8.8: Численост на популациите на зайците и преследващите ги рисове в Канада, съгласно данните на компанията за кожи "Хъдсън-Бей".

#### 8.5.4 Фармакокинетичен модел

Този модел се използва за описание кинетиката на изменение на концентрацията на въведен в организма лекарствен препарат. Представяме си организма като система с обем  $V$ , в който след въвеждането на лекарствен препарат с маса  $m_0$  започва отделянето му от организма.

Разпределението му се смята за равномерно, а скоростта на отделянето е пропорционална на масата. Нека предположим, че лекарството се въвежда:

1. Еднократно – тогава, уравнението, което описва кинетиката на процеса е:

$$\frac{dm}{dt} = -km$$

Законът, по който намалява концентрацията е експоненциален (фиг.8.9 а) е

$$c = \frac{m_0}{V} e^{-kt}$$

2. Непрекъснато въвеждане на препарата с постоянна скорост  $Q$ . В този случай уравнението е:

$$\frac{dm}{dt} = Q - km$$

Решението за концентрацията (фиг.8.9 б) е:

$$c = \frac{Q}{kV} (1 - e^{-kt})$$

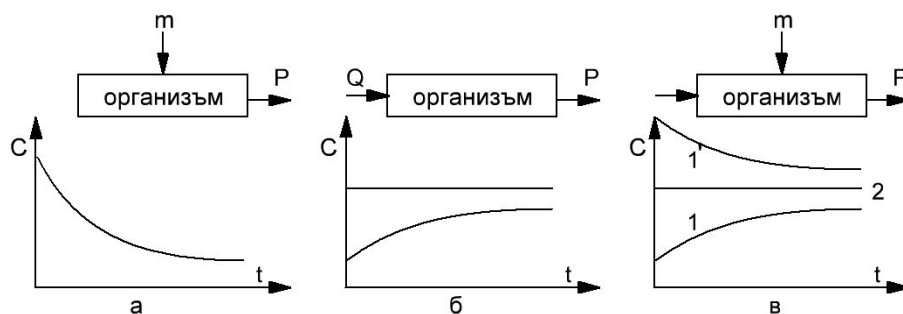
В организма се установява постоянна концентрация  $c = \frac{Q}{kV}$ . Подбирайки скоростта на въвеждане на лекарството може да се достигне необходимата концентрация.

3. Съчетание от двата начина – непрекъснато вкарване с бързо еднократно вкарване. Тогава концентрацията ще се мени по закона:

$$c = \frac{Q}{kV} - \frac{1}{V} \left( \frac{Q}{k} - m_0 \right) e^{-kt}$$



Графиката е показана на фиг.8.9 в) с кривите 1, 1' и 2. Като се избераат скоростта  $Q$  и натоварващата доза  $m_0$ , така че ако  $m = \frac{Q}{k}$  постоянната концентрация се установява много бързо.



Фигура 8.9: Фармакокинетични модели за различни начини на вкарване на лекарството: а) еднократно, б) непрекъснато, в) комбинирано.

### 8.5.5 Модел на Кермак–Маккендрик (SIR модел)

Моделирането на разпространението на инфекциозни заболявания е инструмент, който на основата на изследването на епидемичния механизъм позволява прогнозиране на нови огнища на болестта и оценка на стратегията за борба с нея. В първоначалната работа от 1927 г. Кермак и Макендрик разделят цялото население на три групи:

- $S(t)$  - податливи на инфекция, но все още не е заразени в момента (Susceptible persons);
- $I(t)$  - заразени индивиди, способни да предават инфекцията на чувствителни към нея лица (Infected persons);
- $R(t)$  - всички, които са се излекували и са придобили имунитет, които вече не са в състояние да се разболеят или предадат инфекцията или са мъртви (Removed persons).

Този модел се нарича SIR - според първите букви на английските имена на групите, на които е разделено населението. Моделът е предложен за обяснение на разпространението на болести като чума и холера. Моделът предполага, че скоростите на инфекция и възстановяване значително надвишават скоростите на раждаемост и смъртност, поради което те се игнорират в модела.

$$\begin{aligned}
 \frac{dS}{dt} &= -\frac{\beta}{N}SI \\
 \frac{dI}{dt} &= \frac{\beta}{N}SI - \gamma I \\
 \frac{dR}{dt} &= \gamma I
 \end{aligned}
 \tag{8.4}$$

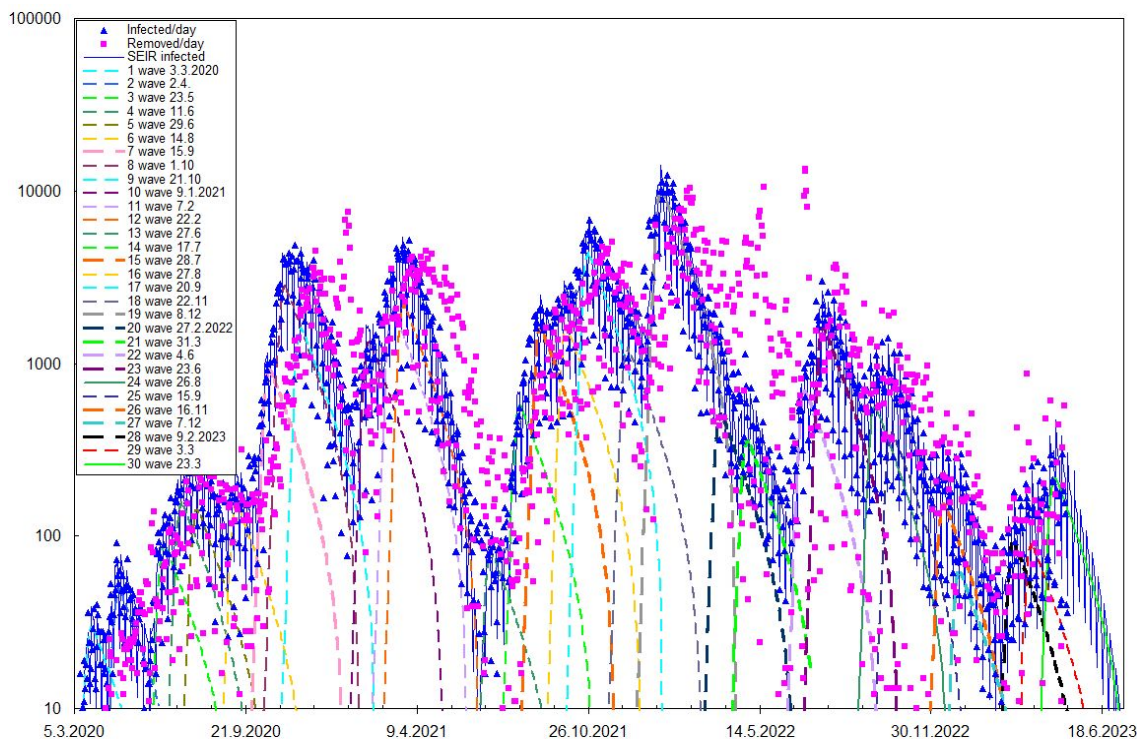
Тук  $\beta$  е честотата на контактите между индивидите, а  $1/\gamma$  е средната продължителност на инфекциозния период.

Като съберем трите уравнения получаваме  $\frac{dS}{dt} + \frac{dI}{dt} + \frac{dR}{dt} = 0$ , което означава, че общият брой  $S + I + R = N$  е постоянен.

### 8.5.6 SEIR модел на епидемията от коронавирус в България

За разлика от предишния, в SEIR модела се въвежда една допълнителна променлива  $E$  (от Exposed), която отчита наличието на инкубационен период – това е броят на заразилите се, но все още не проявили симптоми. Допълнителният параметър  $\alpha$  отчита времето на инкубационния период. Общият брой  $S + E + I + R = N$  е постоянен.

$$\begin{aligned}\frac{dS}{dt} &= -\frac{\beta}{N}SI \\ \frac{dE}{dt} &= \frac{\beta}{N}SI - \alpha E \\ \frac{dI}{dt} &= \alpha E - \gamma I \\ \frac{dR}{dt} &= \gamma I\end{aligned}\tag{8.5}$$



Фигура 8.10: Динамика на заразените (Infected) и на оздравелите+починалите (Removed) от COVID19 в България за периода 8.3.2020 – 8.6.2023г.

Отново се смята, че заболяването протича толкова бързо, че може да се пренебрегне раждаемостта и естествената смъртност в популацията. На фиг.8.10 са

показани данните за трите години от развитието на епидемията от коронавирус в България. Броят инфектирани (Infected) е означен със сини триъгълници, а броят оздравели плюс починали (Removed) е означен с червени квадратчета. Данните са взети от сайта [32].

Сините криви на графиката съответстват на броят инфектирани пресметнати според SEIR модел с 30 вълни на епидемия - първата започва на 1.3.2020 г., а последната на 8.6.2023. Червените криви съответстват на броят на оздравелите плюс починалите (Removed) пресметнати по същия модел. Непрекъснатите криви са получени като сума от всички вълни на епидемия. Параметрите  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  са еднакви за всички вълни на модела. Те са разгледани като свободни и са подбрани така, че моделът да описва най-добре публикуваните данни [32]. Като свободни параметри са третирани и общият брой  $N$  хора засегнати от всяка вълна и датата на началото на всяка вълна – общо  $30 \cdot 2$  свободни параметъра. Трябва да се вземе предвид, че не всички случаи на заболели и излекувани се регистрират. За да отчетем този ефект в модела въвеждаме още 51 параметъра, който отчита каква част от излекуваните са представени в статистиката през различните месеци, оказва се, че това са около 50%. За да направим тази смяна плавна използваме логистична крива с 2 параметъра – за положението и наклона на тази крива. По този начин броят на свободните параметри стават  $4 + 2 \cdot 30 + 51 + 2 = 117$ . Фитирането на данните е извършено с програмата MINUIT. На графиката е отразена дневната динамика на общият брой инфектирани и общият брой на оздравелите плюс починалите.

