

ДИЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Б. И. Седунов и Д. А. Франк-Каменецкий

В последние годы усиленное внимание уделяется применению физики к биологическим проблемам. В связи с этим представляется интересным рассмотреть имеющиеся сведения об электрических свойствах живого вещества. Реакции нервов и мышц на электрические воздействия изучались давно и интенсивно. Обширный материал имеется также по измерению биотоков и биопотенциалов. Все эти вопросы относятся не к физике, а к физиологии. От физики здесь берутся только методы воздействия и исследования, сами же изучаемые процессы связаны с регулируемыми системами организма, составляющими основной объект физиологии. Новый этап в применении физики и химии к явлениям жизни связан, в частности, с развитием молекулярной биологии — направления, ставящего себе целью изучение не сложного организма с его регулируемыми системами, а живого вещества.

В работах по молекулярной биологии широко применяются оптические методы, электронный и ядерный пармагнитный резонанс, но сравнительно мало используются электрические свойства. Это связано со сложностью электрических характеристик биологических объектов, которая делает интерпретацию результатов электрических измерений зачастую неоднозначной и сомнительной. Такое неудовлетворительное состояние вопроса делает дальнейшее выяснение его особенно важным и желательным.

Настоящий обзор посвящен в основном тем электрическим свойствам живого вещества, которые не связаны с реакцией регулирующих систем организма. Важнейшим из них является дисперсия диэлектрической проницаемости.

1. ДИЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ И ПРОВОДИМОСТЬ

Живое вещество представляет собой коллоидную среду, пропитанную физиологическим раствором. Такая среда обладает прямой ионной проводимостью. Величина прямой проводимости зависит как от концентрации электролитов, так и от подвижности ионов и связана с тем биологически важным свойством, которое носит название клеточной проницаемости. С другой стороны, при наложении электрических полей в живом веществе могут происходить явления внутренней поляризации, т. е. смещения зарядов, создающих объемно распределенный дипольный момент. Все явления смещения зарядов могут быть описаны как диэлектрическая проницаемость живого вещества. При этом возможен сдвиг фаз между приложенным полем и внутренней поляризацией, вследствие чего диэлектрическая проницаемость оказывается, вообще говоря, комплексной.

Сдвиг фаз всегда связан с дисперсией и в простейших случаях возникает вследствие релаксационных явлений. Механизм внутренней поляризации может быть различным: смещение зарядов может происходить либо внутри молекулы, либо вследствие поворота полярной молекулы, либо, наконец, внутри структурных элементов, состоящих из большого числа молекул (макроструктурная поляризация). В одних случаях поляризация связана с молекулярной, в других — с макроскопической структурой вещества. Но для живого вещества макроскопическая структура не менее существенна, чем молекулярная. Поэтому, говоря о диэлектрических свойствах живого вещества, надлежит включить в это понятие на равных правах как молекулярную, так и макроструктурную поляризацию. Это тем более неизбежно, что на опыте различить явления той и другой природы крайне трудно, и эту задачу для ряда важнейших случаев до сих пор еще не удалось разрешить. Макроструктурную поляризацию обычно связывают с биологической структурой клеток или внутриклеточных элементов (таких, как митохондрии) и окружающих их оболочек (мембран). Однако нельзя считать исключенной возможность макроструктурных эффектов и при изучении биополимеров, обладающих не биологической, а коллоидной структурой. Лиофильные коллоиды склонны к образованию гелей (студней), таких, как, например, желатина или агар-агар. Такой студень представляет собой пористую среду, содержащую раствор электролита. Смещение ионов внутри пор может приводить к макроструктурной поляризации. Даже и в молекулярных растворах биополимеров наряду с молекулярной поляризацией возможна поляризация ионных атмосфер, окружающих молекулы полимера, в силу их полиэлектролитных свойств¹⁰. Такая полиэлектролитная поляризация по своему механизму близка к макроструктурной. Полного исключения всех макроструктурных эффектов можно достичь только при полном удалении влаги за счет тщательной сушки в вакууме (так называемая лиофильная сушка).

Поляризация, сопровождаемая сдвигом фаз, связана с потерями. Эти потери складываются с омическими потерями, вызванными прямой проводимостью. Для полной характеристики электрических свойств среды на частоте ω удобно вводить комплексную проводимость

$$\Lambda = \sigma + i \frac{\omega}{4\pi} \varepsilon,$$

где σ — прямая омическая проводимость, ε — комплексная диэлектрическая постоянная. Вещественная часть этой величины описывает все виды потерь.

Как прямая проводимость σ , так и комплексная диэлектрическая проницаемость ε обладают, вообще говоря, дисперсией. Поэтому комплексная проводимость Λ может иметь несколько областей дисперсии. Обратную величину центральной частоты дисперсии принято называть временем релаксации τ даже и тогда, когда она не связана по существу с релаксационными явлениями.

2. НИЗКОЧАСТОТНЫЙ ИНКРЕМЕНТ, ВЫСОКОЧАСТОТНЫЙ ДЕКРЕМЕНТ, КОЭФФИЦИЕНТ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ

Как правило, диэлектрическая проницаемость растворов биополимеров на низких частотах выше, а на высоких ниже, чем у чистой воды. Повышение низкочастотной проницаемости называют **и н к р е м е н т о м**, а понижение высокочастотной — **д е к р е м е н т о м** (рис. 1). Количественно инкремент или декремент относят обычно к единице концентрации. Низкочастотный инкремент может объясняться ориентацией

полярных групп в молекулах биополимера, проявляющейся только на низких частотах в силу малой подвижности. Было высказано предположение⁴⁸, что этот инкремент может быть связан и со смещением области дисперсии самой воды в сторону низких частот из-за структурирующего действия молекул биополимера на окружающую воду, приближающего свойства ее к свойствам льда. На этой гипотезе структурированной воды мы еще остановимся ниже. Высоко-частотный декремент наблюдается в той области частот, где внутренние вращения в молекулах биополимера не успевают уже за внешним полем, т. е. практически в диапазоне СВЧ (сантиметровые волны). В этой области диэлектрическая проницаемость раствора определяется вращением молекул воды. Молекула биополимера связывает некоторое число молекул окружающей ее воды, лишая эти молекулы способности к свободному вращению. В результате поляризуемость и диэлектрическая проницаемость раствора снижаются. Из этих соображений измерения высокочастотного декремента могут быть использованы для определения степени гидратации молекул биополимера, как это было сделано в работах^{67, 68}. У объектов, обладающих биологической структурой, низкочастотный инкремент может быть еще во много раз больше, чем у растворов, по причине макроструктурной поляризации. При разрушении биологической структуры макроструктурная поляризация исчезает и разница между низкочастотной и высокочастотной проницаемостью сглаживается. В качестве самой грубой меры наличия биологической структуры в некоторых работах используется отношение проницаемостей, измеренных на частотах порядка 10^4 и 10^6 гц. Это отношение иногда называют «коэффициентом жизнеспособности» или «поляризационным коэффициентом». При наличии биологической структуры коэффициент жизнеспособности за счет макроструктурной поляризации может достигать очень больших значений. После полного разрушения биологической структуры он падает до значений порядка единицы.

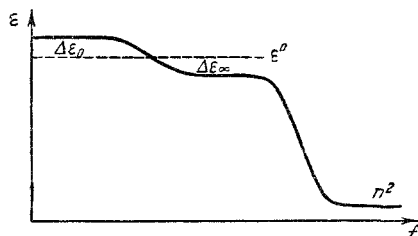


Рис. 1. Частотная зависимость диэлектрической постоянной раствора биополимера в воде.

ϵ^0 — диэлектрическая постоянная воды; n — оптический коэффициент преломления раствора; $\Delta\epsilon_0$ — низкочастотный инкремент; $\Delta\epsilon_\infty$ — высокочастотный декремент.

3. ФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ

Все развиваемые в литературе представления о природе поляризационных явлений в живом веществе могут быть сведены к следующим пяти основным физическим механизмам:

1. Дипольная ориентация.
2. Макроструктурная поляризация.
3. Структурированная вода.
4. Поляризация ионной атмосферы у полиэлектролитов.
5. Делокализация электронов.

Ориентация молекулярных диполей есть классический механизм, объясняющий высокую диэлектрическую проницаемость полярных веществ²². Время релаксации τ определяется в этом случае вращательным трением. Вблизи частоты, равной обратному времени релаксации, наблюдается дисперсия: вещественная часть комплексной диэлектрической проницаемости при этом падает от высокого значения ϵ_0 , связанного с ориентацией диполей, до низкого значения ϵ_∞ , зависящего только от внутренней

поляризуемости молекул. Для чистой воды область дисперсии лежит в диапазоне сантиметровых волн. Значение ϵ_0 около 80, $\epsilon_\infty \approx 3$. У полимеров, содержащих полярные группы, наблюдаются обычно две области дисперсии, связанные с двумя механизмами релаксации⁷². Для высокочастотной дисперсии определяющим механизмом является релаксация дипольных групп, т. е. вращение отдельных дипольных групп вокруг связей, присоединяющих их к полимерной цепи. Для низкочастотной дисперсии релаксационным механизмом является вращение целых сегментов полимерной молекулы. Этот механизм носит название дипольно-эластической релаксации, так как тем же временем релаксации определяются и механические свойства полимеров. Времена вращательной релаксации уменьшаются с повышением температуры. Эта зависимость особенно сильна для дипольно-эластической релаксации. Вследствие зависимости времени релаксации от температуры, при измерениях в узком диапазоне частот высокочастотная дисперсия (релаксация дипольных групп) наблюдается только при низких, а низкочастотная (дипольно-эластическая) релаксация — только при высоких температурах. Отсюда возникло распространенное мнение, что релаксация дипольных групп наблюдается только в стеклообразном, а дипольно-эластическая релаксация — только в высокоэластичном состоянии полимера. С расширением рабочего диапазона частот удалось наблюдать обе области дисперсии при постоянной температуре⁷³. Важнейшие биополимеры: белки и нуклеиновые кислоты — обладают большим числом полярных групп, и естественно ожидать у них дипольную поляризацию. В начале изучения электрических свойств биологических объектов все наблюдаемые дисперсионные явления объясняли дипольным механизмом. В дальнейшем была отмечена важная роль макроструктурной поляризации, которую мы уже упоминали и подробнее разберем ниже. Для объектов, обладающих биологической структурой, вопрос о разделении дипольного и макроструктурного механизмов в настоящее время еще не разрешен ни экспериментально, ни теоретически. В растворах биополимеров дипольная ориентация должна проявляться в более чистом виде, но тут на нее могут накладываться специфические механизмы, которые мы сейчас рассмотрим.

