

УСПЕХИ ФИЗИЧЕСКИХ НАУК

539.199

**НИЗКОТЕМПЕРАТУРНАЯ КАЛОРИМЕТРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ  
МАКРОМОЛЕКУЛ***Г. М. Мрелишвили*

## СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение . . . . .	273
Цель обзора (275).	
2. Особенности строения биополимеров и их конформационные свойства . .	276
а) Белки (276). б) Нуклеиновые кислоты (279). в) Характерные особенности термических переходов в растворах биополимеров в широком интервале температур (279).	
3. Краткий обзор теории теплостойкости полимеров в твердом состоянии . . .	281
4. Калориметрические измерения . . . . .	284
5. Экспериментальные результаты . . . . .	287
а) Удельная теплостойкость и термодинамические величины аминокислотных остатков в интервале температур 1,5—350 °K (287). б) Удельная теплостойкость и термодинамические величины полипептидов в интервале температур 1,5—300 °K (289). в) Удельная теплостойкость и термодинамические величины глобулярных белков в интервале температур 10—350 °K (293). г) Термодинамические свойства фибриллярного белка — коллагена в спиральном и клубковом состояниях при температурах 4—400 °K (295). д) Теплостойкость ДНК при низких температурах (299). е) Аномалии в низкотемпературной теплостойкости меланина и в опухолевой меланосоме (306).	
6. Заключительные замечания . . . . .	308
Цитированная литература . . . . .	309

«Вопрос заключается в следующем: являются ли современные познания закономерностей неодушевленной природы достаточными, чтобы описать все явления, характерные для живого мира?.... У нас нет никаких данных отрицать, что в цепочках достаточной длины из атомов с их чередованием по определенным правилам не может появиться новое свойство, аналогичное свойству самовоспроизводства в живой природе. В отдельных атомах и несложных молекулах такое свойство может быть незаметным».

*П. Л. Капица*

(«Эксперимент, теория, практика  
(статьи, выступления)»)

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Физика биополимеров, особенно теория биологических макромолекул и их упорядоченных надмолекулярных структур (волокна, нуклеопротеидные комплексы, мембраны и др.), развивается на основе достижений теоретической физики твердого тела, статистической физики и термоди-

© Главная редакция физико-математической литературы издательства «Наука», «Успехи физических наук», 1979.

намики. В настоящее время фронт исследований физических свойств важнейших биополимеров (белков и нуклеиновых кислот) довольно широк. Это и детальное рентгеноструктурное исследование (с разрешением  $\sim 1-2\text{\AA}$ ) пространственной структуры белков и нуклеиновых кислот, их конформационных особенностей, характера внутримолекулярных конформационных превращений, и установление связи строения биополимеров с их функцией и др. Особое внимание при исследовании физических свойств биополимеров уделяется изучению молекулярной подвижности макромолекул (так называемым «динамическим» свойствам макромолекул белков и нуклеиновых кислот), природе сил, стабилизирующих пространственную структуру в растворе, и внутримолекулярным перестройкам макромолекул, наступающим при различных внешних воздействиях (температура,  $pH$ , давление и др.).

Исследование тепловых свойств биополимеров в растворах и «твердом» состоянии (ориентированные пленки, кристаллы белков в маточном растворе, дегидратированные (высушенные) образцы) и, в частности, изучение теплоемкости в широком интервале температур, позволяет получить экспериментальные значения фундаментальных термодинамических параметров этих соединений и связать их с динамическими свойствами и с конформационными особенностями макромолекул. Методы тепловых измерений биологических объектов находят все большее применение в молекулярно-биологических исследованиях (см., например, обзоры <sup>1-7</sup>), что обусловлено как созданием прецизионных теплофизических приборов нового поколения (в том числе сканирующих дифференциальных микрокалориметров <sup>7-13</sup>), так и развитием конфигурационной статистики и статистической механики макромолекул <sup>14-16</sup>, статистико-термодинамической теории фазовых переходов в биополимерах <sup>15, 17-21</sup> и теории растворов макромолекул <sup>22, 23</sup>.

Как будет видно из данного обзора, современные методы калориметрии оказываются чрезвычайно информативными и тогда, когда они применяются для исследования свойств биополимеров и их синтетических аналогов в широком интервале температур, включая температурную область жидкого гелия, т. е. при температурах, далеко отстоящих от температурной области биологического функционирования макромолекул. Подобный подход является типичным при решении задач физики конденсированного состояния, так как позволяет выявить характерные особенности вещества путем анализа его физических свойств при экстремальных внешних условиях среды (низкие и высокие температуры, высокие давления и др.).

Теплоемкость важнейших биополимеров при низких температурах (от  $2^\circ\text{K}$  и выше) интенсивно изучается в настоящее время в нескольких научных центрах СССР <sup>24-30</sup>, США <sup>31-45</sup>, Франции <sup>46, 47</sup>. В 60-х годах уже были получены термодинамические величины практически для всех аминокислот (20 «строительных блоков», с помощью которых формируется структура белков) в интервале температур  $10-350^\circ\text{K}$  (в основном благодаря усилиям группы проф. Хатченса из Чикагского университета <sup>31-37</sup>).

Изучена низкотемпературная теплоемкость ряда синтетических полипептидов, моделирующих структур белков <sup>40-44, 46, 47</sup>, глобулярных <sup>38</sup> и фибриллярных белков <sup>24-27, 48</sup>, и начаты исследования низкотемпературной теплоемкости нуклеиновых кислот (ДНК) <sup>29, 30</sup>. Физика биополимеров при низких температурах формируется в настоящее время как новое направление исследований в молекулярной биофизике (мы назвали бы это направление «молекулярной криобиофизикой»), и основой для этого являются возросшие экспериментальные возможности новых прецизионных калори-

метров, резкое уменьшение расхода дорогостоящих и труднополучаемых веществ, разработка электронных систем для автоматизации эксперимента и быстрая и точная обработка данных с использованием ЭВМ. Немаловажно, что теории, созданные для квантовомеханического описания низкотемпературных тепловых свойств сильно анизотропных твердых тел (так называемых «слоистых и цепных структур») в ряде случаев хорошо объясняют поведение биополимеров в «твердом» состоянии при низких температурах.

### Ц е л ь о б з о р а

В этом обзоре сделана попытка собрать в одном месте и обсудить различные экспериментальные данные, относящиеся к физике биополимеров, к конформационному анализу и тепловым свойствам макромолекул при низких температурах, которые могли бы выявить новые характерные особенности строения биополимерных цепей.

Одновременно с этим в обзоре впервые сделана попытка собрать в одном месте и проклассифицировать экспериментальные данные по теплоемкости аминокислот, пептидов, полипептидов, белков и нуклеиновых кислот и сопоставить их с существующими теориями теплоемкости сильно анизотропных структур при низких температурах.

Анализируя проблему поведения биополимерных цепей при низких температурах, можно поставить следующие вопросы:

1) В каких наблюдаемых явлениях при низких температурах может проявиться специфика строения биополимерных цепей?

2) Отличается ли характер температурной зависимости теплоемкости для полипептидов, имеющих различную конформацию? Если да, то можем ли мы, исходя из данных по теплоемкости, судить о наличии тех или иных спиральных конфигураций в биополимерах?

3) Можем ли мы отличить биохимически активную конформацию макромолекулы («спираль») от биологически неактивной — денатурированной («клубок») формы по поведению их теплоемкости в области низких температур? Какова разность энтропии клубкообразной и спиральной конформаций макромолекул?

4) Можно ли рассчитать энтропию белка, исходя из его аминокислотного состава?

5) Какую роль играет растворитель (вода) в тепловых свойствах биополимерных цепей при низких температурах?

6) Каковы характеристики низкотемпературных фазовых переходов и тепловых аномалий в биополимерах и какова их связь с биологической функцией (особенностью) данного полимера?

К сожалению, не все эти вопросы удалось рассмотреть одинаково подробно из-за отсутствия соответствующих экспериментальных данных, которые, мы надеемся, будут получены в недалеком будущем.

Прежде чем приступить к изложению конкретных результатов измерения теплоемкости биомacroмолекул в интервале температур 2—300° К, остановимся коротко на особенностях строения биополимеров и их конформационных свойств и на основных положениях теории теплоемкости сильно анизотропных тел. Настоящий обзор включает также описание главных методических приемов, применяемых в экспериментальных исследованиях низкотемпературной теплоемкости биополимеров. Анализ имеющихся экспериментальных данных показывает, что точность, с которой измерена теплоемкость биополимеров при низких температурах, достаточно велика, однако может быть существенно улучшена при современном уровне методики калориметрического эксперимента.

## 2. ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОНФОРМАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА

### а) Б е л к и

Макромолекулы белков состоят из полипептидных цепей, упакованных в пространстве строго определенным образом. Полипептиды обладают почти уникальной

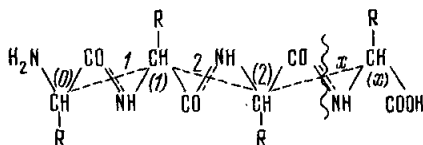


Рис. 1. Полипептидная цепь.

Указан частично двойной характер амидных связей. Штриховой линией показаны виртуальные связи, соединяющие последовательные атомы  $\alpha$ -углерода. Приведена нумерация остатков (0), (1) ... (x) и соединяющих их виртуальных связей (1, 2, ..., x)<sup>48</sup>.

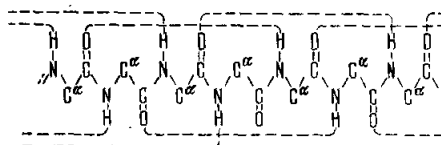


Рис. 2. Схематическое изображение полипептидной цепи в  $\alpha$ -спиральной конформации «в плоскости».

Штриховыми линиями показаны водородные связи.

комбинацией структурных особенностей. Химическое строение полипептидной цепи представлено на рис. 1. Повторяющейся единицей в полипептидах являются  $\alpha$ -ами-

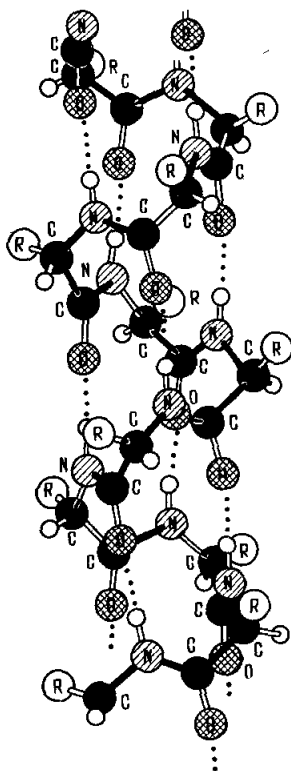


Рис. 3.  $\alpha$ -спираль Полинга — Кори.

Пунктир — водородные связи.

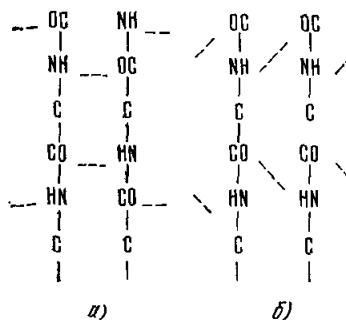
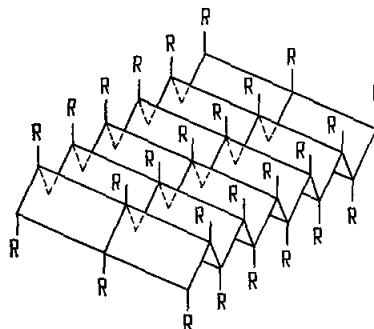


Рис. 4. Расположение полипептидных цепей в  $\beta$ -структуре.

Антипараллельное (а) и параллельное (б) расположение полипептидных цепей в  $\beta$ -складчатой форме.

нокислотные остатки ( $-\text{NH}-\text{CHR}-\text{CO}-$ ), число которых равно двадцати. Строго чередующаяся последовательность различных аминокислот вдоль цепи представляет так называемую первичную структуру белка. Полипептиды живых организмов, за редким исключением, имеют  $L$ -конфигурацию<sup>49</sup>.

Взаимодействие между ковалентно связанными аминокислотными остатками вдоль цепи с помощью образования водородных связей (рис. 2) приводит к спиральной конфигурации с вполне определенными параметрами (количество остатков на виток спирали, шаг спирали и др.) (вторичная структура макромолекул)<sup>49</sup>. На рис. 3 приведена  $\alpha$ -спиральная конформация полипептидных цепей белков.

Другим примером вторичной структуры белков может служить конформация, которая реализуется в результате образования водородных связей между остатками, принадлежащими различным полипептидным цепям, либо в случае складывания одной цепи с образованием водородных связей между звеньями (рис. 4) (так называемая  $\beta$ -складчатая структура).

Однако этот уровень организации полипептидных цепей белков отнюдь не является высшим. Будучи во взвешенном состоянии в среде растворителя, полипептидные

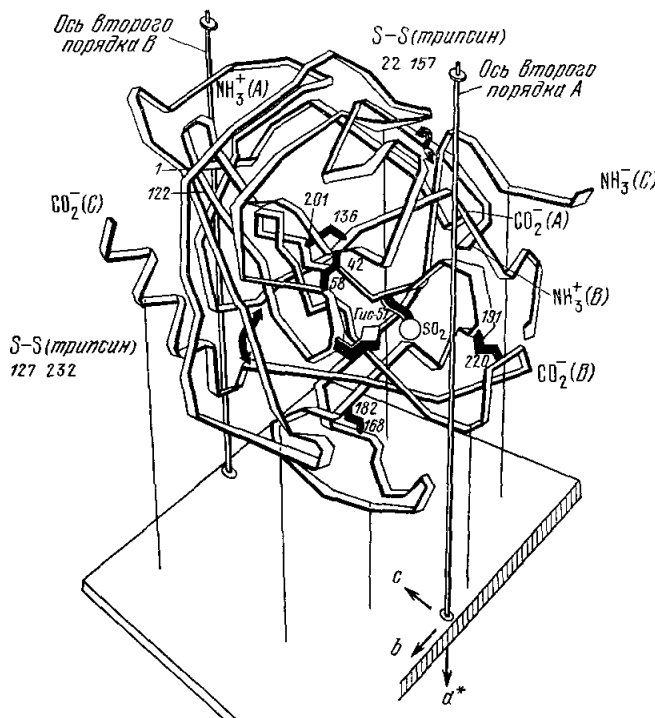


Рис. 5. Схематическое изображение конформации полипептидных цепей в А-химо-трипсине<sup>120</sup>.

цепи, содержащие участки со вторичной структурой, складываются в плотные, компактные глобулы определенных геометрических размеров (третичная структура белков) (рис. 5). Общие принципы организации третичной структуры глобулярных белков развиваются в работах<sup>51-53</sup>.

Некоторые вопросы статистической теории биополимеров были рассмотрены в работах И. М. Лифшица<sup>19-21</sup> и в работах его учеников<sup>54,55</sup>. Было показано<sup>19</sup>, что фазовое состояние полимерной цепи определяется «боковыми» или «съемными» взаимодействиями далеко отстоящих друг от друга звеньев, причем первичная структура цепи и связи между ее звеньями считаются зафиксированными и образуют «линейную память» в системе. Равновесие в такой системе достигается в присутствии дополнительных сил взаимодействия с ограничениями, накладываемыми «линейной памятью». В зависимости от числа мономеров ( $N$ ) и температуры ( $T$ ) модельная полимерная цепь с «линейной памятью» может находиться в одном из трех макроскопических состояний: 1) в квазигазообразном клубковом состоянии, 2) в своеобразном двухфазном состоянии глобулы с рыхлой газообразной опушкой, 3) в состоянии глобулы с резкой границей. Переходы между этими состояниями могут быть фазовыми переходами как первого, так и второго рода. Реальная белковая глобула более сложна, однако работы<sup>19-21,54-55</sup>, несомненно, приближают нас к точному статистико-термодинамическому описанию этих сложных систем. (Подробный анализ работ<sup>19-21</sup> и связь развитого подхода с основными проблемами биофизики дан в монографии Блюменфельда<sup>56</sup>).

Главной отличительной чертой структуры всех глобулярных белков, выявленной дифракционными картинами (с разрешением  $1-2 \text{ \AA}$ ), является плотная упаковка цепей. Практически все пространство внутри области глобулярной молекулы занято аминокислотными остатками неполярной (гидрофобной) природы. Свободный объем пренебрежимо мал и практически не доступен для растворителя (воды). Ионные боковые цепи полярных остатков располагаются в основном на поверхности частицы. Конфигурация цепи в нативном состоянии всегда размещает остатки именно таким образом<sup>57</sup>. Иначе говоря, остатки двух типов («полярные» и «неполярные») так располагаются вдоль цепи (первичная структура — «линейная память» вдоль цепи), что выполняются эти условия и в то же время обеспечивается высокая плотность упаковки остатков в гло-

булярном состоянии. Полярные остатки, расположенные снаружи, обеспечивают создание электрического слоя, обуславливающего растворимость в водной среде и стабилизирующего диспергированное состояние относительно коагуляции.

Отметим также, что молекулы многих белков состоят из нескольких субъединиц, каждая из которых представляет отдельную свернутую полипептидную цепочку, имеющую третичную структуру. (Такое пространственное объединение субъединиц в сложную молекулу называют четвертичной структурой.)

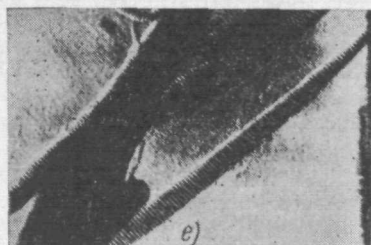
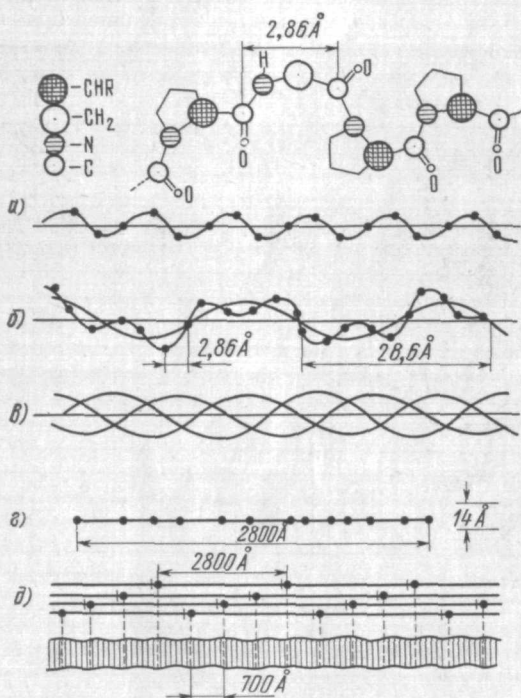


Рис. 6. Различные уровни структурной организации коллагена<sup>58</sup>.

а) Пептидная спираль (первичная структура); б) вторичная структура; в) третичная структура (тройная суперспираль); г) молекула коллагена, изображенная в виде стержня длиной  $2800 \text{ \AA}$  и диаметром  $14 \text{ \AA}$ ; д) упаковка коллагеновых молекул в волокне (четвертичная структура) с периодом  $700 \text{ \AA}$ ; е) электронномикроскопическое изображение волокон коллагена. (Снимок получен в ИФ АН ГССР Г. Нацвлишвили и Г. Микадзе.)

