



ВОПРОСЫ
БИОФИЗИКИ

И*Л

Издательство
иностранной
литературы

*

ADVANCES IN BIOLOGICAL
AND
MEDICAL PHYSICS

Ed. by
J. H. LAWRENCE AND C. A. TOBIAS

Volume IV

New York
1956

П.

612
В-748

ВОПРОСЫ БИОФИЗИКИ

Перевод с английского

Н. А. Габеловой, А. Б. Гутерман, М. А. Пешкова,
Л. Л. Разумовой и В. Т. Хозяинова

Под редакцией и с предисловием
проф. Г. М. Франка



ИЗДАТЕЛЬСТВО
ИНОСТРАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ
Москва, 1957

Мр К

АННОТАЦИЯ

В настоящий сборник включен ряд статей из вышедшего в 1956 г. IV. тома ежегодника „Биологическая и медицинская физика“.

Доклады посвящены таким вопросам, как изучение свойств белков на основании рентгеноструктурного анализа их кристаллических форм, инфракрасная спектроскопия, изучение физико-химических основ клеточного деления, изучение кинетики обмена железа и, наконец, определяющая роль нуклеиновых кислот в синтезе белков.

Использование биофизических методов исследования при решении этих важных вопросов вносит в их освещение много нового. Настоящий сборник знакомит с современным состоянием и перспективами дальнейшего развития указанных областей науки.

Предназначен для биофизиков, физиологов, цитологов, биохимиков, работников в области медицины.

Редакция биологической литературы
Заведующий проф. А. А. НИЧИПОРОВИЧ

ПРЕДИСЛОВИЕ

В сборник „Вопросы биофизики“ включен ряд обзорного статей из вышедшего в 1956 г. очередного тома ежегодного издания „Биологическая и медицинская физика“.

Статьи, представленные в сборнике, весьма разнохарактерны. Это обусловлено разнообразием вопросов, входящих в круг проблем, обобщаемых термином „биологическая и медицинская физика“. Если под биофизикой понимается в первую очередь изучение принципиальных вопросов, касающихся физических и физико-химических процессов, совершающихся в живой системе, то к разделу „медицинская физика“ часто относятся собственно методические и даже технические вопросы. Правда, следует отметить, что развитие современных методов создает новые направления и открывает принципиально новые возможности в развитии науки. Так, например, включенная в сборник статья Фримана посвящена описанию только методов и приборов, применяемых в настоящее время в инфракрасной спектроскопии. Однако включение подобной работы в сборник вполне оправдано, поскольку роль молекулярной спектроскопии в инфракрасной области для решения многочисленных биологических и в первую очередь биохимических задач все больше возрастает. Применение инфракрасной спектроскопии еще очень ограничено, однако оценить границы ее применения в будущем довольно трудно. Основное достоинство этого метода заключается в том, что чисто оптическим путем удастся идентифицировать сложные органические соединения и следить за некоторыми сторонами химических

превращений. Более того, использование поляризованного инфракрасного излучения в процессе анализа позволяет устанавливать пространственную ориентацию определенных химических связей в изучаемом объекте. Весьма вероятно, что инфракрасная спектроскопия — это только первый из ряда новых физических методов, применение которых в биологии откроет в конечном итоге заманчивые перспективы непосредственного наблюдения за быстро совершающимися в живой ткани химическими превращениями, так сказать, в витальных условиях, без вмешательства в процессы обмена и нарушения жизнедеятельности.

Необходимо подчеркнуть, что использование инфракрасной спектроскопии в биологии изменяет самый характер эксперимента, поднимая его на принципиально новый уровень. Введение этого метода нельзя приравнивать к простому использованию в прежних условиях какого-то нового, более удобного прибора. Применение инфракрасной спектроскопии для решения даже простейших биологических и биохимических задач требует специальной подготовки и будет хотя бы в какой-то мере целесообразным и полезным лишь при умении оперировать данными теории молекулярных спектров, используя их не только для трактовки получаемых результатов, но и для постановки самой задачи.

Все сказанное об инфракрасной спектроскопии относится и к другим статьям сборника, в частности к статьям, посвященным изучению кинетики обмена железа методом меченых атомов и применению рентгеноструктурного анализа. В этих случаях трудно отделить возникновение методического приема в смежной области знания и переход его в биологию, с одной стороны, от постановки и разрешения принципиальных задач, связанных с изучением и истолкованием физических и физико-химических свойств живого объекта, — с другой.

Метод исследования, изложенный в статье Харкера „Применение рентгеноструктурного анализа к изучению кристаллических белков“, требует еще более высокого уровня специализации в весьма трудной области современной физики — рентгеноструктурном анализе. Этим методом решаются задачи, являющиеся в сущности чисто

физическими; биологическая проблема сводится к разработке соответствующего метода приготовления объекта, подлежащего исследованию.

На первый взгляд может показаться, что изучение кристаллических белков представляет собой в какой-то мере абстрактный вопрос, не имеющий непосредственного отношения к изучению основного субстрата жизни — нативных комплексных белковых систем. Однако на самом деле исследование белка в кристаллической форме необходимо для получения „богатой“ диффракционной картины, позволяющей произвести детальную расшифровку структур. Это позволяет решить те принципиальные вопросы строения белка, которые в равной мере актуальны и при рассмотрении строения нативных белковых систем, находящихся в живой клетке. Из этого обзора читатель составит себе ясное представление не только о сущности метода и принципах расшифровки структур, но и о границах его применения и тех возможностях, которые он открывает для исследования структуры основного носителя жизни — белка.

Статью Хаффа и Джадда „Кинетика обмена железа“ в большой мере можно отнести к тому, что называется медицинской физикой. В статье описаны те методы изучения кинетики распределения радиоактивного изотопа железа, которые авторы считают наиболее пригодными для рациональной диагностики нарушений кроветворения. Исследователи, применяющие метод радиоактивных индикаторов, до сих пор очень часто придерживаются примитивной точки зрения, согласно которой количество изотопа, включаемого в тот или иной комплекс или в ту или иную ткань, соответствует интенсивности обмена веществ. Однако количество включившегося изотопа никогда не бывает прямо пропорционально количеству введенного вещества и уровню обмена в месте его обнаружения. Распределение изотопа представляет собой, как правило, многоступенчатый и, более того, „ветвящийся“ процесс, причем конечные итоги зависят от условий движения вещества по параллельным путям и на отдельных этапах этих путей. Для того чтобы разобраться в сложной динамике этого процесса, авторы мысленно моделируют его в соответствии с возможным характером многоступенчатости и при помощи

счетно-аналитических машин получают некоторую общую картину поведения вводимого в организм железа. Таким образом, простая, казалось бы, задача диагностического использования радиоактивного железа перерастает в проблему, разбираемую, во-первых, на основе представлений о реальном поведении вещества в организме, а во-вторых, при помощи одного из совершеннейших орудий современного теоретического исследования — счетно-вычислительных машин.

Наиболее биологической является статья Мэзиа „Биофизические и биохимические исследования клеточного деления“. Эта статья интересна тем, что, с одной стороны, она содержит очень полный материал, относящийся к различным сторонам процесса клеточного деления — цитологической, биохимической и физико-химической, а с другой — демонстрирует недостаточность наших знаний в области скрытых механизмов (материальной основы) этого сложного явления.

В настоящее время, если не говорить о феноменологии процесса, хорошо разработанной цитологами, выяснены лишь отдельные звенья, характеризующие обменную и энергетическую основу процесса деления и физико-химические свойства живого субстрата на разных фазах деления клетки. Настоящий обзор может, несомненно, стимулировать постановку новых исследований и разработку новых теоретических представлений, относящихся к сущности явления клеточного деления.

Статья Гамова, Рича и Икаса посвящена вопросу, ставшему за последнее время весьма модным, а именно роли специфической структуры нуклеиновых кислот в определении направленности синтеза и структурной характеристики синтезирующихся белков. В обзоре рассмотрен вопрос о взаимодействии нуклеиновых кислот и белков, причем вполне резонно утверждается, что в существующих представлениях об определяющей роли нуклеиновых кислот в синтезе белков есть еще неясности. Однако получены убедительные данные (прежде всего — по вопросу о воспроизведении различными бактериальными клетками строго определенного бактериофага при проникновении внутрь клетки лишь нуклеинового компонента этого фага), делающие целесообразным рассмотрение в широ-

ком плане вопроса о взаимоотношениях нуклеиновых кислот и белка. Рассмотрение это, как подчеркивают сами авторы, проводится на основе чисто формальной схемы — решения задачи о том, как можно представить себе влияние нуклеиновой кислоты, имеющей определенную структуру и состоящей из четырех оснований, на синтез белка определенной структуры с определенной последовательностью чередования 20 аминокислот в полипептидной цепи. При конкретном решении этой формальной задачи обходится вопрос о природе тех сил, при помощи которых заданная пространственная комбинация четырех оснований определяет некоторую комбинацию аминокислот в структуре белка. В статье обсуждаются лишь способы „кодирования“ структурой нуклеиновых кислот той информации, которая передается в процессе синтеза полипептидной цепи и расшифровывается в виде определенной последовательности чередования аминокислот в белке.

В результате формального рассмотрения различных вариантов такого кодирования авторы приходят к выводу, что ни один из предложенных кодов не удовлетворяет реально наблюдаемым структурным соотношениям в полипептидных цепях. Вопрос оказывается гораздо более сложным и требует новых поисков, а может быть, и принципиально иного подхода к проблеме взаимодействия нуклеопротеидов и белка.

В целом настоящий сборник, демонстрирующий различные пути применения физики в биологии и возникающие здесь сложные и трудные задачи, будет весьма полезен и интересен не только лицам, интересующимся биофизикой, но и широкому кругу читателей-биологов.

Следует учесть, однако, что представленные в настоящем сборнике статьи касаются лишь отдельных, в значительной мере случайно подобранных вопросов и не могут служить характеристикой взаимоотношений физики и биологии в целом.

Необходимо также подчеркнуть следующее: статьи, публикуемые в настоящем сборнике, убедительно доказывают, что изучение физических свойств жизненных структур и физических процессов в живом организме отнюдь не упрощает наш подход к биологическим явлениям

и не ведет к примитивизации ; наоборот, применение биофизических методов дает возможность реально выявить своеобразие и специфику жизненных явлений, неповторимых и принципиально несравнимых с явлениями и процессами в неорганическом мире.

Биофизика отнюдь не стирает грани между живым и неживым, а более глубоко раскрывает особый характер и особые условия возникновения и течения биологических процессов.

Проф. Г. М. Фракк

КИНЕТИКА ОБМЕНА ЖЕЛЕЗА

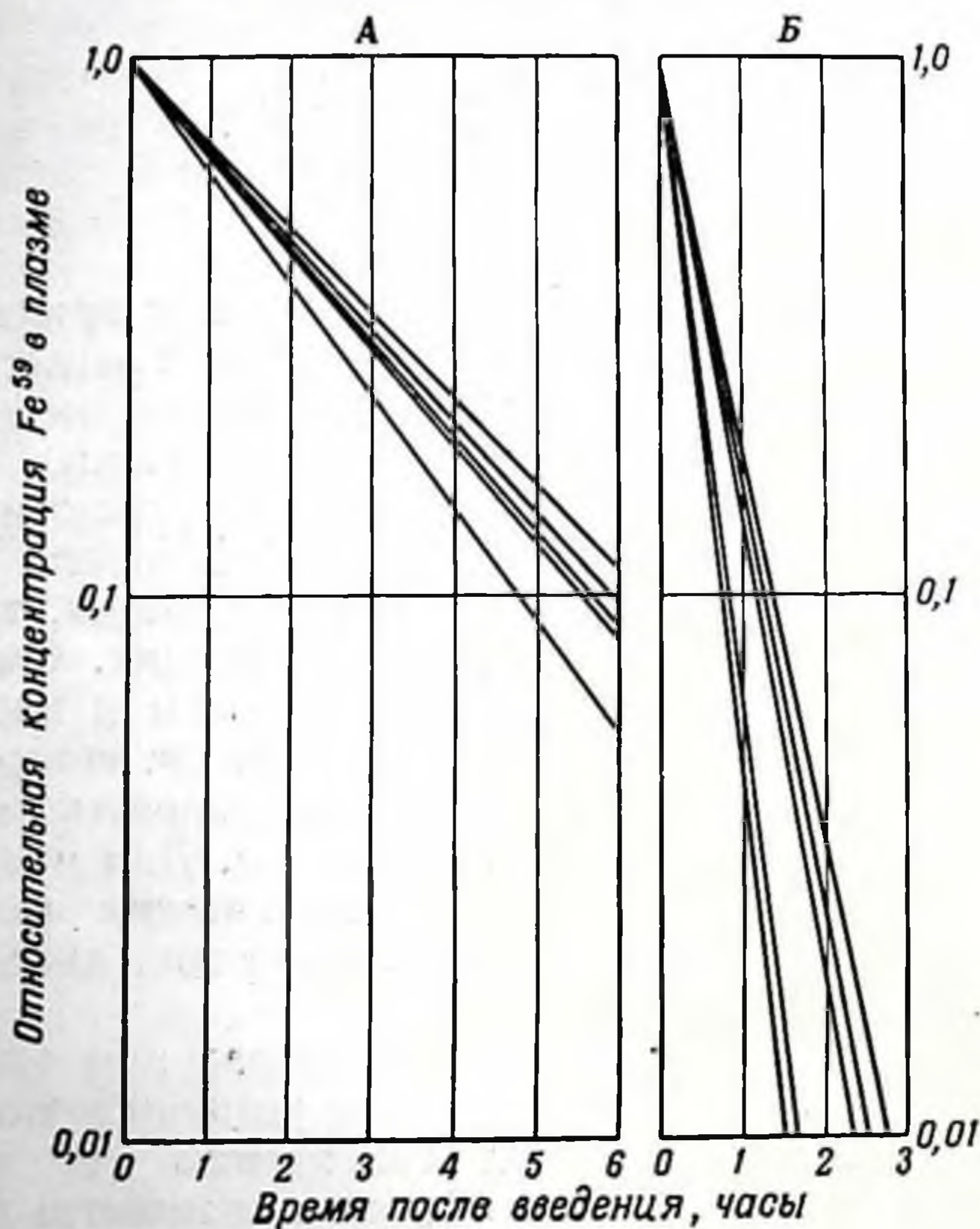
Р. ХАФФ и О. ДЖАДД

В настоящее время в основном благодаря применению изотопов появилась возможность изучить процесс образования и разрушения эритроцитов. Наиболее существенное значение в таких исследованиях имеют изотопы C^{14} , N^{15} , P^{32} , Cr^{51} , Fe^{55} и Fe^{59} . Из них только Fe^{59} испускает жесткое γ излучение; эта очень важная особенность делает данный изотоп незаменимым как в клинических, так и в углубленных гематологических исследованиях. Сопоставляя радиоактивность эритроцитарной массы и плазмы в пробах крови с активностью, измеряемой на поверхности тела, можно довольно точно определить скорость переноса железа в различных участках организма. Для получения более детальных сведений о биохимических реакциях исследуют радиоактивность соответствующих химических фракций.

Настоящий обзор посвящен исследованиям кинетики Fe^{59} у человека. Основное внимание уделяется математической обработке данных по обновлению Fe^{59} плазмы с учетом скоростей этого обновления и количества неплазменного железа, поступающего в обменный фонд из разных источников. Обработку данных производили при помощи счетной машины, которая решала уравнения, составленные для кинетических моделей, приближенно отображающих соответствующие биологические процессы.

Исходя из того, что организм представляет собой термодинамически открытую систему и что в обмене с внешней средой участвует железо, следует ожидать, что железо в плазме должно обновляться с постоянной скоростью. Значение этой скорости можно определить по данным фиг. 1, А, где в полулогарифмической шкале изображена зависимость относительной концентрации Fe^{59}

в плазме от времени, протекшего после однократного внутривенного введения Fe^{59} здоровым людям. Железо для внутривенного введения готовили в той химической



Ф и г. 1. Зависимость относительной концентрации Fe^{59} в плазме от времени после однократного внутривенного введения [5].

А — здоровые люди ; Б — больные полицитемией.

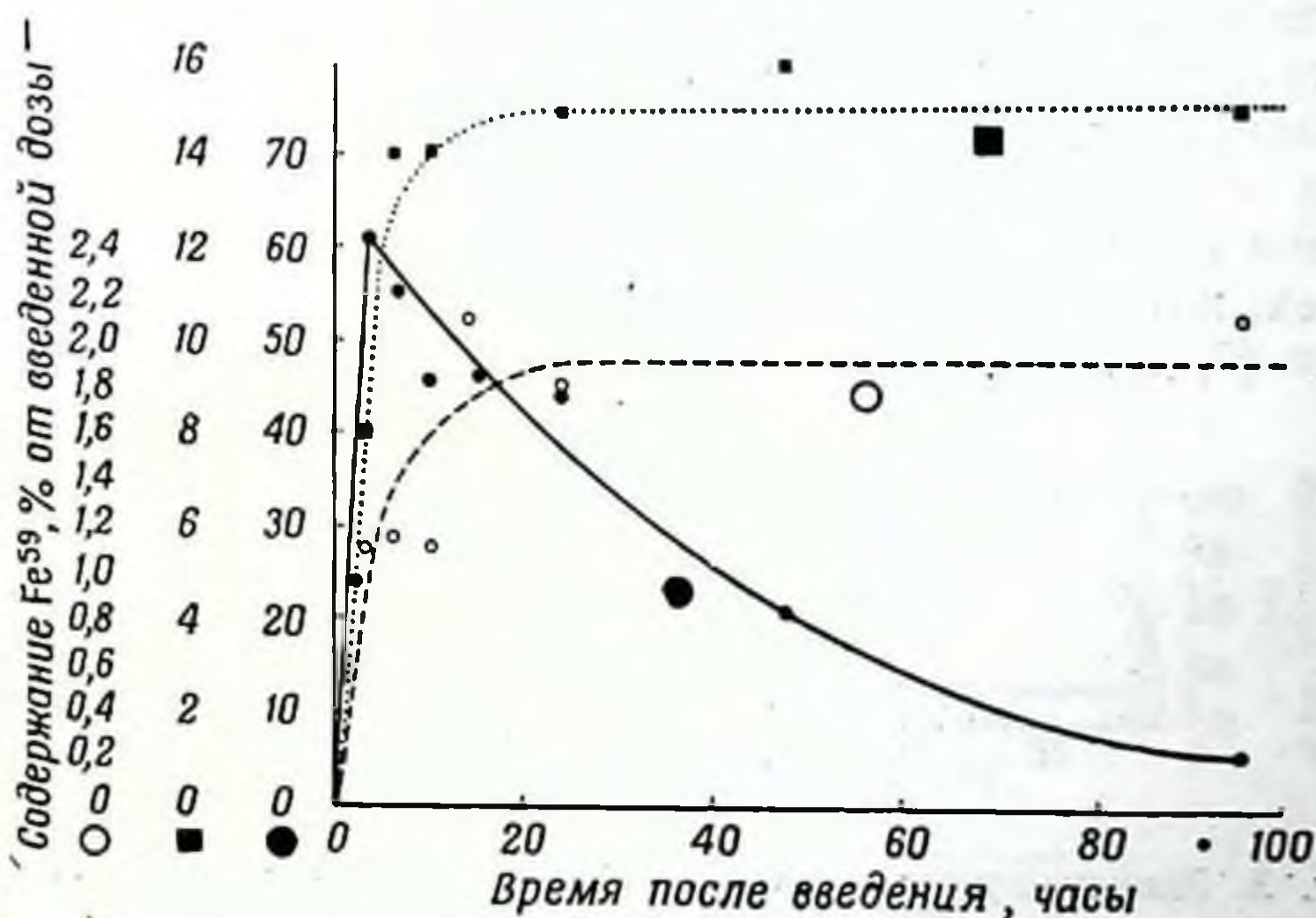
форме, в которой оно обычно находится в плазме [5, 9, 12, 15, 16, 20]; количество вводимого меченого железа составляло всего 20 μg , так что общее содержание железа в плазме после введения такой дозы заметно не изменялось.

В начальный период после введения меченого железа

изменение его концентрации можно описать известным дифференциальным уравнением реакции первого порядка

$$\frac{dA}{dt} = -kA, \quad (1)$$

где A — количество изотопа в момент времени t , k — коэффициент, имеющий размерность час⁻¹ и характеризующий скорость (или время) реакций. Чтобы можно было использовать уравнение (1) для расчета скорости обновления железа, необходимо знать общее содержание железа в плазме. При непродолжительном исследовании содержание железа можно считать практически постоянным; для его определения применяют обычные методы [10].

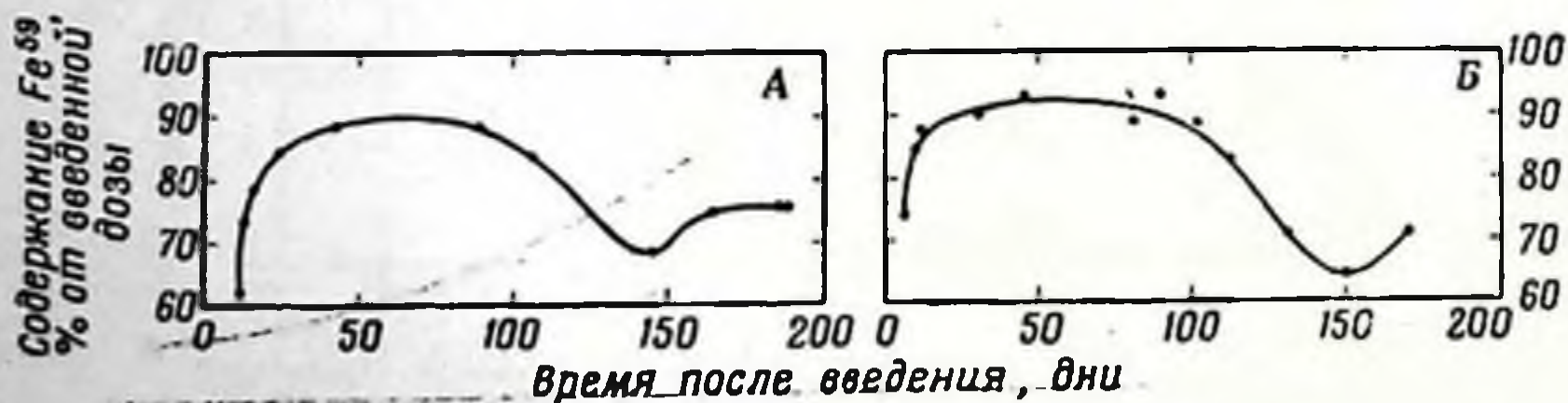


Ф и г. 2. Зависимость содержания Fe^{59} (в % от введенной дозы) в селезенке, печени и костном мозге от времени после однократного внутривенного введения [6].

○ селезенка; ■ печень; ● костный мозг. Каждая точка получена на основании среднего из данных, полученных по трем животным.

Общее содержание железа в плазме равно произведению объема плазмы на концентрацию железа, а скорость обновления определяется произведением коэффициента скорости на общее содержание железа в плазме. Вычисленная таким образом (на основании данных, представленных на фиг. 1, А) скорость обновления у пяти обследуемых

дованных здоровых людей варьировала в пределах 20—37 мг/сутки; ее среднее значение составляло 27 мг/сутки. То обстоятельство, что количество обновляемого железа превышает количество железа, необходимое для синтеза гемоглобина, свидетельствует, по-видимому, об участии в обмене как „запасенного“ железа, так и железа ретикулоэндотелиальной системы, где оно находится в равновесии с железом, освобождающимся из гемоглобина разрушающихся эритроцитов. О переходе железа из плазмы в две указанные выше системы свидетельствует фиг. 2, где изображено изменение содержания Fe^{59} в тканях селезенки, печени и костного мозга крыс в зависимости от времени. Крыс забивали через различные промежутки времени после введения Fe^{59} и из исследуемых тканей изготовляли соответствующие образцы [6]. На людях проводили прижизненные измерения радиоактивности при помощи счетчика с коллиматором, помещенным в области крестца, печени и селезенки; результаты качественно не отличались от тех, которые были получены в острых опытах с животными [3, 8].

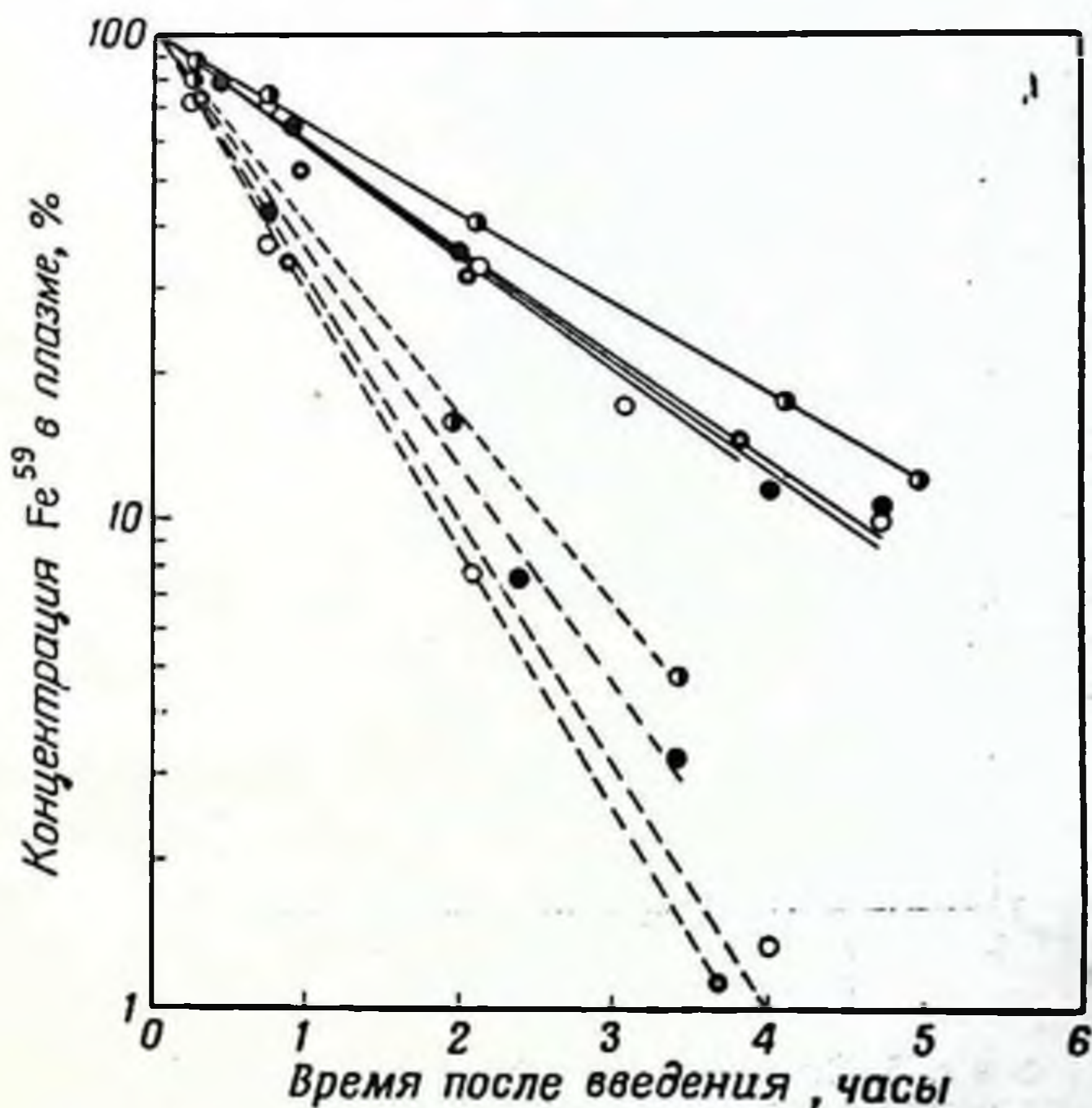


Ф и г. 3. Зависимость содержания Fe^{59} (в % от введенной дозы) в эритроцитах циркулирующей крови двух здоровых людей (А и Б) от времени после однократного введения глобулина-IV-7- Fe^{59} .

Ранние исследования показали, что большая часть радиоактивного железа накапливается в эритроцитах в течение 1—3 недель после введения [2, 4]. Эти результаты особенно отчетливы при высокой удельной активности препарата и при малом общем количестве вводимого железа. По нашим собственным данным, в эритроцитах здорового человека через 1—3 недели накапливается 70—90% введенной дозы железа, тогда как накопление практически всей введенной дозы в эритроцитах удавалось в некоторых

случаях обнаружить несколько позже—через 60—80 дней (фиг. 3).

Данные фиг. 1, Б свидетельствуют об ускоренном обновлении плазменного Fe^{59} у больных истинной полицитемией, для которой характерно увеличение общего

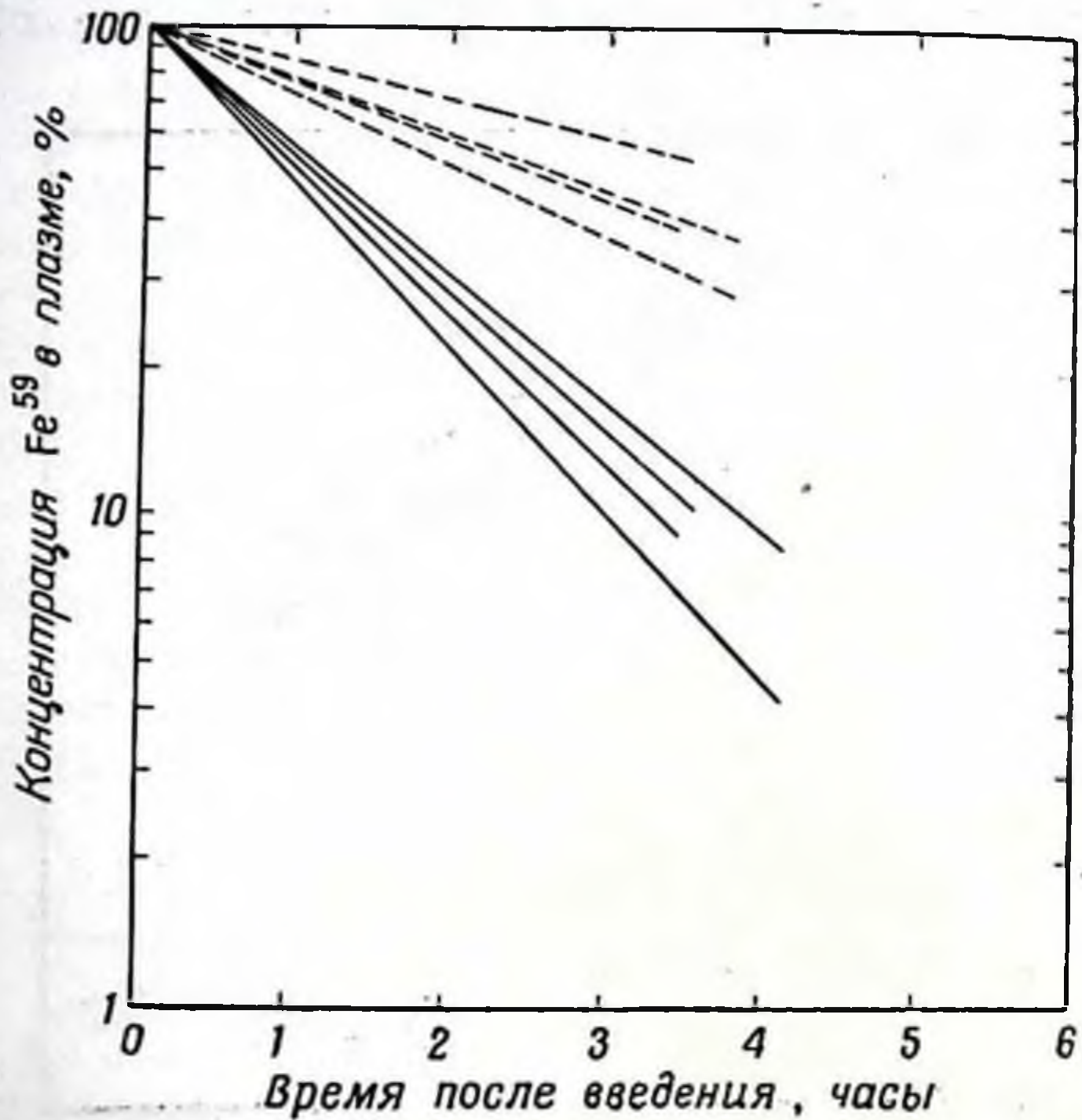


Ф и г. 4. Скорость обновления Fe^{59} в плазме на разных высотах над уровнем моря [7].

Сплошные линии — на уровне моря (норма);
пунктирные линии — после подъема на 4500 м.

количества эритроцитов, в то время как продолжительность жизни эритроцитов либо не отличается от нормальной, либо меньше. Фиг. 4 показывает, как изменяются те же параметры при перемещении здоровых людей с уровня моря на высоту 4500 м над уровнем моря [7, 11]. Известно, что на такой высоте наблюдается увеличение объема эритроцитов в циркулирующей крови, а следовательно, можно ожидать увеличения скорости обновления

Fe^{59} в плазме. На фиг. 5 представлены данные, соответствующие перемещению в обратном направлении (сверху вниз): когда индейцы, постоянно живущие на



Ф и г. 5. Скорость обновления Fe^{59} в плазме на разных высотах над уровнем моря [7].

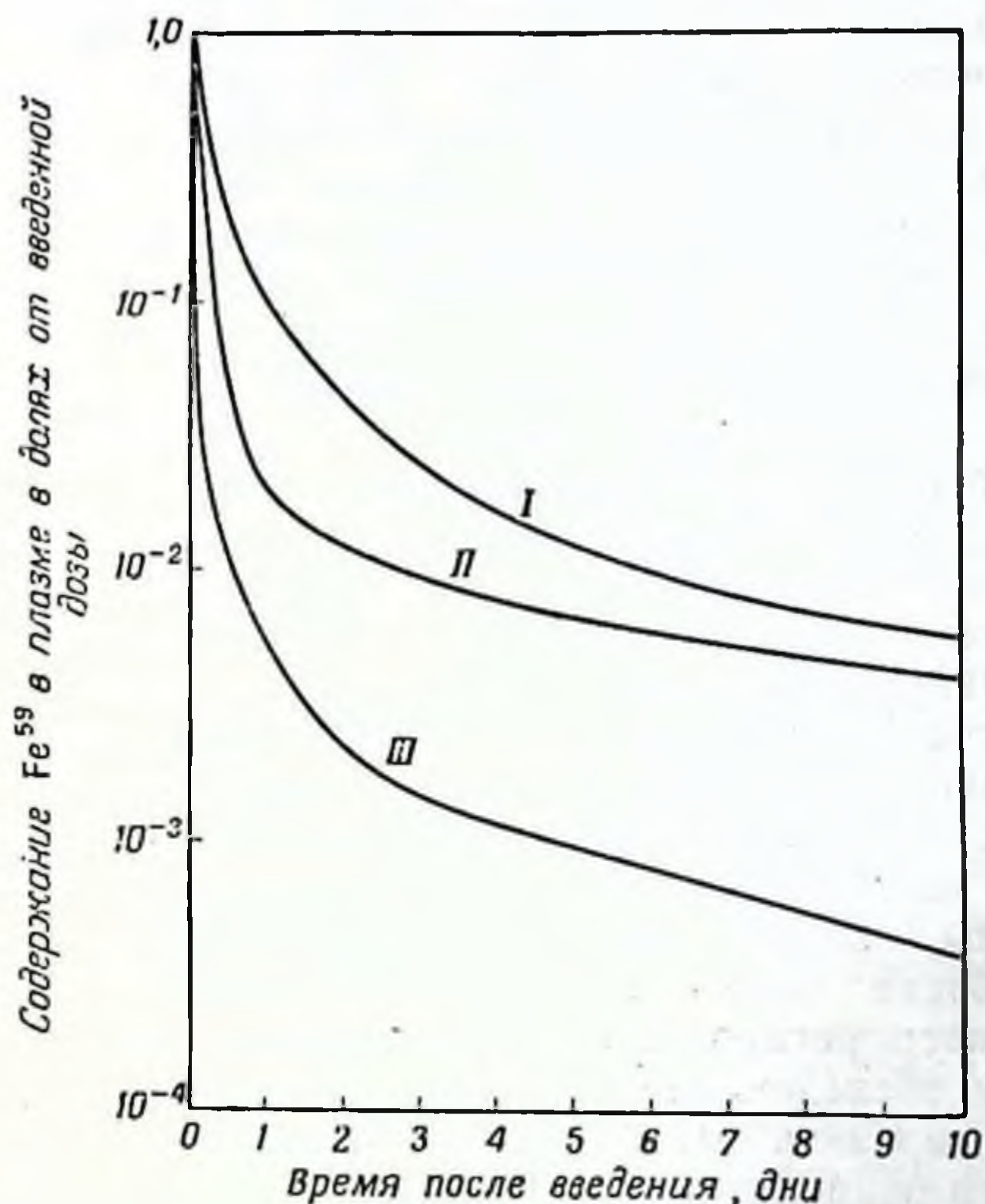
Сплошные линии — на высоте 4500 м (норма);
пунктирные линии — после спуска до уровня моря.

высоте 4500 м, спускались в местности, расположенные на уровне моря, происходило заметное снижение скорости обновления Fe^{59} в плазме [7, 11].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что скорость образования эритроцитов и скорость обновления железа плазмы взаимосвязаны; можно предполагать, что наблюдаемые отклонения от нормы удастся использовать для определения скорости образования эритроцитов.

Если кривая зависимости содержания Fe^{59} в плазме от времени вычерчена в полулогарифмической шкале, то для

небольших промежутков времени она очень мало отличается от прямой. Если же взятие проб продолжается более нескольких часов, отклонение от прямолинейности становится вполне явным; в этом случае кривую можно

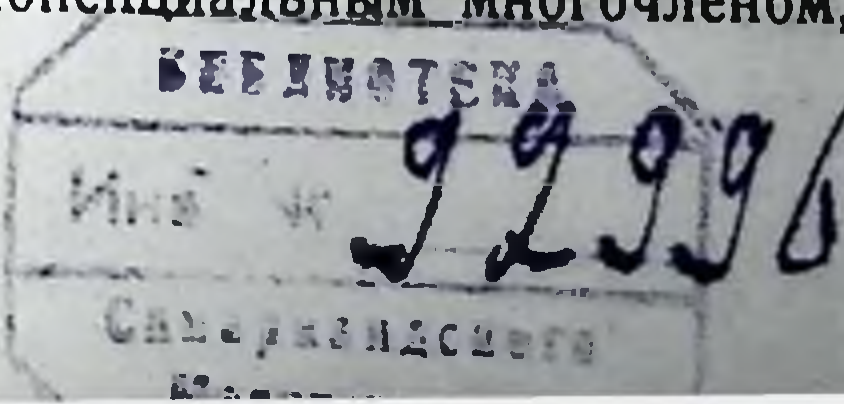


Ф и г. 6. Зависимость содержания Fe^{59} в плазме от времени после введения.

I — апластическая анемия ; II — норма ;
 III — истинная полицитемия.

описать экспоненциальным многочленом (фиг. 6). При некоторых нарушениях нормального состояния это отклонение от прямолинейности обнаруживается очень рано, что затрудняет определение угла наклона, используемого для вычисления скорости обновления.

Если полученные методом меченых атомов результаты удастся выразить таким экспоненциальным многочленом,



их можно интерпретировать при помощи соответствующих кинетических моделей. Исходное предположение, общее для всех подобных моделей, заключается в том, что система находится в термодинамически неравновесном, но стационарном состоянии; при этом стационарность поддерживается при участии внешних сил, но система в целом рассматривается как закрытая. Шеппард и Хаусхолдер [17] с различных точек зрения рассмотрели неразветвленные и разветвленные цепные системы, состоящие в общем случае из n звеньев; для рассмотрения более простых моделей они применяли некоторые специальные приемы. Соломон [18, 19] разработал простые модели некоторых биологических систем и при помощи соответствующих моделей математически обработал результаты исследований, проведенных методом меченых атомов.

Одди [13, 14] проанализировал тем же методом данные по кинетике ^{131}I и получил математические выражения для определения кинетических коэффициентов. Пользуясь этими выражениями, можно рассчитать соответствующие скорости, однако для этого необходимо знать общее количество стабильного изотопа в обменном фонде для одной из химических форм. Тобиас [21, 22], пользуясь моделью, состоящей из n звеньев, выразил математически результаты, полученные при помощи меченых атомов, и разработал показатели, на основании которых их можно интерпретировать. Исходя из данных, полученных нами при обследовании здоровых и больных людей, нам удалось выразить аналитически изменение содержания введенного радиоактивного железа в плазме в зависимости от времени, объема плазмы, объема эритроцитов и общей концентрации железа в плазме. Обработку полученных результатов производили в соответствии с разработанной нами кинетической моделью, имеющей определенный биологический смысл; скорости обмена между отдельными звеньями модели были подобраны в соответствии с реально полученными данными.

Были разработаны две модели¹. Первая (изображенная на фиг. 7, А) имеет вид неразветвленной цепи, вторая

¹ В 1953 г. Полликов и Мортимер предложили более совершенную модель [23].

(фиг. 7, Б) — разветвленной. Системы описываются следующими уравнениями:

$$\frac{dU}{dt} = -k_1U + k_2V; \quad (2)$$

$$\frac{dV}{dt} = +k_1U - (k_2 + k_3)V + k_4W; \quad (3)$$

$$\frac{dW}{dt} = +k_3V - (k_4 + k_5)W; \quad (4)$$

$$\frac{dX}{dt} = -k_1X + k_2Y; \quad (5)$$

$$\frac{dY}{dt} = +k_1X - (k_2 + k_3 + k_5)Y + k_4Z; \quad (6)$$

$$\frac{dZ}{dt} = +k_3Y - k_4Z; \quad (7)$$

$$\frac{dM}{dt} = +k_5Y - k_6M. \quad (8)$$

Наиболее существенное значение для кинетической характеристики модели имеет отыскание параметров k_i — кинетических коэффициентов. Переменные величины в уравнениях (2—8) соответствуют количеству меченого вещества в обменных фондах и выражаются в долях от введенной дозы радиоактивного железа; коэффициенты k_i имеют размерность %/сутки.

Легко показать, что если начальные условия заданы в виде начальных значений меченых фракций V и Y , то изменение этих переменных во времени удастся выразить аналитически в виде суммы не более чем трех экспоненциальных функций. Простота аналитического выражения и возможность приписать каждому из слагаемых вполне определенный биологический смысл заставляют предпочитать именно такого рода модели; этот выбор не исключает, однако, применимости и других моделей, более сложных.

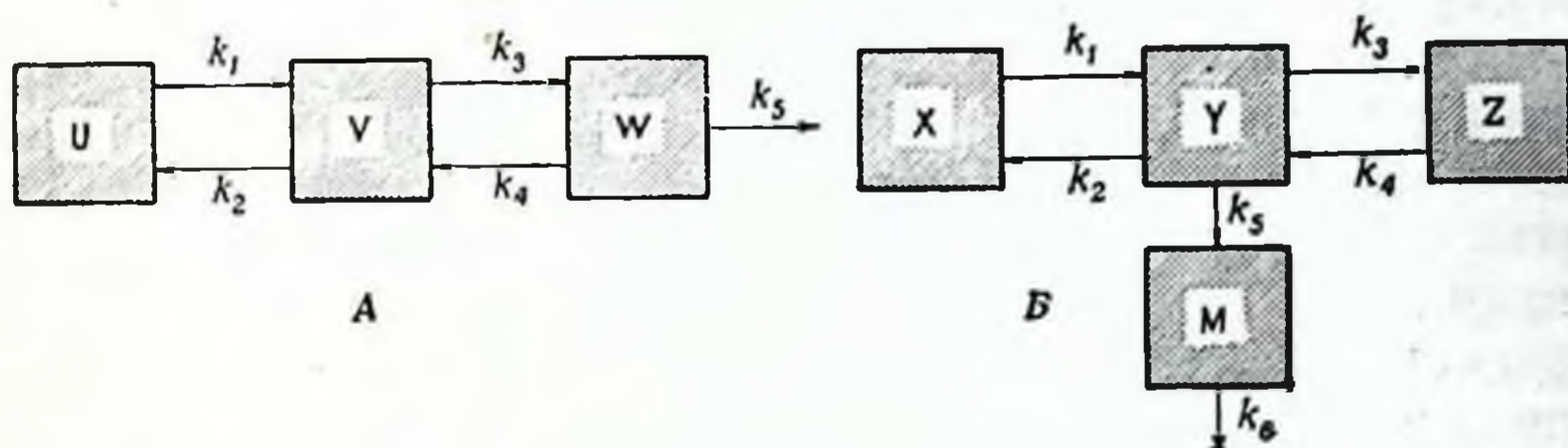
Для решения систем уравнений, отображающих те или иные процессы в соответствии с принятыми кинетическими моделями, Броунелл [1] предложил использовать моделирующую счетную машину. Мы применили в наших исследованиях счетную машину С-302 фирмы „Reeves Instru-

ment Co.“; задание параметров на этой машине осуществляется потенциометрически, и их значение легко можно изменять в широких пределах. Практически электронному аналогу задают вначале грубо ориентировочные параметры модели, а затем подбирают более реальные значения, на основании которых машина решает уравнения. Машина может давать также и графическое изображение каждой из переменных; это позволяет подбирать значения параметров, непосредственно наблюдая за результирующим графиком и добиваясь плавным изменением параметров соответствия между графиком, даваемым машиной, и фактическими данными, полученными в опыте.

При введении Fe^{59} относительное содержание его в плазме изменяется от 1 в начальный момент (при $t = 0$) до величин менее 10^{-3} в конце исследований. Изменение содержания Fe^{59} в плазме у каждого из обследованных обычно изображают в полулогарифмической шкале, как на фиг. 6, и сопоставляют полученные кривые, сравнивая наклон отдельных участков. Чтобы облегчить анализ этих кривых и определить кинетические коэффициенты при помощи счетной машины, решающей уравнения для заданной модели, необходимо представить экспериментальные данные в декартовых координатах, что позволит непосредственно сравнивать их с графиком, полученным на счетной машине. Так как функция убывает очень быстро, необходимо ввести изменение масштаба по оси ординат по мере увеличения промежутка времени после введения; такое изменение масштаба (мы пользовались 10-кратным увеличением) обеспечивает достаточную точность сравнения кривых. В схеме счетной машины было предусмотрено усиление выходного сигнала [$V(t)$ или $Y(t)$] в 10 раз, как только кривая опускалась так, что ордината уменьшалась до $1/10$ всей шкалы самописца. Графики функций $V(t)$ или $Y(t)$, полученные при помощи счетной машины, сличали с экспериментальными данными прямым наложением кривых при рассматривании их на просвет в эпидиаскопе. Такой метод давал вполне удовлетворительные результаты и позволял быстро осуществлять количественный контроль.

Неточность результатов, получаемых при помощи счетной машины, нарастает с течением времени. Однако

расчет показал, что расхождение не превышает 1%, т. е. оказывается в пределах ошибок опыта. Погрешность экспериментальных результатов при определении Fe^{59} в плазме в начале измерений составляла около 1%, затем с течением времени возрастала почти линейно и в конце исследования достигала максимального значения 10%.



Ф и г. 7. Модели, используемые для воспроизведения кинетики обновления железа у людей.

Объяснение см. в тексте.

В моделях, изображенных на фиг. 7, звенья V и Y представляют все введенное Fe^{59} , содержащееся в плазме; в начальный момент времени все меченое железо находится в этих звеньях. На фиг. 7, А звено U представляет ту долю железа, которое не включается во вновь образуемые эритроциты, но обменивается с железом плазмы. Железо кроветворной системы, соответствующее звену W, состоит из: 1) железа, включаемого во вновь образуемые эритроциты; 2) железа, обменивающегося с плазменным железом, и 3) железа, удаляемого из системы вместе с созревшими эритроцитами, покидающими место своего возникновения. Предполагается, что за время исследования только ничтожные количества радиоактивного железа могут попасть из эритроцитов обратно в плазму. Кроме того, очень низкая скорость выделения железа не позволяет обнаружить данным методом хоть сколько-нибудь заметный обмен радиоактивного железа с внешней средой. Это оправдывает отсутствие в модели звена, отражающего подобный механизм убыли индикатора.

Фиг. 7, Б изображает другой вариант модели; здесь X представляет систему резервного железа, которое

обменивается с железом плазмы и не обменивается непосредственно с железом зрелых эритроцитов. Звено Z представляет другую систему резервного железа, которое также участвует в обмене с плазменным железом и пополняется за счет железа, освобождающегося при разрушении старых эритроцитов. Звено Y соответствует плазме, все железо которой обменивается с системами X и Z и из которой железо поставляется в кроветворную систему M .

При составлении программы для моделирующей счетной машины были использованы усредненные данные, полученные при обследовании четырех здоровых людей (табл. 1). В качестве образца для программного моделирования были использованы только данные по плазме; расчетные данные представлены в табл. 2. Исходя из полученных кинетических коэффициентов и общего содержания железа в плазме (табл. 2), можно вычислить скорости обмена железа и его содержание в системах, соответствующих различным звеньям модели. Эти расчеты проделаны для обеих моделей в соответствии с решением уравнений стационарного состояния (последние получаются из уравнений (2—8) путем приравнивания нулю левых частей равенства) (табл. 1, 2).

Для четырех обследованных среднее содержание железа в плазме составляло 4,42 мг и было получено на основании 15 определений железа в плазме и 4 измерений объема плазмы. Концентрацию железа в плазме определяли по методу Кицеса и Эльвейема [10], а объем плазмы вычисляли путем экстраполяции содержания Fe^{59} в плазме к моменту $t = 0$. Было рассчитано количество железа, участвующего в обмене: для системы W оно составило 36,6 мг, а для системы U — 53,9 мг. Скорость перехода железа из W в эритроциты, т. е. $k_5 W$, была равна 16,6 мг/сутки. Исходя из средней продолжительности жизни эритроцитов, можно определить скорость обновления железа в системе W , соответствующую скорости обновления эритроцитарного железа в циркулирующей крови, если известно общее их количество в норме. Для четырех здоровых людей средний суммарный объем эритроцитов в циркулирующей крови составил 2116 см³. Если принять, что в 1 см³ объема эритроцитов содержится 1 мг железа и что средняя продолжительность жизни эритроцитов

Таблица 1

ДАННЫЕ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ПРИ СОСТАВЛЕНИИ ПРОГРАММЫ ДЛЯ МОДЕЛИРУЮЩЕЙ СЧЕТНОЙ МАШИНЫ

№ прото- кола	1-й этап*		2-й этап*		3-й этап*		Объем плазмы и эритроцитов циркулирующей крови, мл			Содер- жание Fe в плазме, μг/мл	
	исходное содержа- ние Fe ⁵⁹ в плазме	время полувыве- дения, дни	исходное содержа- ние Fe ⁵¹ в плазме	время полувыве- дения, дни	исходное содержа- ние Fe ⁵⁹ в плазме	время полувыве- дения, дни	определенный при помощи Fe ⁵¹ плазма	эрит- роциты	определенный при помощи P ² плазма		эрит- роциты
Здоровые люди											
1	0,970	0,104	0,020	0,770	0,010	7,0	3000	2460			2,0; 1,9
2	0,970	0,075	0,020	0,688	0,010	3,0	2340	1910			1,0; 0,9
3	0,974	0,100	0,025	1,720	0,001	33,0	2040	2240			1,9; 2,1; 2,0; 2,1; 2,1; 2,1
4	0,937	0,109	0,056	0,500	0,007	4,0	2090	1855			1,4; 1,9; 2,0; 2,0; 1,8
Среднее	0,963	0,097	0,03	0,92	0,007	11,75					
Больные истинной полицитемией											
15	0,957	0,015	0,038	0,166	0,005	2,38	2475	2905	1735	2646	0,5; 0,5; 0,6; 0,6
16	0,961	0,027	0,030	0,400	0,009	2,20	1775	10045	1652	6610	2,3; 2,3 1,2
17	0,975	0,021	0,023	0,370	0,0023	3,78	1574	6296			
Среднее	0,964	0,022	0,030	0,312	0,0054	2,79					
Большой апластической анемией											
9	0,791	0,167	0,19	0,75	0,019	5,75	3500	2070	3347	1255	2,9; 3,6; 3,4

* Содержание Fe⁵⁹ в долях от введенной дозы определяли на трех последовательных этапах после введения.

Таблица 2

РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТОВ, ПРОВЕДЕННЫХ НА ОСНОВАНИИ МОДЕЛЕЙ, ИЗОБРАЖЕННЫХ НА ФИГ. 7 (А и Б)

	Норма (4 человека)		Истинная полицитемия (3 человека)	Истинная полицитемия (1 человек, протокол № 17)	Апластическая анемия (1 человек)
	фиг. А	фиг. Б			

	Значение параметров k_i , %/день				
k_1	11,5	12,0	45,0	34,0	1,2
k_2	140,0	80,0	95,0	495,0	160,0
k_3	55,0	200,0	2850,0	960,0	120,0
k_4	26,1	62,0	82,0	280,0	108,0
k_5	45,0	395,0	240,0	2000,0	50,0
k_6		40,0		44,0	40,0

Вычисленные количества железа (мг), находящегося в равновесии в различных звеньях моделей

U	53,9		2,27		
V	4,42*		1,08*		
W	35,58		9,52		
X		29,5		27,5	1485,0
Y		4,42*		1,89*	11,13*
Z		14,28		6,47	12,37
M		43,7		85,9	13,81

* Измеренные количества железа.

соответствует 125 дням, то скорость обновления железа будет равна 16,93 мг/сутки. Это значение хорошо соответствует скорости обновления, полученной при помощи счетной машины.

Количество участвующего в обмене железа в системе U (53,9 мг) оказалось в действительности значительно ниже, чем предполагалось, в системе W (36,6 мг) — лишь несколько ниже.

Воспроизведение экспериментальных данных в соответствии с моделью, изображенной на фиг. 7, Б, привело к значению 16,5 мг/сутки для величин k_5Y и k_6M , что близко к значению 16,1 мг/сутки для k_5W первой модели. Общий обменный фонд систем X и Z составил 43,8 мг, что сравнимо со значением 53,9 мг для U . Общее количество железа в системах U , V и W равно 94,9 мг, а в X , Y , Z и M — 91,9 мг. Так как из условий стационарности для второй модели однозначно определяется не M , а только k_6M , то соответствие общего содержания железа для каждой из моделей можно считать случайным. Чтобы решить, какая из двух моделей более точно отображает реальные процессы, нужны дополнительные сведения, помимо имеющихся биологических данных о кинетике „резервного железа“ и (или) „железа ретикулоэндотелиальной системы“.

Кроме обследования здоровых людей, были проведены также обследования двух групп больных; одна состояла из трех больных истинной полицитемией — болезнью, характеризующейся, в частности, быстрым выведением меченого железа из плазмы, а другая — всего из одного больного апластической анемией, при которой очищение плазмы от радиоактивного железа происходит очень медленно.

Для воспроизведения данных по изменению содержания радиоактивного железа в плазме в зависимости от времени у больных истинной полицитемией была применена модель, изображенная на фиг. 7, А. Данные, полученные при обследовании трех больных, были, как и для здоровых людей, усреднены.

Кинетические коэффициенты определяли при помощи счетной машины, исходя из уравнений стационарного состояния; среднее измеренное содержание железа в плазме было равно 1,08 мг; отсюда было определено, что

количество железа, обменивающегося с плазмой и не включающегося в незрелые эритроциты (звено U), составляет 2,27 мг, а количество железа, поступающего во вновь образующиеся эритроциты (звено W), — 9,52 мг. Произведение $k_5 W$, характеризующее скорость перехода железа в эритроциты, по расчету оказалось равным 23,03 мг/сутки.

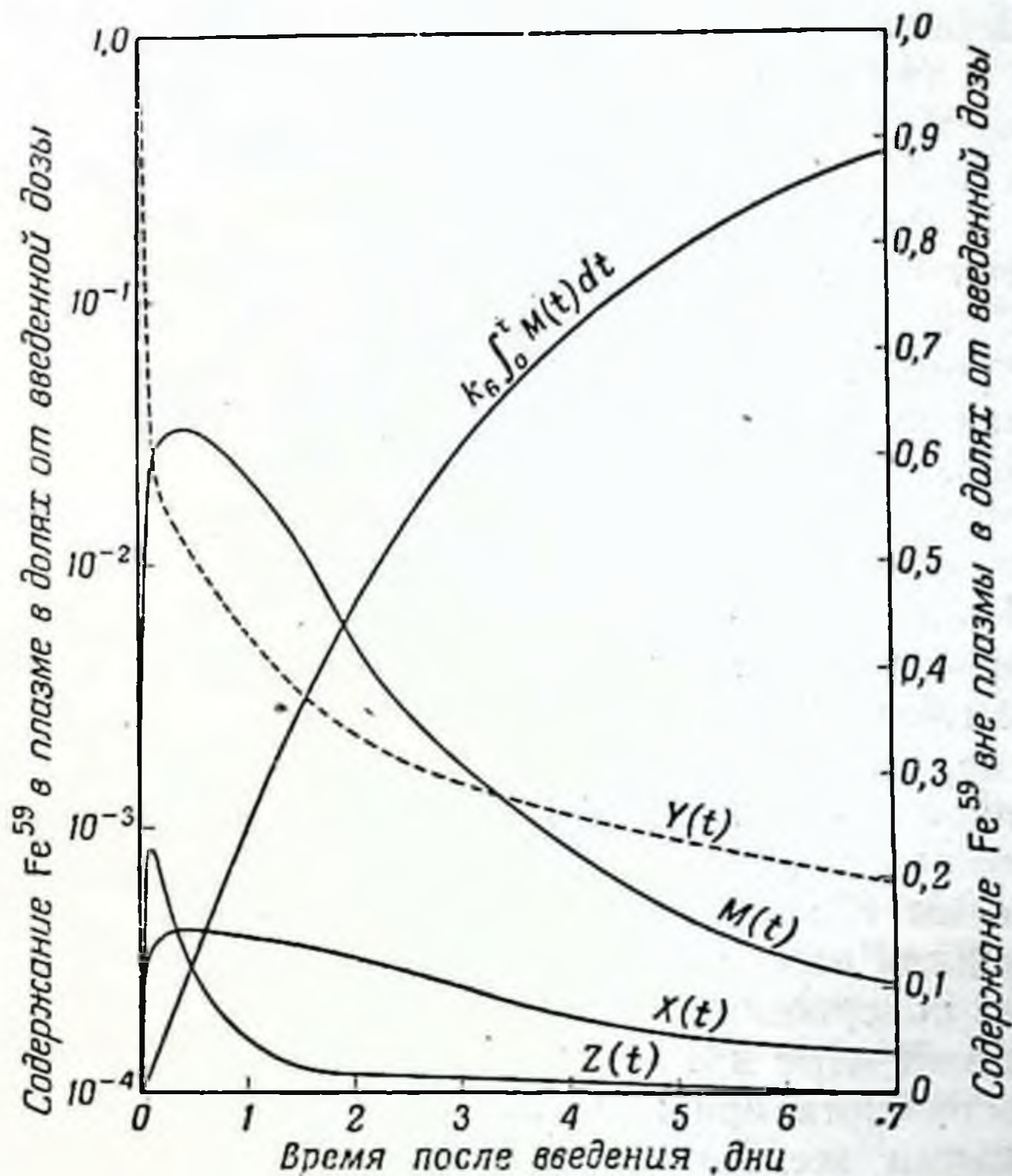
Вряд ли на основании этих данных можно судить о продолжительности жизни эритроцитов, ибо усреднялись результаты обследования трех больных, у которых течение болезни и терапевтические воздействия были, несомненно, различны. Чтобы судить о продолжительности жизни эритроцитов у таких больных, необходимо тщательно исследовать, выполняются ли в каждом случае условия стационарности состояния, ибо вполне возможны значительные отклонения от стационарности.

В соответствии с моделью, изображенной на фиг. 7, Б, для одного из больных полицитемией (протокол № 17) были получены следующие результаты: количество резервного железа, находящегося в равновесии с плазмой, — 27,5 мг, количество железа в ретикулоэндотелиальной системе — 6,47 мг, в костном мозге — 85,9 мг. Для произведения $k_6 M$ получено значение 37,8 мг/сутки. На фиг. 8 изображены кривые, полученные для этого случая при помощи счетной машины. Наряду с кривыми, изображающими переменные, характеризующие указанную модель, на фиг. 8 приведена также функция $k_6 \int_0^t M(t) dt$, ранее не рассмотренная. Эта функция довольно хорошо отображает общий характер накопления радиоактивного железа в эритроцитах. Для более точного соответствия потребовалась бы функция более сложного вида. Приведенное простое выражение применимо при условии стационарности состояния. На фиг. 8 не представлены фактические результаты обследования больного, так как они с точностью до ширины линии, регистрируемой самописцем, совпадают с кривой, получаемой на счетной машине.

Общий объем эритроцитов в циркулирующей крови определяли косвенно — методом разведения плазмы (Fe^{59}); этот метод обычно дает несколько завышенные значения; причем степень отклонения не всегда одинакова. Поскольку изменения этого объема не поддаются оценке, вряд ли можно рассчитывать на получение истинных

значений для скорости обновления железа в эритроцитах.

Модель фиг. 7, Б была применена и для анализа результатов обследования больного апластической анемией. При



Фиг. 8. Результаты вычислений, проведенных на счетной машине, для больного, страдающего истинной полицитемией (протокол № 17). Вычисления проведены на основании модели, изображенной на фиг. 7, Б. Кривые изображают содержание Fe^{59} в различных звеньях модели в долях от введенной дозы в зависимости от времени после однократного внутривенного введения. Левая ось ординат относится только к $Y(t)$.

этом заболевании в большей или меньшей степени нарушается включение железа в гемоглобин эритроцитов; по видимому, это связано с задержкой созревания эритроцитов. Действительно, оказалось, что за время обследования у этого больного проникла в эритроциты всего только $1/10$ введенного Fe^{59} . Эта величина сравнима с величиной $k_6 \int_0^t M(t) dt$, полученной на счетной машине.

Прижизненные измерения, проведенные при помощи счетчика, приложенного к телу в области печени, показали, что нарастание скорости счета не прекращается с самого начала и до конца обследования. Из этого следует, что коэффициент k_5 приблизительно в 10 раз меньше, чем в норме, а также что возврат железа из X (в данном случае из резерва) очень мал. Вычисленные значения для скоростей $k_5 Y$ и $k_6 M$ составили 5,5 мг/сутки. Такая скорость примерно в 3 раза меньше, чем в норме, и если бы у больного человека продолжительность жизни эритроцитов не отличалась от нормальной, то это означало бы, что у больного в эритроцитах циркулирующей крови содержится почти в 3 раза меньше железа, чем у здорового. Если известно, что больному делали вливание крови, то определить относительные количества введенных извне и „собственных“ эритроцитов весьма затруднительно. У больного апластической анемией в обменном фонде X (в данном случае — резервное железо) оказалось 1485 мг железа, т. е. почти в 50 раз больше, чем в норме (29,5 мг). Как и у здорового человека, это резервное железо не отложено в качестве „неприкосновенного запаса“, но находится в состоянии непрерывного обмена и динамического равновесия с железом плазмы. В период обследования больному неоднократно производили вливание крови (с терапевтическими целями), и общее содержание железа в его организме увеличилось по крайней мере в 3—4 раза. Приведенные выше расчеты дают основания предполагать, что для определения общего содержания железа в организме метод исследования с применением Fe^{59} вполне пригоден. Следует отметить, что состояние при апластической анемии нельзя, в сущности, считать стационарным; это означает, что за счет поступления эритроцитарного железа извне (при вливаниях крови) должно увеличиваться и общее содержание железа в этом обменном фонде. Однако отклонения от стационарности за время обследования, по-видимому, не настолько велики, чтобы был оправдан переход к более сложной кинетической модели.

Мы считаем, что примененные нами модели достаточно хорошо отображают исследуемые биологические процессы и являются вместе с тем наиболее простыми как по общей схеме, так и в отношении математической обработки.

Мы не рассмотрели здесь два вопроса, имеющие непосредственное отношение к обмену железа в организме, а именно, вопросы об изменении содержания Fe^{59} в эритроцитах и в их незрелых формах в костном мозге в зависимости от времени. Однако подобные данные легко получить только для плазмы и эритроцитов. Существует множество других железосодержащих пигментов, например пероксидаза, цитохром, миоглобин и каталаза, по которым сведения об обновлении в них железа либо очень скудны, либо совершенно отсутствуют. В примененной модели не учтена и другая биологически важная сторона общего обмена железа в организме — всасывание железа в кишечнике и обмен его с плазмой, а также обратный цикл перехода железа из плазмы в желчь, затем из желчи в кишечник и из него снова в плазму. Наличие промежутков между едой, т. е. неравномерность поступления железа с пищей, вызывает отклонения от стационарности. В данной работе это обстоятельство не учитывалось; для того чтобы учесть его, необходима несколько иная обработка получаемых результатов.

Полное моделирование всей системы обмена железа в организме (которое можно было бы осуществить при наличии соответствующих биологических данных) представляет, по-видимому, очень сложную и трудно разрешимую задачу. По предварительной оценке требуется примерно 30 взаимосвязанных радиотехнических блоков; для их регулировки при вычислениях необходимо подобрать 15—20 параметров, причем относительно большинства из них нет даже грубо ориентировочных данных. Эти параметры соответствуют кинетическим коэффициентам k_i модели, и их величины могут различаться в 1000 раз, что очень затрудняет подбор соответствующих значений.

По нашему мнению, основное достоинство использования простых моделей при анализе данных, полученных методом меченых атомов, состоит в том, что таким образом можно выяснить характер недостающих сведений и установить направление будущих экспериментов, предназначенных для получения более исчерпывающих результатов. Так, например, помимо имеющихся данных об изменении концентрации радиоактивного железа в плазме в зависимости от времени, требуются сведения о продол-

жительности жизни эритроцитов, о характере процесса их воспроизведения, о роли ретикулоэндотелиальной системы и значении железосодержащих пигментов при образовании и дальнейшем развитии незрелых форм эритроцитов, а также об обновлении в них железа. Кроме того, необходимо точно установить абсолютные значения для общего содержания железа в каждой из систем, соответствующих отдельным звеньям кинетической модели. Все эти данные необходимо получить одновременно при всестороннем обследовании одного и того же человека. В тех случаях, когда у больных наблюдаются заметные отклонения от стационарного состояния, особенно важно изучить всю историю болезни. Только при этом условии результаты, полученные при помощи моделирующей счетной машины, будут полноценны. Вообще говоря, клинически выраженное заболевание представляет новое (более или менее устойчивое) стационарное состояние; при этом необходимо учитывать, что при заболеваниях, связанных с нарушением обмена железа в организме, всегда применяются различные терапевтические воздействия (например, кровопускания при полицитемии или гемохроматозах), а также вливания крови, которые могут привести к различным отклонениям от стационарного состояния. С другой стороны, отклонения от исходного стационарного состояния, не приводящие к установлению нового стационарного состояния, должны также рассматриваться как заболевание. Возможность выявления таких нарушений методом меченых атомов зависит от скорости, с которой эти изменения происходят. Если эти изменения наступают быстро, то в экспоненциальном многочлене, описывающем поведение изотопа, могут оказаться как бы лишние члены. Если же изменения происходят относительно медленно, то могут получиться неправдоподобные значения для скоростей обновления железа в системах, которым соответствуют различные звенья модели.

Второе достоинство использования простых моделей состоит в том, что этот метод позволяет немедленно установить диагноз и назначить лечение при таких заболеваниях, которые практически не удается исследовать другими методами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brownell G. L., J. Clin. Endocrinol., **11**, 1095 (1951).
2. Dubach R., Moore C. V., Minnich V., J. Lab. Clin. Med., **31**, 1201 (1946).
3. Emlinger P. J., Huff R. L., Tobias C. A., Lawrence J. H., Acta Haematol., **9**, 73 (1953).
4. Hahn P. F., Advanc. Biol. Med. Phys., **1**, 283 (1948).
5. Huff R. L., Hennessy T. G., Austin R. E., Garcia J. F., Roberts B. M., Lawrence J. H., J. Clin. Invest., **29**, 1041 (1950).
6. Huff R. L., Bethard W. F., Garcia J. F., Roberts B. M., Jacobson L. O., Lawrence J. H., J. Lab. Clin. Med., **36**, 40 (1950).
7. Huff R. L., Lawrence J. H., Siri W. E., Wasserman L. R., Hennessy T. G., Medicine, **30**, 197 (1951).
8. Huff R. L., Emlinger P. J., Garcia J. F., Oda J., Cockrell M. S., Lawrence J. H., J. Clin. Invest., **30**, 1512 (1951).
9. Holmberg C. G., Laurell C. B., Acta Physiol. Scand., **10**, 307 (1945).
10. Kitzes G., Elvehjem C. A., Schuette H. A., J. Biol. Chem., **155**, 653 (1944).
11. Lawrence J. H., Huff R. L., Siri W. E., Wasserman L. R., Hennessy T. G., Acta Med. Scand. **142**, 117 (1952).
12. Laurell C. B., Acta Physiol. Scand., **14**, Suppl. 46 (1947.)
13. Oddie T. H., Brit. J. Radiol., **22**, 261 (1949).
14. Oddie T. H., Commonwealth of Australia, X-ray and Radium Lab. Tracer Elements Unit, Tech. Commun., № 41 (1950).
15. Schade A. L., Caroline L., Science, **100**, 14 (1944).
16. Schade A. L., Caroline L., Science, **104**, 340 (1946).
17. Sheppard C. W., Householder A. S., J. Appl. Phys., **22**, 510 (1950).
18. Solomon A. K., J. Clin. Invest., **28**, 1927 (1949).
19. Solomon A. K., Advanc. Biol. Med. Phys., **3**, 65 (1953).
20. Surgenor D. M., Koechlin B. A., Strong L. C., J. Clin. Invest., **28**, 73 (1949).
21. Tobias C. A., Excerpt from the Medical and Health Divisions Quarterly Report, April, May, June, 1948, Report № UCRL-157 (личное сообщение).
22. Tobias C. A., Physical Rev., **75**, 1460 (1949).
23. Polycove M., Mortimer R. K., Clin. Research Proc., **4**, 51 (1956).

ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Н. ФРИМАН

Введение

Среди различных специализированных отраслей спектроскопии изучение инфракрасных спектров приобрело наиболее широкое распространение. Оно находит применение в таких далеких друг от друга областях, как технология гончарного производства, парфюмерия и изучение структуры белков. Нетрудно найти причину этой исключительной многогранности. Она заключается в тесной связи между инфракрасными спектрами и молекулярной структурой. Эта связь дает возможность использовать инфракрасные спектры почти во всех отраслях химии, как чистой, так и прикладной, и, следовательно, в любых других науках, связанных с химией. В биологии значение детального исследования структур основных веществ, принимающих участие в жизненных процессах, все более возрастает. Для медицины, тесно связанной с биологией, также важно знать строение молекул; это может иметь значение для профилактики и понимания этиологии заболевания. Исследователи, работающие в этих областях, могут, естественно, спросить, какие особенно ценные для них результаты дала инфракрасная спектроскопия, в каком направлении она развивается и каковы возможности ее использования в будущем.

Первое время разработкой техники инфракрасной спектроскопии занимались лишь физики. Надо было исследовать эту область спектра и выяснить природу взаимодействия инфракрасного излучения с веществом. Необходимо было создать соответствующую оптику и приемники излучения. Вскоре, однако, выяснилось, что при наличии даже примитивной техники в инфракрасных спектрах поглощения многих веществ можно заметить связь между некоторыми

полосами поглощения и специфическими структурными особенностями поглощающих молекул. Первым исследователем, получившим инфракрасные спектры большого числа самых разнообразных соединений, был Кобленц [39], для которого было очевидно наличие связи спектров со структурой вещества. Однако в течение следующих 30 лет методы инфракрасной спектроскопии оставались сложными и трудными, поэтому исследований молекулярной структуры в широком химическом смысле почти не проводилось. Это было время, когда закладывались основы квантовой теории и выяснялась природа химических связей. Было установлено, что элементарный процесс поглощения света в значительной части инфракрасной области спектра заключается в возбуждении молекулярных колебаний, т. е. что квант падающей энергии преобразуется в колебательную энергию атомов, входящих в поглощающую молекулу. Была создана теория молекулярных колебаний и колебательных спектров; в этот период метод инфракрасной спектроскопии применяли в основном для проверки этой теории на таких простых молекулах, как HCl , H_2O , NH_3 , CO_2 и CH_4 , для которых необходимые математические расчеты могли быть выполнены с достаточной степенью точности. В процессе изучения как этих, так и других простых молекул были получены надежные данные, позволяющие приписывать характерные инфракрасные полосы поглощения определенным атомным группам и химическим связям. При распространении теории колебаний на все более крупные и сложные молекулы точный математический расчет становится невозможным. Однако, сделав соответствующие допущения и приближения, учитывающие данные, полученные на простых молекулах, и некоторые упрощения, обусловленные молекулярной симметрией (там, где эта симметрия существует), можно достаточно полно и логично интерпретировать спектры многих молекул, вплоть до молекул, достигающих размеров молекулы бензола, содержащей 12 атомов. Вообще говоря, при теоретических исследованиях желательно в дополнение к инфракрасному спектру исследовать также и спектр комбинационного рассеяния. Оба они отражают внутримолекулярные колебания, и данные, которые можно получить, исследуя эти спектры, часто дополняют друг

друга. В большей части исследований, имеющих практический характер, спектры комбинационного рассеяния используются относительно мало; поэтому ссылки на них будут встречаться лишь изредка. (Полное теоретическое обсуждение инфракрасных спектров и спектров комбинационного рассеяния см. у Герцберга [83]. Основы математических расчетов дали Гласстон [72] и Нильсен и Этьен [125].)

Принимая во внимание математические трудности, ясно, что для получения сведений о структуре огромного большинства химических соединений на основании их инфракрасных спектров приходится либо экстраполировать данные, полученные при изучении более простых родственных соединений, либо чисто эмпирически сопоставлять спектры со структурой, либо разумно комбинировать эти два метода. Эмпирический подход требует более усовершенствованных приборов, при помощи которых можно было бы снимать большое число спектров с достаточной достоверностью и с минимальной затратой времени и сил.

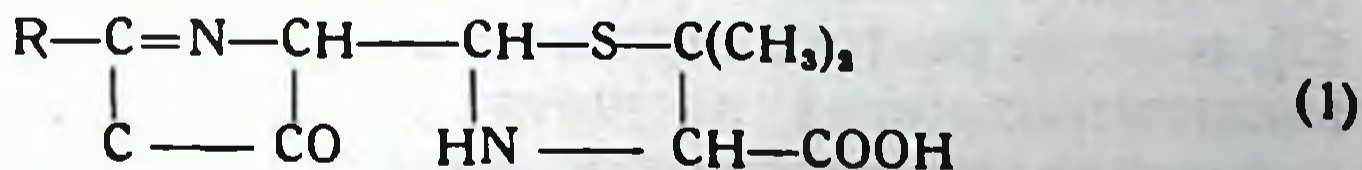
В 40-е годы нашего века физики добились первых необходимых технических успехов. В это время было уже осуществлено получение синтетическим путем больших высококачественных кристаллов щелочных галоидов, необходимых для изготовления призм и окошек. Решающее значение имело создание высокочувствительных малоинерционных приемников излучения. Наличие таких приемников позволило осуществлять прерывание светового пучка в спектрометре с частотой несколько раз в 1 сек., в результате чего создавался переменный сигнал, для которого можно было осуществить стабильное усиление и запись. Инфракрасные спектрометры появились в продаже, и, за исключением особых случаев, отпала необходимость в том, чтобы каждая лаборатория создавала свой собственный прибор.

С появлением фабричных спектрометров сразу расширился фронт работ по инфракрасной спектроскопии. Наличие приборов, позволяющих быстро и легко произвести большое число измерений, создало условия для применения инфракрасной спектроскопии в самых разнообразных областях. Если раньше этот метод использовали главным образом физики и физико-химики, зани-

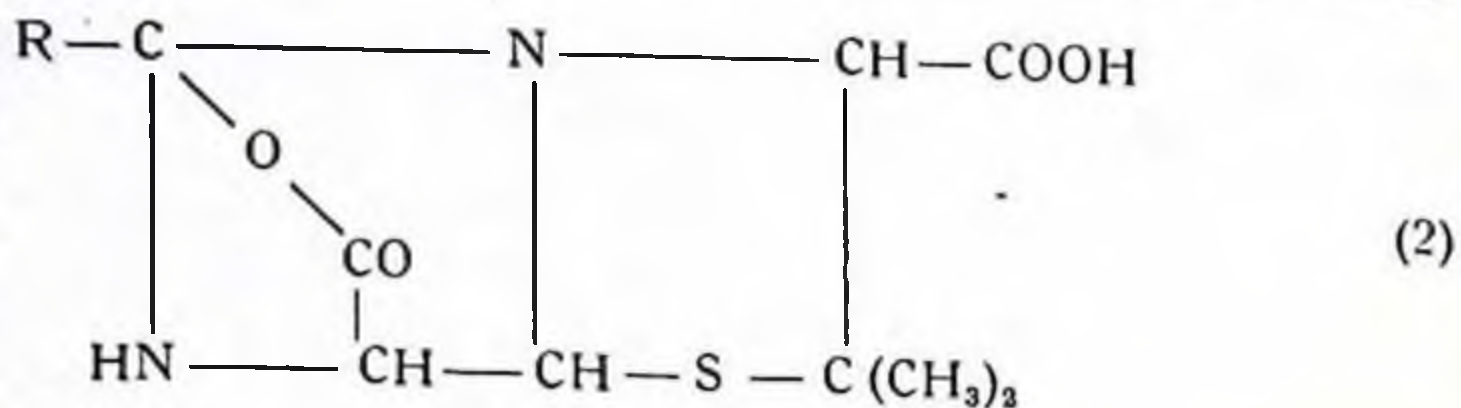
мавшися основными теоретическими проблемами и вопросами молекулярных колебаний, то теперь он быстро перешел в лаборатории химиков-органиков, которые увидели в нем ценное дополнение к имевшимся в их распоряжении многочисленным методам характеристики природных или синтетических соединений. Для химии нефти, в частности, особое достоинство этого метода заключалось в том, что он давал возможность различать изомерные углеводороды, поэтому в этой отрасли он использовался особенно часто. Инфракрасная спектрофотометрия стала удобным методом количественного анализа как углеводородных смесей, так и многих других веществ различной химической природы, в частности синтетических смол и высоких полимеров. Во многих достижениях биохимии, успехи которой имеют непосредственное значение для биологии и медицины, инфракрасная спектрометрия также играла большую роль. Для иллюстрации приведем два наиболее известных примера. Поскольку они уже подробно описаны, изложим кратко лишь основные идеи.