На основании ряда соображений была высказана гипотеза, что вода в организме находится в структурированном состоянии^{71, 50, 18}. Предполагается, что молекулы биополимеров вносят в окружающую воду дальний порядок, приводя ее в некое квазикристаллическое состояние, приближающееся по своим свойствам ко льду. Было предложено применить эту гипотезу структурированной воды к объяснению электрических свойств растворов биополимеров. При этом низкочастотный инкремент должен объясняться тем, что статическая проницаемость воды при структурировании приближается к более высокой статической проницаемости льда. Область дисперсии у льда лежит при гораздо более низких частотах, чем у воды. Низкочастотная дисперсия, наблюдаемая в растворах биополимеров, в цитированных работах рассматривалась как дисперсия структурированной воды, приближающаяся к области дисперсии льда. Эти соображения не могут считаться убедительными и были подвергнуты вполне обоснованной критике в¹⁵. В последней работе был указан еще один возможный механизм поляризации в растворах биополимеров, связанный с их полиэлектролитными свойствами¹⁰. Молекула биополимера в растворе отщепляет ионы и превращается в полиэлектролитный ион, несущий на себе заряды. Всякий ион притягивает к себе из окружающего раствора ионы противоположного знака, образующие вокруг него ионную атмосферу. В случае полиэлектролита ионной атмосфере можно приписывать поверх-

ностную проводимость. При действии внешнего поля ионная атмосфера поляризуется. Поляризация ее складывается с поляризацией самого биополимера и дает вклад в диэлектрическую проницаемость системы. Согласно ¹⁵ электрические свойства полиэлектролита можно описывать посредством теории макроструктурной поляризации, заменяя в грубом приближении молекулы биополимера шариками радиуса a с комплексной проводимостью Λ_i , а поверхностную проводимость λ учитывать добавлением к Λ_i поправки $\frac{\lambda}{a}$.

Во всех рассмотренных механизмах поляризации участвовали дипольные молекулы или ионы. В последнее время в литературе ^{70, 71} обсуждается вопрос о наличии в живом веществе полупроводниковых или родственных им явлений. В этом случае поляризация может происходить от смещения электронов (или дырок). Для этого не обязательно, чтобы вещество являлось истинным полупроводником. Достаточно того, чтобы имела место делокализация электронов. Простейшим примером такой делокализации являются сопряженные связи, т. е. чередование простых и двойных связей между атомами углерода в цепи или в кольце. Делокализация электронов в системах с сопряженными связями обнаруживается экспериментально по сужению линий электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Этот эффект наблюдался и у биополимеров ^{59, 62}. Эти данные говорят за то, что у биополимеров можно ожидать наличия полупроводниковых свойств. Для белков были произведены ⁷² методами квантовой химии расчеты ширины запрещенной зоны, из которых был сделан вывод о возможности полупроводниковых явлений. Проведенные с белками эксперименты на постоянном токе свидетельствуют о наличии проводимости, экспоненциально возрастающей с температурой ^{74, 75} и содержанием влаги ^{76, 85}. Эта проводимость истолковывалась как полупроводниковое явление. Следует, впрочем, отметить, что прямых доказательств электронного или дырочного характера этой проводимости (таких, как холл-эффект или фотопроводимость) для белков до сих пор нет. Таким образом, наличие полупроводниковых явлений в белках не может считаться строго доказанным, но ряд данных в пользу существования их имеется. У хлорофилла ⁸² и других фотосинтетических пигментов ⁶⁹ обнаружена фотопроводимость. В самое последнее время были высказаны предположения ⁸³ о возможной роли в свойствах биополимеров особого типа делокализации электронов, связанного с образованием комплексов переноса заряда (КПЗ). Так называли молекулярные соединения, состоящие из молекул с существенно различным сродством к электрону. Здесь при образовании молекулярного соединения может происходить внутренняя ионизация с переходом электрона от одной молекулы к другой. Аналогичных явлений можно ожидать и в полимерной цепи, где рядом стоят две группы с различным сродством к электрону. Все явления делокализации электронов могут давать свой вклад в поляризуемость и диэлектрическую проницаемость, но экспериментальное обнаружение ее затруднительно, поскольку она маскируется очень сильными ионными и дипольными эффектами.

4. ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И КЛЕТОЧНАЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ

Одной из важнейших проблем физиологии клетки является проблема проницаемости. Известно, что в живую клетку растворенные вещества из внешней среды проникают медленно. После гибели клетки проницаемость резко возрастает. Для таких объектов, как мышечные и нервные клетки, известно явление возбуждения, сопровождаемое некоторым

повышением проницаемости. Можно сказать, что возбуждение аналогично гибели, но только возрастание проницаемости при возбуждении слабее и имеет обратимый характер. У высших организмов, обладающих регулируемыми системами, известны явления активного транспорта, когда диффузия происходит против градиента концентрации. Примерами могут служить натриевый насос, выкачивающий натрий из нервных клеток, явления секреции в железах и высокое давление кислорода в плавательном пузыре глубоководных рыб.

По вопросу о механизме клеточной проницаемости существуют две противоположные точки зрения. Классическая мембранная теория считает, что клетка окружена сплошной оболочкой, препятствующей диффузии. Повышение проницаемости при гибели клетки объясняется по этой теории разрушением (лизисом) оболочки. Мембранная теория является господствующей в западной литературе. В нашей стране работами школы Д. Н. Насонова, В. Я. Александрова, А. С. Трошина^{8, 12} развита противоположная точка зрения, получившая название фазовой теории. Согласно этой теории клеточная оболочка пронизана субмикроскопическими отверстиями и не является труднопроницаемой мембраной. Морфологическими исследованиями⁷⁷ с несомненностью установлено существование в клетке многочисленных слоистых структур, к числу которых относится внешняя оболочка, а также такие важные внутриклеточные органы, как митохондрии и хлоропласты. Слоистые структуры состоят в большинстве случаев из чередующихся слоев белковых и липоидных (жироподобных) веществ. По выражению одного из сторонников фазовой теории⁷ «липидно-белковая решетка, являясь как бы поверхностным скелетом клетки, отделяющим протоплазматическую фазу из белковых диполей от межклеточной жидкости, играет несравненно более простую роль в клеточной физиологии, чем гипотетическая клеточная мембрана». Согласно фазовой теории клеточная проницаемость определяется коллоидными свойствами протоплазмы. Протоплазма представляет собою двухфазную систему, состоящую из коллоидных мицелл и интермицеллярной жидкости. Растворенные вещества из жидкой фазы адсорбируются на развитой поверхности коллоидных частиц, чем и объясняется пониженная проницаемость живой клетки. Повышение проницаемости при гибели клетки фазовая теория объясняет необратимой коагуляцией коллоидных систем клетки. Аналогичные явления, но только обратимого характера, происходят при возбуждении. Диэлектрическая проницаемость по этой теории должна быть связана не с макроструктурной, а с молекулярной поляризацией. Обычно фазовая теория клеточной проницаемости ассоциируется с дипольной теорией диэлектрической проницаемости, как видно из цитаты, приведенной выше.

Окончательное решение вопроса о механизме клеточной проницаемости должно базироваться на анализе широкого экспериментального материала, интерпретация которого представляет весьма трудную задачу. До сих пор вопрос этот остается дискуссионным. Изучение биопотенциалов не дает однозначного ответа⁷⁸. Исследование электрических свойств клеток представляет большой интерес с этой точки зрения, так как мембранной теории проницаемости соответствует теория макроструктурной поляризации, а фазовой теории проницаемости — молекулярный механизм поляризации, или, как обычно считают, дипольная теория. К сожалению, макроструктурная и дипольная теории приводят к тождественному виду дисперсионной формулы, так что форма дисперсионной кривой еще не дает никаких указаний на механизм. Сторонники мембранной теории считают важным доводом в пользу ее согласие между значениями толщины мембраны, вычисленными из статической проницаемости и из времени релаксации³². Сторонники фазовой теории пользуются для аргу-

ментации температурной зависимостью проводимости. В работе⁷ исследовалась электропроводность крови на двух частотах 10^4 и 10^6 гц при двух температурах 25 и 56° С. Оказалось, что низкочастотная проводимость сильно возрастает с температурой, высокочастотная же проводимость зависит от температуры тем слабее, чем выше концентрация эритроцитов. Отношение низкочастотной и высокочастотной проводимостей (коэффициент жизнеспособности) обращается в единицу только при 75° С. В пределах от 25 до 56° С проницаемость мембраны резко возрастает, а между тем диэлектрические свойства сохраняются. Автор считает, что эти результаты свидетельствуют в пользу фазовой теории проницаемости.

Имеющийся в настоящее время материал об электрических свойствах клеток явно недостаточен для обоснованного решения вопроса о механизме клеточной проницаемости. В то же время в литературе все более распространяется мнение, что именно электрические измерения могут дать наиболее надежные данные для решения этого вопроса. Но для этого необходимо более глубокое и детальное исследование комплексной проводимости клеток в зависимости от различных параметров и выяснение внутреннего механизма поляризации.

5. ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОПОЛИМЕРОВ

Из работ, посвященных исследованиям электрических свойств выделенных и очищенных биополимеров, мы рассмотрим здесь только две группы, имеющие определенную идейную направленность. Одна группа работ выполнялась на растворах, другая — на прессованных таблетках. Задачей исследований в одном случае было выяснение степени гидратации и формы белковых молекул в растворе по высокочастотному декременту, в другом — поиски аномалий в электрических свойствах нуклеиновых кислот в связи с их особой биологической ролью.

а) Высокочастотный декремент и свойства молекул белков

В работах^{67, 68} измерения высокочастотного декремента в растворах белков использовались для суждения о форме белковых молекул и степени их гидратации в растворе. Измерялась диэлектрическая проницаемость раствора на волнах сантиметрового диапазона. Обработка результатов производилась по формуле

$$\varepsilon - \varepsilon_v = \frac{\beta p}{1 - p} (\varepsilon_b - \varepsilon_v),$$

где ε — проницаемость раствора, ε_v — чистой воды, ε_b — чистого белка, p — объемная доля белка в растворе, β — коэффициент, близкий к 3/2, точное значение которого зависит от формы белковой молекулы. Значения этого коэффициента были вычислены, принимая молекулу за эллипсоид вращения, в зависимости от отношения его осей. Для разбавленных растворов приведенная формула записывается приближенно как

$$\varepsilon \approx \varepsilon_v - \beta p (\varepsilon_b - \varepsilon_v) = \varepsilon_v - \delta C,$$

где C — весовая концентрация белка в граммах на 100 см³ раствора. Декремент δ выражается как

$$\delta = \frac{\beta}{100} [(\varepsilon_b - \varepsilon_{\infty b}) v + (\varepsilon_v - \varepsilon_{\infty v}) w],$$

где v — парциальный удельный объем белка, w — вес связанной воды

на 1 г белка. Последняя формула выведена в предположении, что связанная вода не участвует во вращении диполей. Анализ экспериментальных данных с помощью этих формул привел к выводу, что количество связанной воды для всех исследованных белков составляет около 0,3 г на 1 г белка. Этот вывод согласуется с результатами других физико-химических измерений и резко расходится с гипотезой структурированной воды, согласно которой количество связанной воды должно было быть во много раз больше. Определение формы молекул оказалось гораздо более затруднительным, так как значение β весьма мало чувствительно к форме. Только для двух из исследованных белков удалось сделать качественный вывод, что форма молекул удлинненная, что согласуется с другими физико-химическими данными.

б) Электрические свойства нуклеиновых кислот

Электрические свойства нуклеиновых кислот возбуждают в последнее время очень большой интерес в связи с тем фундаментальным значением, которое приписывается этим веществам в современной молекулярной биологии. Еще в работе⁴⁷ в измерениях с натриевой солью дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК*) были получены очень большие значения диэлектрической проницаемости, а время релаксации оказалось гораздо меньше, чем отвечало бы повороту длинной оси молекулы. Предлагалось объяснять эти результаты тем, что дипольный момент вдоль длинной оси отсутствует, но молекула имеет очень большой поперечный электрический момент порядка 20 000 единиц Дебая. Последующие исследователи получили еще гораздо более сложные и противоречивые результаты. В работе³⁹ волокна натриевой соли ДНК, содержавшие около 20% воды, зажимались в виде слоя толщиной около 1 мм между пластинами плоского конденсатора. На частоте 50 циклов при амплитудах электрического поля 100—1000 в/см при температурах 30—50° С наблюдались циклы гистерезиса, подобные тем, какие характерны для сегнетоэлектриков. Эти циклы исчезали как при понижении температуры до 0—10° С, так и при повышении ее до 60° С. В работе был сделан вывод, что ДНК обладает сегнетоэлектрическими свойствами. Температуру 60° С предлагалось рассматривать как точку Кюри. При приближении к ней диэлектрическая проницаемость возрастала. На частоте 1000 гц значения диэлектрической проницаемости доходили до 500 при 30° С и до 140 000 при приближении к «точке Кюри». Однако в следующей работе той же лаборатории⁴⁰ было показано, что все эти явления существенным образом связаны с наличием воды в исследуемых образцах. Полностью обезвоженная натриевая соль ДНК ведет себя, по выражению авторов, «как изолятор». Нелинейные эффекты обнаруживаются, начиная с 20% воды, и цикл гистерезиса наиболее ярко выражен при содержании воды около 40%. При увеличении содержания воды свыше 50% прямая проводимость становится слишком велика для интерпретации результатов измерений. «Точка Кюри» близ 50° С объясняется просто термической дегидратацией образцов. Все эти результаты получены на частоте 50 гц. При повышении частоты до нескольких кгц диэлектрическая проницаемость падала с нескольких тысяч до значений меньше 10. Следует отметить, что измерения велись с электродами из полированной платины и никаких мер для исключения электродной поляризации не принималось. Сами авторы делают вывод, что разделение истинных диэлектрических эффектов и явле-

*) В оригинальной работе используется старое название «тимонуклеиновая кислота», что соответствует современному термину ДНК.

ний, связанных с ионной проводимостью, требует дальнейших экспериментальных исследований.

В последнее время вопрос об электрических свойствах нуклеиновых кислот сделался еще более актуальным в связи с работами⁵⁹⁻⁶⁰, в которых были обнаружены у этих объектов широкие полосы магнитного резонанса. Измерения производились в условиях, обычно принятых для изучения электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), но наблюдавшиеся широкие линии поглощения имеют, по-видимому, ферромагнитную природу^{79, 80}. Предлагалось⁵⁹ связать эти явления с молекулярной структурой биополимеров, с наличием делокализованных электронов, приводящим к явлениям полупроводникового характера или к образованию комплексов переноса заряда (КПЗ). В подобных случаях аномальные магнитные свойства биополимеров должны сочетаться с аномальными электрическими свойствами. Однако тщательные эксперименты⁸¹ указывают на существенную роль ферромагнитных примесей (железа и его окислов) в наблюдавшихся магнитных эффектах. Вопрос о природе широких линий магнитного резонанса и нуклеиновых кислот является в настоящее время предметом острой дискуссии. Если эти линии обусловлены целиком ферромагнитными примесями, как доказывается в⁸¹, то подлежит еще выяснению, вносятся ли эти примеси в процессе приготовления препаратов или они являются необходимой составной частью живого вещества и играют определенную биологическую роль⁶⁰. Следует отметить, что изменение величины магнитных эффектов в определенных фазах жизнедеятельности клеток еще не является доказательством их биологического значения. В самом деле, в жизнедеятельности клеток фундаментальную роль играют окислительные процессы и в связи с протеканием этих процессов железа, входящее в состав ферромагнитных соединений, может подвергаться окислению и восстановлению, меняя при этом свои магнитные свойства. Таким образом, процессы биологического окисления могут влиять на магнитные свойства железа даже и в том случае, если это железо является случайной примесью и не играет никакой биологической роли. Но, конечно, не исключена и возможность существенной биологической роли ферромагнитных веществ. Если широкие линии магнитного резонанса происходят от ферромагнитных примесей, то независимо от их биологической роли трудно ожидать какой-либо связи их с электрическими свойствами.

Таким образом, имеющиеся данные об электрических свойствах нуклеиновых кислот крайне неясны и противоречивы. Вопрос этот требует детального экспериментального изучения.

6. ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

Объектами электрических измерений являются как целые ткани, так и отдельные клетки, а также составные части клеток. Как известно, ткани и отдельные клетки содержат большое количество воды с растворенными в ней минеральными солями, которые находятся в диссоциированном состоянии. Постоянный обмен ионов между клеткой и внешней средой обеспечивает содержание ионов внутри клетки, близкое по порядку величины к их содержанию во внешней среде. Однако, несмотря на это, проводимость тканей и клеток на низких частотах значительно ниже проводимости среды. Так, еще в прошлом веке были поставлены опыты по измерению проводимости взвеси эритроцитов. Эритроциты крови заменялись равным по концентрации кварцевым песком, и при этом результаты измерений проводимости суспензии эритроцитов и взвеси песка оказались одинаковыми, что говорит о том, что на низких частотах проводи-

мость эритроцитов равна нулю¹. Этот результат подтверждается при измерении зависимости низкочастотной проводимости суспензии клеток σ_0 , взвешенных в среде с проводимостью σ_a , от объемной концентрации p . Получается очень хорошее согласие с формулой Максвелла², полученной для взвеси непроводящих шариков в среде с известной проводимостью

$$\sigma_0 = \sigma_a \frac{1-p}{1+\frac{p}{2}}. \quad (1)$$

Наличие дисперсии диэлектрической постоянной на частотах порядка 1 Мгц и связанного с этим значительного увеличения активной составляющей проводимости заставило исследователей выдвинуть несколько гипотез, объясняющих внутреннее строение клеток³, наиболее важными из которых являются мембранная и дипольная.

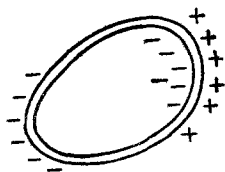


Рис. 2. Схема макроструктурной поляризации.

Клетка находится в растворе, в котором течет ток.

Согласно мембранной гипотезе^{4, 5} клетка представляет собой пузырек жидкости, содержащей ионы в свободном состоянии, ограниченный исключительно тонкой мембраной, обладающей очень низкой проводимостью. При этом благодаря макроструктурной поляризации^{2, 6} (называемой еще механизмом Максвелла — Вагнера) при измерении диэлектрической проницаемости тканей и суспензий клеток на низких частотах получаются очень большие значения ϵ — порядка 10^3 и более.