Чрезвычайно интересный класс белков — фибриллярные белки. Типичным представителем фибриллярных белков является белок соединительной ткани коллаген, составляющий  $\sim 40\%$  всех белков животного мира. Макромолекулы коллагена представляют собой три спиральные полипептидные цепи, свернутые в суперспираль и скрепленные водородными связями (рис. 6). Каждая цепь молекулы состоит из регулярной последовательности  $(\text{Г} - \text{X} - \text{Y})_n$ , где Г — глицин, X, Y — аминокислота или иминокислота. Молекула коллагена достаточно жестка и асимметрична: диаметр тройной спирали составляет  $d = 14 \text{ \AA}$ , длина  $l = 2800 \text{ \AA}$  (молекулярный вес  $M \approx 360\,000$  дальтон)<sup>58</sup>. В настоящее время благодаря работам Рича и Крика<sup>59</sup>, Рамачандрана<sup>60</sup> и Андреевой с сотр.<sup>61</sup> найдены условия и сформулированы критерии, необходимые и достаточные для существования тройной спирали. Отметим, что регулярная сетка межпептидных водородных связей выступает как универсальный элемент коллагеновой структуры. Молекулы растворителя (воды) играют важную роль в сохранении спиральной конформации коллагена, образуя дополнительное количество водородных связей, стабилизирующих тройную суперспираль. Показано, что формирование внутримолекулярной упорядоченной сетки Н-связей сопровождается встраиванием в структуру молекул воды, причем это встраивание тем эффективнее, чем более упорядочена сетка водородных связей<sup>62</sup>.

## б) Нуклеиновые кислоты

Сегодня всем хорошо известно, что молекула ДНК построена из двух длинных обвивающих друг друга цепочек, образующих двойную спираль Уотсона — Крика<sup>63</sup>. На рис. 7 схематически изображен фрагмент цепочки ДНК, состоящий приблизительно из 10 нуклеотидных единиц. Согласно физическим измерениям цепочки ДНК состоят в среднем из 10 000 нуклеотидных единиц. (Молекулярный вес некоторых ДНК может достигать  $120 \cdot 10^6$  дальтон.) Дезоксирибозные кольца связаны фосфатными остатками и образуют хребет цепочки; пуриновые и пиримидиновые кольца представляют собой плоскостные структуры, расположенные перпендикулярно основной оси цепочки. Пуриновые и пиримидиновые основания одной из цепочек связаны водородными связями с пиримидиновыми и пуриновыми основаниями комплементарной цепочки. (Структура и свойства двойной спирали ДНК прекрасно описаны в книге Уотсона<sup>60</sup>.)

Рентгеноструктурные измерения показали, что расстояние между двумя цепочками ДНК соответствует величине, вычисленной для водородной связи, соединяющей пуриновое основание с пиримидиновым<sup>64</sup>. Рентгеноструктурные исследования показали также, что молекула ДНК принимает в волокнах и в растворе различные конформации, большая часть которых может существовать в нескольких упорядоченных формах. Содержание в волокне воды, солей и катионов, используемых для нейтрализации фосфатных групп, являются главным фактором, определяющим конформацию молекулы. Переходы между различными упорядоченными формами ДНК наблюдаются и в растворах при изменении свойств растворителя (воды). Такими факторами является, например, полярность растворителя, которую можно менять с помощью добавления в раствор, содержащий ДНК, различные соли либо органические растворители (см.<sup>65-67</sup>).

В настоящее время уточнены координаты атомов упорядоченных форм ДНК и составлены точные модели, описывающие конформационные свойства этой молекулы<sup>64</sup>. Большие успехи достигнуты при экспериментальном и теоретическом исследовании процесса плавления (раскручивания) двойной спирали и перехода макромолекул в состояние статистических клубков<sup>68-70</sup>.

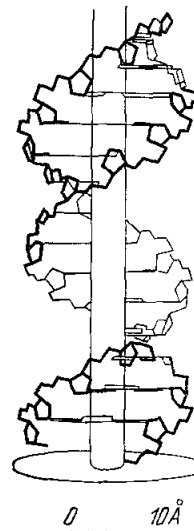


Рис. 7. Фрагмент двойной спирали ДНК Уотсона — Крика (см.<sup>60</sup>).

## в) Характерные особенности термических переходов в растворах биополимеров в широком интервале температур

Биополимеры, обладающие в нативном состоянии определенной молекулярной конформацией (к ним относятся все биополимеры, рассмотренные в предыдущем разделе), способны превращаться в неупорядоченный статистический клубок при соответствующих условиях (при увеличении температуры, изменении  $pH$ , ионной силы и т. д.). Энергетический баланс, приводящий к нативной структуре, включает, как было видно, многочисленные взаимодействия: цепь — цепь и цепь — растворитель, к которым относятся как химические взаимодействия, создаваемые ковалентно связанными атомами основной цепи, так и водородные связи, электростатические взаимодействия, гидрофобные взаимодействия и дисперсионные (лондоновские) силы.

Внутримолекулярные фазовые переходы такие, как переходы «спираль — клубок», «глобула — клубок» и др. (рис. 8), происходящие под воздействием температуры, наблюдаются в узком интервале температур и характеризуются высокой кооперативностью (см.<sup>15-18</sup>). В процессе таких конформационных переходов полностью нарушается баланс сил, определяющий нативную структуру биополимера с изменением не только внутримолекулярных характеристик, но и состояния всего окружающего его растворителя.

Исследования процесса внутримолекулярного плавления в растворах биополимеров, начатые в 50-х годах проф. Доти в США<sup>71</sup>, проводятся в настоящее время с помощью разнообразных физических методов — гидродинамическими, оптическими, радиоспектроскопическими методами (см., например,<sup>72</sup>).

Как было сказано, для изучения термодинамических величин, характеризующих структурные превращения в растворах биополимеров в широком интервале температур с успехом применяются современные методы калориметрии.

Для наглядности проанализируем температурную зависимость теплоемкости растворов биополимеров (имеется в виду трехкомпонентная система биополимер — вода —

ионы растворенных солей) в области 2—400° К (рис. 9). (Теплоемкость здесь приведена в условных единицах.) Мы можем выделить четыре температурные области, в которых регистрируемые тепловые эффекты связаны либо непосредственно с внутримолекулярными конформационными перестройками биополимерных цепей, либо с изменениями в состоянии воды и растворенных в ней солей<sup>29</sup>.

1) Интервал, охватывающий температуры 273, 15—400° К, является областью, в которой наблюдаются конформационные переходы в растворах белков, нуклеиновых

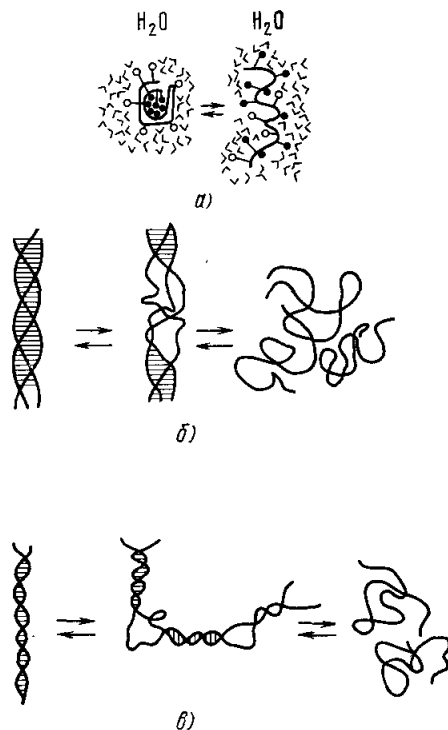


Рис. 8. Схематическое изображение внутримолекулярных фазовых переходов «глобула — клубок» (а), «спираль — клубок» коллагена (б) и ДНК (в).

Показаны полностью спиральные, частично расплавленные и полностью расплавленные состояния макромолекул с разошедшимися цепями.

хода воды (температура, энтальпия и энтропия плавления), мы можем судить о состоянии воды в растворах биополимеров, получая точные количественные данные о таком важном физико-химическом параметре макромолекулы, каким является ее гидратация<sup>29,74-76</sup>.

3) Третий температурный интервал (250—210° К) связан со структурными переходами, происходящими при плавлении эвтектики тройной системы биополимер —  $H_2O$  — соль, образующейся в процессе охлаждения растворов. Термодинамические величины, характеризующие подобные превращения (температура и энтальпия плавления эвтектической смеси и ширина этого перехода), позволяют получить количественные данные о характере связывания лигандов (типа ионов солей), взаимодействующих с биополимерами<sup>29</sup>.

4) Четвертая температурная область (область температур жидкого гелия) интересна для получения термодинамических величин (теплоемкости, энтропии, энтальпии, функции свободной энергии) для биополимеров, имеющих различную конформацию, вблизи абсолютного нуля, что дает возможность полного термодинамического описания исследуемых объектов с использованием третьего закона термодинамики<sup>24-47</sup>.

Кроме того, характер температурной зависимости теплоемкости биополимеров при низких температурах позволяет исследовать ту область низкочастотного колебательного спектра (температура  $\sim 1^\circ$  К соответствует максимальной частоте  $\sim 0,7$  см<sup>-1</sup>),

кислот, липидов и др. Процессы «внутри молекулярного плавления» биополимеров сопровождаются поглощением тепла. Этот процесс детально исследован для ряда белков и нуклеиновых кислот с помощью развитых в последнее время методов сканирующей дифференциальной микрокалориметрии. Получаемая при этом информация содержит такие важные параметры, как температура и теплота плавления, изменение энтропии и свободной энергии. В ряде случаев процесс внутримолекулярного плавления белков и нуклеиновых кислот сопровождается изменением удельной теплоемкости (подробно о применении микрокалориметрии при исследовании конформационных переходов см. в обзорах Стюртеванта<sup>1</sup>, Андроникашвили<sup>2</sup>, Привалова<sup>4</sup>, Мак-Найта, Караша<sup>3</sup>, Риальди и Билтонена<sup>5</sup>).

Анализ, проведенный недавно Стюртевантом<sup>73</sup>, показывает, что большой скачок удельной теплоемкости, наблюдаемый при переходе макромолекул из упорядоченного в клубкообразное состояние, в основном обусловлен двумя факторами: экспонированием неполярных групп макромолекул в растворитель (см. рис. 8, а) и изменениями колебательного спектра макромолекул в состоянии статистических клубков. Таким образом, изучение теплоемкости биополимеров в широком интервале температур становится необходимым для учета различных вкладов в величину скачка теплоемкости ( $\Delta C_p$ ) при конформационном переходе.

2) Во второй температурной области (273—230° К) выявляются особенности фазового перехода воды в присутствии биополимера. Определяя термодинамические величины, характеризующие процесс размороженного по температурной оси фазового пере-



которая недоступна для стандартных спектроскопических (ИК, раман-спектроскопия) методов, выявляющих оптические моды колебаний.

Подчеркнем еще раз, что характер тепловых изменений в каждой из этих температурных областей и количественные значения всех термодинамических характери-

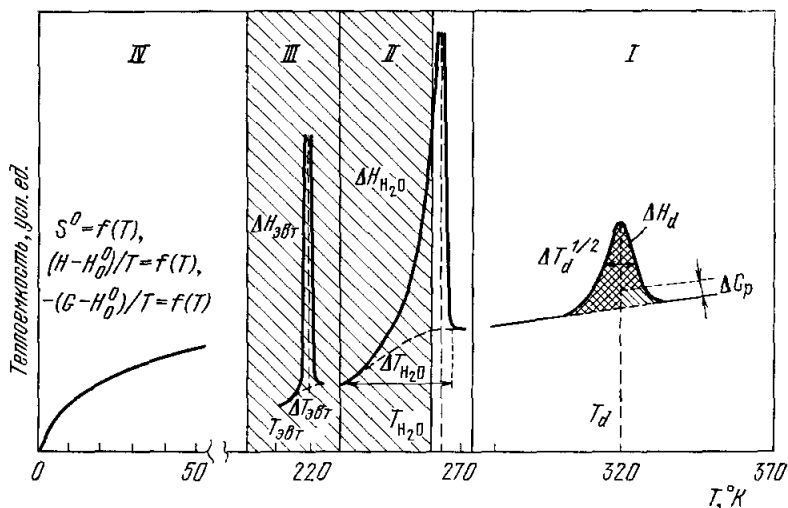


Рис. 9. Схематическое представление температурной зависимости теплоемкости растворов биополимеров в температурной области 2—400° К.

стик обуславливаются конформационными особенностями изучаемых макромолекул, конкретными механизмами взаимодействия всех трех компонентов (биополимер — вода — соль) и их относительной концентрацией.

### 3. КРАТКИЙ ОБЗОР ТЕОРИЙ ТЕПЛОЕМКОСТИ ПОЛИМЕРОВ В ТВЕРДОМ СОСТОЯНИИ

Достаточно полный анализ теории теплоемкости применительно к полимерам в твердом состоянии проведены Вундерлихом и Бауром <sup>76</sup>, поэтому для более детального ознакомления с проблемой мы отсылаем читателя к этой книге (см. также монографию Косевича <sup>77</sup>, в которой изложены специальные вопросы динамики кристаллов и, в частности, законы дисперсии колебаний сильно анизотропных кристаллов, приводящие к своеобразной картине низкотемпературной теплоемкости твердых тел со слоистой структурой). Здесь остановимся на основных моментах и работах, посвященных теории теплоемкости для кристаллов, имеющих пластинчатую или волокнистую (линейную) структуру.

Известно, что при достаточно низких температурах размеры и форма тела начинают играть существенную роль в его тепловых свойствах <sup>78</sup> в силу проявляющейся при этом дискретности уровней энергии колебаний <sup>78,79</sup>.

Сильно анизотропным кристаллам, как, например, кристаллам органических веществ с цепной структурой молекул, соответствует анизотропный континуум. В анизотропном континууме скорость звука различна в разных направлениях. Направлению в пространстве соответствует более чем одна ветвь колебаний, которые отличаются в общем случае как поляризацией, так и скоростью распространения.

Другими словами, спектр колебаний сильно анизотропного кристалла может содержать больше одной характерной частоты, и тогда в термодинамических выражениях будет фигурировать больше чем одна характеристическая температура. Так, например, каждому отдельному направлению в пространстве могут отвечать три дебаевских спектра с тремя различными ограничивающими частотами и соответственно три различных температуры Дебая:  $\Theta_{3,1}$ ,  $\Theta_{3,2}$ ,  $\Theta_{3,3}$ .

Способ приближенного расчета теплоемкости сильно анизотропных кристаллов, развитый в рамках теории упругого континуума, был предложен рядом авторов (см. <sup>76,77,79-83</sup>). Этот подход специально предназначен для расчета теплоемкости кристалла слоистой или цепной структуры, в которых силы взаимодействия между слоями или цепями на несколько порядков ниже, чем в плоскости слоев или вдоль цепей. При очень низких частотах ( $0 \leq \nu \ll \nu_D$ ), при которых еще проявляется влияние сла-

бых сил взаимодействия между слоями или цепями и при которых длины волн велики по сравнению с расстояниями между структурными элементами решетки, плотность спектрального распределения пропорциональна  $\nu^3$ . Поэтому теплоемкость кристаллов слоистой и цепной структур подчиняется при очень низких температурах закону Дебая  $T^3$ . Однако при более высоких температурах слабое взаимодействие между слоями и цепями начинает играть уже подчиненную роль. Колебательный спектр все больше вырождается в спектр мономолекулярного слоя или одномерной цепи<sup>76</sup>. Тарасов предположил, что для расчета плотности спектрального распределения в некотором интервале выше  $\nu_{D_3}$  достаточно рассматривать слой как двумерный, а цепи как одномерный континуум<sup>81,82</sup>. Обобщенная функция распределения частот для  $m$ -мерного континуума, по Тарасову, имеет следующий вид:

$$\rho(\nu) d\nu = 3m N \nu_{\max}^{-m} \nu^{m-1} d\nu. \quad (3.1)$$

При рассмотрении невзаимодействующих слоев и цепей на основе этих распределений частот было получено обобщенное уравнение теплоемкости

$$C_m = 3mR \left( \frac{T}{\Theta_m} \right)^m \int_0^{\Theta_m/T} \frac{(\Theta/T)^{m+1} e^{\Theta/T}}{(e^{\Theta/T} - 1)^2} d(\Theta/T), \quad (3.2)$$

из которого следуют три возможных частных случая: а) для трехмерного континуума Дебая; б) для слоев, или двумерных континуумов; в) для цепей, или одномерных континуумов.

Выражение теплоемкости для сильно анизотропных тел (полимеров в твердом состоянии) с учетом преимущественного вклада одномерных структур (цепей) имеет вид<sup>76,82,85</sup>

$$\begin{aligned} \frac{C_{1,3}}{3R} &= D_1 \left( \frac{\Theta_1}{T} \right) - \frac{\Theta_3}{\Theta_1} \left[ D_1 \left( \frac{\Theta_3}{T} \right) - D_3 \left( \frac{\Theta_3}{T} \right) \right], \\ D_n \left( \frac{\Theta_n}{T} \right) &= n \left( \frac{T}{\Theta_n} \right) \int_0^{\Theta_n/T} X^{n+1} e^X (e^X - 1)^{-2} dX, \end{aligned} \quad (3.3)$$

где  $R$  — газовая постоянная,  $D_n(\Theta_n/T)$  — интеграл Дебая, и  $n$  — показатель размерности. Для тел с учетом преимущественного вклада двумерных структур (слоев)

$$\frac{C_{2,3}}{3R} = D_2 \left( \frac{\Theta_2}{T} \right) - \left( \frac{\Theta_3}{\Theta_2} \right)^2 \left[ D_2 \left( \frac{\Theta_3}{T} \right) - D_3 \left( \frac{\Theta_3}{T} \right) \right]. \quad (3.4)$$

В соответствии с вышеизложенным теплоемкость кристалла, образованного цепными молекулами, сначала возрастает пропорционально  $T^3$ , затем  $\sim T$  и далее достигает постоянного классического значения.

Следует отметить, что многие авторы, используя приближение Тарасова, смогли добиться удивительно хорошего совпадения расчетных значений теплоемкости с экспериментальными (см. работы Вундерлиха<sup>86</sup> и Риз и Таккера<sup>87</sup>). Однако, как подчеркивается Вундерлихом и Бауром<sup>76</sup>, остается неясным, в какой степени это совпадение можно связать с правильностью выбора физической модели. Приближение Тарасова позволяет достаточно точно рассчитывать в области низких частот решеточный спектр валентных колебаний, но не дает возможности определить аналогичный спектр деформационных колебаний. По-видимому<sup>76</sup>, это обусловлено тем, что в теории одномерного континуума при выводе для функции спектрального распределения не учитывается тот факт, что деформационные колебания связаны прежде всего с деформацией валентных углов<sup>84</sup>. Другими словами, в теории Тарасова не учитывается гибкость отдельных слоев и соответственно связанная с ней деформируемость валентных углов (например, C—C—C). Силы, возникающие при деформации валентных углов, приводят к существенному изменению спектра деформационных колебаний, и вклад этих колебаний в теплоемкость не может быть описан при помощи «двумерной» функции Дебая<sup>76</sup>.