Часть II  
Упражнения

## 1.1 Определяне на динамичния вискозитет на течности по метода на Оствалд

При относителното движение на пластове на една реална течност един спрямо друг (ламинарно течение) възникват сили насочени против движението, наречени сили на вътрешно триене (вискозитет).

### Теоретична част

Законът на Нютон за силата на вътрешно триене при ламинарно течение (ако пластове на течността се хлъзгат един спрямо друг без да се смесват) е:

$$F = \eta S \frac{\Delta v}{\Delta z},$$

където коефициентът на вътрешно триене  $\eta$  се нарича динамичен вискозитет и е величина, зависеща от естеството на течността и температурата;

$S$  е площта на пластове, между които действа силата  $F$ ;

$\frac{\Delta v}{\Delta z}$  е градиентът на скоростта (изменението на скоростта  $\Delta v$  на разстояние  $\Delta z$  в посока, перпендикулярна на скоростта на движение на пластове).

Законът на Нютон е в сила за системи, които нямат вътрешна структура (чисти течности, истински разтвори). Такива течности се наричат нютонови. Разтворите на високомолекулни съединения, гелове, суспензии и емулсии имат променлив вискозитет в зависимост от скоростта на течността и от условията на експеримента. Такива течности се наричат ненютонови. Наличието на структура в тези системи изисква допълнителни усилия за унищожаването ѝ.

За ламинарно протичане на течност през цилиндрична тръба е в сила законът на Хаген-Поазьой:

$$V = \frac{\pi r^4}{8 l \eta} (p_1 - p_2) t, \quad (1.6)$$

където  $V$  е обемът на течността, която протича за време  $t$ ;

$p_1$  и  $p_2$  са наляганията на течността в две напречни сечения на тръбата;

$l$  е разстоянието между тези сечения;

$r$  е радиусът на тръбата;

$\eta$  е динамичният вискозитет на течността.

Вискозиметърът на Оствалд представлява U-видна стъклена тръба с разширение в долния край на едното коляно. Другото коляно представлява капилярка, свързана с разширение и по-малко резервно разширение. Разширението е ограничено от два белега – m и n (фиг.7.4, стр.105).

За определяне на динамичния вискозитет на една течност се използва закона на Хаген-Поазьой (1.6), като се сравнява с вискозитета на позната течност (вода). В случая разликата в наляганията  $p_1$  и  $p_2$  е:

$$p_1 - p_2 = \rho g h,$$

където  $\rho$  е плътността на течността;

$g$  е земното ускорение;

$h$  е средното разстояние между нивата на течността в двете колена в началото и края на опита.

Нека  $\rho_0$  и  $\rho$  са плътностите, а  $t_0$  и  $t$  са времената на изтичане, съответно на водата и изследваната течност. Като се има предвид, че  $V$  и  $h$  остават едни и същи за двете течности, следва, че

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{\rho t}{\rho_0 t_0} \quad (1.7)$$

## Експериментална част

I. Приготвят се 100 ml едномоларни разтвори.

Разтвор	M, g/mol
1M NaCl	
1M NH <sub>4</sub> Cl	
1M CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	

II. Определяне плътността на разтворите с пикнометър.

1. С помощта на аналитична везна се измерва масата  $m = (m \pm \Delta m)$  на сухия пикнометър заедно със запушалката, като  $\Delta m$  е точността на везната.

2. Пикнометърът се напълва с дестилирана вода и се поставя запушалката. Част от течността трябва да излезе през капилярката му.

3. Напълненият пикнометър се поставя във водна баня, която има температура 1-2 градуса над стайната.

4. След като пикнометърът се темперира, се изважда от водната баня, с филтърна хартия се избърсва отвън и се нагласява нивото на течността в капилярката до белега.

5. Измерва се масата  $m_1$  на пикнометъра, пълен с дестилирана вода.

6. Повтаря се същата процедура с изследваната течност. Нека масата на пикнометъра, пълен с изследваната течност, е  $m_2$ .

Разтвор	$m_{1i}$	$m_{2i}$	$\rho_i$
1M NaCl			
1M NH <sub>4</sub> Cl			
1M CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O			

7. Пресмята се масата на дестилираната вода  $m' = m_{1i} - m$ .

8. Определя се масата на изследваната течност  $m''_i = m_{2i} - m$ .

9. Изчислява се плътността на изследваната течност по формулата

$$\rho_i = \frac{m''_i}{m'} \rho_0 = \frac{m_{2i} - m}{m_{1i} - m} \rho_0$$

където  $\rho_0$  е плътността на водата при температурата на опита.

III. Определяне динамичния вискозитет на разтворите по метода на Оствалд.

1. Във вискозиметъра се налива дестилирана вода с определен обем и се всмуква над белега п.
2. Измерва се времето  $t_0$  за изтичането ѝ през разширението 2 от белег до белег. Правят се 3 измервания  $t_{01}, t_{02}, t_{03}$  на времето на изтичане.
3. Намира се средната им аритметична стойност  $\bar{t}_0$ .
4. Във вискозиметъра се налива същият обем от съответната изследвана течност.
5. Определя се времето за изтичането  $t_i$ .
6. Правят се по 3 измервания за  $t_i$  и се намира средно аритметична стойност  $\bar{t}$ . Резултатите се нанасят в таблица.

	1M NaCl	1M NH <sub>4</sub> Cl	1M CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O
1.			
2.			
3.			
$\bar{t}$ , s			
$\eta$ , Pa.s			

7. Пресмята се динамичният вискозитет на изследваната течност по формулата:

$$\eta = \frac{\rho_i \bar{t}}{\rho_0 t_0} \eta_0.$$

Динамичният вискозитет  $\eta_0$  на водата се взема от таблица при температурата на опита.

## Въпроси

1. Какво явление характеризира вискозитета?
2. Какво явление се описва от законът на Хаген-Поазбой?
3. Газовете имат ли вискозитет?
4. Коя течност по-бързо се излива от бутилка - водата или олиото? Защо?
5. Според вас, коя течност има по-голям вискозитет - водата или олиото? Коя от тях има по-голяма плътност?
6. Какво се измерва с пикнометър?

## 1.2 Изследване на зависимостта на коефициента на повърхностното напрежение от температурата

В твърдите тела движението на молекулите е силно ограничено – те могат да трептят само около равновесните си положения. По-свободни са молекулите в течностите, взаимодействието помежду им е по-слабо, което позволява движението им.

### Теоретична част

Междумолекулните сили в течността бързо намаляват и могат да се пренебрегнат на разстояние  $r$ , наречено радиус на молекулно действие, а сферата с радиус  $r$  се нарича сфера на молекулно действие.

На всяка молекула във вътрешността на течността на разстояние от повърхността  $d > r$  действат всички молекули, намиращи се в сферата на молекулно действие, и действието им се уравновесява, т. е. резултантната сила  $F = 0$ . За молекула на разстояние от повърхността  $d < r$  равнодействащата сила е отлична от нула и насочена перпендикулярно на повърхността към вътрешността на течността. Това обуславя т. н. кохезионно налягане.

При преминаване на молекула от вътрешността в повърхностния слой се извършва работа срещу кохезионното налягане (фиг.1.11) и се увеличава потенциалната енергия. Следователно, повърхностният слой на течността с площ  $S$  притежава допълнителна енергия  $W$ , наречена повърхностна енергия.

Отношението

$$\sigma = \frac{W}{S},$$

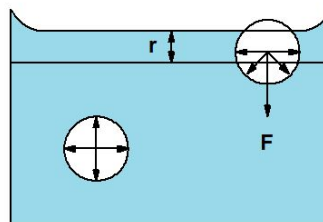
което показва каква част от тази енергия се пада на единица площ от повърхностния слой, се нарича коефициент на повърхностно напрежение (или специфична повърхностна енергия). Коефициентът  $\sigma$  зависи от температурата, вида на течността, естеството на средата с която тя граничи и примесите.

Коефициентът на повърхностно напрежение може да се дефинира и като работа, необходима за изотермично увеличаване на свободната повърхност на течността с единица:

$$\sigma = \frac{dA}{dS} = \frac{F}{L}$$

или като силата на повърхностно напрежение, която действа на единица дължина, допирателно към повърхността на течността и перпендикулярно на тази дължина.

Коефициентът на повърхностно напрежение  $\sigma$  в SI се измерва в единици  $\text{J/m}^2$ .



Фигура 1.11: Произход на повърхностното напрежение.



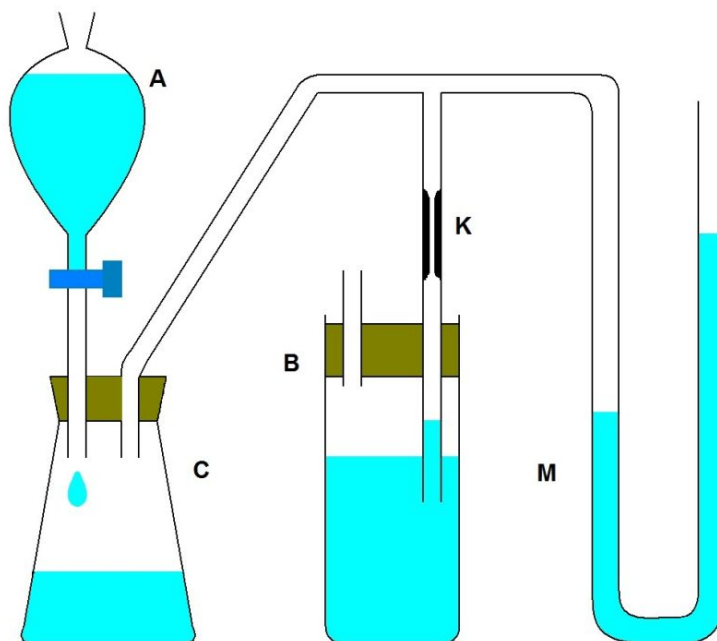
## Експериментална част

I. Приготвяне на разтвори за анализ.

Приготвят се 20 g от съответните разтвори.