Первой из крайне важных для медицины проблем, решенной в основном методами инфракрасной спектроскопии, была проблема структуры пенициллина. В военные годы эта проблема считалась настолько важной, что во многих лабораториях США и Англии ей было посвящено множество совместных исследований, субсидированных государством. Материалы по истории этого исследования на всех его этапах собраны в труде Кларка, Джонсона и Робинсона [37]; гл. XIII, написанная Томпсоном, Браттеном, Рэндоллом и Расмуссенем, содержит данные, полученные методом инфракрасной спектроскопии. Независимо от этих работ Расмуссен [139] изложил некоторые общие соображения по поводу инфракрасной спектроскопии органических соединений.

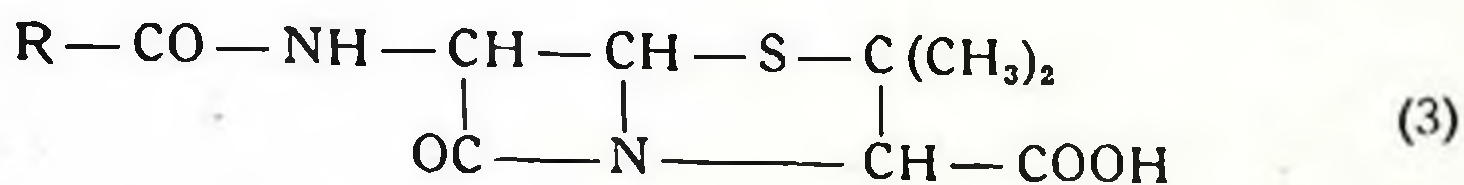
Коротко говоря, структурные исследования, проведенные классическими методами органической химии, свели число возможных структур пенициллина к трем:



Оксалоновая структура



Трициклическая структура

 β -Лактамная структура

При помощи одних только химических методов нельзя было окончательно решить вопрос о том, какая же из этих трех структур отражает действительную структуру пенициллина, но были серьезные основания считать структуру (2) наименее вероятной, а структуру (1) — наиболее вероятной. Результаты предварительного истолкования инфракрасных спектров пенициллина и некоторых из его производных в свете имеющихся данных указывали на наличие структуры (3), причем отправной точкой была длина волны полосы поглощения одной из карбонильных групп, занимавшей довольно необычное положение, — 5,62 μ . Были предприняты и успешно проведены синтезы некоторых модельных соединений, содержащих в расплавленном состоянии тиазолидин β -лактамную структуру (3), и в спектрах этих соединений были обнаружены полосы поглощения, очень близкие к 5,62 μ . Структура (3) стала казаться более вероятной, чем структуры (1) и (2), и когда рентгеноструктурный анализ привел к тому же заключению, вряд ли могло оставаться какое-либо сомнение в ее справедливости. Дальнейшие химические исследования подтвердили этот результат.

Здесь уместно отметить, что в вышеприведенном примере метод инфракрасной спектрометрии был не единственным; скорее он составлял часть большой совместной работы, проводимой как химиками, так и физиками для разрешения определенной проблемы, стоящей перед ними. Принимая во внимание всю эту программу, невозможно беспристрастно оценить относительную важность каждого метода. Мы особо остановились здесь на существенном значении инфракрасных спектроскопических данных в разгадке структуры пенициллина, но это ни в коей мере не может зачеркнуть результаты огромного количества химических исследований или такого тонкого метода исследования, как рентгеноструктурный анализ. Мы лишь привели один из случаев, когда инфракрасная спектроскопия в сочетании с другими методами была с успехом применена для разрешения типичной структурной проблемы. В органической химии часто встречаются подобные ситуации, и нередко при помощи инфракрасной спектроскопии можно сделать выбор между вероятными структурами или по крайней мере определить наиболее эффективное направление исследований. Этот способ, хотя и применявшийся в более скромных масштабах, оказался полезным автору при изучении одной жирной кислоты, выделенной из туберкулезной палочки и обладающей патогенными свойствами [35, 65]. Для интерпретации инфракрасных спектров здесь также использовались как синтетические модельные соединения, так и данные, полученные спектроскопистами и органиками.

Другим важным достижением, представляющим интерес для биологов, является накопление материалов по инфракрасным спектрам стероидов и применение их для анализа этих веществ. Первоначальный толчок этой работе дал покойный Конрад Добринер, и она выполнялась в основном в Раковом институте Слоан-Кеттеринга в Нью-Йорке при очень интенсивном участии Р. Джонса, работавшего в лабораториях Национального научно-исследовательского совета Канады в Оттаве. Эти авторы [91] опубликовали обзор основных результатов работ в этой области. В отличие от метода, примененного к пенициллину, где предметом обсуждения была прежде всего структура специфической молекулы, здесь было предпринято составление каталога

инфракрасных спектров, в котором содержались бы спектры по возможности всех веществ, относящихся к классу стероидных соединений. При помощи этого каталога большую часть стероидов, выделенных в процессе медицинских или биохимических исследований, можно было идентифицировать, непосредственно сравнивая их спектры со спектрами каталога. Далее, накопленные данные можно было использовать для установления соответствия между спектрами и структурой стероидов как класса в целом. Если бы встретился новый, неописанный стероид, то имеющиеся общие закономерности давали бы возможность сделать некоторые заключения о его структуре на основании его спектра. Применение инфракрасной спектроскопии оказалось весьма полезным при изучении продуктов стероидного обмена, выделенных из мочи химическими и хроматографическими методами. В лабораториях Института Слоан Кеттеринга в течение нескольких лет пользовались этим методом для характеристики таких соединений. Параллельные исследования, проведенные главным образом Джонсом и его группой в Оттаве, имели не только большую ценность для химии стероидов, но также и практическое значение для стереохимии органических соединений в целом. Последним достижением этого объединенного исследования было опубликование атласа инфракрасных спектров стероидов, составленного Добринером, Каценелленбогеном и Джонсом [48]. Джонс и Херлинг [92] составили таблицу полос поглощения, характерных для тех или иных специфических структурных элементов. Она является новейшей сводкой и содержит ссылки на оригинальные работы по этому вопросу, появившиеся после первого обзора Джонса и Добринера [91].

Эти примеры лишь иллюстрируют важность исследований, проведенных методом инфракрасной спектроскопии; в настоящее время различные лаборатории разрабатывают и другие не менее важные проблемы. Вместе с тем инфракрасная спектроскопия применяется для решения множества проблем меньшего масштаба, полезность которых испытана в повседневной практике. Нередко это становится возможным благодаря сведениям, получаемым при решении более крупных проблем, как например идентификация

стероидов. Возможности дальнейшего использования инфракрасной спектрофотометрии для количественного анализа полностью зависят от количества имеющихся спектроскопических данных. Накопление сведений об инфракрасных спектрах в результате как крупных, так и мелких исследований, а также продолжающееся совершенствование техники позволят решать все более сложные проблемы биологии и медицины.

Интерпретация инфракрасных спектров

Общие замечания.

Использование структурных корреляций

Допустим, что перед нами инфракрасный спектр вещества, представляющий собой кривую пропускания в зависимости от длины волны. Какие сведения относительно природы вещества можно получить, изучая этот спектр? Какие основные данные о веществе надо использовать для интерпретации спектра? Как применить полученные при этом результаты для выяснения структуры вещества в каждом конкретном случае?

Все это очень общие вопросы, и ответы на них будут весьма различны, если учесть огромный диапазон условий, при которых используются инфракрасные спектры. Характер ответа будет зависеть от различных факторов, в том числе от количества имеющихся данных о веществе, от его сложности, экспериментальных условий, при которых получали спектр, характера спектральной кривой, пригодности эмпирических соотношений и, наконец, наличия спектров, с которыми можно непосредственно сравнивать данный спектр.

Поскольку нелегко сформулировать краткие и определенные ответы на вопросы, поставленные выше в очень общем виде, надо, очевидно, для большей ясности рассмотреть в отдельности некоторые различные возможности интерпретации инфракрасных спектров. Можно вернуться назад и поставить предварительный вопрос: для какой цели был получен спектр? Цель физико-химика, имеющего дело со спектром известного, чистого соединения, состоит в том, чтобы приписать каждой полосе поглощения

определенный тип колебаний молекулы, т. е. его подход носит чисто теоретический характер. Пользуясь установленными соотношениями, он может определить силовые константы химических связей, геометрию молекулы и ее энергетические уровни, а также термодинамические свойства. В своей работе он исходит из „основных принципов“ законов колебаний гармонических осцилляторов и механики колеблющейся системы точечных масс. Главным средством его исследований является математический анализ, и тем самым ограничивается размер и сложность молекул, которые он может успешно анализировать этим методом. Такой подход будет весьма мало интересовать биолога, несмотря на то, что речь идет о самом смысле инфракрасных спектров.

Подход химика, выделившего чистое соединение и желающего идентифицировать его при помощи инфракрасного спектра, носит чисто эмпирический характер. С его точки зрения, спектральная кривая является просто собранием точек двумерной диаграммы, и общая картина рассматривается как характерное свойство молекулы. Если спектры выделенного вещества и какого-либо известного совпадают во всех деталях, то устанавливается идентичность этих веществ, причем в зависимости от характера кривой и определенных экспериментальных факторов можно быть более или менее уверенным в правильности сделанного заключения. (Например, может случиться, что теми приборами, которые имеются в распоряжении исследователя, нельзя будет выявить различий в спектрах двух гомологов какого-либо высокомолекулярного углеводорода или двух различных белков.) Раскрытие структурного смысла спектра в этом случае не обязательно; необходимы лишь некоторые сведения о типах колебаний. Для таких работ требуется в основном обширная справочная библиотека по спектрам чистых соединений и специальное приспособление, облегчающее отыскание парного спектра. Для этой цели используют кодированные перфокарты или перфокарты игольчатого типа; ниже они будут кратко описаны.

В большинстве случаев подход исследователя к интерпретации инфракрасных спектров носит промежуточный характер. Он проводит структурные сопоставления, обычно

чисто эмпирические по форме и по назначению, но при этом часто использует элементы теории молекулярных спектров, необходимые в каждом отдельном случае. Этим методом можно подойти к разрешению многих разнообразных структурных проблем, в том числе и проблем, касающихся сложных молекул. Могут возникнуть различные вопросы: присутствуют или отсутствуют в молекуле определенные функциональные группы — CO, OH, NH₂ и т. д.; является ли спирт первичным, вторичным или третичным; каково положение двойной углеродной связи внутри молекулы; имеет ли цепь белка свернутую или вытянутую конфигурацию. Многочисленные данные по инфракрасным спектрам, накопленные к настоящему времени, позволяют ответить или облегчают ответ на очень многие вопросы, подобные этим. Для решения специфической проблемы такого рода используют известную корреляцию между исследуемым элементом структуры и характеристическими полосами поглощения или ищут такую корреляцию. Для этого изучают спектры возможно большего числа соединений, содержащих исследуемый структурный элемент, с тем чтобы установить пределы длин волн, в которых встречается каждая характеристическая полоса поглощения, и изучить специфическое влияние различных окружающих атомов или групп атомов на точную локализацию (и иногда интенсивность) полос внутри этих пределов.

Надежность таких корреляций может быть весьма различной; она зависит от количества использованных данных, а также от того, насколько свободны от интерференции характеристические полосы. Применяя корреляции для определения структуры по виду спектральной полосы, необходимо принять во внимание следующее общее ограничение. Полосы, приписываемые группам различных типов, могут перекрываться; поэтому наблюдающаяся у какого-либо известного вещества полоса может быть связана с более чем одной возможной структурой. Другими словами, бывают случаи, когда полосу невозможно интерпретировать *однозначно*, и для того, чтобы сделать выбор среди возможных интерпретаций, необходимы дополнительные данные. Например, полосы двойной связи C=C и двойной связи C=N обладают

почти одинаковыми валентными частотами, но, если из элементарного анализа известно, что соединение (для которого найдена полоса с этой частотой) не содержит азота, одна возможность исключается. В некоторых случаях дополнительные сведения можно получить из самого спектра, изучая какой-либо другой его участок. Следовательно, спектральные данные относительно структуры, установленные для одного класса соединений, могут оказаться полезными и для другого класса, если полосы поглощения последнего, находящиеся в исследуемой области, имеют несколько иное происхождение. Вообще если учесть должным образом соотношение интенсивностей, то *отсутствие* характеристических полос поглощения позволяет сделать более определенные выводы, чем наличие этих полос.

Существуют таблицы, в которых в сжатой и очень обобщенной форме приведены установленные к настоящему времени корреляции между структурами и спектрами; среди них надо отметить таблицы Томпсона [161], Колтхупа [42] и Рэндолла и других [136]. Книга, в которой приведены последние таблицы, содержит развернутое обсуждение структурных определений методом инфракрасной спектроскопии. Несколько иные представления об этом предмете, с точки зрения химиков-органиков, дали Рамуссен [139], Фергюсон [55] и Миллер [122]. По их мнению, из упомянутых выше сжатых таблиц корреляций можно получить лишь ориентировочные данные, но для того, чтобы сделать надежные заключения, требуются обычно более детальные сведения о специфических корреляциях. Подробная сводка таких данных для всех классов органических соединений дана в книге Беллами [17], являющейся крайне ценным вкладом в науку об инфракрасных спектрах.

Основные сведения о природе и происхождении инфракрасных спектров общеизвестны, и нет необходимости излагать их вновь. Однако существуют некоторые общие закономерности, имеющие особое значение с точки зрения интерпретации, и их необходимо напомнить. Одной из них является разделение инфракрасной области спектра в целях облегчения интерпретации на подобласти примерно следующим образом:

0,75— 2,5 μ	— обертоны, комбинации	} Область прозрачно- сти призмы из NaCl
2,5 — 4,5 „	— валентные колебания водорода	
4,5 — 6,5 „	— двойные, тройные связи	
6,0 — 15 „	{ деформационные колебания водорода	
	{ колебания скелета молекулы	
> 15 „	{ колебания скелета молекулы — колебания тяжелых атомов { межмолекулярные колебания	

Наиболее интересной областью является область 2,5—15 μ , поскольку большая часть работ по инфракрасной спектроскопии проводится с призмами из каменной соли и большая часть структурных соотношений приходится на эту область. Область валентных колебаний водорода отчетливо выделена и относительно обособлена. Из других типов колебаний здесь появляются лишь обертоны и комбинации, причем они обычно настолько слабы, что ими можно пренебречь. Однако можно отметить перекрывание областей поглощения ОН и NH; различные виды связей С—Н (отличающиеся характером других связей атома углерода) не могут быть распознаны без применения приборов большей разрешающей силы (призмы из LiF и CaF₂). Изучая эту область, можно получить очень ценную информацию о водородных связях.

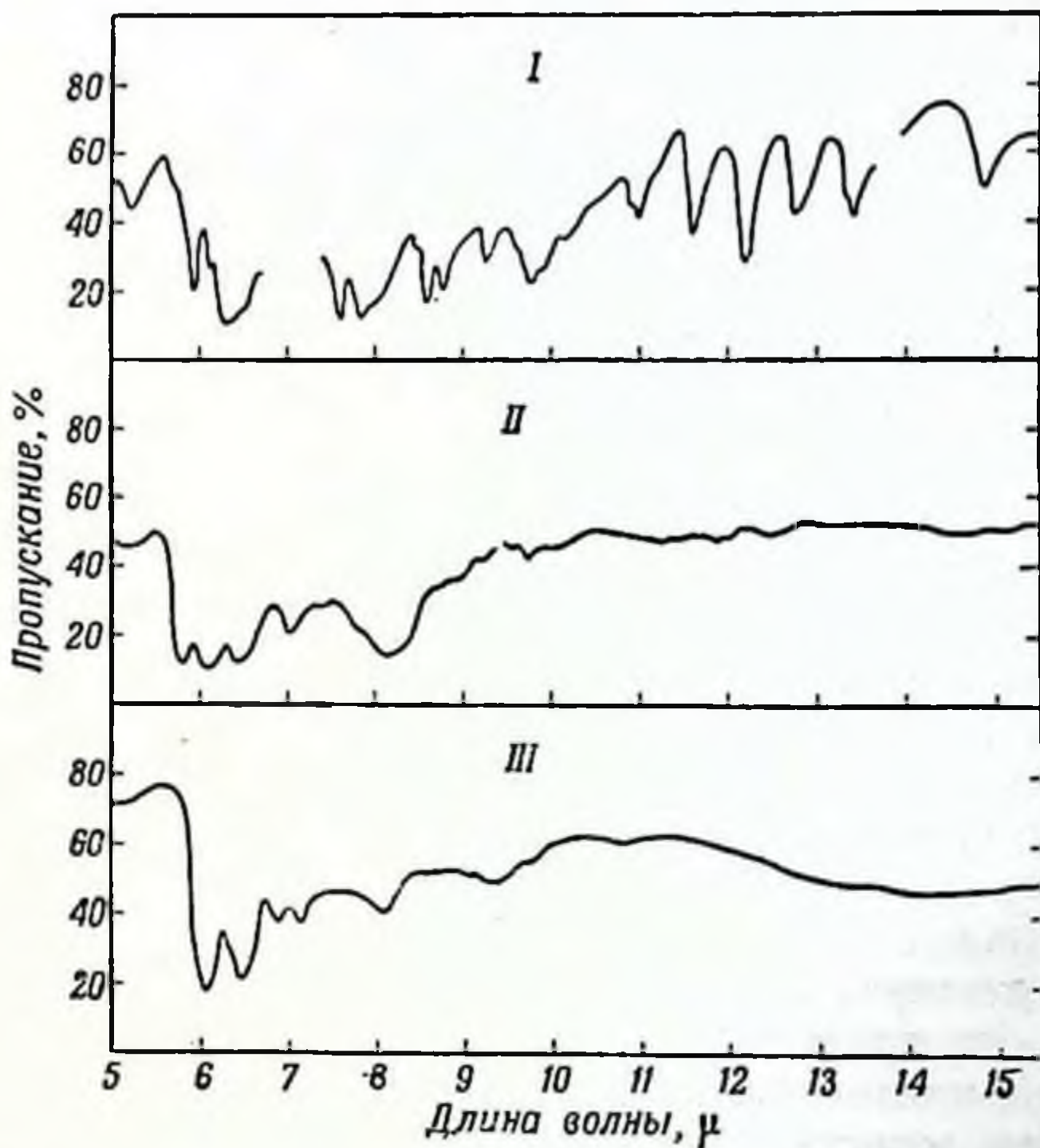
Вообще говоря, область кратных связей также обособлена, но в нее попадает частота угловых деформационных колебаний аминогруппы, а кроме того, иногда встречаются полосы, которые пока трудно интерпретировать. Изучение спектра в этом диапазоне длин волн крайне плодотворно, и те корреляции, которые можно установить для групп С=О и С=C, относятся к наиболее широко распространенным в инфракрасной области.

В колебаниях скелета молекулы водородные атомы и кратные связи не принимают непосредственного участия. Полосы, соответствующие этим колебаниям, располагаются в широком интервале частот и не очень характерны. Картина спектрального поглощения в интервале 7,5—13 μ вообще сложна, и встречающиеся здесь частоты функциональных групп довольно трудно или невозможно распознать из-за перекрывания близко расположенных

полос. Поэтому здесь ограничены возможности корреляции спектра с группами атомов, хотя, конечно, некоторые возможности все же имеются. Эту область часто называют областью „отпечатка пальцев“, так как здесь характер спектра таков, что можно идентифицировать соединение прямым подбором аналогичной спектральной кривой.

Спектральные характеристики стероидов таковы, что их очень удобно анализировать методом „отпечатка пальцев“. Однако для некоторых классов соединений, особенно для больших молекул, состоящих из повторяющихся групп атомов, метод „отпечатка пальцев“ становится непригодным, так как в области частот колебаний скелета молекулы многие полосы сливаются в квазиконтинуум. Простой иллюстрацией этого явления может служить прямая цепь алифатических углеводородов. Метан обладает совсем простым спектром, состоящим из двух очень сильных полос поглощения (основные частоты, разрешенные с точки зрения симметрии) и множества очень слабых полос (обертоны и комбинации). При изучении спектров следующих членов серии можно видеть, что их сложность возрастает до максимума при 7—10 атомах углерода. (Количество основных нормальных колебаний молекулы равно $3N-6$, где N — общее число атомов.) Однако, когда число атомов углерода становится больше 10, заметного возрастания числа полос не наблюдается, и в области „отпечатка пальцев“ они постепенно становятся более расплывчатыми. Характер спектра приближается к спектру нуйола (парафиновое масло) или полиэтилена; спектр содержит три сильные полосы, одну полосу средней интенсивности, и, кроме того, наблюдается слабое общее поглощение в области $7,5-13 \mu$ (частот колебаний скелета молекулы). Некоторые полосы можно приписать колебаниям CH_2 - и CH_3 -групп. Удлинение цепи на одну или даже несколько групп CH_2 не вызывает качественно наблюдаемого изменения спектра. Аналогичное положение встречается в других классах соединений, содержащих длинные алифатические цепи (жирные кислоты и т. д.); для этих классов существуют пределы, за которыми метод „отпечатка пальцев“ неприложим. Чтобы различить гомологи этого типа, необходимы тщательные количественные измерения интенсивностей.

На этой же основе можно объяснить и тот факт, что спектр белка дает более простую картину, чем спектр аминокислоты. Это ясно из кривых фиг. 1, изображающих типичные участки „отпечатка пальцев“ для спектров аминокислоты, трипептида и белка. На всем протяжении



Ф и г. 1. Сравнение инфракрасных спектров аминокислоты, трипептида и белка.

I — глутаминовая кислота (взвесь в масле); *II* — глутатион (пленка); *III* — γ -глобулин (пленка). Заметно обеднение спектра в длинноволновой области.

спектров полипептида или белка три наиболее сильные полосы связаны с пептидной группой. Другие полосы обычно значительно слабее, и хотя они меняются от белка к белку, но эти различия недостаточны для того, чтобы можно было основывать на них надежный общий метод идентификации.

Применяя обычный метод „отпечатка пальцев“, необходимо помнить, что для действительно надежного срав-

нения спектров образцы должны находиться в одинаковом физическом состоянии. Для твердых образцов очень важно, чтобы метод изготовления был один и тот же. Различия в этих факторах могут вызвать или не вызвать доступных для наблюдения изменений в деталях спектра. Розенкранц и Зяблов [140] изучили небольшое число стероидов с этой точки зрения. Другим возможным источником различий между спектрами одних и тех же соединений является полиморфизм [97] и образование оптическими изомерами рацемических соединений [180, 181]. При сравнении спектров, полученных на разных приборах (или на том же приборе, но при других экспериментальных условиях), должна быть сделана поправка на возможные различия в разрешающей силе.

Другие способы интерпретации

В особых случаях можно применить несколько способов получения дополнительной информации, уточняющей интерпретацию инфракрасного спектра. К ним относятся использование поляризованного излучения, дейтерирование исследуемых соединений, изучение влияния температуры и изменений физического состояния образца на картину поглощения, а также измерение абсолютных интенсивностей. В тех случаях, с которыми приходится непосредственно сталкиваться биологам, особенно широко применяют поляризованное излучение и дейтерирование.

Поляризация полезна при изучении твердых образцов, например кристаллов и волокон, где молекулы расположены до некоторой степени упорядоченно. Соответственные связи в молекулах с одинаковой ориентацией будут параллельны. Рассмотрим, например, в таком упорядоченном образце отдельную связь, имеющую характеристическую валентную частоту. Удлинение связи сопровождается изменением дипольного момента связи, и в той мере, в которой можно считать, что простое удлинение связи достаточно точно описывает колебание, направление результирующего изменения молекулярного дипольного момента будет примерно параллельно связи. Если на образец падает плоско-поляризованное излучение, частота которого совпадает с характеристической частотой образца, то интен-

сивность поглощения будет зависеть от угла между электрическим вектором и направлением связи. Поглощение максимально в том случае, когда связь параллельна электрическому вектору; когда они перпендикулярны, поглощение равно нулю, а при других углах оно пропорционально проекции связи на электрический вектор. При исследовании деформационных колебаний вместо валентных соотношение между направлениями связи и электрического вектора будет обратным. Таким образом, если известно, с каким колебанием связана некоторая полоса поглощения, и в образце может быть установлено указанное направление (как например, в волокне или кристалле, обладающем осевой симметрией), то, измеряя интенсивности при различных углах поляризации, можно определить примерное направление связи. При этом определяют дихроизм полосы, т. е. отношение поглощения излучения, поляризованного параллельно оси ориентации, к поглощению излучения, поляризованного перпендикулярно к этой оси. Поскольку рентгеноструктурный анализ дает возможность определить постоянную решетки, эти два метода часто дополняют друг друга. Комбинированной методикой часто пользуются при изучении белковых структур, и в соответствующем разделе мы остановимся на этом более подробно.

Использование дейтерирования в качестве вспомогательного средства для интерпретации основано на том, что замена водорода в молекуле дейтерием изменяет соотношение масс в системе, так что частоты колебаний, в которых участвуют эти атомы, понижаются примерно в $\sqrt{2}$ раз. Хотя этим спектральным сдвигом особенно часто пользуются при теоретическом анализе простых молекул, он может быть также полезен при идентификации полос, соответствующих колебательным частотам водорода в сложных молекулах. Валентные полосы C—D, O—D и N—D появляются в спектральной области 3,5—5 μ , которая относительно свободна от интерференции. Картина сдвигов длины волны для деформационных колебаний требует расшифровки, так как она затемнена более сложным фоном в области выше 7 μ , но обычно спектральные изменения очевидны. Джонс, Кол и Нолин [93] метили стероиды дейтерием, замещая им водород в различных

положениях, и получили некоторые спектральные характеристики метилена и метильных групп по исчезновению полос, связанных с этими группами. Меченный дейтерием стероид использовали также Добринер и другие [47] в опытах по изучению обмена стероидов, причем наличие продуктов обмена во фракциях выделений, обладающих достаточной концентрацией, обнаруживали методом инфракрасной спектроскопии. Применение трития для меток такого рода имеет некоторые преимущества и в последние годы стало более распространенным, но было бы заманчиво рассмотреть в общей форме возможности локализации меченого атома внутри меченой молекулы методом инфракрасной спектроскопии. Применение дейтерия часто облегчает изучение водородной связи этим методом. Треннер и другие [167] выполнили количественный анализ никотиновой кислоты методом изотопного разведения, измеряя отношение количеств дейтерированных и недейтерированных молекул на основании инфракрасных спектров. Этим методом можно также определить содержание D_2O в H_2O [162].

Изменения температуры или физического состояния (в некоторых случаях — концентрации раствора) влияют прежде всего на взаимодействие между молекулами. Межмолекулярные силы часто действуют на внутренние колебания таким образом, что изменениям в окружающей среде сопутствуют изменения в спектре. Наиболее известным примером такого рода является сдвиг полос поглощения OH и NH вследствие образования водородной связи; это явление изучено наиболее основательно. Другим примером служат спектры жидких (или аморфных) углеводородов с длинной цепью и их производных, содержащих полосу метиленовой группы $13,8 \mu$. Эта полоса в спектрах кристаллических соединений расщепляется на две компоненты. Штейн и Сэзерленд [155] объяснили это явление взаимодействием между цепями в кристалле. Приведем температурные эффекты несколько иного типа: 1) уменьшение естественной ширины полосы при очень низких температурах; 2) эффекты, связанные с существованием молекул в двух изомерных формах, причем относительное число молекул в той и другой форме может меняться с температурой; 3) эффекты, связанные с особой

комбинацией полос, интенсивность которых зависит от тепловой заполненности уровней с низкой колебательной энергией.

Измерениям абсолютной интенсивности полос в инфракрасных спектрах поглощения уделяли раньше очень мало внимания, главным образом в силу экспериментальных трудностей. Качества современных приборов позволяют заново пересмотреть возможности интерпретации спектров как по интенсивностям, так и по положению максимумов поглощения. Джонс и другие [93] обсудили результаты измерений абсолютных интенсивностей и опубликовали данные для карбонильных полос 55 стероидов. Было показано, что по интенсивности полос можно различить группы $C=O$, занимающие разные положения в молекуле.

Каталогизация спектров

При идентификации различных соединений необходима картотека спектров чистых соединений, которая являлась бы сводкой основных спектральных данных. Для лабораторий, в которых проводится значительное количество интерпретаций прямым сравнением кривых, правильно составленная сводка такого рода совершенно необходима. В тех лабораториях, где инфракрасной спектроскопией занимаются в течение долгого периода, вообще неизбежно накапливается картотека своих собственных кривых; в больших заводских лабораториях число спектров легко достигает нескольких тысяч. Проблема, возникающая при этом, состоит не только в составлении картотеки и указателя к ней; необходимо также найти удобный способ отыскания в картотеке кривой, содержащей те же спектральные характеристики, что и идентифицируемое вещество. Это обычно выполняется двумя способами, объяснение которых можно найти в выпускаемых каталогах инфракрасных спектров.

Каталог, изданный при содействии Национального научно-исследовательского совета и Национального бюро стандартов, содержит несколько сот спектров и постоянно пополняется. Спектры напечатаны на карточках с двойной перфорацией по краям, кодированных таким образом,

что каждое отверстие соответствует какой-либо одной характеристике соединения. Примерно по половине длины перфорированного участка отверстия кодируют по длинам волн резких полос с охватом спектральной области от 2,7 до 40 μ . Положение отверстий соответствует длине волны каждой полосы поглощения (начиная с некоторой произвольно выбранной интенсивности). Кроме того, кодируют и другие свойства: наличие определенных функциональных групп, число атомов углерода, точку плавления или кипения. На одной стороне карточки напечатано описание образца и необходимые сведения об экспериментальных условиях, при которых снимали спектр, т. е. физическое состояние образца, толщина кюветы, тип призмы и т. д.; на другой стороне приведена спектральная кривая.

Первая операция при пользовании карточками заключается в том, что отбирают либо все спектры, содержащие полосу с определенной длиной волны, либо спектры всех соединений с данной точкой плавления, либо спектры всех соединений, содержащих определенную функциональную группу. Из этой отобранной группы второй аналогичной операцией, но с учетом какого-либо другого свойства получают еще меньшую группу спектров, удовлетворяющих двум критериям и т. д. Даже при наличии большой картотеки можно довольно быстро отобрать небольшое число спектров, которые в конце концов сравнивают в деталях со спектром неизвестного вещества.

Филадельфийская фирма „Samuel P. Sadtler and Son“ (Пенсильвания) выпустила каталог инфракрасных спектров, в котором подбор кривых производят также при помощи кодированных карт. Этот каталог содержит несколько тысяч спектров самых разнообразных соединений, и число их непрерывно возрастает.

Каталог инфракрасных спектров, выпущенный Американским институтом нефти (Технологический институт Карнеги), содержит свыше 1600 кривых, большая часть которых принадлежит углеводородным соединениям. Библиографические перфокарты для сортировки инфракрасных спектров можно получить в Национальном научно-исследовательском совете (Вашингтон). Американским обществом испытания материалов (Филадельфия) издан каталог спектроскопических перфокарт, в котором собраны

как литературные данные, так и данные, содержащиеся в упомянутых выше каталогах.

Изложенные выше способы отыскания спектров в картотеке вполне пригодны для идентификации чистых соединений, но для неизвестных смесей эта операция весьма трудоемка и отнимает много времени.

Бэкер, Райт и Оплер [10] усовершенствовали метод сортировки спектров при помощи перфокарт таким образом, что появилась возможность почти так же легко идентифицировать смеси из нескольких компонентов. Они создали систему, при помощи которой можно кодировать интервалы длин волн как при отсутствии, так и при наличии полос.

Кинг, Блантон и Фроули [100] осуществили цифровую запись спектра непосредственно на перфокартах. Показания берут непосредственно со спектрометра; для получения всего инфракрасного спектра требуется 100 карточек. Возможности этого способа обработки данных следует еще изучить.

В связи с тем, что инфракрасная спектроскопия находит все более широкое применение в научных исследованиях, вопросы каталогизации и стандартизации приобретают огромное значение. С этой точки зрения крайне неудобно то обстоятельство, что в литературе можно найти инфракрасные спектральные кривые, вычерченные самыми различными способами.

В США наиболее общепринято вычерчивать пропускание в зависимости от длины волны, выраженной в микронах, в то время как в Англии чаще вычерчивают поглощение в зависимости от частоты, выраженной в обратных сантиметрах. Приверженцы последней системы указывают на то, что она является более разумной основой для интерпретации, особенно если рассматривается какой-либо теоретический вопрос. Для эмпирических целей предпочитают в основном систему „пропускание — длина волны“, так как большая часть литературных данных приводится в этой форме. Разрешения этого конфликта пока не предвидится, и те, кто имеет дело с большим количеством инфракрасных данных, должны научиться с легкостью производить перевод из одной системы в другую.

Приборы

Спектрометры, выпускаемые промышленностью

Появление промышленных инфракрасных спектрометров, как нам кажется, имеет не меньшее значение, чем то, что было сделано в период быстрого развития инфракрасной спектроскопии в конце 40-х годов. Вильямс [174, 175] сформулировал принципы, в соответствии с которыми сконструировано большинство современных приборов, и сравнил особенности приборов различных типов. Целью конструкторов, ясно определившейся еще в конце последнего десятилетия, являлось осуществление в приборах быстрой автоматической записи спектров непосредственно в процентах пропускания. В настоящее время уже существуют спектрометры, на которых можно в несколько минут получить полную кривую пропускания в спектральной области 2—15 μ . Таким образом, эта фаза спектрометрических измерений занимает меньшую часть времени и усилий, требующихся для полного исследования. Поскольку общие цели, которым служат приборы, изготавливаемые в настоящее время, вполне ясны, усилия ученых в последнее время были направлены на усовершенствование конструкций и создание более универсальных приборов при помощи различных дополнительных приспособлений.

В США наиболее распространены инфракрасные спектрометры, изготавливаемые следующими фирмами: 1) „Baird Associates, Inc.“, Cambridge, Mass.; 2) „Beckman Instruments, Inc.“, Fullerton, Calif.; 3) „The Perkin-Elmer Corporation“, Norwalk, Conn.

В Англии изготовлением инфракрасных спектрометров занимаются фирмы: 1) „Sir Howard Grubb, Parsons and Co.“; 2) „Hilger and Watts, Ltd.“; 3) „Unicam Instruments, Ltd.“

В задачи настоящей статьи не входят подробное обсуждение или сравнительная оценка этих приборов. Мы коснемся лишь нескольких особенностей, свойственных всем приборам, изготавливаемым в Америке. (Харли и Уайберли [81] составили полное описание новейших приборов;

более детальные сведения могут дать фирмы, выпускающие эти приборы.) Записывающий двухлучевой инфракрасный спектрометр впервые был выпущен фирмой „Бэрд“; в последние модели этого прибора введено несколько усовершенствований. Используется принцип оптической компенсации, для чего на пути пучка сравнения помещается поглощающее вещество и непосредственно записывается величина поглощения, необходимого для того, чтобы сбалансировать поглощение образца. Фирма „Бэкман“ выпускает две модели. Модель IR 2 представляет собой однолучевой прибор, вначале предназначавшийся для аналитической спектрофотометрии без записи. Позднее были предусмотрены приспособления для „развертки“ или записи спектров. Модель IR 3 также относится к классу однолучевых приборов, регистрирующих при помощи „запоминающего“ устройства относительную долю пропускания (в процентах); в этом приборе записывают интенсивность фона, и сигнал фона используют для сравнения при записи спектра образца. Для увеличения разрешающей силы использован двойной монохроматор; вся оптическая система герметична, что позволяет удалять водяные пары и углекислоту. Фирмой „Перкин—Эльмер“ сконструирован двухлучевой спектрометр (модель 21), в котором применен тот же основной принцип оптической компенсации, что и в приборе Бэрда. Эта компания выпускает в дополнение к модели 21 весьма обширный каталог взаимозаменяемых спектроскопических деталей, необходимых для сборки спектрометров самых разнообразных (с точки зрения оптики) типов — как для работ обычного характера, так и для решения специальных проблем. Можно воспользоваться монохроматорами двух типов: один из них — обычный автоколлимационный монохроматор типа Littrow, в другом использован принцип „двукратного разложения“ Уолша [168] для увеличения разрешающей силы и ослабления рассеянного излучения. Сочетая какой-либо из этих монохроматоров с подходящим источником, призмой, приемником и другими элементами, можно получить однолучевой прибор для работы на произвольно выбранном участке спектра в пределах от 220 м μ до 38 м μ . Модель 112 представляет собой стандартный инфракрасный спектрометр, собранный таким образом.

Если используется монохроматор с однократным разложением, то для записи процента пропускания можно использовать фотометрическое устройство с делителем пучка и логарифмический усилитель. Таким прибором является модель 13. Оба эти прибора наряду с моделью 21 могут служить в качестве „универсальных“ спектрометров при монтаже установок, в которых предусмотрена быстрая и легкая замена источников, призм и приемников излучения. Прибор Бэкмана IR 3 можно считать в этом смысле также универсальным прибором. В приборах Бэрда и Бэкмана IR 2 не предусмотрена замена источников и приемников, но можно менять призмы.

В коротковолновой инфракрасной области (от длинноволновой части видимого спектра до $2,7 \mu$) работают обычно с кварцевой призмой. Кайе [96] при помощи сернисто-свинцового фотоэлемента удалось приспособить для работы на этих длинах волн кварцевый монохроматор Бэкмана (модель DU). Позднее Бэкман ввел эту модификацию в свой записывающий спектрофотометр (модель DK), в котором фотоумножитель и сернисто-свинцовый фотоэлемент взаимозаменяемы. В модели 14 прибора Кари (Applied Physics Corp., Pasadena, Calif.) предусмотрена такая же взаимозаменяемость для работы в коротковолновой инфракрасной, а также в видимой и ультрафиолетовой областях спектра.

Специальные устройства

Хотя большую часть обычных спектроскопических исследований проводят с призмой из NaCl, при решении ряда важных структурных проблем требуется более высокое спектральное разрешение. Для некоторых интервалов длин волн весьма эффективной является замена призм; чаще других применяют LiF ($2-5 \mu$) и CaF₂ ($2-9 \mu$). В двух каталогах инфракрасных спектров (в каталоге Американского института нефти и в атласе спектров стероидов [48]) приведены кривые, часть которых получена с одной из этих призм.

Чтобы повысить разрешение, можно также применить двойной монохроматор, как это сделано в спектрометре

Бэкмана IR 3. Нововведение Уолша [168, 169], известное как монохроматор с двукратным разложением, дает при одной призме тот же эффект, что и двойной монохроматор. В нем используется обычная автоколлимационная схема с системой вспомогательных зеркал, при помощи которой пучок диспергированной радиации попадает вновь в тот же монохроматор. Луч модулируется перед вторичным падением на призму, поэтому приемник регистрирует энергию луча только после двух разложений. Уолш распространил этот принцип на многократное разложение. Выпущенный недавно монохроматор Перкина—Эльмера (модель 99) представляет собой прибор такого типа.

Особенно высокую дисперсию дают диффракционные решетки; в инфракрасной спектроскопии их используют главным образом для изучения „тонкой структуры“ полос поглощения простых молекул в газообразном состоянии. Эта тонкая структура представляет собой вращательный спектр, на который накладываются колебательные полосы, и в тех случаях, когда она разрешима, анализ дает возможность определить вращательные константы и моменты инерции молекул. Для сложных молекул таких целей не ставится, и вообще естественная ширина полос поглощения столь велика, что слишком высокое разрешение не оправдано. Работа с решетками осложнена тем, что необходима призма предварительного разложения или какой-либо другой фильтр для подавления спектров высоких порядков. Несмотря на это, Кол [40] успешно применил решетку в одном из выпущенных им спектрометров, что дало, по его сообщению, повышение разрешающей силы во всей инфракрасной области.

Очень часто работу спектрометра ограничивают не оптические характеристики, а возможности измерения энергии излучения. Поэтому естественны поиски источника с более высокой температурой, чем широко распространенный глобар, работающий при 1200—1300° К. Было найдено, что при соответствующих условиях работы дуга с угольными электродами (3900° К) является подходящим для спектрометрии источником инфракрасного излучения [143]; она дает в 5 раз большую интенсивность, чем глобар, во всем интервале длин волн, пропускаемых призмой из NaCl. В последних модификациях Руперта [142] и Яффе

[90] угольная дуга вмонтирована в компактный механизм, более удобный для работы и имеющий поэтому более широкое применение. Микроспектрометр с угольной дугой в качестве источника используют в одной из лабораторий фирмы „Дюпон“ для изучения синтетических волокон (см. фиг. 3). В этой установке энергия, попадающая на приемное устройство (после прохождения всей системы), почти во всем интервале длин волн, пропускаемых призмой из NaCl, примерно в 3 раза выше, чем при работе с глобаром. Холл и Нестер [80] сообщили о применении при микроспектрометрических измерениях циркониевой дуги; они находят, что с точки зрения конструкции оптической системы она имеет ряд преимуществ.

Возможности измерения энергии связаны не только с количеством получаемой энергии, но и с чувствительностью приемника излучения. Приемники — термпары и болометры (включая термисторы), используемые обычно в промышленных приборах — в основном примерно равноценны с точки зрения регистрируемой ими минимальной энергии излучения, достигающей порядка 10^{-10} вт. Этот предел может быть понижен в 2 раза и более в простом приемном устройстве — пневматическом приемнике Голея [73]. Поглощающая тепло пленка помещена внутри маленькой, наполненной газом камеры, одна стенка которой служит окошком, пропускающим инфракрасное излучение. Другая стенка представляет собой упругую мембрану. Когда прерываемое с нужной частотой излучение попадает на поглощающую пленку, газ в камере попеременно нагревается и охлаждается. Вызванные этим соответственные изменения давления заставляют мембрану вибрировать, причем амплитуда вибраций пропорциональна нагреванию, вызываемому излучением, и может быть измерена при помощи вспомогательной оптической системы и фотоэлемента. Этот приемник с успехом использовали в микроспектрофотометрах [20] и при измерениях в длинноволновой области [128], т. е. в тех случаях, когда требуется наиболее высокая чувствительность.

В ограниченном диапазоне длин волн $1-3\mu$ сернисто-свинцовый фотоэлемент в 10—100 раз превосходит термпары и болометры. Этот приемник применяют обыч-

но для работы в самой коротковолновой части инфракрасного спектра в сочетании с кварцевой призмой. Для расширения диапазона длин волн, в котором можно работать с приемником этого типа, были сконструированы селенисто-свинцовые и теллуристо-свинцовые элементы, но сообщений о широком применении их не поступало.

Длинноволновая инфракрасная область

Несмотря на то, что давно уже существуют призмы для работы на длинах волн свыше 15μ (15μ — предел для NaCl), число таких работ относительно невелико. Большею частью их выполняли физико-химики в целях получения данных для теоретических расчетов структуры некоторых молекул. Это можно отчасти объяснить исключительной плодотворностью исследований в области прозрачности NaCl; кроме того, условия эксперимента на больших длинах волн менее благоприятны. Если сравнить имеющиеся в литературе каталоги инфракрасных спектров, то область $15—25\mu$ (призма из KBr) лучше всего представлена в спектрах углеводородов, содержащихся в каталоге Американского института нефти. Мартин и другие [118] описали метод анализа ароматических углеводородов на основе структуры спектра в этом интервале. Для работы в области $25—38\mu$ в промышленных спектрометрах применяют призмы из KRS-5 (бромистый таллий) и CsBr. В последнее время к существующему ассортименту призм добавилась призма из CsI, пропускающая излучение до 52μ и обладающая достаточной дисперсией выше 22μ . Применение этой призмы в указанных пределах длин волн описали Плилер и Аквиста [133] и Ман, Аквиста и Плилер [115].

Наконец, существуют три спектрометра, в которых диспергирующим элементом для длинноволнового излучения ($25—250\mu$) служат дифракционные решетки (отражательного типа). Описание их дали Рэндолл и Файерстон [134], Этьен и другие [128] и Бон и другие [29], но применяли их главным образом в тех случаях, когда исследования простых молекул проводили с теоретическими целями.

Недисперсные анализаторы

На нефтяных очистительных и химических заводах все шире применяют инфракрасные газовые анализаторы для автоматического контроля различных процессов. Для этих устройств пригодны даже небольшие спектрометры, но большинство из них относится к приборам недисперсного типа, не содержащим призм или других диспергирующих элементов. Определение содержания одного из газов в газовой смеси выполняют при помощи либо фильтров, либо избирательных приемников, либо тех и других одновременно. При этом исследуемый газ помещают обычно на пути одного из лучей и используют часто в качестве „негативного“ фильтра. Аналогично может быть осуществлено избирательное поглощение излучения, при котором сам газ действует в качестве приемника. Хотя эти устройства представляли сначала интерес лишь для инженеров как средства автоматизации, их все же использовали иногда в медицинских и биологических исследованиях, главным образом для измерений содержания CO_2 . Фаулер [56] изготовил анализатор собственной конструкции и пользовался им для измерений количества выдыхаемого CO_2 в физиологических опытах. Отсчет на этих приборах производится быстро и не требует большого количества исследуемого газа; это основные достоинства метода, которые позволяют легко осуществить непрерывную запись. В настоящее время имеется целый ряд таких приборов, изготовляемых различными компаниями, включая все перечисленные выше американские фирмы-изготовители инфракрасных спектрометров. Кроме них, поставщиками являются фирмы: „Leeds and Northrup Co.“, Philadelphia, Pa., и „Liston Becker Instrument Co.“, Stamford, Conn. Эти анализаторы предназначаются в основном для промышленных целей и могут быть приспособлены для измерений содержания различных газов. Фирма „Листон—Бекер“ выпускает анализатор для измерения содержания CO_2 , специально приспособленный для обычных медицинских целей, а также более универсальную лабораторную модель.

Толберт и другие [163] недавно нашли особенно интересное для биофизиков применение этого метода.

В исследованиях обмена при помощи соединений, меченных C^{14} , очень важно проследить за активностью выдыхаемого CO_2 в зависимости от времени, прошедшего с момента введения этого соединения. Для измерения общей активности пропускали выдыхаемый воздух (достаточно высушенный) через ионизационную камеру соответствующих размеров, с которой был соединен вибрационный гальванометр. Затем строили кривую зависимости общей активности от времени. Если после этого пропустить выдыхаемый воздух через инфракрасный газовый анализатор, то можно записать общее содержание в нем CO_2 . Новое здесь заключается в использовании многоканального записывающего прибора для одновременного вычерчивания обеих кривых; кроме того, был введен третий канал для записи отношения этих двух величин, т. е. удельной активности. Таким образом, в результате одного эксперимента на общей временной оси были построены кривые для всех трех величин. При введении крысам и людям глицина, ацетата и глюкозы, меченных C^{14} , получались великолепные кривые такого рода.

Для измерения отношения $C^{13} : C^{12}$ в CO_2 Ключвер и Милац [101] сконструировали недисперсный анализатор, при помощи которого можно определить это отношение в 30 мг CO_2 при естественной концентрации CO_2 1,1% с точностью до 0,005 процентного содержания атомов; анализатор пригоден для исследований методом меченых атомов.

Калкварф и Фрост [95] описали недавно прибор для выявления бесцветных веществ на хроматограммах на бумаге. Поглощение инфракрасного излучения веществом используется в нем несколько иным способом. Хроматограмму, накрытую черной бумагой, помещают между простым нагревателем и болометром; в приборе имеется прерыватель, благодаря которому на болометр попадает прерывистое излучение, пропущенное хроматограммой и черной бумагой. Поглощение излучения веществом хроматограммы проявляется в виде переменного сигнала, который может быть усилен и записан. Этот прибор, как выяснилось, пригоден для обнаружения на бумаге некоторых видов соединений в количестве нескольких миллиграммов, но для обнаружения вещества, вес

которого измеряется микрограммами, его чувствительность недостаточна. Кроме того, при помощи этого прибора невозможно обнаружить некоторые вещества (например, сахара). Все это создает серьезные ограничения для широкого применения этого прибора. Были предложены некоторые усовершенствования, расширяющие пределы его применения.

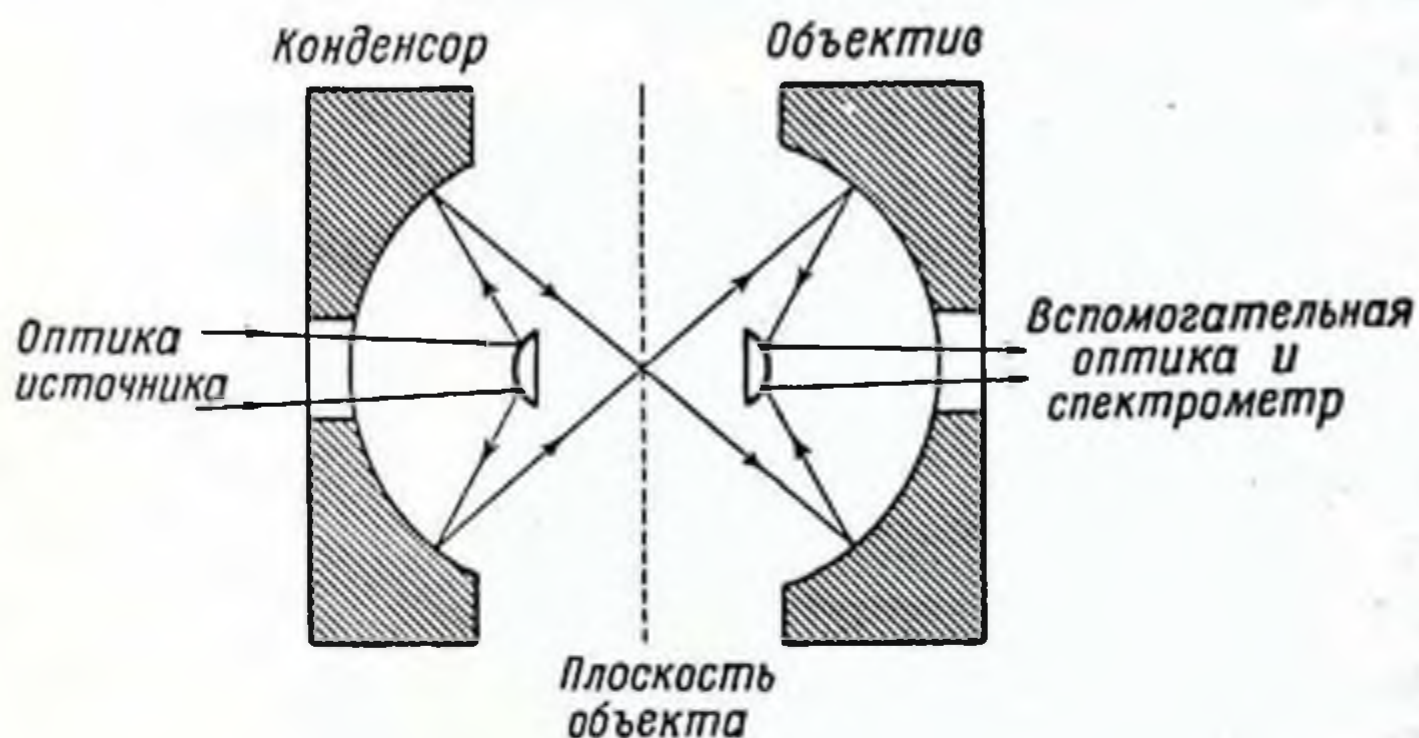
Инфракрасная микроспектроскопия

Отражательный микроскоп

Термин „микроспектроскопия“ принят для обозначения спектроскопии очень малых проб или образцов. По определению Луфбороу [113], этот метод заключается в сочетании микроскопа со спектрометром. Такое сочетание давно уже применялось в видимой и ультрафиолетовой областях, и по этому вопросу имеется ряд общих обзоров [18, 113, 121]. Поскольку до недавнего времени оптика для работы в инфракрасной области, кроме призм и окошек, ограничивалась большей частью зеркалами внешнего отражения, микроспектроскопия в этой спектральной области стала возможной лишь с появлением отражательного микроскопа Барча [32]. Барер, Кол и Томпсон [13] использовали сочетание этого микроскопа с однолучевым записывающим спектрометром Перкина — Эльмера для получения инфракрасных спектров различных веществ в диапазоне длин волн 2—15 μ (с призмой из каменной соли). Были исследованы вещества в количествах 10^{-7} — 10^{-9} г и некоторые кристаллы и волокна диаметром 20—50 μ , в том числе волокно нерва и мышцы лягушки. Добавив к системе поляризатор, авторы наблюдали также дихроизм некоторых полос поглощения органических кристаллов.

Основные элементы отражательного микроскопа показаны схематически на фиг. 2. Как видно на фигуре, одна пара зеркал (комбинация выпуклого и вогнутого зеркала) действует как конденсор, другая, такая же — как объектив. По обе стороны обычно вводят вспомогательную оптику для фокусировки увеличенного изображения объекта на входной щели спектрометра. В измененной конструкции

микроскоп помещают за выходной щелью спектрометра, так что образец освещается лишь узкой спектральной полосой. Излучение, пропущенное образцом, проходит затем через объектив и соответствующую оптику и попадает на приемник.



Ф и г. 2. Схема отражательного микроскопа (сечение вдоль оптической оси).

Микроскоп Барча содержит асферические зеркала, и конструкция его довольно сложна. За исключением микроскопа, построенного Вудом [177] по чертежам Барча, при помощи которого он получил инфракрасный спектр одиночного волокна мышцы лягушки, во всех остальных описанных приборах используют сферические зеркала. Конструкцию этих зеркальных систем обсудили с точки зрения оптики Норрис, Сидс и Вилкинс [126], а также Грэй [79] на основе несколько других критериев. Было показано, что для работы в инфракрасной области требуется численная апертура (NA) не менее 0,65; Фрэзер [58] работал с отражательным объективом, численная апертура которого равнялась 0,8. Для дальнейшего повышения NA необходимо ввести в систему преломляющие элементы. Блу, Бёрд и Грэй [27] и Блу и Бёрд [20] рассмотрели особую проблему, возникающую при сочетании микроскопа с инфракрасным спектрометром; они указали на ограничения, накладываемые друг на друга обоими компонентами, и определили оптимальные условия для работы всей системы. Поскольку регистрирующая система

спектрометра с трудом поддается калибровке, конструкция вспомогательной оптики должна быть такой, чтобы коллиматор был заполнен и не происходило неизбежных потерь световой энергии.

Они получили выражение для безразмерной рабочей характеристики $P(\lambda)$, которая может быть выражена двумя способами.

1. Первое выражение для $P(\lambda)$ имеет вид :

$$P(\lambda) = \left[\frac{1}{\Delta\lambda} \cdot \left(\frac{1}{\tau} \right)^{\frac{1}{2}} \cdot \frac{1}{A} \cdot \frac{1}{\Delta T} \right] \cdot \left[\frac{\lambda^2}{S^{\frac{1}{2}}} \right],$$

где $\Delta\lambda$ — ширина спектральной полосы ; τ — общая константа времени ; A — площадь поперечного сечения образца ; ΔT — поправочный коэффициент, учитывающий „шумы“ (колебания) фона. Как видно из этого выражения, следует стремиться к понижению указанных факторов ; для сохранения характеристики на определенном уровне уменьшение одного из факторов должно сопровождаться увеличением другого или других.

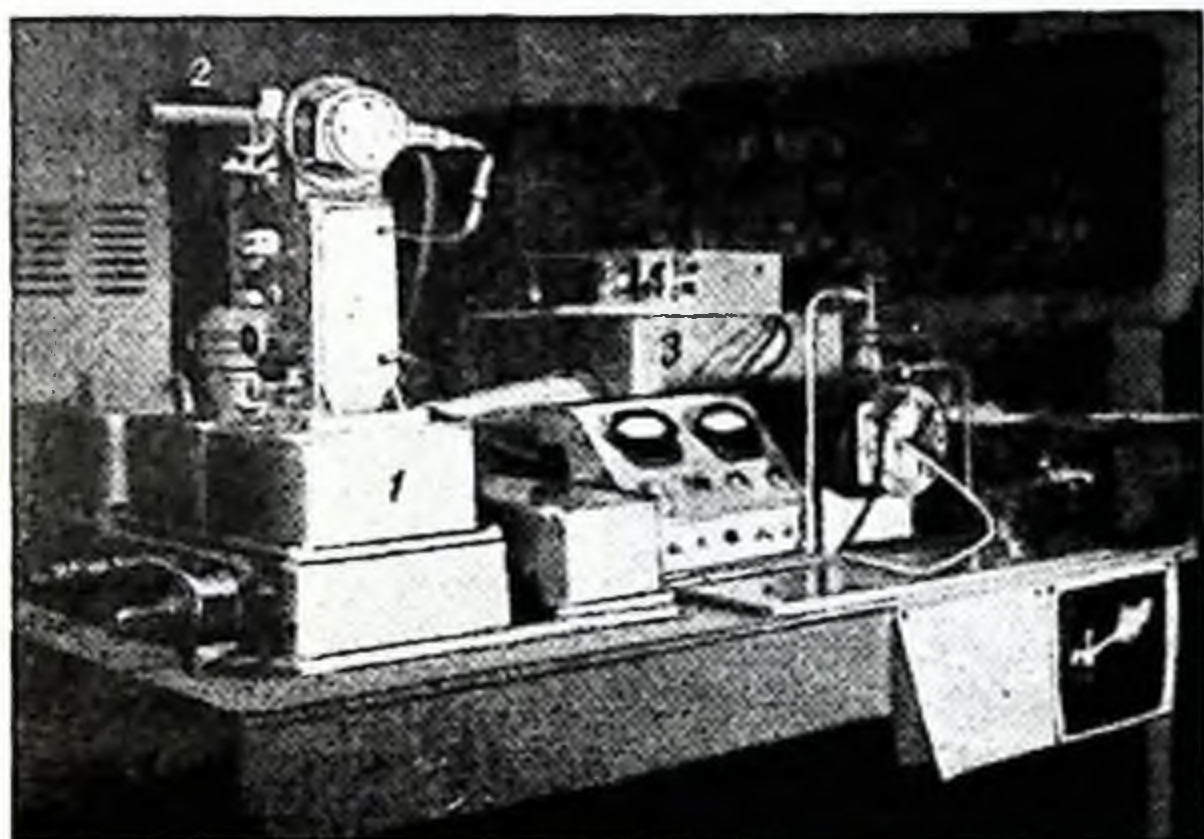
2. Второе выражение для $P(\lambda)$ содержит величины, характеризующие качество прибора :

$$P(\lambda) = K \cdot (NA_m)^2 \cdot R(\lambda) \cdot F_d \cdot L(\lambda),$$

где NA_m — численная апертура микроскопа ; $R(\lambda)$ — распределение энергии источника по спектру ; F_d — коэффициент, выражающий качество приемника ; $L(\lambda)$ — оптический коэффициент, учитывающий пропускание и отражение.

Увеличение каждого из этих факторов является шагом к повышению характеристики прибора. Блу и Бёрд ввели в отражательную систему линзы из бромисто-иодистого таллия или бромистого кальция для увеличения NA от 0,63 до 0,89 или до 0,96. Они использовали также пневматический приемник Голея [74], значительно повысив коэффициент F_d . Применение дуги с угольными электродами в качестве источника, описанное Рупертом [142] и Яффе [90], увеличивает $R(\lambda)$ в 5 и более раз ; Холл и Нестер [80] успешно использовали для этой цели циркониевую дугу, хотя она дает меньший эффект.

Микроспектроскопия в инфракрасной области осложняется тем, что вся длинная оптическая система должна быть герметична и заполнена азотом или сухим воздухом, не содержащим CO_2 ; в противном случае в результате поглощения инфракрасных лучей углекислым газом и парами воды некоторые спектральные области будут



Ф и г. 3. Инфракрасный микроспектрометр, источником для которого служит дуга с угольными электродами.

1—отражательный микроскоп Перкина—Эльмера 85, смонтированный на монохроматоре с двукратным разложением; 2 — окуляр; 3 — кожух, в который заключены дуга с угольными электродами и вспомогательная оптика. Прибор можно заполнять азотом на всем пути светового пучка.

затемнены. Наименьшего удлинения светового пути добился Фрэзер [60], который пользовался только конденсором и объективом (как на фиг. 2.) без вспомогательной оптики, и нашел, что потери энергии были не слишком велики. Фирма „Перкин—Эльмер“ [38] выпустила микроскоп, приспособленный для работы с однолучевым монохроматором, изготовляемым этой же фирмой; возможны комбинации, при которых он становится прибором универсального типа для всех спектральных областей. Этот микроскоп показан на фиг. 3; он установлен на монохроматоре с двукратным разложением и используется в сочетании с угольной дугой. Установка компактна и герметична. Микроскоп

располагается не перед входной щелью монохроматора, а за его выходной щелью; таким образом, на образец падает прошедшая через монохроматор узкая спектральная полоса, а не полное прямое излучение источника, в результате чего исключается излишнее нагревание образца. Применением особого приемника излучения, площадь которого вдвое меньше площади обычной термопары, достигают увеличения чувствительности, т. е. повышения качества всего прибора.

Блу и Аббат [19] успешно осуществили приспособление отражательного микроскопа к двухлучевому спектрофотометру фирмы „Перкин—Эльмер“ (модель 21); существенным видоизменением являлось введение в систему длинной газовой кюветы, в результате чего удлинялся путь, проходимый пучком сравнения.

Что касается размера образцов, то можно прийти к следующим общим выводам относительно возможностей различных инфракрасных микроспектрометров.

1. При помощи микроскопа, состоящего только из отражающих элементов, можно получить полезное увеличение (определяемое отношением NA микроскопа к NA спектрометра) примерно в 6 раз. Введя в систему преломляющие элементы, можно увеличить численную апертуру до 1,5 и в результате получить полезное увеличение примерно в 15 раз.

2. Рассчитанный с учетом дифракции минимальный размер поперечного сечения образца составляет 6μ при длине волны 15μ и $NA = 1,5$. На практике при NA меньше единицы можно успешно исследовать образец (волокно) диаметром не менее $15-20 \mu$.

3. Для того чтобы можно было получить спектр, в поле зрения должно находиться не менее $0,1-1,0 \mu\text{г}$ материала. Однако проблема обращения с такими малыми количествами столь сложна, что требуется все же образец весом $5-10 \mu\text{г}$.

Образцы можно изучать в различных формах: в виде растворов, тканей, волокон и кристаллов. Для обращения с микрообразцами оказался очень эффективным метод прессованных образцов, описанный в другом разделе настоящей главы. Кол и Джонс [41] описали микрокювету для растворов, содержащих около $10 \mu\text{г}$ растворен-

ного вещества ; Блу и другие [28] использовали короткие капилляры из хлористого серебра, вмещающие 1 $\mu\text{г}$.

В работе Барера [12] рассмотрены трудности, с которыми сопряжено исследование тканей при помощи инфракрасного микроспектрометра. В отличие от ультрафиолетового микроспектрометра, при помощи которого можно исследовать количества в 10—100 раз меньшие, инфракрасный микроспектрометр оказывается непригодным для изучения отдельных клеток или клеточных компонентов *in situ*. Хотя для гистологических исследований положение кажется более обнадеживающим, но и там возникают осложнения в связи с тем, что на основной спектр накладывается поглощение, обусловленное присутствием воды. Кроме того, химический состав ткани настолько сложен, что трудно различить отдельные компоненты. В спектрах большинства тканей на фоне интенсивного поглощения, обусловленного белком, присутствующим в относительно большом количестве, мелкие спектральные различия видны очень слабо. В преодолении этих трудностей могут помочь более фундаментальные спектральные исследования тканей [147—149] и компонентов тканей.

Котс, Оффнер и Зиглер [38] получили микроспектры некоторых синтетических волокон ; более развернутые исследования волокон были проведены на белках, и они обсуждаются в другом разделе. Если при изучении белков и кристаллов применить сочетание микроспектрометра с поляризатором, то можно измерить дихроизм полос и получить таким образом ценные сведения о направлении связей. Этим методом изучали такие кристаллы, как жирные кислоты с длинной цепью [41] и N-ацетилглицин и дикетопиперазин [123].

Конденсор из хлористого серебра

Кроме отражательного микроскопа, для получения инфракрасных спектров малых образцов было разработано еще одно новое приспособление. Хотя обычно его считают конденсором, но логически следует относить его к микроскопам, несмотря на малую светосилу. Как указано у Андерсона и Миллера [5], он был сконструирован спе-

циально для двухлучевого спектрофотометра Бэрда, и теперь эта фирма выпускает его в качестве стандартной детали. Торибара [164] сообщил об использовании аналогичного устройства в спектрометре Бэкмана IR-2.

Конденсор состоит из двух линз из хлористого серебра, помещенных между источником и зеркалом, фокусирующим излучение источника, как показано на фиг. 4. Первая линза проектирует уменьшенное изображение источника



Ф и г. 4. Схема конденсора из хлористого серебра (сечение вдоль оптической оси).

на образец, при помощи второй изображение увеличивается примерно до тех исходных размеров, которые получаются на зеркале источника. На пути пучка сравнения помещают компенсирующую пластинку из хлористого серебра.

Это устройство дает эффективное увеличение примерно в 3 раза; Андерсон и Вудалл [6], используя методику прессованных образцов, получили при помощи этого конденсора спектры образцов весом 10 $\mu\text{г}$. Хотя характеристики его ниже, чем у отражательного микроскопа, но они тем не менее вполне достаточны для работы с малыми образцами таких размеров, которые часто встречаются на практике. Ввиду простоты и относительной дешевизны этого устройства оно, вероятно, найдет себе обширное применение в тех случаях, когда предельных требований к прибору не предъявляется.

Экспериментальная техника

Изготовление образцов

Можно снимать инфракрасные спектры вещества в газовом, жидком и твердом состояниях, а также в растворе. Техника обращения с газами или жидкостями ясна, и обсуждать ее мы не будем. Вопрос о твердых образцах и растворах имеет смысл рассматривать лишь в том случае, если указать препятствия, ограничивающие их исследования в некоторых участках инфракрасного спектра.

Нет ни одного растворителя, который был бы прозрачен во всей инфракрасной области. Чтобы число и интенсивность полос поглощения растворителя были минимальны, его молекулы должны быть простыми, симметричными и неполярными. Высокая диэлектрическая постоянная воды делает ее поглощение очень интенсивным, поэтому применение воды в инфракрасной спектроскопии в качестве растворителя весьма ограничено. (Эти возможности, однако, будут рассмотрены ниже.) Из органических растворителей лучше других удовлетворяют всем требованиям CS_2 и CCl_4 ; пользуясь ими, можно получить большую часть полного спектра растворимых в них веществ. Для соединений, нерастворимых в CS_2 и CCl_4 , приходится обращаться к более сложным или более полярным растворителям; в этих случаях удастся исследовать лишь ограниченную часть спектра. Удовлетворительный компромисс между растворяющей способностью и отсутствием полос поглощения имеет место также в CHCl_3 . Он вполне пригоден во многих случаях, так как прозрачен в области поглощения двойных связей. Торкингтон и Томпсон [166] определили области прозрачности для ряда других обычных растворителей.

Нерастворимость многих классов веществ в неполярных органических растворителях привела к необходимости изучать их в твердом состоянии. В зависимости от свойств различных материалов существуют разнообразные методы изготовления образцов: 1) вещество в расплавленном состоянии помещают между двумя пластинками из NaCl , где оно и затвердевает; 2) раствор вещества наносят на пластинку, где он выпаривается (для водных растворов

применяют пластинки из AgCl); 3) осаждают сублимированный в вакууме материал на пластинку из NaCl ; 4) раствор наносят на подходящую пластинку, нагретую выше точки кипения растворителя; 5) готовят взвеси стертого твердого порошка в жидкой среде, обычно в минеральном масле, иногда во фтороуглероде или гексахлорбутадиене; 6) для получения образца прессуют смесь порошков исследуемого материала и KBr (или другого щелочного галоида).

Первые пять из этих способов не всегда применимы; в некоторых случаях получаются спектры либо вообще невысокого качества, либо мало пригодные для количественных измерений. Наиболее широко распространен метод взвесей, так как он очень прост и применим для самых разнообразных веществ. Последний метод (метод прессованных образцов) имеет ряд очевидных преимуществ перед остальными и уже заменил их во многих лабораториях. Ввиду все возрастающего значения этого метода, особенно для исследования биологических веществ, мы рассмотрим его более подробно.

Метод прессованных образцов

Метод изготовления твердых образцов, известный под названием „метода прессованных образцов“, представляет собой, пожалуй, наиболее ценный вклад в инфракрасную спектроскопию за последние годы. Этот метод обычно связывают с именами Стимсона и О'Доннелла [157] и, независимо от них, Шидта и Рейнвейна [145]. Однако в недавно появившейся статье Кук и другие [43] утверждают, что они разработали этот метод в своей лаборатории в период 1947—1949 гг. и тогда же опубликовали его, но не в широкой печати. Сущность этого метода состоит в том, что смесь порошков исследуемого материала и KBr прессуют под достаточно высоким давлением так, что получается твердый образец (обычно в виде плоского диска). При оптимальных условиях такой образец может быть абсолютно светлым и прозрачным; но для многих спектрометрических работ вполне допустима некоторая „мутность“.

Описанные в литературе методики изготовления хотя и различаются иногда значительно в деталях, но по существу аналогичны той, которую применили Стимсон и О'Доннелл [157] для получения спектров цитозина и изоцитозина. Чистый КВг размалывали до 200 меш и высушивали в течение нескольких дней при 110°; затем его смешивали с исследуемым материалом и смесь растирали в ступке. Порошкообразную смесь помещали в открытый стальной штамп, находящийся в герметизованной камере, которую затем откачивали; смесь подвергали давлению в течение 3—5 мин. под 15-тонным гидравлическим прессом и вынимали из штампа в готовом для спектроскопических измерений виде. На образцах, приготовленных таким образом, получали как ультрафиолетовые, так и инфракрасные спектры. При изготовлении смеси порошков для прессования необходимо учесть следующие существенные моменты: 1) КВг должен быть абсолютно сухим, иначе при 3 и 6 μ появятся полосы поглощения воды; 2) величина частиц не должна превосходить 1 μ ; более крупные частицы вызовут усиленное рассеяние, что приведет к потере энергии и размытости спектра; 3) для получения хороших количественных результатов требуется равномерное распределение исследуемого порошка в смеси.

Выбор методики зависит от природы и количества изучаемого вещества. В некоторых случаях были получены удовлетворительные результаты при простом размельчении образца в ступке. Шидт [144] упоминает использование вибратора; Гордон и другие [75] нашли весьма эффективным изготовление образцов угля на шаровой мельнице. Ингебритсон и Смит [88] сообщили о хороших результатах смешивания сухого КВг вместе с образцом в летучем растворителе (например, в ацетоне или бензоле) с последующим растиранием до высыхания. Еще один способ изготовления порошкообразных смесей — высушивание замороженного раствора образца, к которому добавлен КВг. Этот способ, более медленный и громоздкий, чем некоторые другие, очень удобен при различных биохимических исследованиях и, вероятно, будет особенно полезен в обращении с очень малыми количествами. Пример такого рода описан Торибара и Ди-Стефано [165],

которые получили этим методом спектр материала, элюированного из пятна на хроматограмме на бумаге. Вес материала равнялся, вероятно, 10—100 $\mu\text{г}$; он был выделен из гидролизата 6 мг обызвествленного хряща большеберцовой кости крысы, больной рахитом. Методом высушивания из замороженного состояния пользовался также работавший в лаборатории автора Нг [124] для получения спектров некоторых липопротеидов сыворотки человека. В этих опытах липопротеиды разделяли ультрацентрифугированием в растворах, плотность которых регулировали добавлением KBr ; в окончательный раствор перед лиофилизацией добавляли требуемый избыток KBr .

Были сконструированы различные типы штампов; мы приводили многочисленные ссылки на работы, в которых они описаны. Штампы можно также заказать у фирм, выпускающих инфракрасные спектрометры. В простейшем виде они представляют собой тяжелую плиту, обычно стальную, с отверстиями нужного диаметра. Два стальных стержня с полированными плоскими торцами входят в отверстие с очень малым зазором; один из них служит пуансоном, второй — наковальней. Штампы такого типа малых размеров изготавливает фирма „Бэрд“ (круглые — диаметром 6,35 мм, или прямоугольные — $6 \times 1,5$ мм или $6 \times 0,75$ мм) со стальными или пластмассовыми основаниями. Пользуясь такими штампами, можно получить вполне пригодные, хотя и непрозрачные, образцы без откачивания воздуха перед прессованием [6]. Но, как показал опыт, обычно для получения качественных прессованных образцов необходим вакуум. В штампах просверливают боковой канал для выпуска воздуха из пространства, занимаемого образцом, и помещают их в металлическую герметизованную камеру. Фирма „Бэрд“ поставляет герметизованные камеры, приспособленные для изготавливаемых ею штампов. В других описанных конструкциях откачку производят из объема самого штампа без вспомогательной камеры. Шланг соединяют со штуцером, связанным с полостью образца; для стержней предусмотрено соответствующее уплотнение.

Если на таких прессованных образцах требуется производить точные количественные измерения, рекомендуются штампы более сложной конструкции. К ним отно-

сятся, например, штампы, выпускаемые фирмой „Бэрд“ : вместо двух стержней в них имеются пуансон и опорная плита, в результате чего достигается большая точность в толщине изготавливаемых образцов. Фирма „Перкин—Эльмер“ изготовила эвакуируемый штамп для изготовления образцов диаметром 13 мм, воспользовавшись некоторыми разработанными Шидтом [144] конструктивными деталями в целях экономии материала при прессовании. В этой конструкции образец помещают в канал, просверленный по оси разъемного конуса. Этот конус входит в коническое отверстие основания штампа и легко из него выбивается, позволяя, таким образом, осуществить удаление образца без всякого повреждения (раскалывания или выкрашивания). Ингебритсон и Смит [88] описали штамп, в котором образец формуется в съемном металлическом кольце ; при разборке штампа кольцо служит держателем образца.

Условия прессования, описанные выше, меняются в зависимости от размеров изготавливаемых образцов. Данные о давлении и продолжительности прессования, приведенные выше из работ Стимсона и О'Доннелла, весьма показательны, но диаметр диска там не указан. Для получения дисков диаметром 12,7 мм, содержащих 1% белка, Кук и другие [43] применяли давление $10,5 \text{ т/см}^2$ в течение нескольких десятков секунд. Ингебритсон и Смит изучали этот вопрос и нашли, что достаточно действия силы 20 т в течение 20 мин. для приготовления прозрачных дисков диаметром 25,4 мм ; при более высоком давлении такие же результаты получали за 3—5 мин. Фирмы „Бэрд“ и „Перкин—Эльмер“ применяли пресс мощностью 10 т для изготовления выпускаемых ими штампов, прямоугольных — $4,5 \times 22 \text{ мм}$ и круглых — диаметром 13 мм.

Шидт и Рейнвейн [145] исследовали различные соли, которые можно было бы использовать в этом методе вместо КВг, в том числе NaCl, NaBr, KCl, KI и AgCl. Результаты, полученные ими, указывают, что КВг, вообще говоря, более пригоден, чем другие соли, так как при работе с ним отсутствует ложное поглощение, обусловленное остатками воды или другими загрязнениями. КВг получил с тех пор широкое признание; однако Френч и другие

[67] с успехом применяли Ku , предварительно тщательно очищенный рекристаллизацией и сушкой. Преимуществом Ku является меньшая продолжительность прессования при том же давлении. По сообщению авторов, диски диаметром 22 мм получались при действии силы 20 *m* в течение 5 мин.