Наиболее корректная физическая интерпретация тепловых свойств цепных и слоистых структур при низких температурах была дана в работах И. М. Лифшица<sup>79,80</sup>. И. М. Лифшиц показал, что волны «изгиба» с законом дисперсии  $\nu \sim k^2$ , распространяющиеся в тонких пленках и «иглах»\*), приводят к своеобраз-

\*) «Игольчатой» обычно называют структуру кристалла, который состоит из слабо взаимодействующих параллельных линейных цепочек. Если взаимодействие между атомами вдоль отдельной цепочки значительно превосходит взаимодействие между ними в соседних цепочках, то динамика такого кристалла подобна динамике слоистого кристалла<sup>77</sup>.

разным температурным зависимостям теплоемкости при достаточно низких температурах.

Для получения более ясного представления о физической картине изменений тепловых свойств цепных и слоистых структур при низких температурах, вызванных существенной перестройкой закона дисперсии сильно анизотропных кристаллов, обратимся к схематическому графику, заимствованному из книги Косевича <sup>77</sup> (рис. 10). Этот график дает общее представление о функции распределения частот изгибных колебаний сильно анизотропного кристалла. Участок 1 на графике соответствует квадратической зависимости  $\nu(\omega)$  от частоты, участок 2 — линейной зависимости, а участок 3

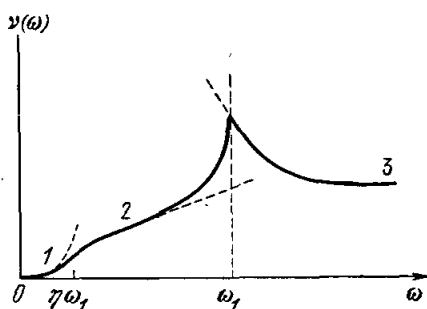


Рис. 10. Функция распределения частот изгибных колебаний сильно анизотропного кристалла <sup>77</sup>.

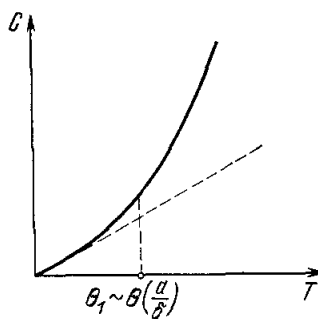


Рис. 11. Теплоемкость тонких пленок по Лифшицу <sup>79</sup>.

3 — постоянному значению  $\nu(\omega)$  при  $\omega \gg \omega_1$ . На графике отмечена «корневая особенность» функции  $\nu(\omega)$  при частоте  $\omega = \omega_1$  <sup>77</sup>.

Из-за того что функция распределения частот для сильно анизотропного кристалла разбивается на несколько интервалов, область низких температур будет состоять из нескольких интервалов с различной температурной зависимостью теплоемкости кристалла. Так, для тонких пластин (рис. 11) (пленки) при  $T \ll \Theta_1$  Лифшицем было получено выражение

$$C = \frac{2\alpha k}{\delta^2 (T/\Theta)}, \quad (3.5)$$

где  $\delta$  — толщина пленки,  $\alpha = (\pi\sqrt{3}/12)\sqrt{1-\sigma}$  (где  $\sigma$  — коэффициент Пуассона); при  $\Theta_1 \ll T \ll \Theta$ ,  $C \sim (T/\Theta)^3$ .

Для теплоемкости тонких игл (рис. 12)

$$C = \nu \sqrt{\frac{T}{\Theta}}, \quad \nu = \frac{2k}{R}.$$

Как и в случае пластины, при  $\Theta_1 \ll T \ll \Theta$  мы имеем обычную зависимость  $C \sim T^3$ . Ход теплоемкости схематически изображен на рис. 12.

Далее И. М. Лифшиц рассмотрел теплоемкости реальных цепных и слоистых структур с учетом взаимодействия между слоями (соответственно цепями). В данном случае, как указывалось выше, необходимым оказалось учесть закон дисперсии в кристалле, в котором силы взаимодействия, действующие в одном направлении, сильно отличаются от сил, действующих в двух других направлениях.

В той области температур, в которой взаимодействие между слоями несущественно, волны «изгиба» приводят к теплоемкости  $C \sim T$ . При более низких температурах, когда взаимодействие между слоями становится существенным, имеют место зависимости (с точностью до главных по  $(T/\Theta)$  членов)

$$C \sim T^3, \quad T \ll \Theta \left( \frac{\mu}{\alpha} \right), \quad (3.6)$$

$$C \sim T^2, \quad \Theta \left( \frac{\mu}{\alpha} \right) \ll T \ll \Theta \sqrt{\frac{\beta}{\alpha}},$$

где  $\mu$  — модуль сдвига между слоями,  $\beta$  — модуль Юнга в направлении  $Z$  ( $\lambda_{zzzz}$ ),  $\alpha$  — модуль Юнга в плоскости слоя ( $\lambda_{xxxx}$ ).

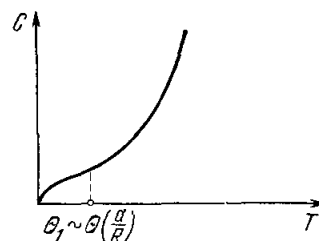


Рис. 12. Теплоемкость тонких игл по Лифшицу <sup>80</sup>.

Существенно, что при весьма малых  $\mu$  ( $\mu \ll \beta, \alpha$ ) область квадратичной зависимости может стать достаточно широкой. Кроме того, как показано в работе И. М. Лифшица, для цепных структур учет «волн изгиба» приводит в приближении невзаимодействующих цепей к закону  $C \sim \sqrt{T}$ , что существенно отличается от уравнения, полученного Тарасовым для случая невзаимодействующих цепей при очень низких температурах без учета изгибных колебаний. Отметим также, что ряд экспериментальных данных<sup>83,88,89</sup> находится в хорошем согласии с теорией Лифшица.

Таким образом, учет колебаний с обычным законом дисперсии приводит к линейной зависимости теплоемкости от температуры, а дополнительный учет волн изгиба существенным образом меняет температурную зависимость теплоемкости — она становится пропорциональной квадратичному корню от температуры. В теории Тарасова учет взаимодействия проведен путем довольно формального комбинирования трехмерного континуума с одномерным, тогда как основной метод, развитый в работах И. М. Лифшица, заключается в отыскании закона дисперсии для длинноволновой части спектра колебаний слоистого кристалла как целого в приближении, в котором, помимо уравнений теории упругости сильно анизотропного тела (цепные и слоистые структуры), учитывается поперечная жесткость атомных слоев или цепей.

При решении задач, относящихся к поведению теплоемкости реальных полимерных молекул в твердом состоянии, возникает также необходимость учета вклада теплоемкости, связанной с подвижностью боковых групп полимерных звеньев<sup>83</sup>.

Химическая структура полимера будет определяющим при расчете соотношения скелетной теплоемкости и теплоемкости связанной с подвижностью боковых групп. Первый вносит основной вклад в низкотемпературную теплоемкость полимера, так как скелетные колебания являются акустическими колебаниями и отдельные звенья цепи могут рассматриваться как точечные массы (особенно для полимеров с легкими боковыми радикалами). Вклад других групп колебаний, вызванных отдельными группами атомов, зависит от соотношения масс атомов основной цепи и боковой группы и от температуры. Эти колебания характеризуются значительно большими частотами, чем скелетные колебания. В результате их вклад в теплоемкость становится ощутимым, начиная с умеренно низких температур<sup>83</sup> (см. работы<sup>88,89</sup>, в которых проведен расчет колебательных спектров двух простейших полимеров — полиэтилена и политетраф-ар-этилена).

#### 4. КАЛОРИМЕТРИЧЕСКИЕ ИЗМЕРЕНИЯ

В настоящее время большинство измерений теплоемкости производится одним из двух следующих методов:

а) Методом «теплового импульса», который состоит в том, что термически изолированному образцу сообщают известное количество тепловой энергии ( $\Delta Q$ ) и измеряют вызванное им повышение температуры  $\Delta T$ . Теплоемкость равна

$$C = \lim_{\Delta T \rightarrow 0} \frac{\Delta Q}{\Delta T}.$$

При измерении теплоемкости обычно применяется аппроксимация

$$C^*(\bar{T}) = \frac{\Delta Q}{\Delta T},$$

где  $\bar{T}$  — средняя точка температурного интервала  $\Delta T$ . Обычно измеряется  $C_p$  — теплоемкость при постоянном давлении.

б) Методом «непрерывного нагрева», когда тепло к образцу подводят с постоянной скоростью  $dQ/dt = P$  и регистрируют скорость повышения температуры образца. Теплоемкость в этом случае вычисляется по формуле

$$C = P \left| \left( \frac{dT}{dt} \right) \right|.$$

Как отмечалось выше, в последнее время в молекулярной биофизике и биологии для изучения тепловых свойств биополимеров применяются дифференциальные сканирующие микрокалориметры, работающие в режиме равномерного непрерывного нагрева (см. обзоры<sup>1-7</sup>).

Метод непрерывного нагрева обладает рядом преимуществ. Так, например, он является наиболее удобным для исследования теплот внутримолекулярных фазовых переходов и особых точек на кривых зависимости теплоемкости от температуры, поскольку для таких исследований наиболее важно высокое разрешение по температуре (малая величина  $\Delta T$ ). Современные сканирующие дифференциальные калориметры, работающие в режиме непрерывного нагрева, позволяют проводить прецизионные изме-

рения на микрограммовых количествах препарата, что также весьма важно. Чувствительность современных сканирующих микрокалориметров достигает  $10^{-7}$  *вт*.

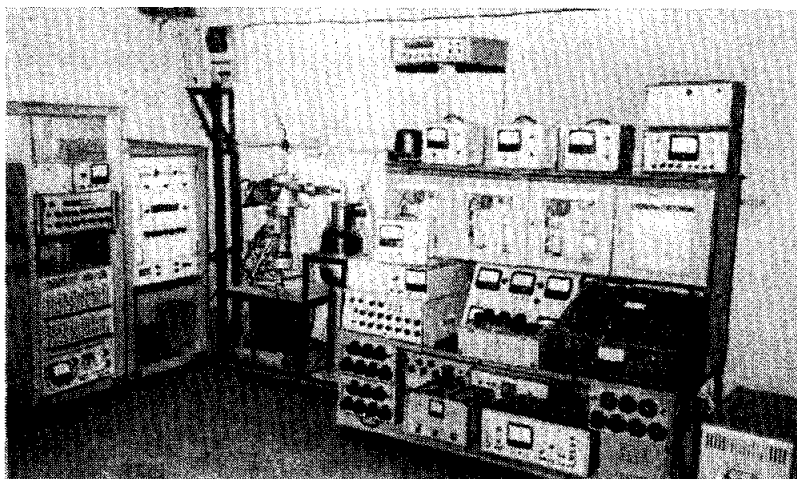


Рис. 13. Общий вид низкотемпературной калориметрической аппаратуры отдела физики биополимеров ИФ АН ГССР.

Достоинством метода теплового импульса является то, что до начала нагрева и после его окончания образец практически находится в тепловом равновесии. Следовательно, величина  $\Delta Q/\Delta T$  характеризует свойства образца в равновесном состоянии.

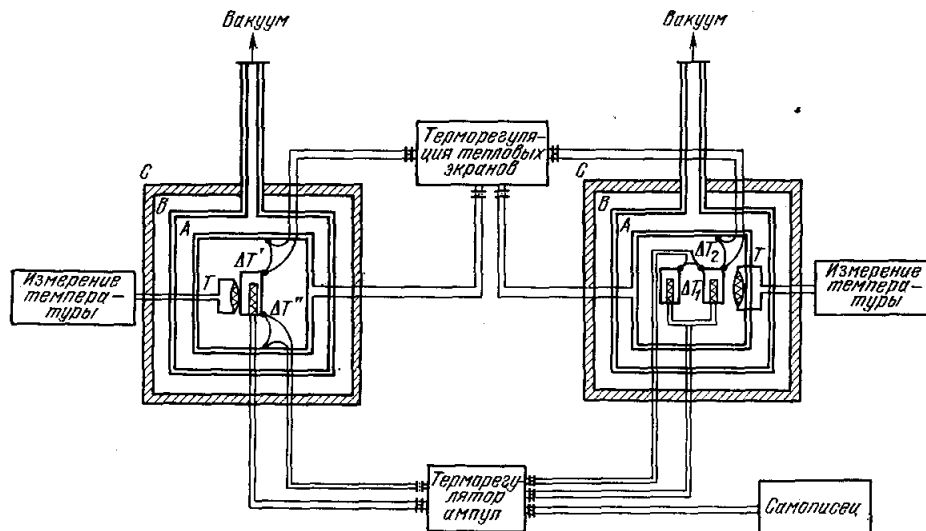


Рис. 14. Схема комплекса калориметрической аппаратуры, позволяющей проводить исследования тепловых свойств биологических объектов в режимах «теплового импульса» и «непрерывного нагрева» в широком интервале температур.

А — тепловые экраны, В — вакуумный кожух, С — криостат,  $\Delta T$  — датчики, регистрирующие разности температур<sup>113</sup>.

Метод непрерывного нагрева, при использовании которого в образце непрерывно поддерживается поток тепла, напротив, позволяет определять свойство образца только в неравновесном состоянии. Именно поэтому и при наличии высокочувствительной сканирующей калориметрии для точных измерений удельной теплоемкости использу-

ются современные калориметры, работающие в режиме теплового импульса<sup>90-93</sup>. Требования равновесных условий проведения калориметрических измерений становятся особенно важными, если задача исследователя — определение формы кривых температурной зависимости теплоемкостей при низких температурах и вычисление абсолютных значений термодинамических функций (изменение энтальпии, энтропии, свободной энергии) вещества. В том случае, когда применяется метод непрерывного нагрева, необходимо проводить измерения теплоемкости в представляющем интерес диапазоне температур при трех или более различных скоростях нагрева, чтобы произвести затем экстраполяцию к нулевой скорости нагрева. Только в этом случае получаемые результаты характеризуют уже равновесные свойства образца, что снимает одно из основных возражений против применения метода непрерывного нагрева.

Мы не будем останавливаться на описании различных калориметров, применяемых для изучения биополимеров в широком интервале температур, в различных лабо-

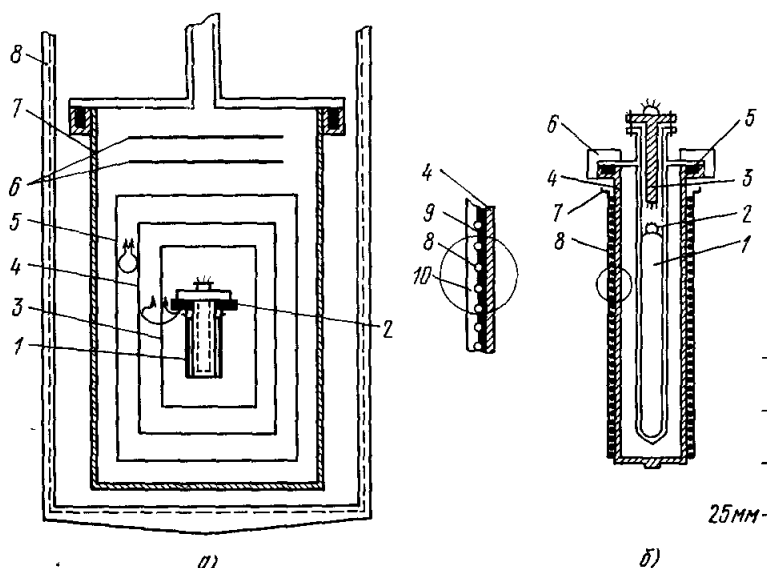


Рис. 15. Схема вакуумного адиабатического низкотемпературного калориметра<sup>24, 29</sup>. а) 1 — калориметрическая ампула с образцом, 2 — медное кольцо, 3 — тепловой экран, 4, 5 — адиабатические экраны с нагревателями, 6 — медные диски для уравнивания температуры подводящих проводов, 7 — вакуумный кожух, 8 — металлический гелиевый криостат; б) калориметрическая ампула: 1 — платиновый термометр сопротивления капсультного типа, 2 — позолоченная медная гильза для термометра, 3 — шпилька для термического уравнивания проводов, 4 — корпус, 5 — прокладка, 6 — накидная гайка, 7 — выводы нагревателя, 8 — нагреватель, 9 — изоляционный слой, 10 — покрытие серебром.

раториях. В качестве иллюстрации ограничимся описанием комплекса низкотемпературной калориметрической аппаратуры Института физики АН ГССР (рис. 13, 14). Отличительной особенностью используемой аппаратуры является то, что с помощью ее возможно проведение калориметрического эксперимента как методом «теплового импульса», так и в режиме «непрерывного нагрева». В данном случае используется одна электронная система управления калориметрическим экспериментом. В металлический криостат с хладагентом (жидкий азот, жидкий гелий) опускается либо вакуумный кожух абсолютного адиабатического калориметра (левая часть рис. 14 и рис. 15), либо вакуумный кожух дифференциального сканирующего микрокалориметра (правая часть рис. 14 и рис. 16). С помощью набора разъемов одна из систем подключается к электронным блокам автоматического регулирования тепловым режимом установок. Электронная система управления тепловым режимом калориметра, разработанная в нашей лаборатории (см. работу Монаселидзе и Бакрадзе<sup>10, 11</sup> и Квавадзе<sup>4</sup>), позволяет получить хорошую адиабатизацию и полностью автоматизировать калориметрический эксперимент.

Детальное описание калориметров приводится в работах<sup>10-12, 24, 29, 94</sup>. Здесь отметим, что объем ампулы адиабатного вакуумного низкотемпературного калориметра составляет  $2 \text{ см}^3$ . Измерения удельной теплоемкости проводятся методом теплового импульса через каждые  $1-4^\circ$  с выжиданием теплового равновесия в течение  $1-2 \text{ час}$ .

Среднеквадратичная ошибка отдельного измерения теплоемкости образцов не превосходит  $\pm 1\%$ , а разброс результатов при повторных измерениях не превышает  $\pm 0,5\%$ . Обработка данных проводится с помощью ЭВМ.

Основные технические характеристики используемого в ИФ АН СССР вакуумного низкотемпературного сканирующего микрокалориметра следующие: рабочий диапазон температур 80—400° К; скорость прогрева 2°/час — 25°/час; рабочий объем измерительных ячеек 0,03 мл; чувствительность  $\approx 10^{-7}$  вт; точность регистрации температуры 0,1° К (см. работы <sup>10-12,29</sup>).