Концентрация, %	Спирт, g	Вода, g
5		
10		
20		
40		
80		

II. Определяне на константата на капилярката.



Фигура 1.12: Схема на опитната постановка за измерване на повърхностното налягане. А - аспиратор, В - епруветка, С - съд, К - капилярка, М - манометър.

1. Капилярката се нагласява така, че да допира повърхностния слой на течността (дестилирана вода). Малко стълбче течност навлиза в капилярката (фиг.1.12).

2. Завърта се кранът и се пуска водата от аспиратора да изтича бавно. Налягането в съда С и капилярката нараства, а водното стълбче намалява постепенно, докато от капилярката започнат да излизат мехурчета. (Това става, когато разликата между атмосферното налягане и повишеното налягане в капилярката стане равна на повърхностното налягане.)

3. Отчита се по манометъра разликата  $H_0$  в нивата на водата в двете колена. Правят се 3 измервания:  $H_{01}$ ,  $H_{02}$ ,  $H_{03}$ .

4. Намира се средната аритметична стойност  $\bar{H}_0$ .

5. В момента на излизане на мехурчетата коефициентът на повърхностно напрежение  $\sigma$  е пропорционален на разликата  $H$ .

$$\sigma = aH,$$

където  $a$  е коефициент на пропорционалност, който зависи от радиуса на капилярката  $r$ .

6. За дестилираната вода  $\sigma_0$  се взема от таблица при съответната температура и така се определя коефициента на пропорционалност  $a$ .

$$a = \frac{\sigma_0}{\bar{H}_0}$$

II. Изследване зависимостта на коефициента на повърхностно напрежение от концентрацията на спиртен разтвор при стайна температура.

1. По описания по-горе начин се правят по 3 измервания за  $H_i$  и се намира средната аритметична стойност  $\bar{H}_i$  за всеки от спиртните разтвори, и резултатите се нанасят в таблица.

	$C_1 = 5\%$ $H, \text{ mm}$	$C_2 = 10\%$ $H, \text{ mm}$	$C_3 = 20\%$ $H, \text{ mm}$	$C_4 = 40\%$ $H, \text{ mm}$	$C_5 = 80\%$ $H, \text{ mm}$	$C_x = x\%$ $H, \text{ mm}$
1.						
2.						
3.						
$\bar{H}, \text{ mm}$						
$\sigma, \text{ N/m}$						

2. За пресмятане на  $\sigma$  се използва определената по-горе константа  $a$ .

$$\sigma = a\bar{H} = \frac{\sigma_0}{\bar{H}_0} \bar{H}$$

3. От получените стойности се чертае графика на зависимостта  $\sigma = f(C)$ .

4. От графиката се определя концентрацията на неизвестен разтвор  $C_x$ , на който е изчислен коефициентът на повърхностно напрежение  $\sigma_x$ .

## Въпроси

1. Какво е това "радиус на молекулно действие"?
2. Какво наричаме "кохезионно налягане"?
3. Дефинирайте величината "коефициент на повърхностно напрежение".
4. Как се обяснява наличието на повърхностно напрежение при течностите?
5. Какво представлява капилярката?
6. Какво мерим с U-виден манометър?

### 1.3 Изследване на дифузията на капка туш във вода с използване на компютър и WEB камера

Дифузията е физичен процес при който се пренася вещество при наличието на градиент на концентрацията. Той играе важна роля при много биологични явления.

Опитната постановка се състои от компютър с WEB камера, закрепена на статив, така, че да снима процеса на дифузия в Петриева чаша пълна с вода. Целта на упражнението е наблюдава дифузията, която се получава след капването на капка туш, като всяка секунда се заснема положението на полученото петно и накрая се пресмята на коефициента на дифузия.

#### Теоретична част

Процесът на дифузия се описва с диференциалното уравнение:

$$D \left( \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \right) = \frac{\partial C}{\partial t}, \quad (1.8)$$

където  $D$  се нарича коефициент на дифузия, а  $C(x, y, z, t)$  е концентрацията.

При капване на мастило в плитка чаша пълна с вода се наблюдава как капката пада на дъното и след това образувалото се кръгче започва да увеличава размера си. В този случай процесът на дифузия може да се разглежда като двумерен, тъй като петното е на дъното и дифузията протича по него, т.е. в една равнина.

Разглеждаме двумерното уравнение на дифузията

$$D \left( \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} \right) = \frac{\partial C}{\partial t} \quad (1.9)$$

Началното условие е :

$$C_0(r) = \begin{cases} C_0 & r \leq a \\ 0 & r > a \end{cases}$$

Тук  $C_0$  е концентрацията в началния момент, която смятаме за постоянна в рамките на кръг с радиус  $a$ .

Представяме концентрацията като интеграл на Фурие [34] :

$$C(r, t) = \int C_k(t) e^{i\vec{k} \cdot \vec{r}} \frac{d^2 k}{(2\pi)^2} \quad (1.10)$$

$C_k(t)$  се дава с обратното преобразуване :

$$C_k(t) = \int C(r, t) e^{-i\vec{k} \cdot \vec{r}} d^2 k \quad (1.11)$$

Заместваме в уравнението на дифузията (1.9) и получаваме за Фурие коефициентите :

$$\frac{dC_k}{dt} + Dk^2 C_k = 0,$$

с решение :

$$C_k(t) = C_{0k} e^{-Dk^2 t}$$

Същата функция ще получим, като положим  $t = 0$  в уравнение (1.11), затова получаваме, че :

$$C_{0k} = \int C_0(r') e^{-i\vec{k} \cdot \vec{r}'} d^2 r' \quad (1.12)$$

Заместваме в (1.10) и получаваме :

$$C(r, t) = \int C_0(r') e^{-Dk^2 t} e^{i\vec{k} \cdot (\vec{r} - \vec{r}')} \frac{d^2 k}{(2\pi)^2} d^2 r' \quad (1.13)$$

Интегралът по  $k$  се разбива на произведение от 2 интеграла от вида :

$$\int_{-\infty}^{+\infty} e^{-\alpha k^2} \cos(\beta k) dk = \left(\frac{\pi}{\alpha}\right)^{1/2} e^{-\beta^2/4\alpha}$$

(sin като нечетна функция изчезва при интегрирането).

$$C(r, t) = \frac{1}{4\pi Dt} \int C_0(r') e^{-\frac{(\vec{r} - \vec{r}')^2}{4Dt}} d^2 r' \quad (1.14)$$

Минаваме в полярни координати и получаваме :

$$C(r, t) = \frac{C_0 e^{-r^2/4Dt}}{4\pi Dt} \int_0^a e^{-\frac{r'^2}{4Dt}} r' dr' \int_0^{2\pi} e^{-\frac{rr' \cos \theta}{2Dt}} d\theta \quad (1.15)$$

Във формула (1.15) можем да заместим с Беселовата функция  $I_0$

$$2I_0\left(\frac{rr'}{2Dt}\right) = \int_0^{2\pi} e^{-\frac{rr' \cos \theta}{2Dt}} d\theta$$

и ще получим резултата цитиран в [35] :

$$C(r, t) = \frac{C_0 e^{-r^2/4Dt}}{2\pi Dt} \int_0^a e^{-\frac{r'^2}{4Dt}} I_0\left(\frac{rr'}{2Dt}\right) r' dr' \quad (1.16)$$

Решението може да се запише в безразмерни променливи, като положим  $\tau = \frac{Dt}{a^2}$   
и  $\rho = \frac{r}{a}$

$$C(\rho, \tau) = \frac{C_0}{2\tau} e^{-\frac{\rho^2}{4\tau}} \int_0^1 e^{-\frac{x^2}{4\tau}} I_0\left(\frac{\rho x}{\tau}\right) x dx \quad (1.17)$$

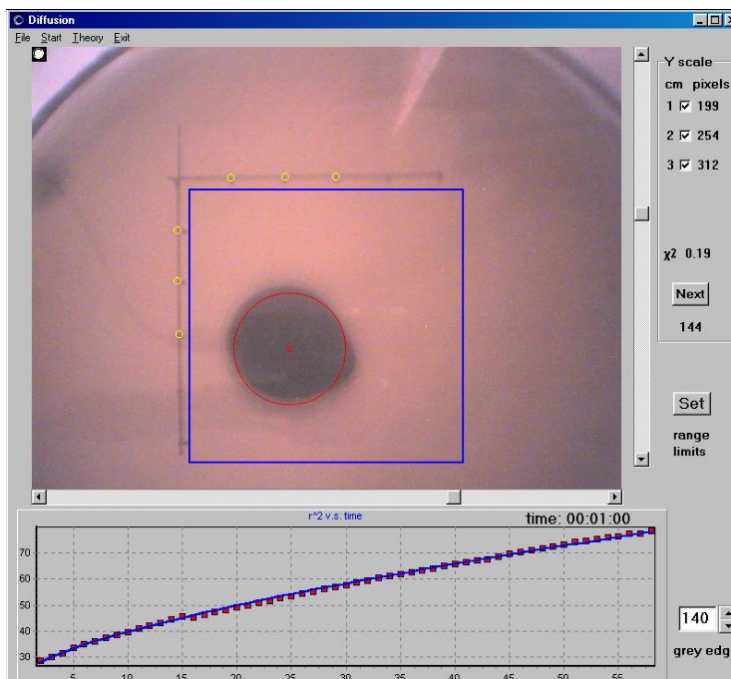
Границата на разширяващото се кръгче може да се определи като решение на уравнение (1.16) при  $C/C_0 = 0.001$ . Радиусът на петното  $r$  в произволен момент може да се изчисли като се реши уравнението:

$$\frac{C}{C_0} = 0.001 \quad (1.18)$$

## Експериментална част

Над петриева чаша пълна с вода, е поставена WEB камера, прикрепена за статив и включена към компютър [36]. За управлението ѝ се използва програма написана на DELPHI Object Pascal. След пускането на капка туш програмата се стартира и започва през 1 секунда да прави снимки с разрешение 640x480 пиксела.