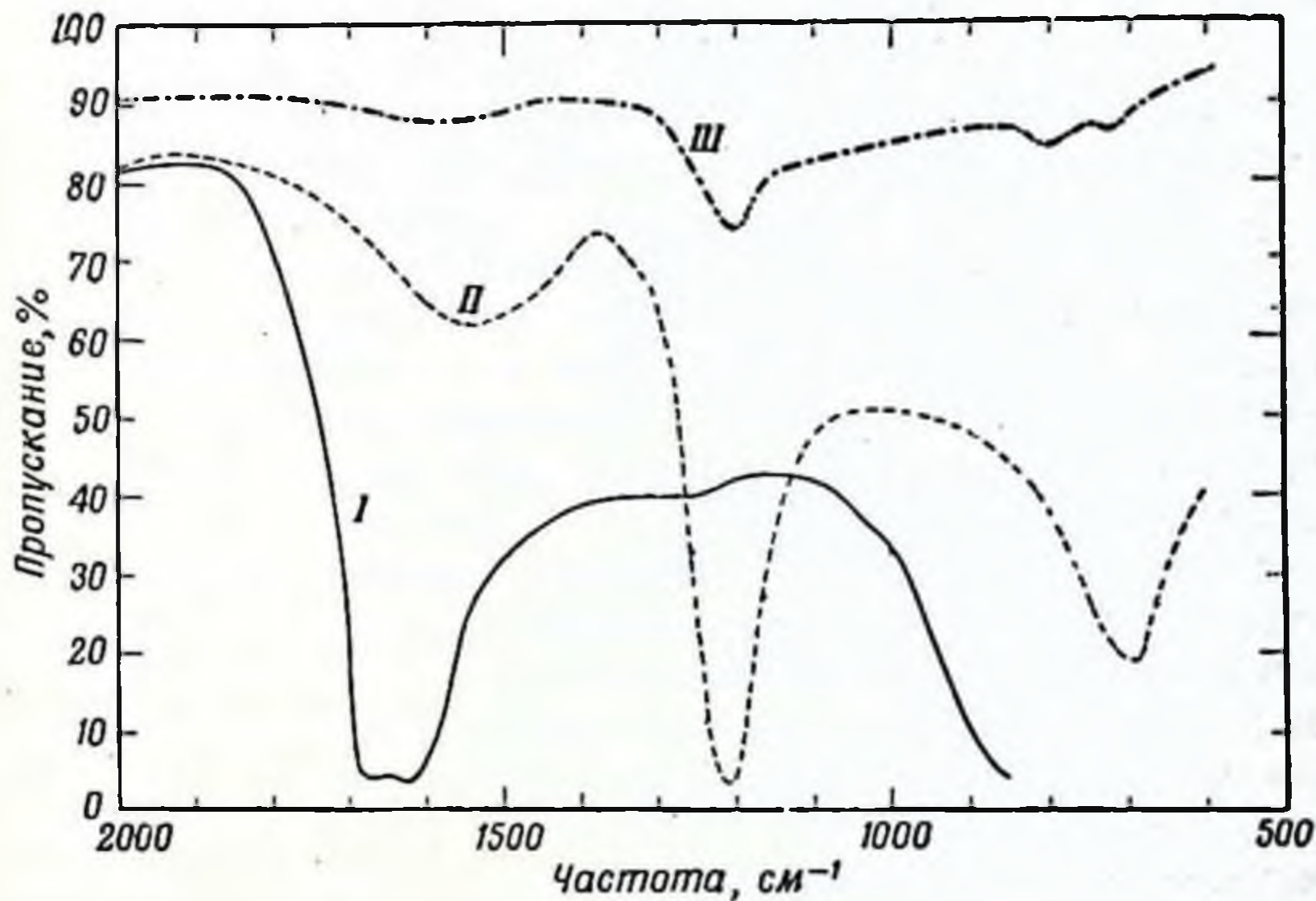
Возможности метода прессованных образцов неоценимо велики. Прежде всего он позволяет исследовать самые различные твердые материалы и, кроме того, по сравнению с другими способами приготовления образцов обладает рядом преимуществ: 1) отсутствие полос поглощения веществ, в которых распределен исследуемый материал (как в обычном методе суспензии в минеральном масле); 2) уменьшение или полное устранение фона, обусловленного рассеянием на коротких длинах волн; 3) лучшее в смысле четкости и разделения полос качество спектра; 4) возможность исследования при очень малых количествах вещества, что расширяет границы применения микроспектрометрии; 5) создание прочной базы для количественных измерений нерастворимых твердых веществ. Несколько меньшее значение имеет возможность хранения образцов на случай повторного исследования и в некоторых случаях исследования их в других областях спектра, например в ультрафиолетовой области.

Водные растворы

Первоначально существовали два рода трудностей, связанных с применением воды в инфракрасной спектроскопии в качестве растворителя. Первая была устранена с появлением во время войны оптического хлористого серебра и бромисто-иодистого таллия; окошко кюветы, изготовленное из этих веществ, нерастворимо в воде и прозрачно для инфракрасного излучения.

Вторая трудность — очень сильное поглощение инфракрасного излучения водой — остается, поэтому применение метода инфракрасной спектроскопии при решении ряда проблем, имеющих биологический интерес, казалось невозможным. Однако при некоторых длинах волн вода все же достаточно прозрачна для получения приемлемого спектра. Кроме того, соответствующие области „прозрач-

ности" D_2O сдвинуты настолько, что, пользуясь в качестве растворителей этими двумя веществами, можно изучить интервал от 2 до 15 μ . Гор, Барнес и Петерсон



Ф и г. 5. Кривые пропускания слоев воды и тяжелой воды толщиной 0,025 мм [23].

I — H_2O ; II — D_2O ; III — степень сбалансированности, которую можно получить на двухлучевом спектрометре, поместив на пути каждого из лучей слой D_2O толщиной 0,025 мм.

[77] изучали этим методом влияние изменений pH на спектры некоторых органических кислот. Позднее Ленорман [105] и Ленорман и Шуто [108] также пользовались этим приемом при получении спектров некоторых аминокислот и пептидов. Блу и Ленорман [23] описали применение этого метода при измерениях двухлучевым спектрофотометром. На фиг. 5 показаны кривые пропускания H_2O и D_2O , а также кривая, полученная в том случае, когда кювета с образцом и кювета сравнения наполнены D_2O . Эти авторы приводят в качестве иллюстрации спектры белков, нуклеиновых кислот, нуклеогистона и суспензии живых бактерий. Поскольку толщина кюветы имеет порядок 0,01—0,025 мм, обычно требуется

относительно высокая концентрация (5-20%). Ниже мы коснемся некоторых полученных этим методом результатов, имеющих специальный интерес.

Количественный анализ

В заводских лабораториях инфракрасной спектроскопией пользуются в основном для количественного анализа. В тех областях, где можно применить этот быстрый и простой метод, он всегда удобнее любого другого. Очень существенно, что для получения спектра не требуется большого количества материала и что вещество при таком исследовании не разрушается. Чувствительность и точность в значительной степени зависят от природы анализируемой системы, но при благоприятных условиях они достигают очень высоких порядков. В ряде случаев применение химических методов затруднено или они неточны, в то время как инфракрасный анализ вполне эффективен. Хорошо известным примером является определение *транс*-изомеров ненасыщенных жирных кислот [151].

В основе количественного анализа методом измерения поглощения в инфракрасной области спектра лежат те же спектрофотометрические принципы, что и для других спектральных областей. Мы здесь не будем заново выводить известные соотношения, вытекающие из закона Бэра, а также подробно описывать технику измерений (см. [120]).

Количественные измерения на газах, жидкостях и растворах, т. е. на таких веществах, которые могут быть помещены в соответствующую кювету определенной толщины, не вызывают никаких затруднений. Напротив, анализ твердых веществ, нерастворимых в неполярных органических растворителях, представляет серьезные трудности. Рассматривая изложенные выше методы изготовления твердых образцов, можно видеть, что большинство из них не позволяет точно измерить либо концентрацию, либо длину оптического пути в образце. В методе масляных суспензий можно иногда ввести внутренний стандарт (этот способ применили, например, Барнес и другие [15] при анализе пенициллина). Метод прессованных образцов, кроме других своих преимуществ,

позволяет непосредственно измерять концентрацию по весу КВг. С появлением этого метода, как нам кажется, количественный анализ нерастворимых твердых образцов может занять по крайней мере такое же прочное положение в спектроскопической практике, как и анализ в растворах. Для работ с микроколичествами он имеет, пожалуй, даже некоторые преимущества, благодаря чему можно найти новые области применения инфракрасного анализа в биохимии.

Весьма эффективен особый метод количественного анализа, осуществляемый при помощи двухлучевого спектрофотометра — так называемый „дифференциальный метод“. Он особенно полезен в тех случаях, когда измеряют малое количество вещества, полосы которого перекрываются полосами другого компонента, присутствующего в большом избытке. Второй („мешающий“) компонент помещают в кювету сравнения в той же концентрации, что и в образце. При наличии нескольких „мешающих“ веществ процедура весьма осложняется. Этот метод рассмотрен в работах Шнурмана и Кендрика [146]; по сообщению Мак-Дональда [114], его можно применить для точного определения элаидиновой кислоты при концентрациях порядка 0,5%. Гулден [78] изучал возможность использования инфракрасного спектрометра для измерения количества вещества непосредственно на хроматограммах на бумаге. Для определения количества аминокислот хроматограмму (на бумаге, пропитанной минеральным маслом) последовательно анализировали при помощи спектрометра, установленного на 1610 см^{-1} , т. е. в области сильного пика поглощения аминокислот. Удавалось определить количества порядка 0,5 мг с точностью $\pm 5\%$, но нижний предел измерений не определен.

Применение инфракрасной спектроскопии в биохимии

Не намереваясь полностью излагать столь широкую тему, мы сделаем здесь лишь некоторые замечания о тех исследованиях, которые производятся в различных областях биохимии методами инфракрасной спектроскопии. Мы надеемся, что краткое описание отдельных

успехов этого метода заострит внимание читателей на различных сторонах практики инфракрасной спектроскопии, как экспериментальных, так и теоретических. Некоторые из этих вопросов были недавно освещены в литературе; в тексте приводятся ссылки на те статьи, в которых можно найти более развернутое обсуждение той или иной проблемы.

Белки, полипептиды и аминокислоты

Эти классы соединений представляют исключительно благодарное поле деятельности для исследований методом инфракрасной спектроскопии. В 1952 г. Сэзерленд [158] опубликовал прекрасный обзор работ в этой области и подытожил основные открытия, сделанные к тому времени. Все эти исследования могут быть разбиты на две категории: 1) установление корреляций между спектрами и основными связями или структурными группами; 2) изучение спектров, связанных с различными конфигурациями белковых цепей.

Отдельные аминокислоты изучала ранее Райт [180, 181], которая нашла, что спектры *d*- и *l*-форм одной и той же аминокислоты были сходны между собой, но отличались от спектра *dl*-формы. Это явление она объясняла различиями молекулярных взаимодействий в кристаллическом состоянии. Работы ряда других авторов подтвердили это объяснение; по наблюдениям Оти и Гринштейна [130], спектр *l*-цистинил-*d*-цистина сходен со спектром *d* цистинил-*l* цистина, но отличается от спектра *l* цистинил-*l*-цистина. Эллиотт [52] отметил в спектрах многих синтетических полипептидов, цепь которых имеет α -конфигурацию, значительное различие между характеристическими валентными частотами группы CO в оптически-активной и мезоформе. Аминокислоты обладают характерным спектром в области „отпечатка пальцев“. Были сделаны попытки проследить некоторые полосы в дипептидах и выше, но они имели весьма скромный успех. Ларсону [104] удалось приписать полосы спектра лейцилвалина различным аминокислотным компонентам. Блу и Линслей [25] обнаружили,

что полоса 1015 см^{-1} сохраняется во всех спектрах серии полиглицинов, но отсутствует у полилейцина или полиаланина. Эти авторы нашли, что в том случае, когда полиглицин содержит больше трех аминокислотных остатков, его спектр приближается по своему характеру к спектру белка (см. фиг. 1). Для расшифровки частот, связанных с метильными боковыми цепями в некоторых полиаланинах, Эллиотт [53] применял поляризацию и дейтерирование. Как показал Ленорман [105] на спектрах растворов в тяжелой воде, натриевые соли аминокислот имеют полосу поглощения группы COO^- примерно при $6,35 \text{ м}$, в то время как у солянокислых солей полоса группы COOH находится при $5,85 \text{ м}$.

Фузон, Жози и Поуэлл [69] изучали инфракрасные спектры меркаптуровых кислот и S-замещенных цистеинов с целью идентификации этих соединений в моче; они считали, что эти вещества имеют отношение к анти-токсическому механизму.

Наиболее сильные полосы поглощения в спектрах белков или полипептидов находятся при 3 ; $6,1$ и $6,45 \text{ м}$. Эти полосы можно приписать следующим колебаниям пептидной группы:

- 3 м — валентные колебания NH
- $6,1 \text{ м}$ — валентные колебания $\text{C} = \text{O}$
- $6,45 \text{ м}$ — деформационные колебания N—H
или валентные колебания C—N (спорная)

В спектрах N-однозамещенных амидов присутствует та же группа полос; изучение этого класса соединений очень помогло в установлении связей между полосами спектра и определенными видами колебания. В работе Рэндолла и других [136] весьма подробно изложена их точка зрения на интерпретацию этих полос. Спорная полоса $6,45 \text{ м}$ была предметом многих исследований; Сэзерленд [158] обсудил аргументы „за“ и „против“ каждой из интерпретаций, но, поскольку окончательного решения так и не было найдено, вопрос о расшифровке этой полосы остался открытым. Результаты более поздних

исследований N-замещенных амидов заставляют думать, что эта полоса относится скорее к валентным колебаниям C—N. Летау и Гроп [109] приводят в доказательство тот факт, что введение в молекулы N-бутилэтанамиды и N, N-дибутилэтанамиды электроотрицательных заместителей (хлора или фтора) при α -углероде вызывает сдвиги полосы. Гирер [70, 71] изучал N-метилацетамид и некоторые родственные ему соединения в различных состояниях и при низких температурах, а также их дейтерозамещенные производные. Он пришел к заключению, что, если эти соединения находятся в конденсированном состоянии, то в них имеются две различные формы водородной связи, возникающие, по-видимому, за счет кето-энольного таутомеризма.

Невозможность приписать полосу $6,45 \mu$ какой-либо простой связи таким образом, чтобы это удовлетворяло всем имеющимся экспериментальным данным, заставляет думать, что здесь мы имеем дело с колебанием более сложного характера. Принимая во внимание явление резонанса и наблюдаемое укорочение связи C—N в амидогруппе, Паулинг, Кори и Брэнсон [132] вычислили, что связь C—N должна быть наполовину двойной; это обстоятельство было учтено в работах ряда других авторов при установлении связи между валентными колебаниями C—N и спектром. Фрэзер и Прайс [63] тщательно исследовали типы колебаний пептидной группы; они приближенно рассчитали частоты колебаний группы N—C—O, рассматривая ее как изогнутую трехатомную молекулу и определяя силовые константы на основании измеренных длин связей. Одна из вычисленных частот была весьма близка к частоте деформационного колебания N—H. Взаимодействие таких двух колебаний дает две полосы, одна из которых может быть идентифицирована с полосой $6,45 \mu$ пептидов. Предложенная Фрэзером и Прайсом трактовка полосы $6,45 \mu$ как сочетания плоского деформационного колебания N—H с фазовым валентным колебанием N—C—O представляется вполне обоснованной, и она, вероятно, ближе к истине, чем те, в которых не принимается во внимание взаимодействие колебаний. Эта трактовка применима лишь к *транс*-конфигурации пептидной группы; при *цис*-конфигурации взаимодействия та-

кого рода существовать не может, что подтверждается отсутствием этой полосы в спектрах циклических амидов и лактамов, существующих только в *цис*-форме.

В спектрах белков полоса $6,45 \mu$ еще более сложна. Блу и Ленорман [23] изучали альбумин бычьей плазмы, растворенный в D_2O , при различных рD и нашли, что эта полоса в значительной степени перекрывается полосой $6,35 \mu$, принадлежащей ионизированному карбоксилу. При дейтерировании эта компонента полосы $6,45 \mu$ сохраняется в изоэлектрической точке или при подкислении, но исчезает в щелочном растворе или при нагревании изоэлектрического раствора до 100° в течение 2 мин. Исчезновение полосы необратимо при повторном подкислении.

Было высказано предположение, что пептидные группы существуют в двух формах: в одной из них дейтерирование происходит легко, а в другой для дейтерирования требуется повышенная температура или ощелачивание. Эрлих и Сэзерленд [49] провели аналогичные исследования с дейтерированными белками и нашли, что при интерпретациях, основанных на положении абсорбционных максимумов, это соображение следует учесть.

Кесслер и Сэзерленд [98] идентифицировали полосу поглощения около $14,3 \mu$ с неплоскими деформационными колебаниями связи N—H в пептидной группе. Эта полоса сдвигалась к $18,9 \mu$ в дейтерированном N-метилформамиде. Методом разведения было показано влияние на эту полосу водородной связи. Перпендикулярный дихроизм этой полосы в спектре растянутого найлона согласуется с предположением о перпендикулярности связи N—H к оси растяжения.

Исследуя полосы поглощения полипептидов и белков в инфракрасном спектре, можно получить ряд ценных сведений о конфигурации цепи. Ясно, что установить конфигурацию на основании одних этих данных невозможно, но их можно использовать для проверки какой-либо заранее постулированной модели. В некоторых случаях изучают положение полос, но чаще — дихроизм, измеряемый при помощи поляризованного излучения. Во многих исследованиях фибриллярных белков пользовались отражательным микроскопом в сочетании с

поляризатором. В дополнение к трем основным полосам пептидной группы было обнаружено несколько комбинационных полос, которые также могут быть использованы при интерпретации спектра. Среди ученых, работавших в этой области, следует отметить Амброза, Эллиотта и их сотрудников. В 1951 г. они провели ряд исследований синтетических полипептидов и белков различных типов при помощи инфракрасных спектров. Результаты этих работ приведены в табл. 1 [3]. Судя по длинам волн максимумов поглощения неденатурированных и денатурированных белков, первые обладают свернутой цепью, в то время как у вторых имеется значительное количество вытянутых цепей. Аналогичные изменения наблюдались в синтетическом поли-*dl*-аланине [50].

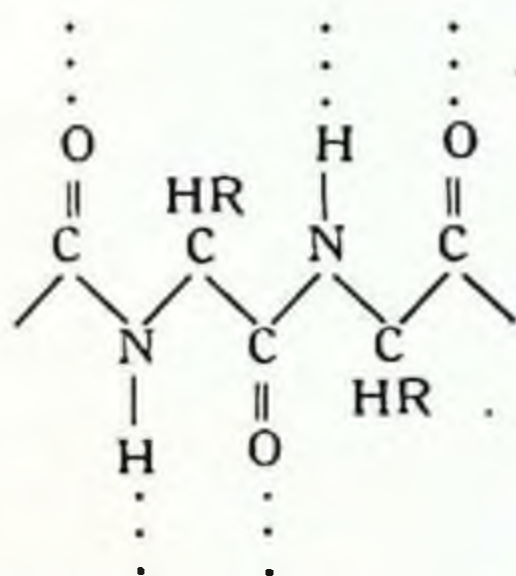
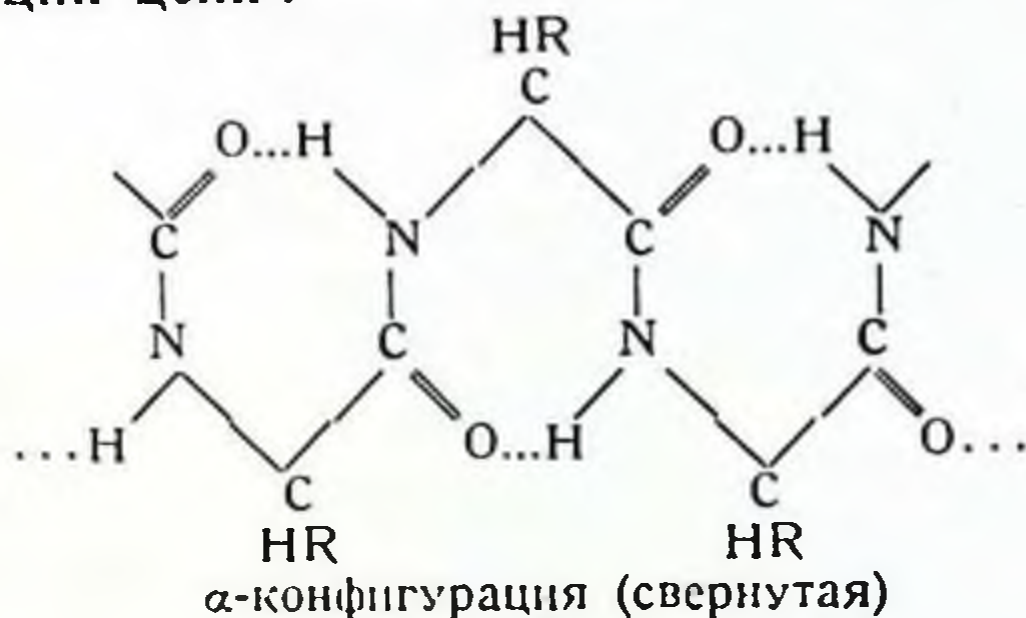
Таблица 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛОС ПОГЛОЩЕНИЯ ПЕПТИДНЫХ ГРУПП

Колсбание	Синтетические полипептиды и α -и β -фибрилярные белки				Желатина	
	длина волны, μ		дихроизм*		длина волны, μ	дихроизм
	свернутая цепь	вытянутая цепь	свернутая цепь	вытянутая цепь		
Деформационное колебание N—H	6,47	6,56	⊥		6,46	
Валентное колебание C=O	6,02	6,10		⊥	6,02	⊥
Валентное колебание N—H	3,03	3,03		⊥	3,00	⊥
Комбинационное колебание C=O	2,17	2,21	Нет		2,18	⊥
Комбинационное колебание N—H	2,07	2,07	⊥		2,05	

* Обозначения: || — поглощение сильнее в том случае, когда электрический вектор плоско-поляризованного излучения параллелен оси волокна (или оси ориентации), чем в том случае, когда он перпендикулярен ему; ⊥ — поглощение сильнее в том случае, когда электрический вектор плоско-поляризованного излучения перпендикулярен оси волокна (или оси ориентации), чем в том случае, когда он параллелен ему.

Амброз и Эллиотт [2] рассматривали следующие модели конфигураций цепи:

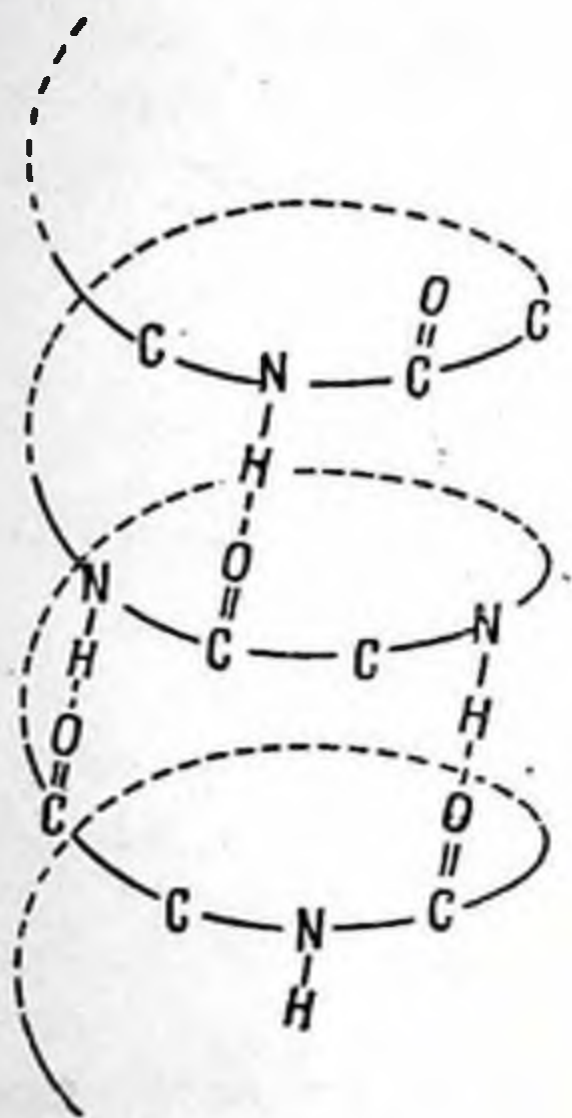


β-конфигурация (вытянутая)

Эти модели объясняют свойства дихроичности, показанные в табл. 1; денатурационные изменения правдоподобно объясняются переходом от формы, в которой водородные связи локализованы внутри цепей, к форме, в которой водородные связи образованы между цепями.

Паулинг, Кори и Брэнсон [132], предлагая хорошо известную в настоящее время спиральную модель структуры белков, утверждали, что α-структура, показанная выше, не удовлетворяет основным требованиям, накладываемым на соотношения связей в пептидной группе. В то же время их α-спираль согласуется с параллельным дихроизмом полос, соответствующих валентным колебаниям C=O и N—H. Эти связи направлены поперек винтовой линии под небольшим углом (всего около 12°) к оси цепи и образуют водородные связи внутри цепи, как показано на фиг. 6. Поскольку предполагалось, что связи C=O и N—H примерно коллинеарны, из простых представлений о колебаниях локализованных связей

следовало, что они должны иметь примерно одинаковые значения дихроизма. Однако Амброз и Эллиотт [2] сообщили о том, что в хорошо ориентированном поли- γ -бензил-*l*-глутамате дихроизм полосы N—H значительно выше, чем полосы C=O. Позже Эллиотт [51] обнаружил различие дихроизма соответствующих полос поглощения найлона.



Ф и г. 6. Схема расположения пептидных групп и внутримолекулярных водородных связей в спиральной модели полипептидов.

Более подробную схему см. в работе Паулинга, Кори и Брэнсона [132].

Эта аномалия заставила подумать о более тщательных исследованиях точных значений дихроизма. Фрэзер [61] оценил влияние таких факторов, как беспорядочное расположение цепей в образце, сходимость пучка и несовпадение направления связи с направлением изменения дипольного момента (т. е. с направлением переходного момента). Фрэзер и Прайс провели анализ колебаний пептидной группы с учетом явления резонанса и нашли, что переходный момент, соответствующий валентному колебанию C=O, образует со связью C=O угол примерно 20° . (Измерениями Бэмфорда и других [11] было экспериментально установлено, что соответствующий угол в кристаллическом ацетанилиде не превышает 22° .) Это важное уточнение объясняло низкое значение дихроизма полосы C=O по сравнению с

полосой N—H и позволило лучше согласовать имеющиеся данные с моделью α -спирали. Структура коллагена представляет собой третий вид структуры белковых цепей, при изучении которой пользовались измерениями дихроизма полос в инфракрасной области спектра. Рэндолл, Фрэзер и Норт [137] считали, что ни одна из предложенных к тому времени моделей не согласуется достаточно удовлетворительно с данными

рентгеноструктурного анализа и результатами измерения дихроизма и одновременно с требованием планарности пептидной группы. По их наблюдениям валентная частота N—H обладает более сильным дихроизмом в инфракрасной области спектра, чем можно было бы ожидать согласно расчетам, основанным на модели Паулинга и Кори [131], хотя эти авторы утверждают, что направление связи N—H (перпендикулярно к оси цепи) согласуется с данными Амброза и Эллиотта [4].

Недавно Крик [45] предложил для коллагена структуру, в которой две спирали, имеющие общую ось, соединяются водородными связями, перпендикулярными оси. Данные, которые получили Бэджер и Пуллин [7], противоречат этой модели. Они наблюдали параллельный дихроизм для сложного плоского колебания группы N—H, в то время как согласно модели плоскость пептидной группы должна быть перпендикулярна к оси цепи. Более того, интенсивность этой полосы не отличается от обычной, что противоречит наличию амидогруппы в *цис*-положении, требуемому в модели. Сэзерленд, Таннер и Вуд [159] наблюдали также, что неплоские колебания связи N—H (650 см^{-1}) обладают перпендикулярным дихроизмом, что также не согласуется с моделью.

Измеряя дихроизм ориентированного геля вируса табачной мозаики в инфракрасной области спектра, Фрэзер [59] пришел к заключению, что основной компонент белка находился в α -конфигурации, причем оси цепей ориентированы перпендикулярно оси вирусной частицы. Рудалл [141] изучал эпидермин — эластичный фибриллярный белок из эпидермиса носа коровы. Он использовал как поляризованное, так и неполяризованное инфракрасное излучение и нашел доказательства существования перехода $\alpha \rightarrow \beta$ при нагревании или растяжении.

Спектры белков в коротковолновой инфракрасной области ($1\text{—}2,5\ \mu$) также представляют определенный интерес; в табл. 1 приведены две важные полосы, лежащие в этой области. Бат и Эллис [16] изучали желатину, фиброин шелка и цинк-инсулин и сообщают, что спектр шелка имеет дихроичную полосу $1,93\ \mu$, которая, по их мнению, является обертоном валентного колебания C=O. Однако Эллиотт, Хэнби и Малкольм [54] обнаружили вблизи

полосу воды, полностью исчезавшую после высушивания образца, поэтому они считают обнаруженную ранее полосу ложной. Эти авторы составили обзор работ, посвященных исследованию полипептидов, шелка и других волокон в коротковолновой инфракрасной области.

Нуклеиновые кислоты

Число работ по инфракрасной спектроскопии нуклеиновых кислот невелико по сравнению с числом работ, относящихся к белкам, но в этой области можно ожидать значительных успехов. Так же как и для белков, здесь были предприняты попытки корреляции спектров целых молекул со спектрами их более или менее сложных компонентов. Спектры пуринов и пиримидинов изучали ряд авторов, в том числе Блу и Филдс [22], Браунли [31], Лахер и другие [103], Шорт и Томпсон [150] и Стимсон и О'Доннелл [157] (цитозины). Блу и Филдс [21] получили спектры некоторых нуклеозидов, нуклеотидов и нуклеиновых кислот (натриевых солей). Возможности интерпретации были весьма ограничены: полоса 3μ была приписана валентным колебаниям $O-H$ и $N-H$, полоса 6μ — различным двойным связям, полосы в более длинноволновой области остались нерасшифрованными. Затем было выяснено, что сильные полосы между 8 и 11μ принадлежат частицам фосфата и сахара.

Существуют различия между спектрами рибонуклеата и дезоксирибонуклеата натрия, но они не очень резки. В спектре соли ДНК имеется плечо при $9,8 \mu$, отсутствующее в спектре РНК; в последнем имеется полоса $11,7 \mu$, которой нет в первом.

Ленорман и Блу [107] изучали спектр адениловой кислоты в растворе D_2O и в сухом состоянии. Они наблюдали изменения в различных областях спектра при изменении ρD . Фрэзер и Фрэзер [57] провели поляризационные измерения ориентированных пленок ДНК. Был отмечен перпендикулярный дихроизм при 3μ (валентные колебания $N-H$), 6μ (различные валентные колебания двойных связей) и $9,5 \mu$ ($P-O-C$). Полоса $8,1 \mu$ (валентные колебания $P=O$) не обладает дихроизмом. Дихроизм валентного колебания $N-H$ согласуется с моделью

Уотсона и Крика [171], в которой две спиральные пряди скрепляются расположенными между ними водородными связями.

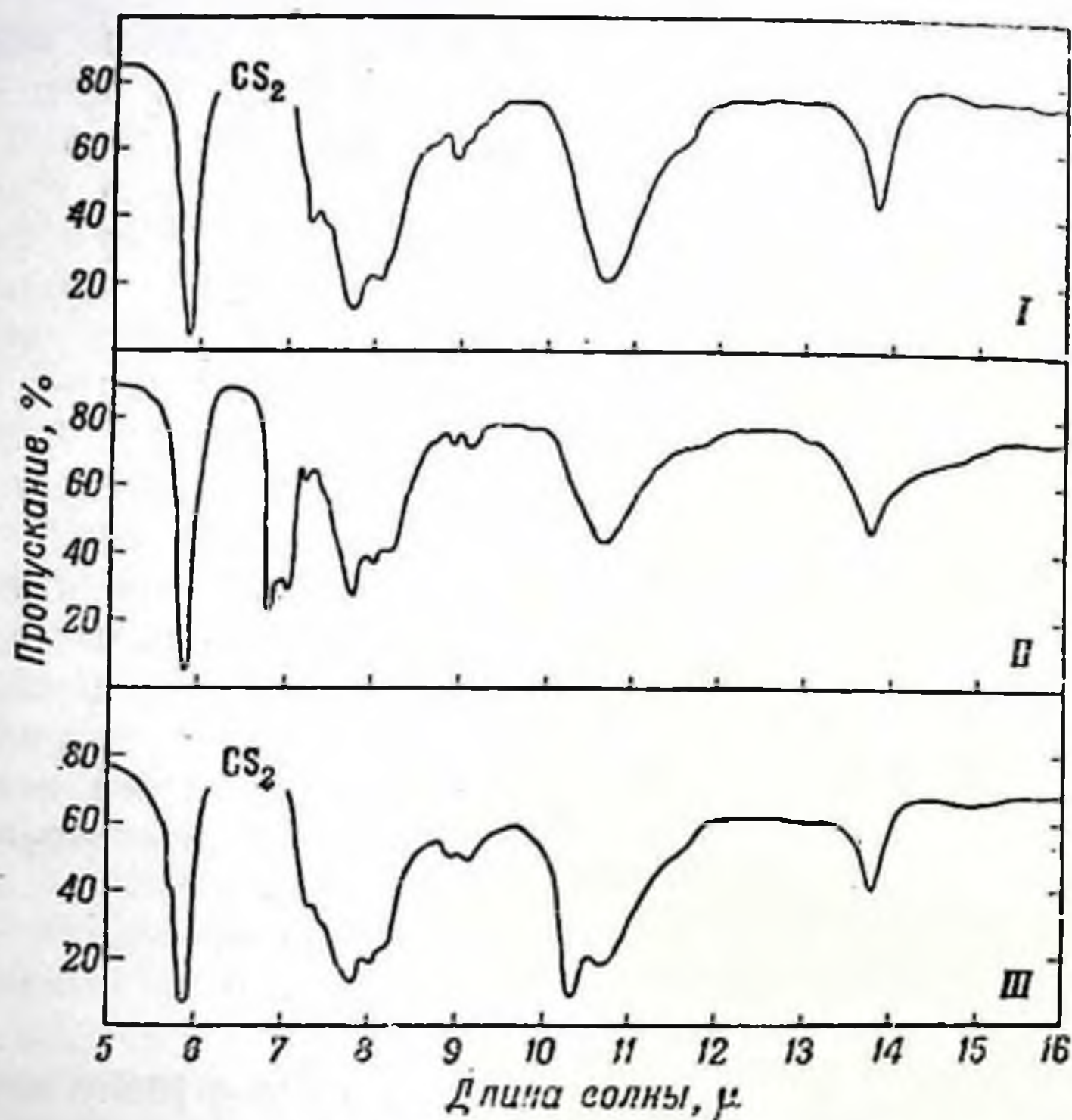
При изучении спектров веществ, растворенных в тяжелой воде, Блу и Ленорман [24] наблюдали явление, указывающее, по их мнению, на то, что при этом структура молекулы ДНК подвергается изменениям, аналогичным денатурации белка. Две сильные полосы при 1680 и 1645 см^{-1} смещались к 1660 и 1625 см^{-1} при различных воздействиях — нагревании до 100°, повышении рD свыше 9 или добавлении рибонуклеазы. Это смещение частоты аналогично различиям (см. табл. 1) между полосами C=O и N—H для свернутых и вытянутых белковых цепей и, вероятно, также отражает различие между двумя типами водородных связей в нуклеиновой кислоте.

Фрик и Розенберг [68] также наблюдали изменение спектра ДНК при высоких рН, выразившееся в небольшом, но воспроизводимом изменении контура полосы 3 μ ; авторы интерпретировали это изменение как результат разрыва водородной связи. Для исследований они применяли лиофилизированный материал, спрессованный с порошком KBr.

Липиды

Уилер [172] опубликовал недавно обзор работ по инфракрасной спектроскопии жиров, жирных кислот и их производных. Спектры обычных жирных кислот с длинной цепью, часто встречающихся в природе, например кислот с насыщенной прямой цепью или кислот, содержащих только неконъюгированные двойные связи в *цис*-конфигурации, качественно совершенно одинаковы; исключение составляют спектры кислот, находящихся в твердом состоянии [152, 153]. В этом можно убедиться на спектрах стеариновой (раствор в CS_2) и жидкой олеиновой кислот, изображенных на фиг. 7. По характеру инфракрасных спектров можно установить существование ряда жирных кислот с менее обычной структурой; ниже будут приведены в качестве примера некоторые литературные данные. Необходимо принять во внимание, что для окончательных выводов относительно структуры приходится

в большинстве случаев использовать наряду с методом инфракрасной спектроскопии также ультрафиолетовую спектроскопию и методы химического анализа.



Ф и г. 7. Сравнение некоторых типичных инфракрасных спектров жирных кислот [65].

I — стеариновая кислота (раствор в CS_2 , 30 г/л, толщина слоя 0,9 мм); II — олеиновая кислота (жидкая пленка толщиной 0,025 мм); III — элаидиновая кислота (раствор в CS_2 , 30 г/л, толщина слоя 0,9 мм). Отмеченная стрелкой полоса поглощения $10,3 \mu$ характерна для *транс*-формы изолированных двойных связей.

Изучая спектр жирной кислоты, выделенной из *Bacillus polytuxa*, Гор и Петерсен [76] обнаружили, что полоса метильной группы при $7,25 \mu$ обладает аномальной интенсивностью; по их мнению, эта аномалия свидетельствует о разветвлении цепи. Фриман [64] установил, что во многих случаях разветвление цепи в жирных кислотах отражается на их инфракрасных спектрах.

Кейсон, Фриман и Сумрелл [35] нашли, что C_{27} -фтиеноидная кислота (из туберкулезной палочки) имеет спектр,

необычно сложный для жирной кислоты. Спектр указывал на α , β -ненасыщенность и на присутствие по крайней мере четырех конечных метильных групп, одна из которых была расположена при α -углероде. Данные относительно изопронила, конечного этила и конечных n -пропиловых групп были отрицательны. Сравнение этих спектров со спектрами некоторых синтетических разветвленных α , β -ненасыщенных кислот [65] заставляет думать, что две из метильных групп находятся в α - и γ -положениях.

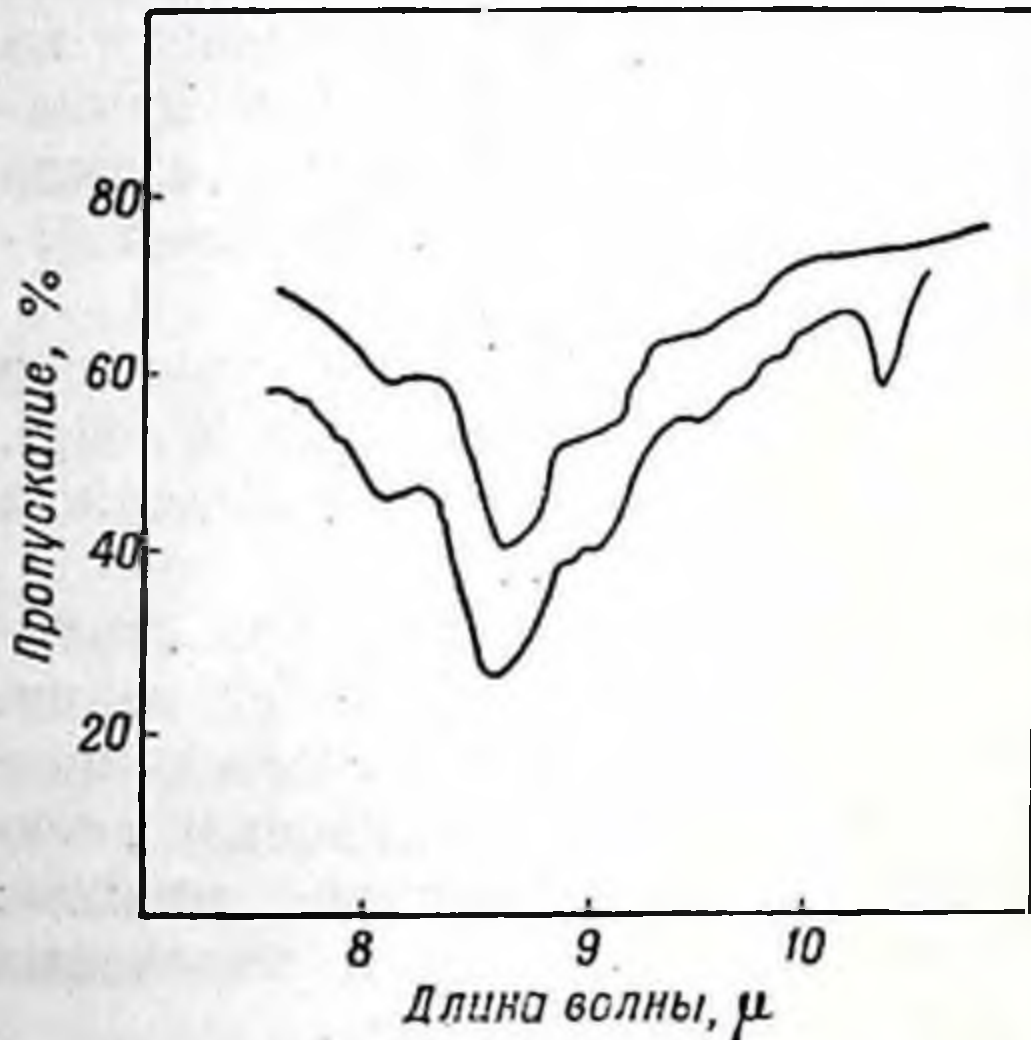
Гофман, Лукас и Сакс [86] нашли, что выделенная из *Lactobacillus arabinosus* жирная кислота содержит циклопропановое кольцо; единственным указанием на нее была инфракрасная полоса 9,8 μ . Кислота, называемая лактобацильной, была найдена позднее в *L. casei* [85].

Нунн [127] обнаружил циклопропановое кольцо в стеркулиевой кислоте (из масла семян *Sterculia foetida*). Гидрирование давало продукт, спектр которого содержал полосу поглощения циклопропана 9,85 μ .

Цельмер и Соломонс [36] успешно исследовали структуры антибиотиков — микомицина и его изомера изомикомицина, представляющих собой высоко ненасыщенные 13-углеродные жирные кислоты. По инфракрасным спектрам этих веществ было установлено наличие тройных связей, конъюгированных двойных связей и алленовых двойных связей.

На фиг. 7 изображен спектр элаидиновой кислоты — *транс*-изомера олеиновой кислоты. Он содержит полосу поглощения 10,3 μ , характерную для *транс*-конфигурации неконъюгированной двойной связи. Наличие этой полосы в спектре вакценовой кислоты, выделенной из говяжьего сала, подтверждает предположение о *транс*-конфигурации двойной связи в этом соединении [138]. Применяя метод инфракрасного спектрофотометрического анализа, Шрева и другие [151], Суэрн, Найт и Эдди [160] установили, что в жирных кислотах говяжьего жира содержится 5—10% *транс*-изомеров. Аналогичные измерения провели Корнуэлл и другие [44] на жирах масла. Они обнаружили 6—8% *транс*-кислот в летнем масле и примерно половину этого количества в зимнем. Смит, Фриман и Жак [154] нашли, что *транс*-кислоты молочного жира окружены кислотами, у которых число атомов

углерода в цепи колеблется от 12 до 18. По их мнению, вид спектра свидетельствует о том, что 10-углеродная фракция содержит жирные кислоты с конечными двойными связями. Джексон и другие [89], работая с концентратом молочного жира (метиловые эфиры), содержащим полиэтиеноидные жирные кислоты, определили при помощи инфракрасных спектров *цис*, *транс*-конфигурации некоторых конъюгированных двойных связей. Гартман, Шорланд и Мак-Дональд [82] высказали предположение, что из животных только у жвачных встречаются жирные кислоты с двойными связями в *транс*-форме. Они нашли *транс*-кислоты в жировых депо быка, овцы и оленя, но у крысы, лошади или кролика эти кислоты обнаружены не были.



Фиг. 8. Инфракрасные спектры растворимых в ацетоне липидов лимфы кролика.

Полоса поглощения 10,3 μ на нижней кривой указывает на наличие *транс*-формы двойных связей (образец взят у животного, получавшего в пищу изомеризованное растительное масло).

щенных жирных кислот в *транс*-форме в некоторых жирах. На фиг. 8 приведены инфракрасные спектры растворимых в ацетоне липидов лимфы кролика. Липиды были выделены из двух кроликов, одного из которых кормили обычным растительным маслом, а другого — маслом, частично изомеризованным нагреванием с селеном. Липиды, выделенные из второго кролика, идентифицировали по полосе поглощения 10,3 μ . При соответствующих условиях в лимфе обнаруживали измеримые

Юнг в лаборатории автора изучает в настоящее время возможность использования инфракрасных спектров в исследованиях, посвященных переносу и обмену ненасы-

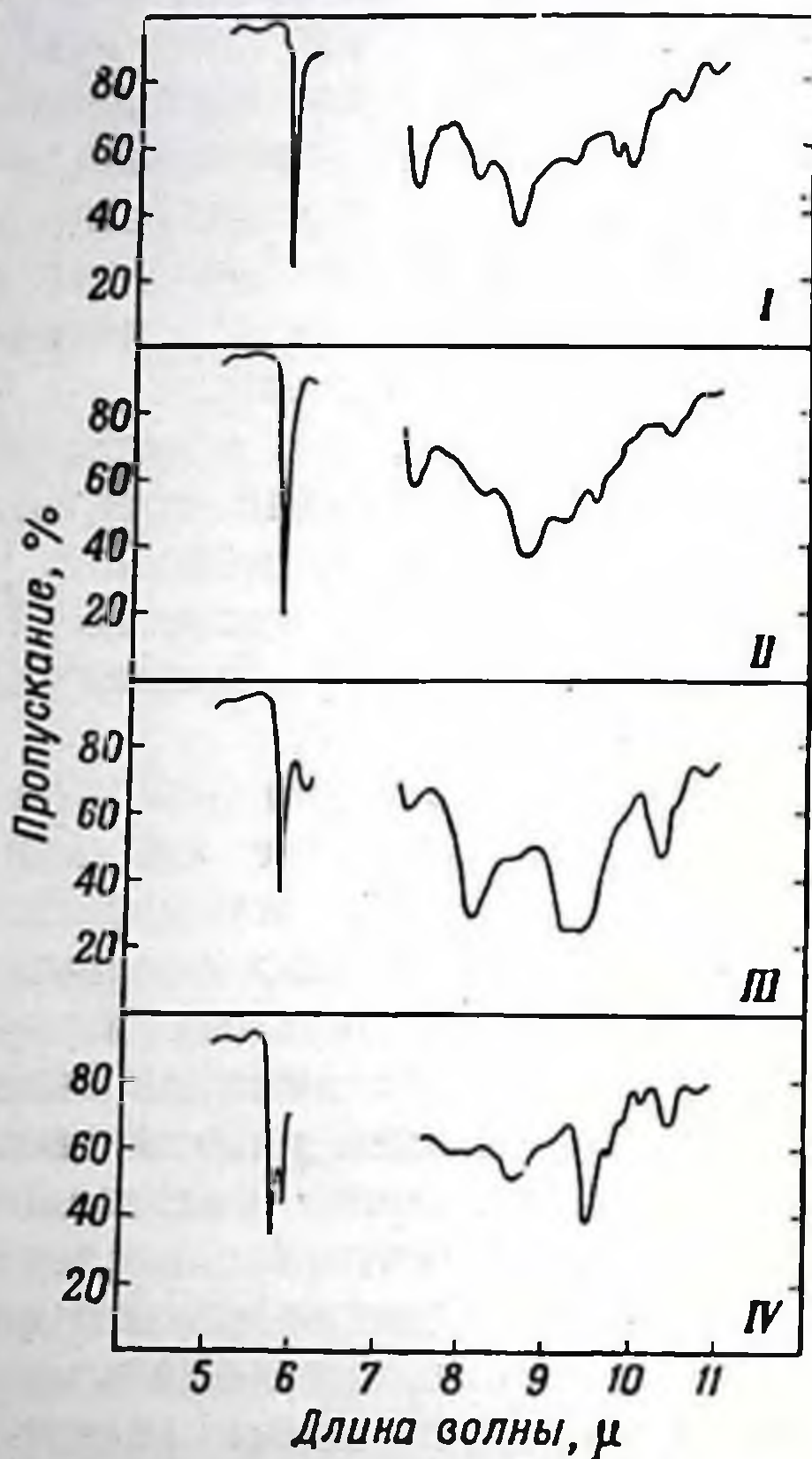
концентрации, но для малых концентраций, встречающихся в циркулирующей крови, решить эту проблему при помощи существующих методик пока не удалось.

Методом инфракрасной спектроскопии изучали аутоокисление жиров; Кан [99] применил его для выяснения механизма окисления линолевой кислоты, катализированной липоксидазой. Было обнаружено, что на ранних стадиях процесса некоторые двойные связи становятся конъюгированными. Имеются указания на существование молекул *транс*, *транс*- и *транс*, *цис*-формы.

Комплексные липиды изучены меньше, чем отдельные жирные кислоты. Бер и другие [9] получили спектры синтетических цефалинов и синтетических лецитинов [8], содержащих только насыщенные жирные кислоты. В работе Маринетти и Штольца [116] рассмотрены спектры сфингомиелина и цереброзидов.

В лаборатории автора был проведен ряд работ по химии крови, целью которых было развитие аналитических методов, основанных на измерении поглощения в инфракрасной области спектра, для изучения основных липидов сыворотки. Результаты предварительных исследований липопропротеидов и входящих в них липидов были опубликованы [65]. В процессе дальнейшей работы была испробована методика хроматографического разделения липидов на три фракции, каждую из которых исследовали затем методом инфракрасной спектрофотометрии. Разделение проводили на колонке из силикагеля, в основном методами Боргстрема [30]. Инфракрасные спектры типичных фракций липидов сыворотки (растворенных в CS_2) приведены на фиг. 9. Фракция I (кривая I) состоит из эфиров холестерина. Фракция II (кривая II) является смесью глицеринов свободного холестерина и неэстерифицированных жирных кислот. В данном случае количество имеющихся неэстерифицированных жирных кислот было недостаточным для того, чтобы их можно было обнаружить. Однако на кривой IV, соответствующей сыворотке лица, страдающего *xanthoma tendinosum*, фракция II обнаруживается. Появление полосы поглощения $5,85 \mu$ в правой части полосы $5,75 \mu$, принадлежащей глицерину, указывает на повышенное (и измеримое) количество неэстерифицированных жирных кис-

лот в этой сыворотке. Сильная полоса поглощения свободного холестерина $9,5 \mu$ также более интенсивна на кривой I, чем на кривой II. Фракция III (кривая III) является общей фосфолипидной фракцией. При помощи калибровочных кривых, изображающих зависимость интенсивности полос от концентрации, можно определить содержание отдельных компонентов, измеряя интенсивности некоторых выбранных полос. Возможные различия в составе жирных кислот не влияют заметным образом на спектры липидов; надо лишь учесть, что, поскольку интенсивности прокалиброваны по весовой концентрации, необходимо исходить из такого среднего молекулярного веса, отклонения от которого будут невелики. Ввиду усложненной структуры фосфолипидов надо выбрать какую-нибудь полосу поглощения, интенсивность которой в спектрах различных фосфолипидов примерно одинакова. Эмпирически



Ф и г. 9. Инфракрасные спектры липидов сыворотки человека (раствор в CS_2).

Фракции, полученные при помощи хроматографии на колонке из силикагеля:

I — эфиры холестерина; II — глицериды, неэстерифицированный холестерин, свободные жирные кислоты; III — фосфолипиды; IV — фракции из крови больного хантотоматендизомом. Кривая IV при сравнении с кривой II указывает на повышенное содержание неэстерифицированного холестерина ($9,5 \mu$) и жирных кислот ($5,9 \mu$).

найденно, что для измерения общего содержания фосфолипидов сыворотки подходит одна из двух полос — $8,1$ или $9,2 \mu$, хотя они не прокалиброваны для

кривой I, чем на кривой II. Фракция III (кривая III) является общей фосфолипидной фракцией. При помощи калибровочных кривых, изображающих зависимость интенсивности полос от концентрации, можно определить содержание отдельных компонентов, измеряя интенсивности некоторых выбранных полос. Возможные различия в составе жирных кислот не влияют заметным образом на спектры липидов; надо лишь учесть, что, поскольку интенсивности прокалиброваны по весовой концентрации, необходимо исходить из такого среднего молекулярного веса, отклонения от которого будут невелики. Ввиду усложненной структуры фосфолипидов надо выбрать какую-нибудь полосу поглощения, интенсивность которой в спектрах различных фосфолипидов примерно одинакова. Эмпирически

каждого фосфолипида в отдельности. За исключением свободного холестерина, все остальные компоненты могут быть в настоящее время определены этим методом с точностью около $\pm 10\%$, если только их содержание в образце не ниже 0,5 мг. Детальное описание метода должно быть вскоре опубликовано. В настоящее время проводятся дальнейшие исследования липидов методом инфракрасной спектроскопии.

Стероиды

В настоящей главе уже были даны ссылки на работы, посвященные инфракрасной спектроскопии стероидов; в основном это работы Добринера, Джонса и их сотрудников. После того как их результаты пополнились рядом важных данных, полученных многими другими исследователями, стероиды стали с точки зрения спектроскопии одним из наиболее основательно изученных классов соединений. Многочисленные данные, накопившиеся к настоящему времени, собраны в атласе стероидных спектров [48] и в недавно вышедшей таблице характеристических частот [92]. Обе эти публикации содержат библиографии, которые могут быть использованы для определения различных специфических групп. Были установлены корреляции, позволяющие выявить некоторые особенности структуры веществ, в частности локализацию карбонильных групп, этиленовых двойных связей, метиленовых и метильных групп, структуры с боковыми цепями, стереохимические конфигурации 3-окси- и 3-ацетокси-групп и спирокетальное поглощение сапогенина стероидов.

В химии стероидов и для их идентификации широко используют такого рода информацию, поэтому здесь будут приведены лишь отдельные примеры.

Джонс и Добринер [91] исследовали стероиды мочи и обнаружили методом инфракрасной спектроскопии стероид ($\Delta^{9,11}$ этиохоленолон), ранее не обнаруживаемый другими методами; предполагают, что он связан с наличием злокачественного образования. Мейсон и Шнейдер [119] идентифицировали Δ^{16} -андростен-3(α)-ол в моче женщины, страдающей раком коры надпочечников. Среди стероидов, выделенных из опухоли яичка, Марти и Хойсер

[117] обнаружили эстрадиол; для идентификации они использовали наряду с другими методами инфракрасную спектроскопию.

Идлер и Бауман [87] выделили из кожи крысы стерол, который, как им удалось показать, представляет собой Δ^7 -холестенол. Цандер [182] изучал содержание прогестерона в крови и тканях и в качестве средства для идентификации выделенного материала использовал инфракрасный спектр образца весом 61 $\mu\text{г}$. Вуттон [179] описал метод разделения и идентификации кислот желчи, в котором фракции, полученные при хроматографии метиловых эфиров, исследовались затем спектрофотометрически.

Углеводы

Кун [102] получил инфракрасные спектры большого числа сахаров и их производных и рассмотрел возможность их интерпретации. Для этого класса веществ общие структурные корреляции весьма ограничены, но идентификация отдельных соединений вполне возможна. Особенное значение имеют явные спектральные различия между α - и β -метилгликозидами. Уистлер и Хаус [173] установили дальнейшие корреляции для изомерных производных сахаров; ими были составлены таблицы специфических инфракрасных полос α - и β -форм свободных гексоз, ацетилированных гексоз и пентоз, метиловых и фениловых гликозидов. По мнению авторов, эти корреляции полезны, однако они не всегда позволяют сделать окончательные выводы. Баркер и другие [14] предложили корреляции, основанные на различных сериях полос; они считают, что эти корреляции надежны для всех производных *d*-глюкопиранозы, включая восстанавливающие сахара, гликозиды и полисахариды.

Методом инфракрасной спектрофотометрии изучали различные полисахариды. Баркет и Мелвин [33] нашли, что спектры декстранов в основном сходны, за исключением полосы 12,6 μ , интенсивность которой варьирует в образцах различного происхождения. Путем осаждения в спирте им удалось получить две фракции, в одной из которых эта полоса была очень сильной, а в другой отсут-

ствовала. Они считают, что существует две формы декстранов, и в каждом отдельном случае относительное количество этих форм может меняться.

Орр [129] обсудил спектры хондроитинсерной кислоты, гиалуроновой кислоты, алгиновой кислоты и полисульфатных производных двух последних. Спектры гиалуроновых кислот, выделенных из пупочных канатиков, саркомы Роуса у цыплят или миксомы человека, оказались одинаковыми. Были найдены две формы хондроитинсерной кислоты, различающиеся, по-видимому, экваториальной или полярной конфигурацией сульфатных групп.

Дармон и Рудалл [46] применили для исследования структуры полисахаридов те же методы, что и для белков. Они изучали спектры хитина и некоторых его производных при помощи поляризованного излучения. Материал получали из мягких кутикул личинок насекомых или из сухожилий омара и путем растягивания в горячем щелочном растворе приводили в частично ориентированную форму. Наблюдения показали наличие водородной связи типа $\text{NH} \cdots \text{OC}$ между ацетиламиногруппами соседних цепей. Дихроизм полос поглощения $\text{C}=\text{O}$ и $\text{N}-\text{H}$ указывает на то, что эти связи так же, как и плоскость амидогруппы, перпендикулярны оси цепи. Интерпретируя другие особенности спектра, авторы предполагают наличие водородных связей типа $\text{OH} \cdots \text{OC}$. Данные, полученные методом инфракрасной спектроскопии, рассматривали совместно с результатами рентгеноструктурного анализа.

Бактерии

В области бактериологии инфракрасная спектроскопия может найти двойное применение: 1) для получения спектральных характеристик и идентификации целых организмов; 2) для исследования различных химических компонентов, полученных из этих организмов. Первым вопросом занимались Стивенсон и Боллдуан [156] и Левин и другие [110—112], изучавшие спектры сухих мазков целых бактерий. Характер спектров зависел от условий выращивания культуры, вида, к которому относятся бактерии, и штаммов внутри вида. Было показано, что для

данного штамма можно получить воспроизводимые спектры при том условии, чтобы среда, время и температура инкубации были постоянными. Вариации этих факторов влияют на спектры различных бактерий по-разному. Вариации вида и штамма бактерий отражаются на спектре в области между 6 и 12 μ , но в некоторых случаях эти спектральные различия ничтожно малы. Основные белковые полосы поглощения расположены вне этой области. Полоса 8,1 μ , присутствующая во всех спектрах, относится главным образом к нуклеиновым кислотам, а широкая полоса между 8,5 и 10 μ — к нуклеиновым кислотам и углеводам одновременно. Спектральные различия легче всего обнаруживаются по контурам этой полосы. Левин, Стивенсон и Борднер [110] предполагают, что методом инфракрасной спектроскопии можно будет выявить гликоген в целых бактериальных клетках.

Левин, Стивенсон и Каблер [111] изучали полисахариды пнеймококков. При помощи спектральных данных, указывающих на присутствие N-однозамещенных амидов и ионизированных групп карбоксилатов, удалось разбить 57 исследованных полисахаридов на 4 вида, содержащих: 1) только амиды; 2) только карбоксилаты; 3) те и другие; 4) ни тех, ни других. Были предложены некоторые корреляции спектров с химическими и серологическими свойствами.

Рэндолл и Смит [135] опубликовали обзор спектроскопических исследований, проведенных ими на экстрактах липидов из туберкулезной палочки. Липидные фракции получали экстракцией в различных растворителях или хроматографическим методом, и при помощи инфракрасных спектров удавалось различать штаммы организмов. Авторы не пытались сопоставить спектры с химической структурой бактерий и лишь указали на возможность таких сопоставлений.

Ткани

25 лет назад Картрайт [34] измерял пропускание различных тканей в самой коротковолновой части инфракрасного спектра (0,5—1,5 μ). Он нашел, что препарат ткани щеки человека толщиной 5 мм имеет максимальное

пропускание (около 20%) при $1,15 \mu$; в спектре препарата свиного сала такой же толщины был обнаружен максимум пропускания (почти 100%) при той же, по существу, длине волны — $1,2 \mu$. Наличие воды в тканях ограничивало пропускание длинноволнового излучения. Полученные данные имели некоторое значение при конструировании медицинских ламп-нагревателей.

В многочисленных более современных работах спектроскопические исследования тканей проводили на приборах с призмами из NaCl и в некоторых случаях—при помощи отражательного микроскопа. Поскольку в спектральных областях 3 и 6μ доминирует поглощение пептидных групп белков, полосы, характерные для небелковых компонентов ткани, приходилось искать в области более длинных волн — свыше 7μ . Некоторые полосы такого типа действительно были найдены, и были сделаны попытки приписать их различным компонентам.

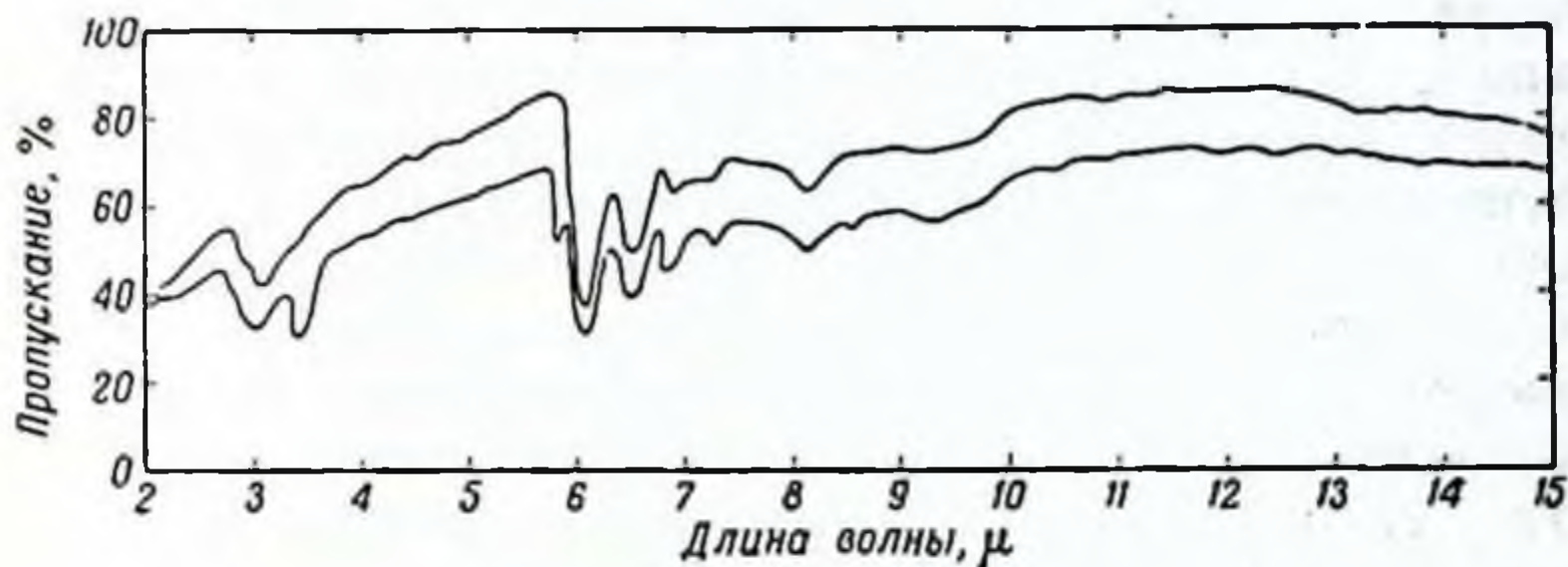
Блу и Меллорс [26] сравнивали спектры различных нормальных и раковых тканей, а также мазков нормальной крови и крови больного лейкемией. Хотя в спектрах и были обнаружены некоторые различия, интерпретировать их было трудно. В более длинноволновой области (вблизи $9,3 \mu$) поглощение ткани грудной железы, пораженной раком, было сильнее, чем ткани нормальной грудной железы, что соответствует, по мнению авторов, сильной полосе поглощения нуклеиновых кислот. Аналогичные, но более развернутые исследования нормальных и неопластических тканей и некоторых их компонентов проводил Уорили [176]; он приписывал полосы, часто встречающиеся при $8,1$; $9,35$ и $10,3 \mu$, нуклеиновым кислотам. Было отмечено, что интенсивности этих полос и содержание нуклеиновых кислот до некоторой степени коррелируют между собой. Исследования Фрэзера и Шайена [62] показали, что эти полосы, по крайней мере частично, обусловлены присутствием нуклеиновых кислот. Пользуясь микроспектрофотометром, они получили спектры срезов верхушек корней фасоли до и после обработки рибонуклеазой. Обработка вызывала уменьшение интенсивностей полос $8,1$; $9—9,5$ и $10,3 \mu$. В спектре спермы барана до и после экстракции $0,1$ н. HCl были отмечены сходные изменения.

Шварц и сотрудники [147—149] применяли инфракрасную спектроскопию тканей при решении различных медицинских проблем. На спектрах многих тканей они изучали явления, связанные с инсулиновым шоком (у кроликов), и нашли, что поглощение тканей мозга при шоке значительно меняется. Ими был предложен метод расчета относительных интенсивностей полос, основанный на использовании белковой полосы $6,44 \mu$ в качестве внутреннего стандарта. Во второй статье они описали инфракрасные спектры ткани мозга крысы, спектры липидов, экстрагированных из мозга, и влияние облучения их рентгеновскими лучами. Были отмечены различия между спектрами мозга взрослого и растущего животного. Еще одна статья была посвящена гликогену печени, его выявлению и определению в срезах печени при помощи инфракрасной спектроскопии. Изучали печень взрослых крыс и зародышей крыс, причем содержание гликогена в печени зародышей оказалось значительно выше, чем показывал расчет. Были отмечены также изменения, связанные с голоданием и облучением рентгеновскими лучами.

Исследуя повышенную чувствительность к тем или иным заболеваниям, Агню, Лизан и Бойд [1] изучали инфракрасные спектры сухих пленок сыворотки крови человека. В области $7—12 \mu$ были обнаружены различия между спектрами нормальной и патологической сыворотки; по мнению авторов, эти различия можно частично объяснить изменением относительных количеств альбумина и глобулина в сыворотке при заболевании.

Спектры, приведенные на фиг. 10 в качестве иллюстрации, взяты из неопубликованной работы Нг, выполненной в лаборатории автора, где в связи с изучением атеросклероза проводились некоторые исследования строения ткани аорты методом инфракрасной спектроскопии. Нижняя кривая на фиг. 10 представляет собой спектр слоя ткани, составленного из нескольких продольных срезов внутренней оболочки атероматозной аорты кролика толщиной 20μ каждый. Верхняя кривая получена на тех же срезах, но после экстракции ацетоном и хлороформом. Полосы поглощения, исчезающие после этой обработки, принадлежат липидным компонентам ате-

ромы. Спектр экстрагированной ткани в основном принадлежит белку. Полосы 3,4 ; 5,8 ; 6,8 ; 7,25 и 8,5 μ в исходном спектре указывают на липидный характер пораженной ткани. Идентификацию каждого липида в



Ф и г. 10. Инфракрасные спектры поглощения атероматозной ткани аорты кролика.

Продольные срезы внутренней оболочки толщиной примерно 20 μ получены в замороженном состоянии и высушены на воздухе на пластинке из хлористого серебра. На нижней кривой видны полосы поглощения липидных компонентов 3,4 ; 5,8 ; 6,8 ; 7,25 и 8,5 μ . Верхняя кривая представляет собой спектр остальной части ткани (в основном белка) после удаления липидов экстракцией ацетоном и хлороформом.

отдельности лучше производить по их спектрам после экстракции и разделения. Пользуясь этим методом, удалось обнаружить в атероматозной бляшке холестерин, эфиры холестерина и фосфолипиды. В дальнейшем следует оценить возможность использования в этих исследованиях методов, приводящих к количественным результатам, а также метода микроспектрометрии.

Демонстрируя применение отражательного микроскопа, Барер, Кол и Томпсон [13] получили спектры волокон нерва и мышцы лягушки. Были отмечены различия между спектрами этих тканей; спектр нерва претерпевал дальнейшее изменение при экстрагировании образца хлороформом. Возможности интерпретации этих спектров (даже предположительной) были весьма ограничены; исключение представляли сильные полосы белка.

Вуд [178], используя также отражательный микроскоп, получил спектры волокна живой мышцы, взвешенной в рингеровском растворе, в области 6,5—10 μ . Волокна брали из разных групп мышц лягушки, черепахи, тара-

кана и кролика. Основные спектральные изменения были обнаружены в полосе $9,7 \mu$, интенсивность которой варьировала от очень слабой (иногда она совсем отсутствовала) до довольно сильной. В спектре гликогена присутствует сходная полоса при $9,7 \mu$, но в результате определения нормального содержания гликогена в мышце был сделан вывод, что количество его недостаточно для появления такой полосы в спектре мышцы. Происхождение этой полосы за счет аденозинтрифосфата также было исключено, поскольку в воде он не мог быть спектроскопически обнаружен даже при концентрации 1%, которая значительно превосходит концентрацию его в ткани. При обсуждении этого результата было сделано заключение, что если содержание присутствующих в ткани веществ ниже 1%, то они вообще не могут быть обнаружены. Хотя спектр миозина совпадает со спектром мышцы на других участках, полосы $9,7 \mu$ в нем нет. Таким образом, происхождение этой полосы остается невыясненным.

Заключение

Освещая применение инфракрасной спектроскопии в биологии, мы опустили некоторые области исследования; к ним относятся исследования алкалоидов, наркотиков, витаминов, антибиотиков, вирусов, канцерогенных веществ, лигнина и терпеноидных соединений. При помощи инфракрасных спектров получены сведения о структуре этих веществ или, во всяком случае, разработана соответствующая методика их изучения. В том, что мы не коснулись этих вопросов, нет ничего преднамеренного, и игнорировать значение инфракрасной спектроскопии в этих областях, конечно, нельзя.

Биохимические приложения инфракрасной спектроскопии можно разбить на следующие виды: 1) идентификация изолированных чистых соединений; 2) идентификация соединений в смесях, к которым относятся, например, ткани или экстракты; 3) количественный анализ; 4) определение особенностей химической структуры (наличие функциональных групп, изомерных структур, различных стереохимических конфигураций и т. д.); 5) выяснение направления связей в ориентированных

структурах при помощи поляризованного излучения ; б) эмпирические корреляции спектра со свойствами не химического порядка (вид бактерий, ткани и т. д.). Примеры исследований каждого из этих видов приведены выше. Рассматривая конкретно эти приложения, биохимик сталкивается с затруднениями, обусловленными сложной природой систем, с которыми он имеет дело. Если требуется выделить какое-либо чистое соединение, приходится пользоваться той или иной специальной методикой, причем выход бывает весьма мал. С другой стороны, результаты спектроскопических исследований таких целых систем, как например ткани, очень трудно интерпретировать. Возможности количественного анализа также убывают с усложнением системы.

При спектроскопических исследованиях желательно, конечно, чтобы компоненты биохимической системы были до некоторой степени разделены. Мы указывали уже на удачное сочетание хроматографии и инфракрасной спектроскопии. Весьма вероятно, что можно будет также привлечь и другие методы фракционирования, как например экстракцию противотоком. Таким образом, можно расширить возможности количественного анализа. Недавно разработанный метод получения инфракрасных спектров малых образцов дает возможность исследовать элюаты с хроматограмм на бумаге.

Изготовление прессованных образцов и микроспектроскопические устройства для исследования малых количеств вещества относятся к тем основным техническим достижениям, которые способствуют применению инфракрасной спектроскопии во всех отраслях биохимии. Хотя отражательный микроскоп был создан несколько лет назад, возможности его применения были довольно ограничены. Для того чтобы применять его достаточно широко, необходимо было найти удобный способ обращения с очень малыми количествами вещества. Сочетание отражательного микроскопа с двухлучевым прибором, а также использование линз из хлористого серебра сделают еще более доступными спектроскопические исследования малых образцов.

Вошедшие в обращение новые приборы облегчат работу в области $1-2,5 \mu$ и выше 15μ . В этом отношении сделано

еще очень мало, и в будущем можно ожидать много интересного.

Прогресс в области инфракрасной спектроскопии тканей осуществляется весьма медленно, и результаты исследований носят большей частью ориентировочный характер. Адекватная интерпретация спектров тканей и широкое их использование в настоящее время еще представляют трудности. Концентрация большинства компонентов невелика по сравнению с имеющимся в избытке белком; он затемняет картину небелкового поглощения, и поэтому выводы, которые можно сделать на основе небелковой части спектра, часто недостоверны. Хотя, несомненно, имеется много случаев, в которых полезно использовать спектры тканей, но результаты, к которым приводит изучение этих спектров, следует оценивать весьма осторожно. Когда расширятся наши сведения о спектрах отдельных компонентов тканей, легче будет разобраться в спектрах тканей в целом.

Заглядывая вперед, мы можем с уверенностью сказать, что усовершенствование спектроскопической техники, сочетание ее с различными методами разделения вещества на отдельные компоненты, непрерывное накопление основных спектроскопических сведений будут, естественно, способствовать все более широкому проникновению инфракрасной спектроскопии во все области биологических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Agnew J. T., Lisan P., Boyd M. J., J. Opt. Soc. Amer., **42**, 815 (1952).
2. Ambrose E. J., Elliott A., Proc. Roy. Soc., **A205**, 47 (1951).
3. Ambrose E. J., Elliott A., Proc. Roy. Soc., **A208**, 75 (1951).
4. Ambrose E. J., Elliott A., Proc. Roy. Soc., **A206**, 206 (1951).
5. Anderson D. H., Miller O. E., J. Opt. Soc. Amer., **43**, 777 (1953).
6. Anderson D. H., Woodall N. B., Anal. Chem., **25**, 1906 (1953).
7. Badger R. M., Pullin A. D. E., J. Chem. Phys., **22**, 1142 (1954).
8. Baer E., J. Am. Chem. Soc., **75**, 621 (1953).
9. Baer E., Maurukas J., Russell M., J. Am. Chem. Soc., **74**, 152 (1952).
10. Baker A. W., Wright N., Opler A., Anal. Chem., **25**, 1457 (1953).
11. Bamford C. H., Brown L., Elliott A., Hanby W. E., Trotter I. F., Proc. Roy. Soc., **B141**, 49 (1953).
12. Barer R., Discussions Faraday Soc., № 9, 369—378 (1951).
13. Barer R., Cole A. R. H., Thompson H. W., Nature, **163**, 198 (1949).
14. Barker S. A., Bourne E. J., Stacey M., Whiffen D. H., J. Chem. Soc., p. 171 (1954).

15. Barnes R. B., Gore R. C., Williams E. F., Linsley S. G., Petersen E. M., *Anal. Chem.*, **19**, 620 (1947).
16. Bath J. D., Ellis J. W., *J. Phys. Chem.*, **45**, 204 (1941).
17. Bellamy L. J., *The Infrared Spectra of Complex Molecules*, Methuen, London, 1954.
18. Blout E. R., *Advanc. Biol. Med. Phys.*, **3**, 286 (1953).
19. Blout E. R., Abbate M. J., *J. Opt. Soc. Amer.*, **45**, 405 (1955).
20. Blout E. R., Bird G. R., *J. Opt. Soc. Amer.*, **41**, 547 (1951).
21. Blout E. R., Fields M., *J. Biol. Chem.*, **178**, 335 (1949).
22. Blout E. R., Fields M., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 479 (1950).
23. Blout E. R., Lenormant H., *J. Opt. Soc. Amer.*, **43**, 1093 (1953).
24. Blout E. R., Lenormant H., *Biochim. Biophys. Acta*, **15**, 303 (1954).
25. Blout E. R., Linsley S. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1946 (1952).
26. Blout E. R., Mellors R. C., *Science*, **110**, 137 (1949).
27. Blout E. R., Bird G. R., Grey D. S., *J. Opt. Soc. Amer.*, **40**, 304 (1950).
28. Blout E. R., Parrish M., Jr., Bird G. R., Abbate M. J., *J. Opt. Soc. Amer.*, **42**, 966 (1952).
29. Bohm C. R., Freeman N. K., Gwinn W. D., Hollenberg J. L., Pitzer K. S., *J. Chem. Phys.*, **21**, 719 (1953).
30. Borgstrom B., *Acta Physiol. Scand.*, **25**, 101, 111 (1952).
31. Brownlie I. A., *J. Chem. Soc.*, p. 3062 (1950).
32. Burch C. R., *Proc. Phys. Soc. (London)*, **59**, 41, 1947.
33. Burket S. C., Melvin E. H., *Science*, **115**, 516 (1952).
34. Cartwright C. H., *J. Opt. Soc. Amer.*, **20**, 81 (1930).
35. Cason J., Freeman N. K., Sumrell G., *J. Biol. Chem.*, **192**, 415 (1951).
36. Celmer W. D., Solomons I. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 1372 (1953).
37. Clarke H. T., Johnson J. R., Robinson R., см. *The Chemistry of Penicillin* (H. T. Clarke, ed.), p. 382—414, Princeton Univ. Press, Princeton, N. J., 1949.
38. Coates V. J., Offner A., Siegler E. H., Jr., *J. Opt. Soc. Amer.*, **43**, 984 (1953).
39. Coblenz W. W., *Investigations of infrared spectra*, Carnegie Inst. Wash., Publ. № 35 (1905).
40. Cole A. R. H., *J. Opt. Soc. Amer.*, **44**, 741 (1954).
41. Cole A. R. H., Jones R. N., *J. Opt. Soc. Amer.*, **42**, 348 (1952).
42. Colthup N. B., *J. Opt. Soc. Amer.*, **40**, 397 (1950).
43. Cook E. S., Kreke C. W., Barnes E. B., Motzel W., *Nature*, **174**, 1144 (1954).
44. Cornwell D. G., Backderf R., Wilson C. L., Brown J. B., *Arch. Biochem. Biophys.*, **46**, 364 (1953).
45. Crick F. H. C., *J. Chem. Phys.*, **22**, 347 (1954).
46. Darmon S. E., Rudall K. M., *Discussions Faraday Soc.*, № 9, 251 (1951).
47. Dobriner K., Kritchevsky T. H., Fukushima D. K., Lieberman S., Callagher T. F., Hardy J. D., Jones R. N., Cilento G., *Science*, **109**, 260 (1949).
48. Dobriner K., Katzenellenbogen E. R., Jones R. N., *Infrared Absorption Spectra of Steroids — An Atlas*, Interscience, New York, 1953.
49. Ehrlich G., Sutherland G. B. B. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 5268 (1954).
50. Elliott A., *Nature*, **170**, 1066 (1952).
51. Elliott A., *Nature*, **172**, 359 (1953).