Согласно второй, дипольной, гипотезе^{3, 7-9} клетка представляет совокупность дипольных белковых молекул, а вместо мембраны предполагается липоидо-белковая решетка, вовсе не обладающая высокими изоляционными свойствами.

Электронно-микроскопические наблюдения подтверждают наличие мембраны^{11, 77}.

Кроме этих теорий, имеется теория, предполагающая наличие обоих механизмов^{13, 14}, а также теория, допускающая свободное движение ионов не в пределах всей клетки, а в ограниченных областях внутри нее¹⁵.

Изучение только лишь одной частотной зависимости проницаемости не может дать определенного ответа в пользу той или иной гипотезы. Поэтому важны опыты, дающие зависимость проницаемости от температуры^{7, 16}, от функционального состояния¹⁷, от содержания ионов во внешней среде¹⁹⁻²¹.

а) Д и с п е р с и я

В общем случае диэлектрические свойства вещества представляют в комплексном виде

$$\epsilon = \epsilon' - i\epsilon'', \quad (2)$$

где ϵ' — диэлектрическая постоянная, ϵ'' — мнимая часть, связанная с потерями; ϵ'' связана с проводимостью посредством соотношения

$$\epsilon'' = \frac{4\pi\sigma}{\omega}. \quad (3)$$

Отношение $\frac{\epsilon''}{\epsilon'}$ называется тангенсом угла потерь. Простейшая теория дисперсии была получена Дебаем для полярной жидкости. Как сейчас известно, эта теория справедлива в случае любого механизма поляризации при наличии одного времени релаксации τ . Эта теория

дает для комплексной диэлектрической проницаемости ε следующий вид частотной зависимости после исключения прямой омической проводимости:

$$\varepsilon - \varepsilon_{\infty} = \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_{\infty}}{1 + i\omega\tau}, \quad (4)$$

где ε_0 и ε_{∞} — асимптотические значения диэлектрической постоянной на частотах соответственно ниже и выше области дисперсии.

Можно записать отдельно выражения для мнимой и вещественной частей ε :

$$\varepsilon' - \varepsilon_{\infty} = \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_{\infty}}{1 + (\omega\tau)^2}, \quad (5a)$$

$$\varepsilon'' = \frac{(\varepsilon_0 - \varepsilon_{\infty}) \omega\tau}{1 + (\omega\tau)^2}. \quad (5б)$$

С учетом прямой омической проводимости σ_0 последнее равенство переписывается в виде

$$\sigma - \sigma_0 = \frac{(\sigma_{\infty} - \sigma_0) (\omega\tau)^2}{1 + (\omega\tau)^2}, \quad (6)$$

где σ_0 и σ_{∞} — асимптотические значения проводимости на частотах ниже и выше области дисперсии соответственно.

Если изобразить ε или σ на комплексной плоскости, то в обоих случаях должны получиться полуокружности (рис. 3). Так, откладывая

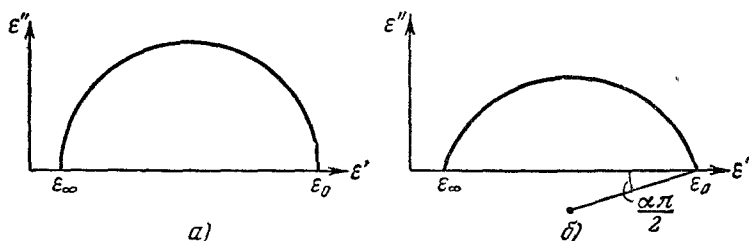


Рис. 3. Диаграмма ε на комплексной плоскости в случае: а) простого механизма дисперсии; б) механизма Коула — Коула.

по оси абсцисс ε' , по оси ординат ε'' , получим полуокружность с центром на оси абсцисс и пересекающую эту ось в точках ε_0 и ε_{∞} . Точка, где ε'' максимальна, соответствует центральной частоте дисперсии ω_c

$$\omega_c = \frac{1}{\tau}. \quad (7)$$

В ряде случаев совпадение эксперимента с простейшей теорией дисперсии очень хорошее. Но очень часто получается более широкая, нежели теоретическая, область дисперсии; при этом и максимум ε'' бывает меньше.

Если в этом случае вычертить график ε на комплексной плоскости, то получим дугу, центр которой находится ниже оси абсцисс^{21,23-25}. Такие кривые хорошо описываются полуэмпирической формулой

$$\varepsilon - \varepsilon_{\infty} = \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_{\infty}}{1 + (i\omega\tau)^{1-\alpha}}. \quad (8)$$

Смысл параметра α ясен из чертежа. Когда $\alpha = 0$, получается формула Дебая. В большом числе экспериментов получается хорошее соответствие с (8).

Если представить измерительный конденсатор, заполненный веществом, в виде эквивалентной схемы, то получается схема²³ (рис. 4), где $\tilde{Z} = \frac{\tau (i\omega\tau)^{-\alpha}}{\epsilon_0 - \epsilon_\infty}$; при $\alpha = 0$ $\tilde{Z} = R = \frac{\tau}{\epsilon_0 - \epsilon_\infty}$. \tilde{Z} обладает тем свойством, что у него с частотой меняется только модуль, угол же сдвига фаз остается постоянным. Параметр α часто связывают с распределением времен релаксации τ . Однако когда из формулы (8) попытались вывести спектр времен релаксации, то вместо естественной гауссовской кривой

$$F(s) ds = \frac{b}{\sqrt{\pi}} e^{-b^2 s^2} ds \quad (9)$$

получили формулу, которой не удалось приписать никакого физического смысла^{23, 26}:

$$F'(s) ds = \frac{1}{2\pi} \frac{\sin \alpha \pi}{\operatorname{ch} (1-\alpha)s - \cos \alpha \pi} ds; \quad (10)$$

здесь

$$s = \ln \left(\frac{\tau}{\tau_0} \right).$$

Формула (9) — гауссовский закон распределения времен релаксации, b — ширина распределения.

В литературе встречаются попытки^{23, 24, 33} объяснить импеданс $\tilde{Z} = Z(i\omega)^{-\alpha}$, называемый поляризационным, так как с подобным явлением сталкиваются при рассмотрении проводимости граничного слоя металл—электролит. Аналогичное явление имеет место и в тонком слое фотоэлемента и в некоторых плохих диэлектриках.

Предполагают, что импеданс самой мембраны является не емкостным, а поляризационным. Такое предположение объясняет результаты эксперимента. При $\alpha = 1$ получается чисто емкостной характер мембраны. При этом мембрана непроницаема для ионов.

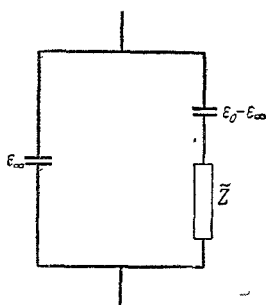


Рис. 4. Эквивалентная схема конденсатора, заполненного исследуемым веществом.

Согласно концепции Нернста—Варбурга о диффузионном характере поляризационного импеданса указанное явление можно объяснить²⁴ разной проницаемостью мембраны для противоположно заряженных ионов. На поверхности, совершенно непроницаемой для одного вида ионов и совершенно проницаемой для другого, эта теория дает $\alpha = 0,5$. При совершенной проницаемости для всех ионов получим $\alpha = 0$. Для случая неполной избирательности эта теория не развита, но предполагается, что можно получить любое значение α , лежащее между нулем и единицей, при надлежащих предположениях о характере проницаемости мембраны. В некоторых случаях значение центральной частоты, полученное из дисперсии ее мнимой части, не совпадает со значением центральной частоты, полученной из дисперсии ее мнимой части. При этом за центральную частоту $\omega_0 = \frac{1}{\tau_0}$ берут²¹ среднее геометрическое из ω_{ce} и ω_{cs}

$$\omega_0 = \frac{1}{\tau_0} = \sqrt{\omega_{ce} \omega_{cs}}. \quad (11)$$

При диэлектрических измерениях биологических объектов получают три области дисперсии, называемые α , β и γ ²⁷.

Природа α -дисперсии наименее понятна. Она занимает область частот от 0 до 10^4 гц. В этой области очень трудно получить точные значения ϵ'

из-за влияния поляризации электродов, очень сильно затрудняющего эксперимент.

Больше всего экспериментов ^{5, 21, 24, 27}, проведено по исследованию β -дисперсии, которая располагается в диапазоне от 10^4 до 10^8 *гц*. Как видно из формул (5), область дисперсии занимает две декады. Здесь же указана более широкая область частот из-за зависимости области дисперсии от вида объекта. Именно при рассмотрении β -дисперсии и возникают разногласия между сторонниками мембранной и дипольной гипотез.

γ -Дисперсия располагается в сантиметровом диапазоне. Это дисперсия диэлектрической проницаемости воды.

б) Оценка толщины мембраны

Впервые мембранная гипотеза была выдвинута Фрике в 1925 г. ⁴. Он же первый вычислил значение емкости мембраны C_m , приходящейся на квадратный сантиметр. Значения C_m в разнообразных измерениях ^{21, 28-31} примерно одинаковы: 0,5—1,5 *мкф/см²*.

Эксперименты по определению C_m проводятся на суспензиях клеток в слабом растворе электролита. Подобные измерения были проведены для эритроцитов крови различных животных ³⁰, для некоторых типов бактерий ²⁵, для дрожжевых клеток ²⁸ и для митохондрий ^{21, 32}, которые являются уже составным элементом клетки. Во многих случаях форма частиц близка к сферической. Поэтому к ним подходит теория проводимости взвеси экранированных сфер ³⁶. В основе этой теории лежит формула, полученная впервые Максвеллом ² для проводимости взвеси шариков с проводимостью σ_i в среде с проводимостью σ_a :

$$\frac{\sigma - \sigma_a}{\sigma + 2\sigma_a} = p \frac{\sigma_i - \sigma_a}{\sigma_i + 2\sigma_a}. \quad (12)$$

Здесь σ — проводимость взвеси. Формула верна, если вместо σ в ней будет стоять комплексная проводимость Λ или диэлектрическая проницаемость ϵ . p — объемная концентрация шариков. Формула справедлива при $p \ll 1$.