След заснемането, получената снимка се сканира пиксел по пиксел, като цветът на всеки пиксел се трансформира към сиво. Преброяват се пикселите вътре в зададена област (на фиг.1.13 тя е оградена от син квадрат), които имат сивота по-голяма от предварително зададена стойност (на фиг.1.13 това е 140). Степента на сивота отговаря на определена концентрация - по този начин ние определяме границата на петното. Получената сума е пропорционална на площта му - за да се получи в  $\text{mm}^2$  тя се умножава на мащабен коефициент, получен от измерване на сантиметрова скала начертана на дъното на чашата (вижда се вляво на фиг.1.13). Определянето на мащаба са извършва преди започването на измерванията като с мишката се маркират деленията на хоризонталната и вертикалната сантиметрови скали. Програмата пресмята ъгъла на завъртане и мащаба по двете оси. Другата важна процедура е определяне на границата на петното, тя зависи от осветеността и може да се определи по чернотата на сантиметровата скала. За задаване на областта на сканиране се използват двата плъзгача отляво и отдолу на снимката и бутона SET.



Фигура 1.13: Екран с програмата след 1 минута измерване.

Зависимостта на квадрата на радиуса от времето се получава в реално време, както е показано на графиката на фиг.1.13. На фигурата с малко червено кръгче е означен центъра на петното, получен като център на тежестта на преброените пиксели, а големият червен кръг е начертан с пресметнатия радиус по формулата  $R^2 = N/\pi$ , където  $N$  е броят на пикселите по-черни от зададената гранична

стойност.

На фиг.1.13 с кръгчета са представени измерените стойности, а кривата е получена като решение на уравнение (1.18) при  $C/C_0 = 0.001$ . За пресмятането на кривата са необходими 2 параметъра: коефициента на дифузията  $D$  и  $a$  - началния радиус на петното. Те са получени като свободни параметри при фитиране на експерименталните данни. Интегралът във формула (1.16) се пресмята по метода на Симпсън. Началният радиус на петното се разглежда като неизвестен, тъй като измерването започва на втората секунда от падането на капката – това е необходимо за да може капкомерът, с който тя е пусната, да е извън зрителното поле и да не пречи на анализа на яркостта, и за да се избегне преходния процес, когато капката пада върху дъното, а най-леката фракция от туша се разстила върху повърхността на течността. За фита използвахме метода Marquardt, а уравнение (1.18) се решава по метода на разполовяването.

## Въпроси

1. Какво представлява дифузията?
  2. С какво уравнение се описва промяната на размера на капка туш на дъното на чаша с вода?
  3. Защо е необходимо да се измери мащаба върху дъното на чашата?
  4. Какво представлява численият метод фитиране?
  5. За какво се използва метода на разполовяването?
  6. За какво се използва метода на Симпсън?
-

## 1.4 Определяне на йонната подвижност чрез електрофореза

На всяка заредена частица поставено в електрично поле действа сила  $F = qE$ . Ако това е макромолекула на нея ѝ действа сила на триене пропорционална на скоростта. Ако електричното поле е постоянно то след известно време двете сили се изравняват и молекулата започва да се движи с постоянна скорост. На този ефект се базира използването на електрофорезата.

### Теоретична част

Постоянният електрически ток се използва широко за медицински цели, както и за въвеждане на лекарства през кожата или лигавиците. Този метод се нарича лекарствена електрофореза. По време на електрофорезата, човешкото тяло се влияе както от постоянния електрически ток, така и от лекарствено вещество, въведено в тялото чрез него. Ако активният елемент на терапевтичното вещество са йони, тогава този метод на лечение се нарича йонофореза.

В научните изследвания електрофорезата се използва за разделяне на различни фракции от протеини. Този процес на разделяне е възможен поради факта, че различните протеини в електрическо поле се движат с различни скорости. Електрофоретичният анализ на кръвния серум се извършва за диагностични цели, тъй като при някои заболявания съотношението между фракциите в човешката кръв се променя драстично.

Електрофоретичната подвижност  $\mu$  се дефинира с формула (7.1), стр.106. Електричното поле създадено от потенциална разлика  $U$ , която действа на разстояние  $d$  се пресмята по формулата  $E = U/d$ , така че за електрофоретичната подвижност получаваме:

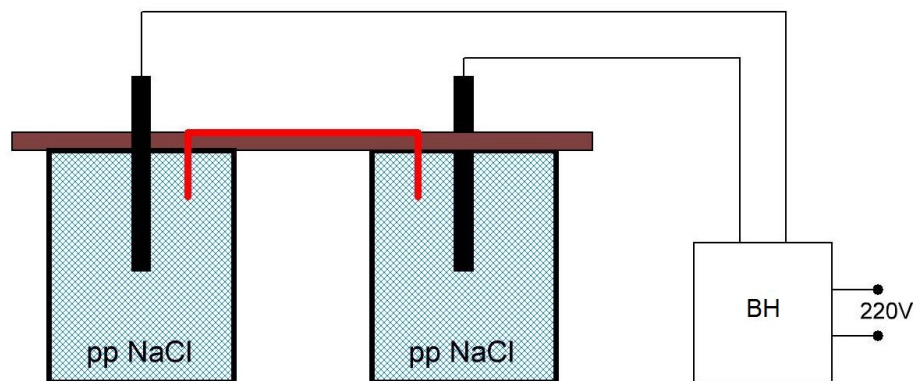
$$\mu = \frac{vd}{U} \quad (1.19)$$

### Експериментална част

Определянето на подвижността на йони се извършва на електрофорезен апарат, схемата на който е показана на фигура 1.14.

Поставете стъклена (или пластмасова) пластинка върху краищата на съдовете с електролит.

1. С помощта на линейка измерете разстоянието между електродите  $d$ .
2. Отбелязва се средата на лента филтърна хартия и се навлажнява с леко алкален воден разтвор на NaCl и метилоранж. Лентата се поставя върху пластинката така, че краищата ѝ да са потопени 1-2 см в разтвора, който се намира в съдовете.
3. Включете източника на постоянен ток и настройте напрежението между електродите на 60 V.



Фигура 1.14: Схема на опитната постановка.

4. Навлажнява се тънка лентичка от филтърна хартия с разтвор на оксалова киселина. Внимава се да няма капки. Напоената с киселина лентичка се поставя плътно до отбелязаната среда на лентата откъм страната на анода.
5. Включва се напрежението и се засичат 5 минути. След изтичането им, напрежението се изключва, лентата се сваля и се измерва разстоянието  $x$ , което са изминали водородните йони.
6. Повторете подобни измервания при 80 V и 100 V.
7. Подвижността на йони  $OH^-$ , изчислена от формула (1.19) е:
 
$$\mu = xd/Ut$$
8. Получените данни се въвеждат в таблицата:

№	$U$ , V	$x$ , m	$t$ , s	$s$ , m	$\mu$ , $m^2/Vs$
1	60				
2	80				
3	100				

9. Да се построи графика на зависимостта на подвижността на йоните  $OH^-$  от електрическото поле.
10. Направете извод.

## Въпроси

1. Какво се нарича електрофореза?
2. Какво се нарича електролитна дисоциация?
3. Какво се нарича йонна подвижност? Мерни единици?
4. Как скоростта на движение на йоните зависи от силата на електрическото поле?
5. Какво явление се нарича: електрофореза, йонофореза, електроосмоза?

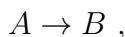


## 1.5 Влияние на температурата върху активността на катализата на клетки от дрожди

Веществата, постъпващи в тялото, влизат в сложна мрежа от химически трансформации. Скоростта на химичните реакции в клетките и тъканите на тялото играе основна роля за регулиране на жизнения процес. В тази връзка изследването на законите на протичане на химичните процеси във времето е от голямо значение. За разлика от биохимията, която описва специфични химични реакции в организма, кинетиката изучава механизмите на химични трансформации в зависимост от различни фактори (температура, концентрация на реагенти, налягане, рН, присъствие на катализатори и др.).

### Теоретична част

Най-важната количествена характеристика на химическата реакция е скоростта. Под скорост се разбира увеличението или намаляването на концентрацията на реагиращото вещество във времето. Ако веществото  $A$  се превръща в  $B$ :



то скоростта на реакцията  $v$  е производната по времето на концентрацията на някое от веществата ( $v = dA/dt$  или  $v = dB/dt$ , тук и по-нататък с  $A$  и  $B$  ще означаваме концентрациите на  $A$  и  $B$ ).

Скоростта на химическата реакция зависи главно от три фактора: концентрацията на реагиращите вещества, температурата и наличието на катализатори. Според кинетичната теория на реакциите, тяхната скорост се определя от броя на сблъсъците на молекули помежду си за единица време. Ако скоростта на реакцията зависи от концентрацията на едно вещество, тогава тази реакция се нарича реакция от първи ред. В случай на мономолекулната реакция  $A \rightarrow B$  според закона на действащите маси:

$$-\frac{dA}{dt} = kA, \quad (1.20)$$

където коефициентът на пропорционалност  $k$  се нарича константа на скоростта на реакцията. Ако скоростта на реакцията зависи от концентрацията на две реагиращи вещества, тогава това е реакция от втори ред. Например, при реакцията  $A + B \rightarrow B$ :

$$-\frac{dA}{dt} = kAB \quad (1.21)$$

Редът и молекулеността на реакцията не винаги съвпадат. Бимолекулната реакция може да бъде реакция от първи ред, ако едно от реагиращите вещества е в излишък и концентрацията му не се променя видимо. Обикновено ензимните реакции протичат по този начин при условия на излишен реагент. В условия на нулев ред скоростта е постоянна и се определя от скоростта на разлагане на ензимно-субстратния комплекс. По време на реакцията може да възникне преход от реакция от първи ред към реакция от нулев ред. Ако процесът протича в клетката, където реагиращите вещества навлизат през клетъчната стена, тогава в началния момент, когато концентрацията на реагиращото вещество е малка,

реакцията може да протече като реакция от първи ред и когато всички ензимни молекули са наситени, преминава в нулев ред.