52. Elliott A., Proc., Roy. Soc., A221, 104 (1953).
53. Elliott A., Proc. Roy. Soc., A226, 408 (1954).
54. Elliott A., Hanby W. E., Malcolm B. R., Brit. J. Appl. Phys., 5, 377 (1954).
55. Ferguson L. N., Electron Structures of Organic Molecules, p. 225—273, Prentice-Hall, New York, 1952.
56. Fowler R. C., Rev. Sci. Instr., 20, 175 (1949).
57. Fraser M. J., Fraser R. D. B., Nature, 167, 761 (1951).
58. Fraser R. D. B., Disc. Faraday Soc., № 9, 378—382 (1951).
59. Fraser R. D. B., Nature, 170, 491 (1952).
60. Fraser R. D. B., J. Opt. Soc. Amer., 43, 929 (1953).
61. Fraser R. D. B., J. Chem. Phys., 21, 1511 (1953).
62. Fraser R. D. B., Chayen J., Exptl. Cell Research, 3, 492 (1952).
63. Fraser R. D. B., Price W. C., Nature, 170, 490 (1952).
64. Freeman N. K., J. Am. Chem. Soc., 74, 2523 (1952).
65. Freeman N. K., J. Am. Chem. Soc., 75, 1859 (1953).
66. Freeman N. K., Lindgren F. T., Ng. Y. C., Nichols A. V., J. Biol. Chem., 203, 293 (1953).
67. French R. O., Wadsworth M. E., Cook M. A., Cutler I. B., J. Phys. Chem., 88, 805 (1954).
68. Frick G., Rosenberg A., Biochim. Biophys. Acta, 13, 455 (1954).
69. Fuson N., Josien M. L., Powell R. L., J. Am. Chem. Soc., 74, 1 (1952).
70. Gierer A., Z. Naturforsch., 8b, 644 (1953).
71. Gierer A., Z. Naturforsch., 8b, 654 (1953).
72. Glasstone S., Theoretical Chemistry, p. 149—160, Van Nostrand, New York, 1944.
73. Golay M. J. E., Rev. Sci. Instr., 18, 357 (1947).
74. Golay M. J. E., Rev. Sci. Instr., 20, 816 (1949).
75. Gordon R. R., Adams W. N., Pitt G. J., Watson G. H., Nature, 174, 1098 (1954).
76. Gore R. C., Petersen E. M., Ann. N. Y. Acad. Sci., 51, 924 (1949).
77. Gore R. C., Barnes R. B., Petersen E., Anal. Chem., 21, 382 (1949).
78. Goulden J. D. S., Nature, 173, 646 (1954).
79. Grey D. S., J. Opt. Soc. Amer., 41, 183 (1951).
80. Hall M. B., Nester R. G., J. Opt. Soc. Amer., 42, 257 (1952).
81. Harley J. H., Wiberley S. E., Instrumental Analysis, Wiley, New York, 1954.
82. Hartman L., Shorland F. B., McDonald I. R. C., Nature, 174, 185 (1954).
83. Herzberg G., Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules, Van Nostrand, New York, 1945.
84. Hofmann K., Lucas R. A., J. Am. Chem. Soc., 72, 4328 (1950).
85. Hofmann K., Sax S. M., J. Biol. Chem., 205, 55 (1953).
86. Hofmann K., Lucas R. A., Sax S. M., J. Biol. Chem., 195, 473 (1952).
87. Idler D. R., Baumann C. A., J. Biol. Chem., 195, 623 (1952).
88. Ingebritson D. N., Smith A. L., Anal. Chem., 26, 1765 (1954).
89. Jackson J. E., Paschke R. F., Tolberg W., Boyd H. M., Wheeler D. H., J. Am. Oil Chemists' Soc., 29, 229 (1952).
90. Jaffe J. H., J. Opt. Soc. Amer., 43, 619 (1953).
91. Jones N., Dobriner K., Vitamins and Hormones, 7, 294—360 (1949).
92. Jones R. N., Herling F., J. Org. Chem., 19, 1252 (1954).

93. Jones R. N., Cole A. R. H., Nolin B., J. Am. Chem. Soc., **74**, 5662 (1952).
94. Jones R. N., Ramsay D. A., Keir D. S., Dobriner K., J. Am. Chem. Soc., **74**, 80 (1952).
95. Kalkwarf D. R., Frost A. A., Anal. Chem., **26**, 191 (1954).
96. Kaye W., J. Opt. Soc. Amer., **41**, 277 (1951).
97. Kendall D. N., Anal. Chem., **25**, 382 (1953).
98. Kessler H. K., Sutherland G. B. B. M., J. Chem. Phys., **21**, 570 (1953).
99. Kahn N. A., Arch. Biochem. Biophys., **44**, 247 (1953).
100. King G. W., Blanton E. H., Frawley J., J. Opt. Soc. Amer., **44**, 397 (1954).
101. Kluyver J. C., Milatz J. M. W., Physica, **19**, 401 (1953).
102. Kuhn L. P., Anal. Chem., **22**, 276 (1950).
103. Lacher J. R., Campion D. E., Park J. D., Science, **110**, 300 (1949).
104. Larsson L., Acta Chem. Scand., **4**, 27 (1950).
105. Lenormant H., Compt. rend., **234**, 1959 (1952).
106. Lenormant H., Blout E. R., Nature, **172**, 770 (1953).
107. Lenormant H., Blout E. R., Compt. rend., **239**, 1281 (1954).
108. Lenormant H., Chouteau J., Compt. rend., **234**, 2057 (1952).
109. Letaw H., Jr., Gropp A. H., J. Chem. Phys., **21**, 1621 (1953).
110. Levine S., Stevenson H. J. R., Bordner R. H., Science, **118**, 141 (1953).
111. Levine S., Stevenson H. J. R., Kabler P. W., Arch. Biochem. Biophys., **45**, 65 (1953).
112. Levine S., Stevenson H. J. R., Chambers L. A., Kenner B. A., J. Bacteriol., **65**, 10 (1953).
113. Loofbourow J. R., J. Opt. Soc. Amer., **40**, 317 (1950).
114. McDonald I. R. C., Nature, **174**, 703 (1954).
115. Mann D. E., Acquista N., Plyler E. K., J. Res. Nat. Bur. Stand., **52**, 67 (1954).
116. Marinetti G., Stotz E., J. Am. Chem. Soc., **76**, 1347 (1954).
117. Marti M., Heusser H., Helv. Chim. Acta, **37**, 327 (1954).
118. Martin J. M., Jr., Johnston R. W. B., O'Neal M. J., Jr., Anal. Chem., **26**, 1886 (1954).
119. Mason H. L., Schneider J. J., J. Biol. Chem., **184**, 593 (1950).
120. Mellon M. G., Analytical Absorption Spectroscopy, p. 493—511, Wiley, New York, 1950.
121. Mellors R. C., Science, **112**, 381 (1950).
122. Miller F. A., см. Organic Chemistry, An Advanced Treatise (H. Gilman, ed.), vol. 3, p. 122—158, Wiley, New York, 1953.
123. Newman R., Badger R. M., J. Chem. Phys., **19**, 1147 (1951).
124. Ng Y. C., Ph. D. Dissertation, Univ. of California, 1955.
125. Nielsen H. H., Oetjen R. A., см. Physical Methods in Chemical Analysis (W. G. Berl, ed.), Vol. I, p. 333—404, Academic Press, New York, 1950.
126. Norris K. P., Seeds W. E., Wilkins M. H. F., J. Opt. Soc. Amer., **41**, 111 (1951).
127. Nunn J. R., J. Chem. Soc., p. 313 (1952).
128. Oetjen R. A., Haynie W. H., Ward W. M., Hansler R. L., Schauwecker H. E., Bell E. E., J. Opt. Soc. Amer., **42**, 559 (1952).
129. Orr S. F. D., Biochim. Biophys. Acta, **14**, 173 (1954).

130. Otey M. C., Greenstein J. P., Arch. Biochem. Biophys., **53**, 501 (1954).
131. Pauling L., Corey R. B., Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.), **37**, 272 (1951).
132. Pauling L., Corey R. B., Branson H. R., Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.), **37**, 205 (1951).
133. Plyler E. K., Acquista N., J. Opt. Soc. Amer., **43**, 212 (1953).
134. Randall H. M., Firestone F. A., Rev. Sci. Instr. **9**, 404 (1938).
135. Randall H. M., Smith D. W., J. Opt. Soc. Amer., **43**, 1086 (1953).
136. Randall H. M., Fowler R. G., Fuson N., Dangi J. R., Infrared Determination of Organic Structures, Van Nostrand, New York, 1949.
137. Randall J. T., Fraser R. D. B., North A. C. T., Proc. Roy. Soc., **B141**, 62 (1953).
138. Rao P. C., Daubert B. F., J. Am. Chem. Soc., **70**, 1102 (1948).
139. Rasmussen R. S., см. Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe (L. Zechmeister, ed.), p. 331—386, Springer, Vienna, 1948.
140. Rosenkrantz H., Zablow L., Anal. Chem., **25**, 1025 (1953).
141. Rudall K. M., Advances in Protein Chem., **7**, 253 (1952).
142. Rupert C. S., J. Opt. Soc. Amer., **42**, 684 (1952).
143. Rupert C. S., Strong J., J. Opt. Soc. Amer., **40**, 455 (1950).
144. Schiedt U., Z. Naturforsch., **86**, 66 (1953).
145. Schiedt U., Reinwein H., Z. Naturforsch., **76**, 270 (1952).
146. Schnurman R., Kendrick E., Anal. Chem., **26**, 1263 (1954).
147. Schwarz H. P., Riggs H. E., Glick C., Cameron W., Beyer E., Jaffe B., Trombetta L., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **76**, 267 (1951).
148. Schwarz H. P., Riggs H. E., Glick C., McGrath J., Cameron W., Beyer E., Bew E., Jr., Childs R., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **80**, 467 (1952).
149. Schwarz H. P., Riggs H. E., Glick C., McGrath J., Childs R., Bew E., Jr., Stone F., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **85**, 96 (1954).
150. Short L. N., Thompson H. W., J. Chem. Soc., p. 168 (1952).
151. Shreve O. D., Heether M. R., Knight H. B., Swern D., Anal. Chem., **22**, 1261 (1950).
152. Sinclair R. G., McKay A. F., Jones R. N., J. Am. Chem. Soc., **74**, 2570 (1952).
153. Sinclair R. G., McKay A. F., Myers G. S., Jones R. N., J. Am. Chem. Soc., **74**, 2578 (1952).
154. Smith L. M., Freeman N. K., Jack E. L., J. Dairy Sci., **37**, 399 (1954).
155. Stein R. S., Sutherland G. B. B. M., J. Chem. Phys., **21**, 370 (1953).
156. Stevenson H. J. R., Bolduan O. E. A., Science, **116**, 3005 (1952).
157. Stimson M. M., O'Donnell M. J., J. Am. Chem. Soc., **74**, 1805 (1952).
158. Sutherland G. B. B. M., Advanc. Protein Chem., **7**, 291—318 (1952).
159. Sutherland G. B. B. M., Tanner K. N., Wood D. L., J. Chem. Phys., **22**, 1621 (1954).
160. Swern D., Knight H. B., Eddy C. R., J. Am. Oil Chemists Soc., **29**, 44 (1952).
161. Thompson H. W., J. Chem. Soc., p. 328. (1948).
162. Thornton V., Condon F. E., Anal. Chem., **22**, 690 (1950).
163. Tolbert B. M., Kirk M., Baker E. M., Federation Proc., **14**, 152 (1955).
164. Toribara T. Y., Anal. Chem., **26**, 2003 (1954).
165. Toribara T. Y., Di Stefano V., Anal. Chem., **26**, 1519 (1954).
166. Torkington P., Thompson H. W., Trans. Faraday Soc., **41**, 184 (1945).

167. Trenner N. R., Walker R. W., Arison B., Trumbauer C., *Anal. Chem.*, **23**, 487 (1951).
168. Walsh A., *Nature*, **167**, 810 (1951).
169. Walsh A., *J. Opt. Soc. Amer.*, **42**, 96 (1952).
170. Walsh A., *J. Opt. Soc. Amer.*, **42**, 496 (1952).
171. Watson J. D., Crick F. H. C., *Nature*, **171**, 737 (1953).
172. Wheeler D. H., см. *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids* (R. T. Holman, W. O. Lundberg, T. Malkin, eds.), Vol. 2, p. 268—291, Academic Press, New York, 1954.
173. Whistler R. L., House L. R., *Anal. Chem.*, **25**, 1463 (1953).
174. Williams V. Z., *Rev. Sci. Instr.*, **19**, 135 (1948).
175. Williams V. Z., *Science*, **113**, 51 (1951).
176. Woernley D. L., *Cancer Research*, **12**, 516 (1952).
177. Wood D. L., *Rev. Sci. Instr.*, **21**, 764 (1950).
178. Wood D. L., *Science*, **114**, 36 (1951).
179. Wootton I. D. P., *Biochem. J.*, **53**, 85 (1953).
180. Wright N., *J. Biol. Chem.*, **120**, 641 (1937).
181. Wright N., *J. Biol. Chem.*, **127**, 137 (1939).
182. Zander J., *Nature*, **174**, 406 (1954).

ПРИМЕНЕНИЕ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА К ИЗУЧЕНИЮ КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

Д. ХАРКЕР

Введение

В кристаллическом состоянии можно получить только те белки¹, молекулы которых имеют постоянные размеры и форму, — так называемые глобулярные белки.

Белок, из которого можно приготовить истинные кристаллы, должен состоять из молекул, идентичных по внешней форме, размеру и электростатическому полю; только тогда будет возможно точное и последовательное повторение расположения данной молекулы относительно ее соседей, обеспечивающее построение трехмерного периодического сооружения — кристалла. Из этого не следует, что все молекулы в кристаллическом белке должны быть идентичны; напротив, неоднократно было показано, что в растворе, образующемся при растворении кристаллических белков, молекулы можно разделить при помощи хроматографии, электрофореза или другим способом на две или более фракций. Однако различия между молекулами не должны исключать возможности построения кристалла; другими словами, необходимо, чтобы повторялись одни и те же пространственные конфигурации молекул. Вариации в положении сильно кислых или сильно основных групп на поверхности молекулы почти неизбежно мешают формированию кристаллов, но вариации в положении или даже в природе групп, имеющих слабое

¹ Можно возразить, что рентгенограммы некоторых волокнистых белков сравнимы с рентгенограммами монокристаллов. Но на самом деле эти дифракционные картины очень бедны по сравнению с тем, что дают подлинные монокристаллы, и только по контрасту с еще более диффузными дифракционными картинами от полностью аморфных веществ их считают свидетельством „кристалличности“.

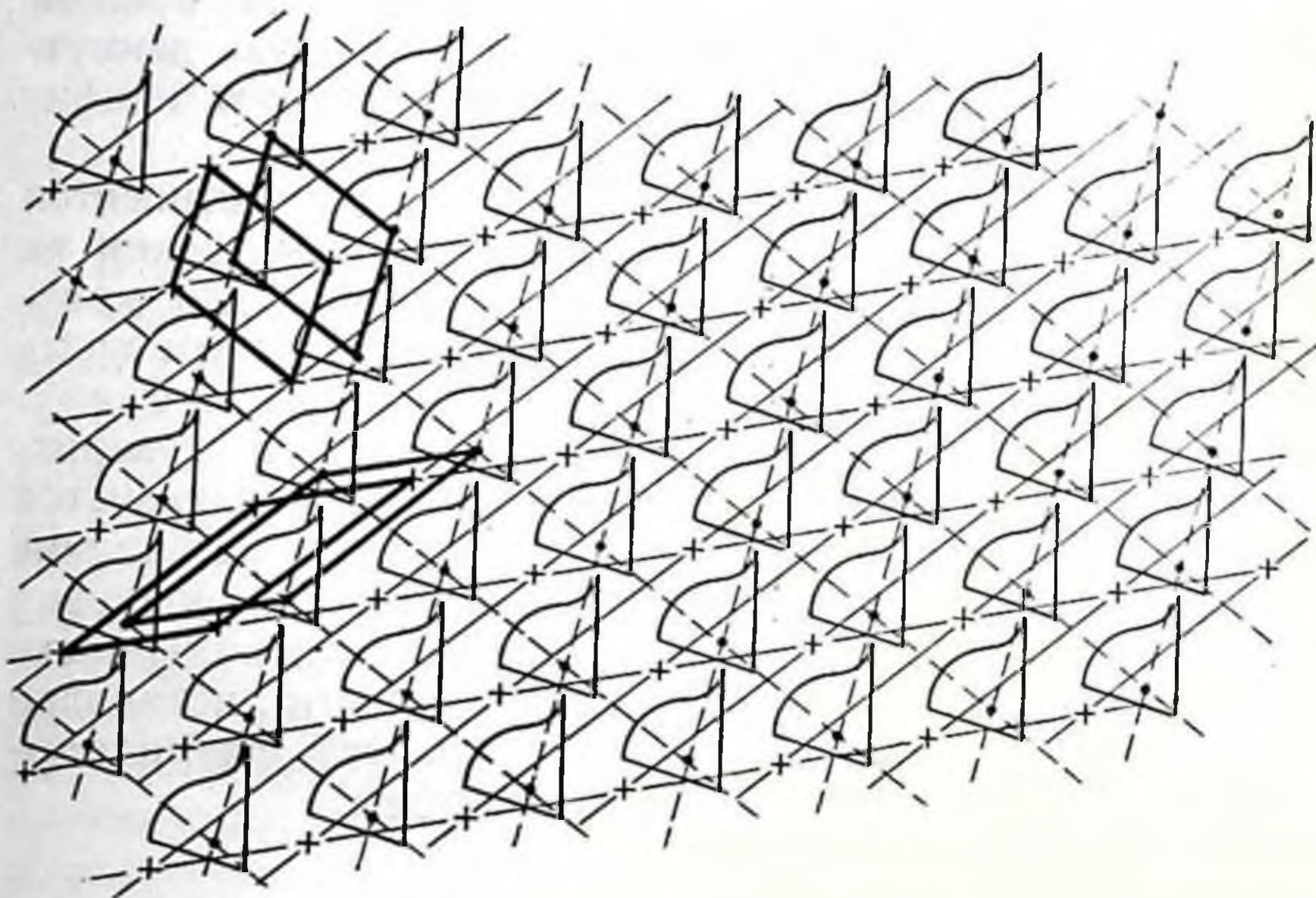
электростатическое поле или совсем не имеющих его, могут оказывать столь малое влияние на межмолекулярные силы, что пространственная конфигурация молекул будет оставаться ненарушенной и кристаллизация еще будет возможна. Другими словами, кристаллизующийся белок — это белок, состоящий из молекул, которые могут быть химически различными, но лишь в той мере, в какой это не влияет на силы, связывающие каждую данную молекулу с соседней, или на пространственную конфигурацию этих сил.

Все белки, способные к кристаллизации, относятся к классу глобулярных белков. Фибриллярные белки не характеризуются параметрами, необходимыми для кристаллизации. Их молекулы не обладают постоянным молекулярным весом и имеют различные размеры и форму. О некоторых фибриллярных белках иногда говорят, что они „кристаллические“, но этот термин используется в таких случаях лишь для того, чтобы указать на наличие определенной статистической закономерности в упаковке молекул в волокне; эта статистическая закономерность весьма отличается от точной периодичности истинного кристалла. Вопросы, относящиеся к классу фибриллярных белков, мы здесь обсуждать не будем.

Кристаллы

С субмикроскопической точки зрения кристалл представляет собой совокупность идентичных (или в некоторых случаях весьма подобных) объектов, в упаковке которых наблюдается трехмерная периодичность. Среди предметов, с которыми мы встречаемся повседневно, нетрудно найти объекты, в весьма большой степени обнаруживающие кристаллическую периодичность. Трехмерным периодическим множеством идентичных объектов является куча пушечных ядер; трехмерной периодичностью обладает и кусок кирпичной кладки. Двумерную периодичность найти еще легче: кафельный пол, хорошо распланированный фруктовый сад, большинство узоров на обоях и тому подобное. Если несколько систем с двумерной периодичностью нагромождены одна на другую таким образом, что все они

параллельны и находятся на одинаковом расстоянии друг от друга, то мы получим трехмерную периодическую структуру, т. е. весьма совершенный кристалл. Подобными трехмерными периодическими структурами могут быть молекулы глобулярных белков.



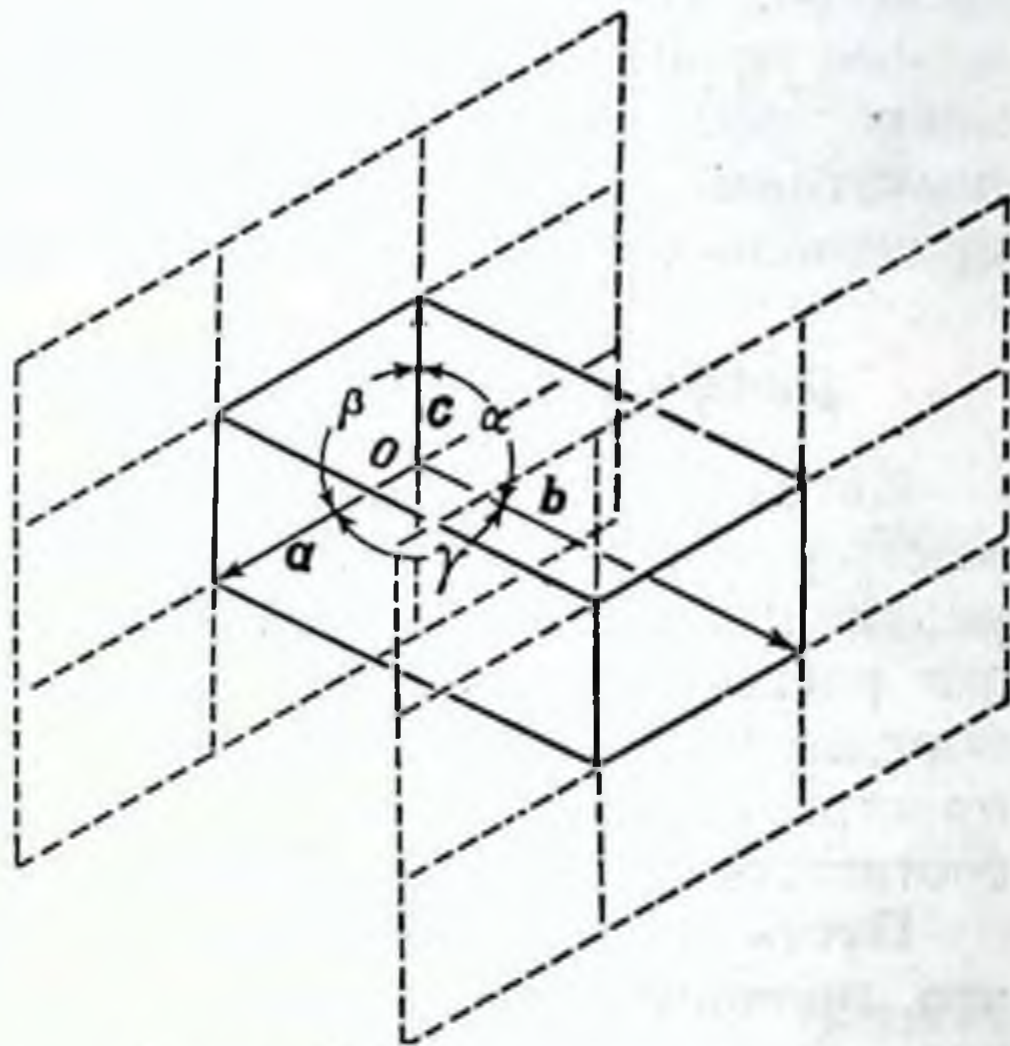
Ф и г. 1. Два способа выделения контура пространственной решетки в двумерном кристалле.

Каждый кристалл может быть описан на основе представлений о *пространственной решетке*, которая отображает его периодичность. Пространственную решетку кристалла можно найти следующим образом: выберем где-нибудь в кристалле точку, которую примем за начало координат; затем найдем все точки, которые как в отношении ориентации, так и в отношении структуры имеют *точно* такое же окружение, как эта начальная точка; совокупность всех этих точек и есть пространственная решетка кристалла. На фиг. 1 показан двумерный „кристалл“, образованный периодическим повторением некоторого нерегулярного объекта. Показаны два способа построения решетки — один основан на соединении точек,

соотношения которых с их окружением одинаковы, второй основан на соединении крестиков, которые также находятся в совершенно эквивалентных положениях.

Любая кристаллическая решетка может быть использована в качестве основы для деления кристалла на *элементарные ячейки*. Это производится путем соединения соответствующих групп соседних точек решетки таким образом, чтобы получить параллелепипед (фиг. 2).

Выбор восьми данных точек не является единственно возможным, и элементарная ячейка может быть выбрана несколькими путями. Это трудно показать на объемном чертеже, но



Ф и г. 2. Элементарная ячейка трехмерной кристаллической решетки.

$$|a| = a_0; |b| = b_0; |c| = c_0;$$

$$\alpha = \angle b, c; \beta = \angle c, a; \gamma = \angle a, b.$$

аналогичная ситуация существует и в двух измерениях, что видно на фиг. 1. Ряды линий связывают „точечный“ набор узлов решетки; форма „элементарной ячейки“ показана в верхнем левом углу. Рядом таким же образом связан в решетку „крестовый“ набор узлов для того, чтобы показать, что размер и форма элементарной ячейки не зависят от выбора начала координат. „Крестовые“ узлы решетки связаны также иной системой линий, соответствующей элементарной ячейке, показанной в левом нижнем углу фигуры; этим же способом здесь связаны и „точечные“ узлы решетки. Любая элементарная ячейка — соответствует ли она системе точек или системе крестиков — может быть использована для описания структуры; и та и другая содержат законченные элементы структуры, которые могут образовывать кристалл повторением ячейки параллельно самой себе. Важно отметить,

что, хотя пространственная решетка является инвариантной структурой, ее можно описать различными элементарными ячейками. Заслуживает также внимания то обстоятельство, что начало координат решетки в кристалле можно произвольно смещать; такая фраза, как „атомы хлора находятся в узлах решетки“, создает ложное впечатление; лучше было бы сказать „узлы решетки произвольно связаны с атомами хлора“.

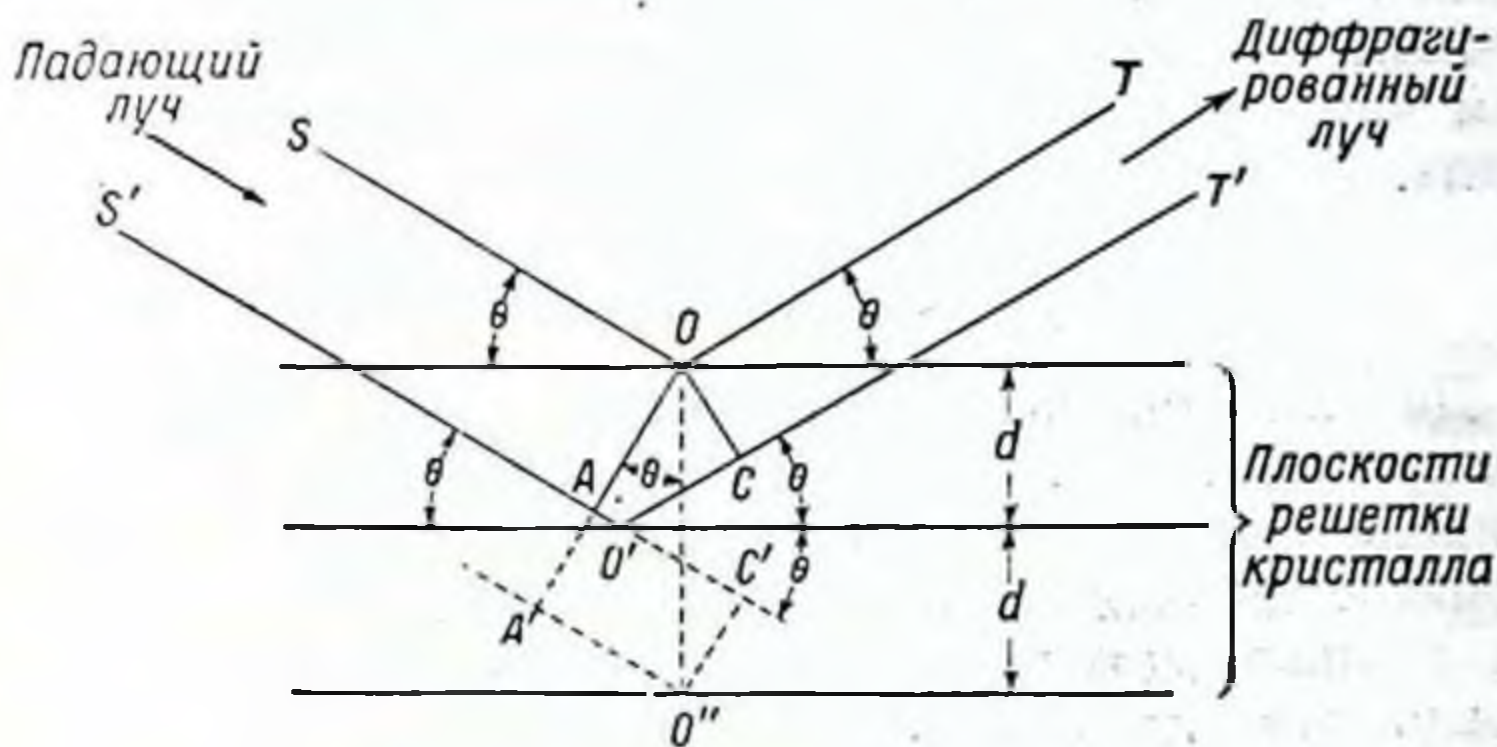
Диффракция рентгеновских лучей в кристалле

Когда рентгеновские лучи проходят сквозь вещество, некоторая их часть рассеивается на атомах вещества в различных направлениях. Если объект — кристалл, то это рассеянное излучение концентрируется в некоторых определенных направлениях; изучая его, можно найти пространственную решетку данного кристалла. Методы соответствующих расчетов изложены ниже.

Пусть некоторая плоскость построена таким образом, что проходит через часть узлов решетки кристалла и что другие плоскости, параллельные ей, проходят через все другие наличные узлы решетки. Таким образом, каждый узел решетки будет лежать на одной из этих плоскостей и расположение узлов решетки в каждой плоскости будет одинаковым. Кроме того, плоскости будут находиться на равном расстоянии одна от другой. Каждая из этих плоскостей называется *плоскостью решетки*, а вся совокупность их называется *системой плоскостей решетки*. На фиг. 2 показаны две соседние плоскости такой системы.

Предположим, что пучок рентгеновских лучей пересекает кристалл таким образом, что угол, образуемый им с плоскостями решетки, равен θ (фиг. 3). Посмотрим, могут ли рентгеновские лучи быть рассеяны так, как если бы они отражались от этих плоскостей. Лучи SO и $S'O'$ падающего пучка проходят через узлы решетки O и O' соответственно; при этом они возбуждают вещество, так что оно рассеивает лучи во всех направлениях. нас будут интересовать направления OT и $O'T'$, соответствующие отражению лучей от плоскостей решетки под углом θ . Луч $S'O'T'$ длиннее, чем луч SOT на длину $AO'C$,

которая, как можно показать из чертежа, равна $2d \sin \Theta$, где d — расстояние по перпендикуляру между соседними плоскостями рассматриваемой системы — „межплоскостное расстояние“. Если разница в длине пути, $2d \sin \Theta$,



Ф и г. 3. Вывод закона Брэгга.

равна целому числу длин волн, то лучи OT и $O'T'$ окажутся в фазе, т. е. максимумы и минимумы волн будут совпадать и их амплитуды будут складываться; это относится ко всем подобным лучам, отраженным от других плоскостей системы. Если же $2d \sin \Theta$ — нецелое число длин волн, то отражения от некоторых плоскостей системы будут уже в противофазе с лучом SOT и полностью погасят его; то же самое произойдет со всеми подобными лучами, отраженными от каждой из плоскостей системы, так как всегда будет существовать другой луч, который погасит данный. Таким образом,

$$n\lambda = 2d \sin \Theta \quad (1)$$

является условием, при котором имеет место отражение от данной системы плоскостей; здесь λ — длина волны рентгеновских лучей и n — некоторое целое число. Уравнение (1) называют законом Брэгга¹ по имени открывшего его исследователя.

¹ В отечественной литературе это уравнение называют также уравнением Брэгга—Вульфа. — Прим. перев.

Система плоскостей может быть построена в кристаллической решетке в различных направлениях. Наблюдая углы, под которыми от кристалла отражаются рентгеновские лучи определенной длины волны, и используя уравнение (1), можно определить эти направления и соответствующие им межплоскостные расстояния. По этим данным можно затем найти пространственную решетку кристалла.

Симметрия кристаллических решеток

До сих пор была рассмотрена только периодическая повторяемость одиночных неупорядоченных объектов, но в природе она встречается сравнительно редко; чаще повторяющейся единицей является группа объектов, и сама эта группа может иметь симметрию. Например, можно объединить предмет и его зеркальное отображение, и этот комбинированный объект может быть повторяющейся единицей, или *мотивом*, кристалла. Есть много видов симметрических упаковок объектов, включающих различные виды симметрии; большая часть природных кристаллов построена по мотивам такого рода.

Обычно, если мотив кристалла обладает определенной симметрией, то кристаллическая решетка также будет обнаруживать, по крайней мере частично, ту же симметрию. Это происходит потому, что симметричные форма и силовое поле объекта вызывают симметричную ориентацию соседних объектов. Однако для кристаллической решетки возможны только определенные типы симметрии, которых всего семь. Такой элемент симметрии, как, например, ось пятого порядка, не может иметь места в кристаллической решетке.

Наличие определенной симметрии мотива ведет к более высокой симметрии кристаллической решетки. Так, если сам мотив имеет только одну ось второго порядка, то кристалл будет моноклинным и будет обладать решеткой, которая, если ее рассматривать как совокупность точек, имеет как ось второго порядка, так и плоскость отражения. В этом случае кристалл в целом обнаруживает только ось второго порядка. Имеется 32 комбинации элементов симметрии, которые отображают симметрию в мотиве

кристалла; соответственно имеется 32 кристаллических класса.

Обычно в пределах мотива имеется несколько типов различных симметрических упаковок объектов, которые могут приводить к определенной наивысшей симметрии кристалла. Поэтому кристаллические классы подразделяются на пространственные группы (всего их 230), причем каждая пространственная группа соответствует частному способу расположения полностью несимметричных, но идентичных объектов.

Детальный перечень кристаллических систем, кристаллических классов и пространственных групп можно найти в некоторых работах по кристаллографии (например, [7]).

Мотив каждой из пространственных групп должен состоять из некоторого определенного числа несимметричных объектов. Это число есть кратность пространственной группы. Если известно, что число молекул в элементарной ячейке кристалла меньше, чем кратность пространственной группы, то сами молекулы должны иметь некоторую симметрию, т. е. несимметричным объектом является уже часть молекулы, которая, будучи повторяема симметрией мотива и периодичностью решетки, образует кристалл.

Белки, подобно большей части природных соединений, оптически активны. Это означает, что кристаллы белков не могут обладать плоскостями отражения или центром инверсии, так как такие элементы симметрии превращают правовращающие объекты в левовращающие и обратно. Единственно возможными элементами симметрии в белковых кристаллах являются оси вращения и винтовые оси. Указанное обстоятельство ограничивает число возможных для кристаллических белков пространственных групп до 65, причем эти пространственные группы принадлежат лишь к 11 кристаллическим классам, хотя возможны все 7 кристаллических систем.

Симметрия кристалла ясно отражается в симметрии рентгеновских диффракционных картин, полученных на этом кристалле. Во-первых, свойствам симметрии подчинены углы между плоскостями решетки, и, во-вторых, интенсивности отражений от связанных симметрией плоскостей решетки равны между собой. Таким образом, можно

многое выяснить относительно симметрии кристалла, изучая угловое распределение и интенсивности отражений от различных плоскостей решетки. Интересно, что интенсивность и геометрическое расположение рентгеновских дифракционных максимумов кристалла таковы, как если бы кристалл имел центр инверсии, независимо от того, так ли это на самом деле. Этот эффект не создает никаких трудностей при исследовании белковых кристаллов, так как эти кристаллы могут иметь только оси вращения или винтовые оси, и каждому виду симметрии, обнаруживаемой методами дифракции рентгеновских лучей, соответствует только один вид кристаллической симметрии. Следовательно, рентгеноструктурный анализ всегда позволяет однозначно определить кристаллический класс белка.

Из-за наличия центра инверсии на рентгенограммах обычно невозможно обнаружить различие между двумя энантиоморфами оптически активного образца кристалла¹.

Поэтому определение нужно проводить другими способами. К счастью, известно, что все аминокислотные остатки являются левовращающими, так что если при помощи рентгеноструктурного анализа определена структура белка и найдено, что он состоит из декстроаминокислот, то для получения правильной структуры необходимо только взять ее зеркальное отображение.

Определение молекулярных весов

Если найдены элементарная ячейка белкового кристалла, его симметрия и пространственная группа, то возможно подсчитать объем, занимаемый одной так называемой „асимметричной единицей кристалла“, разделив объем элементарной ячейки на кратность пространственной группы. Обычно этот объем содержит одну молекулу белка и некоторое количество растворителя, из которого был выращен кристалл. Иногда, однако, асимметричная единица может содержать более чем одну молекулу белка,

¹ Это не всегда верно. В весьма специальных условиях можно определить оптический изомер на основании рентгенограммы (см. [14]).

Таблица 1

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЕСА БЕЛКОВ, ОПРЕДЕЛЕННЫЕ МЕТОДАМИ РЕНТГЕНСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА

Белок	Степень гидратации белка	Пространственная группа	Число молекул в элементарной ячейке	Постоянные решетки			Углы ячейки	Объем элементарной ячейки, Å ³	Плотность	Содержание растворителя, %	Молекулярный вес
				a ₀	b ₀	c ₀					
Лизоцим цыпленка (хлорид)	Воздушно-сухой	P4 ₁ 2 ₁ или P4 ₃ 2 ₁	8	71,2		31,4		1,305	11,45	13 900	
Ферритин	Влажный	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	4	131,5	131,5	156		1,45	33 (объемных)	545 000	
Апоферритин	"	F (кубическая)	8	186				1,27	33 (объемных)	460 000	
Альбумин сывотки человека	"	F2	8	178	54	166	91°	1,145	52,6	65 200	
Меркаптальбумин человека (ртутный димер)	"	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	2	165	83	63		1,135	55,4	131 500	
Цинк-инсулин	Воздушно-сухой	R3	9	74,8		30,9		1,312	5,35	12 500	
Глобулин табачного семени	Сухой	F (кубическая)	4(?)	123				1,286	10,4	325 000	
β-Лактоглобулин	Влажный	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	8	69,29	70,42	156,47		1,144	46,2	35 400	
То же	Воздушно-сухой	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	8	60,7	61,0	112,4		1,259	9,8	35 600	
Метгемоглобин I лошади	Влажный	C2	2	109	63,2	54,4	111°	1,160	45,1	67 000	
То же	Воздушно-сухой	C2	2	102	51,4	47	130°	1,270	7,4	66 700	
Вирус некроза табака	Сухой	P1	1	105	157	154	α = 100° β = 110° γ = 120°	1,317	21,4	1 600 000	
Рибонуклеаз II	Воздушно-сухой	P2 ₁	2	29,10	30,08	51,03	114°	1,269	13,6	13 400	

или, наоборот, симметричная молекула белка может быть разделена на несколько асимметричных единиц. Поэтому, прежде чем делать вывод относительно объема молекулы, необходимо сравнить кристаллографические данные со всеми другими физико-химическими данными.

Если известна плотность кристалла, то легко найти массу асимметричной единицы и если вдобавок известен вес растворителя или белка на единицу веса кристалла, то можно подсчитать массу белка в асимметричной единице кристалла. Умножив эту величину на число Авогадро, получают молекулярный вес асимметричной единицы белка в кристалле; обычно его считают молекулярным весом белка. Если эта величина не дает действительного молекулярного веса, то она либо в несколько раз больше, либо в несколько раз меньше его; в комбинации с приближенными величинами, полученными другими методами, ее можно использовать для нахождения истинного молекулярного веса. В табл. I представлены результаты, полученные этим путем.

Содержание растворителя в белковых кристаллах

Белки нельзя растворить или переосадить, не вызвав в них при этом необратимых химических изменений; поэтому все белковые кристаллы выращены из раствора и содержат растворитель. Если из белковых кристаллов удаляют содержащийся в них растворитель, то они всегда становятся менее кристаллическими — их рентгенограммы становятся менее определенными, а оптические свойства все больше и больше отклоняются от свойств, которые должны быть у истинно кристаллических веществ. С уменьшением содержания растворителя в кристалле от совершенной трехмерной периодичности, имевшей место в сольватированных кристаллах, почти ничего не остается. Кроме того, если кристалл, полученный в результате высушивания кристаллического белка, вновь размочить, то лишь в редких случаях можно восстановить, хотя бы частично, его кристаллическость. Таким образом, содержащийся в белковых кристаллах растворитель играет существенную роль в их структуре.

Растворитель, содержащийся в белковых кристаллах, следует отличать от так называемой „кристаллизационной воды“, содержащейся во многих более простых веществах, как например $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Здесь молекулы воды размещены определенным образом относительно атомов меди и сульфатных групп кристалла, и попытка удалить воду приводит к совершенно новому расположению атомов. В противоположность этому сольватированный белковый кристалл в процессе „сушки“ сохраняет (насколько это возможно) свою внутримолекулярную структуру; при удалении растворителя молекулы в кристалле лишь сдвигаются ближе и, возможно, слегка поворачиваются и скользят одна по отношению к другой, но тип структуры, симметрия и пространственная группа остаются неизменными, хотя кристалл становится все менее совершенным. Обычно кристаллы, вырастающие в контакте с насыщенным белковым раствором, называют „влажными“, а те же кристаллы после потери некоторого количества растворителя — „сухими“.

Для некоторых кристаллических белков, в частности для гемоглобина [1], наблюдаются отдельные хорошо определенные степени высыхания; это значит, что стабильны только определенные размеры элементарных ячеек этих кристаллов, и каждая из этих элементарных ячеек соответствует некоторому интервалу давлений пара растворителя (в данном случае — воды). Высыхание кристаллов других белков при уменьшении давления пара растворителя происходит, видимо, непрерывно; так ведет себя β -лактоглобулин. И в том и в другом случае данные рентгеноструктурного анализа показывают, что в процессе высыхания молекулы белка не изменяются ни по размеру, ни по форме; процесс сушки, следовательно, оказывает влияние только на растворитель и на характер воздействия растворителя на межмолекулярные силы.

Содержание растворителя во влажных белковых кристаллах может достигать 85% их веса (тропомиозин), обычно же оно составляет около 50%. Воздушно-сухие кристаллы содержат около 10% растворителя; обычно его можно удалить полностью лишь интенсивной сушкой в вакууме при 100° . Потерю в весе при сушке в вакууме при $70\text{—}100^\circ$ считают мерой содержания растворителя в

белковых кристаллах, если только растворитель не содержит нелетучего компонента, такого, как неорганические соли или высококипящие спирты или гликоли. В табл. 1 приведено содержание растворителя в некоторых белковых кристаллах.

Плотность белковых кристаллов

Плотность белковых кристаллов не может быть измерена такими стандартными методами, как пикнометрическое взвешивание или потеря в весе при погружении в жидкость, так как эти кристаллы очень быстро обменивают свой растворитель с жидкостью, в которую их погружают. Вполне удовлетворительным методом является взвешивание белкового кристалла в его маточном растворе при помощи весов с кварцевой нитью [13], причем подсчет объема кристалла производят на основании его линейных размеров, измеренных под микроскопом; при помощи этих данных, зная плотность маточного раствора, можно определить плотность кристалла. Преимущество этого метода заключается в том, что состояние сольватации белка не меняется. Другой метод состоит в том, что кристалл помещают в столб жидкости, плотность в котором монотонно увеличивается сверху вниз, и наблюдают, как в зависимости от времени меняется высота уровня, на котором удерживается кристалл [10, 11]. Кривая зависимости высоты уровня от времени с того момента, когда кристалл помещен в столб жидкости, всегда показывает, что благодаря обмену содержащегося в кристалле растворителя с жидкостью, в которую погружен кристалл, плотность погруженного кристалла постепенно меняется. Если эти наблюдаемые слабые изменения экстраполировать к нулевому времени, то получается довольно точная величина плотности кристалла. В табл. 1 приведены плотности некоторых белковых кристаллов.

Интенсивности брэгговских отражений

Интенсивность брэгговских отражений зависит отчасти от угла диффракции и от длины волны рентгеновских лучей, но главным образом — от структуры кристалла,

т. е. от способа размещения атомов в элементарной ячейке кристалла. Легко видеть, что такая зависимость должна существовать. Если бы все вещество в элементарной ячейке было сконцентрировано в узлах решетки, то для брэгговских отражений все рассеянные лучи совпадали бы по фазе и амплитуда этого рассеяния была бы максимальной. С другой стороны, если бы вещество в элементарной ячейке было распределено равномерно, то периодичности и брэгговских отражений вообще не существовало бы, так как количество вещества, рассеивающего в фазе и противофазе, было бы одинаковым. Большая часть кристаллов имеет промежуточную структуру; для некоторых отражений вещество рассеивает более или менее в фазе, и интенсивность этих отражений велика, для других отражений рассеяние от одной части структуры почти погашается рассеянием от другой части, и интенсивность этих отражений мала. Различия в интенсивностях отдельных отражений можно использовать для выяснения расположения вещества в элементарной ячейке кристалла. Чтобы объяснить, как это делается, необходимо привлечь некоторый математический аппарат.

Рассмотрим кристаллическую решетку, изображенную на фиг. 2; примем одну из точек решетки за начало координат и свяжем его с тремя ближайшими точками решетки векторами \mathbf{a} , \mathbf{b} и \mathbf{c} . (Эти точки должны быть связаны так, чтобы три вектора не лежали в одной плоскости.) Тогда другие точки решетки будут лежать на концах векторов $\mathbf{R} = u\mathbf{a} + v\mathbf{b} + w\mathbf{c}$ (где u , v и w — целые числа), проведенных из начала координат. Разные точки решетки могут быть в таком случае обозначены комбинацией чисел u , v , w . Точки решетки 000, 001, 010, 100, 110, 101, 011, 111 расположены в вершинах параллелепипеда, являющегося элементарной ячейкой кристалла. Обычно, но не всегда, лучше выбрать векторы \mathbf{a} , \mathbf{b} и \mathbf{c} так, чтобы эта элементарная ячейка не содержала других точек решетки, кроме точек в ее вершинах; тогда это *примитивная* элементарная ячейка. При этом считают, что из восьми точек решетки, создающих контур ячейки, одна принадлежит примитивной ячейке, а другие — соседним ячейкам; таким образом, точку решетки 000 можно приписать только что описанной элементарной ячейке, а другие точки решетки,

которые создают контур ячейки, можно приписать соседним ячейкам. Следовательно, примитивная элементарная ячейка содержит только одну точку пространственной решетки. Иногда, из соображений симметрии, элементарную ячейку выбирают так, что она содержит две, три или четыре точки решетки; это *непримитивные* элементарные ячейки.

Начало координат и две другие точки решетки, не лежащие на прямой, проходящей через начало координат, определяют плоскость решетки. Параллельно этой плоскости расположены другие плоскости решетки, причем наиболее близкие из плоскостей пересекают векторы \mathbf{a} , \mathbf{b} и \mathbf{c} в точках a/h , b/k и c/l соответственно, где h , k и l — целые числа, называемые миллеровыми индексами этой системы параллельных плоскостей решетки. Если x , y и z — координаты некоторой точки кристалла, измеряемые в направлениях, параллельных векторам \mathbf{a} , \mathbf{b} и \mathbf{c} в единицах длины этих векторов a , b и c , то уравнения плоскостей решетки этой системы имеют вид

$$hx + ky + lz = m, \quad (2)$$

где m — целое число. Если $m = 0$, то плоскость проходит через начало координат; если $m = 1$, то плоскость является ближайшей к началу координат и т. д. Если x , y и z — целые числа, то они имеют то же значение, что и величины u , v и w , о которых речь шла выше, и точка x , y , z есть точка решетки. Поскольку h , k и l целые числа, ясно, что все точки решетки в кристалле лежат на одной из плоскостей, описываемых уравнением (2); можно показать, что если h , k и l не имеют общего множителя, то все эти плоскости содержат точки решетки. Если h , k и l имеют общий множитель n , то плоскостями решетки являются только те плоскости, для которых m имеет тот же множитель, т. е. только каждая n -я плоскость системы. Если считать все плоскости системы (hkl) кристаллографическими плоскостями, независимо от того, являются ли все они или часть из них плоскостями решетки или нет, то закон Брэгга (уравнение (1)) можно записать в виде

$$\lambda = 2d(hkl) \cdot \sin \Theta, \quad (3)$$

поскольку межплоскостное расстояние как раз в n раз меньше, чем расстояние между плоскостями решетки; таким образом для межплоскостных расстояний разность хода между последовательными отраженными лучами будет равна одной длине волны, если соответствующая разность хода для отражений от плоскостей решетки равна n длинам волн.

Все рассеивающее вещество, лежащее в плоскостях системы (hkl) , будет участвовать в создании амплитуды отражения hkl . Вещество, лежащее между плоскостями системы, также будет рассеивать в направлении отражения, но в большей или меньшей степени в фазе. Например, вещество, лежащее на плоскостях, расположенных как раз на половине пути между плоскостями системы, будет рассеивать в противофазе, и амплитуда его рассеянных лучей будет вычитаться из амплитуды отражения от основной плоскости. Амплитуду рассеяния от всей элементарной ячейки, определяемую характером распределения рассеивающего вещества в кристалле, находят по формуле

$$F(hkl) = \sum_j f_j(d) e^{2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j)}, \quad (4)$$

где $F(hkl)$ — комплексное число, описывающее одновременно амплитуду и фазу луча, отраженного от системы плоскостей (hkl) ; $f_j(d)$ — коэффициент рассеяния j -й частицы этой ячейки (обычно атома) для межплоскостного расстояния d ; x_j, y_j, z_j — координаты этой j -й частицы (если в качестве единиц длины взяты a, b и c)

(Экспонента чисто мнимого числа есть комплексное число, модуль которого равен единице; точнее, соответствующая формула имеет вид $e^{i\alpha} = \cos \alpha + i \sin \alpha$.)

Модуль комплексного числа $F(hkl)$ записывают как $|F(hkl)|$. Интенсивность отражения hkl , обозначаемая $I(hkl)$, связана с $F(hkl)$ формулой

$$I(hkl) = \Phi(\lambda, \Theta) |F(hkl)|^2, \quad (5)$$

где $\Phi(\lambda, \Theta)$ — функция длины волны рентгеновских лучей λ , угла отражения Θ и экспериментальных условий; она рассмотрена в основных работах по диффракции рентгеновских лучей (например, [8]).

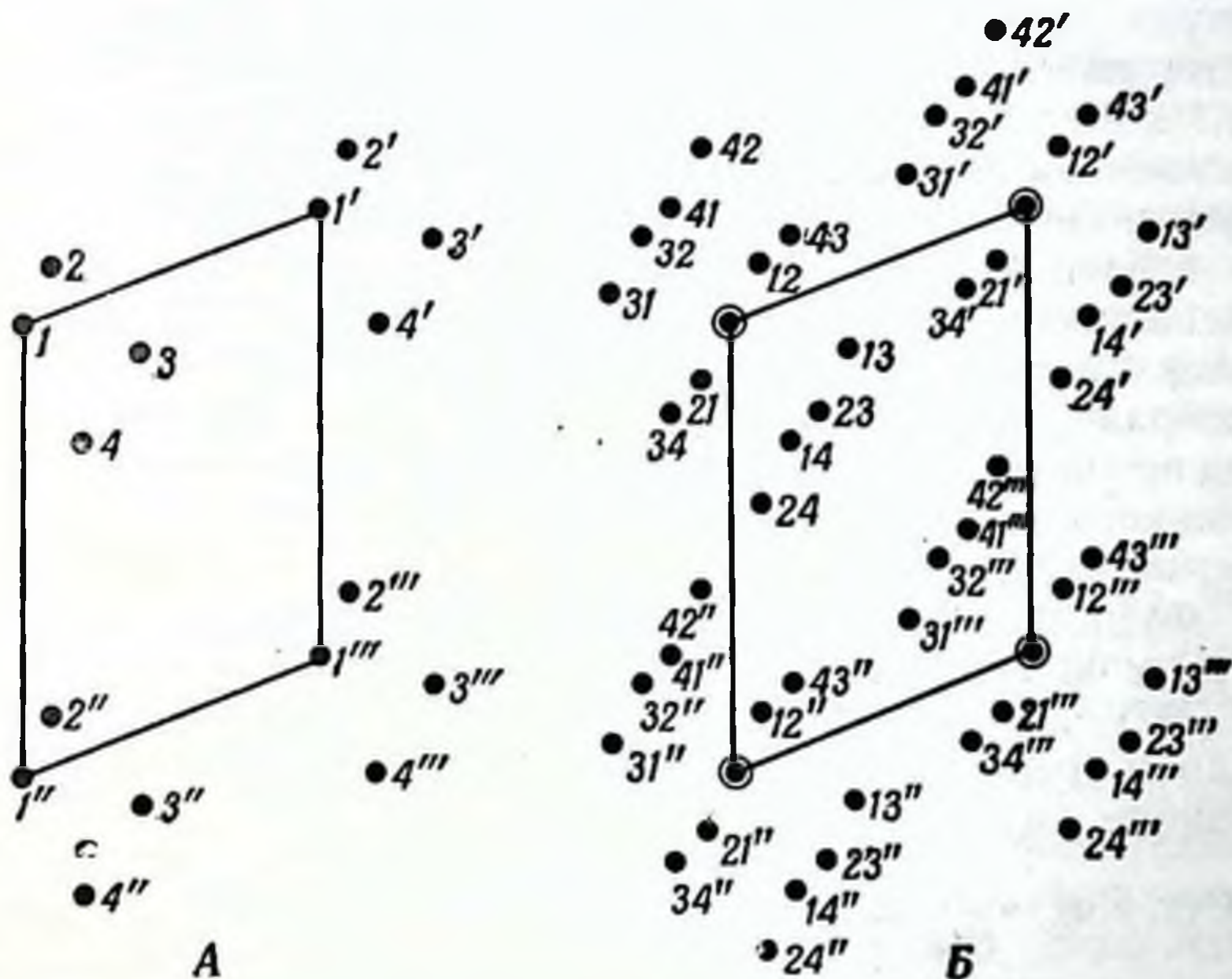
Формула (5) показывает, что интенсивность каждого отражения hkl может быть вычислена, если известно распределение рассеивающего вещества, т. е., иными словами, если известно расположение атомов в элементарной ячейке кристалла. Поэтому совокупность значений интенсивностей различных отражений должна была бы дать возможность определить структуру кристалла; в принципе это верно, но в действительности это определение далеко от прямого и иногда не дает однозначного ответа. На практике удобнее определять кристаллическую структуру более косвенными методами.

Один из наиболее удачных методов, который следует использовать для расшифровки несложных структур, заключается в том, что структуру предполагают известной, подсчитывают при помощи уравнений (4) и (5) интенсивности отражений, а затем сравнивают рассчитанные интенсивности с интенсивностями, наблюдаемыми экспериментально. Однако возможное число неверных предсказаний структуры быстро растет с ее усложнением, и этот метод проб и ошибок становится совершенно непригодным для разрешения структуры даже тех кристаллов, которые с химической точки зрения можно считать относительно несложными.

Функция Паттерсона

Было предложено много способов определения структуры кристалла непосредственно из интенсивностей диффракции, но удачного универсального метода еще не найдено — расшифровка каждой кристаллической структуры представляет особую специфическую проблему. По-видимому, наиболее общий и успешный метод обработки данных, характеризующих интенсивности отдельных отражений, обеспечивает функция Паттерсона. Эту функцию выражают в виде схемы всех межатомных расстояний в кристалле с учетом их направления; соотношение этой схемы со структурой кристалла показано на фиг. 4. Слева изображена проекция кристаллической структуры; „молекула“, состоящая из четырех атомов, повторяется согласно законам решетки, одна из элементарных ячеек которой показана. Функция Паттерсона имеет ту же простран-

ственную решетку, что и кристалл, и выделена таким же образом в правой части фигуры; она содержит пики — „паттерсоновские атомы“ — в точках, расположение которых по отношению к началу координат соответствует взаимному расположению атомов в кристалле. Таким



Ф и г. 4. Взаимосвязь кристаллической структуры и функции Паттерсона.

А — кристаллическая структура ; Б — функция Паттерсона.

образом, вектору, соединяющему атомы 1 и 3, соответствует в функции Паттерсона максимум с индексом 13; этот максимум удален от начала координат на такое же расстояние и в том же направлении, как атом 3 от атома 1 в кристалле. Кроме этих максимумов, имеется большой пик в начале координат функции Паттерсона, возникающий вследствие того, что каждый атом находится на нулевом расстоянии от самого себя. Высота каждого максимума на проекции Паттерсона определяется произведением порядковых номеров атомов, находящихся на концах соответствующего вектора в кристалле. Молекула, состоящая

из 4 атомов, имеет 16 межатомных векторов. 4 из них соответствуют расстояниям атома от самого себя и проявляются в начале координат паттерсоновского пространства, а 12 являются векторами, связывающими различные атомы; они могут быть разделены на пары, причем члены пары зеркально связаны в начале координат и соответствуют двум векторам с противоположным направлением, которые можно провести между парой атомов, например от 1 к 2 и от 2 к 1. Поэтому в функции Паттерсона, изображенной на фиг. 4, имеется только 6 независимых максимумов. Вообще, если мотив кристалла содержит n атомов, то в функции Паттерсона будет n^2 пиков, n из которых расположены в начале координат, а $n(n-1)/2$ независимы. Следует заметить, что пики в функции Паттерсона, изображенной на фиг. 4, образуют ряды или цепи; этот вид проекции является случайным, и по-видимому, не имеет никакого значения для характеристики самой кристаллической структуры.

Функция Паттерсона данной кристаллической структуры может быть рассчитана непосредственно по значениям $|F(hkl)|^2$, полученным из интенсивностей рассеянных кристаллом рентгеновских лучей. Расчет включает суммирование рядов Фурье

$$P(x, y, z) = \frac{1}{V_0} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)|^2 \cos 2\pi(hx + ky + lz) \quad (6)$$

по такому количеству точек в элементарной ячейке, которое достаточно для получения правильного изображения формы функции Паттерсона $P(x, y, z)$. В уравнении (6) V_0 — объем элементарной ячейки кристалла; другие символы имеют свой обычный смысл. Результат этого расчета не представляет собой, конечно, системы четко определенных пиков, окруженным пустым пространством; напротив, это плавно меняющаяся функция, которая достигает максимальной величины на конце каждого межатомного вектора кристалла. Электронная плотность атома плавно меняется от нуля вдали от атома до максимального значения в центре атома; максимумы функции Паттерсона имеют такой же характер — у них нет четко определенной формы, подобно форме пиков на фиг. 4. На практике суммирование в правой части уравнения (6)

проводится по конечному числу членов, и результат поэтому является только приближением к истинной функции Паттерсона; в случае кристаллических белков пики, отстоящие один от другого менее чем примерно на 2 \AA , не могут быть на ней разрешены, так как обычно нельзя наблюдать отражений, соответствующих $d(hkl)$ меньшим, чем $\sim 2 \text{ \AA}$.

Формула (6) дает метод для расчета функции Паттерсона $P(x, y, z)$ в трех измерениях. Однако построение трехмерной функции проводится очень редко, так как работа весьма трудоемка даже при использовании современных счетных машин. Обычно вместо трехмерной функции Паттерсона пользуются проекцией этой функции; эти так называемые паттерсоновские проекции вычисляют по формулам типа

$$P(x, z) = \frac{1}{A} \sum_h \sum_l |F(h0l)|^2 \cos 2\pi(hx + lz), \quad (7)$$

где $P(x, z)$ — проекция функции Паттерсона вдоль оси y (оси b) кристалла, A — площадь проекции элементарной ячейки; другие символы имеют свой обычный смысл. Следует заметить, что в $P(x, z)$ входят только две переменные и коэффициентами суммирования являются только $|F(h0l)|^2$. Производить подсчет таких рядов значительно проще, чем подсчет по уравнению (6); например, выражение под знаком суммы в уравнении (6) может содержать несколько тысяч членов, и суммирование должно быть проведено по нескольким тысячам точек (x, y, z) , тогда как уравнение (7) для того же кристалла может содержать только около тысячи членов и его нужно просуммировать только по нескольким сотням точек $(x, 0, z)$. Многочисленные примеры паттерсоновских проекций имеются в литературе (см., например, библиографию в книге Липсона и Кокрена [12]).

Функции Паттерсона для белков

Почти в каждом исследовании, посвященном структуре кристаллических белков, используют паттерсоновские проекции, причем чаще всего делается попытка в общих чертах наметить структуру белковой молекулы на основании изучения характера этих проекций.

Исследования этого рода очень ценны и позволили сделать ряд важных общих заключений, касающихся структуры некоторых белковых молекул; однако сомнительно, приведут ли они когда-либо к познанию структуры в целом. Основанием для этих сомнений служит громадная плотность максимумов паттерсоновской функции белкового кристалла. Возьмем, например, белок с молекулярным весом 25 000, содержащий 2 молекулы на элементарную ячейку кристалла. Тогда, если пренебречь наличием молекул растворителя, одна элементарная ячейка будет содержать около 7000 атомов (не считая водорода, который рассеивает рентгеновские лучи очень слабо) с атомным номером между 6 и 8. Элементарная ячейка паттерсоновской функции содержит в этом случае около 49 000 000 пиков, каждый из которых больше, чем пик одного атома, причем эти максимумы будут очень сильно перекрываться. Действительно, для каждого атома кристаллической ячейки паттерсоновская ячейка будет содержать 7000 пиков, причем все они будут собраны вместе в том же самом объеме, в котором в кристалле содержится 1 атом. Поэтому абсолютно невозможно различить индивидуальные паттерсоновские пики на паттерсоновских функциях белковых кристаллов, а тем более на паттерсоновских проекциях. Максимумы таких паттерсоновских функций или проекций соответствуют не межатомным векторам, а большим концентрациям межатомных векторов, тогда как минимумы свидетельствуют о малых концентрациях межатомных векторов. Очевидно, на основе таких данных невозможно однозначно решить вопрос о структуре белковой молекулы; были, однако, сделаны попытки произвести выбор между различными возможными общими типами структуры, например между структурами, составленными из атомов, лежащих на сферических оболочках, и структурами, составленными из параллельных цепей. Ни одному из авторов не удалось еще найти убедительного доказательства справедливости того или другого, но некоторые из полученных ими результатов следует принять к сведению.

Наиболее надежным результатом рентгеноструктурного анализа белковых кристаллов является, как нам кажется, доказательство сохранения формы и размера

белковых молекул в процессе высыхания кристаллов, когда удаляется содержащийся в них растворитель [1]. Расчеты паттерсоновских проекций кристаллов гемоглобина на разных стадиях высыхания показали, что конфигурация этих функций вблизи начала координат остается постоянной; это означает, что молекулы сохраняют свою структуру. Основанием для такого вывода служит то обстоятельство, что атомы внутри молекулы в среднем ближе друг к другу, чем атомы разных молекул, так что большинство коротких межатомных векторов отражают расстояния между атомами внутри одной молекулы; эти короткие расстояния соответствуют паттерсоновским пикам вблизи начала координат и обуславливают, таким образом, форму паттерсоновской функции в этой области. Изучавшийся в упомянутой выше работе кристаллический гемоглобин содержал только одну молекулу на элементарную ячейку, так что здесь максимумы функции не представляли собой результата наложения межатомных векторов двух различно ориентированных молекул, но изображали концентрации этих векторов в одной молекуле; следовательно, постоянство вида этой функции доказывает, что молекула гемоглобина постоянна по размеру, форме и внутренней конфигурации даже в тех случаях, когда содержание растворителя в кристалле изменяется от 50 до 10%. Структура этой молекулы независима от ее окружения.

Из этих опытов были также получены некоторые дополнительные сведения о структуре молекулы гемоглобина. Максимумы паттерсоновской функции, соответствующие внутримолекулярному расположению атомов, не смещаются относительно оси a кристалла, хотя ориентация оси c в процессе сушки значительно меняется. Это позволяет сделать вывод относительно общей формы молекулы гемоглобина; грубо — это эллипсоид, главные оси которого равны 55, 55 и 65 Å [2, 3].

Вопрос о паттерсоновских функциях белковых кристаллов неоднократно обсуждался. Были сделаны попытки показать, что молекулы белка содержат параллельные цепи или сферические оболочки с высокой электронной плотностью; выводы других авторов не согласуются с этими утверждениями. Ни одна из этих попыток не привела

еще к чему-либо определенному, и обсуждать их в деталях мы не будем. Прекрасный обзор этих работ дан Кендрию [9].

Электронная плотность кристалла

Если бы была получена трехмерная карта электронной плотности в каждой точке элементарной ячейки кристалла, это было бы эквивалентно полному изображению кристаллической структуры; каждый атом проявлялся бы на этой карте в виде максимума электронной плотности, а относительная высота и положение этих максимумов позволяли бы идентифицировать атомы и их связи в молекуле. Такую карту можно получить при помощи суммирования рядов Фурье:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V_0} \sum \sum \sum F(hkl) e^{-2\pi i (hx + ky + lz)}, \quad (8)$$

где $\rho(x, y, z)$ — электронная плотность в точке с координатами x, y, z ; V_0 — объем элементарной ячейки; $F(hkl)$ — „структурный фактор“ отражения hkl , а другие символы имеют свой обычный смысл. К сожалению, структурные факторы $F(hkl)$ — комплексные числа, для которых непосредственно измеряется только их модуль, $|F(hkl)|$. (Следует напомнить, что $|F(hkl)|^2$ непосредственно связано с интенсивностью отражения hkl формулой (5).) Проблема определения структуры кристалла состоит тогда в отыскании комплексных чисел $F(hkl) = A(hkl) + iB(hkl)$ на основании совокупности известных чисел

$$|F(hkl)|^2 = A^2(hkl) + B^2(hkl).$$

Очевидно, A и B можно считать катетами прямоугольного треугольника, в котором $|F(hkl)|$ является гипотенузой, т. е. для каждого $|F|^2$ существует бесконечное число комплексных чисел $A + iB$; эта ситуация усложняется еще и тем, что A и B могут быть как положительными, так и отрицательными. Именно это обстоятельство и способствовало широкому использованию в рентгеновской кристаллографии паттерсоновских функций.

Проблему отыскания A и B из значений $|F|^2$ часто называют „проблемой фаз“ рентгеновской кристаллографии; в последние 10 лет мы значительно приблизились к ее разрешению. Принципиальная возможность разрешения

этой проблемы следует из того, что электронная плотность кристалла не может выражаться любой функцией; она должна удовлетворять некоторым вполне определенным требованиям. Во-первых, электронная плотность является действительным числом и не может быть отрицательной; во-вторых, все интересующие нас функции электронной плотности должны изображать упаковку изолированных, сферически симметричных атомов, которые никогда не могут приблизиться друг к другу ближе чем на минимальную длину химической связи; в-третьих, обычно известно число атомов и содержание электронов в различных атомах, принадлежащих одной элементарной ячейке кристалла. Если все эти требования, накладываемые на функцию электронной плотности $\rho(x, y, z)$, выразить в надлежащих математических терминах и учесть при решении „проблемы фаз“, то оказывается, что, зная достаточное количество значений $|F|^2$, можно наложить определенные ограничения на способ, которым для некоторой F могут быть выбраны A и B . Эти ограничения становятся, однако, все менее и менее эффективными, когда число атомов в элементарной ячейке кристалла растет; для кристаллических белков эти ограничения настолько смягчаются, что оказываются совсем бесполезными.

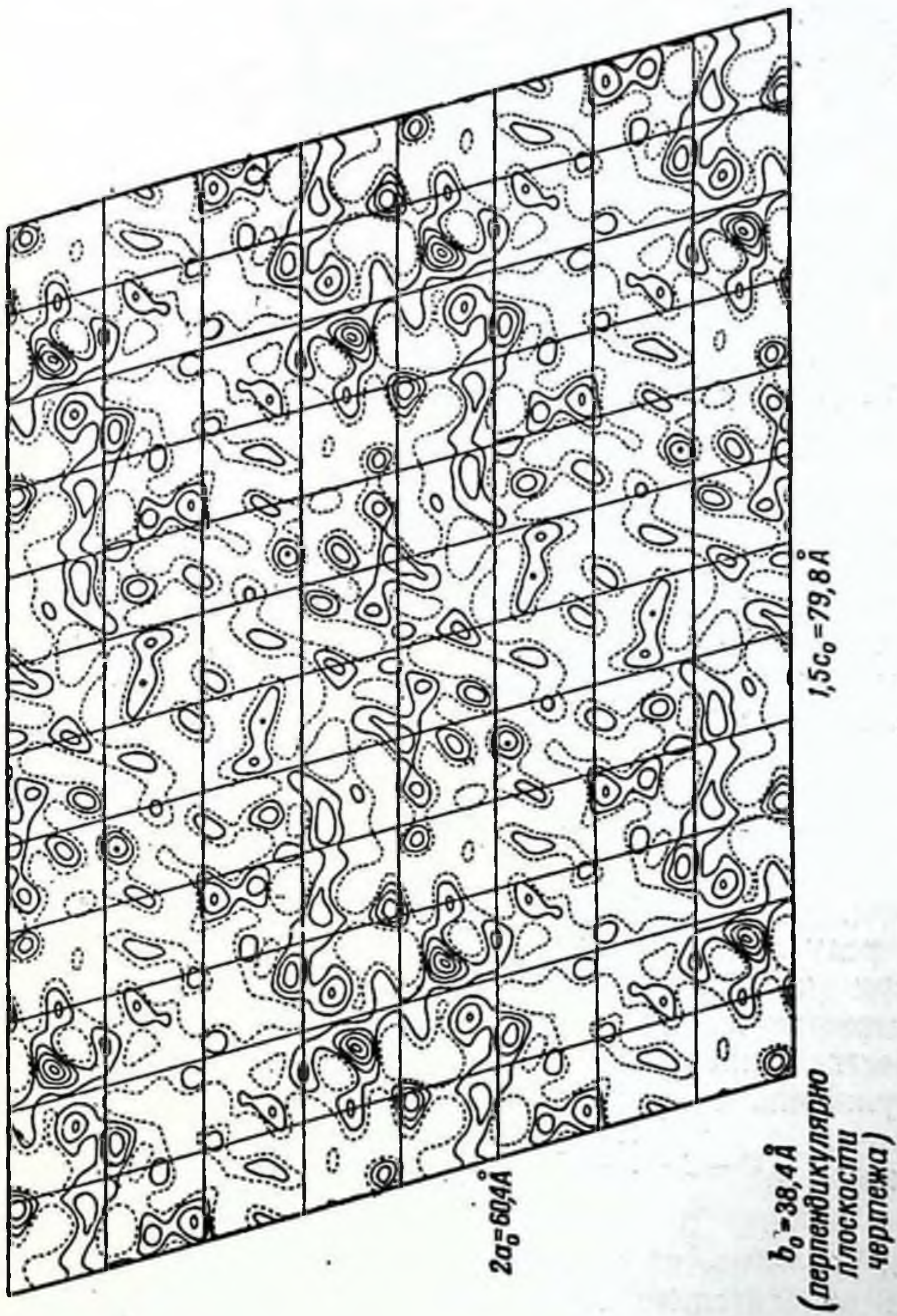
Имеется, однако, другой путь отыскания чисел A и B , который состоит в том, что сравнивают значения $|F|^2$ для различных „изоморфных“ кристаллов. Термин „изоморфный“ означает, что два кристалла (или больше) имеют одинаковую структуру и размеры элементарной ячейки и отличаются только тем, что либо в некоторых соответственных узлах решетки разных кристаллов лежат различные атомы, либо один из кристаллов содержит некоторые атомы, вместо которых в другом имеются свободные места. Например, было найдено, что в гемоглобине можно заменить в сульфгидрильных группах водород на ртуть, не нарушая типа кристаллизации; при кристаллизации рибонуклеазы образуются изоморфные кристаллы независимо от присоединения молекул красителя. Недавно было обнаружено, что, зная $|F|^2$ (т. е. интенсивности отражений) для трех изоморфных белковых кристаллов — одного, содержащего только белок и растворитель, и

двух других, содержащих каждый различную добавочную группировку атомов большой рассеивающей силы, — можно найти значения A и B для всех F и, следовательно, может быть подсчитана электронная плотность белкового кристалла [5]. Эти исследования начаты столь недавно, что получены лишь один-два предварительных результата; однако они указывают на то, что полная структура по крайней мере нескольких белковых кристаллов в течение ближайших лет станет известной.

Результаты

Рентгеноструктурный анализ кристаллических белков не дал еще никаких определенных сведений о деталях расположения атомов в белковой молекуле, однако были получены некоторые весьма интересные предварительные результаты. Наиболее важным из них является определение проекции электронной плотности гемоглобина лошади [4] и рибонуклеазы II [6]. На фиг. 5 представлена проекция в направлении винтовой оси второго порядка для электронной плотности рибонуклеазы II — одной из кристаллических модификаций рибонуклеазы.

Ни одну из этих проекций нельзя интерпретировать, и вряд ли этого можно было ожидать, даже если бы исследуемые структуры были построены исключительно просто и правильно. Трудность интерпретации этих проекций заключается главным образом в том, что они являются „теневыми картинками“ объектов толщиной порядка многих атомных расстояний (около 30 для гемоглобина, около 15 для рибонуклеазы), так что взаимное наложение отображений атомов, расположенных на разной высоте, не позволяет получить какие-либо данные об их расположении. Кроме того, разрешение этих проекций, равное 7 Å для гемоглобина и 3 Å для рибонуклеазы, мало для того, чтобы показать отдельные изображения соседних атомов. Существенной является относительно однообразная плотность молекулярных отображений в этих двух проекциях; это показывает, что если в кристалле и существуют параллельные прямые стержни с высокой электронной плотностью, то они не проектируются в виде отдельных отображений. Таким образом, наличие стержнеподобной струк-



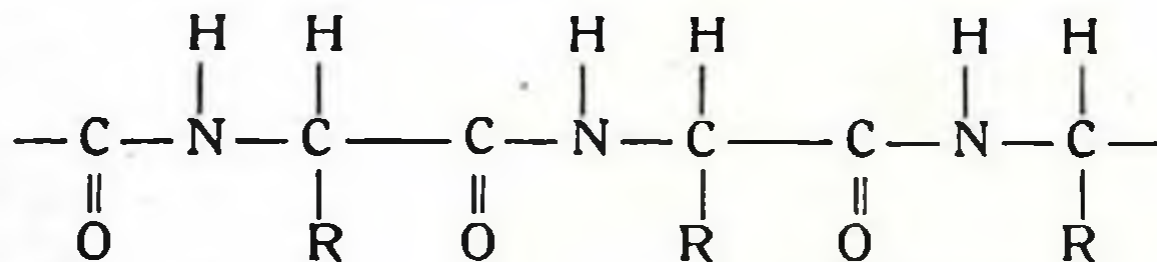
Ф и г. 5. Электронная плотность рибонуклеазы II, „спроектированной“ на 010. (Разрешение — 3 Å.)

туры внутри исследуемых молекул нельзя считать доказанным, хотя не исключена возможность присутствия стержней, расходящихся в различных направлениях.

Рентгеноструктурный анализ белков позволил установить другой важный факт, а именно, что молекулы белков сохраняют размер, форму и упаковку атомов независимо от содержания растворителя в кристалле. Это доказано для гемоглобина [1] и, по-видимому, верно и для других кристаллических белков. Поскольку известно, что глобулярные белки могут быть выкристаллизованы из раствора, такого результата и следовало ожидать.

Теории строения белка

Основой всех принятых в настоящее время теорий строения белковых молекул служит представление о том, что белки являются по существу полипептидными цепями, имеющими следующий вид:



В результате изучения структуры многих простых молекул (по большей части методами дифракции рентгеновских лучей или электронов) получено достаточное количество данных, позволяющих высказать ряд определенных суждений относительно геометрии пептидных связей.

В группе $\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{C} \\ || \\ \text{O} \end{array}$ все атомы лежат в одной плоско-

сти и, вероятно, атом водорода находится в *транс*-положении относительно атома кислорода. Все межатомные расстояния и углы между связями в этой группе известны. Углы между четырьмя связями α -углеродного атома (того, к которому присоединены R-группы) составляют по $109^\circ 28,5'$; т. е. равны углам тетраэдра; относительно этих связей возможно свободное вращение, хотя преимущественными являются те структуры, в которых одна

или две из этих связей находятся в плоскостях смежных амидных групп. Очень вероятно, что группа N—H связана „водородным мостиком“ с группой C=O, находящейся в той же или в другой цепи, причем направление этого мостика примерно совпадает с направлением связи N—H. По всей вероятности, структура любого белка соответствует этим принципам; во всяком случае, имеется множество структур, для которых они выполняются.

