

mańsze urządzenia sterujące i pamięciowe — tzw. mikroprocesory mają wymiary zbliżone do przenośnych radioodbiorników tranzystorowych.

Zastosowanie mikroprocesorów we współczesnej aparaturze medycznej pozwoliło na budowę urządzeń o nie spotykanych dotąd możliwościach np. tomografy komputerowe wykreślające obraz przekroju narządów wewnętrznych, gamma kamery, które pokazywać mogą dynamikę przepływu (przebiegu) radionuklidów w organizmie czy sonografy ultradźwiękowe, które bez obawy można stosować nawet w położnictwie — uzyskując czytelny obraz łożenia, a nawet ruchu płodu u ciężarnej. Lekarz uzyskał w ten sposób aparaturę pozwalającą na prowadzenie takich działań diagnostycznych i terapeutycznych o jakich do niedawna nawet nie myślano.

Część druga || Podstawy biofizyki" pod kierownictwem  
BIOFIZYKA UKŁADÓW BIOLOGICZNYCH A. Pilewskiego  
Panstrony Złotod  
Wydawnictwo Lekarskie,  
15-VR 1985

## BIOFIZYKA KOMÓREK I TKANEK

Andrzej Morawiecki

### 8. Elementy biofizyki molekularnej

#### 8.1. Podstawowe rodzaje makrocząsteczek biologicznych

Budowa, właściwości i zasadnicze funkcje żywych komórek i całych organizmów uwarunkowane są w przeważającym stopniu właściwościami makrocząsteczkowych biopolimerów: białek, kwasów nukleinowych i polisacharydów. Do tej grupy, ze względu na ich rolę i niektóre właściwości należy zaliczyć także tłuszcze złożone — lipidy — jakkolwiek swoją budową różnią się one od typowych biopolimerów.

Wymienione powyżej składniki stanowią główne materiały budulcowe komórek oraz są najważniejszymi substancjami czynnymi żywych organizmów. Przykłady podano w tab. 8.1.

Najważniejsze biopolimery: białka i kwasy nukleinowe, a także niektóre wielocukry, mają budowę linearną: poszczególne monomery łączą się ze sobą tworząc nierozgałęzione sekwencje. Jednakże w makrocząsteczkach tych występują ponadto inne, niekwalencyjne oddziaływania pomiędzy monomerami. Oddziaływania te, jakkolwiek znacznie słabsze od chemicznych wiązań kowalencyjnych, ze względu na ich znaczną liczbę wpływają w wyraźny sposób na swobodną energię cząsteczki i powodują, iż makrocząsteczki mają w warunkach naturalnych określone wtórne struktury (konformacje). Struktury te uwarunkowane są wprawdzie sekwencją odpowiednich monomerów, jednakże to właśnie one wpływają w decydujący sposób na właściwości fizyczne i biologiczne biopolimerów.

Poniżej omówiono najważniejsze typy oddziaływań wtórnych w makrocząsteczkach.

Wiązania wodorowe. Wiązania te, których energia swobodna jest rzędu 12–30 kJ · mol<sup>-1</sup>, tworzą się wówczas, gdy atom wodoru związany kowalencyjnie z elektroujemnym atomem (tlenem, azotem, siarką itp.) znajdzie się w sąsiedztwie, tj. w odległości 0,13–0,15 nm (1,3–1,5 Å), innego elektroujemnego atomu (rozdział 3.1.2). Przykłady takich wiązań podano na ryc. 8.1.