Основные технические характеристики низкотемпературного сканирующего дифференциального калориметра ИФ АН СССР, работающего при гелиевых температурах (см. <sup>94,29</sup>) следующие: рабочий диапазон температур 2—30° К; скорость нагрева 2°/час — 10°/час; рабочий объем измерительных ячеек 10—25 см<sup>3</sup>; чувствительность  $4 \cdot 10^{-8}$  вт; точность регистрации температуры  $\pm 0,005^\circ$  К. (Описание других калориметрических установок, применяемых в различных лабораториях, можно найти в цитированных работах <sup>31,40,47,48,90,95</sup>. Однако следует отметить, что в большинстве случаев, судя по теплофизическим характеристикам этих установок, они уступают описанным нами калориметрам.)

## 5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

### а) Удельная теплоемкость и термодинамические величины аминокислотных остатков в интервале температур 1,5—350° К

В настоящее время мы располагаем данными о термодинамических величинах практических для всех аминокислотных остатков <sup>31-37</sup> в твердом состоянии в интервале температур 10—350° К (для *L*-аланина с 1,5° К).

Экспериментальная процедура приготовления образцов включала получение материалов в кристаллическом состоянии с последующей дегидратацией (удаление воды). Проводилась проверка на кристалличность (исследования в поляризационном микроскопе) и анализ на содержание углерода, водорода и азота. Применялись и некоторые тесты на биохимическую активность препаратов до и после проведения серии калориметрических экспериментов <sup>31-37</sup>.

Теплоемкость кристаллических аминокислот измерялась с помощью низкотемпературного адиабатического калориметра (рабочий объем ампулы  $\sim 100$  см<sup>3</sup>), разработанного авторами специально для изучения биологических объектов, работающего в режиме «теплового импульса» (см. гл. 4 и <sup>96</sup>). (Следует отметить, однако, что большой рабочий объем делает практически неприменимым такой калориметр для изучения слишком дорогостоящих и дефицитных препаратов белков, ферментов, нуклеиновых кислот и др.).

В качестве примера на рис. 17 приведена температурная зависимость теплоемкости *L*-пролина в твердом состоянии, построенная по данным, табулированным Хатченсом и сотр. <sup>34</sup>.

Это типичная зависимость  $C_p = f(T)$  для всех аминокислот в кристаллическом состоянии. Исключение составляет *L*-метионин, для которого был обнаружен переход в интервале температур 180—350° К с максимумом

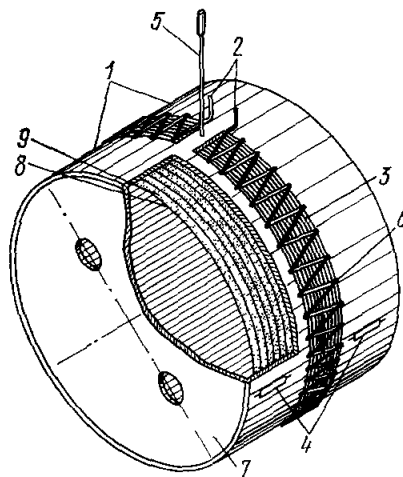


Рис. 16. Дифференциальная ампула вакуумного низкотемпературного сканирующего калориметра <sup>94, 29</sup>.

1 — контейнеры для измерительных ячеек, 2 — выводы нагревателей и термопар, 3 — нагреватель, 4 — германиевые термометры сопротивления, 5 — штырек для подвешивания ампулы, 6 — термобатарея, 7 — крышка, 8 — медные позолоченные диски для увеличения теплопроводности образца, 9 — образец.

теплоемкости при 305,5° К (рис. 18). Изменение энтропии при этом переходе составило 4,2 кал·(°К)<sup>-1</sup> моль<sup>-1</sup>.

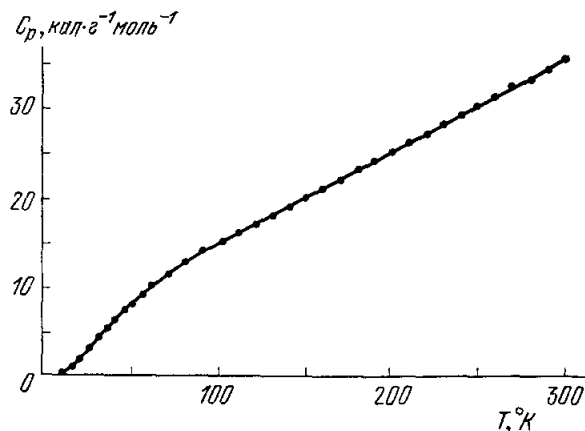


Рис. 17. Температурная зависимость теплоемкости кристаллического L-пролина <sup>24</sup>.

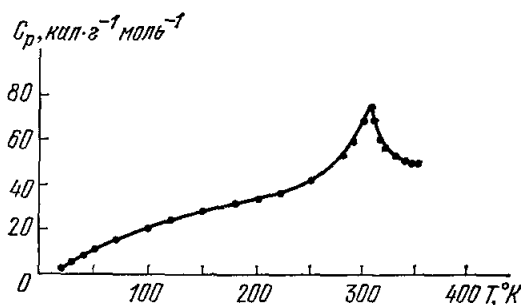


Рис. 18. Температурная зависимость теплоемкости кристаллического L-метионина <sup>25</sup>.

Дорелем и сотр. <sup>47</sup> и Файнголдом и Кудз <sup>42, 43</sup> была также изучена теплоемкость L-аланина в твердом состоянии при температурах 1,5—300° К <sup>47</sup> и 1,5—20° К <sup>42, 43</sup>. Авторы использовали классическую модель Дебая и вели расчет теплоемкости L-аланина в твердом состоянии по формуле

$$C = \frac{12}{5} r k N \pi^4 \left( \frac{T}{\Theta_P} \right)^3,$$

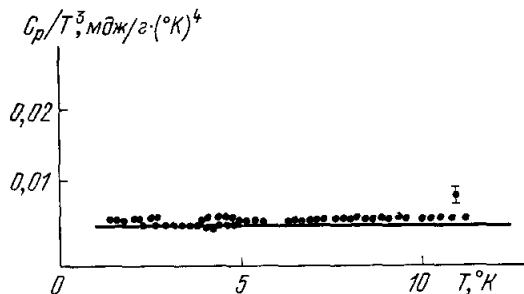


Рис. 19. Зависимость  $C_p/T^3 = f(T)$  для кристаллического L-аланина при низких температурах.

Сплошная линия — расчет по модели Дебая ( $r=2$ ) <sup>47</sup>.

кристаллы аминокислоты полностью описываются трехмерной моделью Дебая и при низких температурах характеризуются зависимостью теплоемкости  $T^3$ .

исходя из того, что молекулярный кристалл должен иметь зависимость  $C \sim T^3$  в области низких температур. На рис. 19 приведена экспериментально полученная зависимость  $C_p/T^3 = f(T)$  для твердого L-аланина. Как видно из зависимости,



Таблица I

Термодинамические параметры аминокислот при 298,15° К  
(все величины в кал·моль<sup>-1</sup>·град<sup>-1</sup>; 1 кал = 4,186 Дж)

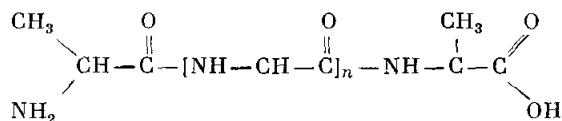
Аминокислота	$C_p$	$S_0 = \int_0^{298} C_p/T dT$	$\frac{H_0 - H_0^0}{T}$	$\frac{F_0 - H_0^0}{T}$
Глицин	23,71	24,74	12,97	11,77
Аланин	29,22	30,88	16,06	14,82
Валин	40,35	42,75	22,11	20,64
Лейцин	48,03	50,62	25,35	25,27
Изолейцин	45,00	49,71	24,90	24,81
Аспарагиновая кислота	37,09	40,66	20,69	19,96
Глютаминовая кислота	41,84	44,98	23,06	21,92
Серин	32,40	35,65	18,16	17,49
Треонин	39,7	—	—	—
Лизин	57,10	63,21	31,72	31,49
Аргинин	62,37	68,43	34,59	33,84
Гистидин	59,64	65,99	33,16	32,83
Фенилаланин	48,52	51,06	25,61	25,45
Тирозин	51,73	51,15	26,75	24,39
Триптофан	56,92	60,00	29,83	30,17
Цистеин	—	—	—	—
Цистин	62,60	67,06	34,42	32,65
Метионин	69,32	55,32	28,14	27,18
Пролин	36,13	39,21	19,59	19,62
Оксипролин	—	—	—	—

В табл. I приведены термодинамические параметры — теплоемкость, энтропия, изменение энтальпии и свободной энергии, для всех аминокислот при температуре 298,15° К. Таблица составлена нами по данным<sup>31-37</sup>.

Таким образом, к настоящему времени закончены работы по определению термодинамических величин аминокислот — основных строительных блоков белковых полимерных цепочек и поставлен вопрос об учете этих величин при термодинамическом анализе полипептидов и белков, обладающих сложной пространственной структурой, в широком интервале температур, включая температурный интервал жидкого гелия.

б) Удельная теплоемкость и термодинамические величины полипептидов в интервале температур 1,5—300° К

Прецизионные измерения низкотемпературной теплоемкости поли-L-аланина (ПЛА) в двух конформациях:  $\alpha$ -спиральной и  $\beta$ -складчатой структуры были проведены Деле и сотр.<sup>46</sup> в исследовательском центре Р. Паскаля (Таленс, Франция) в 1970 г., Файнголдом и Кудз<sup>40-43</sup> в Колорадском университете, США в 1972 г. (в интервале 1,5—20° К) и повторены французской группой в 1975 г. однако в гораздо более широком интервале температур (1,5—300° К)<sup>47</sup>. Поли-L-аланин имеет следующую химическую структуру:



( $n$  — число мономеров в полипептидной цепи).

Существуют известные трудности полимеризации ПЛА и идентификации возникающих упорядоченных форм полипептидной цепи. В работах <sup>40-43, 47</sup> конформация полипептидной цепи ПЛА проверялась независимыми экспериментами с помощью методов инфракрасной спектроскопии ( $400-4000\text{ см}^{-1}$ ) и рентгеноструктурного анализа.

На рис. 20 приведены зависимости  $C_p/T^3 = f(T)$  для ПЛА в форме  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -складчатой структуры <sup>40-43</sup>. Точками обозначены экспериментальные значения; сплошная линия соответствует модели Тарасова для «одномерной» ( $\alpha$ -спираль) и «двумерной» ( $\beta$ -форма) структур в трехмерном континууме с учетом независимого набора вибраторов. Штриховая

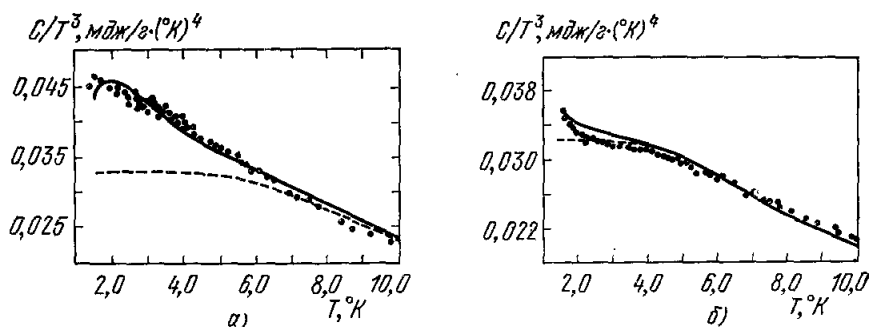


Рис. 20. Зависимость  $C_p/T^3 = f(T)$  для поли-L-аланина в  $\alpha$ - (а) и  $\beta$ -конформациях (б). Точки — экспериментальные значения. Штриховая линия — расчет по модели Тарасова, сплошная линия — расчет по модели Тарасова с учетом вклада независимого набора вибраторов <sup>41</sup>.

линия отражает зависимость  $C_p/T^3 = f(T)$ , отвечающую модели Тарасова (без учета независимых колебаний).

Как видно из приведенных графиков, экспериментальные значения согласуются с моделью Тарасова только в том случае, если учитывается малое количество независимых осцилляторов, обладающих одинаковыми частотами (эйнштейновские осцилляторы); по мнению авторов, эти результаты могут быть использованы для оценки вклада «одномерных» и «двухмерных» структур в теплоемкость твердого тела.

Как было отмечено, Дорель и др. <sup>47</sup> изучили удельную теплоемкость ПЛА в  $\alpha$ - и  $\beta$ -конформациях в широком интервале температур ( $1-300^\circ\text{K}$ ). Образцы содержали  $85 \pm 15\%$  полипептидных цепей в  $\alpha$ -форме и  $85 \pm 15\%$  в  $\beta$ -форме. Теплоемкость рассчитывалась, согласно классической модели Дебая, при различных значениях параметра  $r$  (количество вибраторов). На рис. 21 приводится температурная зависимость теплоемкости ПЛА для «чистой»  $\alpha$ - и  $\beta$ -конформаций в интервале температур  $1-300^\circ\text{K}$ .

Для объяснения полученных экспериментальных данных авторы использовали упрощенную модель Тарасова и провели расчет теплоемкости по выражениям (3.3) и (3.4) для  $C_{1,3}$  и  $C_{2,3}$ , допустив существование только одного вида колеблющихся единиц ( $r = 1$ ). Такое упрощение позволяет рассмотреть только удельную теплоемкость, соответствующую акустическим ветвям колебаний.

Сравнение экспериментальных и расчетных данных приведено на рис. 21.

На рис. 22 приведено сравнение экспериментальных данных, полученных Дорелем и сотр. <sup>47</sup>, с теоретическими расчетами  $C_p = f(T)$ , проведенными Фанкони и др. <sup>96</sup> и Вундерлихом и Бауром <sup>97</sup> для слоистых, анизотропных полимерных тел.

Как видно из зависимостей, в области температур 80—150° К экспериментальные данные хорошо согласуются с теоретическими расчетами,

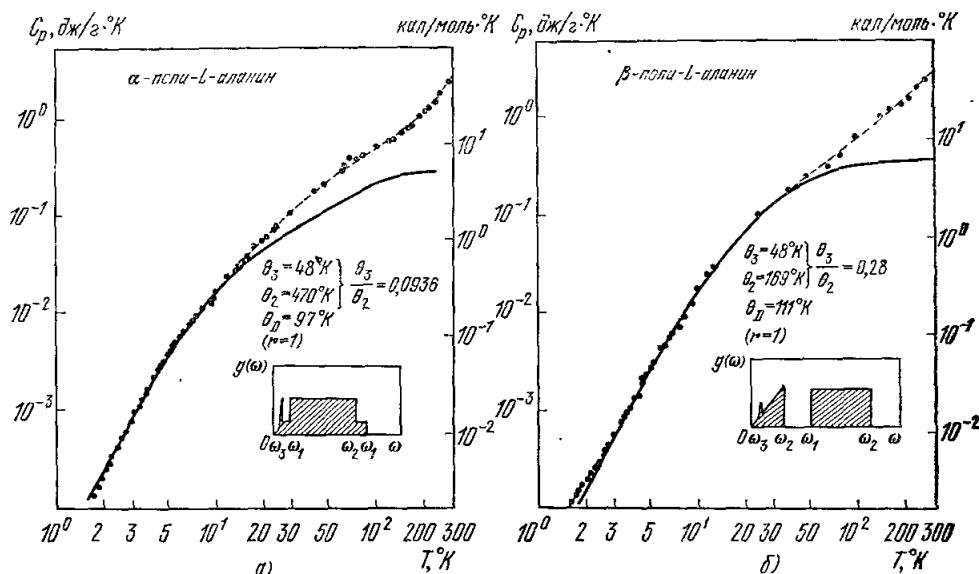


Рис. 21. Температурная зависимость поли-L-аланина в конформациях «чистая  $\alpha$ -спираль» (а) и «чистая  $\beta$ -структура» (б).

Сплошные линии — расчет по модели Тарасова (по формулам (3.3) и (3.4) для  $C_{1,3}$  и  $C_{2,3}$ ). Приводится также колебательный спектр для обеих форм<sup>47</sup>.  $\omega$  — частота колебаний.

учитывающими специфику поведения одномерных структур в трехмерном континууме. Интересно отметить, что для  $\beta$ -формы данные больше отличаются от величин, рассчитанных для одномерных структур. Это свидетельствует о том, что складчатую  $\beta$ -форму нельзя отождествлять с «одномерной» структурой. При низких и высоких температурах имеются существенные отклонения в зависимостях  $C_p = f(T)$  от теоретических значений для обеих форм полипептидной цепи. Отклонения в области низких температур могут быть результатом некорректного учета особенностей тепловых свойств сильно анизотропных тел, связанных с поперечной жесткостью отдельных атомных слоев и цепей и необычного закона дисперсии для длинноволновой части спектра (см. гл. 3).

Интересные результаты по изучению низкотемпературной теплоемкости гомополимеров были получены Фанкони и Фейнголдом<sup>44</sup> в Институте исследований материалов Национального Бюро стандартов (Вашингтон) и Дрекслерском университете (Филадельфия). Была изучена теплоемкость поли-L-глицина II. Известно, что полиглицин (ПГ), или поли-(—СОСНRNH—), где R = H, может существовать в форме  $\beta$ -складчатой

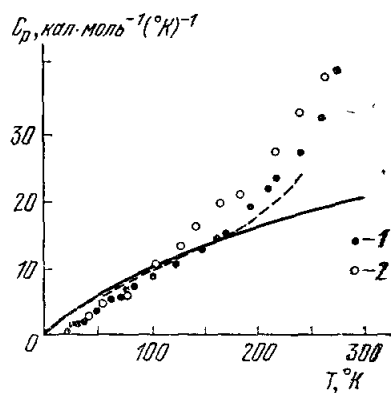


Рис. 22. Сравнение экспериментальных данных температурной зависимости поли-L-аланина с теоретическими расчетами Фанкони и др.<sup>96</sup> и Вундерлиха<sup>97</sup>.

1 —  $\alpha$ -форма, 2 —  $\beta$ -форма; сплошная линия — данные<sup>96</sup>, штриховая —<sup>97</sup>.

структуры (ПГ-I) или в виде тройной спирали (ПГ-II), в которой в свою очередь возможны параллельная и антипараллельная укладки трех полипептидных цепей, скрепленных межцепочечными водородными связями. Авторы задались целью получить расчетным путем плотность спектрального

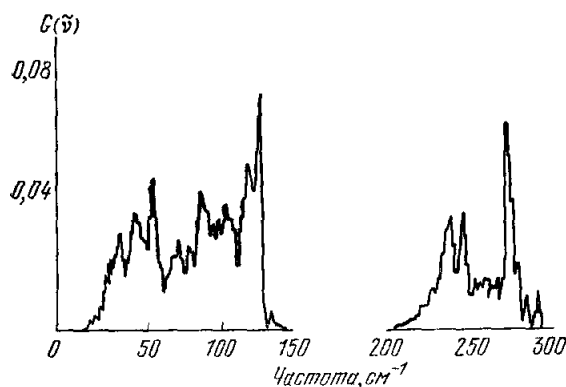


Рис. 23. Плотность спектрального распределения для полиглицина-II<sup>44</sup>.

распределения для ПГ-II и сравнить теоретически рассчитанную теплоемкость с экспериментальной зависимостью  $C_p = f(T)$ . Для упрощения расчета принималось параллельное расположение цепей относительно оси спирали и учитывались силовые постоянные, относящиеся к водородным связям.