Паулинг, Кори и Брэнсон [14] использовали эти принципы для предсказания возможных структур *одиночных* полипептидных цепей, в которых все аминокислотные остатки геометрически эквивалентны, если не считать различий в природе R-групп. Они нашли только две такие структуры; в дальнейшем работами других исследователей было показано, что, кроме этих структур, возможны еще только три или четыре, причем они могут существовать лишь в том случае, когда угол между связями при α -углеродном атоме отличается от угла тетраэдра. У всех этих структур полипептидная цепь имеет спиральную конфигурацию, причем плоскости амидных групп параллельны оси спирали, и водородные мостики N—H... O=C связывают последовательные витки спирали.

Спиральной структурой, наиболее полно удовлетворяющей всем указанным требованиям, является известная „ α -спираль“ Паулинга, Кори и Брэнсона. Можно показать, что эта спираль согласуется с диффузными рентгенограммами, полученными от белковых волокон α -кератина, и, по-видимому, является основой структуры этих веществ. Один виток этой спирали содержит 3,6 аминокислотных остатка, ее шаг равен 5,4 Å, так что на каждые 1,5 Å вдоль оси спирали приходится один остаток.

Паулинг и Кори предсказали также существование структур, содержащих более чем одну полипептидную цепь. Одну из них — трехмерную спиральную структуру, включающую некоторые *цис*-конфигурации пептидных связей, — они считают вероятной для волокон типа коллагена. Однако эта структура не согласуется со всеми имеющимися данными, и ее, вероятно, нельзя считать правильной. Другую группу структур представляют в виде множества параллельных полипептидных цепей,

связанных друг с другом по бокам водородными мостиками так, что образуются слои. Некоторые из этих структур согласуются с данными, полученными для волокон β -кератина, и, вероятно, действительно являются основной структуры этих белков.

Все упомянутые здесь структуры содержат полипептидные цепи, расположенные в одном направлении. Обсуждались возможности резких изменений в направлении цепей, обусловливаемых пролиновыми остатками, но и эти структуры являются по существу волокнистыми структурами. Однако эти конфигурации весьма привлекательны и прекрасно совпадают с известными из предыдущего стереохимическими принципами; поэтому было сделано много попыток доказать, что они образуют основу структуры также и глобулярных белков. В некоторых случаях это, может быть, и верно; паттерсоновские функции кристаллического миоглобина и инсулина действительно содержат стержнеподобные области пиков, или высокой электронной плотности, которые, вероятно, представляют собой векторное отображение стержнеподобных структур в молекулах, составляющих эти кристаллы. Можно также выделить стержневидные образования в паттерсоновских функциях гемоглобина и рибонуклеазы, хотя такое выделение совсем не очевидно. Если вспомнить фиг. 4, то станет ясным, однако, что присутствие стержнеподобных образований в паттерсоновских функциях не всегда означает наличие стержней в соответствующих кристаллических структурах. Поэтому до сих пор существуют серьезные сомнения, действительно ли основной структурной единицей глобулярных белков являются структуры волокнистого типа, например структуры, предложенные Паулингом и Кори. С другой стороны, найденная Лоу (неопубликованная работа) структура молекулы инсулина, основанная главным образом на α -спирали, согласуется с основными контурами паттерсоновской функции одной из кристаллических форм инсулина.

Без сомнения, можно себе представить множество структур, основанных на еще не известных нам особенностях стереохимической природы пептидной связи. Не обязательно, чтобы все аминокислотные остатки имели

одинаковое геометрическое окружение, как не обязательно, чтобы все водородные мостики образовывались между группами NH и CO пептидных связей; действительно, R-группы сами иногда обладают большими возможностями для образования водородных связей. Растворитель, который всегда, даже в кристаллах, окружает молекулы глобулярных белков, за исключением особенно тщательно высушенных препаратов, в некоторых случаях может также принимать участие в образовании структуры. Возможно также образование пептидоподобных связей между карбоксильными группами аспарагиновой, или глутаминовой кислот и аминогруппой лизина, что будет искажать структуру и также способствовать возникновению водородных связей. Все эти возможности мало исследованы. Вполне вероятно, что в ближайшие несколько лет будет определена полная структура какого-либо кристаллического белка, что послужит хорошей экспериментальной основой для решения вопроса о структуре белка вообще.

ЛИТЕРАТУРА

1. Boyes-Watson J., Davidson E., Perutz M. F., Proc. Roy. Soc., **A191**, 83 (1947).
2. Bragg W. L., Howells E. R., Perutz M. F., Proc. Roy. Soc., **A222**, 33 (1954).
3. Bragg W. L., Perutz M. F., Proc. Roy. Soc., **A213**, 425 (1952).
4. Bragg W. L., Perutz M. F., Proc. Roy. Soc., **A225**, 315 (1954).
5. Harker D., Acta Cryst. (в печати).
6. Harker D., American Crystallographic Association, Summer Meeting, Pasadena, Abstract 77, 1955.
7. International Tables for X-ray Crystallography, Vol. I, International Union of Crystallography, Birmingham, England, 1952.
8. James R. W., The Optical Principles of X-Ray Diffraction (Vol. 2 of „The Crystalline State“, W. L. Bragg, ed.), Bell, London, 1950.
9. Kendrew J. C., Progr. Biophys. a. Biophys. Chem., **4**, 224 (1934).
10. Linderstrøm-Lang K., Nature **139**, 713 (1937).
11. Low B. W., Richards F. M., J. Am. Chem. Soc., **74**, 1660 (1952).
12. Lipson H., Cochran W., The Determination of Crystal Structures (Vol. 3 of „The Crystalline State“, W. L. Bragg, ed.), Bell, London, 1953. (Липсон Г., Кокрен В., Определение структуры кристаллов, ИЛ, 1956.)
13. Low B. W., Richards F. M., Nature, **170**, 412 (1952).
14. Pauling L., Corey R. B., Branson H. R., Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.), **37**, 205 (1951).
15. Peardeman A. F., van Bommel A. J., Bijvoet J. M., Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap. Proc., **B54**, 2 (1951).

БИОФИЗИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КЛЕТОЧНОГО ДЕЛЕНИЯ

Д. МЭЗИА

Проблема клеточного деления. Введение

Значение проблемы клеточного деления настолько ясно, что, говоря о ней, невозможно избежать банальностей. Тем более странно, что в настоящее время вопросам клеточного деления уделяется так мало внимания. По-видимому, эта проблема считается чересчур сложной, чтобы ее можно было решить даже наиболее многообещающими экспериментальными методами. Если это и так (а многое из того, что изложено ниже, покажет ошибочность такого представления), можно полагать, что рано или поздно весь арсенал современной экспериментальной техники будет использован для разрешения этой проблемы так же, как сейчас он используется для решения других проблем. Настоящий очерк представляет собой попытку собрать имеющийся материал, который может послужить базой для создания биофизического и биохимического подхода к данной проблеме. Автор не пытался дать полный литературный обзор, а лишь старался объединить старые и новые данные с целью, во-первых, отметить общность процессов там, где это имеет место, и выделить отклонения, опровергающие сделанные обобщения, а во-вторых, наметить вопросы, поддающиеся либо непосредственному анализу биохимическими и биофизическими методами, либо обсуждению с этих позиций. Ясно, что на данной стадии мы стремимся наметить доступные пониманию механизмы, объясняющие сложные явления клеточного деления. Видимо, термин „доступные пониманию“ следует предпочесть термину „простейшие“, так как из истории вопроса мы знаем, сколько раз увлечение простейшими физическими моделями приводило к самым плачевным результатам.

За последние годы появилось несколько важных об-

зорных работ по различным вопросам клеточного деления, среди которых следует отметить работы Шрадера [95], Хьюза [45], Риса [89] и Байера [123, 124].

Клеточная теория постулирует прерывистый характер роста биологических систем. Предел, до которого клетка способна увеличить свою массу, строго ограничен. По достижении этого предела клетка должна разделиться на две, каждая из которых повторяет процесс роста путем увеличения своей массы за счет внешней среды. Пожалуй, еще большее значение имеет то обстоятельство, что весь процесс в целом определяется циклом воспроизведения ядер. Однако увеличение числа клеток растущей системы не всегда связано с увеличением числа ядер. Это видно на примере таких синцитиев, как волокна скелетных мышц и сердечной мышцы, в которых размножение ядер сопровождается увеличением тканевой массы без образования границ между вновь сформированными ядрами. Клеточное строение в смысле образования стенок между массами цитоплазмы, относящимися к отдельным ядрам, возможно, лишь косвенно связано с основным процессом роста, обеспечивая: 1) наиболее благоприятное решение проблемы диффузии, с которой приходится сталкиваться живому веществу; 2) разделение таких процессов, как проведение возбуждения и сокращение, которые в противном случае были бы ограничены законом „все или ничего“; 3) несколько большую гибкость функциональных дифференцировок, нежели та, которая возможна в пределах одной клетки или синцития.

Значение клеточного деления для роста, пожалуй, более очевидно, чем роль, которую оно играет в качестве механизма замещения у взрослых организмов. До появления работ, проведенных в последнее время, количественная характеристика этих функций встречала значительные затруднения. Речь идет об исследованиях Дэвидсона [23] и Ховарда и Пелка [40]; показавших, что размножение хромосом сопровождается синтезом ДНК и что ДНК, однажды образовавшись, не находится в „динамическом состоянии“ и не обменивается столь же быстро, как другие вещества, входящие в состав клетки. Поэтому скорость образования новой ДНК определяет скорость образования новых клеток. Применение меченых атомов

[51] значительно облегчило количественное изучение этих процессов. Оказалось, что в организме млекопитающего скорость образования новых клеток поразительно велика.

Типы клеточного деления

Приведенный ниже перечень структур, вовлекаемых в клеточное деление, и описание различных типов деления могут показаться слишком подробными, однако это необходимо для разработки биофизического и биохимического подхода к изучению данной проблемы. При таком подходе необходимо иметь в виду, что существуют различные виды деления; вместе с тем их разнообразие дает возможность исследователю выбрать в каждом случае наиболее подходящий экспериментальный материал. Лишь рассматривая различные типы клеточного деления, можно выявить некоторые общие закономерности этого процесса.

Основные вариации схемы клеточного деления

I. Митоз, приводящий к образованию отдельных дочерних ядер.

А. Поведение ядра на стадии профазы.

1. Ядерная оболочка исчезает. (Большинство растений и животных.)
2. Ядерная оболочка сохраняется во время деления. (Многие простейшие, некоторые животные.)

Б. Расположение хромосом в метафазе.

1. Все хромосомы заключены в „метафазной пластинке“. (Многие крупные клетки с мелкими хромосомами.)
2. Только кинетохоры (центромеры) устанавливаются в экваториальной плоскости. Плечи хромосом выходят за пределы экваториальной плоскости. (Многие мелкие клетки с крупными хромосомами.)

3. Экваториальное расположение отсутствует. Хромосомы иногда располагаются полностью вне фигуры веретена и присоединены к полюсам лишь посредством нитей. „Метафазная пластинка“ может лежать наклонно к оси веретена. (Пыльцевые трубки.)

В. Форма веретена.

1. Непрерывные нити веретена тянутся от полюса к полюсу, перемежаясь с хромосомными нитями, присоединяющими хромосомы к полюсам. (Многие растительные и животные клетки.)
2. Непрерывное „центральное веретено“ может отличаться от „полуверетен“, присоединяющих хромосомы к полюсам. Хромосомы располагаются иногда по периферии вокруг центрального веретена. (Многие растительные и животные клетки.)
3. Веретено образуется исключительно внутри ядерной оболочки. (Многие простейшие, некоторые растительные и животные клетки.)
4. Каждая хромосома перемещается в пределах отдельного элемента веретена. (Клетки некоторых насекомых.)

Г. Митотические (клеточные) центры.

1. Отчетливые центры со звездами. Встречаются как в виде оформленных центриолей, выявляемых окраской, так и в виде центриолей, расположенных в более крупной „центросоме“, или „центросфере“, лишенной различных окрашивающихся центриолей. (Клетки большинства животных, многих низших растений.)
2. На полюсах отсутствуют дифференцированные структуры, которые можно

идентифицировать при наблюдении.
(Клетки большинства высших растений).

Д. Присоединение хромосом к полюсам и движение хромосом.

1. Хромосомы движутся по направлению к полюсам по мере сокращения тянущих нитей. Форма хромосом не противоречит гипотезе, согласно которой тянущая сила приложена к одной точке их тела. (Большинство растительных и животных клеток.)
2. Хромосомы ведут себя так, как будто тянущие нити прикреплены к их телу по всей его длине — так называемый „диффузный кинетохор“. (Некоторые растительные клетки.)
3. Хромосомы движутся „неправильно“. Нити, видимо, удлиняются настолько, что концы плеч хромосом опережают кинетохоры. (Некоторые клетки насекомых.)

Е. Относительная скорость движения отдельных хромосом.

1. Все хромосомы движутся с одинаковой скоростью независимо от их величины. (Большинство клеток.)
2. Одна из хромосом движется с иной скоростью, чем остальные.

Ж. Удлинение веретена и укорочение хромосомных тянущих нитей.

1. Наборы хромосом разделяются в результате одновременного укорочения хромосомных нитей и удлинения веретена.
2. Сокращение хромосомных нитей может предшествовать удлинению веретена.

(Ввиду недостаточности материала невозможно еще определить, какой из этих типов более обычен.)

3. „Амитотический тип“. Две группы хромосом внутри ядерной оболочки могут разойтись в результате перетяжки ядра и раздвигания дочерних ядер посредством тяжа, способного значительно удлиняться. (Многие простейшие, некоторые растительные клетки.) Этот тип расхождения внешне весьма отличается от нормального, но механизм раздвигания может трактоваться как процесс „нормального“ удлинения веретена.

3. Цитокинез ; сегрегация дочерних ядер в отдельных клетках.

1. Перетяжка происходит по экватору либо одновременно по всей его длине, либо с какой-либо одной стороны. (Яйцеклетки.)
2. Перетяжка смещена к одному из полюсов. Часто сопровождается асимметрией звезд; меньшие звезды образуются в направлении полюса, где формируется маленькая клетка. (Некоторые яйцеклетки, иногда животные клетки.)
3. Перетяжка сопровождается расхождением дочерних клеток, между которыми иногда образуется тяж. (Многие животные клетки, в особенности амебоидные клетки.)
4. Перетяжка носит неправильный характер, что, видимо, определяется поверхностной дифференцировкой клеток. (Некоторые ресничные.)
5. Закладка новых клеточных мембран или стенок между дочерними клетками происходит без перетяжки. (Большинство растительных клеток.)
6. Деление ядра без деления цитоплазмы, приводящее к образованию син-

цитиев (мышечная ткань животных, некоторые слизистые грибы и т. д.). Иногда синцитий делится в дальнейшем на клетки путем закладки клеточных перегородок между ядрами. (Эндоспермы растений, спорообразование у простейших и т. д.)

II. Размножение хромосом и их рост без образования дочерних ядер или новых клеток.

А. Эндомитоз. Циклическое внутриядерное удвоение числа хромосом без расхождения дочерних наборов. Объем цитоплазмы нарастает в соответствии с пloidностью. (Некоторые растительные клетки и клетки некоторых тканей насекомых.)

Б. Политенность. Число генных хромонем в хромосоме удваивается циклически; число хромосом не меняется; объем цитоплазмы нарастает пропорционально числу удвоений хромонем. (Гигантские клетки личинок двукрылых.)

Ядро

Вряд ли можно сомневаться в том, что митоз является основным механизмом деления ядра клеток растений, животных, грибов и тех микроорганизмов, которые обычно классифицируются как простейшие. В отношении бактерий вопрос остается нерешенным. Де-Ламатер и другие [25, 26], пользуясь трудоемкими методами и работая на самой границе разрешающей способности светового микроскопа, описали у них образования, окрашивающиеся подобно хромосомам и располагающиеся в делящейся клетке в виде фигуры митоза. Эти работы не встретили всеобщей поддержки [6].

В настоящее время установлено, что удвоение хромосом происходит в промежутке между делениями или самое позднее в ранней профазе [40, 109, 113]. Поэтому существенной чертой митоза является расхождение дочерних хромосом, возникших в результате удвоения хромосомного набора, таким образом, что в каждое из двух дочерних

ядер попадает по одному дочернему набору. У типичных растений и животных ядерная оболочка исчезает, и расхождение дочерних хромосом осуществляется в цитоплазме посредством *веретена митоза*. В менее типичных случаях, например у ресничных инфузорий, ядерная оболочка сохраняется, а дочерние хромосомы расходятся при помощи удлиняющегося стержня, который толкает и раздвигает оба полюса ядра.

По-видимому, хромосомный цикл в большинстве случаев протекает одинаково. В промежутке между делениями, когда хромосомы не только удваиваются, но, по всей вероятности, и регулируют деятельность клетки, их вещество почти всегда настолько распылено, что отдельные хромосомы нельзя различить не только под обычным микроскопом, но и под электронным. Правда, имеются некоторые исключения. Кливленд [16, 17] наблюдал у некоторых паразитических жгутиковых во время интеркинеза сохранение хромосом, которые ему удалось идентифицировать. Хромосомы в виде так называемых „ламповых щеток“, характерные для овоцитов некоторых животных, преимущественно амфибий, по всей вероятности, представляют собой наиболее яркий пример хромосомных нитей, видимых в неделящейся клетке, активно синтезирующей протоплазму. Однако для неделящихся клеток более характерно диспергированное состояние хромосом. Таким образом, именно тогда, когда нам важно увидеть хромосомы в действии, в большинстве случаев они не поддаются наблюдению. Структура же оформленных свернутых нитей микроскопического размера, наблюдаемых в моменты подготовки клетки к делению, связана, вероятно, лишь с самим механизмом деления.

В некоторых случаях воспроизведение ядер не сопровождается ни разделением ядра надвое, ни делением самой клетки. В качестве примера можно привести гигантские клетки личинок двукрылых, содержащие крупные политенные ядра, и другие случаи, в которых наблюдается внутриядерное размножение хромосом, сохраняющих свои нормальные размеры (эндомитоз), что приводит к появлению полиплоидного набора хромосом. Но даже в этих случаях процесс протекает в рамках нормального цикла. При эндомитозе хромосомы диспергируются в

период, соответствующий интеркинезу, и уплотняются вновь в период деления. Этот цикл не наблюдался в случае гигантских политеменных хромосом, хотя в настоящее время появились данные о существовании кратковременного периода, во время которого число хромосом удваивается (см. [1]). Более того, этот процесс удвоения протекает, по-видимому, синхронно для значительных групп клеток. Во всяком случае это является наиболее удовлетворительным объяснением того факта, что, как правило, количество ДНК в ядрах клетки бывает либо у ординарным, либо увеличенным в 2, 4, 8... и т. д. раз; промежуточные значения встречаются крайне редко.

Митотические центры и звезды

В клетках животных и некоторых растений полярность митотического веретена связана с дифференцированным участком, в котором, по-видимому, заканчиваются нити веретена. Подчас этот участок имеет форму окрашивающейся гранулы — *центриоли*. В других случаях видно светлое образование, либо свободное от включений, либо содержащее одно или несколько зерен. Эта полярная дифференцировка морфологически чрезвычайно изменчива, что привело к возникновению противоречивой терминологии; мы будем называть это образование *митотическим центром*. У некоторых простейших, в частности у жгутиковых, которых изучал Кливленд [16, 17], с митотическим центром связаны, по-видимому, не только элементы веретена, но также и жгутики. Аналогичные взаимоотношения встречаются также у спермиев и других снабженных жгутиками клеток высших животных [84, 85].

Вообще у тех форм, где митотический центр имеет вид выраженной структуры, с ним во время деления оказывается связанной звезда. Размеры звезд изменчивы; изменчиво также их отношение к веретену. На основании того, что лучи звезды обладают, по-видимому, свободными концами, их довольно условно отличают от так называемых непрерывных нитей веретена.

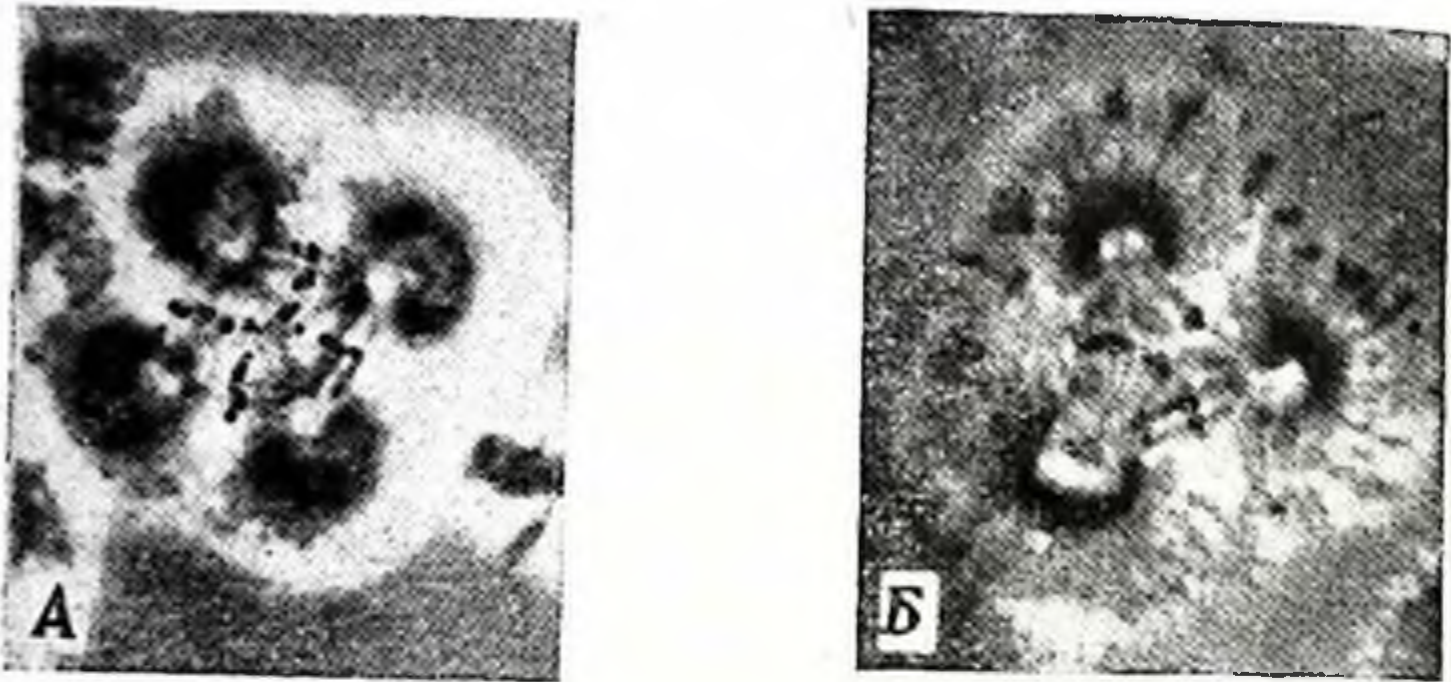
Общепринятое в настоящее время представление о том, что характер митоза у животных и растительных клеток различен (типы митоза „со звездой“ и „без звезды“),

основано исключительно на невозможности обнаружить митотические центры у растений при помощи окраски или других методов исследования. В некоторых из наиболее хорошо изученных случаев митоза у животных (например, дробление яйца морского ежа) митотические центры действительно представлены только звездами и не имеют вида одиночных компактных окрашивающихся центриолей. Хотя в растительных клетках звезды обычно не видны, в последнее время появились сведения об их возникновении при воздействии на клетку некоторых химических веществ [81]. Многие цитологи [17, 96] считают, что разница между фигурами митоза животного („со звездой“) и растительного („без звезды“) типа несущественна. Если рассмотреть возможный механизм действия митотических центров, то станет ясно, что вопрос о том, достаточно ли они компактны или велики для обнаружения их обычными методами, не имеет никакого значения; лишь функциональная проба может решить — проявляется их действие в каждом данном случае или нет.

В клетках таких типов, где митотические центры имеют вид ясно выраженных центриолей, последние иногда становятся постоянными образованиями, которые можно рассматривать как „самовоспроизводящиеся“ элементы. При оплодотворении животных клеток центриоль, привносимая спермием, дает начало двум центриолям, располагающимся на полюсах митотической фигуры. Если же в яйцеклетку проникает еще один сперматозоид, то центриоль каждого из них образует по две центриоли, что приводит к возникновению четырехполюсного митоза (фиг. 1, А). О механизме удвоения центриолей ничего неизвестно, причем картина осложняется тем, что некоторые клетки, как например яйца морского ежа, при условиях, отклоняющихся от нормы, способны образовывать многочисленные звезды, число которых превышает число имеющихся центриолей. Лорх [59] посредством микроманипулятора удаляла митотические центры из бластомеров яиц морского ежа; при этом возникновение звезд происходило значительно позже, чем обычно. Она наблюдала также образование звезд в клетках, ядра которых были удалены. Это заставляет предполагать, что материал, из которого образованы звезды, протоплазматического проис-

хождения. Ни в одном из этих случаев не наблюдалось нормального хода деления.

По-видимому, имеются все основания полагать, что нормальный ход митоза животной клетки обусловлен расположением и размножением митотических центров.



Ф и г. 1. Изолированные митотические аппараты из дробящихся яиц морского ежа. Фазовый контраст; $\times 650$.

А. Четырехполюсная фигура (*Strongylocentrotus purpuratus*). Звезды находятся на равных расстояниях друг от друга. Нити веретена соединяют каждую звезду со всеми другими. Хромосомы располагаются посередине между звездами, но распределяются неравномерно между различными веретенами. Б. Трехполюсная фигура.

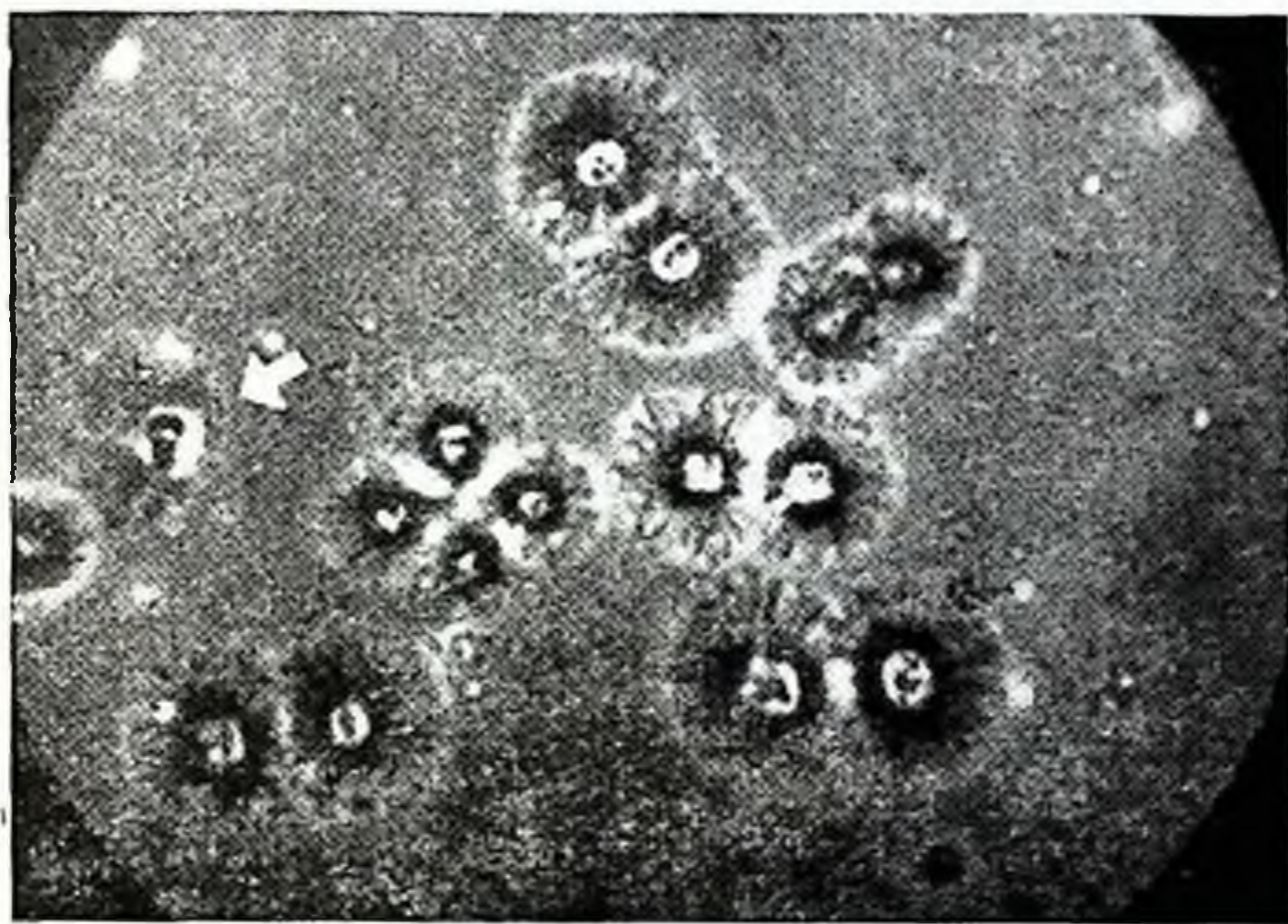
Размножение центров представляет собой проблему, заслуживающую переисследования с применением современных методов, поскольку это один из редких случаев самовоспроизведения цитопроtoplазматических образований микроскопических размеров, наступающего в определенное время.

Веретено митоза

Изменения формы и поведения веретен митоза исчерпывающе разобраны в монографии Шрадера [95]. У большинства растительных и животных клеток веретено располагается вне ядерной оболочки, которая, как правило, исчезает во время митоза. Мы не будем рассматривать

случай внутриядерного веретена, хотя оно иногда встречается у некоторых групп животных.

Обычно считают, что веретено состоит из двух главных элементов—*хромосомных нитей*, присоединяющих хромосомы к полюсам, и *непрерывных нитей*, тянущихся от одного полюса к другому. При расхождении хромосом между ними подчас дифференцируются так называемые *мезозональные нити*.

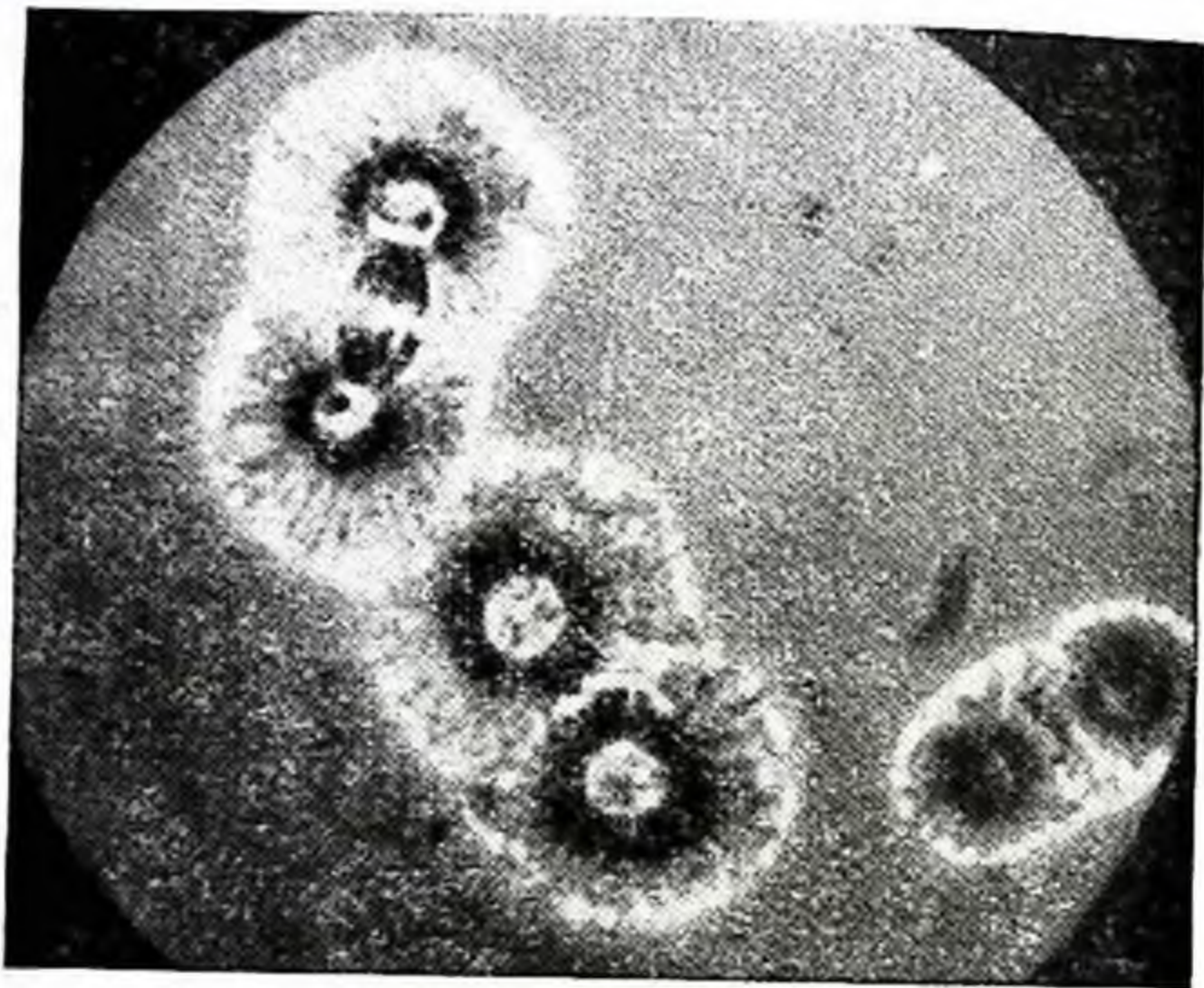


Ф и г. 2. Группа изолированных митотических аппаратов из яиц морского ежа. Фазовый контраст; $\times 336$.

Стрелкой отмечена фигура митоза из яйца, деление которого завершилось; в ней видны реконструируемое интерфазное ядро, а также остатки звезды. Заметен „рост“ звезд и удлинение веретена при расхождении хромосом.

Хотя картина митоза, выявляемая при помощи классических микроскопических методов, давала основания полагать, что волокнистое строение веретена является существенной чертой его функции (нити веретена осуществляют оттягивание или расталкивание хромосом), все же реальность существования нитей подвергалась серьезному сомнению. Считалось, что не исключена возможность возникновения нитей как артефактов, вызванных фиксацией, поскольку многие исследования [30] показали, что под влиянием

цитологических фиксаторов из гомогенных растворов действительно выпадают волокнистые структуры. Некоторые не столь крайние скептики считали, что, несмотря на



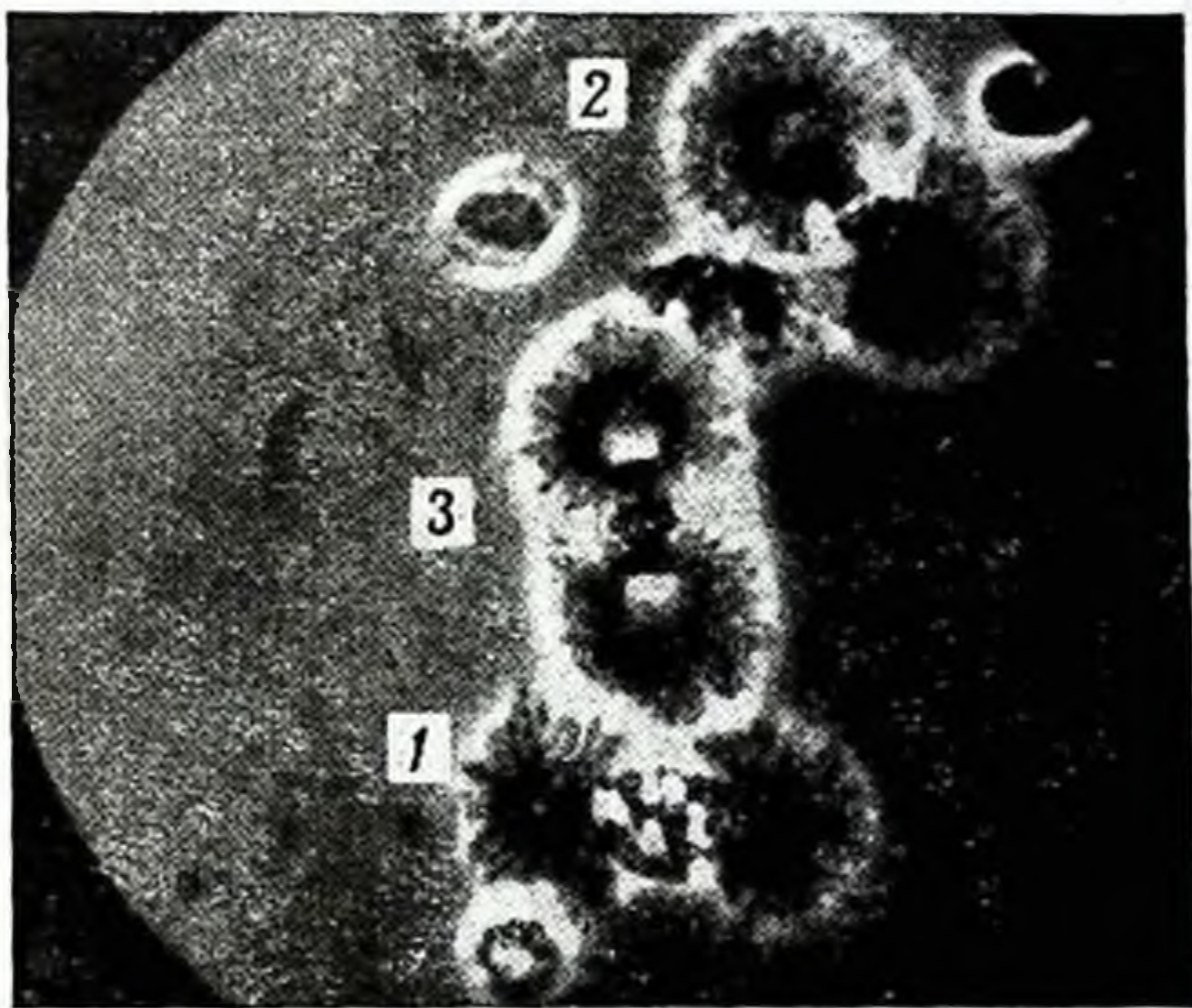
Ф и г. 3. Изолированные митотические аппараты из яиц морского ежа. Фазовый контраст; $\times 650$.

Видны лучи звезд, непрерывные нити веретена и хромосомные нити. Хорошо заметна разница между величиной звезд и длиной веретен в ранней метафазе (внизу справа) и в анафазе.

искусственное происхождение самих нитей, их образование в результате фиксации выявляет предсуществующую субмикроскопическую ориентацию молекул. Применение электронного микроскопа не помогло разрешить эту проблему. В ранних электронномикроскопических исследованиях, проведенных с кислыми фиксаторами, были выявлены те же структуры, что и в обычном микроскопе.

Другие исследования [92], в которых применялись более новые и, как считали, лучшие фиксаторы, показали отсутствие нитей веретена. Еще более поздние работы [98, 99], выполненные методами, считающимися в настоящее время вполне приемлемыми, подтвердили реальность нитей,

хотя выявить детали их строения все же не удалось. Нет сомнения в том, что при помощи электронного микроскопа можно выявить тонкое строение нитей веретена, если они вообще существуют, но нельзя доказать или опровергнуть факт их существования. Дело в том, что в электронномикроскопических исследованиях также нельзя обойтись без применения фиксаторов. Кроме того, в электронном микроскопе, независимо от его разрешающей силы, плохо различимы структуры, плотность которых незначительно отличается от плотности вещества фона.

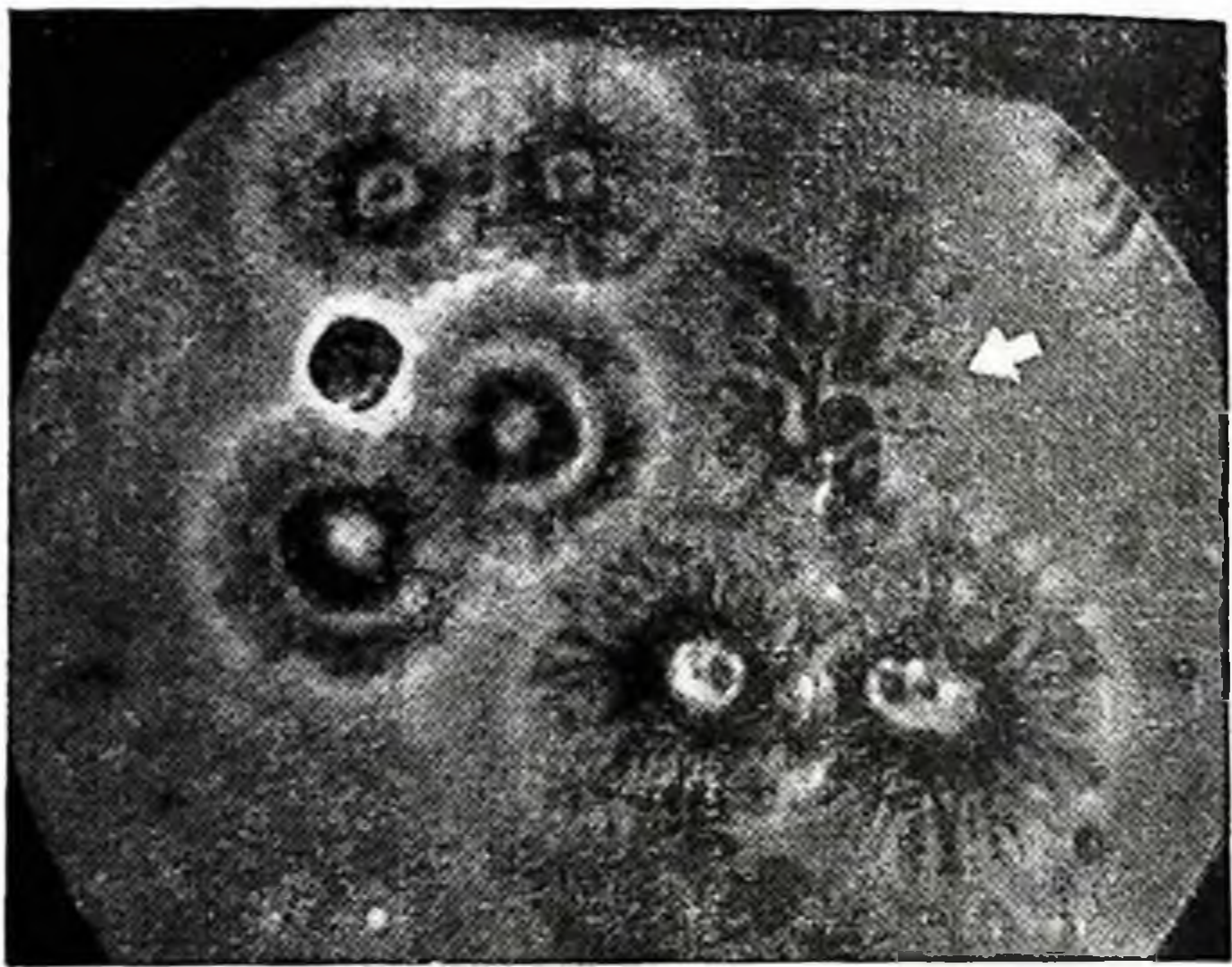


Ф и г. 4. Три этапа образования метафазной фигуры (изолированные митотические аппараты из делящихся яиц морского ежа). Фазовый контраст; $\times 650$.

1 — ранняя стадия (ядерная оболочка еще не разрушилась, звезды разошлись и прилегают к поверхности ядра); 2 — более поздняя стадия (ядерная оболочка более не различима); 3. — образование метафазной пластинки; видны нити веретена.

Вопрос о реальности существования нитей веретена можно решить лишь на основании прижизненных наблюдений. В этом направлении кое-что было сделано ранее, но только теперь благодаря применению усовершенство-

ванных оптических методов удалось получить микрофотографии, несомненно доказывающие существование волокнистой структуры веретена. Следует упомянуть две работы, относящиеся к этому вопросу. Первая из них принадлежит

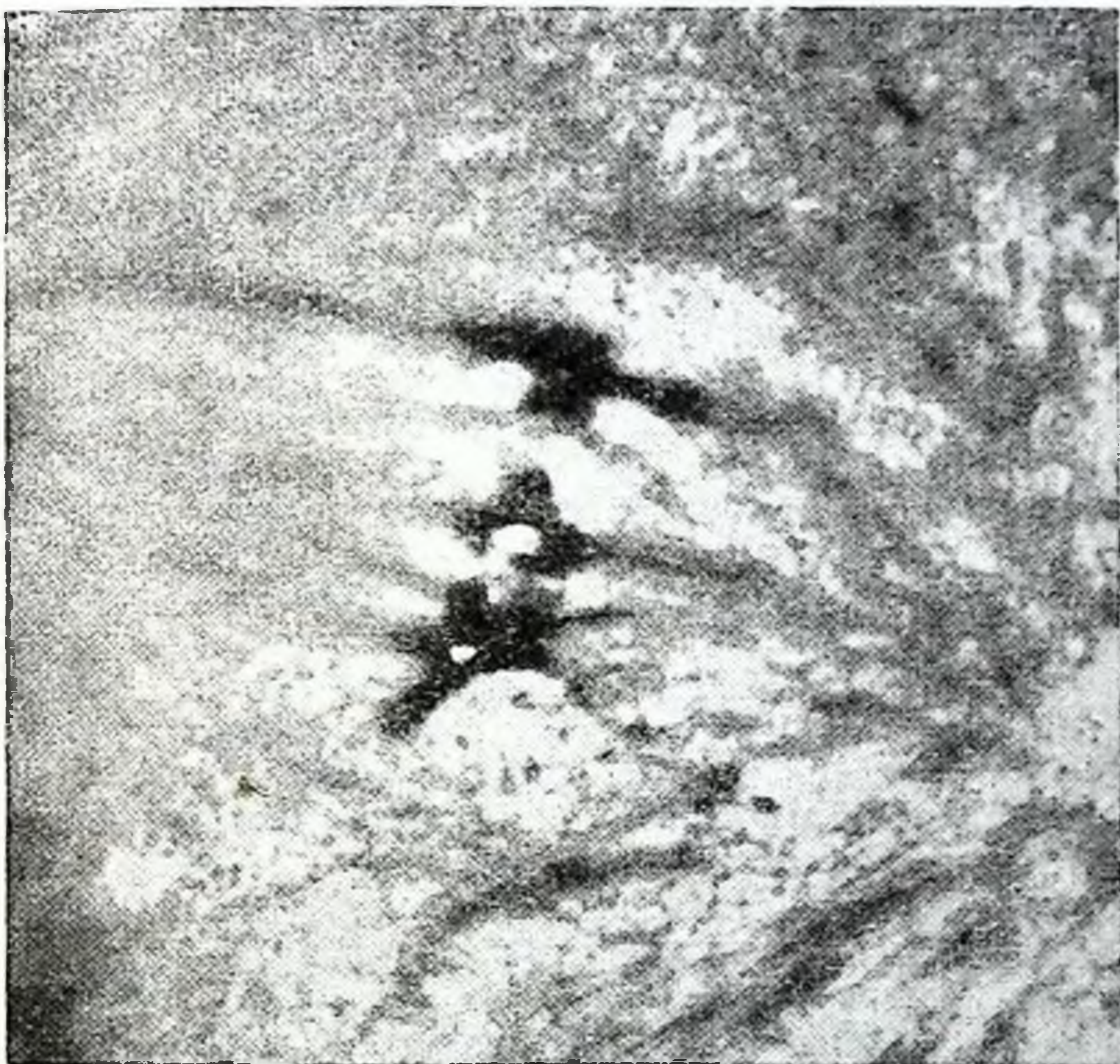


Ф и г. 5. Изолированные метафаза, анафаза и телофаза. Фазовый контраст; $\times 650$.

На метафазных фигурах (слева) видно четкое экваториальное расположение хромосом и хорошо заметны нити веретена. На стадии очень поздней анафазы (внизу справа) видно увеличение размеров звезд и длины веретена, в то время как расхождение хромосом почти закончилось. Следует отметить между группами хромосом „межзональный“ участок веретена, в котором на этой стадии волокнистая структура еще не вполне ясно выражена. Образование, обозначенное стрелкой, представляет собой восстанавливающееся ядро одной из дочерних клеток после завершения клеточного деления. Хромосомы набухли и перешли в везикулярное состояние; видны остатки звезды.

Кливленду [17], который при помощи фазово-контрастного микроскопа наблюдал митотические веретена *Barbulanympha* — жгутикового, паразитирующего в таракане *cryptocercus punctulatus*. Вторая работа принадлежит перу Инуэ [47], изучавшего биологические объекты при помощи усовершенствованного им поляризационного микроскопа. На снимках, приведенных автором, отчетливо видны нити веретена и их поведение на протяжении митотического и мейотического деления как растительных, так и живот-

ных объектов. Эти данные в совокупности с теми, которые получил Кливленд, не оставляют сомнения в том, что нити веретена реально существуют, а не возникают как артефакты фиксации.



Ф и г. 6. Электронномикроскопический снимок тонкого среза изолированного митотического аппарата из делящегося яйца морского ежа. $\times 7000$.

Хромосомы только что начали расходиться.

Другой прием, проливший свет на природу веретена, заключается в массовом выделении митотических аппаратов из делящихся яиц морских ежей, которое осуществили Мэзия и Дан [66], применяя метод, усовершенствованный в дальнейшем Мэзия [63, 64].

На изолированных митотических аппаратах нити веретена отчетливо видны как в фазово-контрастном (фиг. 2—5), так и в электронном микроскопе (фиг. 6). Для получения электронномикроскопического снимка изолированные аппараты обрабатывали OsO_4 , заключали в метакрилат и затем нарезали на микротоме. Хотя изолированные объекты вряд ли можно расценивать как „живые“, все же метод выделения не имеет ничего общего с цитологической фиксацией. Поэтому весьма сомнительно, чтобы тождество наблюдаемых структур с теми, которые были описаны классиками цитологии [115, 116], могло объясняться тождеством артефактов.

Функция веретена обсуждается ниже. Здесь лишь уместно упомянуть, что некоторые ученые описывали веретено как сократительный механизм, разводящий хромосомы к полюсам, другие — как механизм, толкающий хромосомы к тем же полюсам, а третьи — как аппарат, направляющий автономные движения хромосом.

Центромеры (кинетохоры)

Структурой, приобретающей исключительное значение в митозе, является участок хромосомы, к которому, видимо, прикреплены нити веретена. Из многочисленных названий, предлагавшихся для данного образования, чаще всего применяются термины „центромер“ и „кинетохор“. При изучении митоза нельзя пренебречь некоторыми обстоятельствами, полученными в результате цитологических исследований.

1. Хотя тонких деталей структуры кинетохора мы еще не знаем, но известно, что он всегда занимает одно и то же положение на данной хромосоме.

2. Положение кинетохора определяет форму хромосомы при движении ее в анафазе. При терминальном расположении кинетохора хромосома, перемещаясь, имеет вид палочки; при центральном положении кинетохора хромосома при движении имеет вид буквы V с плечами равной длины и т. д. В более типичных случаях хромосомы в анафазе приобретают форму гибкого тела, протягиваемого через жидкость посредством нити, прикрепленной к кинетохору. Таким образом, свободные концы хромосом

тянутся позади кинетохора. По наблюдениям Метца [68], в исключительных случаях концы хромосомы при движении находятся впереди того участка, где прикреплена нить; это весьма серьезно противоречит предположению о том, что хромосомы оттягиваются к полюсам.

3. Если хромосома обладает двумя кинетохорами (как в случае транслокаций, вызванных действием излучения), то она оттягивается одновременно к обоим полюсам и в результате этого подчас ломается [13]. Это обстоятельство, видимо, очень важно для понимания механизма движения хромосом. Во всяком случае ясно, что существует прямая взаимосвязь между кинетохором и перемещением хромосом в анафазе.

4. Если хромосому лишить кинетохора, то она вообще теряет способность нормально перемещаться к полюсам. Хромосомы с двумя кинетохорами, а также фрагменты хромосом, лишенные кинетохора, особенно часто возникают при облучении и представляют собой одно из важных его последствий. Поэтому особое значение для исследования этих явлений приобретает предложенный Циркле и Блумом [112, 122] метод, позволяющий применять облучение строго локализованных участков.

Поскольку полярность митотического процесса определяют лишь митотические центры и кинетохоры, нет ничего удивительного в том, что цитологи считают эти структуры гомологичными. Поллистер [85] рассмотрел заново данные, показывающие, что при сперматогенезе улитки *Vivipara* дополнительные центриоли возникают одновременно с появлением аномалий в поведении хромосом, указывающих на утрату последними своих кинетохоров. Количественные соотношения подтверждают вывод о том, что кинетохоры превратились в центриоли; как мы увидим далее, это может иметь известное значение для теории образования митотического аппарата.

Проблемы стимуляции митоза

Что заставляет растущую, синтезирующую и функционирующую клетку внезапно перейти к процессу митоза? Этому вопросу и в прошлом уделяли достаточно внимания, но он приобрел особое значение в последние годы,

когда усилия биологов сконцентрировались на разрешении проблемы рака. Краткий разбор этого вопроса позволит познакомить читателя с основными взглядами на причины митоза.

Нарастание массы

Обычно за время между образованием клетки в результате клеточного деления и ее собственным последующим делением клетка удваивает свою массу. Казалось бы, что завершение увеличения массы должно быть одним из условий настоящего деления и что деление можно предотвратить, препятствуя росту клетки. Хотя, вообще говоря, резкое подавление роста тормозит очередное деление, дело обстоит гораздо сложнее. Во-первых, известны случаи (главным образом при ранних делениях яйцеклеток животных), в которых деление по существу является дроблением без ощутимого роста. Приводились доводы, что в данном случае рост выражается в переходе запасных веществ в активное состояние. Проблему пускового механизма делений этого рода обсудил недавно Сванн [105]. Во-вторых, Прескотт [87] провел в том же году тщательное исследование *Amoeba proteus*, которое показало, что особи, рост которых был приостановлен при помощи голодания, способны все же завершить процессы, предшествующие делению, хотя и значительно медленнее, чем нормально питавшиеся особи. У амеб, изученных Прескоттом, в условиях непрерывного питания при температуре 21° деления происходили через каждые 24 часа. При выключении питания после 14-часовой инкубации вес амебы достигал 80% веса, присущего взрослой особи, что определяли чувствительными „картезианскими“ весами. Лишь 5% этих особей делилось после 24-часовой инкубации. 85% особей делилось спустя 60 час., даже если питание не возобновлялось. Оставшиеся 10% вообще не делились на всем протяжении опыта. Завершение роста является, видимо, важной детерминантой деления. Однако особи, накопившие лишь 80% массы, все же производят „попытку“ разделиться, хотя этот процесс и растягивается во времени. Формальное объяснение этого явления состоит в том, что существует особый вид синтеза, который должен

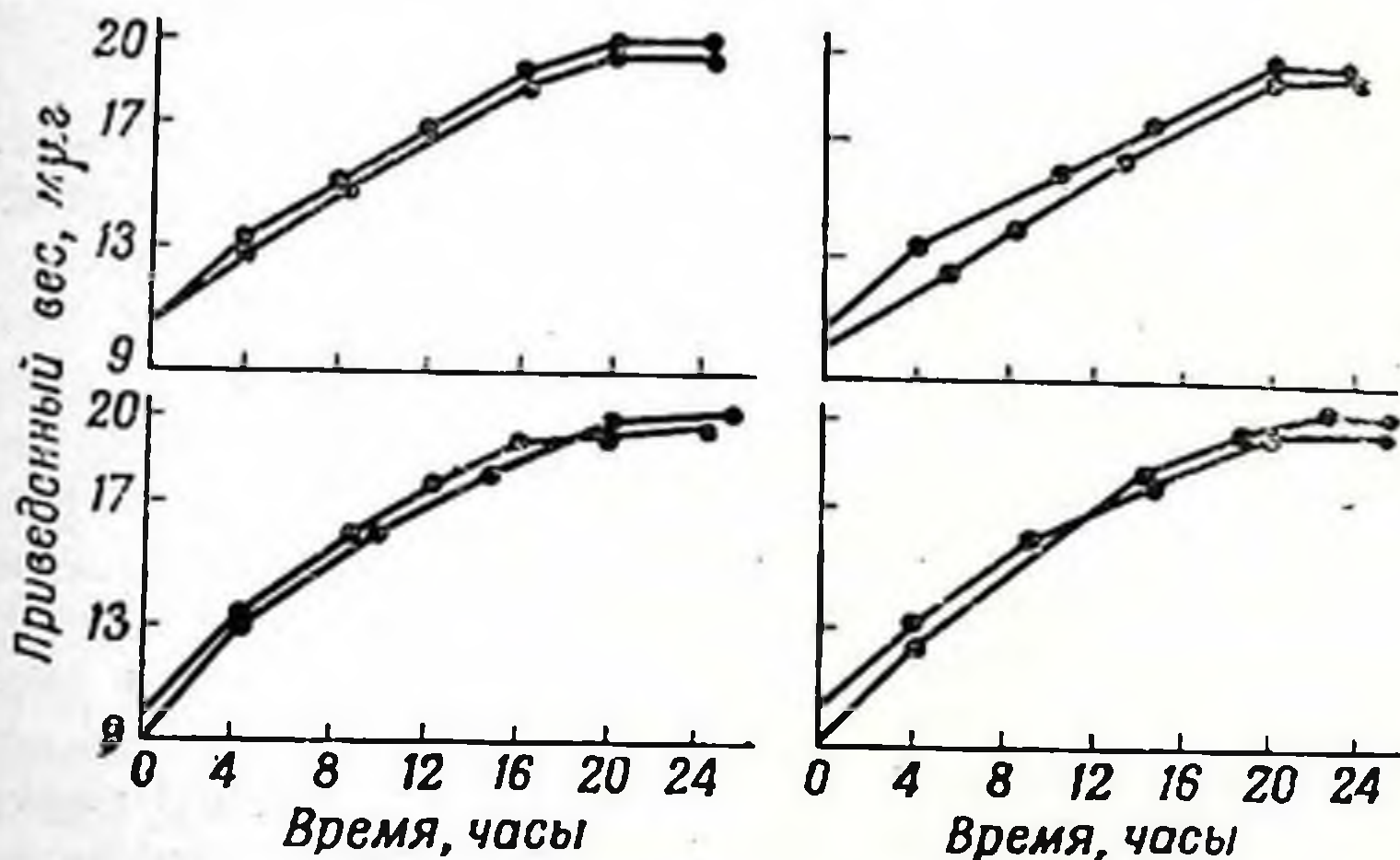
закончиться, прежде чем может начаться деление. Этот синтез, играющий роль пускового механизма, обычно идет за счет внешнего питания, но способен протекать эндогенно, хотя и в более медленном темпе. Данный опыт показывает независимость образования материала пускового механизма от общего нарастания массы.

Проблема критической массы

Некоторые авторы считали, что нормальный рост клетки происходит до тех пор, пока она не достигнет критической массы, и что достижение критической массы ускоряет наступление деления. Биологический смысл этого явления состоит в том, что по достижении критической массы одно ядро оказывается не в состоянии „обслужить“ увеличившийся объем протоплазмы, в силу чего оно должно разделиться. Как описательная эта гипотеза правомочна и ныне, поскольку даже в синцитиях наблюдается определенное соотношение между общей массой цитоплазмы и общим числом ядер. Случаи, когда объем цитоплазмы выходит за пределы обычного без деления ядер, весьма редки и представляют собой аномалии (это наблюдал, например, Боденштейн [8], изучая влияние азотного аналога иприта на эмбриональные клетки). Однако из этого вовсе не следует, что достижение определенной массы является само по себе причиной деления. Можно показать, что это не так.

До последнего времени не было получено количественных данных, касающихся роста отдельных клеток. Основным источником информации являлись в высшей степени неудовлетворительные измерения объема, который в значительной мере мог зависеть от содержания воды. Остроумный прибор Цейтена [117] — весы, действующие по принципу декартового поплавка (картезианские весы), — позволил точнее измерять приведенный вес одной живой клетки (вес под водой или практический эквивалент сухого веса). Прескотт [87] получил полную кривую роста отдельной клетки (*Amoeba proteus*) в промежутке между двумя делениями (фиг. 7). Приведенный вес (вес под водой) определяли на картезианских весах

при 25°. Эта работа показала, что нарастание массы прекращается до наступления деления. У амебы, между делениями которой должно пройти 24 часа, не наблюдается ощутимого нарастания массы по прошествии 18 час. В промежутке между 18-м и 24-м часами в клетке, видимо, завершаются процессы, подготовляющие новое деление,



Ф и г. 7. Кривые роста *Amoeba proteus*.

Пары кривых соответствуют дочерним клеткам, возникшим в результате деления.

но это не отражается на кривой роста. Более того, при задержке деления амеба в течение долгих часов сохраняет вес, присущий взрослой особи, причем пусковой механизм деления, по-видимому, бездействует. Из этого следует, что завершение увеличения массы само по себе не является причиной деления.

Существует ли пусковой механизм?

Под пусковым механизмом я подразумеваю достижение такого состояния, которое приводит к неизбежному наступлению деления. Возможность существования подобного механизма подтверждается следующим простым

опытом. Много лет назад [33] было показано, что при многократном удалении части цитоплазмы у растущей клетки, препятствующем завершению ее роста, клетка остается живой, но не делится. Это состояние, довольно странно названное „экспериментальным бессмертием“ („*experimentelle Unsterblichkeit*“), может поддерживаться в течение неопределенно долгого времени. Влияние периодического удаления части цитоплазмы нельзя сравнивать с эффектом голодания. В последнем случае предполагаемый материал пускового механизма способен накапливаться за счет других веществ, в то время как при удалении части цитоплазмы общие запасы веществ, входящих в состав клетки, катастрофически уменьшаются.

Возникает вопрос, наступает ли такой период роста клетки в интеркинезе, когда необходимость приступить к делению становится настолько настоятельной, что даже удаление части цитоплазмы не способно уже предотвратить деление. Такой опыт осуществил Джеймс [49] на *Amoeba proteus*. Он нашел, что удаление половины цитоплазмы клетки, находившейся на грани профазы (что нетрудно определить), не способно приостановить начавшееся деление. Клетка, объем которой был искусственно уменьшен, делится, давая начало двум маленьким дочерним клеткам. Очевидно, пусковой механизм был уже приведен в действие.

Недавно появился ряд работ, посвященных проблеме синхронизации делений в популяции клеток *Tetrahymena* [93], *Pneumococcus* [39], *Amoeba* [49, 67] и *Salmonella* [53]. У этих разнообразных форм различные авторы независимо друг от друга обнаружили сходный принцип синхронизации — цикличность температурного режима в период размножения клеток. Обычно клетки содержали при слишком высокой или слишком низкой температуре, а затем доводили температуру до более нормальной, что вызывало синхронное деление клеток. Хотя теория синхронизации не была еще разработана, но исследования температурного режима показали [121], что для механизма, ускоряющего деление, зависимость от температуры носит иной характер, чем для механизма роста в промежутке между делениями. Эти открытия способствуют не только изучению клеточного роста и деления, но и пониманию природы самого пускового механизма.

Возможные виды пусковых механизмов

Мы уже отметили, что не считаем достижение критической массы пусковым механизмом деления.

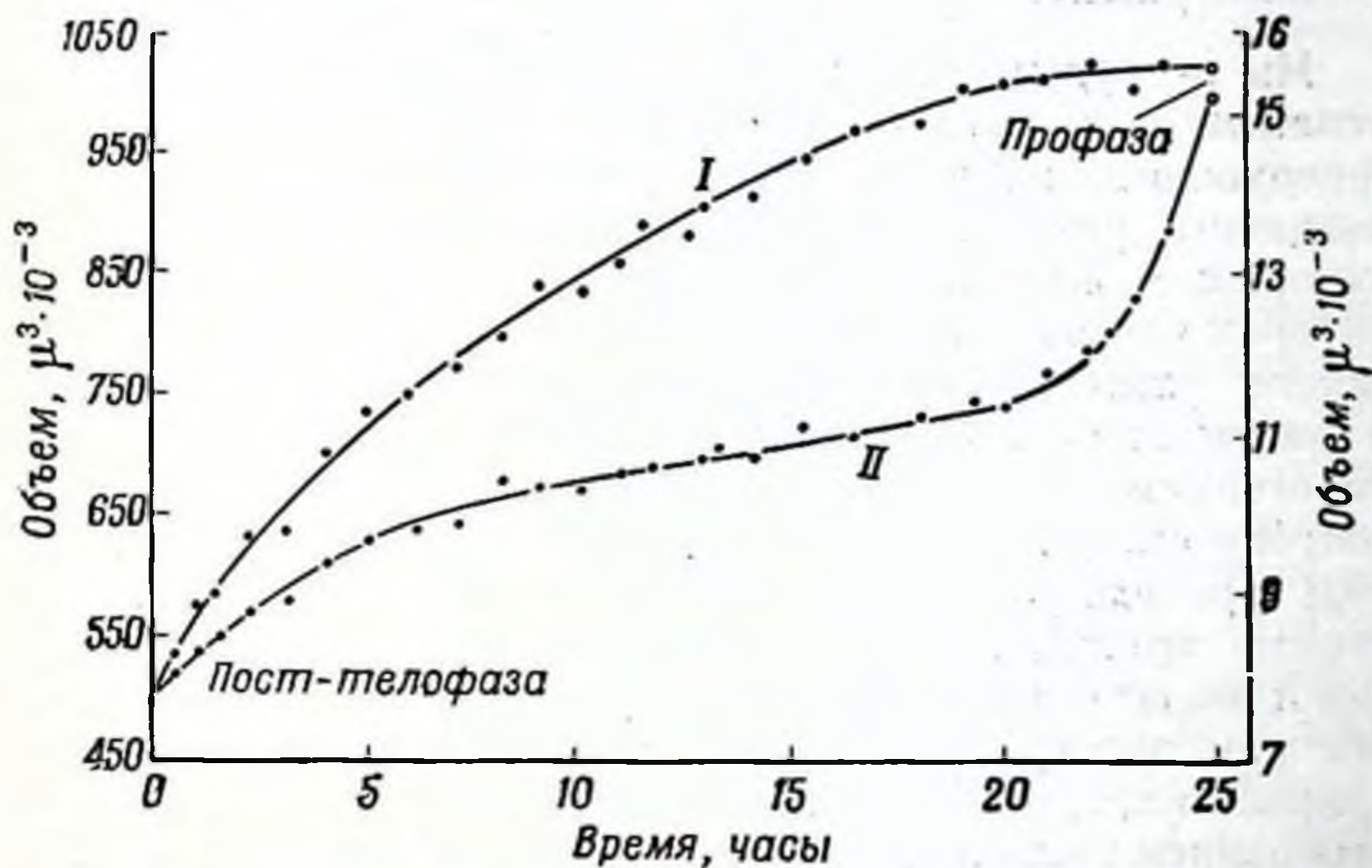
Вероятнее всего, пусковой механизм обусловлен либо завершением какого-то синтеза в цитоплазме, который не отражается на общей массе клетки, либо процессами, протекающими в ядре.

Нельзя исключить первой возможности, тем более, что это предположение можно теперь проверить благодаря разработке синхронных методов культивирования, позволяющих наблюдать группы клеток, заведомо находящихся в стадии, предшествующей делению.

Что касается процессов, протекающих в ядре, то наиболее твердо установлено следующее: клетка не способна разделиться, прежде чем не произойдет удвоения хромосом. В настоящее время имеются несомненные доказательства того, что удвоение хромосом во многих случаях [109, 113] происходит перед делением, но не во время деления. Для изучения этого вопроса Говард и Пелк [40] применили метод автордиографии, обеспечивающий высокое разрешение. Им удалось показать, что синтез ДНК у *Vicia faba* завершается в период интеркинеза за несколько часов до деления. Имеются также данные, указывающие, что в некоторых случаях удвоение ДНК может происходить позднее. Однако несомненно, что, как правило, этот процесс не предшествует непосредственно митозу. Следует, правда, заметить, что удвоение ДНК, чрезвычайно важное само по себе, не идентично удвоению хромосом, так как хромосомы содержат и другие вещества. Такие образования, как кинетохоры, о которых шла речь выше, необходимы для нормального протекания митоза и должны удваиваться на каком-то этапе цикла. Поэтому вряд ли можно отрицать, что делению должно предшествовать завершение важнейших ядерных процессов.

Следовательно, ни в коем случае нельзя утверждать, что окончание удвоения хромосом связано с пусковым механизмом; однако существуют другие процессы, связанные с ядром, которые служат показателями завершения подготовки к делению. Быстрое разрастание ядра непосредственно перед наступлением профазы не раз освещалось

в цитологической литературе [86]. Прескотт тщательно изучил на *Amoeba proteus* корреляцию величины ядер с ростом клетки в период интеркинеза. Он наблюдал резкое увеличение ядра в последние несколько часов перед наступлением профазы (митотический цикл 24 часа) (фиг. 8)



Ф и г. 8. Увеличение объема всей клетки и ядра *Amoeba proteus* между двумя делениями.
I — цитоплазма ; II — ядро.

Это резкое разрастание ядер начинается *после* того, как кривая веса клеток выравнивается. Недавно Штих [101] описал выраженное увеличение количества РНК в ядрах клеток *Cuclops* непосредственно перед наступлением профазы. Прескотт [87] отметил увеличенное поглощение P^{32} у амебы, что, возможно, является показателем активности ядра в период, предшествующий делению.

В общем имеются основания предполагать (но не более), что для решения вопроса о пусковом механизме деления необходимо глубокое изучение ядра клетки. Однако главное заключается в том, что в настоящее время мы имеем возможность исследовать эту проблему, поскольку существуют методы изучения как отдельных клеток, так и их популяций в любой произвольно выбранный период их

жизненного цикла. Ранее этих методов не существовало. Непосредственной практической задачей является по возможности глубокое изучение биохимических процессов, характеризующих период, предшествующий делению.

Экспериментальная стимуляция клеточного деления

Мы не будем здесь детально обсуждать эту проблему; отметим лишь, что ей посвящено большое число работ, содержащих, впрочем, мало сравнимые и подчас неоднозначные результаты. Следует также указать, что агент, который можно было бы считать специфическим стимулятором клеточного деления, еще не обнаружен¹. В качестве такого фактора были испытаны возможные физические и химические воздействия и даже придуман новый фактор — митогенетические лучи (критический обзор по этому вопросу см. у Гарвея [34]). В работах Хьюза [45] и Риса [90] приведен обзор соответствующей литературы. Эти данные трудно использовать для целей анализа (хотя они и имеют определенную ценность в других отношениях), так как экспериментатор обычно измеряет лишь общий прирост клеточной популяции, не делая различий между ускорением роста в промежутке между делениями и стимуляцией самого процесса деления.

Подготовка к митозу

Хорошо известные четыре фазы митоза — профаза, метафаза, анафаза и телофаза — достаточно полно описывают хромосомный цикл, хотя с позиций учения о клеточном делении митоз следует рассматривать как процесс, состоящий из двух стадий. В *подготовительной* стадии закладывается митотический аппарат, поляризуя клетку. Иначе говоря, ориентировка хромосом и веретена в метафазе определяет плоскость деления клетки. На последующей стадии собственно *деления* вступает в действие митотиче-

¹ После того как были написаны эти строки, была опубликована работа Миллера и других [127], обнаруживших специфический фактор клеточного деления у растений. Это вещество, названное ими *кинетином*, было не только выделено, но и синтезировано; оно активно в чрезвычайно низких концентрациях.

ский аппарат, хотя результаты его деятельности уже определились мобилизацией активных элементов в течение подготовительной фазы.

Нам фактически не известна природа подготовительных процессов. Можно лишь остановиться на некоторых проблемах, которыми до сих пор пренебрегали и без разрешения которых нельзя надеяться выяснить сущность митоза. Эти проблемы можно разбить на две группы.

Становление полярности

Образование полюсов легко обнаружить в животных клетках, а также в клетках, обладающих видимыми митотическими центрами. В растительных клетках это сделать труднее, поскольку не разрешен еще вопрос о существовании у них эквивалентов митотических центров. В животных клетках образование полюсов сводится в сущности к разделению центриолей и расхождению дочерних центриолей к противоположным полюсам клетки. Объяснение первого процесса укладывается в рамки общей проблемы удвоения цитоплазматических частиц. Механизм второго процесса — передвижения центриолей к полюсам — совершенно не ясен. В некоторых случаях, когда хорошо известны микроскопические детали строения, как например у яиц морского ежа, в процесс, очевидно, вовлекается ядерная оболочка. В этом случае дочерние центриоли остаются связанными с ядерной оболочкой, но расходятся возможно дальше друг от друга, скользя по поверхности этой оболочке [116]. В других случаях движение центриолей не связано с ядром. У жгутиковых, изученных Кливлендом, центриоль, по-видимому, тесно связана с поверхностью клетки и совершенно не связана с поверхностью ядра.

Процессы, протекающие в ядре при подготовке к митозу

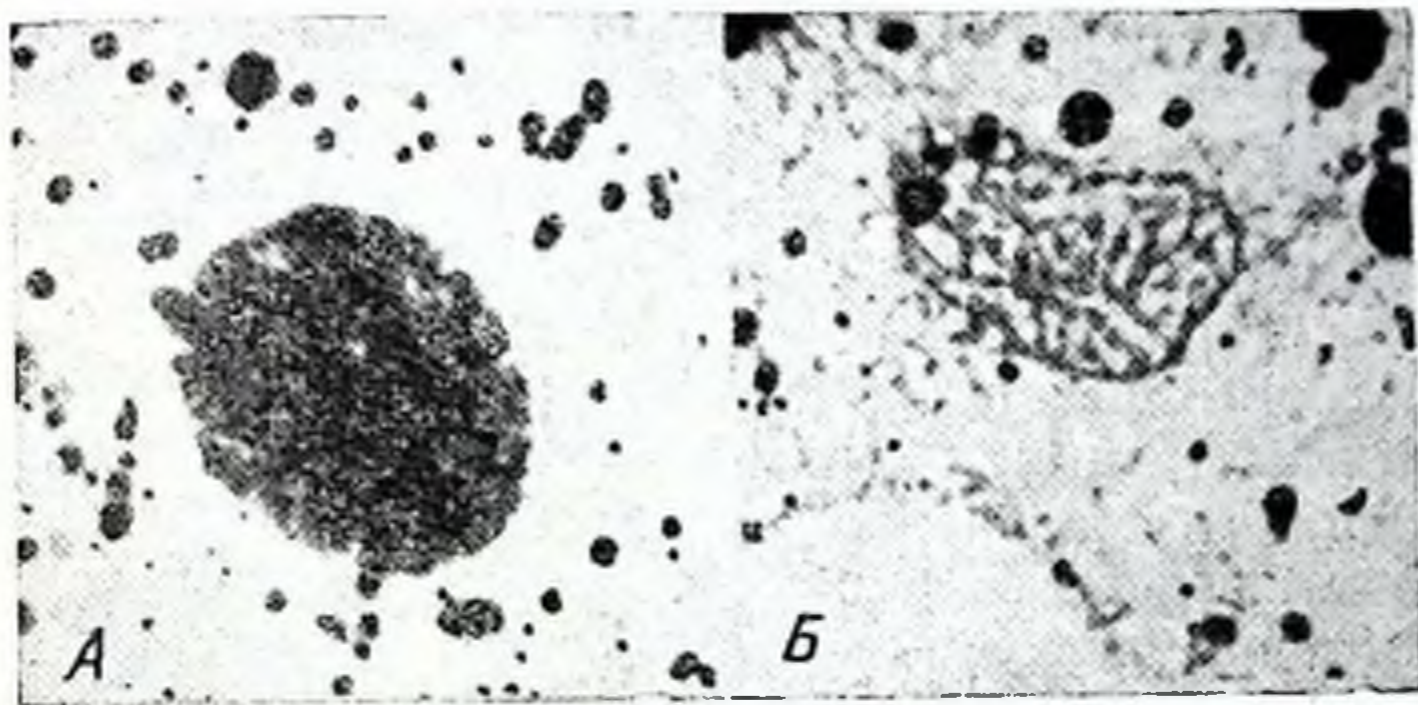
Наиболее выраженными из них являются: 1) исчезновение (у большинства растительных и животных клеток) ядерной оболочка, совпадающее с уплотнением хромосом; 2) такое перемещение хромосом, при котором кинетохоры

(а весьма часто и сами хромосомы) располагаются в плоскости, лежащей посередине между полюсами под углом 90° к оси веретена.

Хромосомы и ядерная оболочка во время профазы. В связи с уплотнением хромосом во время профазы возникает ряд важных специфических вопросов. Осуществляется ли уплотнение путем изменений непосредственно окружающей хромосомы среды в результате разрушения ядерной оболочки? Каковы причины, вызывающие разрушение самой ядерной оболочки? Связь между процессом агрегации вещества хромосом и окружающей средой приобретает новое значение в свете недавних исследований Мэзия [65], посвященных строению хромосом. Оказалось, что хромосома ведет себя как тело, состоящее из крупных частиц, взаимодействие которых определяется ионными факторами. Принимая во внимание модель хромосомы (которую мы не будем детально рассматривать), вполне можно допустить, что если бы внутриядерная среда была слабо ионизирована, хромосомы находились бы в диспергированном состоянии. Наоборот, если во время профазы среда будет более сильно ионизирована, следует ожидать уплотнения хромосом независимо от морфологических деталей этого процесса.