Oddziaływania van der Waalsa i hydrofobowe. Pomędzy atomami lub grupami atomów, jeśli zbliżą się na odległość rzędu 0,1 nm, mogą powstać słabe siły przyciągania (niezależnie od rodzaju atomów) ze zmianą swobodnej energii

Podstawowe biopolimery

Podzuj substancji	Budowa i właściwości	Rola biologiczna
Białka	Linearne polimery aminokwasów. Mają złożone struktury wtórne. Masy cząsteczkowe od kilku tysięcy do kilkuset tysięcy daltontów, a najbardziej złożone białka nawet do kilku milionów daltontów.	Większość białek jest enzymami, tj. biokatalizatorami. Ponadto stanowią składniki bion biologicznych oraz występują w płynach ustrojowych. Są głównymi składnikami włókien mięśniowych i włókien kolagenowych w ścięgnach, skórze i in.
Kwasy nukleinowe	Są linearnymi polimerami nukleotydów: związków składających się z zasad purynowych i pirymidynowych, pentozy i kwasu fosforowego. Rozróżniamy dwa rodzaje kwasów nukleinowych: rybonukleinowe (RNA) i deoksyrybonukleinowe (DNA). Masy cząsteczkowe od kilku tysięcy (niektóre rodzaje RNA) do kilku miliardów (DNA) daltontów. Są linearnymi lub rozgałęzionymi polimerami cukrów i ich pochodnych.	DNA stanowi materiał genetyczny komórek i niektórych wirusów. Różne rodzaje RNA uczestniczą w procesach biosyntezy białek. Niektóre wirusy zawierają RNA jako materiał genetyczny.
Polisacharydy	Głównymi składnikami lipidów są kwasy tłuszczowe oraz często kwasy fosforowy i zasady azotowe. W środowiskach wodnych lipidy mają tendencję do agregacji w duże skupiska (micelle lub błony) i skład podobieństwo ich właściwości do właściwości makrocząstecek.	Stanowią materiał zapasowy wyczerpanych organizmów — stanowią formę magazynowania glukozy (glikogen, skrobię). Stanowią jeden z podstawowych składników ścian komórek roślinnych (celuloza); wchodzi w skład ścian komórek bakteryjnych (np. mureina).

Lipidy

Głównymi składnikami lipidów są kwasy tłuszczowe oraz często kwasy fosforowy i zasady azotowe. W środowiskach wodnych lipidy mają tendencję do agregacji w duże skupiska (micelle lub błony) i skład podobieństwo ich właściwości do właściwości makrocząstecek.

rzędu kilku kJ · mol<sup>-1</sup> (rozdział 3.1.2). Jest to niewiele więcej niż energia ruchów termicznych w temperaturze pokojowej — około 2 kJ · mol<sup>-1</sup> — i oddziaływania te, same przez się, nie stabilizują w wyraźny sposób struktury makrocząstecek. Jednakże w roztworach wodnych może tu dochodzić dodatkowy czynnik. Dołola grup apolarnych znajdujących się w środowisku wodnym tworzy się warstwa cząsteček wody o częściowo uporządkowanej strukturze. Uporządkowanie to jest większe niż cząsteček w pozostałej objętości wody, a więc entropia tej warstwy jest zmniejszona. Połączenie się dwóch lub większej liczby cząsteček