На рис. 23 приведена плотность спектрального распределения ПГ-II. (Подробно о методе расчета см. <sup>44</sup>.) Частоты, большие чем  $350 \text{ см}^{-1}$ , мало влияют на низкотемпературную

теплоемкость. На рис. 24 приведены экспериментальные и расчетные зависимости теплоемкости  $C_p = f(T)$  и  $C_p/T^3 = f(T)$  для ПГ-II.

Как видно из приведенных зависимостей, качественное совпадение экспериментальных и расчетных данных хорошее. Причем, по мнению

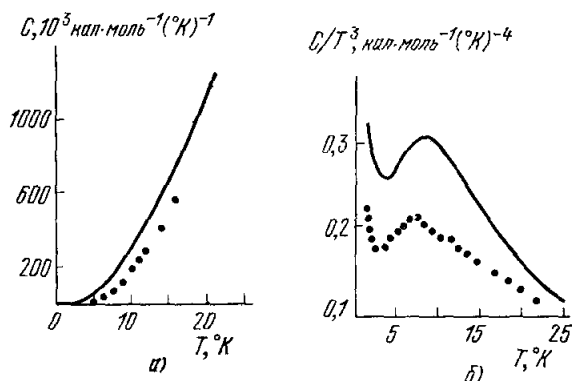


Рис. 24. Экспериментальные (точки) и расчетные зависимости  $C_p = f(T)$  (а) и  $C_p/T^3 = f(T)$  (б) для полиглицина-II<sup>44</sup>.

авторов, маловероятно, чтобы расхождение в количественных величинах было бы вызвано ошибками, которые обычно сопровождают измерения теплоемкости при очень низких температурах. Максимум при температуре вблизи  $8^\circ \text{K}$  впервые обнаружен для гомополимеров. Правда, в настоящее время не ясна природа наблюдаемого максимума, который соответствует частоте  $\sim 5 \text{ см}^{-1}$  и, следовательно, не может быть обнаружен с помощью инфракрасной и раман-спектроскопии. Во всяком случае, можно утверждать, что конформация ПГ-II приводит к таким особенностям низкотемпературной теплоемкости, которые не наблюдались для поли-L-аланина как в  $\alpha$ -, так и в  $\beta$ -конформациях и, следовательно, непосредственно

отражают специфику укладки полипептидных цепей и природу связей конформации тройной спирали ПГ-II.

Таким образом, имеющиеся данные по низкотемпературной теплоемкости полипептидов свидетельствуют о перспективности изучения термодинамических величин этих соединений для выявления их конформационных свойств при низких температурах, которые в свою очередь обязательно должны быть учтены при рассмотрении структурных особенностей биополимеров. Привлекательным является постановка вопроса об обнаружении преимущественной конформации полипептидных цепей в биополимерах с неизвестной пространственной структурой по данным теплоемкости.

в) Удельная теплоемкость  
и термодинамические величины  
глобулярных белков  
в интервале температур 10—350 °K

Глобулярные белки являлись первыми объектами исследования для проведения измерений теплоемкости биополимеров. Однако до 60-х годов отсутствовали данные об удельной теплоемкости этих белков в широком интервале температур. Основные усилия исследователей были направлены на изучение термодинамических величин, характеризующих фазовый переход в разбавленных растворах этих белков (см. гл. 2, в) и <sup>1-7</sup>). Кроме того, была разработана методика исследования состояния воды в растворах биополимеров с помощью низкотемпературной калориметрии (в интервале температур  $-50 \div 20^\circ \text{C}$ ), основанная на измерении теплоемкости растворов белков в этой температурной области <sup>74-75</sup>.

Первые прецизионные калориметрические измерения теплоемкости глобулярных белков в твердом состоянии в широком интервале температур (10—350° K), были проведены в лаборатории Хатченса в 1968—1970 гг. <sup>38-39</sup>. Объектом исследования являлись Zn-инсулин и химотрипсиноген А.

Изучение термодинамических параметров Zn-инсулина в широкой области температур, включая гелиевые температуры, оправдывалась следующими обстоятельствами:

а) Структура молекул Zn-инсулина была к тому времени установлена рентгеноструктурным методом с достаточно высоким разрешением; б) препараты Zn-инсулина получали в кристаллическом виде в свободной от солей форме (экспериментальные приемы приготовления образцов для измерения низкотемпературной теплоемкости глобулярных белков детально описаны в работе <sup>38</sup>).

Кроме Zn-инсулина, была измерена низкотемпературная теплоемкость для сывороточного альбумина и А-химотрипсиногена.

На рис. 25 приведена температурная зависимость теплоемкости этих белков в широком интервале температур (10—350° K). Из рисунка видно, что для всех глобулярных белков в твердом состоянии характер температурной зависимости теплоемкости одинаков. Обращает на себя внимание широкий интервал температур, в котором теплоемкость меняется по линейному закону (от 40° K и выше).

Исходя из данных по теплоемкости были рассчитаны остальные термодинамические функции для этих соединений. В табл. II мы суммировали данные по термодинамическим величинам глобулярных белков в твердом состоянии при температуре 298,15° K.

Из табл. II видно, что значения удельной теплоемкости и энтропии при 298,15° K мало отличаются для разных белков в твердом состоянии.

Таблица II

Термодинамические величины для глобулярных белков  
в твердом состоянии при 298,15° К (кал/100 г·град)

Белок	$C_p$	$S_0 = \int_0^{298} \frac{C_p}{T} dT$	$\frac{H_0 - H_0^0}{T}$	$-\frac{F_0 - H_0^0}{T}$
Зп-инсулин	29,96	31,44	15,85	15,85
Сывороточный альбумин	30,46	31,74	16,12	15,62
А-химотрипсिनоген	30,90	32,27	16,28	15,99

Более того, располагая значениями стандартных термодинамических величин для всех аминокислотных остатков и зная аминокислотный состав всех перечисленных белков, удалось рассчитать изменение энтропии при гипотетической реакции:

$N$  аминокислотных остатков  $\rightleftharpoons$  белок +  $(N - 1) \text{H}_2\text{O}$ , что дает возможность, сравнивая расчетные и экспериментальные данные, оценить

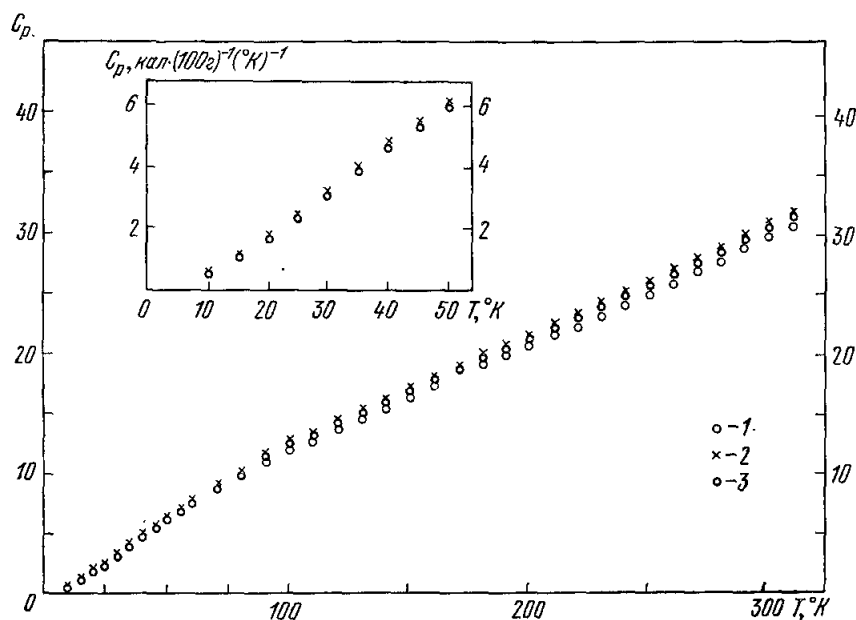


Рис. 25. Температурная зависимость теплоемкости для Зп-инсулина (1), А-химотрипсिनогена (2) и сывороточного альбумина (3) <sup>38</sup>.

Низкотемпературный участок зависимости приводится отдельно.

изменение энтропии при формировании пептидной связи. Оказалось, что эта величина для всех белков составляет  $\Delta S \approx 9$  кал/град·моль пептидной связи и совпадает с изменением энтропии при формировании дипептида <sup>38</sup>. Полученный результат весьма удивителен, так как совершенно не отражает специфику строения различных белков, заключающуюся в особенностях конформации полипептидных цепей и их пространственной укладке.

Таким образом, была сделана попытка рассчитать значения энтропии для белков в твердом состоянии, исходя из их аминокислотного состава

и экспериментальных данных по теплоемкости аминокислот и белков в твердом состоянии. Ясно, однако, что такой подход практически неприменим для расчета энтропии белков в разбавленных водных растворах, где стабилизация пространственной структуры белка достигается за счет баланса сил внутримолекулярных и межмолекулярных связей с растворителем (см. гл. 2, разд. а)).

Как стало известно из последующих экспериментов<sup>29, 73</sup>, отклонения в значениях теплоемкости для различных глобулярных белков в твердом состоянии ( $\Delta C_p$ ) гораздо меньше, чем разница между теплоемкостями данного белка, находящегося в спиральном и клубкообразном состояниях в разбавленных водных растворах ( $\Delta C_p$ ). Так,  $(\Delta C_p) = \pm 0,01 \text{ кал/г} \cdot \text{град}$ , в то время как  $(\Delta C_p) = +0,1 \text{ кал/г} \cdot \text{град}$ . Кроме того, было показано значительное различие в тепловых свойствах и механизмах конформационных переходов белковых макромолекул в разбавленных растворах и в концентрированном состоянии<sup>98, 99</sup>.

Анализ экспериментальных данных<sup>29</sup> показывает, что формирование пространственной структуры любого биополимера в процессе сорбции: твердый (высушенный) образец  $\rightarrow$  влажная пленка  $\rightarrow$  изотропный раствор — находится в прямой зависимости от полного построения гидратных слоев макромолекул. Иными словами, для каждой «конструкции» имеется свое критическое значение объемной доли растворителя, при достижении которого полимер принимает «равновесную» упорядоченную форму<sup>29</sup>.

Поэтому при низкотемпературных измерениях теплоемкости биополимеров большое внимание должно быть уделено правильному выбору величин объемных долей растворителя в образцах и измерения должны быть проведены в таких условиях, когда биополимер содержит минимальное количество кристаллизационной воды, необходимой для сохранения нативности данной конформации.

То, что это именно так, мы проиллюстрируем в последующих параграфах, основываясь на данных о низкотемпературной теплоемкости коллагена и ДНК, полученных в широком интервале температур.

#### г) Термодинамические свойства фибриллярного белка — коллагена в спиральном и клубковом состояниях при температурах 4—400° К

В Институте физики АН ГССР были проведены исследования белка соединительной ткани коллагена в спиральном и клубковом состояниях в интервале температур 4—400° К<sup>25-29</sup>.

Как было отмечено, молекула коллагена состоит из трех полипептидных цепей, образующих тройную суперспираль, скрепленную внутримолекулярными водородными связями (см. гл. 2, разд. а)). Вместе с тем макромолекула коллагена стабилизирована цепочкой гидратной воды, «вписанной» в тройную спираль<sup>100-102</sup>. Следовательно, при описании термодинамических свойств коллагена в спиральном и клубковом состояниях необходимо учитывать не только переход порядок — беспорядок самих полипептидных цепей, но и переход порядок — беспорядок в растворителе (воде)<sup>101</sup>. Конкретной термодинамической задачей являлось изучение низкотемпературной теплоемкости коллагена и определение избыточного значения энтропии коллагена, находящегося в клубковом состоянии относительно к тому же белку в спиральном состоянии.

На рис. 26 приводится температурная зависимость теплоемкости нативного дегидратированного коллагена в интервале температур 4—320° К. Отметим, что измерение теплоемкости коллагена было проведено

ранее в работе <sup>39</sup>, начиная с 10° К. Результаты можно считать хорошо согласующимися друг с другом.

Для выявления закономерностей в температурном поведении теплоемкости коллагена были построены зависимости  $C_p/T = f(T)$  и  $C_p/T^2 =$

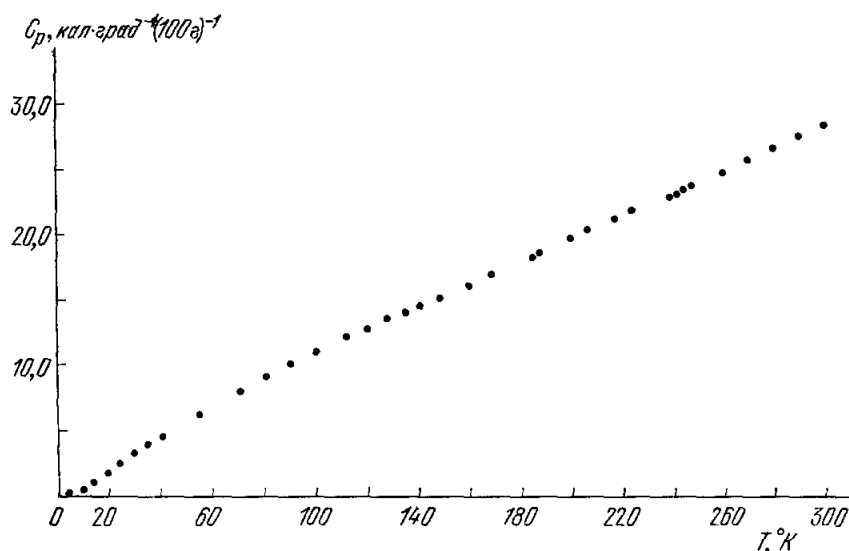


Рис. 26. Температурная зависимость теплоемкости нативного дегидратированного коллагена.

$= f(T)$  для нативных, дегидратированных пленок белка (рис. 27). Как видно из рисунка, в температурном интервале 4—50° К теплоемкость меняется пропорционально квадрату температуры. После 50° К налицо линейная зависимость.

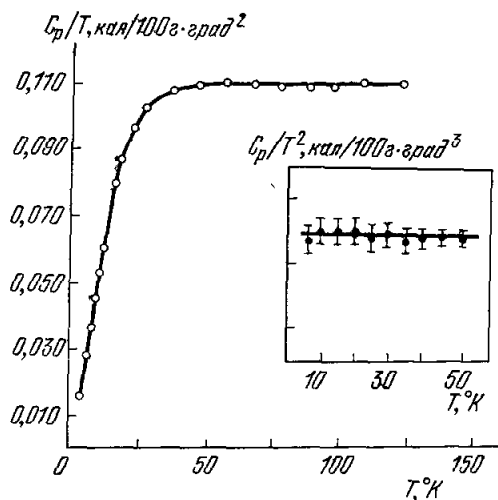


Рис. 27. Зависимость  $C_p/T = f_1(T)$  и  $C_p/T^2 = f_2(T)$  для нативного дегидратированного коллагена (низкотемпературный участок зависимости).

По данным теплоемкости, с использованием известных соотношений, были вычислены и другие термодинамические величины для данного белка (энтропия  $S_0$ , изменение энтальпии  $(H_0 - H_0^0)/T$  и функции свободной энергии  $-(F - H_0^0)/T$ ). Температурные зависимости этих величин приводятся на рис. 28.

Как было отмечено, биополимеры сохраняют пассивную, биологически функциональную структуру только в водной среде. Отсюда ясно, что принципиальным является изучение термодинамических свойств биополимеров именно в гидратированном состоянии. Методом калориметрии и ЯМР было определено <sup>101-102</sup> количество структурно-необходимой воды в

макромолекулах коллагена, находящихся в спиральном состоянии; оно составляет 0,35 г  $H_2O$  на 1 г белка (или  $\sim 5$  молекул  $H_2O$  на трицеп-



тидное звено ( $\Gamma - X - Y$ )). Именно такое соотношение воды к белку было взято при изучении низкотемпературного поведения гидратированных образцов коллагена (рис. 29). Обращаем внимание на резкое отличие хода кривой теплоемкости гидратированного коллагена (точки) по сравнению с дегидратированным белком (штриховая линия).

Температурная область 240—273° К изучена нами достаточно подробно для белков различной конформации (глобулярных и фибриллярных) при различных концентрациях воды в образцах (см. <sup>75</sup>). Во всех случаях

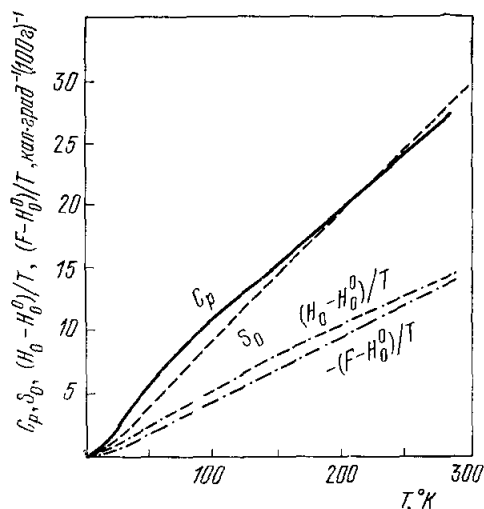


Рис. 28. Температурные зависимости термодинамических величин для нативного дегидратированного коллагена.

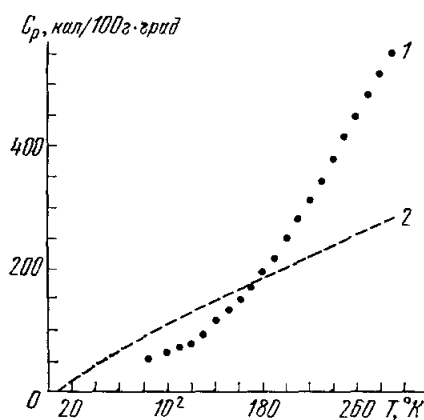


Рис. 29. Температурная зависимость теплоемкости гидратированного ( $\sim 5$  молекул  $H_2O$  на трипептидное звено) (1) и дегидратированного коллагена (2).

удается выявить критическую концентрацию, при которой вся вода в макромолекулах находится в связанном — невымораживаемом состоянии. Отсутствие теплопоглощения в этой области температур для коллагена (рис. 29) свидетельствует о том, что вся вода, добавленная к дегидратированному белку, наличие которой резко изменило зависимость  $C_p = f(T)$ , «связалась» с макромолекулами коллагена, став составной частью тройной спирали белка.

Рассмотрим далее низкотемпературное поведение коллагена, молекулы которого в результате тепловой денатурации были переведены в состояние статистических клубков. Отметим, что и в данном случае измерялась теплоемкость гидратированных (0,35 г  $H_2O$  на 1 г белка) и дегидратированных образцов.

На рис. 30 приведена температурная зависимость разности теплоемкостей гидратированного денатурированного (клубок) и гидратированного нативного (спираль) коллагена в интервале температур 4—310° К:

$$\Delta C_p = C_{\text{клубок}} - C_{\text{спираль}}.$$

Обращают на себя внимание три температурные области, в которых особенно резко проявляются различия в теплоемкостях коллагена в спиральном и клубковом состояниях:

1) Начиная с 4° К разность в теплоемкостях между клубком и спиралью постепенно нарастает, делается максимальной при 15° К и затем начинает уменьшаться.