Действительно ли ядерная оболочка во время профазы распадается? В большинстве случаев она становится неразличимой при наблюдении под микроскопом, хотя не раз указывалось, что хромосомы располагаются в ее пределах. Поскольку нет возможности опровергнуть последнее утверждение, приходится допустить, что при разрушении ядерной оболочки содержимое ядра, за исключением хромосом, изливается в цитоплазму. Ясно, что последнее обстоятельство весьма важно. Можно показать, что составные части ядра действительно исчезают во время митоза и должны вновь образовываться или составляться при реконструкции дочерних ядер. Рабинович и Плаут [29] изучали недавно содержание РНК в ядрах *Amoeba proteus* в конце интеркинеза и непосредственно вслед за телофазой, а также в ядрах дочерних клеток в первые часы интеркинеза. Для выявления РНК применяли окраску галлоцианином — хромовоалюминиевыми квасцами. Они нашли, что в конце интеркинеза ядра содержат много РНК, главная масса которой исчезает во время деления; молодые дочерние

ядра лишены ее практически полностью (фиг. 9). РНК вновь накапливается в этих ядрах в первые часы инкубации. Очевидно, в процессе митоза ядерное содержимое действительно проникает в цитоплазму, как и предполагалось ранее.



Ф и г. 9. Содержание рибонуклеиновой кислоты в ядре *Amoeba proteus*; × 550.

А — непосредственно перед делением; Б — непосредственно после деления.

Расположение хромосом в метафазе. Пожалуй, наиболее интересное явление во всем процессе митоза представляет собой расположение хромосом в плоскости, лежащей посередине между полюсами, перпендикулярно к линии, соединяющей полюса (экваториальная или метафазная пластинка). В тех случаях, когда в этой плоскости не хватает места для целых хромосом, в ней лежат их кинетохоры. Этот процесс был описан рядом авторов [58] на основании наблюдения живых объектов. В недавно опубликованной работе, посвященной митозу живых асцитических опухолевых клеток, Макино и Накахару [60] сообщили, что образование экваториальной пластинки происходит в течение нескольких минут, причем характер движения хромосом таков, как будто они туда втягиваются. Они наблюдали также осциллирующие движения, совершаемые самими хромосомами, образовавшими метафазную пластинку [60]; это позволяет предполагать, что либо пространство, занимаемое пластинкой, ограничено, либо каждая

хромосома в течение некоторого времени подвергается действию тянущей силы, исходящей от обоих полюсов. В некоторых случаях отдельные хромосомы располагаются ближе к одному из полюсов, чем к экваториальной плоскости [77, 79]; это также указывает на связь между расположением хромосом в метафазе и установлением равновесия между факторами, действующими с обоих полюсов. При анализе причин, вызывающих расположение хромосом, характерное для метафазы, было бы чрезвычайно удобно обнаружить, что они движутся как единая группа, либо ограниченная остатками ядерной оболочки, либо погруженная в гель, как это предположили Дюрьи и Догерти [27]. К сожалению, это представляется маловероятным. При многополюсных митозах можно наблюдать, как группы, состоящие из различного числа хромосом, направляются к разным веретенам (см. фиг. 1), что возможно лишь при условии свободного расположения хромосом.

Успешное выделение митотического аппарата позволяет высказать некоторые дополнительные соображения относительно метафазы. При выделении митотического аппарата он фигурирует на всех стадиях как целое образование; в профазе митотические центры и ядра связаны физически, а в процессе формирования метафазной пластинки хромосомы все время остаются связанными с образующимся веретеном. Это хорошо видно на фиг. 4, где удачно сфотографированы три стадии, предшествующие метафазе; видна связь ядра с центрами и расположение хромосом на веретене при разрушении ядерной оболочки. На фиг. 5 изображены клетки на стадии полной метафазы; видно, насколько совершенным может быть экваториальное расположение хромосом.

Ввиду крайне выраженного поляризованного расположения центров, веретена и хромосом были сделаны попытки объяснить эти явления действием электромагнитных сил, для чего был создан ряд физических моделей, рассмотренных Шрадером [95] и Миловидовым [69, 70]. К сожалению, до настоящего времени они могут служить лишь примерами биофизических неудач, ничего не давших для выяснения биологической сущности этих явлений. Попытки воздействия на фигуры митоза электрическим или магнитным полем также оказались бесплодными. В качестве при-

мера можно привести опыты Миловидова, который подверг растущие концы корешков воздействию магнитного поля напряженностью 35 000 гс в течение нескольких часов, что не вызвало никаких отклонений в течении митоза.

„Правила“, определяющие расположение частей митотического аппарата

Двухполюсные модели оказываются несостоятельными, ввиду того что митотический аппарат не всегда ограничивается двумя полюсами; при некоторых важных патологических состояниях он становится многополюсным. Взаимоотношения полюсов и хромосом укладываются, видимо, в рамки строгих „правил“. По-видимому, наиболее рационально изучить эти правила, прежде чем пускаться в малопродуктивные спекуляции по данному вопросу.

1. Число полюсов митотического аппарата определяется числом центров. Например, яйцо морского ежа в аномальных условиях может оказаться оплодотворенным более чем одним сперматозоидом. Каждый сперматозоид привносит один центр. Если в результате проникновения двух сперматозоидов привносятся два центра и они оба делятся, то образуется четырехполюсный митоз (см. фиг. 1, А). В случае деления лишь одного из обоих центров возникает трехполюсный митоз (см. фиг. 2, Б). Наблюдали фигуры и с большим числом полюсов. Как правило, клетка развивает лишь один, но не более, митотический аппарат с соответствующим числом полюсов.

2. Полюса многополюсного веретена находятся на равных расстояниях друг от друга; трехполюсное веретено образует равносторонний треугольник, четырехполюсное веретено — квадрат.

3. Образующие веретено нити располагаются таким образом, что каждый центр, если это только возможно, соединяется с любым другим центром. В случае четырехполюсного веретена нити могут располагаться не только по сторонам квадрата, но также и по обеим его диагоналям.

4. В случае многополюсного митоза хромосомы в метафазе распределяются среди нитей веретена случайно, но обязательно лежат в медианных плоскостях между каждой парой полюсов (см. фиг. 1). Иначе говоря, хромо-

сомы должны попасть в медианные плоскости, но не способны избрать ту пару полюсов, с которой они будут связаны. Однако связь с полюсами определяет характер их расхождения (что доказано прямым наблюдением); следовательно, хромосомы, содержащиеся в дочерних ядрах, которые возникают при образовании многополюсного веретена, не будут эквивалентны, в силу чего такой аномальный митоз должен привести к роковым последствиям. Это и наблюдается в действительности.

В биологических процессах подобное разнообразие геометрических закономерностей встречается редко; оно, естественно, подсказывает биофизический путь исследования, несмотря на то, что прежние попытки в этом направлении оказались чересчур примитивными, чтобы дать успешные результаты.

Хронометраж митоза

Исследователю, которому предстоит заниматься экспериментальным изучением митоза, должна быть известна относительная длительность каждой его фазы у клеток различных типов. Весьма полные данные по этому вопросу для клеток самых разнообразных типов и для клеток одного типа при различных температурах приводят в своих работах Хьюз [45] и в особенности Миловидов [69, 70]. Данные эти весьма разноречивы. Обычно, но не всегда, профазы и телофазы длиннее метафаз и анафаз. Миловидов приводит ряд интересных цифр, показывающих максимальную и минимальную длительность различных фаз во всех исследованных им случаях.

	Минимум, мин.	Максимум, мин.
Профаза	2	270
Метафаза	0,3	175
Анафаза	0,33	122
Телофаза	1,53	140

Длительность отдельных фаз зависит, конечно, от температурных условий. Скучные данные, касающиеся влияния температуры [45], не дают оснований для надежных обобщений, но в дальнейших исследованиях этот вопрос заслуживает самого серьезного внимания.

Биохимия и биофизика митоза

Вещество митотического аппарата

Мэзия и Дан [66] определили митотический аппарат как „совокупность структур, составляющих «хроматиновый» и «ахроматиновый» аппарат классической фигуры митоза. Сюда входят веретено, звезды, центриоли, ядра (до распада) и хромосомы (после исчезновения ядерной оболочки)“. Понятие митотического аппарата возникло в результате опытов по изолированию последнего, показавших, что перечисленные компоненты извлекаются из клетки как единое целое.

Очевидно, возникает необходимость химического исследования каждой из структур этого сложного образования.

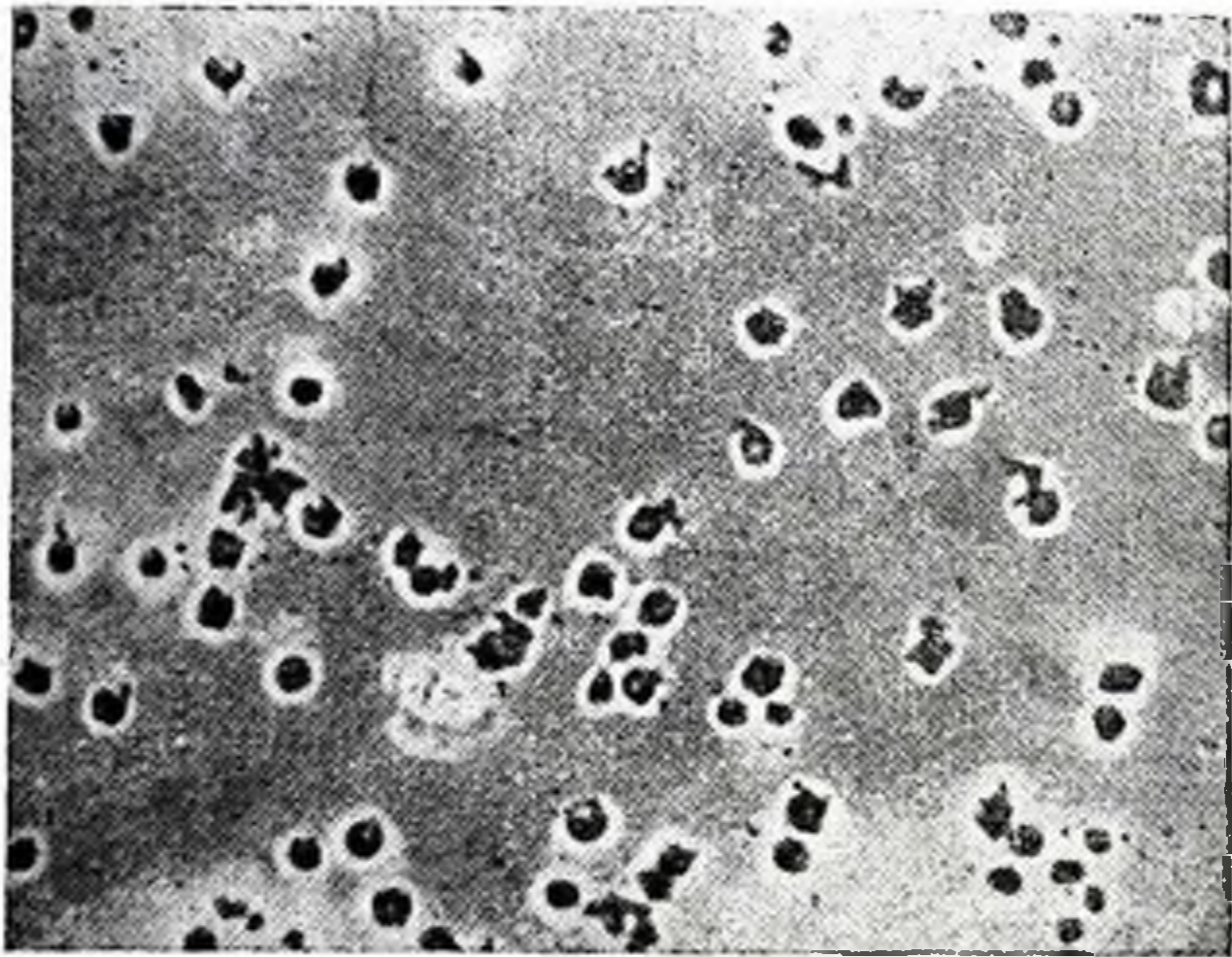
Хромосомы. В то время как химии хромосом вообще уделялось достаточно много внимания, данных о химических изменениях, сопутствующих митозу, почти нет. При помощи цветных реакций было показано [48], что РНК интерфазного ядрышка в течение митоза откладывается на хромосомах и вновь высвобождается при образовании дочерних ядер. С другой стороны, Рабинович и Плаут [29] находят, что у амебы большая часть ядерной РНК теряется во время митоза. Важно было бы выяснить, является ли хромосома во время митоза переносчиком генетически пассивного материала от материнского ядра к дочерним.

Кинетохоры. Различия в химическом составе кинетохоров и остальной части тела хромосом установлены лишь на основании иного отношения их к краскам и другим реактивам [78]. Непосредственных данных о химическом составе кинетохоров не существует, да и получить их было бы весьма затруднительно из-за малой величины объектов.

Митотические центры. Отрывочные сведения о составе митотических центров были получены при помощи цитохимических реакций. Имеются данные о присутствии в них РНК [2,100], белка и полисахаридов [100].

Были предприняты попытки изолировать митотические центры путем растворения изолированных аппаратов в тирогликолате натрия (фиг. 10). Эта методика может

дать минимальные химические сведения об их составе, хотя едва ли центры остаются неповрежденными в результате такой грубой обработки. Когда будут получены более подробные сведения, придется вновь уточнить различия между центриолями, центросомами, центросферами и т. д.



Ф и г. 10. Результат растворения изолированных митотических аппаратов в тиогликолате натрия при рН 11. Фазовый контраст. $\times 200$.
Сохранились только митотические центры и прилегающие волокна.

Веретена и звезды. Исследования по химии митотического аппарата в большинстве своем касались состава веретена и звезд. Прежде всего можно обобщить данные, полученные оптическими методами — окрашиванием, измерением поглощения ультрафиолетовых лучей, а также наблюдениями в интерференционном и поляризационном микроскопах. Все эти данные указывают на то, что веретена и звезды содержат много белков и мало нуклеиновых кислот. Действительно, гистохимические особенности этих образований дали основание обозначить их как „ахро-матиновые“ структуры. Более современные способы окраски белков [62] дают возможность чрезвычайно рельефно выявлять фигуры митоза при наблюдении в обыкновенном микроскопе.

Хотя главным материалом этих структур являются, по-видимому, белки, в их состав могут входить и другие соединения. Измерения поглощения ультрафиолетовых лучей [24] и окрашивание препаратов [101] позволили установить наличие РНК в области веретена, а возможно, и в самих его нитях. Вещество веретена дает также реакцию на полисахариды [101]. Цитологическими методами было установлено [101], что физическая непрерывность веретена после удаления РНК и полисахаридов объясняется присутствием белка. Вопрос о содержании липидов в митотическом аппарате не получил должного освещения. Недавно Фуджи [31] показал, что в веретене присутствует некоторое количество цинка, и высказал ряд соображений относительно возможной функциональной роли последнего.

Митчисон и Сванн [74] исследовали при помощи интерференционного микроскопа митотический аппарат дробящихся яиц морского ежа и нашли, что он обладает более низким показателем преломления (а следовательно, содержит больше воды), чем окружающая цитоплазма. Они считают это следствием выталкивания цитоплазматических гранул, обладающих более высоким показателем преломления. Помимо того, что сам по себе факт более низкого показателя преломления митотического аппарата весьма интересен, это наблюдение прекрасно иллюстрирует сущность тех вопросов, касающихся механизма митоза, которые все еще остаются нераскрытыми; веретено обычно выглядит оптически прозрачным и свободным от зернистых включений, присутствующих в остальной части клетки. Поскольку веретено не обладает видимой наружной оболочкой, неясно, почему образование его влечет за собой выталкивание гранул из обширного участка клетки, в котором оно располагается. Ниже рассмотрен один из возможных механизмов, но он приводил бы лишь к захвату гранул ячейками волокнистой структуры. Недавно Росс [91] привел данные, свидетельствующие о том, что показатели преломления веретена и цитоплазмы в клетках из культуры животных тканей понижаются в течение первого этапа митотического процесса и повышаются в течение второго его этапа.

Начиная с работы Шмидта [97] было проведено много исследований двойного лучепреломления митотического

аппарата с применением более усовершенствованной техники. В основном данные этих работ совпадают; анизотропия действительно имеет место; она обычно положительна в направлении оси веретена. Этот установленный факт дает серьезные основания предполагать, что в веретене мы имеем дело с системой ориентированных белков.

Изолированный митотический аппарат

Нет необходимости подчеркивать крайнюю недостаточность сведений о химическом составе митотического аппарата, полученных только оптическими методами или при помощи окрашивания. Подробные химические данные могут быть получены лишь путем химического анализа; это в особенности касается такой структуры, как митотический аппарат, не являющийся резко ограниченным образованием. Поэтому необходимо найти такой метод выделения его для химического анализа, при котором можно будет учесть источники ошибок, в особенности избытки и потери более подвижных компонентов.

Массовое выделение митотических аппаратов из популяций синхронно делящихся яиц морского ежа произвели впервые Мэзия и Дан [66] в 1952 г. Ими был применен принцип *избирательной растворимости*. Он заключается в том, что делящиеся клетки обрабатывают растворителем, разрушающим все части клеток за исключением митотического аппарата. В качестве растворителей были использованы детергенты. Вслед за этим [63, 64] было показано, что наилучшие результаты дает естественный стероидоподобный детергент *дигитонин*, причем выделение можно производить в два приема: 1) остановка митоза посредством погружения клеток в разведенный (30—40-процентный) спирт, охлажденный до -10° ; 2) превращение цитоплазмы в суспензию из мельчайших гранул в результате обработки дигитонином. После этого более тяжелые митотические аппараты осаждают из суспензии при помощи центрифугирования. Этим путем можно получить для целей химического исследования 10—20 мг чистых митотических аппаратов.

Ниже перечислены данные относительно химического состава митотического аппарата яиц морского ежа, полу-

ченные в результате исследования выделенного таким образом материала.

1. Митотический аппарат состоит преимущественно из белков. Он полностью растворяется под влиянием протеолитических ферментов.

2. Изолированный митотический аппарат содержит РНК, а также незначительное количество ДНК в хромосомах. Содержание РНК достигает 5% или менее, чего, однако, достаточно для сообщения ему резко выраженной базофильности.

3. Получена положительная химическая реакция на полисахариды, что подтверждают цитологические наблюдения, произведенные на других объектах. На содержание липидов материал еще не исследовали.

4. В митотическом аппарате сосредоточено 10% всего клеточного белка. Это количество превосходит возможности ядра; отсюда следует, что большее, если не все, количество белков митотического аппарата черпается из протоплазмы. Такой вывод, естественно, не касается внутриядерных веретен, встречающихся у некоторых организмов.

5. В первом приближении можно утверждать, что митотический аппарат состоит в основном из белка одного вида; при электрофорезе было обнаружено два пика: один — главный, другой — значительно меньший и движущийся быстрее. Материал, обладающий большей подвижностью, содержит больше РНК, чем вещество, обуславливающее главный пик, но анализ аминокислот не позволил установить ощутимой разницы между белками обеих составляющих. Возможно, что РНК является только загрязнением. С другой стороны, можно предположить, что большая часть одного и того же белка присутствует в „чистой“ форме, в то время как меньшая его часть связана с РНК. Штих [101] высказал ряд интересных соображений, в которых постулируется наличие этих двух форм.

6. Для справок ниже приведен аминокислотный состав белка митотического аппарата (табл. 1).

7. Изолированный митотический аппарат растворим при условии разрушения связей S—S (например, щелочным тиогликолатом). Исходя из этого; проще всего предположить,

Таблица 1

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКА ИЗОЛИ-
РОВАННОГО МИТОТИЧЕСКОГО АППАРАТА
МОРСКОГО ЕЖА
Strongylocentrotus purpuratus

Аминокислоты	Относительное число остатков
Цистин	1,0
Тирозин	1,2
Гистидин	3,2
Фенилаланин	6,0
Лизин	9,9
Пролин	8,7
Аргинин	9,9
Треонин	10,0
Аланин	12,0
Валин	12,0
Серин	15,8
Глицин	12,0
Аспарагиновая кислота	20,1
Глутаминовая кислота	23,1
Лейцин	24,9

что его волокна состоят из белка одного типа. Данных о химическом различии между лучами звезд, непрерывными нитями веретена и хромосомными нитями нет. Имеются лишь указания на то, что белковая мицелла относительно невелика и что нити образуются в результате полимеризации этих мицелл, складывающихся в длинные цепи, причем механизм этой полимеризации включает в себя возникновение межмолекулярных связей S—S.

В общем наши знания относительно химического строения митотического аппарата крайне неудовлетворительны; наименее изучены митотические центры и кинетохоры. Тем не менее можно думать, что в основном эти структуры образуются в результате полимеризации и ориентировки белковых частиц. Возможно, что в этих процессах существенную роль играют также РНК, полисахариды и липиды, но этот вопрос еще совершенно не изучен.

Образование митотического аппарата

Из всех микроскопических структур, образуемых клеткой, митотический аппарат представляет собой наиболее сложный „механизм“, хотя и является временным образованием. Он чрезвычайно резко поляризован и сам, в свою очередь, поляризует клеточное деление. От совершенства выполнения им механических функций зависит весь процесс сохранения вида; этот механизм должен работать безупречно. Его симметричность особенно ясно выражена при возникновении звезд. Образование митотического аппарата выявляет лежащие в его основе геометрические законы, изложенные на стр. 166. Каков же процесс его образования и, что не менее важно, исчезновения по окончании деления, в результате чего вновь образовавшиеся клетки получают возможность начать самостоятельное существование? Хотя по этим вопросам не выработано еще общепринятых точек зрения, для пользы дела следует кратко остановиться на выводах, к которым пришел автор [63, 64] в результате изучения изолированного митотического аппарата.

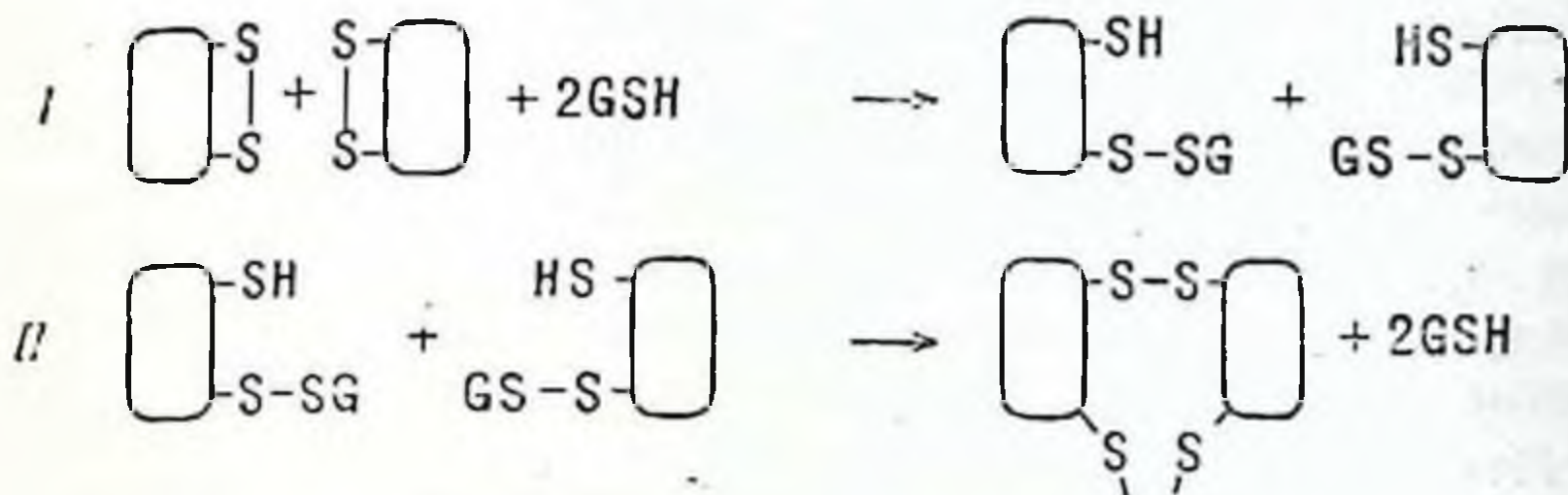
В первую очередь следует охарактеризовать митотический аппарат с физической точки зрения. Сам факт выделения его из клетки говорит о том, что он представляет собой постоянное и непрерывное целое и что составляющие его элементы действительно связаны друг с другом. Это очень простое обстоятельство приобретает особое значение в связи с прежними гипотезами, трактовавшими форму митотического аппарата как результат взаимной ориентации свободных молекул. Подобный взгляд нашел свое крайнее выражение в представлении о веретене как о „тактоиде“. Это представление дискутировалось на страницах научной прессы и должно послужить предостережением физикам, так как подобные спекуляции в области биологии опасны тем, что в них могут поверить сами биологи. В действительности применение данного термина подчеркивает лишь некоторые крайне поверхностные черты сходства (веретенообразная форма и анизотропия) между веретенами митоза и некоторыми макромолекулярными агрегатами. Этих данных настолько мало, что их вряд ли можно использовать при обсуждении

специфических особенностей митотического аппарата (см. [45], стр. 130).

Физическое состояние митотического аппарата можно исследовать при помощи электронного микроскопа. Для получения более высокой контрастности лучше работать с изолированными митотическими аппаратами, а не с целыми клетками. Но, с другой стороны, следует учесть, что, кроме искажений, обусловленных фиксацией, в процессе выделения митотического аппарата появляется вероятность дополнительного искажения формы и утраты некоторых его частей. На фиг. 6 приведена электронномикроскопическая фотография среза митотических фигур, зафиксированных в изолированном состоянии посредством широко применяющегося ныне нейтрального раствора OsO_4 . На снимке виден как бы гель или сеть фибрилл, причем в отдельных участках они расположены более тесно и определенным образом ориентированы, образуя волокна, видимые в обычном микроскопе. Если это действительно так, то при изучении образования митотического аппарата возникнет два рода проблем, связанных, во-первых, с образованием геля в результате полимеризации белков, и, во-вторых — с приобретением частицами геля определенной ориентации. Идею о том, что образование митотического аппарата связано с процессом желатинирования, подробно развивал Гейльбрун [36], пытавшийся установить возможные аналогии этого явления со свертыванием крови. Дан [22, 46] поддерживает гипотезу, согласно которой физические свойства митотического аппарата соответствуют свойствам геля.

Постараемся представить себе, как может протекать процесс желатинирования. Мы уже упоминали данные, согласно которым полимеризация является частично следствием возникновения дисульфидных мостиков между цепочками белковых молекул. Прилагаемая схема изображает модель подобного механизма, в ходе которого внутримолекулярные связи S—S вначале разрываются, а затем преобразуются в межмолекулярные связи S—S (фиг. 11). На схеме G обозначает глутатион, имеющий, по-видимому, наибольшее значение из всех растворимых тиоловых соединений в клетке.

Эта схема подтверждается рядом фактов: 1) Имеются указания на то, что связи S—S действительно служат для скрепления митотического аппарата, который растворяется при их разрушении; 2) подобный механизм желатинирования белков через посредство связей S—S установлен [42] в отношении более простых систем; 3) согласно модели,



Ф и г. 11. Схема желатинирования белков в результате преобразования внутримолекулярных связей S—S в межмолекулярные.

Фаза I предшествует метафазе, соответствуя периоду, когда содержание глутатиона (GSH) падает [88]. Фаза II, протекающая во время метафазы и анафазы, соответствует периоду, когда количество GSH увеличивается. Схема носит гипотетический характер.

в процессе митоза должно происходить сначала окисление, а затем восстановление глутатиона. Подобный цикл выявил в 1931 г. Рапкии [88] при анализе яиц морского ежа, взятых на различных стадиях митоза; 4) данные, полученные в нашей лаборатории, показывают, что серия изменений, претерпеваемых SH-группой белков, отражает, как и следовало ожидать, ход глутатионного цикла.

Вопрос о том, образуется ли белковый „мономер“ в период интеркинеза или во время митоза, еще не получил удовлетворительного освещения. Не был исследован механизм разрушения митотического аппарата по окончании митоза. Неизвестен процесс возникновения геля, при котором гранулы выталкиваются из пространства, ранее ими занимаемого, а не улавливаются гелем, как это происходит с эритроцитами при образовании кровяного сгустка.

Даже при наличии более подробных данных о механизме образования геля необходимо было бы объяснить поляризованное расположение нитей, определяющее его функцию. Из всех вопросов, возникающих в связи с этим, наиболее важен, несомненно, вопрос о прикреплении хромосом

к полюсам веретена. Многие исследователи предполагают, что связывающие нити выделяются либо кинетохорами, либо митотическими центрами. Принимая во внимание химическую однородность веретена, наиболее разумным кажется третье предположение, что ни хромосомы, ни центры, порознь или вместе, не вырабатывают активно вещества нитей, но вместо этого выделяют какую-то субстанцию, агрегирующую вещество на своем пути. Подобное представление совпадает с классическим, по которому лучи звезд образуются в результате уплотнения вещества, предсуществовавшего в цитоплазме (ему было присвоено название „архоплазмы“) [113]. Это же представление связано с более современным термином „структурный фактор“ [102, 103].

Некоторые соображения, основанные на опытах с изолированными митотическими аппаратами, могут разъяснить наш подход к данной проблеме. При изучении растворимости изолированных митотических аппаратов становится ясно, что нарушения связей S—S еще недостаточно; растворение происходит лишь после того, как нарушаются другие связи, названные осторожно „вторичными связями“. Аналогичные явления наблюдаются в отношении таких волокнистых белков, как кератин [50]. Среди веществ, способных вызвать нарушение вторичных связей, можно указать ион OH^- (чем выше pH, тем скорее они нарушаются). При внимательном наблюдении этого явления было обнаружено, что участки веретена, прилегающие к митотическим центрам (и хромосомам), труднее поддаются растворению, чем те его части, которые располагаются на его экваторе и на периферии звезд (см. фиг. 10). На этом основании было постулировано наличие градиента вторичных связей в направлении от центров (и кинетохоров). Такое представление вполне обосновано. Можно предположить, что введение в область геля вещества, вызывающего образование вторичных связей, повлечет за собой местную агрегацию молекулярных цепей в пучки, ориентированные по направлению, в котором происходит диффузия этого вещества. Таким образом, диффузия вещества, вызывающего образование вторичных связей, из митотического центра в образующийся гель приведет к звездообразному расположению нитей около митотического

закрывающихся в образовании волокнистых структур в результате диффузии преципитирующих и связывающих веществ, несомненно, заслуживает более серьезного изучения с точки зрения физики и химии.

Высказанные нами соображения относительно образования митотического аппарата приводят к необходимости экспериментального решения вопроса о существовании механизмов *двух* типов: желатинирования и последующей ориентации частичек геля. Если таких механизмов действительно два, то их можно разъединить. Мы осуществили это разъединение в опытах по блокированию клеточного деления посредством такого хорошо известного антимитотического фактора, как колхицин. По нашим наблюдениям, в заблокированной клетке митотический аппарат хотя и сохраняется, но принимает вид рыхлого аморфного геля, в котором неразличимы какие-либо фибриллярные структуры. В соответствии с изложенными выше соображениями мы считаем, что колхицин подавляет образование вторичных связей (возможно, в результате воздействия на центры и кинетохоры), но не оказывает ощутимого влияния на цикл $SH-S-S$, лежащий в основе процесса желатинирования. Таким образом, мы приходим к весьма интересному и, вероятно, практически важному результату.

*Физические и химические изменения,
связанные с митозом*

Действительное расхождение хромосом происходит после образования митотического аппарата. Следует повторить, что решающие события, кстати наиболее трудно объяснимые, заканчиваются до наступления анафазы. Полюса и экватор уже обозначились; все компоненты расположились таким образом, что механизм, похожий на сокращение хромосомных нитей (см. следующий раздел), неизбежно должен привести к требуемому результату. В некотором смысле анафаза представляет собой как бы разрядку системы, „заведенной“ во время метафазы. Например, можно отсрочить деление, облучая клетки в интеркинезе или профазе [7], но как только закончилась метафаза, всякая чувствительность процесса деления к

облучению исчезает. Этот вопрос более подробно затрагивает в своей работе Карлсон [12].

Рассмотрим известные нам физико-химические изменения в клетке, связанные с митозом и в особенности с анафазой.

Общее физическое состояние цитоплазмы изучали методом определения вязкости. Основные работы в этой области принадлежат Гейльбруну и сотрудникам [36]. Их метод, основанный на наблюдении осаждения гранул при центрифугировании, дает возможность получить количественные результаты, но не позволяет обнаружить каких-либо местных различий. К сожалению, количественных методов для последней цели не существует; качественные различия могут быть установлены посредством зондирования при помощи микроманипулятора [11]. При этом удалось установить, что в период, непосредственно предшествующий образованию метафазного веретена, общая вязкость резко повышается; во время анафазы вязкость понижается. Поскольку методом Гейльбруна можно измерить вязкость лишь цитоплазмы, а вязкость самого митотического аппарата измерить им невозможно, создается впечатление, что предварительное желатинирование охватывает всю клетку, а затем, по мере развития митотического аппарата, остальная часть протоплазмы вновь разжижается. Можно представить себе и другую возможность, напоминающую старую теорию „архоплазмы“, согласно которой вытянутые агрегаты каким-то образом извлекаются из клетки и переходят, как единое целое, в митотический аппарат, понижая по мере своего роста вязкость окружающей цитоплазмы.

В прошлом делались многочисленные попытки измерить дыхательную активность клетки в период деления, но лишь в последнее время удалось добиться значительного повышения чувствительности применяемых при этом методов. Цейтен [117, 118] измерил при помощи декартова поплавка интенсивность дыхания небольшой группы синхронно делящихся яиц морского ежа и других беспозвоночных. Он описывает цикличность дыхания, которая, однако, не связана с явлениями, протекающими во время митоза. В течение всего митоза, когда исчезает ядерная оболочка, наблюдается скорее устойчивое состояние или

даже понижение интенсивности дыхания; при восстановлении ядер в период между делениями интенсивность дыхания повышается. Шоландер, Клафф и Свенсон [94] производили измерения на аналогичных клетках, но с более чувствительным респирометром, при помощи которого можно исследовать дыхание одной клетки. В отдельных случаях цикл был весьма близок к тому, что описал Цейтен; в остальных случаях они вообще не наблюдали колебаний дыхания, связанных с делением.

Эти опыты имеют огромное значение при обсуждении клеточного деления с точки зрения его энергетики. Из них следует, что в процессе митоза клетка, может быть, и не совершает „тяжелой работы“ с точки зрения обмена. Это не означает, что митоз обходится без затраты клеткой известной энергии, но, по-видимому, величина этого расхода незначительна. Невозможность осуществления митоза без участия энергетических механизмов клетки следует из многочисленных опытов по блокированию этого процесса ингибиторами метаболизма. Так, например, недавно Сванн и Митчисон [108] описали опыты по блокированию митоза у морского ежа посредством СО. Барнетт [4] показал, что подавление митоза при помощи СN, динитрофенола, малоната и других веществ может быть частично устранено прибавлением АТФ. Многочисленные более ранние данные о блокаде фосфорилирования при помощи динитрофенола и аналогичных ингибиторов [52] приводят к тем же выводам.

С другой стороны, Бенитес, Мёррэй и Чаргафф [5] сообщают, что прибавление АТФ тормозит деление фибробластов (в тех случаях, когда оно вообще оказывает какое-либо действие).

Другой метаболический процесс, сопровождающий митоз, — глутатионовый цикл — был рассмотрен выше (стр. 176). Он может, видимо, влиять на поведение ферментов, содержащих SH-группы, во время митоза (ср. Баррон [3]), но я считаю более важной ту роль, которую он играет (через посредство механизма желатинирования) в образовании структуры митотического аппарата.

Вопросы энергетики пролиферации клеток обсудил в своей работе Буллоу [10]. Он определил источники энергии для непрерывного размножения животных клеток, но

не дифференцировал при этом рост, приводящий к делению, и собственно процесс деления. Ясно, что технические трудности, связанные с отбором делящихся клеток для соответствующего анализа, весьма велики, поэтому мы вынуждены пока ограничиваться исследованиями лишь яйцеклеток, простейших и других живых систем, которые можно изучать в изолированном состоянии и у которых можно вызвать синхронное деление.

Функционирование клетки во время митоза

Что представляет собой клетка как целое во время митоза? Этот вопрос, возможно, лишь косвенно касается механизма митоза, но важен для понимания жизнедеятельности клетки в целом. Например, генетика может интересоваться активны ли гены в период деления или в промежутке между делениями? Это вполне конкретный вопрос, поскольку лишь во время деления исчезает ядерная оболочка, которая служит барьером, отделяющим хромосомы от остальной массы клетки. Стерн [100] привел ряд фактов, свидетельствующих об активности генов в период интеркинеза. Физиолога будет интересовать другой вопрос — протекает ли тот или иной процесс в период интеркинеза или митоза?

Имеются веские основания полагать, что во время митоза рост прекращается. Прескотт [87] взвешивал амебу до деления, а затем определял вес дочерних особей. Вес последних оказался в точности равным весу материнской клетки. Дочерние особи начинают расти, как только они отделяются друг от друга. Это непосредственно следует также из прямых наблюдений в той мере, в какой размеры могут служить критерием роста. Цейтен [120] проследил прирост дыхательного коэффициента *Tetrahymena* на протяжении нескольких циклов деления и роста, учитывая в основном увеличение содержания дыхательных ферментов. Он обнаружил стойкое увеличение дыхательной активности в период интеркинеза, резкое падение при начале деления и вторичное увеличение лишь в конце периода деления. По-видимому, существуют серьезные основания полагать, что синтезирующая деятельность во время деления клетки приостанавливается, возобновляясь

непосредственно по его окончании. Мэзия и Прескотт [67] нашли, что делящаяся *Amoeba proteus* поглощает всего 50% P^{32} по сравнению с особью, исследованной в период интеркинеза. Поскольку было обнаружено, что удаление ядра из клетки влечет за собой такое же, если не большее, снижение поглощения P^{32} , они сделали вывод, что делящаяся клетка сравнима с клеткой, лишенной ядра. Во время митоза, когда ядерная оболочка отсутствует, а хромосомы уплотнены, ядро не функционирует; в связи с этим можно ожидать понижения интенсивности процессов синтеза и других явлений, связанных с ядром. Независимо от правильности данного объяснения есть все основания полагать, что вообще в период деления клетки ее синтезирующая активность приостанавливается.

Изменение размеров митотического аппарата в анафазе

На основании визуальных наблюдений можно предположить, что митотический аппарат „растет“ во время анафазы и что этот рост имеет большое значение как для расхождения хромосом, так и для деления самого клеточного тела. Одним из наиболее распространенных проявлений „роста“ является удлинение веретена, что приводит к увеличению расстояния между двумя центрами. Можно считать установленными следующие факты: 1) удлинение веретена является частью механизма, осуществляющего расхождение дочерних хромосом; 2) наблюдаемое увеличение расстояния между наборами дочерних хромосом не всегда сопровождается их перемещением к полюсам. В тех случаях, когда удлинение веретена не совпадает по времени с перемещением хромосом по направлению к центрам [9, 89, 90], наблюдается раздвигание двух полуверетен в результате вытягивания „межзональных“ фибрилл („*Stemmkörper*“ Белара [125]). В ряде случаев удлинение веретена и перемещение хромосом по направлению к центрам совпадают по времени; 3) скорость удлинения веретена примерно того же порядка, что и скорость перемещения хромосом (около 0,3 — 3 μ в 1 мин., по сводным данным Риса). Босс [9] находит, что скорость перемещения

хромосом, предшествующего удлинению веретена (в культурах тканей тритона), превышает в 4 раза скорость удлинения; 4) скорость удлинения веретена варьирует. Недавние измерения, произведенные на делящихся яйцах морского ежа, показали, что в анафазе длина между обоими центрами увеличивается за 4 мин. на 20%. Прирост длины сохраняется и у изолированных митотических аппаратов; он отчетливо виден при сравнении метафазы и анафазы на фиг. 2, 3 и 5. У некоторых клеток разница выступает еще яснее; 5) процесс роста веретена создает впечатление растягивания весьма плотного тела. Белар [125] показал, что при осмотическом обезвоживании делящихся клеток удлиняющееся веретено выпячивает их противоположные концы. Яйца морского ежа, как и многие другие клетки, удлиняются при росте веретена [14]. Как показали исследования в поляризационном микроскопе, „межзональное“ вещество, появляющееся между наборами хромосом по мере удлинения веретена (см. фиг. 5), менее ориентировано по сравнению с веществом, находящимся между хромосомами и центрами.

На основании этого краткого перечисления можно утверждать, что теория анафазного движения будет несостоятельна, если она не сможет объяснить также и процесс удлинения самого веретена. Некоторые авторы считали последний процесс наиболее важным фактором расхождения хромосом и полагали, что хромосомы не оттягиваются к полюсам, а расталкиваются. Дан (см. стр. 0196) расценивает активное удлинение ригидного веретена в качестве главного фактора процесса деления клеточного тела.

Вторым процессом, наблюдаемым при росте и относящимся пока лишь к клеткам, обладающим звездами, является разрастание звезд в течение анафазы. Сванн [104] на основании исследования двойного лучепреломления звезд пришел к выводу, что этот рост представляет собой не только распространение исходного вещества звезды, но действительно связан с приростом нового вещества. При исследовании яиц морского ежа он обнаружил, что диаметр звезд удваивается в течение 5 мин., а их рост параллелен во времени с процессом расхождения хромосом. Этот рост звезд, наблюдавшийся прижизненно,

подтверждается данными, полученными при изучении изолированных митотических аппаратов. Даже на изолированных митотических аппаратах видно, что по мере развития анафазы происходит увеличение размеров звезд (см. фиг. 2, 3 и 5). Если методику выделения митотических аппаратов применить к синхронно делящимся клеткам, то можно получить достаточное количество метафазных и анафазных аппаратов, чтобы прямым химическим анализом установить, сопровождается ли их рост увеличением количества вещества или же удлинение нитей в течение какого-то времени происходит без изменения их массы.

При делении клеток некоторых типов, главным образом яиц беспозвоночных, относительно которых мы имеем наиболее полные сведения, „растущие“ лучи звезд в конце концов достигают поверхности; в телофазе звезды фактически заполняют полярные участки клеток. Как мы увидим ниже, некоторые авторы считали луч звезды координирующим фактором, связывающим явления, происходящие в митотическом аппарате и на поверхности клетки в процессе деления клеточного тела.

Определение плоскости деления

Мы будем рассматривать лишь животные клетки, борозда или перетяжка на поверхности которых определяет и плоскость деления. В простейшем случае деление является равнополовинным, а его плоскость соответствует экватору центрально расположенного веретена. Существуют другие, менее типичные случаи, как например одностороннее углубление борозды, а также случаи, когда в норме при делении возникают клетки разной величины. Что касается первого случая, то Дан и Дан [21] подчеркивают, что при возникновении односторонней перетяжки веретено, как правило, оказывается расположенным эксцентрично: перетяжка рассекает веретено со стороны, ближе всего к нему расположенной. При неравномерном делении яиц могут существовать два механизма. В случае центрально расположенного веретена на одной стороне может образоваться избыток протоплазмы в виде наплыва, носящего название „полярной доли“. Если же одна звезда значительно крупнее другой, то возникает смещение

веретена к одной стороне. Но во всех случаях *плоскость деления проходит через плоскость экватора веретена*. Как мы увидим далее, точность этого механизма зависит от звезд; весьма вероятно, что в этом и состоит их главная функция.

Оптические исследования

Некоторые сведения, касающиеся изменений митотического аппарата во время анафазы, были получены цитохимическими методами. Так, например, наблюдения Джекобсона и Уэбба [48] указывают на накопление РНК в „межзональной“ области между расходящимися хромосомами делящихся фибробластов, которое происходит таким образом, что остается как бы „след“, состоящий из РНК. К аналогичному выводу приводит наблюдение живых клеток в ультрафиолетовых лучах [24]. Эта техника могла бы дать много интересного, но возможности ее применения ограничены пока тем, что опасность лучевого повреждения сокращает длительность наблюдений, производимых на одной и той же клетке.

В настоящее время наиболее совершенным прибором для изучения активного митотического аппарата является поляризационный микроскоп [46, 47, 102—104]. (Следует тут же подчеркнуть, что значительные усовершенствования поляризационного микроскопа, произведенные за последнее время, возникли как раз в связи с проблемой клеточного деления [47, 106].) При наблюдениях в поляризованном свете были установлены следующие, наиболее важные для изучения митоза обстоятельства: 1) волокнистые компоненты митотического аппарата выявляются как образования, обладающие двойным лучепреломлением, положительным в направлении их длинной оси; 2) наиболее сильным двойным лучепреломлением обладают хромосомные нити, соединяющие хромосомы с полюсами; 3) двойное лучепреломление „межзонального“ участка между расходящимися хромосомами значительно слабее; 4) двойное лучепреломление хромосомных нитей ослабевает во время анафазы, как и следовало ожидать, поскольку система ориентированных цепочек укорачивается; 5) ослабление двойного лучепреломления хромосомных

нитей во время анафазы не происходит одновременно по всей нити, а перемещается в виде волны, бегущей впереди перемещающихся хромосом; б) в яйцах морского ежа в анафазе наблюдается наряду с ростом звезды усиление ее двойного лучепреломления, но по достижении хромосомами полюсов возникает волна ослабления двойного лучепреломления, движущаяся радиально от полюсов к поверхности клетки. Волны ослабленного двойного лучепреломления расцениваются Сванном как результат действия „структурного фактора“, движущегося через митотический аппарат.

Поскольку при изучении клеточного деления мы имеем дело с проблемой ориентации молекул, поляризационный микроскоп является, по-видимому, наиболее пригодным для этой цели прибором. Однако ценность его ограничена тем, что он дает весьма мало сведений относительно каких-либо иных свойств молекул, кроме характера их ориентации. Истинное значение этих оптических исследований будет понято лишь после того, как удастся получить более подробные сведения о химическом строении веретена. Наблюдения в поляризационном микроскопе привели уже к одному, правда, негативному выводу: ни одна гипотеза, не учитывающая местных различий в митотическом аппарате, не может считаться удовлетворительной. Если химически митотический аппарат представляется относительно гомогенным (что вытекает из исследований изолированных митотических аппаратов), все же следует искать местные ориентирующие или дезориентирующие факторы, для которых термин „структурный фактор“ можно считать достаточно подходящим.

Механизм движения хромосом

Анализ проблемы движения хромосом затруднен избытком цитологических данных по этому вопросу. Почти для каждой упрощенной модели такого механизма найдутся многочисленные „исключения“. Многие нестандартные случаи описаны в монографии Шрадера [95]. Можно допустить существование нескольких механизмов движения хромосом, но, вероятнее всего, мы еще настолько далеки от понимания сущности этих процессов, что вряд

ли можем отличить истинный механизм от предполагаемых. Поэтому ограничимся обсуждением лишь тех основных проблем, которые исследуются в настоящее время различными физическими, химическими, а также визуальными методами.

Прямые наблюдения позволили установить с большой достоверностью, что расхождение хромосом в анафазе складывается из двух моментов: 1) удлинение веретена, выражающееся в увеличении расстояния между центрами и нарастании ширины „межзонального” пространства между наборами хромосом; 2) движение самих хромосом по направлению к центрам. Иначе говоря, расстояние между наборами хромосом увеличивается, в то время как расстояние между каждым набором хромосом и ближайшим к нему центром уменьшается. Как уже было отмечено (стр. 183), оба эти движения могут совпадать или не совпадать по времени.

Скорость наблюдаемого движения. По наблюдениям Риса [90], скорость движения хромосом колеблется от 0,4 до 5 μ в 1 мин. В большинстве случаев, приведенных Миловидовым, длительность анафазы варьировала от 1 до 10 мин., хотя иногда эта стадия либо сокращалась до 20 сек., либо затягивалась до нескольких часов. Известно, что скорость протекания анафазы зависит от температуры, но полученные пока данные весьма неточны; при тщательной постановке опытов по влиянию температуры можно было бы получить более подробные сведения. Важно отметить, что все хромосомы набора движутся, как правило, с *одинаковой скоростью*. При отклонениях от этого правила одна хромосома либо отстает от других, либо опережает их.

Наличие сократительного механизма. Цитологические данные по этому вопросу обсудил Корнман [19]. Собственно говоря, представление о сократительном механизме приложимо только к движению хромосом по направлению к центрам. Не исключено, однако, что видимое укорочение хромосомных нитей и удлинение веретена имеют в основном много общего. Этот вопрос будет рассмотрен ниже; пока же следует ограничиться представлением о притяжении хромосом к центрам.

Существование хромосомных нитей. Этот вопрос уже подвергался обсуждению. Данные, полученные при по-

мощи поляризационного и фазово-контрастного микроскопа, а также наблюдения над изолированными митотическими аппаратами дают основания предположить наличие микроскопических волокон, тянущихся от кинетохоров к митотическим центрам. Предполагают, что в основном они состоят из белков, отличающихся от белков протоплазмы лишь степенью ассоциации и ориентированности. Это, в свою очередь, может обусловить иное содержание связанных с ними небелковых веществ, например РНК.

Степень укорочения. Данные, относящиеся к этому вопросу, собраны в работе Хьюза [45, стр. 128]. В случаях, которые он приводит, длина хромосомных нитей в метафазе уменьшалась в 2—5 раз по сравнению с их длиной в полной анафазе.

Форма перемещающихся хромосом. В разделе, посвященном кинетохору, было отмечено, что обычно форма перемещающейся хромосомы соответствует той форме, которую принимает гибкое тело, погруженное в жидкость и увлекаемое нитью, прикрепленной к этому телу в одной точке. Если хромосома обладает „диффузным кинетохором“ (нити прикреплены по всей длине хромосомы), то ее форма соответствует той, которую можно предсказать на основании представления о „тянущем механизме“. Проблемы подобного движения хромосом рассмотрены в интересной работе Эстергрена [128]. Атипичные случаи (наиболее известным из них является пример *Sciara* [68], у которых некоторые хромосомы, судя по их форме, движутся в „неверном“ направлении) явились главным затруднением для обобщения гипотезы о „сократимых нитях“. По-видимому, самым убедительным доказательством наличия тянущего механизма являются случаи хромосомных перестроек, когда хромосома, снабженная двумя кинетохорами, растягивается и затем разрывается на две при движении ее кинетохоров к противоположным полюсам. Создается впечатление, что хромосомы оттягиваются к полюсам какими-то мощными силами.

Изменения скорости движения во времени. Согласно простой модели сократительного механизма (т. е. укорочения растянутого эластичного тяжа), скорость движения должна быть наибольшей при наибольшей длине тяжа

и затем уменьшаться по мере его сокращения. Работы Хьюза и Сванна [43], а также Риса [89, 90] показывают, что эта схема довольно правильно отражает движение хромосом.

Изменения двойного лучепреломления. Растянутое волокно должно, вообще говоря, обладать двойным лучепреломлением, ослабляющимся по мере укорочения этого волокна. Это относится к области сокращающегося митотического веретена, где находятся хромосомные нити. Однако, согласно простой модели, ослабление двойного лучепреломления должно быть равномерным. В действительности же, как показали исследования Сванна [104], двойное лучепреломление ослабляется не равномерно, а в виде волны, движущейся к полюсам с той же скоростью, что и хромосомы, но впереди них.

Аналогия с мышцей. В первых же исследованиях, посвященных проблеме движения хромосом, возникло представление об аналогии между сокращением хромосомных нитей и мышечных волокон. Очевидные различия не могут служить достаточным основанием для того, чтобы отказаться от подобного допущения. Опыт показывает, что разнообразие жизненных процессов чаще обусловлено модифицированием уже существующего механизма, чем возникновением новых механизмов. Этот вопрос был вновь затронут в связи с экспериментальными работами последнего времени, касающимися изучения мышц.

Опыты по сократимости клетки. С появлением метода глицеринизации, предложенного Сцент-Дьёрдьи [110, 114], в исследованиях по сократимости мышцы были достигнуты значительные успехи. При длительном экстрагировании мышцы холодным глицерином удаляются растворимые компоненты механизма, обуславливающего сокращение, в то время как сократимые структуры сохраняются. Если после этого добавить АТФ (вместе с другими необходимыми низкомолекулярными факторами), то эта модель мышцы сокращается и оказывается способной поднять груз. Гоффман-Берлинг и Вебер [37, 38, 58] применяли технику глицериновой экстракции к фибробластам и обнаружили, что они активно сокращаются при тех же условиях, что и мышечное волокно. Более того, они описывают случаи, когда обработка глицерином

застигла фибробласт на стадии деления, и последующее сокращение, вызванное АТФ, приводило к расхождению хромосом. Эти опыты позволяют нам провести аналогию между митотическими и мышечными движениями. Однако полученные результаты не дают еще возможности утверждать, что движение хромосом, обнаруженное в этом опыте, было вызвано сокращением хромосомных нитей. Клетка при сокращении меняет свою форму как единое целое, в силу чего расхождение хромосом может явиться следствием сдавливания веретена в области экватора. Возможно также, что АТФ вызывает активное удлинение веретена, что было бы крайне важно для теории митоза, хотя это явление следует отличать от сокращения хромосомных нитей. Нужно надеяться, что в будущем окажется возможным непосредственно измерить расстояние между кинетохорами и митотическими центрами, поскольку данные, полученные на фибробластах, к сожалению, далеко не достаточны.

Сокращение или удлинение? Согласно одной из современных концепций относительно работы мышцы, механизмы сокращения и удлинения по своей природе весьма тесно связаны. Моралес и Боттс [76] обсудили эту идею с теоретической точки зрения. При изучении искусственных волокон актомиозина было найдено, что воздействие АТФ на актомиозин в состоянии нагрузки способно вызвать *либо* сокращение, *либо* удлинение. Как отметил Сцент-Дьёрдьи [110] и затем экспериментально подтвердили Хаяши [35] и Вебер [114], осуществление укорочения или удлинения волокна под влиянием нагрузки зависит от степени развития межмолекулярных связей молекул актомиозина.

Данные, полученные на основании опытов по растворимости, проведенных с изолированными митотическими аппаратами, показывают, что молекулы хромосомных нитей связаны между собой более тесно, чем молекулы остальной части веретена. Поскольку фактором, определяющим сокращение или удлинение, оказывается не химический состав (который может быть одинаковым), а межмолекулярные связи, вполне можно себе представить, что при удлинении остальной части митотического аппарата хромосомные нити будут при тех же условиях сокра-

шаться. Если развивать эту мысль далее, следует спросить, как осуществляется нагрузка системы; однако наиболее важным является вопрос, не лежит ли в основе удлинения веретена и укорочения хромосомных нитей один общий механизм.

Возможные сократительные механизмы. Допустив возможность существования близкой аналогии между хромосомными нитями и мышцей, мы встретимся с двумя основными трудностями: 1) сокращение мышечного волокна не сопровождается изменением его массы; при сокращении оно утолщается. Насколько нам известно, в отношении хромосомных нитей дело обстоит иначе; количество вещества, из которого они состоят, уменьшается, расходуясь при их сокращении. С точки зрения функции клетки это вполне рационально, поскольку хромосомные нити должны сократиться только один раз; 2) молекулярные явления, сопровождающие укорочение хромосомных нитей, локализованы. На основании измерений двойного лучепреломления можно сделать вывод, что сокращение возникает в участке, расположенном непосредственно впереди хромосомы.

Хотя механизм сокращения нам неизвестен, тем не менее мы вполне правомочны обсуждать различные возможности, которые дает теория, опирающаяся на результаты экспериментальных исследований. Если белок хромосомных нитей действительно подобен белку остальной части веретена, отличаясь от последнего лишь характером межмолекулярных связей, уплотнением и наличием определенной ориентации, то при утрате ориентации он уже не будет „принадлежать“ хромосомным нитям, а войдет в состав вещества, находящегося между ними. По мнению Сванна [102, 104], обнаруженные им факты говорят о том, что хромосома выделяет на своем пути какое-то вещество, вызывающее дезориентацию белка хромосомной нити. Можно представить себе различные механизмы сокращения этой нити: а) укорочение отдельных длинных молекул, сочлененных друг с другом; б) перегруппировка длинных молекул, в результате которой они не сочленяются концами, а расположены рядом; в) статистическая дезагрегация, при которой некоторые молекулы утрачиваются, а остающиеся объе-

диняются в новые группировки меньших размеров. Механизм (в) может расцениваться либо как специальный случай механизма (а) или (б), либо как комбинация того и другого.

Рассматривая этот механизм чисто описательно, мы видим, что некоторые элементы в силу сжатия или диссоциации теряют способность взаимодействовать с остальными и присоединяться к менее ориентированным (или менее ассоциированным) элементам фона. При этом важно подчеркнуть перемещение молекул, „принадлежающих“ хромосомной нити, в окружающую цитоплазму (фон). На основании сказанного выше можно заключить, что в то время как хромосомные нити могут расходиться в процессе их сокращения, веретено как целое, построенное из тех же белков, способно расти.

Вопрос состоит в том, как представить себе частичную диссоциацию вещества хромосомной нити при одновременной перегруппировке одной ее части и потере другой. Почему вся нить не распадается целиком, а тянет хромосому по направлению к митотическому центру? Если бы утрата ориентированности возникала вдоль всей нити, то так бы и случилось. Но если это происходит в пределах крайне ограниченного участка, расположенного вблизи кинетохора и подверженного влиянию последнего (что следует из наблюдений Сванна), то существование такого механизма представляется вполне реальным.

Другие механизмы. Как уже было сказано, многие авторы допускали существование механизмов, основанных на действии электрических и магнитных сил. Однако все данные, полученные до сих пор на основании изучения делящихся клеток, опровергают существование подобных механизмов. Недавно [83] было получено подтверждение отрицательного заряда хроматина ядра; это дало основание без непосредственных тому доказательств постулировать существование механизма движения, обусловленного „электрофорезом“. В работах Шрадера [95] и Миловидова [69, 70] можно найти литературу, посвященную этому вопросу.

Некоторые авторы, в том числе Дюрьи и Догерти [27], считают, что механизм движения хромосом основан на

процессах гидратации и дегидратации. По их представлениям, веретено состоит как бы из двух частей: внутренней гелеобразной сердцевины, имеющей форму веретена, и конусовидных шапочек, имеющих также консистенцию геля и посаженных на концы веретенообразной сердцевины. Хромосомы прикреплены к основаниям конусовидных шапочек, располагаясь по окружности, охватывающей центральную часть. Предполагают, что во время анафазы сердцевина неравномерно набухает в направлении, перпендикулярном к диаметру (анизодиаметрически), что приводит к ее удлинению. Одновременно шапочки сжимаются, растягивая кольцо хромосом в направлении каждого из полюсов. Эта гипотеза достаточно объясняет тот факт, что за немногими исключениями все хромосомы движутся обычно с одинаковой скоростью, хотя размеры их могут быть и различными. Согласно этой гипотезе, хромосомы в метафазе должны располагаться по периферии веретена. Подобная конфигурация наблюдается довольно часто, но никоим образом не является универсальной. Например, в яйцах морского ежа, служивших излюбленным объектом многочисленных исследований, хромосомы в метафазе располагаются в плоскости экватора, а в анафазе занимают при своем движении все пространство, занятое веретеном.

Большая часть настоящего раздела посвящена гипотезе сократимых нитей не только в силу того, что эту гипотезу можно считать доказанной, но также потому, что в свете существующих экспериментальных данных она представляется наиболее перспективной.

Цитокинез (деление клеточного тела)

Процессы, совершающиеся в митотическом аппарате, согласованы во времени с делением самой клетки; оно осуществляется после того, как хромосомы уже начали перемещаться к полюсам. Оба этих процесса могут быть отделены друг от друга; расхождение хромосом, не сопровождающееся делением клетки, достаточно широко распространено в природе, а также может быть вызвано искусственно. В то время как процесс митоза у самых

разнообразных форм протекает весьма сходно, обнаружить какие-либо общие закономерности в различных формах цитокинеза растительных и животных клеток в настоящее время не представляется возможным. Не удастся обнаружить общий фактор, определяющий образование новой клеточной оболочки в области экватора делящейся растительной клетки и возникновение четкой борозды перетяжки у яйца морского ежа. Нет также никаких оснований считать, что последний процесс по существу подобен тому, что мы наблюдаем на амебоидной клетке или фибробласте, у которых дочерние клетки стремятся разойтись и разрывают тяж, возникающий между ними. Поэтому в настоящее время мы еще не можем нарисовать общей картины цитокинеза и должны ограничиться лишь описанием экспериментальных данных, полученных в результате некоторых успешных опытов. Это не означает, конечно, что по мере накопления новых данных нельзя будет обнаружить общих закономерностей.

Наиболее подробно изучено образование борозды дробления у яйцеклеток беспозвоночных. Она возникает в виде постепенно углубляющегося впячивания или ямочки в области экватора. Исследования этого процесса с физической точки зрения проводились в трех направлениях.

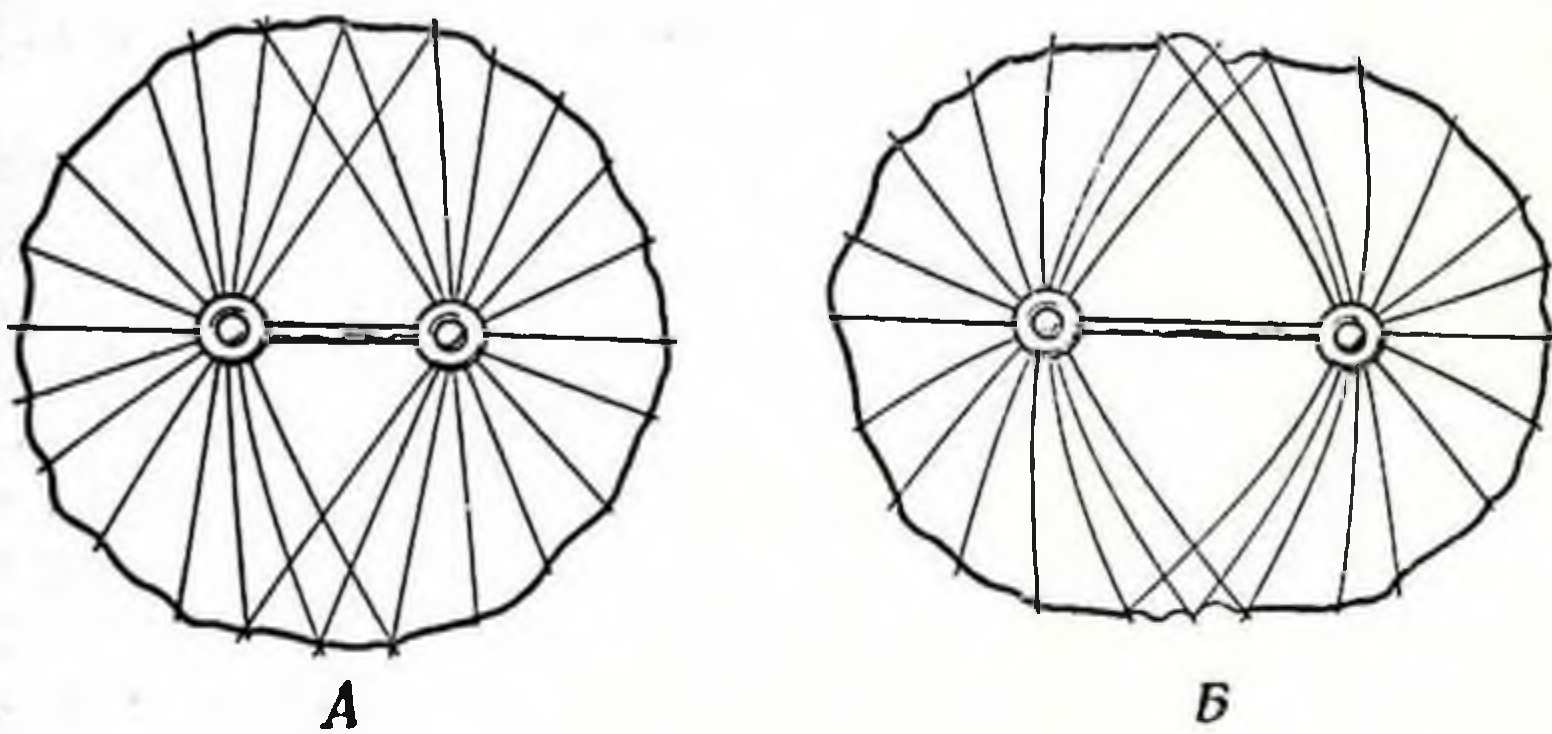
Некоторые авторы (особенно следует отметить работу Марсланда [61]) применили гидростатическое давление. Оказалось, что гидростатическое давление 100—1000 атм препятствует образованию борозды дробления и даже направляет этот процесс в обратную сторону, если она уже образовалась к тому моменту, как было приложено давление. Форма кривой, отражающей количественную зависимость между давлением и вызываемым им эффектом, чрезвычайно похожа на форму кривых, соответствующих другим случаям подавления цитокинеза. Это можно толковать как действие на „эндотермический гель“, образующийся при развертывании молекулярной цепочки. Наблюдавшееся в опыте соотношение между температурой и давлением совпало с ожидаемым: с увеличением температуры требуется более высокое давление для получения той же степени угнетения цитокинеза. Влияние давления на „вязкость“ кортикального слоя яйца определяли

путем измерения центробежной силы, необходимой для перемещения гранул, находящихся вблизи поверхности. На основании этих наблюдений Марсланд приходит к выводу, что гель, реагирующий на давление, располагается в кортикальном слое и что сжатие этого слоя, связанное с его гелеобразным состоянием, вызывает перетяжку яйца. Марсланд представляет себе кортикальный слой в виде дифференцированного слоя, в котором по экватору клетки располагается „контрактильное кольцо“, сокращение которого приводит к разделению клетки надвое¹. Согласно этой концепции, митотический аппарат не играет никакой роли в цитокинезе.

В модели, разработанной Даном [20—22], решающая роль в делении яиц и других клеток, обладающих звездами, приписывается веретену и звездам. Его теория основана на серии остроумных измерений ряда сокращений и расширений поверхности клетки во время деления. Применяя весьма несложную технику, он точно измерял расстояние между двумя частицами каолина, приставшими к различным участкам поверхности клетки. В основном эти опыты позволили установить, что удлинение клетки во время анафазы сопровождается ее *сжатием* в области экватора; при наблюдении двух частиц, расположенных на противоположных точках экватора, было видно, что эти частицы сближались, а в области полюсов происходило соответственное растяжение. Дан считает, что веретено и звезды состоят из ригидного геля. Лучи звезд к моменту полного развития митотического аппарата прикрепляются к поверхности клетки и пересекаются в области экватора. Движущей силой является удлинение веретена, раздвигающее центры, что в свою очередь вызывает сближение пересекающихся в области экватора концов лучей звезд. На фиг.12 схематически изображена эта модель; видно удлинение веретена и клетки, дорастание лучей звезд до поверхности, пересечение лучей звезд в области экватора и возникновение более низкого натяжения на экваторе. Все эти факты наблюдаются при нормальном

¹ Ландау и другие [126] недавно показали, что добавление в среду АТФ повышает то, что они называют „силой перетяжки“ делящихся яиц морского ежа, понижая степень угнетения цитокинеза под действием давления.

делении некоторых клеток. Эта модель позволяет объяснить сжатие оболочки в области экватора и может лечь в основу действия механизма, обуславливающего возникновение борозды и ее локализацию. Характер данного механизма на первых стадиях образования борозды определяли непосредственными наблюдениями; удлинение веретена, гелеобразное состояние митотического аппарата, пересечение лучей звезд и их прикрепление к поверхности представляют собой факты, которые можно подтвердить на изолированном



Ф и г. 12. Модель Дана, изображающая влияние удлинения веретена на образование борозды деления [21].

А — шарообразная клетка (перед удлинением веретена); Б — удлинённая клетка (после образования борозды).

митотическом аппарате. Хотя еще не вполне ясно, что происходит после образования борозды, данная модель все же наиболее удовлетворительно объясняет, каким образом митотический аппарат может определять плоскость деления.

Теория, которую несколько позже разработали Митчисон и Сванн [71, 72, 75], сходна с теорией Дана в том, что в ней митотический аппарат также рассматривается как регулятор цитокинеза, причем большое значение придается звездам. Эти авторы обнаружили, что после перемещения хромосом к полюсам вдоль лучей звезд от центров к поверхности и затем от поверхности к экватору проходит волна ослабления двойного лучепреломления. Они трактуют это явление как результат движения „структурного

фактора" — вещества, вызывающего по ходу своего движения изменение ориентации молекул. Согласно их представлениям, „структурный фактор“, перемещаясь вдоль поверхности клетки к экватору, вызывает развертывание молекул, сопровождающееся соответственным расширением поверхности. Измененная таким образом клеточная оболочка втягивается по экватору, в результате чего появляется перетяжка между дочерними клетками. Для проверки этой теории Митчисон и Сванн [75] разработали прибор, который, по-видимому, скажется чрезвычайно полезным в биофизических исследованиях клетки. Основную его часть составляет миниатюрная искусственная присоска, действие которой регулируется при помощи микроманипулятора. Прибор снабжен манометром, позволяющим измерять величину отрицательного давления, необходимого для того, чтобы расширить поверхность клетки в данном участке. Результаты, полученные этими авторами, свидетельствуют о том, что в период деления поверхность клетки не находится в натяжении, как следовало бы ожидать при наличии сократительного механизма. Очевидно, это наблюдение подтверждает существование активно расширяющейся поверхности. Митчисон [72] приводит несколько остроумных опытов с микроманипулятором, в которых делящаяся клетка была насажена на микроиглы; эти опыты также подтвердили теорию „расширяющейся оболочки“.

Сванн и Митчисон [107] нашли, что при частичном разрушении звезд колхицином деление полностью не прекращается, но возникают неправильности в расположении борозды. Поэтому весьма вероятно, что предположение Дана о сопряженности положения лучей звезд с расположением плоскости деления в основном справедливо, независимо от того, каков механизм, управляющий завершением образования перетяжки. Для последнего этапа существенное значение приобретает теория „расширяющейся оболочки“.

Ясно, что в области изучения одного из типов клеточного деления достигнуты значительные успехи. Опыты, обсуждавшиеся в настоящем разделе, заслуживают особого внимания в качестве прекрасных примеров плодотворных биофизических исследований живых клеток.

Обсуждение действия различных антимитотических факторов

Ввиду большого практического значения проблемы подавления митоза число посвященных ей работ весьма велико. Не имея возможности привести все литературные данные, мы ограничимся лишь ссылками на основные работы [28, 44, 45, 56]. Мне, однако, кажется, что вопрос утратил ясность в результате неопределенности понятия „антимитотического вещества“ и что необходимо пересмотреть всю проблему в целом. Обычно на популяцию клеток воздействуют каким-либо физическим или химическим фактором и спустя некоторое время подсчитывают число митозов. Если их количество ниже, чем в контроле, то делают вывод об антимитотическом характере действия данного вещества. Все же полученные к настоящему времени данные по клеточному делению и действию антимитотических факторов свидетельствуют о том, что различные причины, вызывающие понижение числа митозов, могут быть совершенно не связаны друг с другом. Рассмотрим некоторые из них.

Подавление роста в период интеркинеза. Ранее было показано, что процесс деления может осуществляться лишь после того, как клетка достигнет определенной стадии роста. Если этому воспрепятствовать, то деления не наступит. Чтобы искусственно предотвратить митоз путем воздействия на рост клетки, можно применить антиметаболиты, препятствующие синтезу белков. С более общей точки зрения этот вопрос изучал Буллоу [10], показавший на ряде примеров, что количество энергии, расходуемой на процесс роста (но не на митоз), определяет время, скорость и локализацию размножения клеток в организмах высших животных.

Подавление синтеза ДНК в период интеркинеза. Даже при условии полного завершения процесса роста клетки она не разделится, пока не произойдет удвоения хромосом. Веские данные, полученные рядом авторов [40, 109, 113], свидетельствуют о том, что удвоение происходит в период интеркинеза. Примером подавления митоза путем воздействия на синтез ДНК может служить влияние слабого ионизирующего излучения [41, 82].

Подавление образования митотического аппарата или разрушение уже образовавшегося митотического аппарата. При этих условиях деления клетки, конечно, не наступает. Весьма вероятно, что многие химические антимитотические факторы (колхицин, уретаны, подофиллин и др.) действуют именно таким образом.

Фрагментация хромосом. Нормальный ход митоза зависит от присутствия на хромосомах кинетохоров, причем, как правило, на каждой хромосоме должен быть один кинетохор. Утрата кинетохора в результате транслокации или непосредственного облучения лишает хромосому способности перемещаться к полюсу. Если в результате транслокаций возникают хромосомы, снабженные двумя кинетохорами, они образуют „перемычки“, и их вещество распределяется между дочерними клетками неравномерно. Все эти аномалии приводят к образованию дочерних клеток, содержащих дефектные хромосомные наборы, в результате чего такие клетки утрачивают способность расти и вновь делиться. Антимитотическое воздействие подобного рода оказывает ионизирующее излучение и такие химические вещества, как азотные аналоги иприта, действие которых сходно с действием ионизирующего излучения.

В дополнение к этим известным видам подавления митоза существуют также и другие, которые следует иметь в виду при разработке различных методов подавления митозов. В качестве примера можно привести случай аномальных митотических центров. В популяциях раковых клеток возникают подчас многополюсные веретена. Это явление, несомненно, благоприятно, поскольку в многополюсной фигуре хромосомы, по всей вероятности, не могут правильно разойтись, что делает весьма мало вероятным возникновение многих поколений потомков такой клетки. Накопление знаний о функции митотических центров позволит, вероятно, проникнуть в самую суть процесса митоза. В качестве другого примера можно привести подавление движения хромосом, что, очевидно, блокирует митоза. Это соображение послужило основой гипотезы Леттре [56, 57], состоящей в том, что колхицин блокирует митоз, препятствуя расходованию АТФ при движении хромосом.

Гипотеза Леттре основана на антагонизме между колхицином и АТФ. Бенитес, Мёррей и Чаргафф [5] провели аналогичные опыты, результаты которых заставляют подвергнуть сомнению справедливость этой гипотезы.

Нельзя обсуждать вопрос о подавлении митоза с достаточной ясностью, не разделяя строго влияние различных факторов на весьма разнородные механизмы, участвующие в цикле самовоспроизведения клетки. Дело еще более осложняется тем, что один и тот же фактор может обладать множественным действием, хотя всегда имеется возможность разобраться в каждом из этих действий путем постановки соответствующих экспериментов. Например, излучение может подавлять митозы в популяции клеток, либо вызывая фрагментацию хромосом, либо препятствуя образованию ДНК. Последний процесс приводит к более длинному периоду интеркинеза (что можно выявить соответствующим анализом), тогда как первый обнаруживается чисто цитологически. Многочисленные нарушения метаболизма были обнаружены в результате действия таких веществ, как уретан и колхицин, причем каждый исследователь приписывал обнаруженному им явлению решающую роль в процессе нарушения митоза. Но чтобы изучить один из специфических видов антимитотического воздействия, например подавление функции веретена, необходимо убедиться в том, что мы имеем дело именно с этим явлением. Например, уретан, согласно Корнману [19], активно стимулирует некоторые этапы цикла деления, хотя на другие этапы того же цикла он действует угнетающе. Равным образом недавнее исследование Бенитеса, Мёррея и Чаргаффа [5] показало, что если и существует взаимодействие между АТФ и колхицином, то оно скорее влияет не на митотический процесс как таковой, а на продолжительность интеркинеза.

Конечно, процессы митоза и подавления митоза весьма сложны, но из этого не следует, что степень сложности пропорциональна разнообразию установленных антимитотических факторов. Можно провести параллель с раздражением нерва, в котором импульс может быть вызван действием тока, облучением, механическим ударом, химическими веществами и т. п., что расценивается как проявление простоты, а не сложности реакции. Та же простота может

быть привнесена в нашу трактовку механизма подавления митоза, если мы, вместо того чтобы преждевременно анализировать отдельные свойства тех или иных факторов, уделим больше внимания точке приложения их действия в митотическом аппарате. Допустим, например, что подтвердится наше предположение [63] о способности колхицина и аналогичных веществ стимулировать выработку митотическими центрами и кинетохорами факторов, вызывающих образование молекулярных связей. Из этого следовало бы, что аналогичное действие различными прямыми и косвенными путями могли бы оказать и многие другие факторы; но вопрос о природе действия антимитотических факторов может быть решен лишь в связи с изучением самих центров и кинетохоров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alfert M., Intern. Rev. Cytol., 3, 131 (1954).
2. Amano S., Acta Schol. Med. Univ. Kyoto, Japan, 32, 5 (1954).
3. Barron E. S. G., Advances Enzymol., 11, 201 (1951).
4. Barnett R. C., Biol. Bull., 104, 263 (1953).
5. Benitez H. H., Murray M. R., Chargaff F., Ann. N. Y. Acad. Sci., 58, 1288 (1954).
6. Bisset K. A., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 16, 373 (1952).
7. Blum H. F., Price J. P., J. Gen. Physiol., 33, 285 (1950).
8. Bodenstein D., Kondritzer A. A., J. Exptl. Zool., 107, 109 (1948).
9. Boss J., J. Physiol. (London), 119 (proc.), 34 (1953).
10. Bullough W. S., Biol. Revs., 27, 133 (1952).
11. Carlson J. G., Chromosoma, 5, 199 (1952).
12. Carlson J. G., см. Radiation Biology (A. Hollander, ed.), Vol. 1, Part 2, p. 763, McGraw-Hill, New York, 1954.
13. Catcheside D. G., Brit. J. Radiol., Suppl. 1, 66 (1947).
14. Churney L., Biol. Bull., 70, 400 (1936).
15. Churney L., Cytology, Genetics and Evolution, Univ. of Penna Press, Philadelphia, 1941.
16. Cleveland L. R., Trans. Am. Phil. Soc., 39, 1 (1949).
17. Cleveland L. R., Trans. Am. Phil. Soc., 43, 809 (1953).
18. Cornman I., Am. Naturalist, 78, 410 (1944).
19. Cornman I., Intern. Rev. Cytol., 3, 113 (1954).
20. Dan J. C., Physiol. Zool., 41, 191 (1948).
21. Dan K., Dan J. C., Biol. Bull., 93, 163 (1947).
22. Dan K., J. Fac. Sci. Univ., Tokyo Sect. IV, 6, 324 (1943).
23. Davidson J. N., The Biochemistry of the Nucleic Acids, 2nd ed., Wiley, New York, 1953.
24. Davies H. G., Exptl. Cell Research, 3, 453 (1952).
25. DeLamater E. D., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 16, 381 (1952).