Некоторые исследователи выводят формулы, справедливые и при $0 \leq p \leq 1$ ³⁴, а также справедливые для взвеси тел эллипсоидальной формы ^{34, 35}. Формула, связывающая комплексную проводимость клетки Λ_n с параметрами клетки, аналогична (12). Клетка представляется в виде двух концентрических сфер; внутренность меньшей заполнена средой с комплексной проводимостью Λ_i , пространство между сферами, т. е. мембрана, — средой с Λ_m . Внешний радиус клетки R , толщина мембраны d :

$$\frac{\Lambda_n - \Lambda_m}{\Lambda_n + 2\Lambda_m} = \left(\frac{R - d}{R} \right)^3 \frac{\Lambda_i - \Lambda_m}{\Lambda_i + 2\Lambda_m}. \quad (13)$$

Подставляя вместо Λ_a , Λ_i активные проводимости σ_a и σ_i , а также диэлектрические постоянные ϵ_a и ϵ_i и считая, что мембрана обладает крайне низкой активной проводимостью, которую можно не учитывать, и диэлектрической постоянной ϵ_m , получают следующие формулы ³⁶ из (12) и (13):

$$\epsilon_0 - \epsilon_a \approx 9\pi p R C_m, \quad (14)$$

$$\epsilon_\infty = \epsilon_a \frac{(1 + 2p)\epsilon_i + 2(1 - p)\epsilon_a}{(1 - p)\epsilon_i + (2 + p)\epsilon_a}, \quad (15)$$

$$\sigma_\infty = \sigma_a \frac{1 + 2p \frac{\sigma_i - \sigma_a}{\sigma_i + 2\sigma_a}}{1 - p \frac{\sigma_i - \sigma_a}{\sigma_i + 2\sigma_a}}, \quad (16)$$

$$\tau = R C_m \frac{\sigma_i + \sigma_a}{2\sigma_i \sigma_a}, \quad (17)$$

$$C_m = \frac{\epsilon_m}{4\pi d}. \quad (18)$$

Здесь величины ε_0 , ε_∞ , σ_0 , σ_∞ , характеризующие суспензию, получают непосредственно из опыта. Из формулы (1) можем сразу найти p . Затем, зная p , можем из (16) найти σ_i . И зная $\tau = \frac{1}{\omega_c}$ из опыта, можем найти C_m . Конечно, для этой цели нужен еще и микроскоп, так как требуется определить R . Вторым путем ³⁷ для нахождения C_m является использование (14). В этом случае также необходимо знание радиуса взвешенных клеток. Однако чаще всего исследуемые клетки обладают не одним значением радиуса, а распределением их относительно некоторого среднего значения ²¹. В этом случае можно изучить это распределение с помощью микроскопа, сосчитав количество клеток, обладающих данным радиусом R_i . Зная объемную долю всех клеток p , можем найти объемную долю p_i клеток радиуса R_i . После этого (14) преобразуется в (19),

$$\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty = 9\pi C_m \sum_i p_i R_i^3. \quad (19)$$

Как видно из (18), зная C_m , нельзя ничего сказать о толщине мембраны d , не зная ε_m . Толщина мембраны, отнесенная к веществу с $\varepsilon_m = 1$, имеет порядок 10 Å. Некоторые авторы считают, что ε_m имеет порядок 3. Они опираются на данные об оптическом коэффициенте преломления ^{25, 30} $n = \sqrt{\varepsilon}$, которые дают для ε_m величину порядка 3. При этом они предполагают, что ε_m не меняется от частот, на которых проводится измерение C_m , до оптических частот. Цифру 3 можно получить, если считать, что мембрана состоит из жиров. Другие авторы³, предполагающие, что значительную часть мембраны составляют белки, дают для ε_m величины большие 30 или даже 100.

7. ИЗУЧЕНИЕ ДИЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МАКРОМОЛЕКУЛ

Большой интерес представляет изучение составных частей клетки с точки зрения их диэлектрического поведения. Важность знания конфигурации электрических зарядов состоит в возможности объяснить различные физико-химические свойства макромолекул³⁸. Здесь исследование идет по нескольким путям: 1) изучение полярных молекул в растворе такой концентрации, где взаимодействие макромолекул становится малым и 2) изучение свойств макромолекул в блоке, т. е. исследование таблеток, приготовленных из этого вещества. Характерными для второго способа работами являются работы Садрона и его сотрудников по исследованию диэлектрических свойств таблеток, состоящих из ДНК с 20%-ным содержанием воды³⁹. Как видно из ⁴⁰, эти опыты трудно интерпретировать. Скорее всего здесь самую существенную роль играет вода.

Первый же метод распадается на два:

а) исследование веществ с низким диэлектрическим инкрементом, в основном белков;

б) исследование веществ с высоким диэлектрическим инкрементом — так называемых высокополиэлектролитов или просто полиэлектролитов.

Сейчас мы рассмотрим исследование диэлектрических свойств белков в растворе. Наиболее известным представителем данного направления является Онкли^{41, 42}.

Если мы имеем смесь диполей двух типов, то при измерении частотной зависимости вещественной части диэлектрической проницаемости $\varepsilon'(\omega)$ (далее будем обозначать просто ε) получим кривую, имеющую две области дисперсии⁴¹. Это имеет место при изучении растворов полярных белковых молекул в воде (рис. 1). Здесь ε^0 — диэлектрическая постоянная чистого растворителя (воды). ε^0 воды очень велика (80,3 при 25° С),

поэтому на частотах выше области дисперсии белка, но ниже области дисперсии воды диэлектрическая постоянная раствора ниже ϵ^0 на величину $\Delta\epsilon_\infty$. На низких частотах, из-за большого дипольного момента μ макромолекул, ϵ_0 раствора выше ϵ^0 на величину $\Delta\epsilon_0$.

Величины $\frac{\Delta\epsilon_0}{g}$ и $\frac{\Delta\epsilon_\infty}{g}$ называются диэлектрическими низкочастотным инкрементом и высокочастотным декрементом соответственно. Здесь g — концентрация белков в растворе в граммах на литр.

В случае раствора полярных молекул в неполярной жидкости справедлива формула Клаузиуса — Мосотти

$$\frac{\epsilon - 1}{\epsilon + 2} = \frac{4\pi}{3} n\beta = p, \quad (20)$$

где n — число полярных молекул в 1 см^3 , β — поляризуемость одной молекулы, зависящая от температуры.

Дебай получил выражение для поляризуемости молекулы, обусловленной ее вращением, $\beta_0 - \beta_\infty$, где β_0 и β_∞ — поляризуемости на частотах ниже и выше области дисперсии соответственно:

$$\beta_0 - \beta_\infty = \frac{\mu^2}{3kT}; \quad (21)$$

так как $n = \frac{gN}{1000M}$, где N — число Авогадро, M — молекулярный вес полярной молекулы, из (20) и (21) получаем

$$\mu^2 = \frac{27 \cdot 10^3 kTM (\epsilon_0 - \epsilon_\infty)}{4\pi Ng (\epsilon_0 + 2) (\epsilon_\infty + 2)}. \quad (22)$$

При $\frac{\Delta\epsilon_0}{\epsilon^0} \ll 1$ и $\frac{\Delta\epsilon_\infty}{\epsilon^0} \ll 1$ получаем

$$\mu = \alpha \sqrt{M \frac{\epsilon_0 - \epsilon_\infty}{g}}, \quad (23)$$

где α — константа, зависящая от температуры и вида растворителя.

В системах с большой диэлектрической постоянной растворителя ϵ^0 уравнение Клаузиуса — Мосотти не выполняется, а вместо него используют уравнение⁴³

$$p = \frac{\epsilon - \epsilon^0 - a}{b},$$

где a и b — константы. На основании этих соображений получается тот же результат

$$\mu = \alpha \sqrt{M \frac{\epsilon_0 - \epsilon_\infty}{g}}.$$

Итак, зная молекулярный вес исследуемого белка, можем найти дипольный момент молекулы μ на основании измерений низкочастотного инкремента и высокочастотного декремента. Обычно проводят измерения ϵ для нескольких концентраций раствора и определяют инкремент по наклону кривой $\Delta\epsilon(g)$ при $g \rightarrow 0$.

Учет дезориентирующего влияния температуры эквивалентен учету сопротивления вращению макромолекулы⁸⁶ в среде с вязкостью η . Для этого вводится диффузионная постоянная^{41, 44} вращения

$$\theta = \frac{kT}{\xi}, \quad (24)$$

где ξ — стоксовская константа внутреннего трения вращения сферы

радиуса r в среде с вязкостью η ,

$$\xi = 8\pi r^3 \eta. \quad (25)$$

Для молекул, форма которых отлична от сферы, вводится формфактор ψ . При этом

$$\xi = 8\pi r^3 \eta \psi.$$

Дебай показал, что время релаксации $\tau = \frac{1}{\omega_c}$ связано с постоянной вращения посредством выражения

$$\tau = \frac{1}{2\theta}. \quad (26)$$

Итак, зная ω_c — центральную частоту дисперсии — и вязкость, можем найти объем молекулы. Отличие данного размера от величин, полученных на ультрацентрифуге или в других измерениях, объясняется влиянием гидратации^{45, 46}.