Освен зависимостта от концентрацията на субстрата, има зависимост на скоростта на ензимната катализа от редица други фактори: наличието на инхибитори или активатори, рН на средата, налягане, температура и др., следователно в биологичните системи скоростта на реакция варира в много широк диапазон.

Един от най-значимите фактори, влияещи върху кинетиката, е температурата. При условията на интегрален организъм промяна на температурата може да повлияе на скоростта на реакциите както пряко, така и косвено. И тук понижаването на температурата на тялото, както във всяка неодушевена система, забавя химичните реакции. Използването на хипотермия в медицината се основава на това, но в същото време организма има механизми за терморегулация, които ускоряват реакциите. За разлика от реакциите, които се случват в неживи системи, повечето биологични процеси имат температурен оптимум - температурният диапазон, в който реакцията протича с максимална скорост. Това се дължи на ензимния характер на повечето биологични процеси.

В случай на ензимна реакция действат едновременно два различни фактора, които определят влиянието на температурата: от една страна, увеличаване на скоростта на самата реакция: от друга, увеличаване на скоростта на разрушаване на ензима при нагриване, което причинява непрекъснато намаляване на концентрацията на активния ензим. Оптималната температура зависи от връзката между влиянието на температурата върху скоростта на реакцията на самата ензимна реакция и нейното влияние върху скоростта на инактивиране на ензима.

Влиянието на температурата върху скоростта на биологичните процеси често се оценява с помощта на температурния коефициент  $Q_{10}$  на Ван Хоф. Той показва колко пъти процесът се ускорява при повишаване на температурата с  $10^\circ$ .

$$Q_{10} = \frac{v_{T_1}}{v_{T_2}}, \quad (1.22)$$

където  $v_{T_1}$  е скоростта на процеса при определена температура, а  $v_{T_2}$  е скоростта на процеса при температура с  $10^\circ\text{C}$  по-голяма.

Скоростната константа на реакцията  $k$  зависи силно от температурата по формулата на Арениус (5.3), стр.77. От нея получаваме:

$$Q_{10} = \frac{v_{T_1}}{v_{T_2}} = \frac{e^{-E^*/RT_1}}{e^{-E^*/RT_2}}$$

$$\lg Q_{10} = \lg e \frac{E^*}{R} \left( \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) = 0,434 \frac{E^*}{R} \frac{10}{T_1 T_2}$$

От тук може да се определи енергията на активация  $E^*$  в джаули:

$$E^* = \frac{R}{4,34} T_1 T_2 \lg Q_{10} = 1,9 T_1 T_2 \lg Q_{10} \text{ J/mol}$$

В калории енергията на активация се получава като се умножи по 0,239:

$$E^* = 0,46 T_1 T_2 \lg Q_{10} \text{ cal/mol} \quad (1.23)$$

От уравнението следва, че енергията на активация и логаритъмът на температурния коефициент са свързани чрез линейна зависимост. Следователно, реакциите с по-висока енергия на активиране ще имат по-изразена температурна зависимост.

Енергиите на активация на повечето биологични процеси са в същия порядък, както при химичните реакции 8 – 20 kcal/mol.

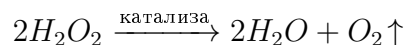
Живите организми не винаги издържат на промяна на температурата от 10°C. Следователно, за определяне на температурния коефициент, често се взема по-малък температурен интервал и резултатът се преизчислява за 10°C.

Поради наличието на ензими, в клетките протичат такива реакции, които са или невъзможни за прилагане в технологията, или могат да се извършват в тежки условия - при висока температура и високо налягане. Ензимите намаляват енергийната бариера, която реагиращите молекули трябва да преодолеят и поради това реакциите в организмите протичат при леки условия - при нормално налягане и при ниска температура.

Разгледаната формула (1.23) се използва и за изчисляване на енергията на активация на биологичните процеси, включително секрецията на жлезите, пулсации на контрактилни вакуоли на протозои, мускулни контракции и др.

## Експериментална част

За да изследваме скоростта на ензимна реакция при различни температури използваме апаратурата показана на фиг.1.15. За целта приготвяме суспензия от мая и захароза, а активността на катализата определяме от скоростта на отделяне на кислорода:

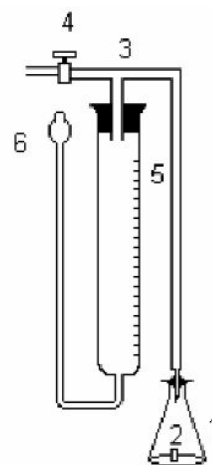


1. Взема се 1g суха хлебна мая и се разбърква в 50ml 8% разтвор на захароза при стайна температура.

2. След 10 – 15 минути, когато маята е добре разтворена, суспензията се поставя в съда 1 (фиг. 1.15) при начална температура  $T_1$ . Съдът се затваря при отворен кран 4. Нагласява се нивото на водата в бюретата 5 на нулево положение и кранът се затваря. След това съдържанието на съда се разклаща в продължение на 5 секунди. Разклащането се повтаря през 5 минути. След 20 минути се отчита обема на отделеното количество газ  $V_1$  в бюретата.

3. Суспензията се нагрява на водна баня до температура с 10° по-висока от стайната. Повтаря се същата процедура, за да се измери обема на отделеното количество газ в бюретата  $V_2$ , като се поддържа по-високата температура.

4. Пресмятат се температурния коефициент  $Q_{10}$  от формула (1.22) и енергията на активация от формула (1.23).



Фигура 1.15: Схема на опитната постановка.

## Въпроси

1. Как се дефинира скоростта на химичната реакция?
  2. От какво зависи скоростта на химичните реакции?
  3. Коя реакция е от първи ред?
  4. Коя реакция е от втори ред?
  5. Каква е ролята на ензимите?
  6. Как влияе енергията на активация на скоростта на химичната реакция?
  7. Как се определя температурния коефициент на Ван Хоф?
  8. Как се пресмята енергията на активация?
-

## 1.6 Въртене на равнината на поляризация на светлината. Наблюдение на конформационните преходи $\alpha$ -спирала - статистическо кълбо

За да се определи конформационното състояние на протеина, се използва поляриметър за определяне на специфичния ъгъл на въртене на поляризацията. Нативната протеинова структура желатина съответства на  $\alpha$ -спирала. При температура 35–40°C настъпва разкъсване на вътрешномолекулните водородни връзки и  $\alpha$  спиралната конформация се разрушава. Тогава макромолекулата може да бъде представена като статистическо кълбо. В него протеините и полипептидите нямат пространствено подредена вторична структура.

### Теоретична част

Способността за въртене на равнината на поляризация на равнинната поляризирана светлина е характерна за асиметричните молекули. Най-често срещаният тип асиметрия е създадената от въглеродните атоми с четири различни заместители. Спиралните форми създават допълнителна асиметрия на молекулите. Всеки тип пространствено опаковане на белтъчните молекули има определена способност да върти равнината на поляризация на плоско поляризираната светлина. В тази връзка измерването на способността на въртене е широко разпространен метод, използван за изследване на конформацията на протеини, както и на други биополимери.

Специфичното оптично въртене на протеините във видимите и UV участъци от спектъра при температура на преход  $\alpha$ -спирала – статистическо кълбо обикновено намалява в абсолютна стойност, оставайки отрицателно по знак.

Желатинът има интересна функция - способността за ренатурация. С понижаване на температурата под 30°C, настъпва частично възстановяване на спиралната конформация на молекулите. Степента на спирализация се увеличава с намаляването температурата на разтвора до 8 – 10°C. При достигане на 8°C, желатинът почти напълно възстановява  $\alpha$ -спиралната конформация.

### Експериментална част

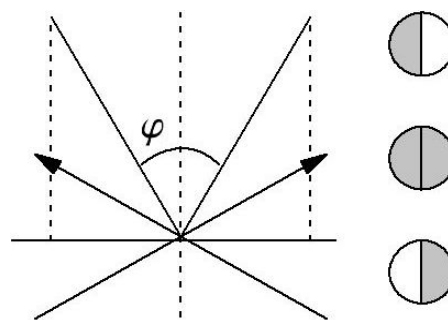
Кювета с желатин, отлежала 2 часа при 6 – 8° C, се поставя в поляриметъра и се отчита ъгъла на завъртане на поляризацията. След това кюветата се поставя в термостат при температура +45°C. След 20 минути нагриване отново се поставя в поляриметъра и се отчита ъгъла.

От получените ъгли на въртене се изчислява специфичното въртене на желатиновия разтвор при температури от около 6°C и 40°C. Направете заключение за присъствието в интервала 6 – 45°C на конформационна конверсия на желатина.

Поставете желатиновата кювета обратно в хладилника. След 20 минути охлаждане определете стойността на ъгъла на въртене на желатиновия разтвор. Направете заключение за процеса на ренатурация, който протича в желатиновия разтвор.

За да се определи конформационното състояние на протеина се използва поляриметър за определяне на специфичния ъгъл на въртене на поляризацията.