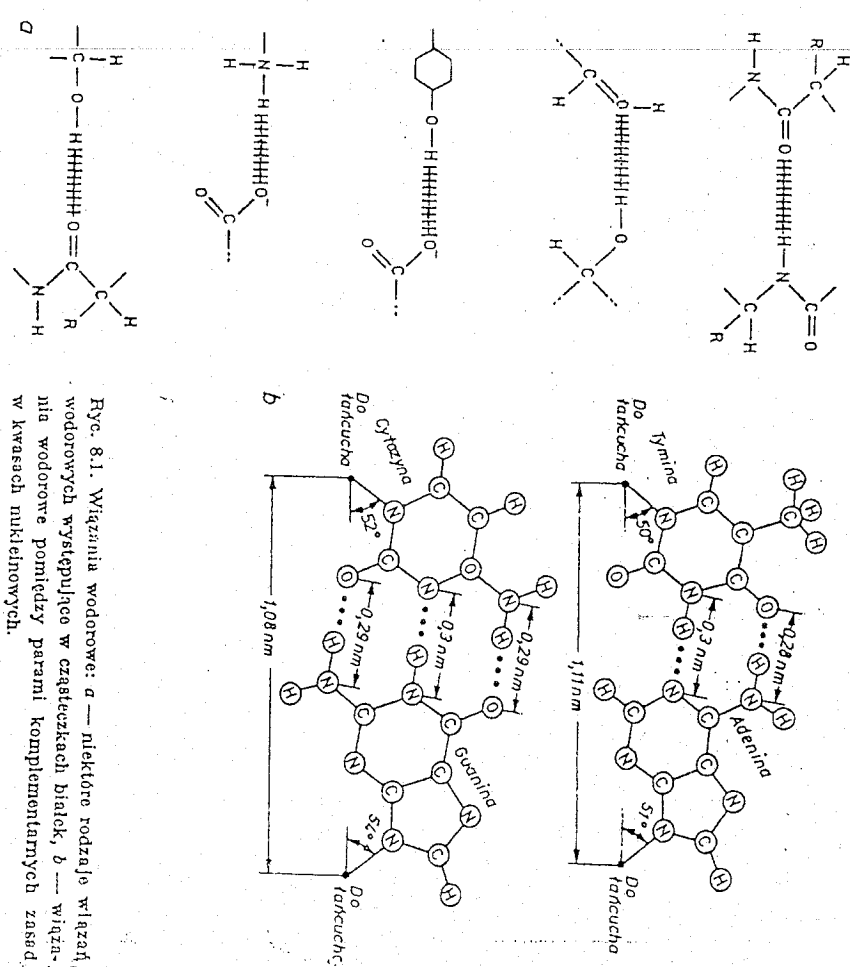


Fig. 8.1. Wiązania wodorowe: a — niektóre rodzaje wiązań wodorowych występujące w cząsteczkach białek, b — wiązania wodorowe pomiędzy parami komplementarnych zasad w kwasach nukleinowych.

apolarnych w większe skupisko sprawia, iż część wody spomiędzy tych reszt zostaje przemieszczona do obszaru wody o nieuporządkowanej strukturze. Procesowi towarzyszy wzrost entropii. Ponieważ zmiana entalpii swobodnej zależy zarówno od zmiany entalpii, jak i zmiany entropii, sumaryczny efekt zmniejszenia entalpii swobodnej makrocząstecki, wywołany zmniejszeniem entalpii (wysycenie oddziaływań van der Waalsa) i wzrostem entropii, jest ważnym czynnikiem stabilizującym wtórną strukturę makrocząsteček znajdujących się w środowisku wodnym.

Oddziaływanie jonowe. Pomiedzy fragmentami (składnikami) biopolimerów mającymi ładunki elektryczne przeciwnych znaków mogą występować siły przyciągania. Siły te są większe, gdy pary jonów znajdują się w obszarze, do którego nie ma dostępu woda — a to ze względu na mniejszą stałą dielektryczną takiego środowiska w porównaniu z roztworem wodnym. Jednakże oddziaływanie jonowe wewnątrz makrocząsteček spotyka się rzadziej niż opisane poprzednio typy oddziaływań. Jony znajdujące się na powierzchni cząsteček

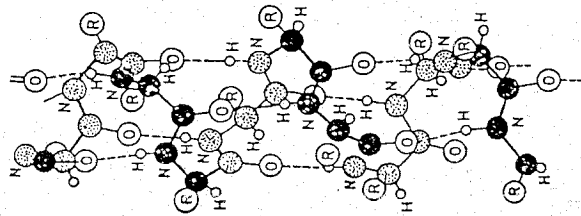
przyciągają wokół siebie dipole wodne, co powoduje zmniejszenie energii swobodnej układu. Jony (dodatnie bądź ujemne) spotykamy więc najczęściej na powierzchni makrocząstek, a oddziaływania jonowe są częściej odpowiedzialne za tworzenie kompleksów pomiędzy makrocząstkami.