Попытки применить теорию вращения диполей в вязкой среде к объяснению результатов исследования водных растворов ДНК и некоторых других биополимеров привели к некоторым противоречиям⁵³. Так, в работе⁴⁷ по определению молекулярного веса молекулы ДНК методом диэлектрических измерений получается несогласие с данными измерений молекулярного веса, полученными методами ультрацентрифугирования и диффузионным методом. Очень существенно то, что, во-первых, эти результаты давали заниженное значение молекулярного веса, во-вторых, это значение зависело от концентрации NaCl, растворенной в воде: при повышении концентрации NaCl до 0,002 М «молекулярный вес» менялся с 135 000 до 35 000. Авторы объясняют это полярной ассоциацией, т. е. соединением малых молекул в большие. Это звучит неубедительно.

Якобсон дает этому явлению оригинальное объяснение. Используя результаты измерений в смеси целлюлозы и воды⁴⁹, данные протонного магнитного резонанса у растворов ДНК⁵⁰, результаты изучения диэлектрических свойств молекул ДНК, ориентированных в потоке⁵¹, он заключает, что дисперсия в районе 1 Мгц водных растворов ДНК объясняется появлением новой структуры воды вблизи макромолекул⁴⁹. Спиральная модель молекулы ДНК Ватсона и Крика очень хорошо соответствует тетраэдральной водной решетке. Согласно Якобсону, водородные связи молекулы ДНК при растворении в воде замыкаются на близлежащие молекулы воды, ориентируя их, что ведет к дальнейшей ориентации удаленных молекул воды, в результате чего создается тетраэдральная решетка в некоторой окрестности макромолекулы. Структура воды в этой области уже уподобляется структуре льда, а так как лед имеет повышенные значения ϵ на низких частотах (т. е. ϵ_0)⁵² по сравнению с ϵ_0 воды, и здесь мы вправе ожидать увеличения ϵ раствора. Расстояние, на котором еще существенна ориентация, составляет для растворов ДНК величину порядка 500—1000 Å при длине самой молекулы 6000 Å и ширине 20 Å. Конечно, это расстояние существенно зависит от степени согласованности макромолекулы и водной решетки.

8. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ГИПОТЕЗЫ СТРУКТУРИРОВАННОЙ ВОДЫ

а) Исследовалась^{51, 49} диэлектрическая постоянная водного раствора ДНК, протекающего перпендикулярно направлению электрического поля, и ее зависимость от градиента скорости. ϵ падала с ростом градиента скорости, оставаясь все-таки выше ϵ воды. Для других веществ (гемоцианин) ϵ не зависела от градиента скорости.

б) Исследовали ⁴⁹ ϵ смеси целлюлозы и воды в зависимости от частоты. Бралась мягкая пористая фильтровальная бумага и промывалась в течение 4-х дней в дистиллированной воде, затем она помещалась в измерительный конденсатор, и производились измерения при $t = 20^\circ \text{C}$. Содержание бумаги — примерно 20%, остальное дистиллированная вода. Как видно, наблюдается значительное увеличение ϵ , хотя ϵ бумаги порядка 5 (рис. 5).

в) Исследование ¹⁶ диэлектрической постоянной тонких слоев воды $\sim 2-5 \mu$, находящихся между слюдяными пластинками, дает ϵ порядка 10—20 в зависимости от толщины слоя ⁵⁴. Это также говорит о том, что на свойства воды существенно влияет наличие второй фазы.

г) Изменение ϵ водных растворов ДНК при добавлении к раствору солей следует связать с тем фактом, что при изменении концентрации электролитов длина молекулы ДНК может значительно измениться (изменение может быть порядка 30%). При этом нарушается соответствие с водной решеткой, и размер области, занятой структурированной водой, уменьшается.

д) Данную гипотезу подтверждают и опыты с протонным магнитным резонансом в воде ⁵⁰. Интенсивность линии значительно уменьшалась при растворении в воде ДНК в концентрации 1,6%, а при добавлении к этому раствору 0,04 М NaCl снова увеличивалась.

Измерения вязкости и осмотического давления также говорят в пользу данной гипотезы, так как при структурировании вязкость воды увеличивается.

Д и с п е р с и я. Низкочастотный инкремент для белков ⁴⁶ порядка 0,1—2, в то время как для молекул ДНК 10—2000 ^{55, 57}. Чем больше инкремент, тем больше увеличивает данный полимер вязкость воды при растворении.

При увеличении концентрации полиэлектролитов инкремент уменьшается, что говорит о наложении структурированных областей от разных макромолекул. Чем больше величина инкремента, тем больше нелинейность его зависимости от концентрации. Подобная нелинейность наблюдается и при протонном магнитном резонансе. Отсюда и следует заключение о размере структурированной оболочки.

Дисперсия чистой воды происходит при частоте 10^{10} гц , льда при 10^2-10^4 гц , а дисперсия раствора лежит посредине между этими значениями — 10^6 гц . Центральная частота дисперсии ω_c возрастает с концентрацией: у ДНК ω_c сдвигается от 0,3 до 0,9 Мгц при изменении концентрации от 0,03 до 0,25 г/л и объясняется уменьшением размера решетки из-за перекрывания. Предполагается, что ω_c у большей водной оболочки меньше.

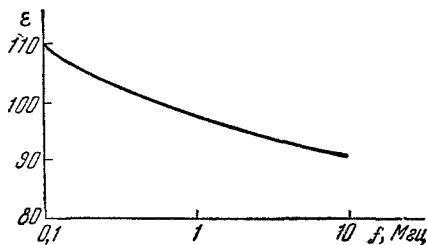


Рис. 5. Частотная зависимость диэлектрической постоянной смеси бумаги и воды.

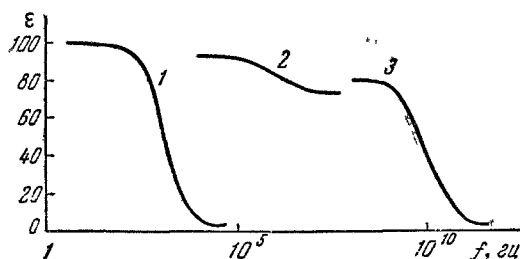


Рис. 6. Частотная зависимость диэлектрической постоянной:

1 — льда, 2 — раствора полиэлектролита в воде, 3 — воды.

На частоте выше области дисперсии у обычных белков декремент порядка 0,06—0,1, что в два раза больше, чем декремент, теоретически вычисленный из объема, занимаемого молекулой. При маленькой водной оболочке ее ϵ на высокой частоте меньше, чем у обычной воды при той же частоте. Однако при больших размерах оболочек ситуация усложняется, так как в зависимости от расстояния от макромолекулы диэлектрические свойства структурированной воды могут существенно меняться; при этом получается иногда инкремент вместо декремента. У смеси воды с целлюлозой ϵ больше ϵ воды даже при 50 Мгц.

9. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕТОДИКА

Чтобы получить представление о диэлектрических свойствах вещества, можно идти по двум направлениям:

1) Исследование с помощью переходных характеристик^{24, 58}. Производится путем изучения реакции исследуемого элемента либо на перепад напряжения или тока, либо на линейный рост напряжения или тока.

2) Снятие частотной зависимости импеданса, например при помощи мостовых методов.

Оба эти метода эквивалентны в смысле получаемой информации, так как преобразование Фурье позволяет преобразовать переходную характеристику элемента в его спектральную характеристику и наоборот.

В большинстве случаев при исследовании биологических объектов используется второй метод, так как он позволяет получить большую точность. Однако, когда важна не точность, а скорость измерения, метод переходных характеристик оказывается лучше. При стремлении получить частотную зависимость импеданса на сверхнизких частотах (ниже 10 гц) в ряде случаев метод переходных характеристик оказывается доступнее.

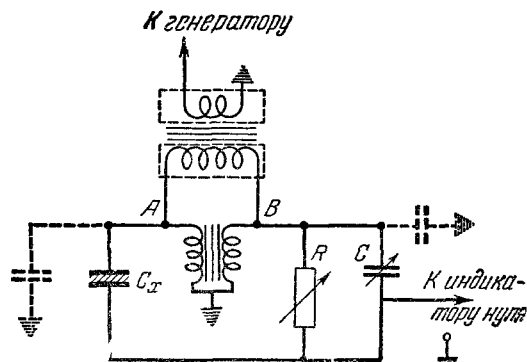


Рис. 7. Схема моста с индуктивной связью между плечами, позволяющей ослабить действие паразитных емкостей.

Однако основным методом является мостовой. Большинство измерений проводится в диапазоне 10^4 — 10^8 гц, т. е. захватывает область β -дисперсии. Исследование биологических объектов мостовыми методами имеет ту особенность, что $\operatorname{tg} \delta$ бывает очень велик: порядка 10. Поэтому и мосты, используемые для измерения, должны допускать измерение высокопроводящих образцов. Конструкций таких мостов много, однако, так как многие авторы в своей работе используют мост с индуктивной связью между плечами, мы здесь опишем такой мост⁶¹ (рис. 7).

Первый трансформатор используется для подачи на оба плеча второго трансформатора симметричного относительно земли напряжения. В этом трансформаторе нужна тщательная экранировка обмоток. Второго трансформатора имеет одинаковые обмотки с коэффициентом связи между ними, равным единице, что позволяет значительно ослабить влияние паразитных емкостей и утечек с точек A и B на землю. Такой мост может работать

в диапазоне от 20 гц до 10 Мгц , если имеются две или три пары сменных трансформаторов.

Для работы на более высоких частотах (выше 5—10 Мгц) балансировка моста по активной составляющей с помощью переменного сопротивления неприемлема из-за большого влияния паразитных емкостей. Поэтому в диапазоне частот от 1 до 300 Мгц используют мост Шеринга, где балансировка как емкостной, так и активной составляющей производится с помощью переменных емкостей.