2) С 70° К теплоемкость коллагена в клубковом состоянии снова начинает опережать теплоемкость нативного белка и при 120° К  $\Delta C_p$  достигает максимального значения.

3) При температурах 230—240° К теплоемкости нативного и денатурированного белка становятся равными, после чего  $\Delta C_p$  становится отрицательной вплоть до 310° К, т. е. до температуры, с которой начинается аномальный рост теплоемкости, связанный с плавлением нативного белка.

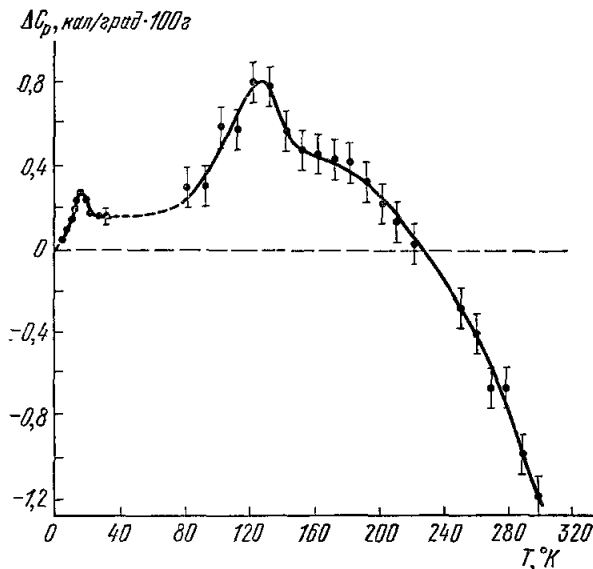


Рис. 30. Температурная зависимость разности теплоемкостей между гидратированными образцами коллагена в состоянии спирали и клубка ( $\Delta C_p = C_{\text{клубок}} - C_{\text{спираль}}$ ).

ным образом взаимодействиями между отдельными полипептидными цепями белка, поскольку в данном температурном интервале  $C_p \sim T^2$ . При увеличении температуры, по-видимому, происходит легкое скольжение между цепями, которое, сохраняя одномерность, гасит изгибные колебания и приводит к линейной зависимости теплоемкости.

Отличие в характере температурной зависимости теплоемкости для дегидратированных и гидратированных образцов коллагена показывает, насколько существенным является для тепловых свойств этого белка специфическое взаимодействие молекул воды с его полипептидными цепями. На рис. 32 мы приводим (см. также работу<sup>103</sup>) схему цепочечной гидратации коллагена и возможные ориентации молекул воды в белке, находящегося в спиральном и клубковом состоянии, опираясь на геометрическую модель гидратации коллагена, предложенную в работе<sup>100</sup>. В то время как в нативном белке существует строгая корреляция в ориентации молекул воды вдоль оси макромолекулы, для коллагена в клубковом состоянии

Совершенно иная картина наблюдается при исследовании разности теплоемкостей для дегидратированных образцов в состоянии спирали и клубков. В этом случае  $\Delta C_p = f(T)$  имеет вид, изображенный на рис. 31.

Исходя из полученных результатов и имея в виду данные работы<sup>80</sup>, можно утверждать, что для коллагена в твердом состоянии при низких температурах (4—50° К) теплоемкость определяется колебаниями не только отдельных атомных слоев или цепей, но существен-

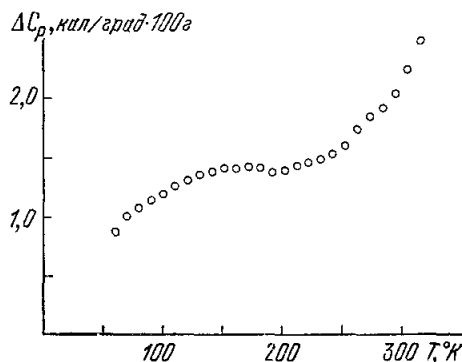


Рис. 31.  $\Delta C_p = f(T)$  для дегидратированного коллагена.

никакой корреляции во взаимном расположении молекул воды нет — при конформационном переходе спираль — клубок «четвертая спираль», состоящая из молекул воды, практически полностью разрушается (по данным ЯМР <sup>101–102</sup>). На рис. 32 приведены также промежуточные состояния цепочек H<sub>2</sub>O (в, г, д) — показана возможность образования дефектов, обусловленных переориентацией протонов в водородных связях Н—О—Н. Дефекты такого типа (дефекты Бьерума <sup>104</sup>) реализуются в структуре льда и играют существенную роль в различных его свойствах, и, в частности, по мнению некоторых авторов, определяют тепло-

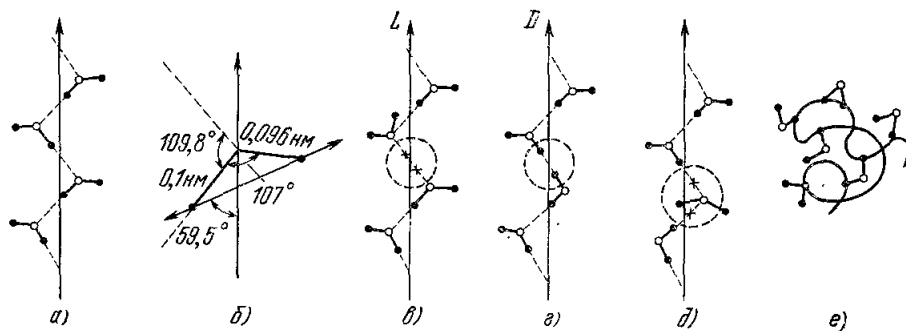


Рис. 32. Схема расположения молекул воды в цепочках, составляющих «внутренний» гидратный слой тройной спирали коллагена.

а, б) Цепочки в нативном белке (стрелкой показано направление оси спирали) <sup>100</sup>; в — д) дефекты Бьерума; е) связывание молекул воды с разошедшимися полипептидными цепями в клубкообразном состоянии.

вую аномалию при 120° К, обнаруженную при измерении теплоемкости льда <sup>103</sup> (вспомним также работы Онзагера <sup>106</sup> по электрическим свойствам льда).

Отметим, что в последнее время кооперативный механизм переориентации протонов в цепочках водородосвязанных молекул предложен для объяснения транспорта протонов через биологическую мембрану <sup>107</sup>. Разность между энтропией гидратированного коллагена в клубкообразном состоянии и энтропией белка в спиральном состоянии положительна во всем интервале температур и при 298° К составляет  $\Delta S = 0,8 \text{ кал/100 г} \cdot \text{град}$  (где  $\Delta S = S_{\text{клубок}} - S_{\text{спираль}}$ ).

Нам представляется очень существенным, что разница в термодинамических свойствах белка в спиральном и клубковом состоянии в значительной степени обусловлена различным характером взаимодействия полипептидных цепей с молекулами воды и проявляется при температурах, далеко лежащих от температур внутримолекулярного перехода спираль — клубок.

#### д) Теплоемкость ДНК при низких температурах

Мы подчеркнули, что при исследовании низкотемпературной теплоемкости биополимеров особое внимание должно быть уделено правильному определению критических концентраций растворителя, так как конфигурация полимерных цепей в нативном биополимере сохраняется только при определенном объеме соотношении полимер — растворитель. К такому классу биологических макромолекул относится и ДНК. Прямая зависимость конформации ДНК от влажности была показана уже в ранних классических рентгенографических работах <sup>178</sup>. Любое изменение конформации ДНК, наступающее вследствие изменений внешних условий среды,

возникает либо за счет прямого воздействия возмущающего агента на двойную спираль (например, связывание лигандов), либо через молекулы растворителя (изменение ионной силы,  $pH$ , полярности, давления, температуры и др.). Поэтому особое значение имеет исследование состояния молекул растворителя, непосредственно примыкающих к макромолекуле ДНК, т. е. гидратации двойной спирали. Исследование низкотемпературной теплоемкости ДНК, проведенное в Институте физики АН ГССР<sup>20</sup>,

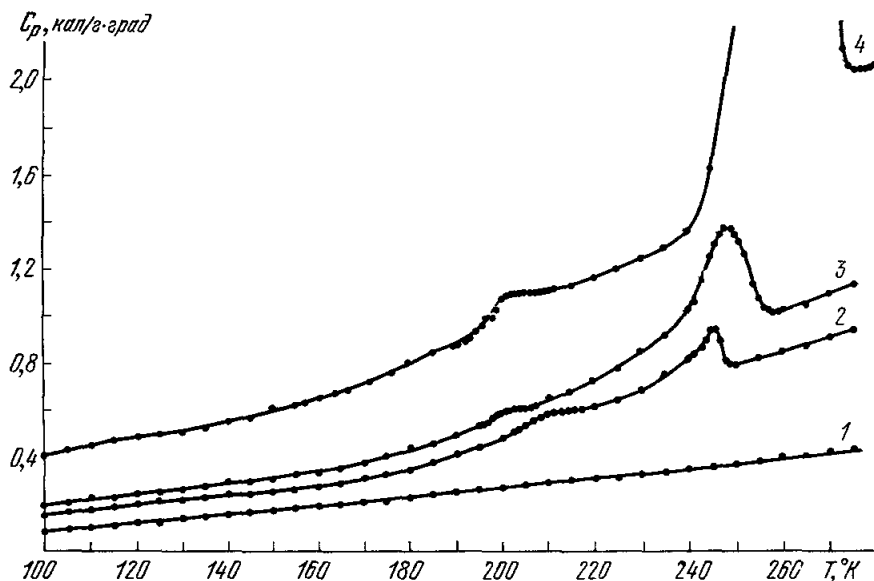


Рис. 33. Температурная зависимость теплоемкости нативной ДНК при различном содержании воды.

1 — 18; 2 — 31; 3 — 37; 4 — 61%  $H_2O$  по весу.

109–113 при различных влажностях, позволило получить данные о механизмах взаимодействия ДНК с молекулами растворителя.

На рис. 33 приведена температурная зависимость теплоемкости нативной ДНК при различном содержании воды. (Здесь и далее приводятся усредненные данные теплоемкости через равные интервалы температур<sup>29</sup>.)

Мы видим, что содержание воды, равное 18%  $H_2O$ , не приводит к отклонению от линейной зависимости теплоемкости ДНК и к возникновению теплопоглощения в области фазового перехода льда, что свидетельствует о том, что это количество воды жестко связано с молекулами ДНК. При увеличении содержания воды до 31% (кривая 2 на рис. 33) в области температур 200–220° K наблюдается слабое изменение теплоемкости, а затем теплопоглощение, связанное с плавлением определенного количества воды, закристаллизовавшейся при охлаждении. Температура, соответствующая максимуму пика теплопоглощения при данных значениях концентрации воды, равна 245° K и сдвинута на 28° относительно температуры плавления чистой воды. Дальнейшее увеличение содержания воды еще более ярко выявляет тепловую аномалию при 190–210° K и одновременно приводит к сдвигу максимума пика теплопоглощения к 273° K.

Рис. 33 показывает, что в системе ДНК —  $H_2O$  при малой концентрации воды плавление воды теряет характер резкого фазового перехода и вырождается в растянутый по температуре переход типа поря-

док — беспорядок. Укажем, что температурный интервал растянутого перехода и характер кривой теплопоглощения зависят (при одних и тех же значениях влажности) от конформации биополимера<sup>75</sup> и в том числе от конформации полинуклеотидных цепей. В работе<sup>75</sup> показано, что причиной вырождения фазового перехода первого рода является не малое количество растворителя (так как распад на две фазы, т. е. резкий фазовый переход, уже наблюдается в системах из нескольких сотен частиц), а взаимодействие молекул воды с биополимером и влияние его на структуру растворителя.

Значительно меняется характер кривых температурной зависимости теплоемкости для денатурированных препаратов ДНК (кривая 1 на

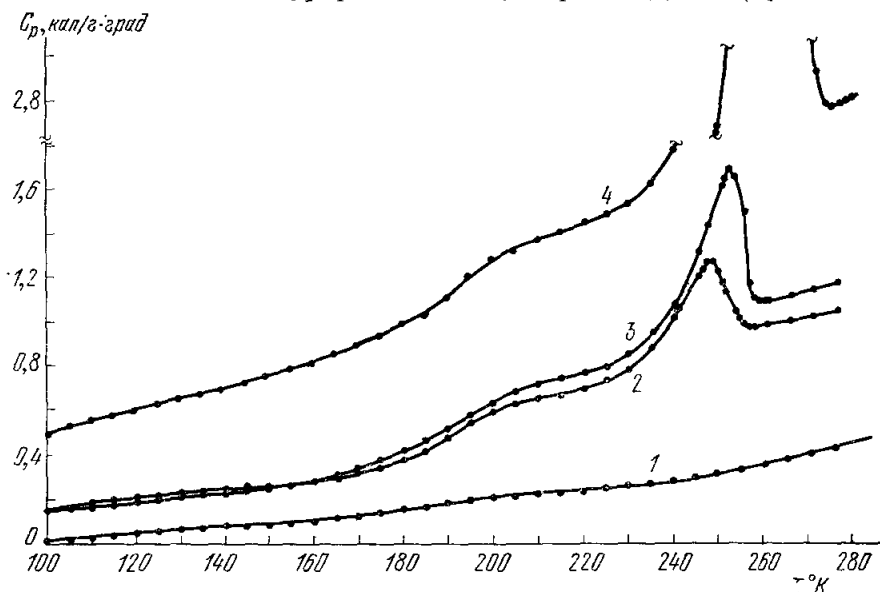


Рис. 34. Температурная зависимость теплоемкости денатурированной ДНК при различном содержании воды.

1—6; 2—35; 3—39; 4—68%  $H_2O$  по весу.

рис. 34) по сравнению с нативными (кривые 2, 3). В частности, меняется характер тепловой аномалии в области температур 200—210° K, т. е. в области, где мы предполагаем, что релаксационные переходы связаны со стеклованием определенной части воды<sup>29</sup>. Для препаратов денатурированной ДНК, находящейся в состоянии статистического клубка, в этом температурном интервале теплоемкость меняется весьма плавно, без резкого скачка, причем форма кривой теплоемкости (в пределах погрешности измерений) уже не зависит от термической предыстории образцов и, в частности, от скоростей охлаждения растворов.

На рис. 35 приведены зависимости количества связанной воды, полученные из калориметрических данных, от общего содержания воды для нативных (кривая 1) и денатурированных (кривая 2) препаратов ДНК. По существу эти зависимости представляют собой «кривые сорбции», на которых можно выделить три участка: а) начальный участок (содержание  $H_2O$  до 20%); б) участок «сорбции», в котором наблюдается резкое увеличение связывания молекул воды с полинуклеотидными цепями ДНК (содержание  $H_2O$  20—40%), и в) участок концентрации  $H_2O$  от 40% и выше, на котором кривая гидратации выходит на насыщение.

По данным калориметрии (см. рис. 35) на начальной стадии гидратации с молекулами ДНК связывается  $\sim 7$  молекул  $H_2O$  на пару основа-

ний, т. е. предположительно на каждую группу  $> PO_2^-$  садится  $\sim 3$  молекул  $H_2O$ , сильно связывающихся с атомами кислорода. Интересно отметить, что начальный участок кривой гидратации для денатурированной и нативной ДНК одинаков.

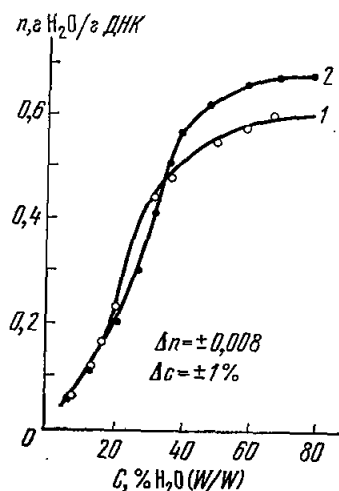


Рис. 35. Кривые гидратации нативной (1) и денатурированной (2) ДНК.

$n$  — количество связанной воды ( $g H_2O$  на  $1 g$  ДНК),  $C$  — весовой процент воды в образцах ДНК.

существенно, что в денатурированных препаратах ДНК количество связанных молекул воды на этом участке кривой гидратации меньше, чем в нативных препаратах (на  $4 \pm 1$  молекулы  $H_2O$  на пару оснований). Дальнейшее увеличение влажности препаратов нативной ДНК приводит к дополнительному связыванию еще 10 молекул  $H_2O$  на пару оснований (участок  $\beta$ , рис. 35), заполняющих желобки и образующих внешние гидратные слои. Полное насыщение всех гидратационных центров (26 молекул  $H_2O$  на пару оснований), еще большее закручивание цепей и увеличение гидрофобных взаимодействий стопки оснований, происходящие на этой стадии гидратации, приводят к установлению равновесных упорядоченных форм двойной спирали ДНК. И здесь необходимо подчеркнуть весьма важное обстоятельство, заключающееся в том, что количество связанных молекул  $H_2O$  с денатурированными препаратами ДНК на этой последней стадии «сорбции» превышает гидратацию нативных образцов.

Резкое увеличение количества связанных молекул воды на втором этапе гидратации (участок  $\beta$  на рис. 35) свидетельствует о кооперативном образовании последующих гидратных слоев. При этих влажностях, как известно, происходит еще большая дезакрирование фосфатных групп и начинается закручивание двух полинуклеотидных цепей с одновременным возникновением вертикальных — «стэкинг» — взаимодействий между основаниями (рис. 36). На этом этапе гидратации количество молекул воды, связывающихся с нативной ДНК, увеличивается на 9 молекул  $H_2O$  на пару оснований. Кооперативное образование этих гидратных слоев, встроенных в структуру двойной спирали, обусловливается возникновением «водяных мостиков» в желобках двойной спирали, возможность существования которых показана прямыми расчетными методами для комплексов ДНК-гидрат ( $Na^+$ )<sup>114</sup>. Весьма

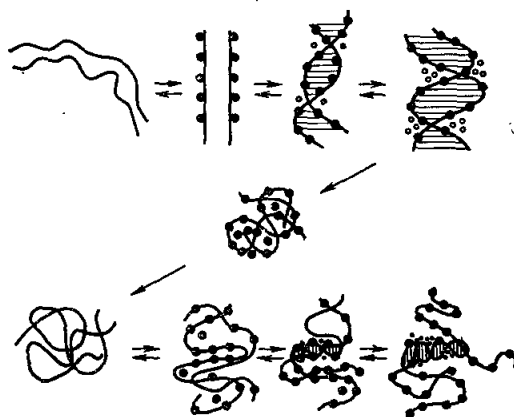


Рис. 36. Схематическое изображение процесса сорбции воды в нативных, дегидратированных образцах ДНК (верхний ряд) и в полинуклеотидных цепях в состоянии статистических клубков (нижний ряд).

Высушивание в данном случае достигается путем быстрого охлаждения раствора статистических клубков с последующей сублимацией.

Необходимо отметить, что вода в гидратных слоях (вторая и третья фракции связанной воды), образуя структуру, обладающую спиральной симметрией молекулы ДНК, способна претерпевать структурные переходы как при температурах внутримолекулярного плавления двойной спирали, так и при более низких температурах<sup>29</sup>.