26. DeLamater E. D., Intern. Rev. Cytol., 2, 158 (1953).
27. Duryee W. R., Doherty J. K., Ann. N. Y. Acad. Sci., 58, 1210 (1954).
28. Eigsti O. J., Dustin P., Jr., Colchicine, Iowa State College Press, Ames, 1955.
29. Rabinovitz M. P., Plaut W., Exptl. Cell Research (в печати).
30. Fischer A., Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas, Fischer, Jena (1899).
31. Fujii T., Nature, 174, 1108 (1954).
32. Geitler L., Endomitose und Endomitotische Polyploidisierung, Protoplasmatologia, 6c, 1 (1953).
33. Hartmann M., Zool. Jahrb., 45, 973 (1928).
34. Harvey E. N., Living Light, Princeton Univ. Press., Princeton, N. J., 1940.
35. Hayashi T., J. Gen. Physiol., 36, 139 (1952).
36. Heilbrunn L. V., An Outline of General Physiology, 3rd ed., Saunders, Philadelphia, 1953.
37. Hoffmann-Berling H., Weber H. H., Biochim. Biophys. Acta, 10, 629 (1953).
38. Hoffmann-Berling H., Biochim. Biophys. Acta, 15, 226 (1954).
39. Hotchkiss E., Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.), 40, 49 (1954).
40. Howard A., Pelc S. R., Exptl. Cell Research, 2, 178 (1951).
41. Howard A., Pelc S. R., Heredity, 6 (Suppl.), 261 (1953).
42. Huggins C., Tapley D. F., Jensen E. V., Nature, 167, 592 (1951).
43. Hughes A. F., Swann M. M., J. Exptl. Biol., 25, 45 (1948).
44. Hughes A., Symp. Soc. Exptl. Biol., 6, 256 (1952).
45. Hughes A., The Mitotic Cycle, Academic Press, New York, 1952.
46. Inoue S., Dan K., J. Morphol., 89, 423 (1951).
47. Inoue S., Chromosoma, 5, 487 (1953).
48. Jacobson W., Webb M., Exptl. Cell. Research, 3, 163 (1952).
49. James T. W., Ph. D. Thesis, University of California, Berkeley, 1953.
50. Jones C. B., Meecham D. K., Arch. Biochem., 3, 193 (1943).
51. Kelly L. S., Jones H. B., Science, 111, 333 (1950).
52. Krahl M. E., Biol. Bull., 98, 175 (1950).
53. Lark K., Maalze O., см. Recent Developments in Cell Physiology (J. A. Kitching, ed.), Academic Press, New York, 1954.
54. Lewis M., Arch. exptl. Zellforsch. Gewebezücht, 16, 159 (1934).
55. Lewis W. H., Ann. N. Y. Acad. Sci., 51, 1287 (1951).
56. Lettre H., Cancer Research, 12, 844 (1952).
57. Lettre H., Ann. N. Y. Acad. Sci. 58, 1264 (1954).
58. Lettre H., Naturwissenschaften, 41, 306 (1954).
59. Lorch I. J., Quart. J. Microscop. Sci., 93, 475 (1952).
60. Makino S., Nakahara H., Z. Krebsforsch., 59, 298 (1953).
61. Marsland D., Ann. N. Y. Acad. Sci., 51, 1327 (1951).
62. Mazia D., Brewer P. A., Alfert M., Biol. Bull., 104, 57 (1953).
63. Mazia D., Symp. Soc. Exptl. Biol., 9, 335 (1955).
64. Mazia D., В симпозиуме „Glutathione“ (S. P. Colowick, N. O. Kaplan, eds.), p. 209, Academic Press, New York, 1954.
65. Mazia D., Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.), 40, 521 (1954).
66. Mazia D., Dan K., Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.), 38, 286 (1952).
67. Mazia D., Prescott D. M., Science, 120, 120 (1954).
68. Metz C. W., Cytologia, 7, 219 (1936).

- 68/a. Miller C. O., Skoog F., von Saltza M. H., Strong F. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1392 (1955).
69. Milovidov P. F., *Physik und Chemie des Zellkernes*, Vol. 1, Protoplasma-Monographien, Bd. 20, Bornträger, Berlin, 1949.
70. Milovidov P. F., *Physik und Chemie des Zellkernes*, Vol. 2., Protoplasma-Monographien, Bd. 21. Bornträger, Berlin, 1954.
71. Mitchison J. M., *Symp. Soc. Exptl. Biol.*, **6**, 105 (1952).
72. Mitchison J. M., *J. Exptl. Biol.*, **30**, 515 (1953).
73. Mitchison J. M., Swann M. M., *J. Exptl. Biol.*, **29**, 357 (1952).
74. Mitchison J. M., Swann M. M., *Quart. J. Microscop. Sci.*, **94**, 381 (1953).
75. Mitchison J. M., Swann M. M., *J. Exptl. Biol.*, **31**, 461 (1954).
76. Morales M. F., Botts J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **37**, 283 (1952).
77. Oestergren G., *Botaniska Notiser*, p. 467 (1945).
78. Oestergren G., *Botaniska Notiser*, p. 176 (1947).
79. Oestergren G., *Hereditas*, **35**, 525 (1949).
80. Oestergren G., *Hereditas*, **37**, 85 (1951).
81. Oestergren G., Koopmans G. A., Reitelau J., *Botaniska Notiser*, p. 417 (1953).
82. Ord M. G., Stocken L. A., *Physiol. Revs.*, **33**, 356 (1953).
83. Philpot J. St. L., Stanier J. E., *Nature*, **174**, 461 (1954).
84. Pollister A. W., *Biol. Bull.*, **65**, 529 (1933).
85. Pollister A. W., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **25**, 189 (1939).
86. Popoff M., *Arch. Zellforsch.*, **1**, 245 (1908).
87. Prescott D. M., Ph. D. thesis, University of California, 1954; *Exptl. Cell. Research*, **9**, 328 (1955).
88. Rapkine L., *Ann. physiol. physicochim. biol.*, **7**, 382 (1931).
89. Ris H., *Biol. Bull.*, **96**, 90 (1949).
90. Ris H., см. *The Analysis of Development* (B.H. Willier, P. A. Weiss, V. Hamburger, eds.), Saunders, Philadelphia, 1955.
91. Ross K. F., *Quart. J. Microscop. Sci.*, **85**, 425 (1955).
92. Rosza G., Wyckoff R. W. G., *Exptl. Cell. Research*, **2**, 630 (1951).
93. Scherbaum O., Zeuthen E., *Exptl. Cell. Research*, **6**, 221 (1954).
94. Scholander P. F., Claff C. L., Sveinsson S. L., Scholander S. I., *Biol. Bull.*, **102**, 185 (1952).
95. Schrader F., *Mitosis*, 2nd ed., Columbia Univ. Press, New York, 1953.
96. Schrader F., *Biol. Symposia*, **1**, 87 (1940).
97. Schmidt W. J., *Die Doppelbrechung von Karyoplasma, Zytoplasma und Metoplasma*, Protoplasma Monographien, 11, Bornträger, Berlin, 1937.
98. Schultz-Larsen J., *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **32**, 567 (1953).
99. Selby C. C., *Exptl. Cell. Research*, **5**, 368 (1953).
100. Stern C., *Am. Naturalist*, **72**, 350 (1938).
101. Stich H., *Chromosoma*, **6**, 199 (1954).
102. Swann M. M., *Intern. Rev. Cytol.*, **1**, 195 (1952).
103. Swann M. M., *Symp. Soc. Exptl. Biol.*, **6**, 89 (1952).
104. Swann M. M., *J. Exptl. Biol.* **28**, 417 (1951).
105. Swann M. M., см. *Recent Development in Cell Physiology* (J. A. Kitching, ed.), p. 185, Academic Press, New York, 1954.
106. Swann M. M., Mitchison J. M., *J. Exptl. Biol.*, **27**, 226 (1950.)
107. Swann M. M., Mitchison J. M., *J. Exptl. Biol.*, **30**, 506 (1953).

108. Swann M. M., Mitchison J. M., *Quart. J. Microscop. Sci.*, **94**, 369 (1953).
109. Swift H. A., *Intern. Rev. Cytol.*, **2**, 1 (1953).
110. Szent-Györgyi A., *Biochim. Biophys. Acta*, **4**, 38 (1950).
111. Thiele H., *Z. Naturforsch.*, **3b**, 7 (1948).
112. Uretz R. B., Bloom W., Zirkle R. E., *Science*, **120**, 197 (1954).
113. Walker P. M. B., Yates H. B., *Proc. Roy. Soc.*, **B140**, 274 (1952).
114. Weber H. H., *Advanc. Protein Chem.*, **7**, 162 (1952).
115. Wilson E. B., *The Cell in Development and Heredity*, 3rd ed., Macmillan, New York, 1925.
116. Wilson E. B., *Atlas of the Fertilization and Karyokinesis of the Ovum*, Columbia Univ. Press, New York, 1895.
117. Zeuthen E., *Nature*, **159**, 440 (1947).
118. Zeuthen E., *Publ. Stazione Zool. Napoli*, **23**, 47 (1951).
119. Zeuthen E., *Arch. neerl. zool.*, **10**, Suppl. 1, 31 (1953).
120. Zeuthen E., *J. Embryol. Exptl. Morphol.*, **1**, 239 (1953).
121. Zeuthen E., Scherbaum O., см. *Recent Developments in Cell Physiology* (J. A. Kitching, ed.), p. 141, Academic Press, New York, 1954.
122. Zirkle R. E., Bloom W., *Science*, **117**, 487 (1953).
123. Bajer A., Mole-Bajer J., *Acta Soc. Botan. Polon.*, **23**, 69 (1954).
124. Bajer A., *Acta Soc. Botan. Polon.*, **23**, 383 (1954).
125. Belâr K., *Arch. mikroskop. Anat. Entwicklungsmech.*, **118**, 359 (1929).
126. Landau J. V., Marsland D., Zimmerman A. M., *J. Cell. Comp. Physiol.* (1955).
127. Miller C. O., Skoog F., von Saltza M. H., Strong F. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1392 (1955).
128. Oestergren G., *Hereditas*, **35**, 444 (1949).

ПРОБЛЕМА ПЕРЕДАЧИ ИНФОРМАЦИИ ОТ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ К БЕЛКАМ¹

Г. ГАМОВ, А. РИЧ И М. ИКАС

Введение

В этой статье мы обсудим взаимосвязь между „химической информацией“, которая может быть заключена в молекуле нуклеиновой кислоты, и порядком чередования аминокислот, обнаруженным в полипептидах и белках. Мы рассмотрим имеющиеся в настоящее время данные, свидетельствующие о наличии взаимосвязей между нуклеиновыми кислотами и белками, изложим экспериментальные данные относительно порядка чередования аминокислот и, наконец, опишем попытки кодовой интерпретации чередования аминокислот.

Белки и две нуклеиновые кислоты — дезоксирибонуклеиновая (ДНК) и рибонуклеиновая (РНК) — составляют в клетке наиболее важную группу макромолекул, обладающих большой специфичностью. Специфические свойства этих длинных полимерных молекул связаны с тем, что порядок расположения в них определенных мономерных элементов может быть различным. Обычно предполагают, что химическая активность макромолекул в значительной степени определяется характером чередования аминокислот или нуклеотидов.

Если считать доказанным участие нуклеиновых кислот в синтезе белков, то основной проблемой, подлежащей нашему рассмотрению, является перевод „химической информации“, неявно заключенной в структуре молекулы нуклеиновой кислоты, на элементы, определяющие место-

¹ Большинство рассуждений, содержащихся в этой статье, ранее опубликовано не было.

положение различных аминокислот. Нуклеиновые кислоты представляют собой полинуклеотиды, состоящие из 4 элементов; белки же являются полиаминокислотами, содержащими 20 с лишним элементов. Наша задача состоит, таким образом, в переводе с 4-буквенного на 20-буквенный код. Для того чтобы полностью решить эту задачу, следовало бы определить те взаимодействия между аминокислотами и нуклеиновыми кислотами, которые определяют пространственную специфичность. Однако пока мы можем рассмотреть проблему кодирования только в ее более общем аспекте.

Отношение нуклеиновых кислот к синтезу белков

Функции нуклеиновых кислот

Относительно нуклеиновых кислот и их связи с процессом синтеза белков написано очень много [7, 13, 15], причем среди собранных данных имеются доводы и „за“ и „против“ наличия такой связи. Мы не стремимся дать критический обзор этих данных, а ограничимся лишь кратким очерком главных направлений развития современных исследований.

ДНК содержится в ядрах всех клеток. Различные факты указывают на генетическую роль этого вещества. Установлено, что количество ДНК в расчете на одно ядро постоянно в самых различных тканях сложных организмов, за исключением тех, где присутствуют гаплоидные или полиплоидные наборы хромосом [42, 64]. В гаплоидных клетках, например в половых клетках, количество ДНК в расчете на ядро вдвое меньше количества ДНК, содержащегося в ядрах соматических клеток.

Предполагаемая генетическая роль ДНК состоит в том, что, претерпевая удвоение, она передает от клетки к клетке „химическую информацию“, необходимую для размножения клеток.

Это предположение подкрепляется данными, полученными из различных источников. В процессе размножения бактериофага только ДНК этого вируса вводится в бактериальную клетку, белковый же остов вируса остается снаружи [22]. Этого достаточно для воспроизведения

всего вируса, включая и нуклеиновую и белковую части. Было показано, что тот же самый вирус возникает даже в том случае, когда в качестве хозяина используется другая бактериальная клетка [26]; этот факт вновь подчеркивает генетическую роль ДНК вируса.

Другим показателем генетической роли ДНК является ее трансформирующая активность. ДНК, выделенная из бактериальных клеток одного штамма, может быть использована для преобразования бактериальных клеток другого штамма, вызывая у них появление соответствующих наследственных признаков [2]. Так, например, экстракт ДНК из пенициллиноустойчивого штамма может передать постоянную устойчивость к пенициллину штамму, чувствительному к пенициллину. Было найдено более 16 таких преобразующих экстрактов и после тщательной очистки показано, что они представляют собой ДНК [30].

Хотя эти примеры показывают, что ДНК обладает генетической активностью, они не исключают возможной генетической роли белка. Феликс с сотрудниками показали, что протамины в сперме рыбы высоко гетерогенны; они считают, что эти белки действуют как факторы наследственности [20].

Хотя ДНК играет, вероятно, важную генетическую роль, она не является компонентом, присутствие которого необходимо для синтеза белков. Браше и Шантрени [8] показали, что в одноклеточной водоросли *Acetabularia mediterranea* синтез белков может продолжаться и при удалении ядра, а следовательно, в отсутствие ДНК. По наблюдениям Борсука и сотрудников [6], синтез гемоглобина продолжается на ретикулоцитной стадии созревания эритроцитов, когда клетка не содержит ДНК.

Эти данные указывают, что синтез белков в цитоплазме может идти в отсутствие ДНК. Недавно Альфри [1] рядом опытов доказал, что синтез белков имеет место во фракции изолированных ядер щитовидной железы. Добавление дезоксирибонуклеазы к ядрам задерживало синтез белков, в то время как добавление рибонуклеазы не оказывало никакого воздействия. Эти наблюдения позволяют предполагать, что ДНК, возможно, играет определенную роль в синтезе белков в ядре, хотя и не играет этой роли в цитоплазме.

Многие косвенные наблюдения свидетельствуют о связи РНК цитоплазмы с синтезом белков. Исследованиями Касперсона [13, 14] и Браше [7] установлено соотношение между количеством РНК и ходом синтеза белков в различных тканях. Колдуэлл, Макор и Хиншельвуд [12] нашли, что в клетках *Bacterium lactis aerogenes*, находящихся в стадии экспоненциального роста, отношение РНК к клеточному азоту примерно обратно пропорционально среднему времени генерации клеток. Это указывает на наличие взаимосвязи между РНК и белками. Исследования Свенсона [60] показали, что спектр ультрафиолетовых лучей, подавляющих образование адаптивного фермента галактозидомы, сходен со спектром поглощения нуклеиновой кислоты.

Парди [43] также исследовал образование β -галактозидазы и окисляющих глицерин ферментов, используя различные мутантные штаммы *Escherichia coli*, рост которых зависит от поступающих извне пуринов, пиримидинов или фосфата. Когда какой-либо из этих главных предшественников нуклеиновой кислоты удаляли, синтез РНК прекращался, причем одновременно прекращался и синтез индуцированного фермента даже в присутствии индуцирующего агента. Этот эффект не был обусловлен задержкой синтеза аминокислоты или разрушением уже образовавшегося фермента. При действии азотных аналогов иприта, тормозящих синтез ДНК, индукция все же продолжалась. По мнению Парди, синтез белков связан с образованием новой РНК, но, однажды образовавшись, РНК является инертным продуктом обмена.

Связь РНК с синтезом белков подтверждается также при фракционировании клетки. При помощи центрифуги можно отделить частицы цитоплазмы диаметром 50—200 Å, содержащие около 50% РНК. Судя по накоплению меченых аминокислот [31], эти частицы, носящие название микросом, способны к синтезу белков.

Более прямое доказательство участия РНК в синтезе белков было получено при помощи различных бактериальных экстрактов. Гэйл и Фолкес [22] показали, что фрагменты клеток *Staphylococcus aureus* были способны синтезировать белки. Добавление РНК, выделенной из этих бактерий, стимулировало образование специфичных бел-

ковых ферментов, а добавление рибонуклеазы приостанавливало его. Лестер [38] и Бельжанский [3] нашли, что в лизатах *Micrococcus lysodeikticus* накапливаются меченые глицин и аланин, но при добавлении рибонуклеазы этот процесс почти полностью подавляется. Интересно отметить, что при добавлении к бактериальной системе дезоксирибонуклеазы накопление аминокислот становится более интенсивным.

Многими экспериментальными наблюдениями установлена связь между нуклеиновыми кислотами и синтезом белков. Однако надо помнить, что эти наблюдения имеют в основном косвенный характер, и, следовательно, прямое участие нуклеиновой кислоты в синтезе белков остается только заманчивой гипотезой.

Структурные особенности нуклеиновых кислот

Последние работы по структуре нуклеиновых кислот и белков позволяют более детально рассмотреть их взаимодействие.

Белки представляют собой большие молекулы, часто глобулярной формы, состоящие из одной или более полипептидных цепей, свернутых некоторым специальным образом по отношению друг к другу. Расположение аминокислотных остатков, без сомнения, определяет как стабильность такой свернутой конфигурации, так и химическую активность поверхности макромолекулы. В опубликованной недавно работе Паулинга и Кори [44] указывается, что нередко отдельные цепи сами имеют спиральную (винтообразную) конфигурацию, соответствующую их максимальной устойчивости. Если подобную спираль развернуть, то полипептидная цепь вытянется и аминокислотные остатки будут располагаться примерно на расстоянии 3,6 Å друг от друга. Можно представить себе, что синтез белка заключается в укладке аминокислотных остатков в такой растянутой форме на другой молекуле, служащей шаблоном, так, чтобы место каждой аминокислоты было специфично именно для данной аминокислоты. После полимеризации таких аминокислотных остатков вновь образовавшаяся цепь может изогнуться, приняв устойчивую спиральную форму, а впоследствии свернуться в клубок

и перепутаться с другими цепями, образуя шарообразную молекулу. Нуклеиновые кислоты могут участвовать в первой стадии процесса, представляя собой специальную поверхность для конденсации аминокислот.

Как РНК, так и ДНК состоят из нуклеотидов. Сам нуклеотид состоит из трех компонентов: пуринового или пиримидинового основания, сахара (рибозы или дезоксирибозы) и фосфорной кислоты. В ДНК входят четыре основания: гуанин, аденин, тимин и цитозин. РНК содержит те же четыре основания, но тимину, входящему в ее состав, недостает одной метильной группы, и он называется урацилом. Другое различие между нуклеотидами двух нуклеиновых кислот состоит в том, что в молекуле сахара у углерода в положении 2' ДНК не имеет гидроксильной группы, присутствующей в РНК. Связи между основанием, сахаром и фосфатной группой в нуклеотидах, входящих в ДНК и РНК, одинаковы.

Как РНК, так и ДНК являются полимерами нуклеотидов, причем сахар, связанный с фосфатным остатком, образует главную цепь, а основание — боковую. В молекулах того и другого соединения главная межнуклеотидная связь осуществляется через атомы углерода, занимающие положение 3' и 5' в остатках сахаров [9, 10]. Таким образом, совершенно очевидно замечательное сходство между этими двумя молекулами.

Используя методы рентгеноструктурного анализа, Уилкинс и сотрудники [66] показали, что все ДНК имеют одинаковую структуру. Рич и Уотсон [51] установили то же самое для РНК. Согласно модели, предложенной недавно Уотсоном и Криком [65], молекула ДНК построена в виде спирали, образованной двумя нитями; каждая нить представляет собой полимер, состоящий из нуклеотидных остатков. Эти две нити скреплены между собой через основания водородными связями, причем каждое данное основание всегда связано с другим вполне определенным основанием. Так, аденин соединяется с тимином, а гуанин — с цитозином. Эти пары оснований совершенно определены и исключают другие комбинации. Шаг винта в предлагаемой модели ДНК составляет 34 Å, причем в этом интервале располагаются перпендикулярно к оси 10 пар оснований. Образуется, таким образом, стопа осно-

ваний с расстояниями между ними 3,4 Å. Фосфатные группы расположены вне спирали на расстоянии 7,2 Å от нее.

Рич и Уотсон [52] показали, что рентгенограммы РНК и ДНК обладают большим сходством, откуда следует, что РНК также представляет собой спиралевидную молекулу с размерами, подобными размерам ДНК. Однако до сих пор неизвестно, объединены ли основания в этой молекуле в те же пары, что и в молекуле ДНК.

Синшеймер [57] изучал порядок расположения нуклеотидов в этих молекулах. Эксперименты, основанные на неполном гидролизе, показывают присутствие всех возможных нуклеотидных последовательностей; таким образом, взаимное расположение четырех элементов в одной цепи может быть произвольным.

В полипептиде, как было отмечено выше, расстояние между соседними боковыми цепями, образованными аминокислотными остатками, равно 3,6 Å или менее, в зависимости от того, выпрямлена или свернута в спираль полипептидная цепь. Расстояния между нуклеотидными остатками выпрямленной полинуклеотидной цепи равны $\sim 7,2$ Å и также уменьшаются при свертывании цепи в спираль. Таким образом, это промежутки одного порядка величины; отсюда можно заключить, что если нуклеиновая кислота играет роль шаблона для аминокислотной цепи, то каждая аминокислота будет, вероятно, взаимодействовать только с малым числом нуклеотидов. Основываясь на геометрических доводах такого рода, можно постулировать наличие некоторого числа подобных упрощенных взаимодействий между аминокислотами и нуклеотидами и рассмотреть кодовые следствия из их взаиморасположения, возникающего в процессе синтеза полипептидов. В ряде случаев, как показано ниже, некоторые конфигурации могут быть отброшены, поскольку они явно несовместимы с существующими данными о последовательности чередования аминокислот в полипептидных рядах. В других случаях, однако, мы не имеем достаточно оснований, чтобы исключить ту или иную кодовую схему. В конце нашего обзора мы покажем, какие выводы относительно кодовых схем можно сделать на основании различных статистических исследований.

Для окончательного решения проблемы кодирования (если оно существует) нуклеиновыми кислотами последовательности чередования аминокислот необходим детальный расчет, основанный не только на представлениях о конфигурации цепей, но и на имеющихся данных о межмолекулярных силах. Каждое звено цепи должно иметь специфические особенности — определенную форму, энергию водородных связей, распределение зарядов, — позволяющие одной и только одной определенной аминокислоте занять данный участок. К сожалению, мы еще не в состоянии решать эти сложные проблемы и ограничимся более общими соображениями.

Эмпирические данные

Порядок чередования аминокислот¹

Сведения относительно порядка чередования аминокислот крайне важны для решения проблемы кодов „нуклеиновая кислота — белок“. Все полученные к настоящему времени данные о последовательности чередования аминокислот в белках собраны в табл. 1. Большая часть их получена очень недавно, а некоторые даже не были известны к моменту „расшифровки“ (см. ниже). Мы исключили из таблицы ряды, содержащие „аномальные“ аминокислоты, например α -формы. Эти случаи обсудил в своей работе Зангер [54].

Экспериментальная техника, используемая при определении порядка чередования в рядах, относительно нова. В упомянутой работе Зангера [54] обсуждаются разнообразные трудности, встречающиеся в этих исследованиях. Надо иметь в виду, что табл. 1 содержит, возможно, небольшое число ошибок; такие ошибки могут существенно повлиять на результаты расшифровки, методы которой описаны ниже.

¹ В дальнейшем при написании рядов аминокислот используются следующие сокращения: ала — аланин, лей — лейцин и т. д.; глун — глутамин, глу — глутаминовая кислота, аспн — аспарагин, асп — аспарагиновая кислота, серф — фосфосерин. — *Прим. перев.*

Таблица 1

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ЧЕРЕДОВАНИЯ АМИНОКИСЛОТ
В ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЯХ РАЗЛИЧНЫХ БЕЛКОВ¹⁾

Белок	Последовательности аминокислот	Литература
Актин	Гис-илей-фен*	Р. Локер [68]
Адренокор- тикотропин	*Сер-тир-сер-мет-глу-гис- фен-арг-три-гли-лиз-про-вал- гли-лиз-лиз-арг-арг-про- вал-лиз-вал-тир-про-ала (гли, глу, асп) асп-глун- лей-ала-глу-ала-фен-про- лей-глу-фен*	П. Белл [69]
Карбоксипепти- даза	*Аспн-сер сер-тре	Е. Томпсон [70]
Клупеин**	*Про-сер-арг ; сер-ала-арг- арг* ; арг-арг-арг-арг	Е. Вальдшмидт- Лейтц [71] ; К. Феликс, Р. Хи- рохата, К. Дирр [72]
Цитохром с	Лиз-цис-ала-глун-цис-гис- тре-вал-глу-лиз	Г. Туппи, Г. Бодо [73]
Желатина**	Арг-гли-гли ; лиз-про-гли ; ала-ала-гли ; гли-про-ала ; ала-гли-ала ; ала-арг ; ала- асх ; ала-лиз ; асх-арг ; глх-ала ; глх-гли ; гли- ала ; гли-асх ; гли-глх ; про-сер ; про-тре ; сер-арг ; тре-ала ; тре-гли ; вал-глх ; вал-гли ; гли-гли ; гли-про ; лей-ала	В. Шрёдер, Л. Кей, Ж. Ле-Гет, Л. Хон- нен, Ф. Грин [74]
Глобулин	*Ала-лей-вал-асх	Р. Портер [75]
Гемоглобин лошади	*Вал-глун-лей ; *вал-лей	Р. Портер, Ф. Зан- гер [48]
Инсулин	Цепь типа „А“. Тре-сер- илей (свинья)	Ф. Зангер, Г. Туп- пи [76]

Продолж. табл. на сл. стр.

Белок	Последовательности аминокислот	Литература
Инсулин	<p>*Гли-илей-вал-глу-глун-цис-цис-ала-сер-вал-цис-сер-лей-ала-гли-вал (овца)</p> <p>Тир-глун-лей-глу-аспн-тир-цис-аспн* (корова)</p> <p>Цепь типа „В“</p> <p>*Фен-вал-аспн-глун-гис-лей-цис-гли-сер-гис-лей-вал-глу-ала-лей-тир-лей-вал-цис-гли-глу-арг-гли-фен-фен-тир-тре-про-лиз-ала*</p>	<p>Ф. Зангер, Е. Томпсон [77]</p> <p>Е. Харфенист [78]</p>
Лизоцим	<p>*Лиз-вал-фен-гли-арг ; сер-фен-асх ; сер-асп-гли-мет-асх ; тре-асх-вал-глун-ала ; илей-глун-лей-ала-лей ; тре-глун-ала ; асх-глун-ала ; лей-тре-ала ; ала-мет-лиз-цис-арг ; гли-фен-глун-асх-илей ; арг-цис-глун-ала ; тре-про-гли ; арг-гис-лиз ; ала-ала ; ала-лиз ; асх-ала ; асх-арг ; асх-лей ; арг-асх ; арг-лей ; цис-ала ; цис-асп ; цис-лиз ; гли-лей ; гли-лиз ; илей-асх ; илей-арг ; илей-вал ; лей-лей ; фен-асх ; сер-ала ; сер-арг ; сер-лей ; сер-вал ; тре-гли</p>	<p>Р. Аше, У. Лоррия, Ж. Торо, К. Фромажо [79] ; К. Оно [80] ; А. Томпсон [81]</p>
Овальбумин	<p>Асх-серф-глх-илей-ала ; ала-гли-вал-асх-ала-ала ; цис-ала ; цис-вал ; цис-фен ; цис-глх ; цис-гли ; тре-цис ; вал-цис ; фен-цис ; глх-цис ; асх-цис ; сер-цис</p>	<p>М. Флавин, Ц. Анфинзен [82] ; М. Флавин [21] М. Оттессен, А. Волленберг [83]</p>

Белок	Последовательности аминокислот	Литература
Окситоцин коровы	*Цис-тир-илей-глун-аспн-цис-про-лей-гли-NH* ₂	В. Дю-Виньо, Ц. Ресслер, С. Триппетт [84]
Папаин Пепсин	*Илей-про-глх Тре-серф-глх ; *лей-гли-асх-асх	Е. Томпсон [85] М. Флавин [21] ; Дж. Пассман, М. Вильямсон [86]
Рибонуклеаза	*Лиз-глу-тре-ала-ала-ала-лиз ; сер-арг-аспн-лей-тре-лиз-асп-арг	В. Хирс, С. Мор, В. Штейн [87] ; Ц. Анфинзен, Р. Рэдфилд, В. Чот, Дж. Пейдж, В. Керролл [88] ; Р. Рэдфилд [89]
Сальмин**	*Про-арг-арг ; арг-про-вал-арг-арг ; про-илей-арг ; арг-вал-сер-арг ; арг-илей-арг ; арг-ала-сер-арг ; арг-гли-гли-арг ; арг-сер-сер-арг ; вал- гли	Р. Монье, М. Ютис [90]
Сывороточный альбумин	*Асх-ала (человек) ; *асх-тре (корова)	Е. Томпсон [61]
Фиброин шелка**	Гли-сер-про-тир-про ; тир-про-сер-тир ; сер-гли-ала-гли ; ала-гли-ала-гли ; тре-гли ; ала-ала ; гли-вал-гли ; гли-тир ; тир-гли ; фен-гли	Е. Абдергальден, А. Бан [92] ; Л. Кэй, В. Шрёдер [93] ; В. Шрёдер [94]
Тропомиозин	Ала-илей-мет-тре-сер-илей*	Р. Локер [68]

Продолжс. табл. 1

Белок	Последовательности аминокислот	Литература
Трипсиноген**	*Вал-асп-асп-асп-асп-лиз	Е. Дэви, Г. Нейрат [95]; Е. Дэви [96]
Вазопрессин	*Цис-тир-фен-глун-аспн-цис-про-арг-гли-NH* ₂ (корова); *цис-тир-фен-глун-аспн-цис-про-лиз-гли-NH* ₂ (свинья)	Е. Попено, В. Дю-Виньо [46]
Шерсть**	Глх-асх; глх-глх; глх-ала; глх-тир; глх-лей; глх-цис; асх-глх; сер-глх; гли-глх; ала-глх; тир-глх; вал-глх; лей-глх; цис-глх; асх-вал; асх-лей; сер-асх; лей-асх; асх-цис; гли-цис; сер-цис; тре-цис; ала-цис; лей-цис; фен-цис; цис-гли; цис-ала; цис-вал; цис-лей	Р. Консен, А. Гордон, А. Мартин [16]; Р. Консен, А. Гордон [97]

¹⁾ Звездочка означает концевой остаток, присоединенный к азоту, если стоит слева, и к углероду, если стоит справа. Двумя звездочками обозначены структурные белки. Глх и асх означают, что сведения о том, находятся ли остатки в кислотной или амидной форме, отсутствуют.

Данные табл. 1 можно использовать для выяснения вопроса о том, какие последовательности аминокислот запрещены (если вообще подобное запрещение существует). Для этой цели ряды табл. 1 были расчленены на дипептиды. Так, например, ряд ала-лей-вал-сер записан в виде трех дипептидных единиц: ала-лей, лей-вал и вал-сер. Распределение соседей для всех этих дипептидов дано в табл. 2.

Цифры в табл. 2 показывают общее число сочетаний двух данных аминокислот (например, глу-арг встречается дважды и т. д.). Сходные последовательности, встречающиеся, например, в инсулинах, полученных из живот-

ных разных видов, в окситоцине и вазопрессине, считают только один раз, кроме тех дипептидов, которыми эти белки отличаются друг от друга. Каждую из пар глу-глюн и асп-аспи считают за одну аминокислоту, а два случая фосфосерина в табл. 1 рассматривают как серин.

Если на основании этой таблицы подсчитать число различных аминокислот, которые могут (насколько нам известно) следовать за некоторой определенной аминокислотой, то выясняется, что это число максимально для серина: за серином могут следовать 16 различных аминокислот. Это объясняется тем, что серин легче обнаруживается при анализе, поэтому данных о нем больше, чем о других аминокислотах. 10 аминокислот образуют дипептиды сами с собой, а 2 (аргинин и аспарагиновая кислота, см. табл. 1) образуют последовательности, в которых рядом расположены три и более одинаковых аминокислотных остатка.

Важно выяснить, не представляют ли пустые места в табл. 2 запрещенные комбинации. Рассмотрев таблицу, можно обнаружить, что имеется несколько пустых мест там, где должны были бы быть обычные дипептиды. Некоторые пустоты могут возникнуть вследствие неустойчивости связей (например, глу-сер). Но, кроме того, можно предполагать наличие пустых мест в таблице за счет самого способа подбора данных, неизбежно ставящего разные аминокислоты в неравное положение. Данные табл. 2 получены не из одного гомогенного белка, а из нескольких разных белков и дериватов белка; некоторые из них обладают структурой, заранее исключающей определенные комбинации. Так, большая часть аргинина сосредоточена в сальмине и клупеине — белках, не содержащих глутаминовой кислоты. Этим, по-видимому, и объясняется отсутствие дипептида арг-глу. Включение „структурных“ белков типа сальмина, желатины и шелка, содержащих необычное количество некоторых аминокислот, приводит к увеличению числа определенных комбинаций. С другой стороны, количественные данные [16] показывают, что сочетания типа, например, глу-глу, часто встречающиеся в шерсти, представлены в табл. 1 только один раз. Таким образом, мы видим, что табл. 2, в которой объединены такие разнородные данные, может ввести в

заблуждение. Не может быть сомнения, что многие из пустых мест в таблице обязаны своим происхождением несоответственному отбору сведений; так что если запрещенные комбинации и существуют, то число их, по нашему мнению, должно быть не велико. К счастью, благодаря быстрому накоплению данных можно надеяться, что уже в близком будущем появится возможность ответить на этот вопрос. Мы обсудим это со статистической точки зрения в разделе „Графики распределения соседей“.

Надо отметить, что из существования дипептидов типа А-В и В-С не следует с необходимостью, что трипептид А-В-С является допустимой комбинацией. Для осеяния этого вопроса необходимо составить таблицы, в которые вошли бы данные по чередованию соседей. Этот вопрос мы также обсудим более подробно в указанном выше разделе.

Замещения аминокислот

Помимо сведений, которые дает изучение порядка чередования аминокислот, существует и другой источник информации, проливающей свет на механизм синтеза белков. Известно, что свойства гомологичных белков в организмах разных видов различны. Соответствующие данные приведены в табл. 3. Пример инсулина и вазопрессина показывает, что видовые отличия не всегда связаны с изменениями в длине цепи или с полным нарушением порядка чередования аминокислот; более вероятно, что они связаны с одним или несколькими замещениями одного аминокислотного остатка другим.

Возникает, естественно, вопрос, являются ли эти замещения случайными или они подчиняются определенным закономерностям. Из табл. 3 можно выделить следующие известные замещения:

Глицин	←————→	Серин
Аланин	←————→	Треонин (3 случая)
Валин	←————→	Изолейцин (2 случая)
Валин	←————→	Метионин
Лизин	←————→	Аргинин

Таблица 3

ПОРЯДОК ЧЕРЕДОВАНИЯ АМИНОКИСЛОТ В ГОМОЛОГИЧНЫХ БЕЛКАХ

Белок	Порядок чередования аминокислот	Вид организма	Литература
Инсулин	...-тре-сер-илей-...	Свинья	
	...-ала-сер-вал-...	Крупный рогатый скот	
	...ала-гли-вал-...	Овца	
Сывороточный альбумин	Асп-ала-...	Человек	[61]
	Асп-тре-...	Крупный рогатый скот	
Вирусный белок	...-тре } Остатки, присоединенные к углероду	Вирус табачной мозаики	
	...-ала }	Вирус огуречной мозаики	
Протамины*	Гли ₂ сер ₃ ала ₂ про ₆ вал ₁ илей ₁	Радужная форель	[19]
	Гли ₂ сер ₃ ала ₂ про ₆ вал ₃ илей ₀	Таймень	
Гемоглобин	...-вал } Остатки, присоединенные к азоту	Лошадь, осел	[47]
	...-вал }	Овца, рогатый скот, коза	
	...-мет }		
Вазопрессин	...-про-арг-гли	Рогатый скот	[46]
	...-про-лиз-гли	Свинья	

* Приведен лишь состав протаминов, а не порядок чередования в них аминокислот.

Поскольку число известных нам случаев замещения очень мало, кажется удивительным, что два из них встречаются более одного раза; отсюда возникает предположение, что это явление не носит случайного характера. Не обсуждая пока вопроса о том, существует ли какая-либо зако-

номерность в этом процессе и какова возможная природа этой закономерности, полезно выяснить, можно ли получить дополнительные данные о замещениях из сравнения белков, не являющихся, строго говоря, гомологами.

В одном и том же организме существует ряд белков и пептидов, имеющих, несмотря на различия, достаточно много общего как в структуре, так и в присущих им функциях, чтобы можно было предположить существование какого-то родства между ними. Например, порядок чередования аминокислот в окситоцине и вазопрессине крупного рогатого скота таков:

Цис-тир-илей-глун-аспн-цис-про-лей-гли-NH₂;
Цис-тир-фен-глун-аспн-цис-про-арг-гли-NH₂.

Ряды отличаются только двумя аминокислотными остатками. Оба эти гормона вырабатываются в задней доле гипофиза, и не исключена возможность, что в процессе филогенеза они произошли от одного общего предшественника в результате процесса замещения, аналогично дифференциации белков-гомологов в организмах родственных видов. Каким бы ни было правильное объяснение данного частного случая, наличие подобного процесса является практически необходимым, если эволюция ведет к увеличению числа различных типов белков в организмах.

Рассмотрев структуру и распространение гемоглобина, можно, пожалуй, прийти к выводу о действительном существовании такого процесса. Гемоглобин [37] встречается в трех различных формах. Нециркулирующий внутриклеточный гемоглобин (миоглобин) обладает молекулярным весом 17 600 и одной гемогруппой на молекулу. Гемоглобин позвоночных, содержащийся в эритроцитах, имеет четыре гемогруппы и в 4 раза больший молекулярный вес. Гемоглобин, циркулирующий в растворенном виде в сыворотке (как у кольчатых), обладает молекулярным весом порядка нескольких сотен тысяч или более, но анализ на железо показывает тем не менее существование составных единиц с молекулярным весом 17 600. Нециркулирующий гемоглобин чрезвычайно широко¹, рас-

¹ Гемоглобин недавно был найден в дрожжах *Neurospora crassa* и в ряде простейших [32—34].

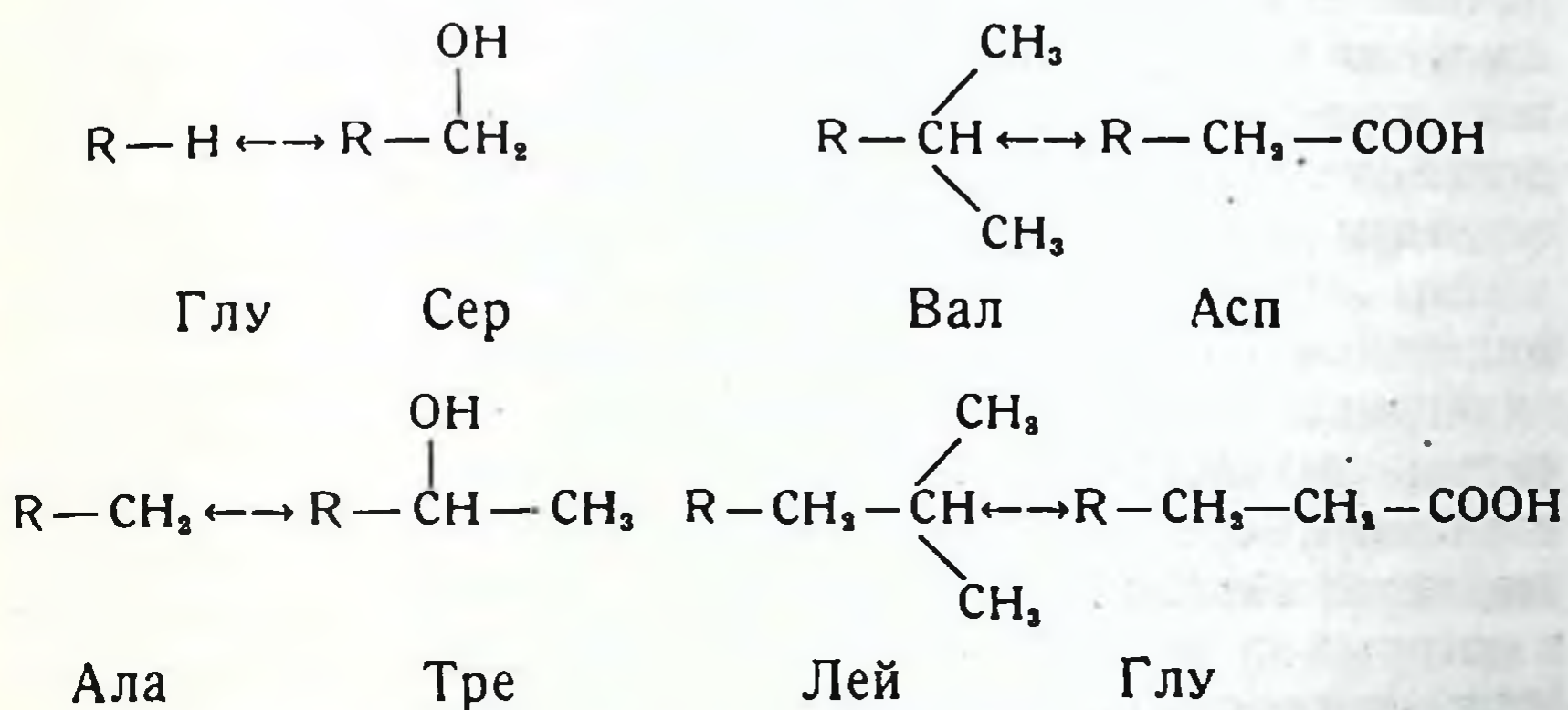
пространен и, сопоставив его распространение с распространением циркулирующих форм, можно прийти к выводу, что филогенетически примитивной формой является молекула миоглобина с молекулярным весом 17 600. Поскольку гемоглобины построены из составных элементов такого молекулярного веса, вполне вероятно, что они возникают в результате процесса полимеризации прото-миоглобина. По своему аминокислотному составу миоглобин отличается от циркулирующего гемоглобина у организмов данного вида [62]. Кроме того, поскольку в составных частях гемоглобина лошади концевые группы, присоединенные к азоту, могут иметь вид как вал-лей, так и вал-глюн-лей, очевидно, существуют по крайней мере два типа таких составных частей, отличающиеся аминокислотным составом [48]. Эти различия могут быть объяснены эволюционным замещением аминокислотных остатков, которые отличают молекулу миоглобина от молекулы гемоглобина и т. д.

Поскольку известно, что некоторые белки состоят из частей, представляющих собой растянутые цепи пептидов, интересно исследовать с этой точки зрения инсулин. Написав рядом последовательность чередования аминокислот в двух инсулиновых цепях, получим:

Гли-илей-	вал -	глю -	глюн-	цис-	цис-	ала-	сер-	вал-	фен-	вал -	аспн-	глюн-	гис -	лей-	цис-	гли-	сер-	гис-	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10										
										-цис-	сер-	лей-	тир-	глюн-	лей-	глю-	аспн-	тир-	цис-
										-лей-	вал-	глю-	ала-	лей -	гир-	лей-	вал -	цис-	гли-
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20										
										-аспн									
										- глю									
										21									

Заметим, что цистеин и серин встречаются в обеих цепях на 7-м и 9-м местах соответственно, а глутаминовая кислота и глутамин — на 4-м. Кроме того, имеется три случая „парных ассоциаций“, встречающихся более одного раза (глю \longleftrightarrow лей на 13-м, 15-м и 17-м местах; аспн \longleftrightarrow вал на 3-м и 18-м и цис \longleftrightarrow лей на 6-м и 11-м). Надо также отметить

одинаково расположенные последовательности лей-тир-лей и глун-лей-глу на 15—17-м местах. На 2-м месте находится пара илей \longleftrightarrow вал, которая дважды встречается как замещение в гомологичных белках. Хотя, взятое в отдельности, ни одно из этих совпадений не может считаться убедительным, но наличие того и другого заставляет предполагать, что в процессе филогенеза эти две инсулиновые цепи имели общего предшественника, от которого они дивергировали в результате замещений. Было бы интересно получить данные по инсулинам позвоночных низших классов и рассмотреть их с этой точки зрения.



Ф и г. 1. Структурные формулы замещающихся пар.

Выше мы обсудили два типа возможных замещений: в гомологичных белках и сходных белках внутри организмов одного вида. Рассматривая их совместно, можно заметить некоторое структурное родство между аминокислотами, способными к взаимному замещению. Так, если изобразить структурные формулы замещающихся пар (фиг. 1), нетрудно видеть, что в обоих случаях соседние члены гомологичных рядов — (глицин, аланин) и (валин, лейцин) замещаются соседними членами других гомологичных рядов — (серин, треонин) и (аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота). Других подобных рядов ожидать нельзя, так как ни одна из прочих аминокислот не является членом гомологичного ряда. Однако замещение вал \longleftrightarrow илей также включает аминокислоты, отличающиеся лишь на одну группу CH_2 в боковой цепи.

Структурная химическая основа этих наблюдаемых в замещениях закономерностей неизвестна. Если принять, что закономерности зависят от каких-то свойств образующего белок шаблона, это будет означать, что шаблон каждой аминокислоты имеет сложную структуру, причем члены взаимозамещающихся пар обладают идентичными шаблонами, за исключением какого-либо одного их элемента¹.

Мы использовали эти идеи при обсуждении кода „старший — младший“, рассмотренного ниже. Необходимо отметить, что каково бы ни было правильное объяснение изложенных выше экспериментальных фактов, полученные сведения о замещениях аминокислот (желательно, конечно, значительное расширение их в будущем) могут служить дополнительным критерием при оценке любой гипотезы о связи нуклеиновых кислот и белков.

Мы знаем, что ряд ферментов и гормонов продолжают функционировать при блокировании или изменении нескольких групп в их боковых цепях. Отсюда следует, что значительная часть молекулы белка не имеет отношения к изучаемой ферментативной функции. Вполне возможно также, что те звенья в цепях различных гомологичных белков, в которых происходит замещение аминокислот, не обладают ферментативной активностью. С другой стороны, замещение, которое, например, воспрепятствует действию инсулина, явится летальной мутацией, и его будет трудно обнаружить.

Кодовые схемы системы нуклеиновая кислота — белок

Введение

Несмотря на большое число косвенных данных, связывающих синтез белков с нуклеиновыми кислотами, в прошлом было проведено очень мало подробных исследо-

¹ На близость ряда свойств шаблонов аминокислот указывает тот факт, что в двух случаях, когда боковые цепи аминокислот содержат оптически активный углеродный атом (треонин и изолейцин), пространственная ориентация групп CH_3 и OH одинакова [50, 58, 63].

ваний „кодовых“ требований, накладываемых на их взаимодействие.

Колдуэлл и Хиншельвуд [17] рассмотрели задачу определения более 20 местоположений аминокислот, исходя из 2 пуриновых, 2 пиримидиновых и 1 фосфорибозного остатков, содержащихся в РНК. Они отметили, что если два из этих элементов определяют местоположение одной аминокислоты, то всего возможно определение 25 мест — числа, достаточного для имеющихся в наличии аминокислот. Эта система, конечно, разрешает все возможные последовательности аминокислот.

Даунс [18] детально разработал метод „синтеза“ белков с использованием нуклеиновой кислоты в качестве шаблона. В этом методе данный аминокислотный остаток определяется как нуклеотидом, к которому он присоединен, так и двумя своими соседями. Автор считает, что это приведет по крайней мере к 40 возможным определенным и специфичным местоположениям, но не рассматривает ограничений, которым в его схеме должны подчиняться ближайшие аминокислотные соседи. Ниже при обсуждении кода „старший — младший“ мы покажем возможные способы анализа подобной схемы и сравнения ее с имеющимися данными по аминокислотным рядам.

Гауровиц [28] постулировал совершенно иную роль нуклеиновых кислот в синтезе белков. Он считает, что длинная цепь полимерной молекулы нуклеиновой кислоты действует лишь в качестве вытянутого стержня, удерживающего полипептидную цепь в растянутом состоянии; цепь служит затем шаблоном для образования идентичной цепи, причем вандерваальсовы силы между одинаковыми аминокислотными остатками удерживают эти остатки в определенной позиции. Такая роль нуклеиновых кислот лишает их всякой химической специфичности.

Однако нам кажется, что специфичность, присущая молекуле нуклеиновой кислоты, может каким-то образом определять специфичность белка, так что каждому размещению оснований в полинуклеотидной цепи соответствует единственно возможное размещение аминокислот в синтезированной полипептидной цепи.

Можно представить себе, что различные аминокислоты или, может быть, соответствующие производные

Этих аминокислот обладают некоторым специфичным средством к определенным звеньям полинуклеотидной цепи и, будучи притянутыми к этим особым точкам на поверхности молекулы нуклеиновой кислоты, удерживаются в этом положении достаточно долго, чтобы между ними успели образоваться пептидные связи. Поскольку расстояния между соседними аминокислотами в полипептидной цепи сравнимы с расстоянием между соседними основаниями в полинуклеотидной цепи, можно, например, принять, что нуклеиновая кислота, служащая шаблоном, и образуемая им белковая молекула обладают равным числом составных единиц. Так, полипептидная цепь инсулина А, состоящая из 21 аминокислоты, может быть образована молекулой нуклеиновой кислоты, состоящей из последовательности примерно равного числа оснований.

Если обозначить 4 различных основания цифрами 1, 2, 3 и 4 и использовать часть латинского алфавита (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, R, S, T, U, V) для обозначения 20 различных аминокислот, можно представить соотношение между структурами шаблона и соответствующего белка в виде длинной строки из букв, написанной под длинным числом, состоящим только из четырех различных цифр. Так, в случае инсулина А это соотношение может быть записано следующим образом:

3	1	1	2	4	3	4	1	1	2	3	1	4	2	2	2	1	3	4	2	1
L	M	A	K	S	I	I	E	K	A	I	K	N	T	S	N	K	F	T	I	F

где буквы второй строки получены из цифр первой с помощью некоторого правила кодирования (системы сигналов). Число всех возможных размещений 4 элементов в последовательности из 21 элемента равно $4^{21} = 4,4 \cdot 10^{12}$, в то время как число всех возможных размещений 20 букв в последовательности той же длины равно $20^{21} = 2,1 \cdot 10^{27}$. Следовательно, для какого-либо определенного кода „расшифровка“, являющаяся результатом кодирования некоторого числа в четырехзначной системе, может дать только одно из $5 \cdot 10^{14}$ произвольных размещений.

Таким образом, если молекула нуклеиновой кислоты действительно служит шаблоном для построения молекулы белка, содержащей столько аминокислотных остатков,

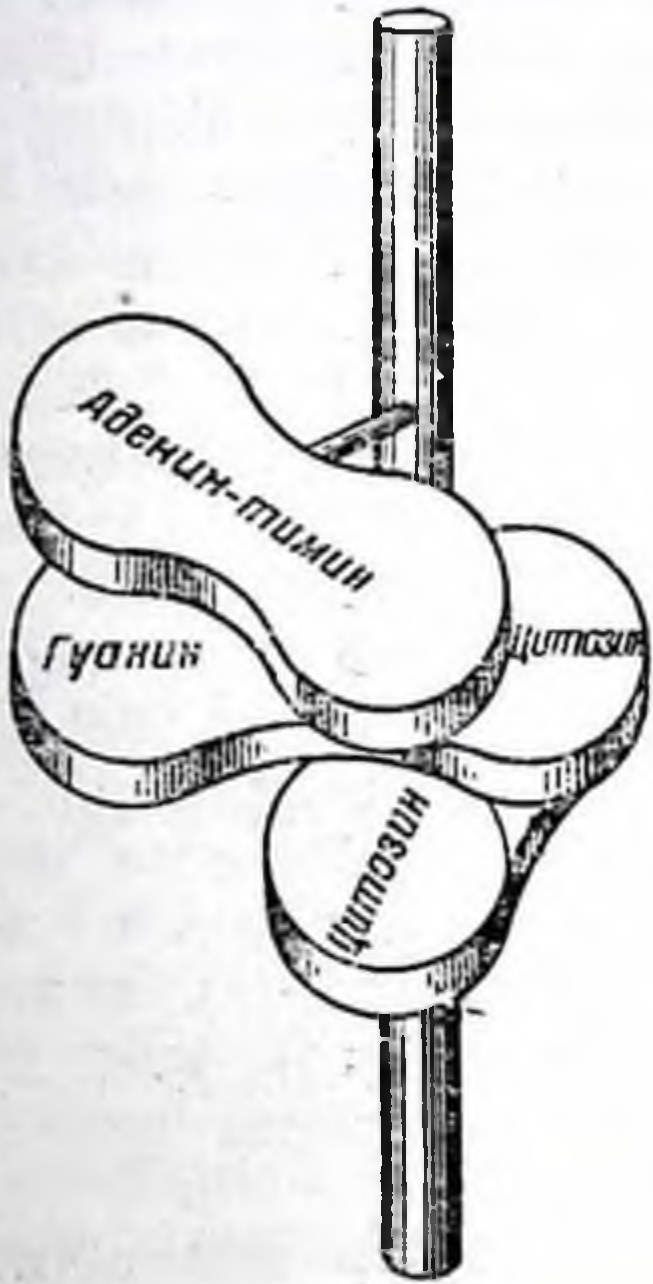
сколько оснований в шаблоне, то порядок аминокислот в известных полипептидных последовательностях должен быть далеко не произвольным и должна существовать строгая корреляция в положениях между соседними аминокислотами. Это похоже на то, что имеет место в любом языке, где разумные фразы вроде „Белки образованы из аминокислот“ или „Прочитай про Алису в стране чудес“, каждая из которых содержит, например, по 28 букв, составляют только ничтожно малую долю всех возможных последовательностей той же длины, составленных из букв алфавита. Как было указано выше, белки и полипептидные фрагменты, в которых порядок чередования аминокислот известен, являются только частью длинных цепей с определенной последовательностью расположения сотен аминокислот. Поэтому мы стоим перед трудностями, похожими на те, которые встречает военная разведка, пытаясь разгадать вражеский шифровальный код на основе единственного послания длиной менее двух строк. Конечно, число известных аминокислотных последовательностей быстро растет, но это вряд ли значительно изменит ситуацию в ближайшем будущем, так как для облегчения расшифровки длина известных рядов должна увеличиться не в 2—3, а в 100—1000 раз.

Было бы, конечно, очень полезно знать какие-либо ряды оснований в полинуклеотидных цепях, особенно в тех, которые связаны с уже исследованными белками, но в настоящее время таких сведений нет. Поэтому единственно возможным способом решения этой проблемы в настоящий момент остается, к сожалению, использование крайне скудного материала, касающегося порядка чередования аминокислот, а также структуры полипептидных и полинуклеотидных цепей и внутренних связей между ними. В дальнейшем мы рассмотрим некоторые попытки, сделанные в этом направлении.

Ромбический код

Первая попытка создания действенного кода на основе модели ДНК, предложенной Уотсоном и Криком, принадлежит Гамову [23, 24]. Как указано выше, из биологических данных следует, что ДНК, вероятно, не участвует

непосредственно в синтезе белков, но действует, возможно, через посредство РНК, точная структура которой до сих пор неизвестна. Однако можно предположить, что молекулы



Ф и г. 2. Схема пространственного расположения оснований, входящих в молекулу ДНК.

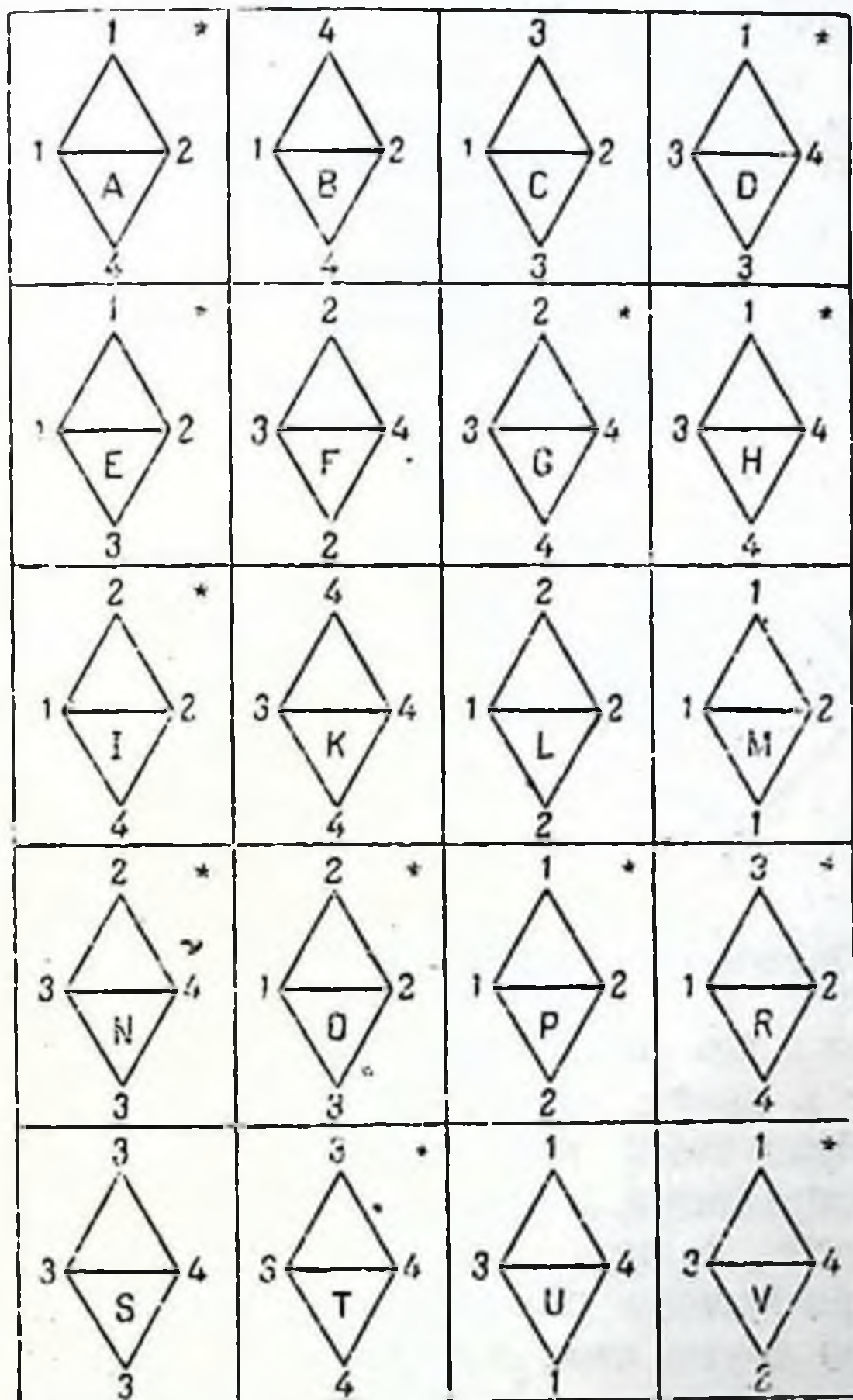
РНК топологически тождественны (в смысле создания определенной последовательности аминокислот) молекулам ДНК, из которых они, по-видимому, происходят. Кроме того, отметим еще раз, что не существует убедительных данных (за исключением случая растительных вирусов), которые доказывали бы невозможность приписать РНК аналогичную ДНК двухнитевую спиральную структуру [52].

Идея Гамова схематически изображена на фиг. 2, где три следующие друг за другом пары оснований представлены тремя похожими на бисквит пластинами. Видно, что комбинация пары оснований, образующих среднюю пластину, и двух выдающихся концов верхней и нижней

пластин образуют ромбовидную фигуру, которая может быть символически записана как $\left(1 \frac{2}{4} 2 \right)$. Поскольку

верхний и нижний концы могут соответствовать любому из четырех оснований, а два средних основания должны быть связаны соотношениями 1—2 и 3—4, то число всех комбинаций различного вида равно числу различных „троек“, которые можно составить из четырех независимых элементов. Используя известную формулу математической комбинаторики, находим, что существует всего 20 различных ромбовидных конфигураций этого сорта, и весьма возможно, что равенство этого числа числу различных

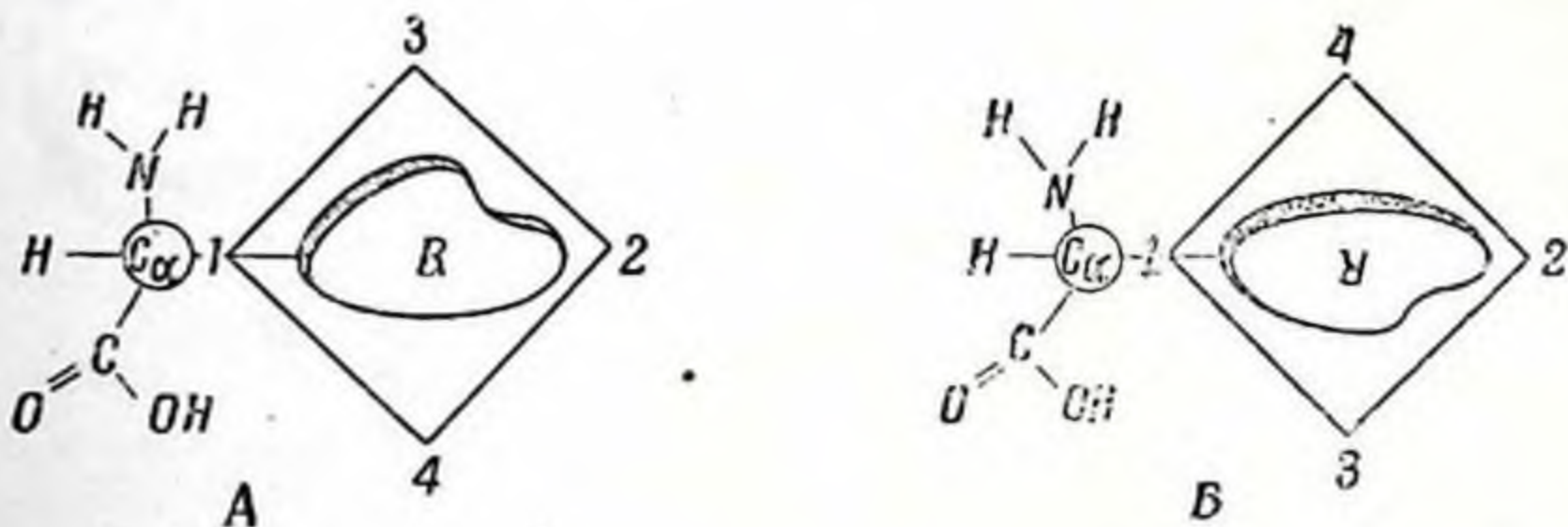
аминокислот не является чистым совпадением¹. На фиг. 3 изображены 20 возможных ромбов, причем 8 ромбов обладают двусторонней симметрией, а остальные 12 (отмеченные



Ф и г. 3. 20 возможных расположений, определяющих места аминокислот по ромбическому коду.

¹ Некоторые необычные аминокислоты (гидроксипролин, гидроксизин, тироксин, фосфосерин [45], тирозин-О-сульфат [4], α-аминоадипиновая кислота [67]) встречаются лишь в ограниченном числе белков. Крик (личное сообщение) предполагает, что они образуются из обычных аминокислот после включения этих обычных кислот в белковые цепи. Структура редких аминокислот соответствует такой интерпретации, подтвержденной экспериментально в случае тироксина [5, 27, 39, 40]. Опыты с мечеными компонентами ука-

звездочкой) несимметричны. Если считать две несимметричные формы, например $\left(3 \frac{1}{4} 4\right)$ и $\left(4 \frac{1}{4} 3\right)$, за две единицы, то число различных ромбов увеличится до 32. Однако, рассмотрев структурные формулы аминокислот, можно видеть, что их боковые цепи обладают двусторонней симметрией¹ (иными словами, боковые цепи не являются оптически активными), так что один и тот же аминокислотный остаток может быть присоединен к любому из двух несимметричных ромбов путем простого поворота вокруг α C-связи на 180° . Это схематически изображено на фиг. 4.



Ф и г. 4. Двусторонняя симметрия боковых цепей аминокислот.

Поскольку два ромба, примыкающие в последовательности друг к другу, имеют общую сторону, между буквами в образуемых ими длинных рядах существует строгая корреляция. Так, хотя имя „Гамов“ может быть (конечно, с помощью предварительной подгонки) записано при помощи ромбического кода, шанс на то, что какое-нибудь другое имя, состоящее из того же числа букв, может быть записано в этом коде, составляет 1 на 3125. (И действительно, никому не удалось до сих пор сделать этого.) Перечень всех возможных ромбических пар дан в табл. 4. Мы видим, что буквы разделяются на 2 группы: 8 букв имеют по 14 различных соседей каждая, остальные 12 имеют только по 7 соседей каждая. Таблица показывает

зывают, что для гидроксипролина [59] и фосфосерина [21] такая интерпретация также, по-видимому, верна. Эти результаты, правда, нельзя считать окончательными.

¹ Исключая треонин, изолейцин и пролин.

также, что буквы В, С, R, F, U, V не могут сдвигаться (т. е. не могут комбинироваться сами с собой), но что остальные 12 могут встречаться парами, а буквы Р и Т могут повторяться последовательно неопределенное число раз.

Таблица 4

СОЧЕТАНИЯ БЛИЖАЙШИХ СОСЕДЕЙ В РОМБИЧЕСКОМ КОДЕ

A, E, I, O

соединяются с

A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, O, P, U, V

D, G, H, N

соединяются с

A, B, C, D, E, G, H, I, K, N, O, R, S, T

L, M, P

соединяются с

A, E, I, O, L, M, P

K, S, T

соединяются с

K, G, H, K, N, S, T

B, C, R,

соединяются с

D, F, G, H, N, U, V

F, U, V

соединяются с

A, B, C, E, I, O, R

Задача расшифровки последовательности чередования аминокислот в белке при помощи ромбического кода состоит в установлении однозначного соответствия между 20 возможными ромбическими формами и 20 различными аминокислотами, что позволит записать эти ряды на

языке ромбической символики в соответствии с комбинаторными правилами табл. 4. Если код правилен, должно существовать только одно возможное решение. Если код не подходит, то попытка расшифровки приведет к противоречию. Число различных вариантов (т. е. способов приписать определенное значение тому или иному расположению кодовых символов) огромно; оно равно 20^1 , т. е. $2,3 \cdot 10^{17}$. При условии, что на проверку каждого варианта уйдет только 1 сек., для отыскания решения потребуется непрерывная работа в течение 6 млрд. лет, что составляет возраст Вселенной! Однако, как часто случается в зашифрованных сообщениях, можно найти некоторые специальные подпоследовательности расположения кодовых символов, которые значительно облегчают решение. Одна такая подпоследовательность, свойственная аминокислотам, может быть найдена в цепи инсулина А и записывается так:

-вал-глу-глу-цис-цис-ала-сер-вал-цис-

Согласно правилам ромбического кода, существуют только 4 пары букв, которые могут располагаться рядом: А-А-Н-Н; L-L-M-M; К-К-Т-Т и Т-Т-S-S. В каждом из этих четырех случаев мы знаем также буквенный символ для четвертой аминокислоты вправо от цис-цис-, т. е. для цистина. Это ограничивает выбор букв для валина, поскольку эта аминокислота должна предшествовать и глутамину и цистину. Применяя этот принцип, можно расшифровать данную последовательность единственным образом, как показано на фиг. 5. Однако, пытаясь продолжить эту расшифровку для остальной части молекулы, мы немедленно сталкиваемся с затруднением, поскольку следующая справа аминокислота есть серин, которому уже была приписана буква С, но, с другой стороны, из табл. 4 следует, что буква С не комбинируется с буквой I, соответствующей цистину. Попытка применить вариант, изображенный на фиг. 5, к цепи инсулина В также приводит нас к противоречиям.

Следует, однако, отметить, что это противоречие обусловлено использованием одной и той же буквы для глутаминовой кислоты и глутамина, хотя на самом деле два соседних „глу“ в цепи инсулина А принадлежат к этим

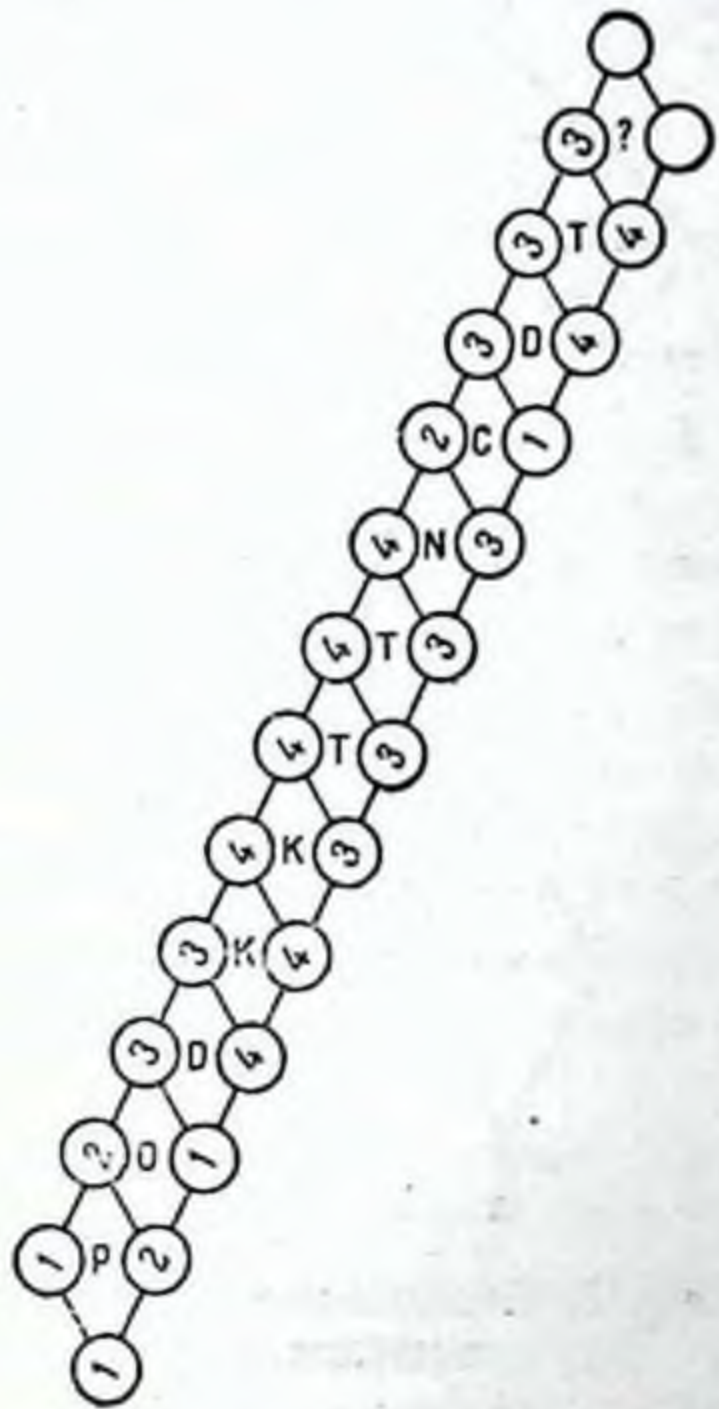
различным формам. Если, однако, принять, что глутаминовая кислота и глутамин соответствуют двум разным буквам ромбического кода, то утратится преимущество наличия пар одинаковых кислот в последовательности, и всякая попытка расшифровки крайне усложнится.

Для проверки правильности ромбического кода иным способом можно рассмотреть взаимосвязь между тремя „тройками“ из молекулы инсулина: 1) -лей-тир-лей (инсулин В); 2) -тир-глу-лей- (инсулин А); 3) -фен-фен-тир- (инсулин В). Обозначим через a и a' , b и b' и т. д. каждую пару оснований, связанную правилами 1—2 и 3—4. В этом случае тирозин можно записать в наиболее общем

виде, как $\left(a \frac{b}{c} a' \right)$, где $a, b,$

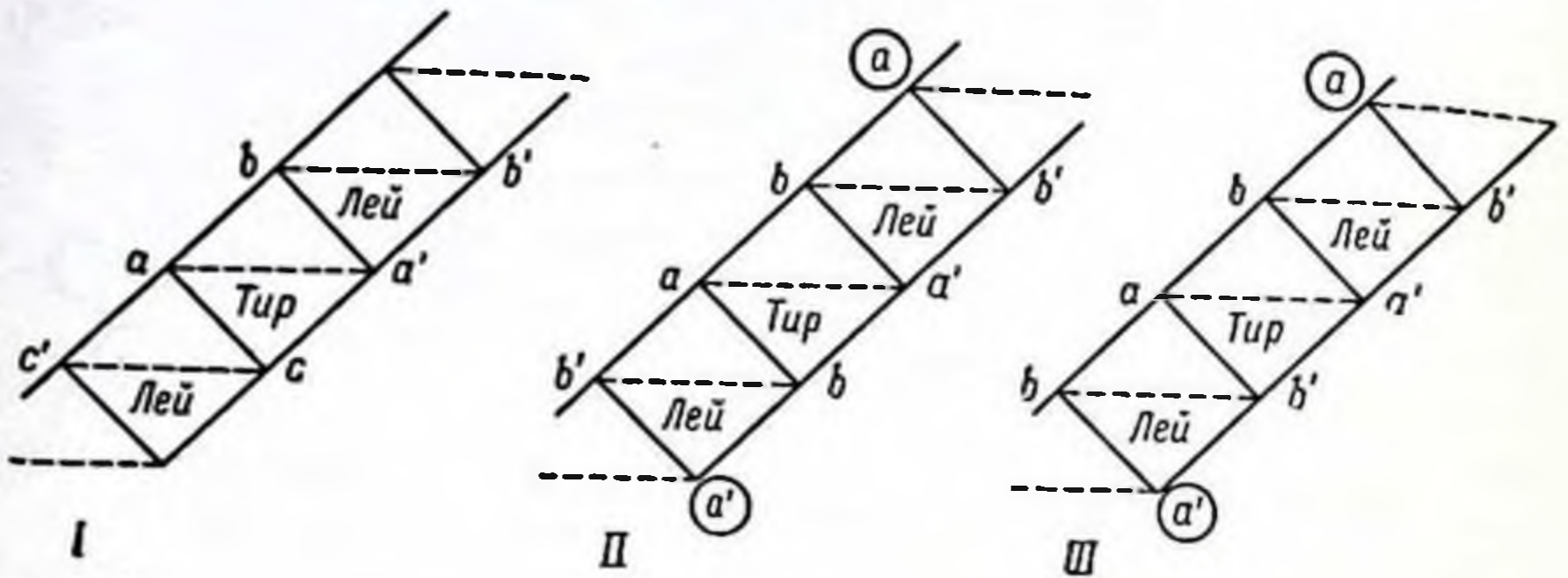
c могут быть или не быть одинаковыми. Но поскольку тирозин с обеих сторон окружен лейцинами, обладающими той же парой в диагонали (фиг. 6, I) то

либо $b=c$ и $b'=c'$, либо $b=c'$ и $c=b'$. Эти две возможности изображены на фиг. 6, II, III. Так как, однако, два крайних ромба должны представлять одну и ту же аминокислоту (лейцин), мы должны приписать отмеченным кружками вершинам буквы a и a' . Это означает, что в лейцине связи 1—2 и 3—4 соответствуют также и вертикальной диагонали, благодаря чему возможными оказываются только следующие четыре формы: α, β, γ и δ (фиг. 7). Однако можно показать, что каждый из четырех вариантов приводит к противоречию.