Конструкции измерительных ячеек исключительно разнообразны. Однако общей чертой всех ячеек является то, что все они изготавливаются либо из платины, либо из серебра и покрываются платиновой чернью электрогальваническим методом в растворе H_2PtCl_6 . Это делается для уменьшения вредного влияния поляризации электродов^{63, 84}.

Поляризация электродов сказывается на частотах ниже 10^5 гц на результатах измерения вещественной части диэлектрической проницаемости.

При мостовом измерении емкости и проводимости ячейки с веществом мы получаем на определенной частоте ω две величины: емкость C и проводимость G , т. е. наш конденсатор с веществом изображается в виде эквивалентной схемы: параллельное соединение емкости и проводимости (рис. 8, а).

Однако истинными характеристиками исследуемого вещества являются C' и G' , в то время как значительная емкость приэлектродного слоя C_p и конечная проводимость этого слоя G_p вносят большую ошибку в измерения. Уравнение, связывающее параметры этих схем, имеет вид

$$\frac{1}{G + i\omega C} = \frac{1}{G_p + i\omega C_p} + \frac{1}{G' + i\omega C'} \quad (27)$$

Этому уравнению эквивалентны следующие:

$$\begin{aligned} \frac{G'}{G'^2 + \omega^2 C'^2} &= \frac{G}{G^2 + \omega^2 C^2} - \frac{G_p}{G_p^2 + \omega^2 C_p^2}, \\ \frac{C'}{G'^2 + \omega^2 C'^2} &= \frac{C}{G^2 + \omega^2 C^2} - \frac{C_p}{G_p^2 + \omega^2 C_p^2}. \end{aligned} \quad (28)$$

Существует несколько методов учета электродной поляризации.

Метод двух расстояний между электродами⁶³. Первоначальное расстояние a , второе расстояние $a + b$. В первом случае имеем показания моста C_1 , G_1 , во втором — C_2 , G_2 . Эквивалентные схемы приведены на рис. 8, в. При этом получается, очевидно, из (27)

$$\frac{G_2 - i\omega C_2}{G_2^2 + \omega^2 C_2^2} = \frac{G_1 - i\omega C_1}{G_1^2 + \omega^2 C_1^2} + \frac{G_b - i\omega C_b}{G_b^2 + \omega^2 C_b^2}; \quad (29)$$

так как всегда

$$\left(\frac{\omega C_2}{G_2}\right)^2 \ll 1, \quad \left(\frac{\omega C_1}{G_1}\right)^2 \ll 1, \quad \left(\frac{\omega C_b}{G_b}\right)^2 \ll 1 \quad (30)$$

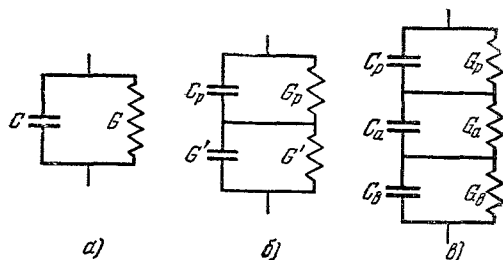


Рис. 8. Эквивалентная схема для учета поляризации электродов.

C и G — показания прибора, C_p и G_p — емкость и утечка приэлектродного слоя, C' и G' — параметры исследуемого вещества.

(нас интересуют низкие частоты), получаем

$$\frac{1}{G_2} = R_2 = \frac{1}{G_1} + \frac{1}{G_b} = R_1 + R_b; \quad (31)$$

отсюда

$$R_b = R_2 - R_1, \\ C_b = \frac{R_2^2 C_2 - R_1^2 C_1}{(R_2 - R_1)^2} = \frac{(a+b)^2 C_2 - a^2 C_1}{b^2}. \quad (32)$$

Этот метод подробно рассмотрен в работе Шоу⁶³, где также проводится сравнение его с методом введения поправок, которым пользуется Онкли⁴². В этом методе используется эмпирический закон, согласно которому

$$C' = C - C_0 - AG^2 f^{-(2-m)}, \quad (33)$$

где A и m — эмпирические константы.

Онкли считает, что $m = 0,5$, а у Шоу получается $m = 0,3$. Данный метод имеет теоретическое обоснование. Согласно Ньюмену⁶⁴ и Варбургу⁶⁵ поляризационная емкость C_p зависит от частоты как $f^{-1/2}$, при этом $G_p = \omega C_p$. Так как чаще всего приходится иметь дело с электролитами с большой проводимостью G , величина ΔG , связанная с поляризационными явлениями, бывает малой по сравнению с G . Поэтому чаще всего учитывают только изменение емкости, для чего можно пользоваться уравнением (33).

Согласно Шоу, оба метода учета поляризационных явлений дают одинаково хорошие результаты. Второй метод оказывается доступнее, если трудно менять расстояние между электродами измерительной ячейки.

Для получения повторяющихся результатов также очень важно следить за величиной тока в измерительной ячейке. Поэтому можно сравнивать результаты работ различных авторов, полученные при сравнимых значениях токов.

При работе с такими объектами, как мышечные и нервные клетки, нельзя работать при больших напряжениях, так как при токах, превышающих определенную величину, наступает возбуждение, при котором электрические параметры клеток меняются^{3, 24}.

10. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изложим более подробно содержание одной из последних и наиболее тщательных работ Швана и его сотрудников по исследованию электрических свойств митохондрий²¹. Так как митохондрии меняют свой размер в зависимости от внешней среды, исследования проводились как с набухшими, так и со сморщенными митохондриями.

Для набухших митохондрий печени крысы были получены значения $C_m = 0,5 \text{ мкф/см}^2$, а для митохондрий сердца морской свинки, как набухших, так и сморщенных, получилась одна и та же величина (в пределах ошибок эксперимента, не превышавших 30%) — $1,3 \text{ мкф/см}^2$. Это уже удивительный факт, так как, если предположить, что при набухании митохондрий (поверхность мембраны возрастает в 4 раза) толщина мембраны уменьшается в 4 раза, это дает увеличение C_m в 4 раза. Авторы делают вывод, что при набухании толщина мембраны не меняется, а увеличение ее поверхности достигается за счет того, что внутри митохондрии имеется запас мембранного материала, который используется по мере набухания. Подтверждение этому найдено в электронномикроскопических наблюдениях¹¹.

Чтобы объяснить вышеописанное понижение центра полуокружности на комплексной плоскости ε , пришлось предположить анизотропию внутренней проводимости. Воспользовавшись данными электронной микроскопии, говорящей о наличии поперечных перегородок в митохондриях, авторы предположили, что в направлении оси проводимость в 4 раза меньше, чем в перпендикулярных направлениях.

Для сморщенных митохондрий распределение времен релаксации оказалось еще шире. C_m можно вычислить двумя путями: из статической проницаемости и из времени релаксации. В данной работе значение C_m , вычисленное для набухших митохондрий из значений ε_0 , $C_{m\varepsilon} = 1,3 \text{ мкф/см}^2$, не зависело от проводимости внешней среды при возрастании последней в 10 раз, в то время как $C_{m\varepsilon_0}$ возросло от 0,5 до $1,2 \text{ мкф/см}^2$. Для сморщенных же митохондрий при возрастании внешней проводимости в 50 раз $C_{m\varepsilon_0} = 1,1 \text{ мкф/см}^2$ не изменилось, а $C_{m\varepsilon_0}$ уменьшилось от 1,8 до $0,4 \text{ мкф/см}^2$.

Авторы считали более верными данные $C_{m\varepsilon_0}$, относя изменения в $C_{m\varepsilon_0}$ на счет распределения времен релаксации.

Интересны и данные этих же авторов о зависимости внутренней проводимости от внешней. Для набухших митохондрий отношение σ_i/σ_a изменилось от 0,64 до 0,32 при изменении σ_a в 30 раз; для сморщенных же при возрастании σ_a в 50 раз σ_i/σ_a уменьшилось от 1,4 до 0,08, при этом σ_i почти не менялась.

Объяснялось это связыванием некоторой части ионов белками, концентрация которых в сморщенных митохондриях велика. В набухших этот эффект исчезает.

На примере этой работы мы видим, что возможно комбинирование мембранной и фазовой теорий.

Аналогичные измерения были проведены Фрике²⁵ на нескольких типах клеток, в том числе на взвеси бактерий кишечной палочки. Он получил типичную кривую. Обращает на себя внимание подъем ε' на низких частотах — так называемая α -дисперсия. При изменении проводимости внешней среды область β -дисперсии сдвигалась в соответствии с теорией²⁰:

$$C_m = 0,7 \text{ мкф/см}^2.$$

В работе Фрике с дрожжами²⁰ предпринята попытка изучения области α -дисперсии при разных значениях проводимости внешней среды:

$$C_m = 0,6 \text{ мкф/см}^2.$$

Авторы приходят к выводу, что в разных типах клеток значения C_m очень близки между собой, что говорит об общности структуры мембран различных клеток.

В случае изучения импеданса тканей и нервных волокон²⁴ дело обстоит сложнее, так как здесь труднее интерпретировать полученные данные. Правда, в случае нервных волокон, расположенных перпендикулярно полю, можно представлять данные волокна цилиндрами известного радиуса и бесконечной длины. Если при этом придерживаться мембранной гипотезы, то можно вычислить и емкость мембраны²⁴.

Всегда в случае работы с тканями и нервными волокнами надо следить за величиной тока, так как при больших токах может начаться возбуждение, что приведет к изменению измеряемых параметров^{3, 24}.