Wymienione tu najważniejsze rodzaje oddziaływań wewnątrz makrocząstek biologicznych powodują, iż makrocząsteczki te nie mają form nieuporządkowanego, giętkiego łańcucha zwiniętego w „statystyczny kłębek” (rozdz. 3.4), lecz przyjmują doładnie określone konformacje (właściwe struktury), takie, aby na skutek powstania możliwie dużej liczby interakcji wtórnych cząsteczka osiągnęła minimum entalpii swobodnej, dostępne w danych warunkach środowiska.

### 8.1.1. Białka

Ze względu na to, że reszty aminokwasowe w białkach mają różnorodne właściwości, w makrocząstkach tych mogą powstawać liczne i różnorodne oddziaływania wtórne, a zatem możliwości tworzenia różnych konformacji cząstek są duże.

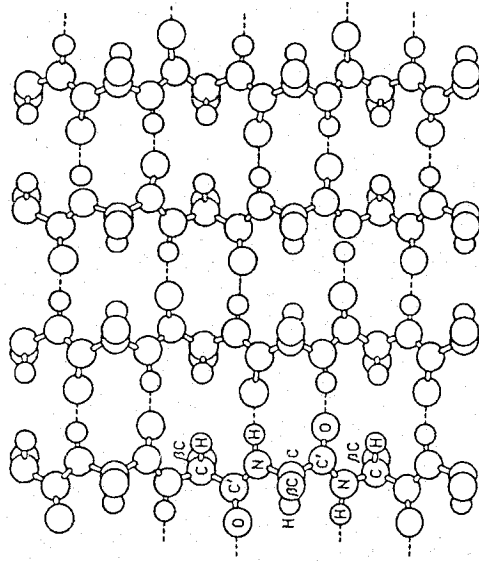
Często występująca, regularna struktura wtórna jest  $\alpha$ -heliks (ryc. 8.2). Struktura ta stwarza możliwość utworzenia maksymalnej liczby wiązań wodorowych pomiędzy grupami  $\geq C=O$  i  $H-N <$  łańcucha peptydowego.



Ryc. 8.2.

Ryc. 8.2. Łańcuch polipeptydowy w formie  $\alpha$ -heliks. Liniami przerywanymi zaznaczono wiązania wodorowe.

Ryc. 8.3. Struktura  $\beta$  łańcuchów polipeptydowych.

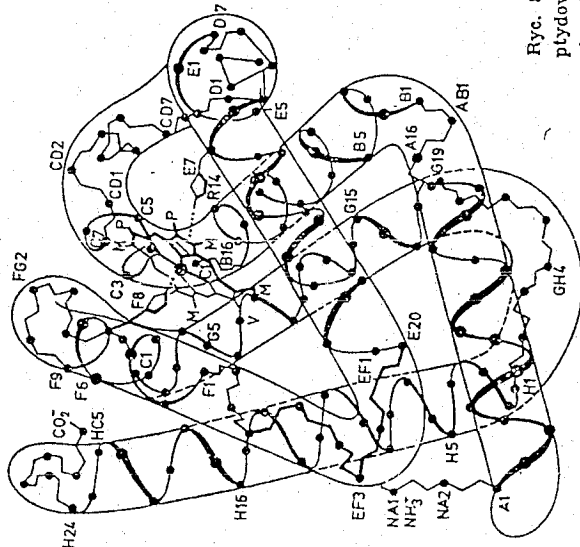


Ryc. 8.3.

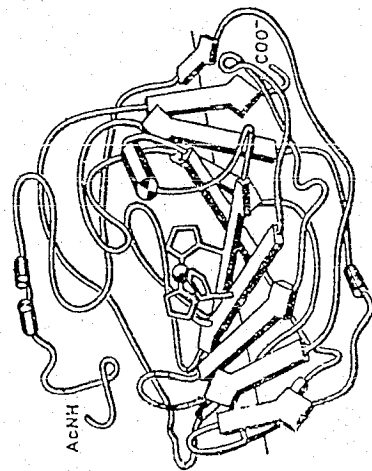
Takie same możliwości stwarza też struktura warstwowa, tzw.  $\beta$ . Jest ona również często spotykana w cząsteczkach białek (ryc. 8.3).