Той се определя, като се сложи напълнената кювета и се освети от долния край. В окуляра се наблюдава картина подобна на фиг.1.16 – едната половина е тъмна, а другата светла. При завъртане на окуляра се наблюдава смяна на тъмната и светлата половина. Стремим се яркостта на лявата и дясната страна да се изравнят – постигнали сме това, ако леко завъртане наляво или надясно променя яркостта в различните половинки.



Фигура 1.16: Схема на опитната постановка.

1. Пригответе 10% и 20% разтвор на желатин и напълнете кюветата на поляриметъра до около една трета от обема.
2. Поставете в поляриметъра кювета с желатин, отлежала 2 часа при  $6 - 8^{\circ}\text{C}$ . Отчетете два пъти ъгъла (в зрителното поле трябва да се видят две еднакво затъмнени полукръгчета)  $\alpha_{10a}$ ,  $\alpha_{20a}$ .
3. След това поставете кюветата с тестовия разтвор в термостат с температура  $+45^{\circ}\text{C}$ . След 20 минути нагряване на кюветата отново я поставете в поляриметъра и отчетете ъгъла  $\alpha_{10b}$ ,  $\alpha_{20b}$ .
4. От получените ъгли на въртене изчислете специфичното въртене на желатиновия разтвор при температури от около  $6^{\circ}\text{C}$  и  $40^{\circ}\text{C}$ , и направете заключение за присъствието в интервала  $6 - 45^{\circ}\text{C}$  на конформационна конверсия на желатина.

$$\Delta\alpha_{10} = \alpha_{10b} - \alpha_{10a}$$

$$\Delta\alpha_{20} = \alpha_{20b} - \alpha_{20a}$$

5. Поставете желатиновата кювета обратно в хладилника. След 20 минути охлаждане определете стойността на ъгъла на въртене на желатиновия разтвор  $\alpha'_{10b}$ ,  $\alpha'_{20b}$ . Направете заключение за процеса на ренатурация, който протича в желатиновия разтвор.

## Въпроси

1. Какво е конформация?
2. Каква е разликата между  $\alpha$  – спирала и стохастично кълбо?
3. Какво представлява поляризацията на светлината?
4. Какво става с желатина при нагряване?
5. Какво представлява ренатурацията на желатина?

## 1.7 Определяне на осмотичното налягане на клетките в картоф

Осмозата е процес на дифузия на вода в разтвор, разделен от полупропусклива мембрана, която позволява на молекулите на разтворителя да преминават, но не и на молекулите на разтвореното вещество. Осмотично налягане е налягането, което разтворителят упражнява върху мембраната. Тургорът (turgor от латински “издуване”) е напрегнато състояние на клетъчната мембрана, създадено от хидростатичното налягане на вътреклетъчната течност. Тургорното налягане е вътрешното налягане, което се развива в растителната клетка, когато водата навлиза в нея в резултат на осмоза и цитоплазмата се притиска към клетъчната мембрана. Това налягане предотвратява навлизането на вода в клетката.

### Теоретична част

Ако една клетка се постави в разтвор, чиято концентрация е по-голяма от концентрацията на клетъчния сок (хипертоничен разтвор), тогава водата от клетката ще потече във външния разтвор, разреждайки го. Поради освобождаването на вода от растителната клетка, обемът на протопласта ще намалее и той ще започне да изостава от клетъчната стена (1.1). Това явление се нарича плазмолиза.

Външен разтвор	концентрация спрямо клетката	посока на движение на водата	тургор
хипотоничен	по-ниска	към клетката	висок
изотоничен	равна	еднакво към и от клетката	нормален
хипертоничен	по-висока	от клетката	нисък

Таблица 1.1: Разтвори и тургор на растителната клетка.

Уравнение на Вант Хоф за осмотичното налягане е:

$$p = iCRT, \quad (1.24)$$

В него  $C$  е концентрацията на разтвора, mol/l,  $R$  е универсалната газова константа,  $T$  - абсолютната температура. Изотоничният коефициент  $i$  за NaCl е даден в таблица 1.2.

Конц. NaCl	1	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
$i$	1,62	1,64	1,66	1,68	1,7	1,73	1,75	1,78	1,83

Таблица 1.2: Зависимост на изотоничния коефициент от концентрацията на разтвор NaCl.

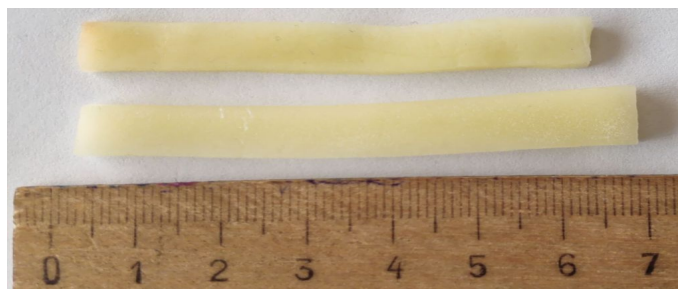
Зависимостта  $i(C)$  добре се апроксимира с полином от втора степен:

$$i = 0,17x^2 - 0,41x + 1,86 \quad (1.25)$$

## Експериментална част

Молекулното тегло на NaCl е 58,44 g/mol, затова 1 mol/l разтвор на NaCl се получава от 5,8 g NaCl разтворени в 100 ml вода. Чрез последователно разреждане се приготвят разтвори на NaCl с концентрация посочена в таблица 1.3 и се наливат в петриевы чаши.

1. От картоф се нарязват плочки с дебелина 3-4 мм. От тях се нарязват еднакви ленти с ширина 3-4 мм. Измерва се дължината на лентите и се нанася в таблица 1.3.



Фигура 1.17: Промяна на дължината на картофени ленти в разтвор от NaCl (от горе) и чиста вода (долу).

2. Картофените ленти се потапят във всяка чаша и се оставят да престоят половин час.
3. След 30 минути лентичките се изваждат, подсушават се с хартиена кърпа, дължината им се измерва отново и се нанася в таблица 1.3.

Концентрация NaCl, мол/л	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	0,0
Начална дължина на лентата, мм							
Дължина на лентата след 30 минути, мм							
Разлика, мм							

Таблица 1.3: Резултати от измерванията.

4. Нанесете в таблицата разликата между първоначалната и получената дължина.
5. Пресметнете изотоничната концентрация като средното от концентрациите при които се наблюдава преход от отрицателна към положителна разлика.
6. От формула (1.25) пресметнете изотоничния коефициент  $i$  за изотоничната концентрация. Заместете с получените стойности в уравнението на Вант Хооф (1.24) и намерете клетъчното налягане.



## Въпроси

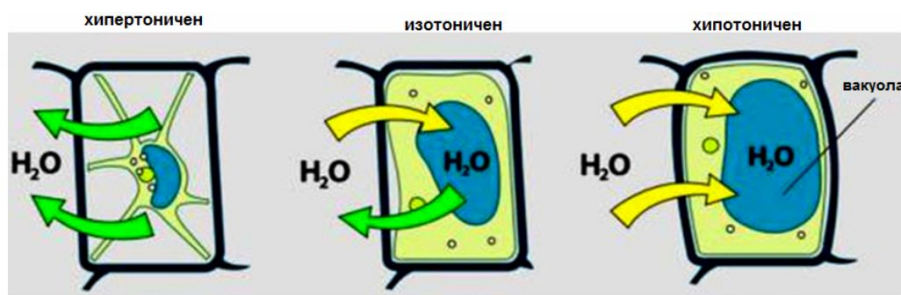
1. Кой разтвор се нарича хипертоничен, изотоничен, хипотоничен?
  2. Какво е тургор?
  3. Какво е осмотично налягане?
  4. Каква формула се използва за изчисляване на осмотичното налягане?
  5. Пресметнете осмотичното налягане на 0,9% NaCl (молекулно тегло 58 g/mol).
  6. Пресметнете осмотичното налягане на 5% глюкоза (молекулно тегло 180 g/mol, а изотоничният коефициент е  $i = 1$  – молекулата е неполярна).
-

## 1.8 Определяне на клетъчното налягане чрез рефрактометър на Абе

Едно от най-важните физиологични свойства на растителната клетка е осмотичното усвояване на водата. Осмозата е преминаването на разтворител в разтвор, отделен от него с полупропусклива мембрана. Тя позволява на молекулите на някои вещества (например вода) да преминават добре поради наличието на протеинови пори и не позволява на молекулите на други да преминават изобщо или само с трудности. Селективната пропускливост на мембраната се поддържа, докато клетката остава жива.

### Теоретична част

Цитоплазмата и вакуолата съдържат голямо количество осмотично активни вещества: захари, органични киселини, соли. Клетъчните мембрани - са избирателно пропускливи и водата преминава през тях много по-лесно, отколкото веществата, разтворени в клетъчния сок и цитоплазмата. Поради селективната пропускливост, когато една клетка се постави във вода, последната ще се влее в клетката според законите на осмозата. Разликата в концентрациите на разтворите, разделени от полупропусклива преграда, определя стойността на осмотичното налягане  $p$ . Когато водата навлезе в клетката, обемът на вакуолата се увеличава, тя оказва натиск върху цитоплазмата и принуждава протопласта да се притиска към клетъчната стена. Клетъчната стена е еластична, разтяга се, поради което клетката влиза в напрегнато състояние - тургор. Тургорното налягане е вътрешното налягане, което се развива в растителната клетка, когато водата навлиза в нея в резултат на осмоза и цитоплазмата се притиска към клетъчната мембрана. Това налягане предотвратява навлизането на вода в клетката.



Фигура 1.18: Тургор в растителна клетка.

Ако една клетка се постави в разтвор, чиято концентрация е по-голяма от концентрацията на клетъчния сок (хипертоничен разтвор), тогава водата от клетката ще потече във външния разтвор, разреждайки го. Поради освобождаването на вода от клетката, обемът на протопласта ще намалее и той ще започне да изостава от клетъчната стена. Това явление се нарича плазмолиза.