В случае измерения импеданса мышцы при параллельном направлении ее волокон и электрического поля получают на комплексной плоскости очень хорошие дуги со значительно пониженным центром:

угол $\gamma \sim 45-60^\circ$. При аналогичных измерениях импеданса нервного волокна хорошей дуги не получается. Это объясняют наличием трех областей дисперсии в районе 100 $\mu\text{ц}$, 5 $\text{к}\mu\text{ц}$ и 1 $\text{М}\mu\text{ц}$. Для этих результатов характерна плохая повторяемость.

При поперечных измерениях (поле перпендикулярно оси волокна) получались хорошие дуги со значительно пониженным центром. При удалении оболочки нервного волокна значительно снижалась реактивная часть импеданса последнего.

Зависимость импеданса тканей от функционального состояния очень сложна. Однако можно отметить следующие черты: в случае смерти ткани начинает уменьшаться разница между низко- и высокочастотной проводимостью, эта разница исчезает при окончательной гибели ткани. При возбуждении наблюдается аналогичное, но обратимое увеличение низкочастотной проводимости. Сторонники фазовой теории объясняют эти явления разрушением комплексов, в результате чего высвобождаются ионы.

Сторонники мембранной гипотезы говорят, что увеличивается проницаемость мембраны.

Опытов по изучению температурной зависимости импеданса тканей поставлено не очень много ^{7, 66}. В работе Аладжаловой и Маслова ⁶⁶ при изменении температуры от 2 до 32°C положение максимума $\text{tg } \delta$ сдвигалось в сторону более высоких частот.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. M. Oker-Blom, Arch. Ges. Physiol. 79, 28 (1900).
2. J. K. Maxwell, A Treatise on Electricity and Magnetism, Vol. 1, стр. 437.
3. Б. И. Тарусов, Основы биофизики и биофизической химии, ч. I, М., Изд-во «Высшая школа», 1960.
4. H. Frick e, J. Gen. Physiol. 9, 137 (1925).
5. H. Frick e, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. I, 1933, стр. 117.
6. K. Wagner, Arch. Electrotechn. 2, 371 (1914).
7. К. С. Тринчер, Усп. совр. биол. 45, 261 (1958).
8. Д. Н. Насонов, В. Я. Александров, Реакция живого вещества на внешние воздействия, М., 1940.
9. К. С. Тринчер, Биофизика 1, 113 (1956).
10. О. В. Птицын, УФН 69, 371 (1956).
11. H. Schulz, H. Löw, L. Ernster and F. S. Sjöstrand, Proc. Stockholm Conf. Electron Micr., 1956, стр. 134.
12. А. С. Трошин, Проблема клеточной проницаемости. М.—Л., Изд-во АН СССР, 1958.
13. Д. Л. Рубинштейн, Р. А. Рутберг, ДАН СССР 71, 109 (1950).
14. А. И. Поливода, А. А. Михайлова, Биофизика 5, 612 (1960).
15. С. Т. О'Конски, J. Phys. Chem. 64, 605 (1960).
16. К. С. Тринчер, Физиол. ж. СССР 3, 293 (1956).
17. Н. А. Аладжалова, С. Н. Мерцалова, ДАН СССР 94, 213 (1954).
18. П. Л. Привалов, Биофизика 3, 738 (1958).
19. Н. М. Маслов, С. М. Свердлов, ДАН СССР 71, 49 (1950).
20. H. Frick e, J. Phys. Chem. 59, 168 (1955).
21. H. Pauly, L. Packer, H. P. Schwan, J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 589 (1960).
22. П. Дебай, Полярные молекулы. М., 1934.
23. K. S. Cole, R. H. Cole, J. Chem. Phys. 9, 341 (1941).
24. K. S. Cole, H. J. Curtis, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. 4, 1936, стр. 73.
25. H. Frick e, Nature (Lond.) 177, 134 (1956).
26. R. Fuoss, J. G. Kirkwood, J. Am. Chem. Soc. 63, 385 (1941).
27. H. P. Schwan, Advances Biol. Med. Phys. 5, 148, 1957.
28. H. Frick e, H. J. Curtis, Nature (Lond.) 134, 102 (1934).
29. H. Frick e, H. J. Curtis, J. Gen. Physiol. 18, 821 (1935).
30. H. Frick e, Nature (Lond.) 172, 731 (1953).
31. K. S. Cole, R. H. Cole, H. J. Curtis, J. Gen. Physiol. 18, 877 (1935).
32. H. Pauly, L. Packer, I. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 603 (1960).

33. K. S. Cole, *Science* 79, 164 (1934).
34. D. Polder, J. H. Van Santen, *Physica* 12, 257 (1946).
35. J. G. Kirkwood, *J. Chem. Phys.* 4, 592 (1936).
36. H. Pauly, H. P. Schwan, *Z. Naturforsch.* 14b, 125 (1959).
37. H. Frick, *J. Appl. Phys.* 24, 644 (1953).
38. K. Scatchard, J. G. Kirkwood, E. I. Cohn, *Ann. Rev. Biochem.* 4, 122 (1935).
39. J. Polonsky, P. Douzon, C. Sadron, *Compt. rend.* 250, 3414 (1960).
40. P. Douzon, J. G. Francq, J. Polonsky, C. Sadron, *Compt. rend.* 251, 976 (1960).
41. J. L. Oncley, *J. Am. Chem. Soc.* 60, 1115 (1938).
42. J. D. Ferry, J. L. Oncley, *J. Am. Chem. Soc.* 63, 272 (1941).
43. J. Wiman, *Chem. Rev.* 19, 213 (1936).
44. J. L. Oncley, J. D. Ferry, K. Shack, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 40, 371 (1940).
45. J. L. Oncley, *Crystalline Protein Molecules*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 41, 77 (1941).
46. E. J. Cohn, T. S. Edsall, *Proteins, Amino Acids and Peptides*, New York, 1943, стр. 460.
47. G. Jungner, I. Jungner and L. G. Allgen, *Nature (Lond.)* 163, 849 (1949); *Acta Chem. Scand.* 6, 1391 (1952).
48. B. Jacobson, *Nature (Lond.)* 172, 666 (1953).
49. B. Jacobson, *J. Am. Chem. Soc.* 77, 2919 (1955).
50. B. Jacobson, *Nature (Lond.)* 173, 772 (1954).
51. J. Jacobson, *Rev. Sci. Instr.* 24, 949 (1953).
52. R. P. Auty, R. H. Cole, *J. Chem. Phys.* 20, 1309 (1952).
53. J. L. Oncley, E. Ellenbogen, *J. Phys. Chem.* 56, 85 (1952).
54. L. S. Palmer, A. Cunliffe, *Nature (Lond.)* 170, 796 (1952).
55. H. M. Dintzis, J. L. Oncley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 40, 62 (1954).
56. I. Jungner, *Acta Physiol. Scand.* 20 (Suppl.), 69 (1950).
57. L. G. Allgen, *Acta Physiol. Scand.* 22 (Suppl.), 76 (1950).
58. S. Bishop, *Am. J. Physiol.* 89, 618 (1929).
59. Л. А. Блюменфельд, *Биофизика* 4, 515 (1959).
60. Л. А. Блюменфельд, В. А. Бендерский, А. Э. Калмансон, *Биофизика* 6, 631 (1961).
61. П. А. Мельниковский, С. А. Михайленко, А. А. Котенко, *Приб. и техн. эксп.* 4, 92 (1961).
62. Л. А. Блюменфельд, *Изв. АН СССР, сер. биол.* 3, 255, 285 (1957).
63. T. M. Shaw, *J. Chem. Phys.* 10, 609 (1942).
64. E. Newman, *Electrolytic Conduction*, 1931.
65. E. Warburg, *Ann. d. Phys.* 6, 125 (1901).
66. Н. А. Аладжалова, Н. М. Маслов, *ДАН СССР* 115, 407 (1957).
67. G. H. Harris, T. G. Buchanan, J. B. Hasted, *Nature (Lond.)* 167, 607 (1951).
68. T. G. Buchanan, G. H. Harris, J. B. Hasted, B. J. Robinson, *Proc. Roy. Soc. A* 212, 379 (1952).
69. W. Arnold and R. K. Clayton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 46, 769 (1960).
70. A. Szent-Gyorgi, *Nature (Lond.)* 148, 157 (1941).
71. А. Сент-Дьерди, *Биоэнергетика*, М., Физматгиз, 1960.
72. Г. П. Михайлов, Т. И. Борисова, *Усп. хим.* 30, 895 (1961).
73. M. Evans, J. Gergely, *Biochim. et Biophys. Acta* 3, 188 (1949).
74. D. D. Eley, G. Parfitt, *Trans. Far. Soc.* 51, 1529 (1955).
75. M. H. Cardew and D. D. Eley, *Faraday Soc. Disc.* 27, 115 (1959).
76. B. Rosenberg, *Nature (Lond.)* 193, 364 (1962).
77. *Современные проблемы биофизики*, т. 2. М., ИЛ, 1961, стр. 58 и след.
78. Е. А. Либерман, *Биофизика* 6, 177 (1961).
79. K. G. Shulman, W. M. Walsh, *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 5, 52 (1961).
80. R. G. Shulman, W. M. Walsh, R. D. Heidenreich, *Nature (Lond.)* 192, 1041 (1961).
81. А. А. Александров, В. Ю. Гаврилов, А. Г. Киселев, Ю. С. Лазуркин, М. А. Мокульский, *ДАН СССР* 141, 1483 (1961).
82. W. Arnold, H. R. Sherwood, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 43, 105 (1957).
83. A. Szent-Gyorgyi, *Introduction to a Submolecular Biology*, Acad. Press, New York, 1960.
84. G. Jones and S. M. Christian, *J. Am. Chem. Soc.* 57, 272 (1935).
85. B. Rosenberg, *J. Chem. Phys.* 36, 816 (1962).
86. S. Takashima, *J. Polymer. Sci.* 56, 257 (1962).