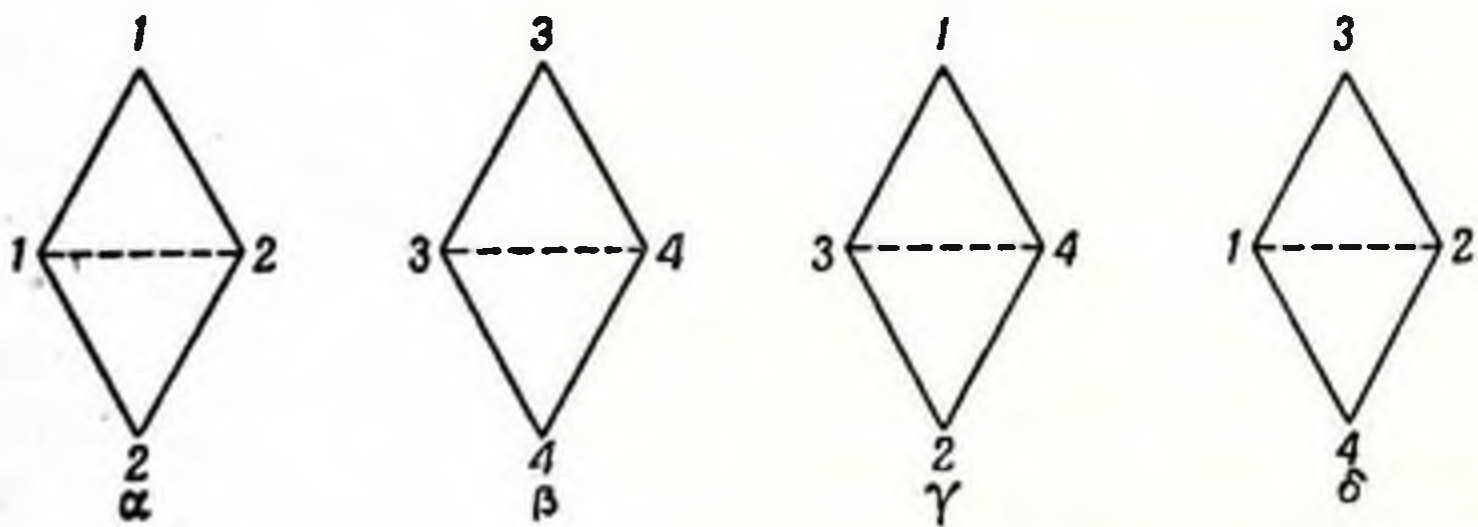


Ф и г. 5. Расшифровка сегмента инсулина.

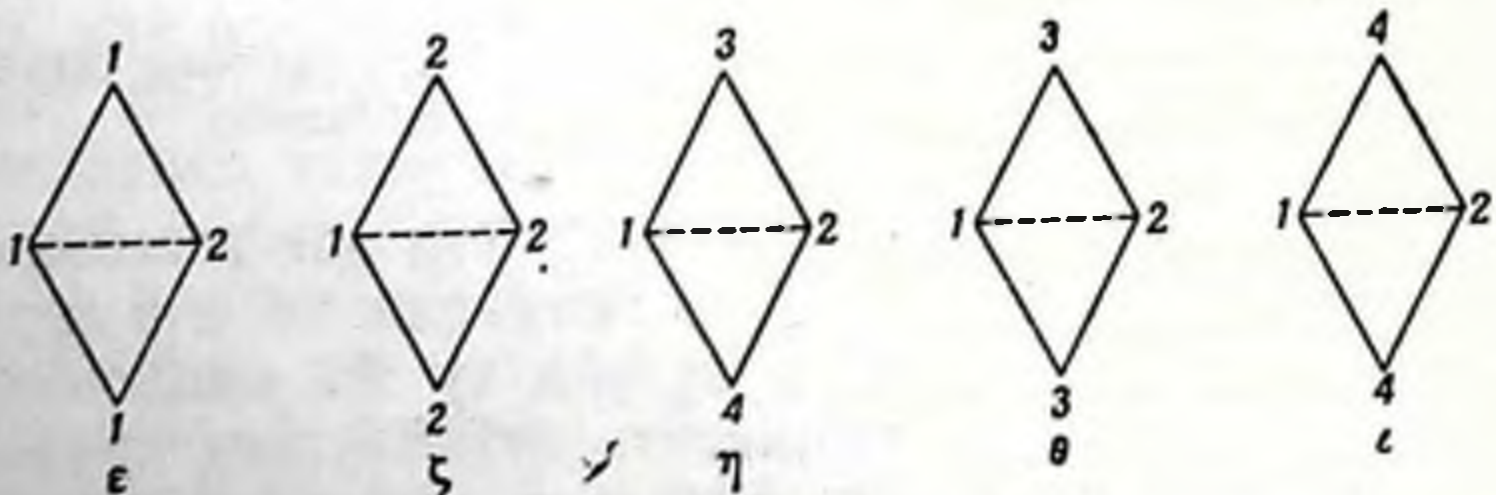
1. Если лейцин соответствует α -ромбу, то „тройка“ (1) показывает, что тирозин должен соответствовать одному



Ф и г. 6. Соответствие оснований последовательности лей-тир-лей согласно ромбическому коду.



Ф и г. 7. Возможные соответствия оснований, определяющих лейцин, в последовательности, изображенной на фиг. 6.



Ф и г. 8. Возможные соответствия оснований, определяющих тирозин, в последовательности, изображенной на фиг. 6.

из двух ромбов — ϵ или ζ (фиг. 8); тогда на основании „тройки“ (2) можно заключить, что глутаминовая кислота должна соответствовать ζ -ромбу, если тирозин соответ-

ствуется ϵ -ромбу, и наоборот. Противоречие возникает при рассмотрении „тройки“ (3): учитывая указанные выше ограничения, нельзя интерпретировать эту „тройку“ так, чтобы ромб, приписанный фенилаланину, не был тождествен ромбу глутаминовой кислоты или лейцина.

2. Если принять, что лейцин соответствует β -ромбу, можно повторить то же рассуждение с той разницей, что основания 1 и 2 надо заменить на 3 и 4.

3. Если лейцин соответствует γ -ромбу, то „тройка“ (1) дает три возможности для тирозина: η , θ и ι (фиг. 8), но тогда становится невозможным построение „тройки“ (2).

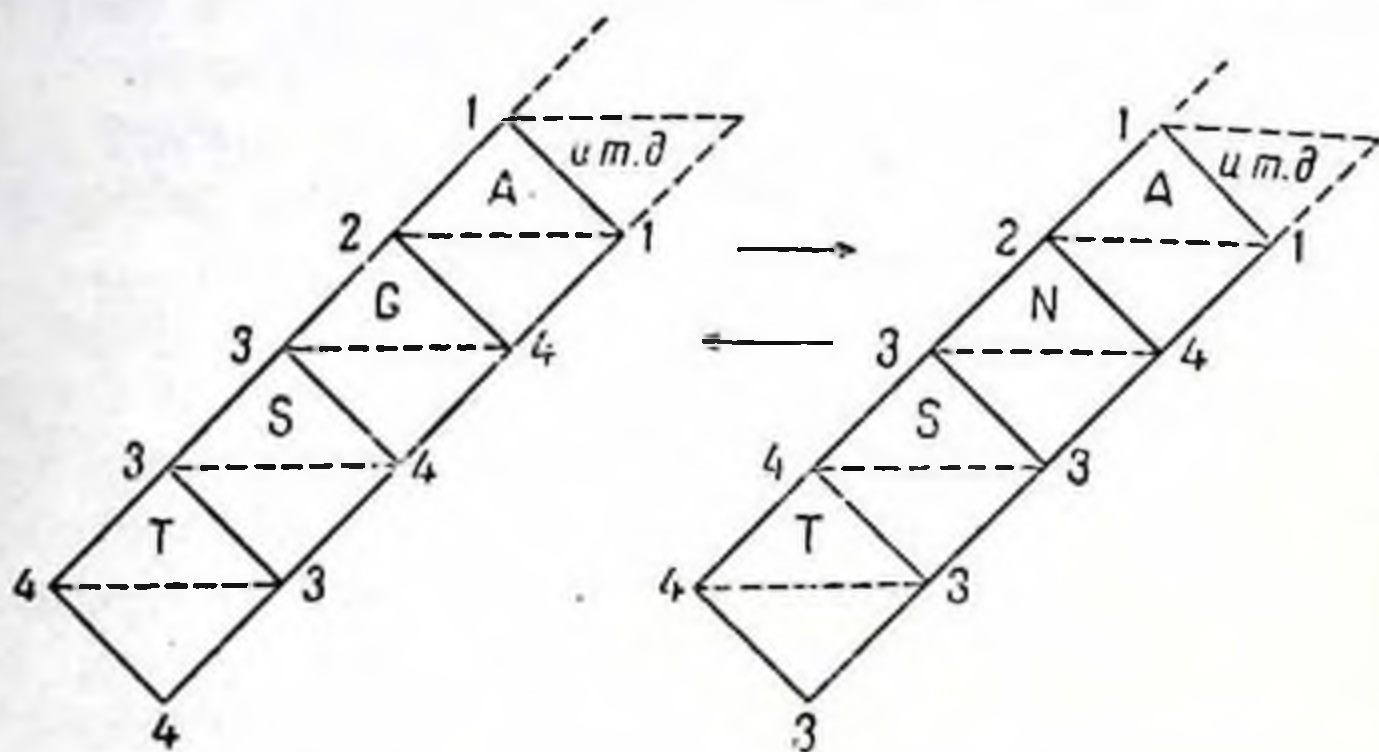
4. Предположение, что лейцин соответствует δ -ромбу, следует отбросить на том же основании, что и предыдущее.

В связи с этим рассуждением необходимо, однако, отметить, что одна из упоминаемых в нем „троек“ (лей-тир-лей) никогда не была обнаружена в виде трипептида при исследованиях цепей инсулина, проведенных Зангером¹. Это единственное недостающее звено во всем анализе, так что этот участок цепи менее достоверен, чем остальные. С другой стороны, вероятность, что участок этот может быть типа -лей-тир-тир-лей- или -лей-тир-Х-тир-лей-, по-видимому, исключается анализом аминокислотного состава инсулина.

Следующее возражение против ромбического кода заключается в том, что известны случаи, когда два родственных белка отличаются лишь одной аминокислотой, в то время как оба ее соседа в ряду аминокислот одинаковы в обоих случаях (ср. цепи окситоцина и вазопрессина в табл. 1). Действительно, каждый ромб в цепи обладает двумя вершинами, общими с соседом справа, а двумя другими — общими с соседом слева; поэтому между двумя данными соседями может поместиться только один ромб. Этот аргумент, несомненно справедливый, если замещения происходят примерно в середине длинной молекулы, может, однако, не иметь реального смысла для аминокислот, близких к одному из ее концов. На фиг. 9 показано, например, как посредством вращения ромбов можно заменить одну аминокислоту, находящуюся на

¹ Последовательность находят, совмещая концы наблюдаемых фрагментов инсулина В.

третьем от свободного аминного конца месте (как в случае замещения фен—илей между окситоцином и вазопрессинном), не изменяя остальной части последовательности.



Фиг. 9. Вращение, приводящее к замене одной аминокислоты в последовательности, согласно ромбическому коду.

Ромбический код был окончательно опровергнут анализом недавно опубликованных данных по чередованию аминокислот в АКТГ (адренокортикотропном гормоне); можно показать, что последовательность

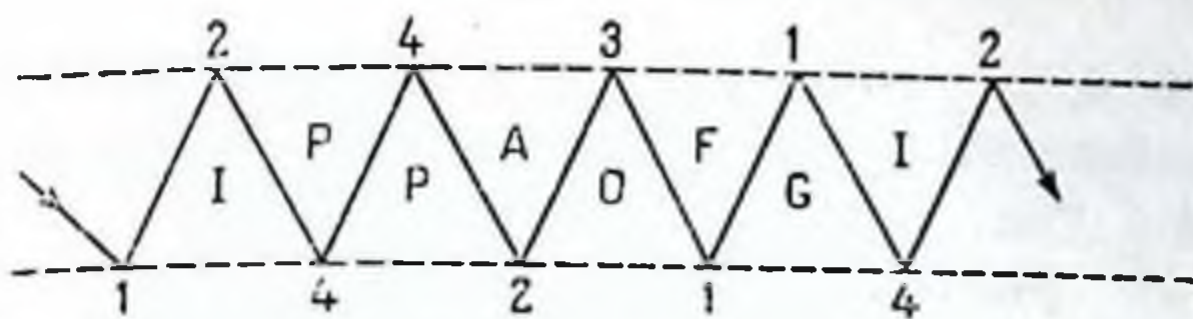
лиз-лиз-арг-арг-про-вал-лиз-вал-

нельзя расшифровать при помощи этого кода.

Мы обсудили столь детально ромбический код главным образом для того, чтобы показать логические методы, применяемые для расшифровки строения белка, так как другие, предложенные позднее более сложные коды значительно менее разработаны.

Треугольные коды (плотный и неплотный)

Ромбический код основан главным образом на предположении о существовании двух нитеподобных шаблонов, идентичных модели молекулы ДНК или сходных с ней, тогда как треугольный код связан с одной последовательностью оснований и может быть применим в том случае, если синтез белка осуществляется одной извитой молекулой РНК. Принцип, лежащий в основе кода, схематично показан на фиг. 10, где последовательность чисел 1, 2, 4,



Ф и г. 10. Схематическое изображение треугольного кода.

Ф и г. 11. Возможные „тройки“ треугольного кода.

4, 2, 3, 1, 1, 4, ... соответствует последовательности оснований в витках отдельной молекулы нуклеиновой кислоты. Совершенно так же, как и в ромбическом коде, здесь имеются 20 различных треугольников, которые могут быть образованы тремя последовательными основаниями. Эти треугольники показаны на фиг. 11, где им приписаны соответствующие буквы. Вновь мы приняли, что шаблон инвариантен относительно вращений или зеркальных отображений. Однако правила сочетаний между треугольниками отличаются от принятых нами для ромбического кода; они зависят от предположений, сделанных по поводу того, каким образом происходит соединение расположенных вдоль шаблона аминокислот при образовании полипептидных цепей. Можно сделать два различных предположения.

1. *Плотный треугольный код* основан на предположении, что аминокислоты соединяются между собой так, как они расположены вдоль шаблона, так что изображенный на фиг. 10 шаблон даст белок I-P-R-A-O-F-G-I.

Правила сочетаний отдельных элементов в этом случае похожи на правила сочетаний ромбов, хотя и содержат больше ограничений. 4 треугольника могут комбинироваться с 10 другими, 12 — с 7 другими, а остающиеся 4 — только с 4. Поскольку среди известных нам последовательностей аминокислот в белках встречаются случаи, когда данная аминокислота имеет более 10 различных соседей, плотный треугольный код не соответствует, очевидно, действительности.

2. *Неплотный треугольный код* основан на предположении, что пептидные связи возникают только между теми аминокислотами, которые занимают треугольники с вершинами, обращенными вверх или вниз. В этом случае один шаблон может дать одновременно два белка, так сказать „дополнительных“ друг к другу (-I-P-O-G и -P-A-F-I в примере, изображенном на фиг. 10). Из табл. 5 следует, что неплотный треугольный код предусматривает значительно менее жесткие комбинаторные правила для каждой отдельной цепи. Так, мы видим, что 4 буквы (гласные) комбинируются с 19 другими, 12 букв комбинируются с 16, а остающиеся 4 буквы комбинируются только с 10 другими.

довательностей аминокислот в полипептиде затрудняется, и ни одной серьезной попытки в этом направлении до сих пор сделано не было.

Следует, пожалуй, указать, что существование „дополнительных“ белков, вытекающее из свойств неплотного треугольного кода, может иметь некоторое отношение к рассмотренным выше экспериментальным результатам, касающимся замещений в родственных белках. Выбирая в качестве примера произвольную последовательность 42 оснований (4, 3, 2, 4, 4, 3, 4, 2, 4, 3, 4, 1, 1, 4, 1, 2, 4, 3, 3, 1, 2, 1, 3, 4, 1, 2, 2, 2, 3, 2, 1, 4, 1, 1, 2, 4, 1, 3, 4, 1, 1, 3) и конструируя, согласно фиг. 10, д а „дополнительных“ белка, получаем следующие два „полипептида“:

A	-P-	R-	K-	A-	E-	G-	I-	A-	L-	V-	E-	I-	T-	C-	I-	G-	I-	E-	E-	F
↑	.	↑	↑	↑	↑	↑	↑			↑						↑	↑	↑		
↓		↓	↓	↓	↓	↓	↓			↓						↓	↓	↓		
A	-R-	A-	K-	R-	G-	G-	I-	N-	O-	O-	E-	H-	C-	O-	G-	V-	I-	E-	G-	E

В этих двух „дополнительных“ последовательностях можно заметить две „парные ассоциации“ и 7 случаев, когда одинаковые аминокислотные остатки занимают одно и то же место в „полипептиде“ (все отмечены стрелками). Нельзя сказать, что это не согласуется с наблюдающимися в цепях инсулина А и В закономерностями (см. выше). Представление о „дополнительных“ цепях можно, таким образом, считать одним из возможных способов объяснения закономерностей, наблюдаемых при замещениях аминокислот у родственных белков. Однако необходимо отметить, что в процессе роста растительных вирусов синтезируется только один, а не два белка и что отсутствие „дополнительных“ белков как раз в том случае, когда их сравнительно легко обнаружить, представляет собой существенное возражение против всей идеи „дополнительных“ цепей“, а косвенным образом, конечно, и против кодов, на основании которых такие цепи могут образовываться.

Код „старший — младший“

Оргель предложил код другого типа, основанный на предположении об односторонней структуре РНК и изученный им довольно подробно в сотрудничестве с Фейнманом и авторами настоящей статьи. Основой кода служит

тот факт, что при часто совершающемся обмене местами отдельных аминокислот в некоторых полипептидных цепях, лежащие рядом с ними аминокислоты остаются неизменными. Так, например, в окситоцине есть ряд

цис-тир-илей-глу-асп-,

а в родственном ему вазопрессине

цис-тир-ф-н-глу-асп-,

где изолейцин заменен фенилаланином. Простейшее предположение состоит в том, что эта замена отражает замещение одного нуклеотида в шаблоне другим.

В этом коде каждой аминокислоте соответствует некоторый нуклеотид, который играет роль главного фактора, определяющего местоположение этой аминокислоты. Это так называемый „старший детерминант“. Взаимодействие между нуклеотидом и аминокислотой может осуществляться путем электростатического притяжения, образования водородных связей или каким-либо иным путем, но при формальном рассмотрении уточнять этот вопрос не требуется. Конечно, несколько различных аминокислот могут иметь один и тот же старший детерминант.

Однако, кроме старшего детерминанта, на положение аминокислот могут также оказывать влияние и прилегающие нуклеотиды. Например некоторый прилегающий нуклеотид может пространственно мешать какой-либо одной аминокислоте (и, наоборот, способствовать другой) занять место, благоприятное для полимеризации. Таким образом каждую аминокислоту можно формально представить тройкой чисел, соответствующих различным нуклеотидам; эти числа могут принимать значения от 1 до 4. Например, изолейцин можно обозначить как 3 1 4, где 1 — старший детерминант, а 3 и 4 — младшие детерминанты. Тогда последовательность аминокислот в окситоцине можно записать в виде

-цис-тир-илей-глу-асп-.

- 1 - 3 - 1 - 4 - 2

Каждой аминокислоте соответствует один старший детерминант, но несколько младших детерминантов. Так, тирозин был выше представлен через 1 3 1, но его можно также записать в виде 1 3 2 (изменился второй младший

детерминант). Аналогично глутаминовую кислоту можно записать либо в виде 1 4 2, либо, например, 2 4 2. Таким образом, если фенилаланину соответствует старший детерминант 2, то последовательность аминокислот в вазопрессине, родственном окситоцину, может быть записана в виде

-цис-тир-фен-глу-асп-
- 1 - 3 - 2 - 4 - 2 -

Следовательно, в этом коде замена одного нуклеотида выражается как замещение отдельной аминокислоты.

Главная задача при расшифровке этим кодом состоит в том, чтобы заполнить различными аминокислотами таблицу, аналогичную табл. 6, не впадая в противоречие с экспериментальными данными по последовательностям чередования аминокислот в белках. В виде примера мы заполнили табл. 6 для последовательности аминокислот в вазопрессине и окситоцине, упомянутых выше.

Таблица 6

СТАРШИЕ И МЛАДШИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ АМИНОКИСЛОТ

		Старшие детерминанты			
		1	2	3	4
Младшие детерминанты	1			Тир	
	1			Тир	Глу
	1				
	1				
	2				Глу
	2				
	2				
	2				
	3				
	3				
	3		Илей	Фен	
	3				
	4				
	4				
	4				

В соответствии с этим кодом сочетание двух аминокислот А, В в триплете АВХ разрешает только четырем другим аминокислотам находить ся в положении Х. То же относится к последовательностям ХАВ или АХВ.

Для заполнения 64 клеток табл. 6 имеется 20 аминокислот. Разобьем все известные последовательности аминокислот на тройки. Тогда можно найти последовательности типа лей-тир-глу и лей-вал-глу. Это означает, что старший детерминант валина отличается от старшего детерминанта тирозина, поскольку оба они окружены одинаковыми аминокислотами; это можно записать так: старш. валина не является старш. тирозина.

На основе подобранной серии трипептидов с более или менее хорошо установленной структурой было получено некоторое число соотношений типа „старш. Х не является старш. Y“, показавших, что принятые взаимосвязи не согласуются с основными принципами, лежащими в основе кода. Однако не исключена возможность, что этот вывод представляет собой результат ошибки в химическом анализе одного из трипептидов, использованных в этих исследованиях; действительно, отдельная ошибка в зашифрованной записи неизбежно приведет к полной несостоятельности расшифровки, даже если сделаны правильные предположения о принципах построения кода.

Код последовательного ряда

Для преодоления трудностей, связанных с наличием отдельных замещений, Теллер предложил другой код. Идея его состоит в том, что аминокислота определяется двумя основаниями и предыдущей аминокислотой. Это предполагает наличие некоторых предпочтительных последовательностей и дает преимущество некоторым связям между отдельными буквенными символами по сравнению с другими. Код напоминает код „старший — младший“, рассмотренный выше, и, поскольку он не содержит новых принципов, мы остановимся на нем очень кратко.

Одна из схем этого кода включает равное число аминокислот и нуклеотидных оснований, расположенных так, что каждая аминокислота попадает между двумя основаниями. Если предшествующая аминокислота не определяет следу-

ющую за ней, то за данной аминокислотой могут следовать только четыре других. Однако если предшествующая аминокислота вместе с двумя прилегающими основаниями определяет следующую аминокислоту, то число возможных расположений будет значительно больше. В наиболее общей форме этого кода в последовательностях могут реализоваться все эти возможности, хотя можно все же ожидать, что некоторые из них будут более вероятны. Так, например, если аминокислота с большими боковыми цепями мешает располагаться второй аминокислоте со столь же большой боковой цепью, то такие комбинации будут встречаться реже, чем комбинации аминокислот с большими и малыми боковыми цепями.

Для осуществления расшифровки при помощи этого кода необходимо изучить найденные опытным путем последовательности чередования аминокислот, чтобы выяснить, существуют ли в этом чередовании какие-либо закономерности. Собрав большое количество данных, можно определить, какие элементы оказывают наиболее существенное влияние.

Мы вернемся еще к этому вопросу в разделе „Графики распределения соседей“.

Использование символической логики

Возвращаясь к проблеме прямой расшифровки известных последовательностей чередования аминокислот в белках, мы вновь встречаемся с тем обстоятельством, что число всех возможных вариантов соответствия между аминокислотами и различными кодовыми символами устрашающе велико; прямая проверка всех возможностей невыполнима даже при помощи современных вычислительных машин. Действительно, если бы еще в дни Римской империи была пущена в ход вычислительная машина, проверяющая 1 000 000 вариантов в 1 сек. и работающая 24 часа в сутки в течение всего года, то вычисления до сих пор не были бы закончены.

Однако Ледли указал недавно [36], что задачу можно значительно упростить, излагая проблему на языке уравнений символической логики и решая эти уравнения на основе граничных условий, определяемых известными

аминокислотными последовательностями. В качестве простого примера он рассматривал только 3 буквы плотного треугольного кода — $O = (1, 2, 3)$; $I = (1, 2, 4)$ и $A = (2, 3, 4)$ — и предположил существование следующих трех последовательностей, образованных тремя различными аминокислотами X, Y и Z:

Y-X-X-X; Y-Y-Y-X; Z-Z-Z-Y;

Сравнительно простое вычисление по методу Ледли приводит к единственному решению: $X = A$, $Y = O$, $Z = I$. Конечно, эта простая задача может быть также быстро решена прямой проверкой всех возможных вариантов соответствия между A, B, C и X, Y, Z, число которых равно $3!$, т. е. 6. Но главное преимущество использования символической логики состоит в том, что с увеличением числа различных аминокислот время, необходимое для прямой проверки всех возможностей, безнадежно увеличивается, тогда как решение соответствующей системы логических уравнений с определенными условиями можно произвести сравнительно быстро. Действительно, было подсчитано, что в случае 20 аминокислот решение на основе одного из указанных здесь кодов и с учетом всех известных последовательностей чередования аминокислот в белках потребует лишь нескольких сотен часов работы электронной машины. Надо надеяться, что в ближайшем будущем можно будет попытаться произвести подобные расчеты.

Некоторые статистические соображения

Корреляция между составом нуклеиновой кислоты и белка

Если нуклеиновые кислоты служат шаблонами для построения белков, то между их составом и составом белков должна существовать известная корреляция. Самым благодарным биологическим материалом для изучения таких корреляций являются вирусы, поскольку в этом случае есть основания полагать, что образующий оболочку частицы белок синтезируется, следуя информации, заключающейся в нуклеиновой кислоте, которая составляет внутренность частицы. У двух вирусов — табачной мозаики

(ВТМ) и желтухи турнепса (ВЖТ) — изучен состав нуклеиновой кислоты и белка. В табл. 7 и 8 дано содержание

Таблица 7
СОДЕРЖАНИЕ ОСНОВАНИЙ В РНК ВИРУСОВ ТАБАЧНОЙ
МОЗАИКИ И ЖЕЛТУХИ ТУРНЕПСА [17, 41]

Вирус	Содержание оснований*			
	аденин	гуанин	цитозин	урацил
ВТМ	0,30	0,25	0,18	0,25
ВЖТ	0,23	0,17	0,38	0,22

* Содержание оснований в молекуле РНК принято за 1.

Таблица 8
АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ ВИРУСОВ ТАБАЧНОЙ
МОЗАИКИ И ЖЕЛТУХИ ТУРНЕПСА

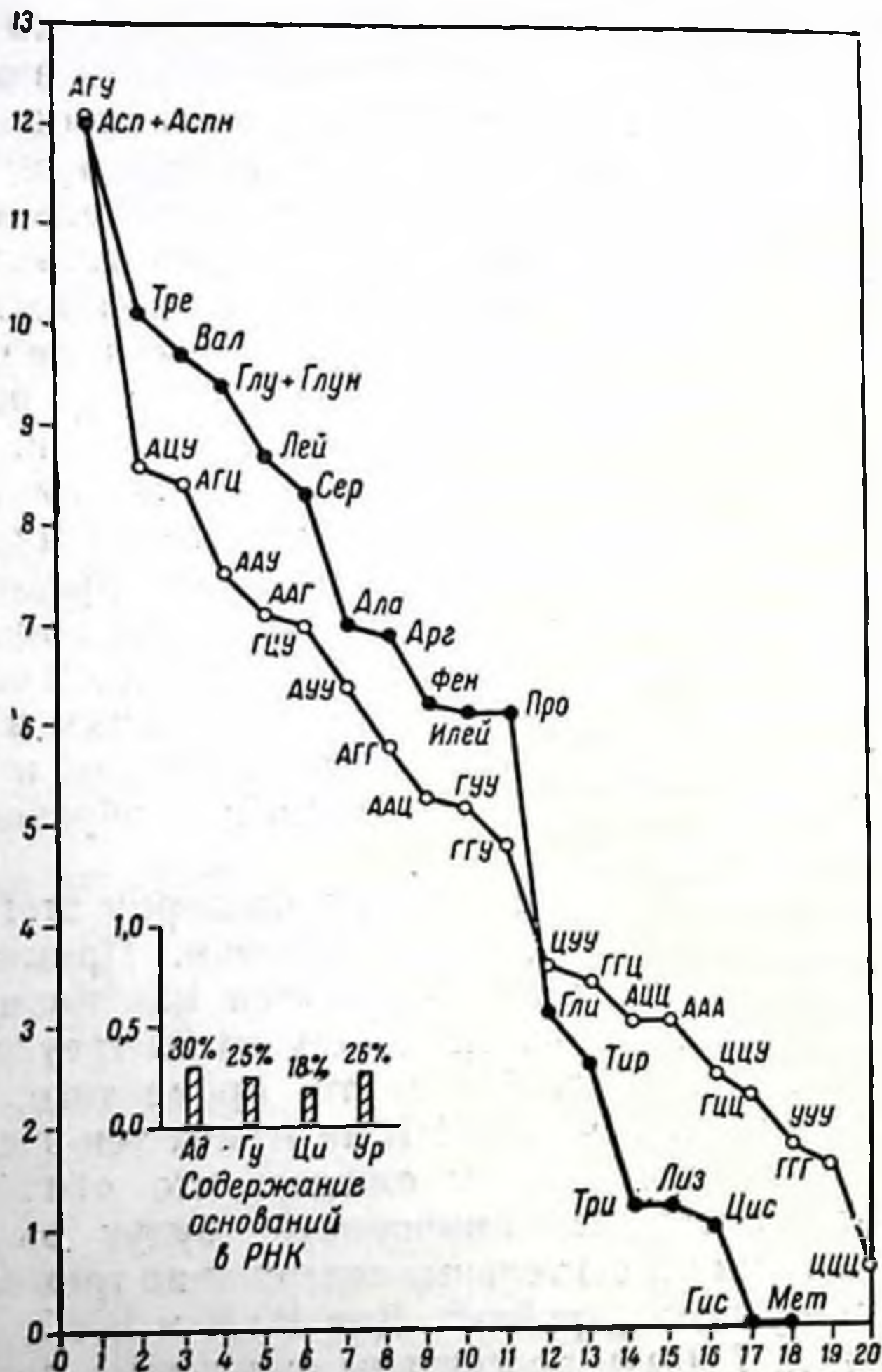
Аминокислота	ВТМ	ВЖТ
Аланин	0,070	0,070
Аргинин	0,069	0,015
Аспарагиновая кислота	0,120	0,041
Аспарагин		
Валин	0,097	0,078
Гистидин	0	0,015
Глицин	0,031	0,042
Глутаминовая кислота	0,091	0,071
Глутамин		
Изолейцин	0,061	0,089
Лейцин	0,087	0,086
Лизин	0,012	0,080
Метионин	0	0,020
Пролин	0,061	0,010
Серин	0,083	0,084
Тирозин	0,026	0,015
Треонин	0,102	0,138
Триптофан	0,012	0,006
Фенилаланин	0,002	0,025
Цистин	0,010	0,023

оснований и аминокислот в этих двух вирусах. Анализ, между прочим, показал, что РНК вируса табачной мозаики представляет собой мономолекулярное образование, а не комплекс молекул [55].

Из табл. 7 видно, что РНК вируса желтухи турнепса отличается от РНК вируса табачной мозаики значительно большим содержанием цитозина и несколько меньшим содержанием аденина и гуанина; содержание урацила уменьшается весьма мало. Если последовательность аминокислот в белке определяется последовательностью оснований в нуклеиновой кислоте, то мы должны ожидать, что ВЖТ будет обладать повышенным содержанием тех аминокислот, которые определяются конфигурацией оснований, содержащей одну или более молекул цитозина. В то же время должно уменьшиться содержание аминокислот, всецело определяемых тремя другими основаниями. Рассмотрев табл. 8, можно, таким образом, предположить, что такие аминокислоты, как гистиин, метионин, лизин, треонин и цистин, определяются конфигурацией оснований, содержащей одну или более молекул цитозина, в то время как аргинин, аспарагиновая кислота, пролин и глутаминовая кислота определяются главным образом тремя другими основаниями.

Более строгую количественную проверку этого вывода можно произвести следующим образом. Принимая, что каждая из аминокислот определяется комбинацией трех оснований, соответствующей одному из 20 треугольников, изображенных на фиг. 11, и что, кроме того, порядок расположения оснований в РНК не отличается значительно от случайного, мы должны ожидать, что относительные содержания различных аминокислот будут выражаться произведениями относительных содержаний трех оснований в соответствующей „тройке“. Для ВТМ и ВЖТ с учетом данных табл. 7 были подсчитаны ожидаемые содержания различных „троек“ оснований (со статистическими весами 1, 3 и 6 для „троек“ типов ааа, ааб и асс) и результаты нанесены на график вместе с наблюдаемыми содержаниями аминокислот, взятыми из табл. 8. Полученные таким образом кривые (фиг. 12 и 13) расположены очень близко друг к другу, что подтверждает наличие определенной корреляции между последовательностью чередо-

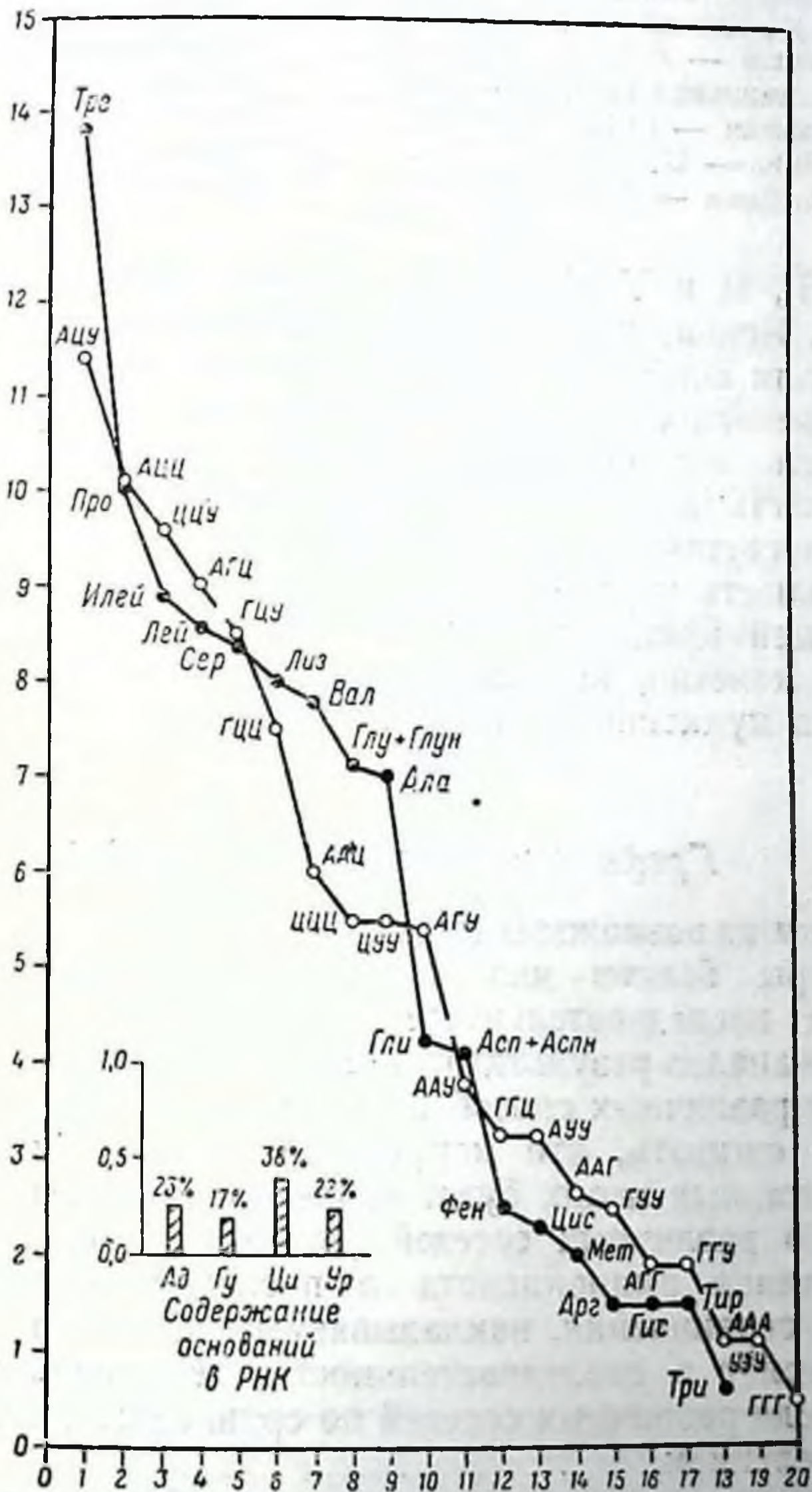
вания аминокислот и „тройками“ оснований. Мы замечаем, однако, что данные по ВТМ и ВЖТ приводят к различным и противоречивым вариантам этих корреляций.



Ф и г. 12. Распределение аминокислот и „троек“ оснований в вирусе табачной мозаики.

Можно попытаться устранить это расхождение, вводя некоторое дополнительное предположение об этих корреляциях, удовлетворяющее данным, относящимся как к ВТМ, так и к ВЖТ, правда, с точностью несколько меньшей, чем

указана на фиг. 12 и 13. Выбирая другие варианты соответствия определенных аминокислот и „троек“ оснований, надо отдать предпочтение наиболее часто встречающимся,



Ф и г. 13. Распределение аминокислот и „троек“ оснований в вирусе желтухи турнепса.

поскольку в этом случае можно ожидать малых относительных ошибок. Следуя этому принципу, мы приходим к следующему соответствию:

Аланин — ААЦ	Лейцин — АГЦ
Аспарагиновая кислота — АГУ	Лизин — ГЦЦ
Аргинин — АГГ	Фенилаланин — ГУУ
Глутаминовая кислота — АУУ	Пролин — ЦЦУ
Глутамин — ГГЦ	Серин — ГЦУ
Глицин — ЦУУ	Треонин — АЦУ
Изолейцин — АЦЦ	Валин — ААУ,

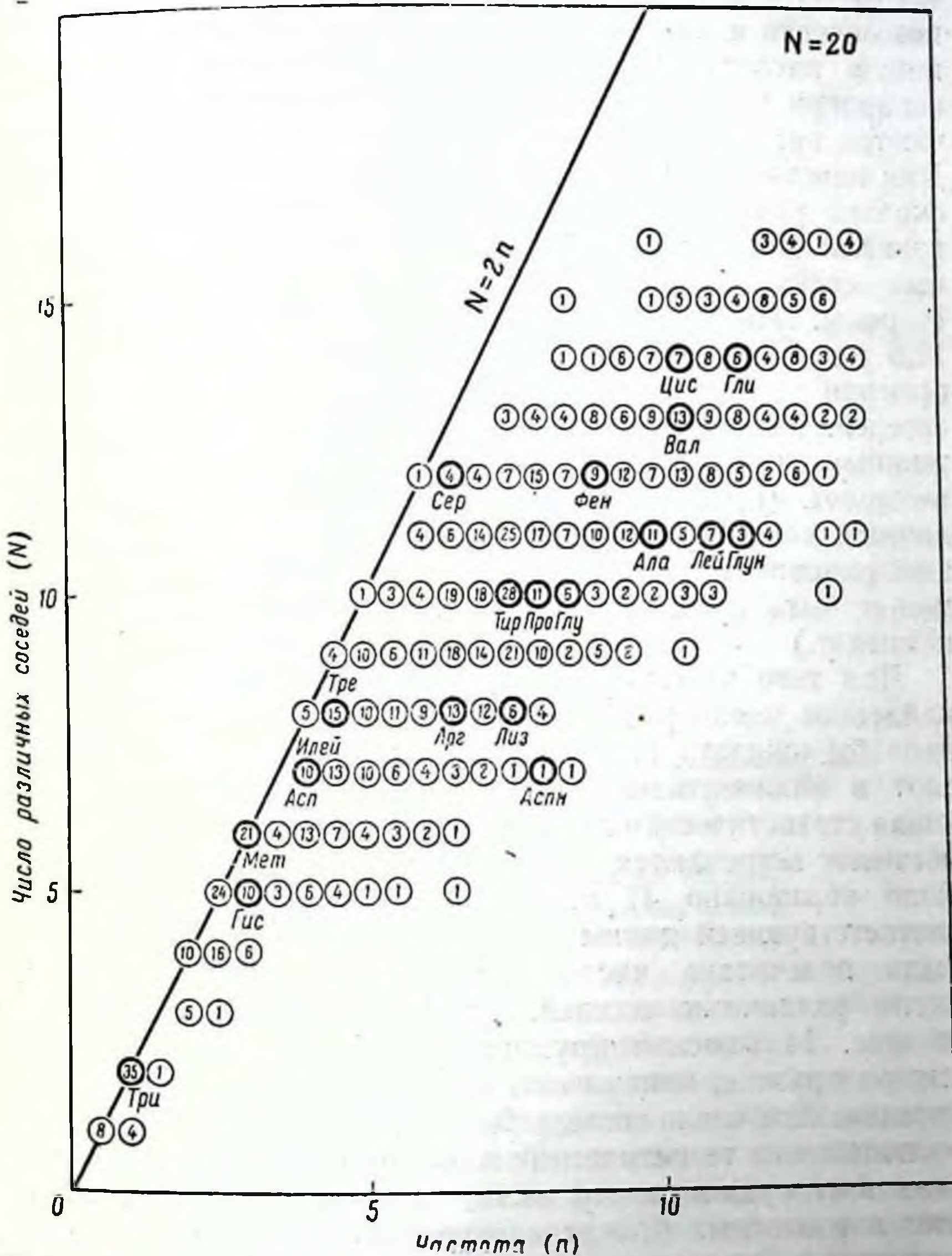
где А, Г, Ц и У обозначают аденин, гуанин, цитозин и урацил. Используя этот набор соответствий как для ВТМ, так и для ВЖТ, мы находим, что среднее отклонение от наблюдаемого содержания аминокислот составляет около 20%, что можно считать вполне удовлетворительным, если учесть возможные экспериментальные ошибки при анализе состава нуклеиновой кислоты и белка. Однако правильность указанного выше выбора, как и справедливость всей концепции, на которой основан этот выбор, можно, конечно, выяснить только в результате анализа белков и нуклеиновых кислот других растительных вирусов.

Графики числа различных соседей

Одним из возможных подходов к проблеме расшифровки структуры белков является статистический анализ известных последовательностей чередования аминокислот, а также анализ результатов, полученных на основе использования различных способов кодирования. Действительно, следует ожидать, что корреляция между символами в полипептидных цепях будет оказывать некоторое влияние на число различных соседей, которыми может обладать одна данная аминокислота в последовательности. Чем сильнее ограничения, накладываемые на возможные связи аминокислот в последовательности, тем меньше должно быть число различных соседей по сравнению со случайным распределением.

Исследования в этом направлении были предприняты Гамовым и Метрополисом [25]; вычисления производили на электронной счетной машине „Маниак“ в лаборатории

Комиссии по атомной энергии в Лос-Аламосе. Анализу были подвергнуты те белки, в которых к тому времени была наиболее надежно установлена последовательность



Ф и г. 14. График числа различных соседей.

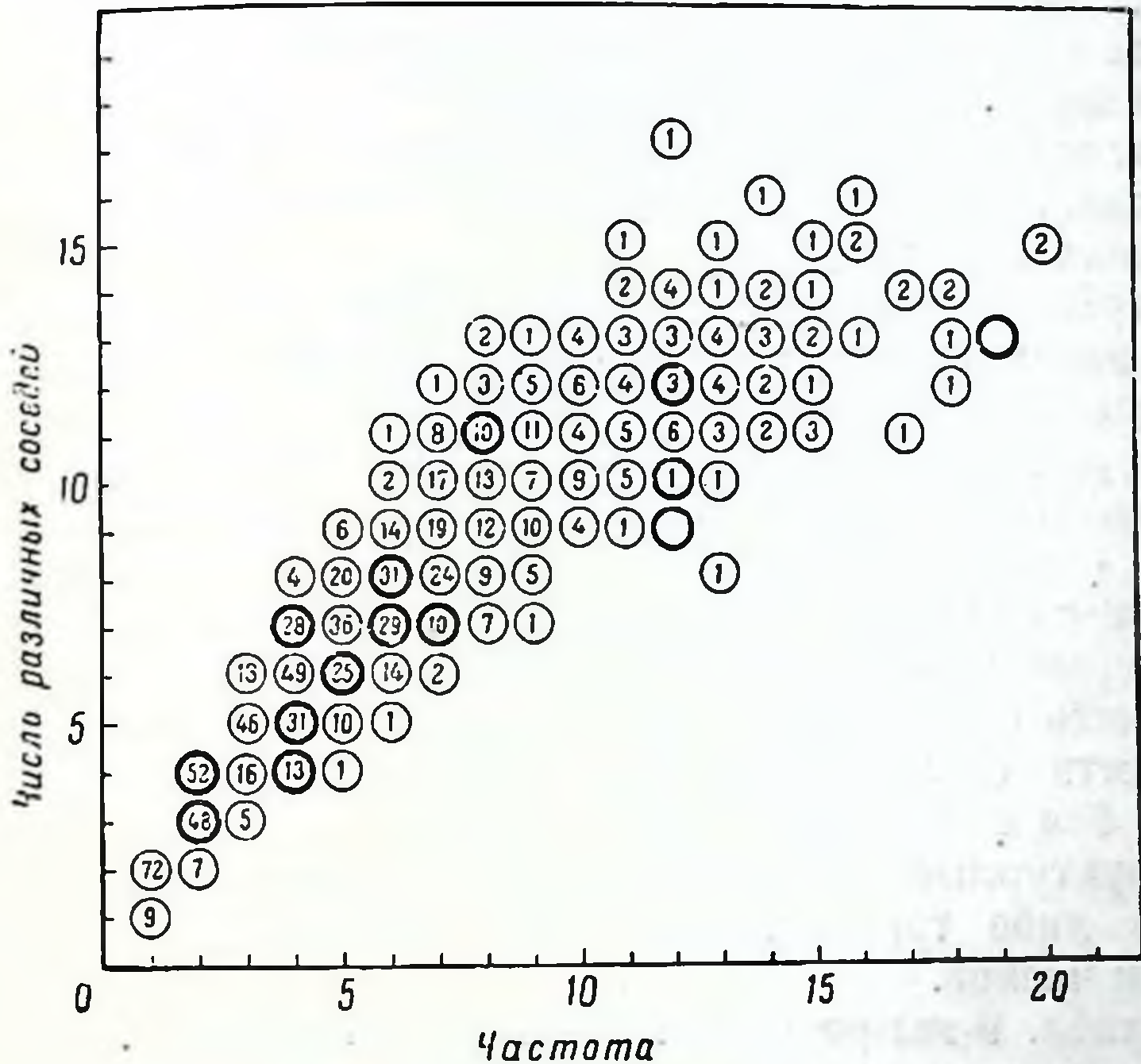
Жирные кружки — экспериментальные данные; тонкие кружки — данные по произвольным полипептидным последовательностям.

чередования аминокислот: инсулин А и В (говядина, баранина и свинина), окситоцин (говядина), вазопрессин (говядина и свинина), АКТГ (адренокортикотропный гормон) и 11 фрагментов лизоцима. Эти белки были выбраны потому, что в них удалось химически разделить глутаминовую кислоту и глутамин. Аспарагиновая кислота и аспарагин не разделялись, но, поскольку обе они встречаются крайне редко, это не имеет большого значения. Для каждой из 20 аминокислот подсчитывали, во-первых, сколько раз эта кислота встречается в выбранных последовательностях¹; во-вторых, подсчитывали число различных соседей аминокислоты, расположенных по обе ее стороны. Находим, например, что глицин встречается 11,5 раз и имеет 14 различных соседей, в то время как аргинин встречается только 6,5 раз и имеет 8 различных соседей. Результаты этого анализа показаны на фиг. 14 жирными кружками с названиями соответствующих аминокислот. (Граничные линии указывают, что число различных соседей не может превышать удвоенного числа аминокислот в последовательности и что это число не может быть также больше общего числа различных аминокислот.)

Для того чтобы определить, является ли эмпирически найденное число различных соседей меньшим, чем следовало бы ожидать при случайном распределении аминокислот в полипептидных цепях, была произведена следующая статистическая проверка. Принимая, что все 20 аминокислот встречаются в белках с равной вероятностью, было образовано 47 произвольных последовательностей соответствующей длины и в каждой последовательности было подсчитано число определенных аминокислот и число различных соседей. Результаты показаны также на фиг. 14 тонкими кружками, причем число, стоящее внутри кружка, показывает, сколько раз (из 47 проб) это определенное число соседей было получено. Относительное расположение теоретических и экспериментальных данных указывает, судя по всему, на то, что чередование аминокислот в известных белках совершенно случайно.

¹ При общем подсчете те случаи, когда аминокислота находилась на конце ряда или части ряда, считали за половину, так как при этом можно было обнаружить только одного из возможных соседей.

Чтобы проверить это заключение, было выполнено аналогичное построение (фиг. 15) для последовательностей чередования аминокислот, искусственно полученных при помощи неплотного треугольного кода из произвольной последовательности четырех оснований.



Графики распределения соседей

Можно изучать распределение соседей в полипептиде иным методом, исходя из табл. 2, составленной на основании табл. 1. Однако табл. 1 включает белки двух видов — структурные и бесструктурные. Первые, например шелк, желатина (производное коллагена), сальмин и шерсть — все обладают высоко специализированным составом аминокислот. Так, например, около $\frac{1}{3}$ аминокислотных остатков желатины приходится на пролин и гидроксипролин, сальмин обладает очень высоким содержанием аргинина и т. д.

Чтобы исключить влияние, оказываемое на результаты этими специализированными белками, в настоящем разделе мы не будем их рассматривать и изучим только бесструктурные белки, обладающие более общим составом. Исключаемые таким образом белки отмечены в табл. 1 двумя звездочками. В табл. 1 включены также многие дипептиды, попавшие в нее только потому, что некоторые аминокислотные остатки особенно легко обнаружить при анализе, как например серин в последовательности овальбумина. Для того чтобы распределение было более показательным, мы будем изучать только бесструктурные последовательности аминокислот, являющиеся либо трипептидами, либо пептидами с большим числом членов.

В табл. 9 мы расчленили все последовательности аминокислот на дипептиды. Последовательность типа

ала-лей-вал-три

дает три таких дипептида: ала-лей, лей-вал и вал-три. Таким путем было получено всего 177 ближайших дипептидных соседей¹. В табл. 9 участвуют 20 аминокислот, поскольку глутамин и аспарагин рассматривались как отдельные аминокислоты (в некоторых случаях это может привести к небольшим ошибкам). Вся таблица имеет

¹ Здесь не учтены цитохром с и некоторые из рядов лизоцима, по которым не было данных при составлении таблицы. Как и в табл. 2, учитывались только различные последовательности в сходных белках (например, инсулин говядины, баранины и свинины).

$20 \times 20 = 400$ клеток, и средняя плотность точек (число единиц в каждой клетке) $n = \frac{77}{400} = 0,442$.

Было найдено, что распределение плотности точек в табл. 9 подчиняется закону Пуассона¹, т. е. закону распределения случайных событий (этому закону подчиняется, например, распределение числа градин, падающих на каждый квадрат мелкой сетки). Это распределение возникает тогда, когда нет ясно выраженного предпочтительного сочетания каких либо аминокислот, т. е. если, например, число сочетаний ала-глу в таблице не больше числа, ожидаемого при случайном распределении².

Если n — средняя плотность точек, а N — полное число клеток, то распределение Пуассона выражается формулой:

$$P(r) = N \frac{e^{-n} n^r}{r!},$$

где $P(r)$ — ожидаемое число клеток, содержащих r единиц. Если сравнить наблюдаемое распределение плотности с предсказанным, то получаются результаты, приведенные в столбцах 1 и 5 табл. 10. Для количественного сравнения наблюдаемых и ожидаемых частот пользуются критерием χ^2 , где χ^2 определяется как $\sum \frac{(o_i - e_i)^2}{e_i}$, где номер наблюдения

o_i — i -е наблюдаемое значение, e_i — i -е ожидаемое значение. Данные столбца 1 табл. 10 показывают, что $\chi^2 = 7,64$, т. е. меньше, чем нужно для обеспечения 5-процентной значимости при 3-х степенях свободы.

Для того чтобы найти предпочтительных соседей аминокислот, мы составили еще одну таблицу. Последовательность ала-лей-вал-гли-сер приведет к следующим трем единицам: ала-вал, лей-гли и вал-сер. Используя те же данные, что и выше, мы получили 143 единицы, так что $\bar{n} = 143/400 = 0,357$. Из табл. 11 видно, что результаты вновь хорошо согласуются с распределением Пуассона.

¹ Мы выражаем благодарность С. Бреннеру, указавшему нам на применимость распределения Пуассона в данном случае.

² Недавно мы получили новые сведения о последовательности чередования аминокислот в цитохроме с, лизоциме и рибонуклеазе. Если табл. 9 рассматривать с учетом новых данных, то результаты продолжают следовать распределению Пуассона.

Таблица 10

СРАВНЕНИЕ НАБЛЮДАЕМОГО И ВЫЧИСЛЕННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЙ
ПРИ $n = 0,442$

Число единиц на клетку сетки	Ближайшие соседи (наблюдаемое распределение)	Неплотный треугольный код (наблюдаемое распределение)	Ромбический код (наблюдаемое распределение)	Английский язык (наблюдаемое распределение)	Распределение, вычисленное по закону Пуассона
	1	2	3	4	
0.....	264	276	301	305	264,2
1.....	103	86	54	55	116
2.....	27	26	28	23	25,6
3.....	4	9	11	7	3,77
4.....	2	3	3	3	0,42
5.....	0	0	1	3	0,037
6.....	0	0	0	2	0,0027
7.....	0	0	2	0	$1,7 \cdot 10^{-4}$
8.....	0	0	0	2	$9,5 \cdot 10^{-6}$
χ^2 (наблюдаемое)	7,64	22,7	$2,4 \cdot 10^4$	$4,2 \cdot 10^6$	
χ^2 (вычисленное для 5-процентной значимости)	7,82	7,82	$11,1 \cdot 10^4$	$12,6 \cdot 10^5$	

Таблица 11

СРАВНЕНИЕ НАБЛЮДАЕМОГО И ВЫЧИСЛЕННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЙ
ПРИ $n = 0,357$

Число единиц на клетку сетки	Чередующиеся соседи (наблюдаемое распределение)	Распределение, вычисленное по закону Пуассона
0.....	283	280
1.....	96	100
2.....	16	17,9
3.....	5	2,13

χ^2 (наблюдаемое) равно 4,25; χ^2 (вычисленное для 5-процентной значимости) равно 5,99.

Если составить таблицу распределения соседей, используя 20 букв и выбирая случайные последовательности чередования этих букв, мы получили бы распределение Пуассона. В „языке“, который содержит некоторое предпочтение для определенных последовательностей, возникнут отклонения от закона Пуассона. В качестве примера мы выбрали частоту появления определенных соседних букв в английском языке, взяв за образец начало книги Мильтона „Потерянный рай“. Буквенная сетка заполнялась нами до средней плотности $n = 0,442$ (результаты показаны в столбце 4 табл. 10). Хотя повторяющиеся целые слова мы не рассматривали, распределение тем не менее существенно отклонялось от пуассоновского. В английском языке сочетания букв типа th, be и an встречаются чаще, чем это следует из случайного распределения.

Распределение частот появления тех или иных букв-соседей было определено для разных языков, и им многократно пользовались для проверки различных методов расшифровки [49]; однако ни в одном из языков распределение буквенных соседей не следует закону Пуассона.

Такие графики частот появления соседей могут быть использованы при изучении любого предлагаемого метода расшифровки системы нуклеиновая кислота—белок. Составим произвольную последовательность четырех оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот; такое распределение соответствует наибольшему „беспорядку“. Исходя из этой последовательности, мы можем перейти к последовательности аминокислот, пользуясь каким-либо специальным методом кодирования, и получить синтетический полипептид, в котором последовательность чередования аминокислот является следствием определенного способа перевода. Мы построили такие синтетические полипептидные последовательности, используя как треугольную, так и ромбическую кодовые схемы. Были взяты последовательности, дающие 177 случаев информации о чередовании объектов; они были подвергнуты такому же анализу на частоту появления соседей, как и экспериментально наблюдаемые последовательности, приведенные в табл. 1. Результаты анализа представлены в столбцах 2 и 3 табл. 10; там же даны значения χ^2 . Легко видеть, что оба метода расшифровки ведут к распределениям,

заметно отличающимся от пуассоновского, а следовательно, от данных эксперимента.

Используя этот косвенный статистический подход, мы можем таким образом выявить некоторую несовместимость метода расшифровки с действительностью, чего нельзя было сделать на основании построений, изображенных на фиг. 14 и 15.

Следует рассмотреть здесь два вопроса: во-первых, насколько надежны собранные нами экспериментальные данные относительно последовательности чередования аминокислот; во-вторых, какое значение имеет то обстоятельство, что распределение соседей подчиняется закону Пуассона.

Конечно, имеющиеся в нашем распоряжении экспериментальные данные в значительной степени случайны; это связано с влиянием таких факторов, как доступность белка, его молекулярный вес, стабильность и т. д. Примерно $\frac{2}{3}$ всех этих данных получены в результате изучения длинных последовательностей АКТГ, лизоцима и инсулина. Являются ли они показательными для большого класса бесструктурных белков, неизвестно. Только накопление большого числа сведений позволит подтвердить ценность информации, имеющейся в настоящее время в нашем распоряжении.

Поскольку распределение соседей аминокислот подчиняется закону Пуассона, возможность отыскания расшифровывающей схемы становится весьма проблематичной. Большинство кодов предполагает наличие определенных ограничений в расположении тех или иных соседних элементов; отсутствие таких ограничений чрезвычайно осложняет работу. Если все 400 клеток таблицы в конечном счете заполнятся, это будет означать, что любая аминокислота может располагаться рядом с любой другой. Отсутствие же избранных, предпочтительных последовательностей означает, что предшествующая аминокислота не принимает, вероятно, участия в определении следующей, соседней с ней аминокислоты и что, кроме того, данный нуклеотид не определяет положения двух прилегающих друг к другу аминокислот. Можно, конечно, все же построить схему расшифровки, в которой два или три эле-

мента нуклеиновой кислоты определяют положение данной аминокислоты, но эти положения, так сказать, независимы друг от друга.

Возможно, однако, что в сущности следовало бы рассматривать вопрос о том, какое количество „информации“ может передать данная полипептидная последовательность. Мы пользуемся термином „информация“, имея в виду специфичность, отличающую молекулу одного белка от молекулы другого. В своей „Математической теории связи“ [56] Шеннон и Уивер развили количественное понятие *энтропии* данного источника информации или языка. В системах, где определенные сочетания символов, например th или ала-лей, являются предпочтительными, энтропия меньше, чем при чисто случайных сочетаниях. Так, они оценили относительную энтропию английского языка в 50%. Чтобы передать данное сообщение на языке с низкой энтропией, т. е. на языке, в котором часто применяются определенные типы сочетаний, надо использовать большее число символов. Наиболее гибкими и экономичными являются языки, обладающие наименьшим количеством ограничений. В белках природа, вероятно, пользуется полипептидным „языком“, энтропия которого высока, а сопутствующая специфичность данной полипептидной цепи чрезвычайно велика. Это не должно, конечно, относиться к классу структурных белков, специальный состав которых по необходимости ведет к уменьшению информационной энтропии.

Заключение

В этой главе мы подводим итог современным усилиям найти формальный механизм, при помощи которого наследственная химическая информация, заключенная, по-видимому, в длинных полинуклеотидных цепях, передается соответствующим полипептидным цепям, образующим клеточные белки. Хотя ни одна из предложенных „моделей передачи информации“ (кодов) не оказалась подходящей для воспроизведения наблюдаемых последовательностей чередования аминокислот, но в процессе работы были развиты методы, позволяющие в будущем проверить достоверность любого предполагаемого механизма передачи.

В частности, на основании статистических исследований, изложенных в последнем разделе, можно предположить, что соответствующий действительности передаточный механизм должен быть менее ограничительным, чем предложенные до сих пор коды. Расчеты показали, что распределение аминокислот в известных последовательностях, по-видимому, неотличимо от случайного. Из этого следует, что вряд ли две соседние аминокислоты „делят“ между собой одно общее для них основание; отношение числа оснований к числу аминокислотных остатков в образующемся белке должно быть равно по крайней мере трем.

Эти результаты подчеркивают необходимость дальнейшего экспериментального изучения относительного состава нуклеиновых кислот и белков в таких простых организмах, как, например, вирусы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Allfrey V. G., Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.) **40**, 881 (1954).
2. Avery O. T., MacLeod C. N., McCarty M., J. Exptl. Med., **79**, 137 (1944).
3. Beljansky M., Biochim. Biophys. Acta **15**, 425 (1954).
4. Bettelheim F. R., J. Am. Chem. Soc., **76**, 2838 (1954).
5. Block P., J. Biol. Chem., **135**, 51 (1940).
6. Borsook H., Deasy C.L., Haagen-Smit A.J., Keighley G., Lowy P. H., J. Biol. Chem., **196**, 669 (1952).
7. Brachet J., Embryologie Chimique, Masson, Paris, 1947.
8. Brachet J., Chantrenne H., Nature, **168**, 950 (1951).
9. Brown D. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., p. 52 (1952).
10. Brown D. M., Fassman G. D., Magrath D. I., Todd A. R., Cochran W., Woolfson M. M., Nature, **172**, 1184 (1953).
11. Caldwell P. C., Hinshelwood C. N., J. Chem. Soc., p. 3156 (1950).
12. Caldwell P. C., Mackor E. L., Hinshelwood C. N., J. Chem. Soc., p. 3151 (1950).
13. Caspersson T., Cell Growth and Cell Function, Norton, New York, 1950.
14. Caspersson T., Symp. Soc. Exptl. Biol., **1**, 127 (1947).
15. Chantrenne H., Symposium sur la biogenese des proteines, 2nd Congr. Intern. Biochim. Sedes, Paris, 1952.
16. Conden R., Gordon A. H., Martin A. J. P., Biochem. J., **44**, 548 (1949).
17. Dorner R. W., Knight C. A., J. Biol. Chem., **205**, 959 (1953).
18. Dounce A. L., Enzymologia, **15**, 251 (1952).
19. Felix K., Experientia, **8**, 312 (1952).
20. Felix K., Fisher H., Hartlieb J. Krekels A., Ramen H. M., Stamm W., 2nd Intern. Congr. Biochem., **190**, 199 (1952).
21. Flavin M., J. Biol. Chem., **210**, 771 (1954).
22. Gale E. F., Folkes J. P., Nature, **173**, 1223 (1954).

23. Gamow G., *Nature*, **173**, 318 (1954).
24. Gamow G., *Dan. Biol. Medd.*, **22**, 3 (1954).
25. Gamow G., Metropolis N., *Science*, **120**, 779 (1954).
26. Gaw H. Z., Stanley W. M., *J. Biol. Chem.*, **167**, 765 (1947).
27. Harrington C. R., Rivers R. V. P., *Nature*, **144**, 205 (1939).
28. Haurowitz F., *Chemistry and Biology of Proteins*, p. 334, Academic Press, New York, 1950.
29. Hershey A. D., Chase M., *J. Gen. Physiol.*, **36**, 39 (1952).
30. Hotchkiss R. D., *Exptl. Cell. Research, Suppl.*, **2**, 383 (1952).
31. Hultin T., *Exptl. Cell Research*, **1**, 376 (1950).
32. Keilin D., *Nature*, **172**, 390 (1953).
33. Keilin D., Tissières A., *Nature*, **172**, 393 (1953).
34. Keilin D., Ryley J. F., *Nature*, **172**, 451 (1953).
35. Knight C. A., *J. Biol. Chem.*, **171**, 297 (1947).
36. Ledley R. S., *Proc. Nat. Acad. Sci. (U. S.)* **41**, 498 (1955).
37. For a discussion of the structure and function of Hemoglobin, см. R. Lemberg, J. W. Legge, *Hematin Compounds and Bile Pigments*, Interscience, New York, 1949; M. Florkin, *Biochemical Evolution*, Academic Press, New York, 1949.
38. Lester R. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 5448 (1953).
39. Ludwig W., von Mutzenbecker P., *Z. physiol. Chem.*, **244**, 4 (1936).
40. Ludwig W., von Mutzenbecker P., *Z. physiol. Chem.*, **258**, 195 (1939).
41. Markham R., Smith J. D., *Biochem. J.*, **49**, 401 (1951).
42. Mirsky A. E., Ris H., *Nature*, **163**, 666 (1949).
43. Pardee A. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.)*, **40**, 263 (1954).
44. Pauling L., Corey R. B., *Proc. Roy. Soc.*, **141**, 21 (1953).
45. Perlman R. R., см. *Phosphorus Metabolism* (W. D. McElroy and B. Glass, eds.), Vol. 2. Johns Hopkins Press, Baltimore, 1952.
46. Popenoe E. A., Du Vigneaud V., *J. Biol. Chem.*, **206**, 353 (1954).
47. Porter R. R., Sanger F., *Biochem. J.*, **42**, 287 (1948).
48. Porter R. R., Sanger F., см. *Haemoglobin* (F. J. W. Roughton and J. C. Kendrew, eds.), Interscience, New York, 1949.
49. Pratt F., *Secret and Urgent*, Blue Ribbon Books, New York, 1939.
50. Rabinovitz M. P., Olson M. E., Greenberg D. M., *Abstracts of papers*, American Chemical Society, p. 3C, 1954.
51. Rich A., Watson J. D., *Nature*, **173**, 995 (1954).
52. Rich A., Watson J. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.)*, **40**, 759 (1954).
53. Roberts E., Ramasarma G. B., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **80**, 101 (1952).
54. Sanger F., *Advanc. Protein Chem.*, **7**, 1 (1952).
55. Schramm G., Kerekjarto V., *Z. Naturforsch.*, **76**, 589 (1952).
56. Shannon C. E., Weaver W., *Mathematical Theory of Communication*, Univ. of Illinois Press, Urbana, 1949.
57. Sinsheimer R. L., *J. Biol. Chem.*, **208**, 445 (1954).
58. Stalberg-Stenhagen S., Stenhagen E., *Arkiv. Kemi Mineral. Geol.*, **24B**, 1 (1947).
59. Stetten M. R., *J. Biol. Chem.*, **181**, 31 (1949).
60. Swenson P. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.)*, **36**, 699 (1950).
61. Thompson E. O. P., *J. Biol. Chem.*, **208**, 565 (1954).
62. Tristram G. R., см. *Haemoglobin* (F. J. W. Roughton and J. C. Kendrew, eds.), Interscience, New York, 1949.

63. Trommel J., Bijvoet J. M., Acta Cryst., 7, 703 (1954).
64. Vendreley R., Vendreley C., Experientia, 5, 327 (1949).
65. Watson J. D., Crick F. H. C., Nature, 171, 737 (1953).
66. Wilkins M. H. F., Seeds W. E., Stokes A. R., Wilson H. R., Nature, 172, 759 (1953).
67. Windsor E., J. Biol. Chem. 192, 595 (1951).
68. Locker R. H., Biochim. Biophys. Acta, 14, 533 (1954).
69. Bell P. H., J. Am. Chem. Soc., 76, 5565 (1954).
70. Thompson E. O. P., Biochim. Biophys. Acta, 10, 633 (1953).
71. Waldschmidt-Leitz E., Angew. Chem., 65, 349 (1953).
72. Felix K., Hirohata R., Dirr K., Z. physik. Chem., 218, 269 (1933).
73. Tuppy H., Bodo G., Monatsh., 85, 1024, 1182 (1954).
74. Schroeder W. A., Kay L. M., LeGette J., Honnen L., Green F. C., J. Am. Chem. Soc., 76, 3556 (1954).
75. Porter R. R., Biochem. J., 46, 473 (1950).
76. Sanger F., Tuppy H., Biochem. J., 49, 481 (1951).
77. Sanger F., Thompson E. O. P., Biochem. J., 52, iii (1952).
78. Harfenist E. J., J. Am. Chem. Soc., 75, 5528 (1953).
79. Acher R., Laurilla U. R., Thaureaux J., Fromageot C., Biochim. Biophys. Acta, 14, 151 (1954).
80. Ohno K., J. Biochem. (Japan), 41, 345 (1954).
81. Thompson A. R., Biochim. Biophys. Acta, 14, 581 (1954).
82. Flavin M., Anfinsen C. B., J. Biol. Chem., 211, 375 (1954).
83. Ottessen M., Wollenberg A., Compt. rend. Trav. Lab. Carlsberg Ser. chim., 28, 463 (1953).
84. Du Vigneaud V., Ressler C., Trippett S., J. Biol. Chem., 205, 949 (1953).
85. Thompson E. O. P., J. Biol. Chem., 207, 563 (1954).
86. Passmann J. M., Williamson M. B., Abstracts of Papers, American Chemical Society, p. 91C, Sept. 1954.
87. Hirs W. H., Moore S., Stein W., Abstracts of Papers American Chemical Society, p. 89C, 1954.
88. Anfinsen C. B., Redfield R. R., Choate W. C., Page J., Carroll W. R., J. Biol. Chem., 207, 201 (1954).
89. Redfield R. R. (личное сообщение).
90. Monier R., Jutisz M., Biochim. Biophys. Acta, 15, 62 (1954).
91. Abderhalden E., Bahn A., Z. physiol. Chem., 210, 246 (1933).
92. Abderhalden E., Bahn A., Z. physiol. Chem., 219, 72 (1933).
93. Kay L. M., Schroeder W. A., J. Am. Chem. Soc., 76, 3564 (1954).
94. Schroeder W. A. (личное сообщение).
95. Davie E. W., Neurath H., Biochim. Biophys. Acta, 10, 442 (1953).
96. Davie E. W., Ph. D. Thesis, Univ. of Washington, 1954.
97. Conden R., Gordon A. H., Biochem. J., 46, 8 (1950).

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	5
Р. Хафф и О. Джадд — Кинетика обмена железа	11
Литература	31
Н. Фриман — Инфракрасная спектроскопия	32
Введение	32
Интерпретация инфракрасных спектров	39
Общие замечания. Использование структурных корреляций	39
Другие способы интерпретации	46
Каталогизация спектров	49
Приборы	52
Спектрометры, выпускаемые промышленностью ...	52
Специальные устройства	54
Длинноволновая инфракрасная область	57
Недисперсные анализаторы	58
Инфракрасная микроспектроскопия	60
Отражательный микроскоп	60
Конденсор из хлористого серебра	65
Экспериментальная техника	67
Изготовление образцов	67
Метод прессованных образцов	68
Водные растворы	72
Количественный анализ	74
Применение инфракрасной спектроскопии в биохимии ...	75
Белки, полипептиды и аминокислоты	76
Нуклеиновые кислоты	84
Липиды	85
Стероиды	91
Углеводы	92
Бактерии	93
Ткани	97
Заключение	98
Литература	100
Д. Харкер — Применение рентгеноструктурного анализа к изучению кристаллических белков	106
Введение	106
Кристаллы	107

Диффракция рентгеновских лучей в кристалле	110
Симметрия кристаллических решеток	112
Определение молекулярных весов	114
Содержание растворителя в белковых кристаллах	116
Плотность белковых кристаллов	118
Интенсивности брэгговских отражений	118
Функция Паттерсона	122
Функции Паттерсона для белков	125
Электронная плотность кристалла	128
Результаты	130
Теория строения белка	132
Литература	135
Д. Мэзна — Биофизические и биохимические исследования	
клеточного деления	136
Проблема клеточного деления. Введение	136
Типы клеточного деления	138
Ядро	142
Митотические центры и звезды	144
Веретено митоза	146
Центромеры (кинетохоры)	152
Проблемы стимуляции митоза	153
Наращивание массы	154
Проблема критической массы	155
Существует ли пусковой механизм?	156
Возможные виды пусковых механизмов	158
Экспериментальная стимуляция клеточного деления	160
Подготовка к митозу	160
Становление полярности	161
Процессы, протекающие в ядре при подготовке к митозу	161
„Правила“, определяющие расположение частей митотического аппарата	165
Хронометраж митоза	166
Биохимия и биофизика митоза	167
Вещество митотического аппарата	167
Изолированный митотический аппарат	170
Образование митотического аппарата	173
Физические и химические изменения, связанные с митозом	178
Функционирование клетки во время митоза	181
Изменение размеров митотического аппарата в анафазе	182
Определение плоскости деления	184
Оптические исследования	185
Механизм движения хромосом	186
Цитокинез (деление клеточного тела)	193

Обсуждение действия различных антимитотических факторов	198
Литература	201
Г. Гамов, А. Рич и М. Икас — Проблема передачи информации от нуклеиновых кислот к белкам	205
Введение	205
Отношение нуклеиновых кислот к синтезу белков	206
Функции нуклеиновых кислот	206
Структурные особенности нуклеиновых кислот ...	209
Эмпирические данные	212
Порядок чередования аминокислот	212
Замещения аминокислот	219
Кодовые схемы системы нуклеиновая кислота — белок	224
Введение	224
Ромбический код	227
Треугольные коды (плотный и неплотный)	236
Код „старший — младший“	240
Код последовательного ряда	243
Использование символической логики	244
Некоторые статистические соображения	245
Корреляция между составом нуклеиновой кислоты и белка	245
Графики числа различных соседей	250
Графики распределения соседей	254
Заключение	260
Литература	261

ВОПРОСЫ БИОФИЗИКИ

Редактор *А. Б. ЛЕВИНА* переплет художник *А. И. Завьяловой*
 Технический редактор *Н. А. Иовлева*

Сдано в производство 30/V 1957 г. Подписано к печати 11/XI 1957 г.
 Бумага 84 x 108 $\frac{1}{32}$ = 4,2. бум. л. 13,7 печ. л
 Уч.-изд. л. 14,2 Изд. № 1/3486 Цена 12 руб. Зак. № типогр. заказа

ИЗДАТЕЛЬСТВО ИНОСТРАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ,
 Москва, Ново-Алексеевская, 52.

Государственная типография, 1957. — 6220/1. Венгрия

ИЗДАТЕЛЬСТВО ИНОСТРАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

ГОТОВИТ К ПЕЧАТИ

НОВЫЕ КНИГИ

Гранит Р. „Электрофизиологическое исследование рецепции“. Перевод с английского.

Книга принадлежит перу выдающегося шведского физиолога. Она представляет собой обзор современных данных по вопросу о восприятии внешних раздражений и о роли в этом процессе рецепторов и нервной системы в целом.

Предназначена для физиологов, биофизиков и научных работников в области медицины.

Бойд Д. Ж. „Авторадиография в биологии и медицине“. Перевод с английского.

Книга написана одним из создателей метода авторадиографии. Первые восемь глав посвящены теории вопроса. В них рассмотрены основы фотографического процесса, свойства и особенности фотоматериалов, процессы образования авторадиографического изображения и его характеристики. Специальное внимание уделено причинам возможных ошибок при работе.

В остальных шести главах описаны различные методы подготовки объектов и препаратов и сам процесс авторадиографии.

Издание предназначено для биологов и медиков.

Комар С. „Радиоактивные изотопы в биологии и сельском хозяйстве“. Перевод с английского.

Книга представляет собой сводку данных и методическое руководство по применению меченых атомов в биологии и сельском хозяйстве.

Отдельные главы посвящены вопросам охраны здоровья при работе с радиоактивными изотопами, организации лабораторий, аппаратуре, подготовке материалов, методам работы с изотопами и т. п.

Предназначена для научных работников в различных областях биологии и сельского хозяйства.

ВНИМАНИЮ ПОКУПАТЕЛЕЙ
ПОЛЬЗУЯСЬ ИНФОРМАЦИЕЙ О ВЫХОДЯЩИХ
КНИГАХ, СВОЕВРЕМЕННО ЗАКАЗЫВАЙТЕ
НЕОБХОДИМУЮ ЛИТЕРАТУРУ

Книжные магазины республиканских, краевых и областных книготоргов принимают предварительные заказы на выходящую литературу Издательства иностранной литературы.

Предварительный заказ оформляется на почтовой открытке в книжном магазине лично покупателем.

О поступлении заказанной литературы в книжный магазин покупатель извещается ранее заполненными почтовыми открытками.

Заказанные книги сохраняются в течение недельного срока.

**ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ЗАКАЗЫ ЭКОНОМЯТ ВРЕМЯ И ОБЕС-
ПЕЧИВАЮТ ПОКУПКУ НЕОБХОДИМЫХ КНИГ В ПЕРВЫЕ
ДНИ ПРОДАЖИ**

В том случае, если книжный магазин не заказал интересующую покупателя литературу и не ожидает ее поступления, предварительные заказы следует направлять в отделы „Книга — почтой“ для получения книг по почте наложенным платежом.

**СВОЕВРЕМЕННО ЗАКАЗЫВАЙТЕ НЕОБХОДИМУЮ ЛИТЕРА-
ТУРУ В КНИЖНЫХ МАГАЗИНАХ, ПОСЫЛАЙТЕ ПРЕДВАРИ-
ТЕЛЬНЫЕ ЗАКАЗЫ В ОТДЕЛЫ „КНИГА — ПОЧТОЙ“.**

Адрес отдела „Книга — почтой“, высылающего книги Издательства иностранной литературы:

Москва, Центр, ул. Кирова, 6.