Недавно для выяснения механизмов взаимодействия ДНК, находящейся в спиральном и клубковом состояниях, с водным окружением

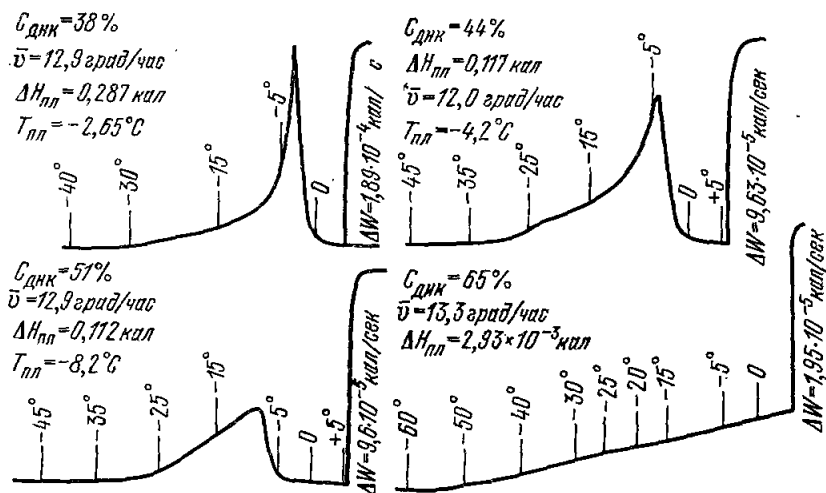


Рис. 37. Микрокалориметрические записи процесса фазового перехода воды в системе Na-ДНК —  $H_2O$  при различных концентрациях ДНК.

и с ионами растворенных солей в Институте физики АН ГССР впервые были применены высокочувствительные низкотемпературные сканирующие микрокалориметры (НСМК). Использование НСМК позволило не только резко уменьшить расход исследуемых препаратов (в  $10^3$  раз), но и изучить термодинамические параметры ДНК и водного окружения в широком интервале температур, влажностей и концентраций растворенных ионов солей.

На рис. 37 приведены микрокалориметрические записи теплопоглощения, наблюдаемого в области фазового перехода лед — вода в процессе прогрева замороженных растворов ДНК —  $H_2O$ , при различном соотношении  $H_2O$ /ДНК. Данные микрокалориметрии позволили получить точные результаты о температуре фазового перехода воды и энтальпии «вырожденного» фазового перехода (рис. 38). С большей точностью установлены те критические значения концентрации полимера, при которых вся вода, присутствующая в системе ДНК —  $H_2O$  находится в невымораживаемом — связанном — гидратированном состоянии (см. рис. 37).

Здесь следует отметить, что в последнее время в ряде работ для изучения гидратации биополимеров были применены коммерческие низкотемпературные микрокалориметры типа DSC-1,2 (фирма Перкин — Эльмер). Несмотря на полную автоматизацию, высокую чувствительность и удобство в работе, теплофизические характеристики этих микрокалориметров не удовлетворяют требованиям, предъявляемым к установкам, с помощью которых изучаются биологические объекты. Так, в работе<sup>119</sup> при изучении низкотемпературных тепловых свойств эластана, при сканировании со скоростью  $8^\circ/\text{мин}(!)$ , температура фазового перехода воды оказалась равной  $+10 \div +15^\circ \text{C} (!)$ . Заведомо неравновесные условия

проведения экспериментов могут быть причиной артефактов при использовании этой аппаратуры для исследования тепловых свойств биологических макромолекул, и к результатам, полученным с помощью подобных

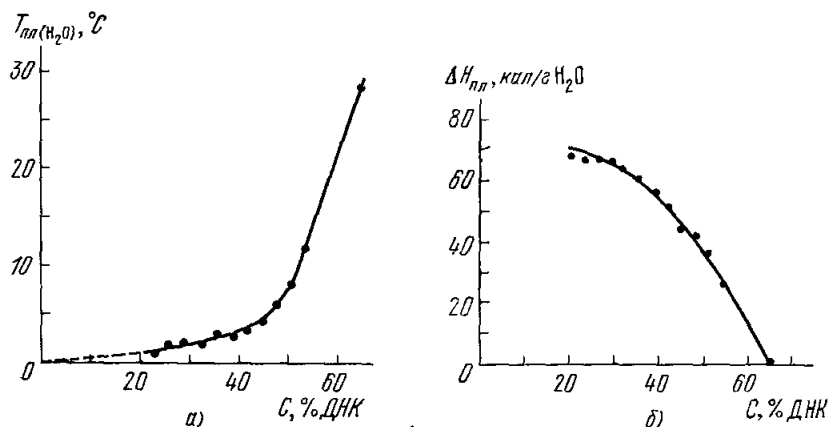


Рис. 38. Зависимость температуры  $T_{пл}$  (а) и энтальпии  $\Delta H_{пл}$  (б) фазового перехода лед — вода от концентрации ДНК в системе Na-ДНК —  $H_2O$  (на рис. а) отложены температуры  $^{\circ}C$  ниже нуля).

установок, необходимо относиться с осторожностью. Значительно лучшими теплофизическими характеристиками (правда, в ограниченном интервале температур 0 — 100° C) обладают отечественные сканирующие

микрокалориметры, выпускаемые СКБ биологического приборостроения в Пушкино (ДАСМ-1).

НСМК ИФ АН ГССР были использованы нами также для более детального исследования тепловых эффектов фазового перехода воды и плавления эвтектик в трехкомпонентной системе ДНК —  $H_2O$  — NaCl.

На рис. 39 приведена температурная зависимость изменения теплоемкости трехкомпонентной системы Na-ДНК —  $H_2O$  — NaCl при различных концентрациях ДНК<sup>112-113</sup>. Отметим следующие характерные особенности кривых плавления:

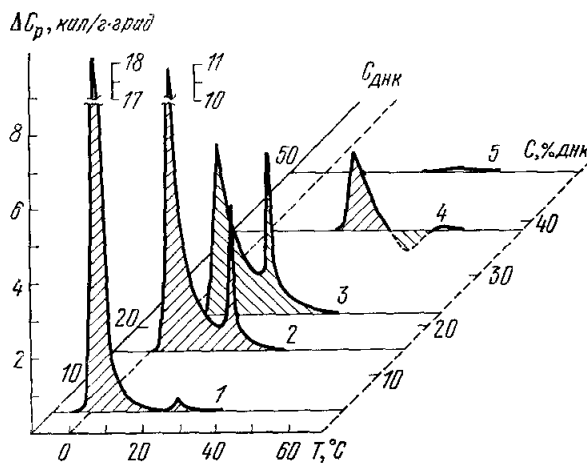


Рис. 39. Зависимость избыточной теплоемкости системы Na-ДНК —  $H_2O$  — NaCl от температуры и концентрации ДНК.

Начальная молярность раствора 0,2 М NaCl.

1) Область температур вблизи — 21,3° C, в которой происходит поглощение тепла, соответствует плавлению эвтектики, образующейся в процессе охлаждения трехкомпонентной системы Na-ДНК —  $H_2O$  — NaCl.

2) Процесс плавления льда в трехкомпонентной системе Na-ДНК —  $H_2O$  — NaCl, следующий за процессом плавления эвтектик, «размазан» по температурной оси, и «точка» перехода смещается в сторону низких



температур при увеличении концентрации ДНК так же, как и в случае двухкомпонентных систем (ср. с рис. 37).

3) Увеличение концентрации ДНК (малая объемная доля растворителя) приводит к перекрыванию пиков теплопоглощения, соответствующих плавлению эвтектики и льда и в конечном итоге к исчезновению эвтектического пика (кривая 5 на рис. 39).

4) Экзотермический эффект, наблюдаемый в системе  $\text{Na-ДНК-H}_2\text{O-NaCl}$ , при малых значениях объемной доли растворителя, в области температур  $-46 \div -34^\circ\text{C}$  (кривая 4 на рис. 39) можно отнести к процессу рекристаллизации (см. работу <sup>115</sup>, в которой подобный тепловой эффект обнаружен калориметрически в других системах).

5) При определенном критическом значении объемной доли полианиона фазовые переходы, наблюдаемые в системе  $\text{Na-ДНК-H}_2\text{O-NaCl}$  в области низких температур, полностью исчезают и не обнаруживаются при самых высоких чувствительностях микрокалориметрических установок. При этих концентрациях агрегатное состояние трехкомпонентной системы в области низких температур можно представить как смесь:  $\text{Na-ДНК}$  — невымораживаемая (связанная) вода —  $\text{NaCl}$ .

Сравнение температурного хода изменения избыточной теплоемкости для разбавленных растворов  $\text{Na-ДНК}_{\text{клубок}}-\text{H}_2\text{O-NaCl}$  и  $\text{Na-ДНК}_{\text{спираль}}-\text{H}_2\text{O-NaCl}$  (рис. 40), наглядно показывает, какие изменения произошли в трехкомпонентной системе после термической

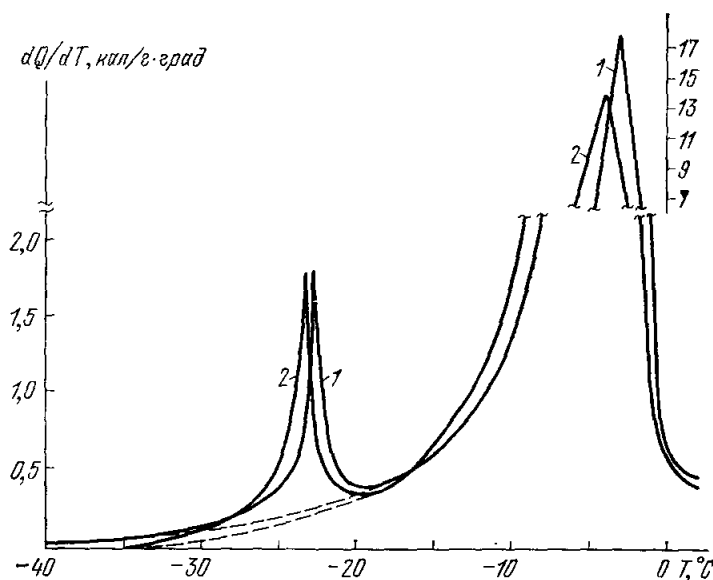


Рис. 40. Микрокалориметрическая запись процессов фазового перехода лед — вода и плавления эвтектик в системе  $\text{Na-ДНК-H}_2\text{O-NaCl}$ .

1 — нативная ДНК, 2 — денатурированная ДНК (1,35 мг ДНК и 0,38 мг  $\text{NaCl}$ ; общий вес препарата 2,8 мг).

денатурации ДНК, т. е. при переходе спираль — клубок. Пик плавления эвтектики смещается в сторону низких температур (на  $0,5^\circ$ ). Полная ширина пика плавления эвтектики увеличивается на  $2^\circ$ . Расчет (см. <sup>29</sup>) показывает, что  $\approx 40\%$  ионов «выбрасывается» в раствор в процессе термической денатурации ДНК (ср. с результатами работы <sup>116</sup>).

Таким образом, исследование низкотемпературной теплоемкости ДНК при различных влажностях и концентрациях ионов растворенных солей позволило получить важные результаты о механизмах взаимодействия макромолекул ДНК с водным окружением и ионами солей для двойной спирали и полинуклеотидных цепей в состоянии статистических клубков.

В настоящее время в Институте физики АН ГССР начаты работы по изучению теплоемкости ДНК при различных влажностях в области температур жидкого гелия. В этом направлении уже имеются экспериментальные данные, полученные в Физико-техническом институте низких температур АН УССР. В работе Веркина и сотр.<sup>30</sup> была изучена теплоемкость влажных пленок ДНК в интервале температур 4 — 200° К. Авторы приходят к существенным заключениям об особенностях низкотемпературной теплоемкости пленок ДНК, основываясь на теории теплоемкости цепных и слоистых структур при низких температурах<sup>79-80</sup>. Показано, что линейная зависимость теплоемкости в области 4,2—180° К обусловлена в основном участием в крутильных колебаниях остова полимера и боковых привесков с большими моментами инерции. Однако для получения однозначного вывода о «сохранении вторичной структуры ДНК в сухих пленках», как мы уже подчеркивали выше, требуется исследование при различных влажностях, вплоть до значений, соответствующих полному гидратному слою двойной спирали.

е) Аномалии в низкотемпературной  
теплоемкости меланина и в опухолевой  
меланосоме

Меланины представляют собой чрезвычайно распространенные пигменты кожи и волос, от которых зависит цвет последних. Химическая структура меланинов полностью не расшифрована<sup>117</sup>.

Таблица III

Низкотемпературная теплоемкость меланина

	$\gamma$ , $\text{эрг/г.}^\circ\text{K}^2$	$\beta$ , $\text{эрг/г.}^\circ\text{K}^{-4}$	$\delta$ , $\text{эрг/г.}^\circ\text{K}^{-6}$	$T_0$ °K	$\Delta C$ , $\text{эрг/г.}^\circ\text{K}$
Меланин 1% H <sub>2</sub> O	50±9	120±2	1,64±0,09	1,87	940
Меланин 20% DEA	} 95±9	99±2	1,84±0,09	1,92	770
10% H <sub>2</sub> O					
Меланосома	220±20	99±4	2,0±0,20	1,95	2,530
Данные получены с использованием уравнения $C = \gamma T + \beta T^3 + \delta T^5$ .					

Исследование физических свойств меланинов показало, что для этих соединений характерна аморфная структура с большой плотностью свободных спинов ( $10^{19} \text{ г}^{-1}$ <sup>118</sup>). Было также показано, что меланины проявляют ряд необычных электрических свойств, обнаруженных в некоторых аморфных материалах<sup>45</sup>.

Американские исследователи изучили теплоемкость природного и синтетического меланинов, а также меланосомы (выделенной из зло-

качественной опухолевой ткани (меланомы)) в интервале температур 1—5° K<sup>45</sup>.

Результаты исследований, выявивших ряд интересных свойств меланина, представлены на рис. 41 и табл. III. Обработка данных с помощью обычного уравнения  $C_p = YT + \beta T^3 + \delta T^5$  (где  $Y$  — коэффициент при линейном члене электронной теплоемкости,  $\beta$  и  $\delta$  — коэффициенты, отражающие вклад теплоемкости решетки) (см. табл. III) показывает, что, исходя из величин коэффициента  $\beta$ , можно говорить об одинаковом вкладе решетчатой теплоемкости для всех трех материалов. Величины коэффициента  $\delta$  также одинаковы, однако значительно меньше по абсолютным значениям. Между тем коэффициент при линейном электронном члене оказался удивительно большим и существенно увеличивается при сравнении синтетического меланина с природным, с одной стороны, и с опухолевой меланосомой человека, с другой. В настоящее время природа наблюдаемых изменений неясна.

Однако из приведенных данных можно прийти к заключению, что изменения в коэффициенте  $Y$  не могут быть обусловлены изменениями в фоновном спектре изученных меланинов.

Другая интересная аномалия была выявлена в температурной зависимости теплоемкости для всех меланинов при 1,9° K (см. рис. 41). Резкость наблюдаемого перехода, по мнению авторов, не позволяет отнести его к известным низкотемпературным переходам.

Интересно отметить, что в работе<sup>118</sup> с помощью метода ЭПР было показано, что  $g$ -фактор для синтетических и природных меланинов близок к двум и установлено парамагнитное поведение этих материалов в интервале температур 4,2—500° K. Авторы пришли к выводу, что наблюдаемый парамагнетизм связан с наличием неспаренных электронов, ассоциированных со свободными радикалами в аморфных меланинах.

Теплоемкость выше точки перехода (1,9° K) характеризует материал в парамагнитном состоянии и, по мнению авторов, тепловая аномалия при 1,9° K отражает переход из антиферромагнитного в парамагнитное состояние.

Таким образом, калориметрическим методом при низких температурах были выявлены такие особенности в тепловых свойствах меланинов различной природы, которые интересны не только для характеристики физических свойств этого пигмента, но ставят вопрос о еще неизвестных функциональных особенностях этих соединений. В частности, становится ясным, что меланосомы не могут быть причислены к ряду пассивных клеточных органелл, выполняющих только роль фотопротекторов — высокая плотность неспаренных электронов и наличие фазового перехода магнитной природы, по-видимому, свидетельствуют о том, что меланосомы играют важную функциональную роль в процессах переноса энергии в живой клетке.

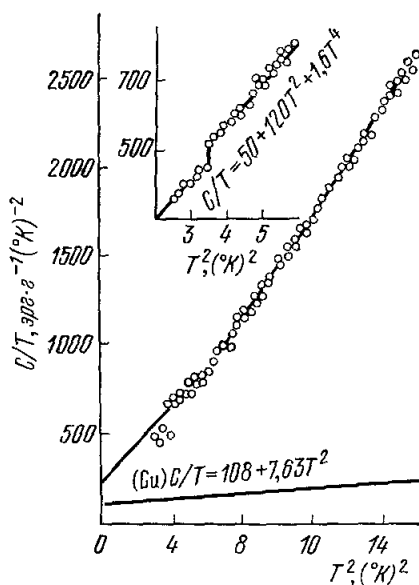


Рис. 41. Зависимость  $C_p/T = f(T^2)$  для синтетического меланина (в центре) и опухолевой меланосомы (вставка) (для сравнения приведена теплоемкость меди)<sup>46</sup>.

## 6. ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

В настоящее время мы находимся в начале развития нового направления в молекулярной биофизике — низкотемпературной физики биологических макромолекул («молекулярной криобиофизики»), которое уже дало ряд существенных экспериментальных результатов. В данной работе мы затронули только лишь проблемы тепловых свойств биомacroмолекул при низких температурах.

Из изложенного видно, что для разработки теории теплоемкости биополимеров в твердом состоянии при низких температурах могут быть использованы достижения теории теплоемкости сильно анизотропных твердых тел (так называемых «слоистых», «цепных» — «игольчатых» структур). Вместе с тем данный обзор имеет также целью усилить внимание физиков-теоретиков к проблемам тепловых свойств биологических макромолекул при низких температурах и, тем самым, «подтянуть» квантово-механическую теорию теплоемкости анизотропных тел для описания физических особенностей биологически важных макромолекул.

Что касается собственно калориметрии биополимеров, следует сказать, что современный уровень техники калориметрического эксперимента (особенно имея в виду теплофизические характеристики сканирующих дифференциальных калориметров) вполне достаточен для получения прецизионных данных о тепловых свойствах биомacroмолекул в широкой области концентрации веществ и температур (начиная с  $2^{\circ}\text{K}$ ). Добавим, что измерения уже в настоящее время могут быть проведены на малых количествах препаратов белков и нуклеиновых кислот. Следует, однако, подчеркнуть, что биохимические процедуры должны обеспечить выделение, очистку и подготовку необходимых образцов (ориентированные влажные пленки, надмолекулярные структуры биополимеров, волокна и др.), предназначенных для низкотемпературной калориметрии. В большинстве случаев методика приготовления образцов является решающей. Как подчеркивалось, при проведении низкотемпературных калориметрических измерений биополимеров особое внимание следует уделять молярному соотношению вода/биополимер. Минимальное количество воды, необходимое для сохранения нативности структуры макромолекул (так называемой связанной — невымораживаемой воды) может быть установлено измерением тепловых эффектов в области фазового перехода лед — вода с помощью низкотемпературных сканирующих микрокалориметров при чувствительностях  $10^{-7}$  вт, на микрограммовых количествах препарата. Попытки расчета энтропии белков в твердом состоянии (исходя из аминокислотного состава и данных по теплоемкости аминокислот), по-видимому, приводят к ошибочным результатам именно потому, что не учитывается специфика взаимодействия полипептидных цепей с молекулами растворителя и его роль при формировании пространственной структуры белка.