За осмотичното налягане е в сила уравнението на Вант Хоф за осмотичното налягане:

$$p = iCRT, \quad (1.26)$$

където  $i$  е изотоничният коефициент, равен на  $1 + \alpha(n - 1)$ , където  $\alpha$  е степента на електролитна дисоциация,  $n$  е броят на йоните, на които се разпада електролитната молекула, за неелектролити (например захароза)  $i = 1$ ,

$C$  е концентрацията на разтвора, mol/l,

$R$  е универсалната газова константа,

$T$  - абсолютна температура.

## Експериментална част

Принципът на метода е да се избере разтвор с такава концентрация на захароза, която да не се променя, когато растителната тъкан се потапя в него. Промяната в концентрацията може да се определи чрез определяне на коефициента на пречупване с помощта на рефрактометър.

Рефрактометър на Абе се състои от две оптични призми (осветяваща и пречупваща) между които се поставя изследваната течност. Светлината влиза в рефрактометъра от долната страна на осветителната призма под много различни ъгли. Горната част на тази призма е дифузна, разсейваща светлината във всички посоки. Част от тази светлина преминава през пробата в пречупващата призма, където най-големият възможен ъгъл на падане  $\alpha$  е почти  $90^\circ$ .

Всички лъчи, пречупени от втората призма, се събират от лещата на обектива и се гледат през окулярна леща. Зрителното поле е кръг, разделен на тъмна и светла област.

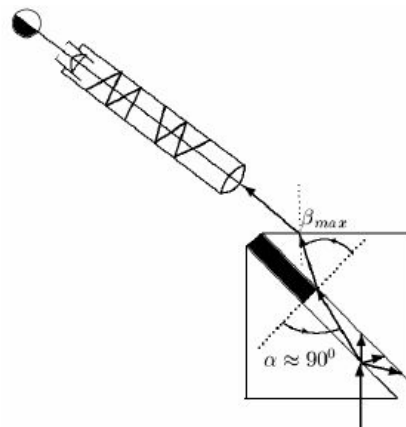
Положението на границата между тях съответства на максималния ъгъл на пречупване от закона на Снелиус:

$$\frac{\sin \beta_{max}}{\sin 90^\circ} = \frac{n_{prob}}{n_{prism}}$$

Ъгълът на тубуса може да се регулира, за до съвпадението на границата между светлото и тъмното с неподвижен кръст. В този случай ъгълът съответства на  $\beta_{max}$  и коефициентът на пречупване може да бъде отчетен от скалата на рефрактометъра.

От 1 mol/l разтвор на захароза и вода се приготвят разтвори със следните концентрации в епруветки: 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1 М. От приготвените разтвори се приготвят експериментални разтвори като след старателно разбъркване се налива по 1 ml в малки епруветки. Във всяка от малките епруветки се поставят по 5 диска, изрязани с цилиндрично свредло от листа на здравец. Пробите се оставят за 1 час, като епруветките периодично разклащат.

1. С помощта на стъклена пръчица се нанесете голяма капка от първоначалния разтвор върху призмата на рефрактометъра и определете коефициента на пречупване.



Фигура 1.19: Рефрактометър на Абе.

2. Почистете призмата и капнете капка от експерименталения разтвор със същата концентрация.
3. Повторете тези измервания с всички разтвори и ги нанесете в таблицата.
4. Изчислете разликите  $\Delta n$  между измерените коефициенти на пречупване за приготвените и експерименталните разтвори.
5. Определте експерименталения разтвор, концентрацията на който остава непроменена в сравнение със съответния първоначален разтвор, за него  $\Delta n = 0$ . Ако не е регистрирано точно съвпадение, но ако  $\Delta$  си сменя знака при преход от един разтвор към следващия, тогава трябва се изчислява средното им аритметичното.
6. С получената стойност изчислете осмотичното налягане на клетъчния сок по формула (1.26).

n	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
чист разтвор								
експ. разтвор								
$\Delta n$								

## Въпроси

1. Кой разтвор се нарича хипертоничен, изотоничен, хипотоничен?
2. Мъртвите клетки способни ли са на осмоза?
3. Какво е тургор?
4. Какво е осмотично налягане?
5. Какви методи за определяне на осмотичното налягане познавате?
6. Каква формула се използва за изчисляване на осмотичното налягане?

# Библиография

- [1] “Физика”, В. Заячки, П. Девенски, Хр. Каназирски, Мартилен, 1993.
- [2] “Ръководство за лабораторни упражнения по физика”, колектив, изд. Мартилен, София, 1994.
- [3] “Лабораторные работы по бифизике”, В. Жандарев и И. Дигурева, ЯрГУ, Ярославль, 2006.
- [4] “Практикум по высокомолекулярным соединениям”, Кабанов, Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2014.
- [5] “Физиология растений. Лабораторные работы”, О. А. Четина, Л. А. Чудинова, ПГНИУ, 2020.
- [6] “Физика для любознательных”, Эрик Роджерс, т.2, стр.311, Мир, Москва, 1970.
- [7] “Биофизика”, М.В. Волькенштейн, Наука, Москва, 1988.
- [8] “Физика ферментов”, М.В. Волькенштейн, Наука, Москва, 1967.
- [9] “Молекулы и жизнь”, М.В. Волькенштейн, Наука, Москва, 1965.
- [10] “Перекрестки науки”, М.В. Волькенштейн, Наука, Москва, 1972.
- [11] “Статистическая физика макромолекул”, А.Ю. Гросберг, А.Р.Хохлов, Наука, Москва, 1989.
- [12] “Увод в биофизикохимията”, Иван Панайотов, Университетско издание, 2000.
- [13] “Физика с основи на биофизиката”, Невена Николова, Наука и изкуство, 1989.
- [14] “Основи на биофизиката”, Елисавета Семерджиева и Атанас Арнаудов, Университетско издателство Паисий Хилендарски, Пловдив, 2021.
- [15] “Химия биологических активных соединений”, под ред.Преображенский, изд. Химия, Москва.
- [16] “Биофизическая химия”, т.3, Ч. Кантор, П. Шиммел, Мир, Москва, 1985.
- [17] “Основи на биоорганичната химия и биохимията”, Е. Головински и Г. Русев, “Наука и изкуство”, София, 1980.
- [18] “Математическо моделиране”, С. Марков, УИ Св. Климент Охридски, 2004.
- [19] “Математические модели в биофизике и экологии”, Г. Ю. Ризниченко, Москва – Ижевск: Институт компьютерны исследований, 2003.
- [20] “Познание сложного”, Г. Николис и И. Пригожин, Мир, Москва, 1990.

- [21] “Современные методы биофизических исследований”, под ред. А.Б. Рубина, Высшая школа, Москва, 1988.
  - [22] “Биофизика”, А.Б. Рубин, т.1 и т.2, Книжный дом, Университет, Москва, 1999.
  - [23] “Physics with illustrative examples from medicine and biology”, G.B. Benedek and F.M.H. Villars, v.2 and v.3, Springer, 2000.
  - [24] “Биосенсоры: основы и приложения”, Под ред. Э. Тернера и др. М.: Мир, 1992.
  - [25] “Biophysics”, Kluwer Academic Publishers, Vasantha Pattabhi, N. Gautham, New York, 2002.
  - [26] “Геномът. Автобиография на един биологичен вид в 23 глави”, Мат Ридли, СИЕЛА, 2002.
  - [27] “Stomatocyte–discocyte–echinocyte sequence of the human red blood cell: Evidence for the bilayer–couple hypothesis from membrane mechanics”, Gerald Lim et.al , PNAS, vol. 99, 26, 16769, 2002.
  - [28] “Structural visualization of the tubulin folding pathway directed by human chaperonin TRiC/CCT”, Daniel Gestaut et al., Cell, v.185, 25, p4675, 2022, DOI: 10.1016/j.cell.2022.11.014, 2022.
  - [29] <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/regulation-of-gene-expression-and-cell-specialization/a/the-lac-operon>
  - [30] “Model for photodegradation with a modified rate constant. Part 2: model description”, E. Lilov, V. Lilova, S. Nedev, Journal of Chemical Technology and Metallurgy, v57, 6, p1175, 2022.
  - [31] “Design of Low Cost Pulse Oximetry Based on Raspberry Pi”, S Bakhri et al., J. Phys.: Conf. Ser., 1501 012003, 2020.
  - [32] [https://en.wikipedia.org/wiki/2020\\_coronavirus\\_pandemic\\_in\\_Bulgaria](https://en.wikipedia.org/wiki/2020_coronavirus_pandemic_in_Bulgaria).
  - [33] <https://en.wikipedia.org/wiki/MINUIT>
  - [34] “Гидродинамика”, Ландау, Лифшиц, Теоретическая физика т.6, Москва, Наука, стр.281–282, 1986.
  - [35] “Ink diffusion in water”, Sanboh Lee, H–Y Lee, I–F Lee and C–Y Tseng, Eur. Jour. of Phys., 25, p.331, 2004.
  - [36] “Web camera as a measuring tool in the undergraduate physics laboratory”, S. Nedev, V. Ch. Ivanova, Eur. Jour. of Phys., 27, p.1213, 2006.
-