Перспективным представляется детальное исследование низкотемпературной теплоемкости синтетических полипептидов, моделирующих, с одной стороны, структуру полипептидных цепей белка, а с другой — поведение так называемых «одномерных» и «двумерных» структур. Весьма вероятно, что, исходя из характера температурной зависимости теплоемкости таких структур в области низких температур, можно будет оценить преимущественную конформацию цепей в белках с неизвестной пространственной структурой, основываясь на данных калориметрии.

Новые возможности в изучении биологических макромолекул откроет выявление низкотемпературных фазовых переходов в биомacroмолекулах. Тот факт, что такой переход обнаружен в меланине, подтверждает эту уверенность. В свою очередь обнаружение и характеристика подобных

фазовых переходов позволят выделить те основные физические свойства, которые являются решающими при функционировании данного биополимера. Весьма привлекательна постановка экспериментов с использованием линейных макромолекул, в структуру которых входят водородосвязанные водные цепочки, регулярно расположенные вдоль длинных осей макромолекул. Особый интерес представляют экспериментальные данные и теоретический анализ этих систем при температурах ниже  $10^{\circ}\text{K}$  и, возможно, ниже  $1^{\circ}\text{K}$ .

Наконец, с нашей точки зрения, чрезвычайно важными и перспективными были бы исследования низкотемпературной теплоемкости жидкокристаллических структур биологического происхождения и модельных жидкокристаллических систем. Такие эксперименты при температурах жидкого гелия пока не реализованы. Между тем хорошо известно, что многие структурные образования клеток и даже органов могут находиться в жидкокристаллическом состоянии. Так, не говоря уже о клеточных мембранах, жидкокристаллическая структура которых не вызывает сомнений, можно с уверенностью сказать, что мозг в сущности представляет собой сложный надмолекулярный комплекс, жидкокристаллический по своей природе. Изучение низкотемпературных тепловых свойств подобных структур может открыть совершенно новые свойства этих соединений, зависящие от плотности и характера упаковки упорядоченных молекулярных ансамблей в них и типа вносимых дефектов.

Ясно, что «молекулярная криобиофизика» не может базироваться только лишь на методах тепловых измерений. Использование всего арсенала современных физических методов для исследования биополимеров в области низких температур (таких, как радиоспектроскопия, нейтронография, ядерная спектроскопия, электрические методы и др.) позволят получить фундаментальные данные о свойствах важнейших биологических макромолекул, которые с успехом будут применены для основной цели — для построения физической теории, объясняющей функциональные свойства макромолекул белков и нуклеиновых кислот.

У нас в стране интенсивные исследования в области калориметрии биологических объектов, включая исследование низкотемпературных тепловых свойств биологических макромолекул, были начаты Э. Л. Андроникашвили и его учениками еще в 1956 г. При написании этой статьи, выборе узловых вопросов и их обсуждении автор постоянно пользовался идеями, советами и критическими замечаниями Э. Л. Андроникашвили, доброжелательное отношение которого к идее написания подобного обзора и неоднократные напоминания о целесообразности его опубликования позволили автору довести до конца начатую работу. Автор пользуется случаем выразить Э. Л. Андроникашвили самую искреннюю благодарность.

Институт физики АН СССР

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Sturtevant J. M.— In: *Methods in Enzymology*/Ed. C. H. W. Mers, S. N. Timasheff.— N. Y.; Lnd: Academic Press, 1972.  
Sturtevant J. M.— In: *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*.— Ann. Rev. Inc., California, 1974.— V. 3, p. 75.
2. Андроникашвили Э. Л.— *Биофизика*, 1972, т. 17, с. 1068.
3. McKnight R. P., Karasz F. E.— *Thermochim. Acta*, 1973, v. 5, p. 339.
4. Privalov P. L. *Feder. Europ. Biochem. Soc. Lett.*, 1974, v. 40, p. S140.
5. Rialdi G., Biltonen R. L.— In: *MTP International Review of Science. Phys. Chem.*/Ed. H. A. Skinner.— Lnd.: Butterworths, 1972.— P. 103.
6. Spink C., Wadso I.— In: *Methods in Biochemical Analysis*/ Ed. D. Glk.— N.Y.: Wiley-Interscience, 1976.— V. 23, p. 83.

7. Привалов П. Л.— В кн. Молекулярная биология. Т. 6.— М.: ВИНТИ, 1975.— С. 7.— (Итоги науки и техники.)
8. Привалов П. Л., Монаселидзе Д. Р., Мревлишвили Г. М., Магалдадзе В. Г. ЖЭТФ, 1964, т. 47, с. 6.
9. Привалов П. Л., Монаселидзе Д. Р.— ПТЭ, 1965, № 6, с. 174.
10. Бакрадзе Н. Г., Монаселидзе Д. Р.— Измерительная техника, 1971, № 2, с. 58.
11. Монаселидзе Д. Р., Бакрадзе Н. Г.— В кн. Конформационные изменения биополимеров в растворах.— М.: Наука, 1973.— С. 300.
12. Андроникашвили Э. Л., Монаселидзе Д. Р., Бакрадзе Н. Г., Мревлишвили Г. М.— Молек. биол., 1972, т. 6, с. 915.
13. Tsong T. Y., Hearn R. P., Wraithall D. P., Sturtevant J. M.— Biochemistry, 1970, v. 9, p. 2666.
14. Волькенштейн М. В. Конфигурационная статистика полимерных цепей.— М.: Изд-во АН СССР, 1959.
15. Бирштейн Т. М., Птицын О. Б. Конформации макромолекул.— М.: Наука, 1964.
16. Флори П. Статистическая механика цепных молекул.— М.: Мир, 1971.
17. Tanford Ch.— Adv. Protein Chem., 1968, v. 23, p. 121.
18. Poland D., Scheraga H. Theory of Helix-Coil Transitions in Biopolymers.— N.Y.; Lnd.: Academic Press, 1970.
19. Лифшиц И. М.— ЖЭТФ, 1968, т. 55, с. 2408.
20. Лифшиц И. М., Гросберг А. Ю.— ЖЭТФ, 1973, т. 65, с. 2399.
21. Лифшиц И. М., Гросберг А. Ю.— ДАН СССР, 1975, т. 220, с. 468.
22. Цветков В. Н., Эскин В. Е., Френкель С. Я., Структура макромолекул в растворе.— М.: Наука, 1964.
23. Моравец Г. Макромолекулы в растворе.— М.: Мир, 1967.
24. Андроникашвили Э. Л., Мревлишвили Г. М., Джапаридзе Г. Ш.— В кн. VI Всесоюзная конференция по калориметрии.— Тбилиси: Мецниереба, 1973.— С. 490.
25. Андроникашвили Э. Л., Мревлишвили Г. М., Джапаридзе Г. Ш., Сохадзе В. М.— В кн. Материалы XVIII конференции по физике низких температур.— Киев, 1974.— С. 219.
26. Андроникашвили Э. Л., Мревлишвили Г. М., Джапаридзе Г. Ш., Сохадзе В. М.— ДАН СССР, 1974, т. 215, с. 457.
27. Andronikashvili E. L., Mrevlishvili G. M., Japaridze G. Sh., Sokhadze V. M., Kvavadze K. A.— Biopolymers, 1976, v. 15, p. 1991.
28. Andronikashvili E. L., Mrevlishvili G. M.— In: 31st Annual Calorimetry Conference: Abstracts.— Argonne National Laboratory, USA, 1976,— P. 48.
29. Мревлишвили Г. М.— Биофизика, 1977, т. 1, с. 180.
30. Беркин Б. И., Сухаревский Б. Я., Тележенко Ю. В., Алапина А. В., Воробьева Н. Н.— ФНТ, 1977, т. 2, с. 252.
31. Hutchens J. O., Cole A. G., Stout J. W.— J. Am. Chem. Soc., 1960, v. 82, p. 4813.
32. Hutchens J. O., Cole A. G., Robie R. A., Stout J. W.— J. Biol. Chem., 1963, v. 238, p. 240.
33. Hutchens J. O., Cole A. G., Stout J. W.— J. Phys. Chem., 1963, v. 67, p. 1128.
34. Cole A. G., Hutchens J. O., Stout J. W.— Ibid., p. 1852.
35. Cole A. G., Hutchens J. O., Stout J. W.— Ibid., p. 2245.
36. Hutchens J. O., Cole A. G., Stout J. W.— Ibid., 1964, v. 239, p. 591.
37. Hutchens J. O., Cole A. G., Stout J. W.— Ibid., p. 4194.
38. Hutchens J. O., Cole A. G., Stout J. W.— Ibid., 1969, v. 244, p. 26.
39. Hutchens J. O. (частное сообщение).
40. Finegold L., Cude J. L.— Nature, 1972, v. 237, p. 334.
41. Finegold L., Cude J. L.— Nature, 1972, v. 238, p. 38.
42. Finegold L., Cude J. L.— Biopolymers, 1972, v. 11, p. 683.
43. Finegold L., Cude J. L.— Ibid., p. 2483.
44. Fanconi B., Finegold L.— Science, 1975, v. 190, p. 458.
45. Mizutani U., Massalski T. B., McGinness J. E., Corry P. M.— Nature, 1976, v. 259, p. 505.
46. Delhaes P., Daurel M., Dupart E.— C.R. Ac. Sci., Ser. B, 1972, t. 274, p. 308.
47. Daurel M., Delhaes P., Dupart E.— Biopolymers, 1975, v. 14, p. 801.
48. Haly A. R., Snaith J. W.— Biopolymers, 1968, v. 6, p. 1355.
49. Волькенштейн М. В. Молекулярная биофизика.— М.: Наука, 1975.

50. Уотсон Д. Молекулярная биология гена.— М.: Мир, 1967.
51. Птицын О. Б.— Вестн. АН СССР, 1973, № 5, с. 57.
52. Finkelstein A. V., Ptitsyn O. B.— Biopolymers, 1977, v. 3, p. 469.
53. Katelchuk D., Sheraga H.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, v. 65, p. 810.
54. Гроссберг А. Ю.— В кн. Конформационные изменения биополимеров в растворах.— Тбилиси: Медниереба, 1975.— С. 200.
55. Лифшиц И. М., Гроссберг А. Ю., Хохлов А. Р.— Биофизика, 1976, т. 21, с. 5; УФН, 1979, т. 127, вып. 3, с. 353.
56. Блюменфельд Л. А. Проблемы биологической физики.— М.: Наука, 1974.
57. Fisher H. F.— Proc. Nat. Acad. Sci., 1964, v. 51, p. 1285.
58. Kühn K.— Leder, 1962, v. 13, p. 73.
59. Rich A., Crick F. H. C.— J. Mol. Biol., 1961, v. 3, p. 483.
60. Ramachandran G. N.— In: Treatise on Collagen/Ed. G. N. Ramachandran.— N. Y.: Academic Press, 1967.— С. 3.
61. Андреева Н. С., Есипова Н. Г., Миллиопова М. И., Рогуленкова В. Н., Тумаян В. Г., Шибнев В. А.— Биофизика, 1970, т. 15, с. 198.
62. Есипова Н. Г., Лазарев Ю. А.— В кн. Конформационные изменения биополимеров в растворах.— М.: Наука, 1973.— С. 185.
63. Watson J. D., Crick F. H. C.— Nature, 1953, v. 171, p. 737.
64. Arnott S.— Progr. Biophys. Mol. Biol., 1970, v. 21, p. 256.
65. Тумаян В. Г.— В кн. Молекулярная биология. т. 2.— М.: ВИНТИ, 1973.— С. 132.— (Итоги науки и техники).
66. Иванов В. И.— Ibid., 1973.— Т. 1, с. 105.
67. Маленков Г. Г., Минасян К. А.— Молек. биол., 1977, т. 11, с. 352.
68. Ведеров А. А., Дыхне А. Н., Франк-Каменецкий М. Д.— УФН, 1971, т. 105, с. 481.
69. Lazurkin Yu. S., Frank-Kamenetskii M. D., Trifonov E. N.— Biopolymers, 1970, v. 9, p. 1253.
70. Lubchenko Yu. L., Frank-Kamenetskii M. D., Vologodskii A. V., Lazurkin Yu. S., Gause G. G.— Ibid., 1976, v. 15, p. 1019.
71. Doty P.— Rev. Mod. Phys.— Biophys. Sci. A Study Program, 1959, v. 31, № 1.
72. Физические методы исследования белков нуклеиновых кислот: Сб. статей. Под редакцией Ю. С. Лазуркина.— М.: Наука, 1967.
73. Sturtevant J. M.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 2236.
74. Андроникашвили Э. Л., Мревлишвили Г. М., Привалов П. Л.— В кн. Состояние и роль воды в биологических объектах.— М.: Наука, 1967.
75. Mrevlishvili G. M., Syrnikov Y. P.— Studia Biophysica (Berlin), 1974, № 3, S. 155.
76. Вундерлих Б., Баур Г. Теплоемкость линейных полимеров.— М.: Мир, 1972.
77. Косевич А. М. Основы механики кристаллической решетки.— М.: Наука, 1972.
78. Fröhlich H.— Physica, 1936, v. 4, p. 406.
79. Лифшиц И. М.— ЖЭТФ, 1952, т. 22, с. 471.
80. Лифшиц И. М.— ЖЭТФ, с. 475.
81. Тарасов В. В.— ЖФХ, 1950, т. 24, с. 111.
82. Тарасов В. В.— ЖФХ, 1952, т. 26, с. 759.
83. Годовский Ю. К. Теплофизические методы исследования полимеров.— М.: Химия, 1976.
84. Baer H.— Kolloid Zs. und Zs. Polymere, 1970, Bd. 241, S. 1057.
85. Finegold L., Moody S. E.— Am. J. Phys., 1972, v. 40, p. 915.
86. Wunderlich B. J.— J. Chem. Phys., 1962, v. 37, p. 1203, 1207, 2429.
87. Reese W., Tucker J. E.— Ibid., 1965, v. 43, p. 105.
88. Готлиб Ю. Я., Сочава И. В.— ДАН СССР, 1962, т. 147, с. 580.
89. Сочава И. В., Трапезникова О. Н.— Вестн. ЛГУ, 1958, т. 13, с. 65.
90. Seidel G. M., Keesom P. H.— Rev. Sci. Instr., 1958, v. 29, p. 606.
91. O'Neal H. R., Phillips N. E.— Phys. Rev., Ser. A, 1965, v. 137, p. 748.
92. Martin B. D., Zuch D. A., Neer C. V.— Ibid., 1964, v. 135, p. 671.
93. Уэструм Э., Мак-Каллаф Дж.— В кн. Физика и химия твердого состояния органических соединений.— М.: Мир, 1967.
94. Квавадзе К. А.— Метрология, 1973, № 5, с. 38.
95. Cole A. G., Hutchens J. O., Robie R. A., Stout J.— J. Am. Chem. Soc., 1960, v. 82, p. 4807.

96. Fanson B., Small E., Peticolas W.— *Biopolymers*, 1971, v. 10, p. 1277.
97. Wunderlich B., Baur H.— *Adv. Polymer Sci.*, 1970, v. 7, p. 151.
98. Монаселидзе Д. Р. Автореферат кандидатской диссертации.— Тбилиси: ИФ АН Груз. ССР, 1972.
99. Малеев В. Я. Автореферат докторской диссертации.— Харьков: ИРЭАН УССР, 1975.
100. Charman G. E., Danyluk S. S., McLauchlan K. A.— *Proc. Roy. Soc., Ser. B*, 1971, v. 178, p. 465.
101. Мревлишвили Г. М., Хуцишвили В. Г., Монаселидзе Д. Р., Джапаридзе Г. Ш.— *Цитир. в* <sup>54</sup> сб.— С. 277.
102. Мревлишвили Г. М., Хуцишвили В. Г., Монаселидзе Д. Р., Джапаридзе Г. Ш.— *ДАН СССР* 1974, т. 215, с. 457.
103. Andronikashvili E. L., Mrevlishvili G. M., Japaridze G. S., Sokhadze V. M. IVth Intern. Conference on Chemical Thermodynamics-Montpellier, France: 1975,— V. 18.
104. Franks F.— In: *Water: A Comprehensive Treatise*.— N.Y.; Lnd.: Plenum Press, 1972,— V. 1, p. 115.
105. Pick M. A.— In: *Physics of Ice*.— N.Y.: Plenum Press, 1969,— P. 345.
106. Onsager L., Dupuis M.— In: *Electrolytes*/Ed. B. Pesce.— Oxford: Pergamon Press: 1962 — P. 27.
107. Nagle J. F., Morowitz H. J.— *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1978, v. 75, p. 298.
108. Franklin R. F., Gossling R. G.— *Acta Crist.*, 1953, v. 6, p. 673.
109. Мревлишвили Г. М., Привалов П. Л.— *Цитир. в* <sup>24</sup> сб.— С. 60.
110. Мревлишвили Г. М., Джапаридзе Г. Ш., Сохадзе В. М.— В кн. *Материалы III Всесоюзной конференции по конформационным изменениям биополимеров в растворах*.— Тбилиси: Медниереба, 1975.— С. 25.
111. Мревлишвили Г. М., Джапаридзе Г. Ш., Сохадзе В. М., Чанчалашвили З. И.— В кн. *Труды VII конференции по калориметрии*.— МГУ, 1976.
112. Mrevlishvili G., Japaridze G., Sokhadze V., Bilinska B.— In: *Changes in DNA conformation: Intern. Conference Abstracts*.— Brno: 1977.— L. 10.
113. Мревлишвили Г. М., Джапаридзе Г. Ш., Сохадзе В. М., Билинска Б.— *Биофизика*, 1978, т. 4, с. 605.
114. Журкин В. Б., Лысов Ю. П., Иванов В. И., Маленков Г. Г.— *Цитир. в* <sup>54</sup> сб.— С. 106.
115. Simatos D., Faure M., Benjour E., Couach M.— *Cryobiology*, 1967, v. 12, p. 202.
116. Vasilescu D., Teboul M., Krank H., Canous B.— *Biopolymers*, 1972, v. 12, p. 341.
117. Штрауб Ф. Б. Биохимия.— Будапешт: Изд-во АН Венгрии, 1963.
118. Blois M. S., Zahlan A. B., Maling J. E.— *Biophys. J.*, 1964, v. 4, p. 471.
119. Scaccorulli G., Scandola M., Pezzin G.— *Biopolymers*, 1977, v. 16, p. 1505.
120. Blow D. M., Birktoft J. J., Hartley B. S.— *Nature*, 1969, v. 221, p. 337.