## Предметен указател

- Θ температура, 40, 45  
α-спирала, 52, 175  
β-форма, 52  
АДФ - аденозин дифосфат, 18, 137  
АТФ - аденозин трифосфат, 18, 24, 49, 60, 63, 64, 96  
ДНК, 49, 63  
Ешерихия коли, 68  
Фурие трансформация, 108, 109, 127  
Какво е живота от гледна точка на физиката, 4, 21  
Лоренцова крива, 117  
РНК, 63  
РНК – матрична, 64  
РНК – рибозомна, 64  
РНК – транспортна, 65  
Рамачандран плот, 51  
Ван-дер-Ваалсови сили, 37  
аденин, 63  
адиабатен процес, 30  
адиабатично приближение, 111  
адсорбция, 76  
агробиотехнологии, 11  
активатор, 79  
активен транспорт, 96  
ангиография, 129  
ангстрьом, 43  
анихилация, 121  
антикодони, 65  
апериодичен кристал, 4, 43  
апоензим, 84  
атомен силов микроскоп, 133  
белтъци, 49  
безреагентен метод на анализ, 141  
биочип, 141  
биоелектроника, 141  
биофизика на клетката, 8  
биофизика на сложните системи, 8  
биополе, 5  
биополимери, 26  
биосензор, 141  
биотехнологии, 9  
център, 148  
цитозин, 63  
частично кристално състояние, 28  
четвъртична структура, 55  
денатуриране на белтъците, 42, 44, 52–54  
дентална медицина, 128  
деоксихемоглобин, 115  
деполяризация на мембраната, 96  
деспирализирана верига, 53  
дезоксирибонуклеинова киселина, 49  
диализа, 45  
дифракционна картина, 126  
дифракционна решетка, 108  
дифузия, 47, 103, 165  
дисипативна ситема, 143  
дисперсионни сили, 37  
дисулфидни връзки, 56, 59  
ефект на Мьосбауер, 43, 122  
ефект на изключения обем, 38  
екологически биотехнологии, 12  
екстинкция, 104  
екзергоничен процес, 18  
еластични деформации, 28  
електрод на Кларк, 142  
електрофоретична подвижност, 106, 169  
електронен парамагнитен резонанс, 116  
ендергоничен процес, 18  
енергия, 5  
енергия на активация, 77  
енергоразход на човек, 25  
ентропия, 4, 20, 30, 33, 34, 40, 43, 44  
ензимен електрод, 141  
ензими, 76  
ензимно-субстратен комплекс, 76  
естествознание, 2  
фармакокинетичен модел, 154, 155  
фази, 76  
фазови преходи, 44  
феноменологична теория, 6, 13  
ферменти, 76  
фибрилярни белтъци, 54  
физическа кинетика, 20  
физика, 2  
флуоресценция, 111  
флуорография, 128  
фонова флуоресценция, 138  
форми на ДНК, 64

- формула на Айнщайн, 48, 103  
формула на Арениус, 77, 172  
формула на Харис - Бенедикт, 25  
формула на Михаелис - Ментен, 79, 81  
формулировка на Каратеодори, 20  
формулировка на Клаузиус, 16  
формулировка на Томсън, 16  
фосфоресценция, 111, 112  
фоторазграждане, 82  
фотосинтеза, 81  
функция на разпределението, 20  
гасене, 112  
генетичен код, 65  
генна експресия, 68  
генно инженерство, 66  
геном, 70  
глицил, 50  
глобула, 38, 39, 42, 44, 53–55, 66  
гуанин, 63  
характеристичен вискозитет, 105  
хемоглобин, 52, 55, 85, 104, 114  
хетерогенен катализ, 76  
хетерополимери, 27  
хидрофобни взаимодействия, 38  
химическо отместване, 119  
химия, 2  
хипертоничен разтвор, 177  
хипотоничен разтвор, 177  
хистони, 64  
хлорофил, 81  
холоензим, 84  
хомеостаз, 86  
хомогенен катализ, 76  
хомополимери, 27  
индукционни сили, 37  
инхибитор, 10, 79  
инициатори, 27  
изключен обем, 38, 40, 42, 43  
изкуствен интелект, 56  
изоелектрична точка, 100  
изотоничен разтвор, 177  
йон-диполни взаимодействия, 37  
йонен филтър, 96  
йонен канал, 95  
йонни сили, 36  
катализатор, 76  
каучук, 26  
кератин, 52  
класическа термодинамика, 13  
клетки на Бенар, 145  
кодони, 65  
коэффициент на бухване, 40, 43  
коэффициент на дифузия, 47, 165  
коэффициент на еластичност, 28  
коэффициент на седиментация, 104  
кофактор, 84  
кохезионно налягане, 162  
колаген, 52  
количество топлина, 15  
компютърен томограф, 129  
конформация, 27, 52, 175  
конкурентно инхибиране, 80  
константа на Михаелис, 78  
константа на седиментация, 104  
квантова химия, 36  
квантова интерференция, 134  
квазиравновесни процеси, 14  
латерална дифузия, 89  
липиди, 88  
луменисценция, 111  
магнетон на Бор, 116  
магнитоимуноанализно измерване, 135  
макромолекули, 26  
мамография, 128  
масспектрограф на Бейнбридж, 124  
масспектрометрия, 122  
медицински биотехнологии, 9  
мембрани, 87  
метаболизъм, 86  
метиленово синьо, 82  
метод на двойно маркираната вода, 25, 124  
метод на спиновите белези, 116  
метода на молекулната динамика, 149  
микроскопически теории, 6  
модел SEIR, 156  
модел SIR, 155  
модел ключ-ключалка, 84  
модел на Фертхюлст, 152  
модел на Лотка-Волтера, 153  
модел на Малтус, 152  
модел на Уотсън и Крик, 63  
модификатор, 79



- 
- модул на Юнг, 28, 29, 33, 35, 43  
молекулна биофизика, 8  
морфогенеза, 146  
нативен белтък, 52, 54  
неконкурентно инхибиране, 80  
необратими термодинамични процеси, 14  
неравновесна термодинамика, 22  
неравновесно състояние, 13  
неустойчив фокус, 148  
неустойчив възел, 148  
нуклеинови киселини, 63  
нулев принцип на термодинамиката, 13  
обратна транскрипция, 66  
оксихемоглобин, 115  
оксиметрия, 115  
опит на Анфинсен, 54  
оптичен микроскоп, 130  
ориентационни сили, 37  
осмотично налягане, 45, 104, 177, 180  
особени точки, 148  
остеоденситометрия, 128  
относителната деформация, 28  
парадокс на Ливентал, 55  
пасивен транспорт, 95  
пептидна връзка, 50  
пълзене, 36  
първи принцип на термодинамиката, 15  
първична структура, 28, 50  
пластични деформации, 29  
поле, 5  
поликондензация, 27  
полимеразна верижна реакция, 72  
полимери, 26  
полимеризация, 27  
полимерно кълбо, 39, 42  
полипептидна верига, 50  
полизома, 64  
полуразреден разтвор, 41  
поляризирана светлина, 175  
потенциал на Ленард-Джонс, 37  
повърхностно напрежение, 92, 162  
позитронен томограф, 120  
позитрони, 121  
преход кълбо-глобула, 42, 44, 45  
преход на Джозефсън, 134  
пръчици, 88  
принцип на Франк – Кондон, 112  
принцип на Пригожин, 23  
принцип на дьо Бройл, 131  
приони, 68  
работа, 5  
реакция на Белоусов - Жаботински, 145, 153  
редукция, 2  
рефрактометър на Абе, 181  
ренатурализация, 54, 175  
рентгеноструктурен анализ, 126  
рентгенова диагностика, 128  
рентгенови лъчи, 125  
реполяризация на мембраната, 96  
рептации, 36  
ръка-ръкавица, 84  
рибонуклеинова киселина, 49, 63  
рибозома, 54, 64  
самоорганизация, 54, 143  
седиментационна клетка, 102  
седиментация, 102  
седло, 148  
сгъване на белтъците, 66  
схема на Михаелис-Ментен, 77  
синергетика, 144, 145  
синтетични полимери, 26  
сканиращ електронен микроскоп, 132  
скорост на химичната реакция, 76  
специфичен заряд, 123  
спектър, 108, 112  
спектрален анализ, 108  
спектроскопия, 112  
стационарно състояние, 14  
статистическа физика, 20  
статистическа термодинамика, 13  
стъкло, 54  
стъклообразно състояние, 28  
стохастично полимерно кълбо, 31  
структура, 143  
субстрати, 76  
сведеберги S, 104  
свободна енергия, 17, 40, 41, 43  
свръхфино взаимодействие, 118  
шаперони, 66  
течни кристали, 89
-

- температура, 6, 13  
термодинамична система, 20  
термодинамичният потенциал, 17  
термодинамика, 6  
тетраметилсилан, 119  
тимин, 63  
топене, 53, 89  
трансдюсери, 141  
транскрипция, 65  
транслация, 65  
трасмисионен електронен микроскоп,  
131  
третична структура, 28, 53  
тубулин, 66  
тургор, 177, 180  
ултрацентрифуга, 102  
унитарен модел, 88  
урацил, 63  
уравнение на Ван-дер-Ваалс, 19  
уравнение на състоянието, 18  
уравнение за състоянието на идеал-  
ния газ, 18  
устойчив фокус, 148  
устойчив възел, 148  
везна на Ленгмюир, 92  
вътрешна енергия, 15  
вириални коефициенти, 19, 39, 104  
вискозитет, 100, 103, 105  
вискозотечно състояние, 28  
вискозоеластичност, 36  
вискоеластично състояние, 28  
вискоеластичност, 28  
водородна връзка, 37  
втори закон на термодинамиката, 4,  
16, 20  
вторична структура, 28, 52  
ядрено магнитен резонанс, 119  
закон, 2  
закон на Болцман, 116  
закон на Фик, 48, 165  
закон на Хук, 28  
закон на Кулон, 37  
закон на Поазьой, 105, 159  
закон на Стокс, 103  
закон на Вант-Хоф, 104, 177, 180  
закон на действащите маси, 171  
желатин, 175  
жертва–хищник, 153  
AlphaFold, 56  
ATR FTIR спектроскопия, 109  
COVID, 157  
flip-flop дифузия, 89  
lac оперон, 69  
PET скенер, 120  
SQUID устройства, 134
-