Oddziaływania apolarne (van der Waalsa — hydrofobowe) oraz tendencja do lokalizacji grup polarnych na powierzchni cząsteczki sprawiają, iż konformacja całej cząsteczki białkowej bywa zwykle bardzo złożona. Przykłady podano na ryc. 8.4 i 8.5.

Taka struktura białek wykazuje znaczny stopień sztywności; cząsteczki zachowują określony kształt, przynajmniej w tych obszarach, które warunkują aktywność biologiczną, np. centra aktywne enzymów lub centra wiążące przeciwciał. Zmiana konformacji w pewnym miejscu cząsteczki może przeniesić się — poprzez łańcuch oddziaływań wtórnych — na inny, niekiedy odległy



Ryc. 8.4. Schemat ułożenia łańcucha polipeptydowego w cząsteczce białka (mioglobiny), ukazujący strukturę drugo- i trzeciorzędową.



Ryc. 8.5. Schemat ułożenia łańcucha polipeptydowego w cząsteczce enzymu — onhydrazy węglowej. Strzałki oznaczają odcinki łańcucha polipeptydowego o strukturze  $\beta$ . Cylindry oznaczają odcinki o strukturze  $\alpha$ -helikalnej.

obszar makrocząsteczki i tam w określony sposób zmienić konformację. Natym oparty jest mechanizm tzw. alosterycznej regulacji aktywności enzymów. Określony czynnik działający na odpowiedni obszar cząsteczki enzymu może indukować zmianę konformacji w centrum aktywnym, regulując tym samym jego aktywność.

**Denaturacja białek.** Cząsteczki białka, które znajdują się w środowisku znacznie różniącym się od środowiska naturalnego, np. przez zastąpienie wody rozpuszczalnikiem organicznym o mniejszej stałej dielektrycznej, znaczną zmianę pH, znaczne podwyższenie temperatury itp., mogą w sposób raptowny zmieniać swoją specyficzną konformację. Wiązania wodorowe w cząsteczce zostają w większości rozrwane; mogą ewentualnie utworzyć się inne oddziaływania wtórne i w rezultacie cząsteczka osiąga stan zapewniający jej osiągnięcie lokalnego minimum energii swobodnej w nowych warunkach. Proces ten nazywamy denaturacją białka. Prowadzi on z reguły do utraty aktywności biologicznej białek.

Według współczesnych poglądów denaturacja jest procesem w zasadzie odwracalnym. Białko zdenaturowane, po przeniesieniu go do środowiska odpowiadającego warunkom naturalnym, ma szansę powrotu do właściwej mu konformacji (stanu rodzimego), która jest przeciwieństwem lokalnego minimum energetycznego w tych warunkach. Możliwość odwrócenia denaturacji zależy jednakże również od spełnienia dodatkowych warunków technicznych, a praktyczne zrealizowanie tego procesu jest, w niektórych przypadkach, zagadnieniem trudnym.

### 0.1.2. Kwasy nukleinowe

Kwasy nukleinowe są linearnymi polimerami nukleotydów. O ile białka złożone są z około dwudziestu rodzajów aminokwasów, to elementami budowy poszczególnych rodzajów kwasów nukleinowych są przeważnie cztery rodzaje nukleotydów.

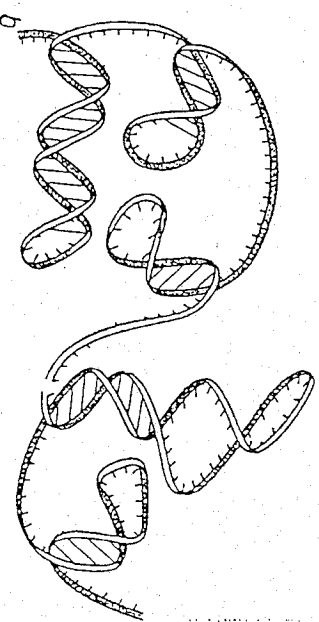
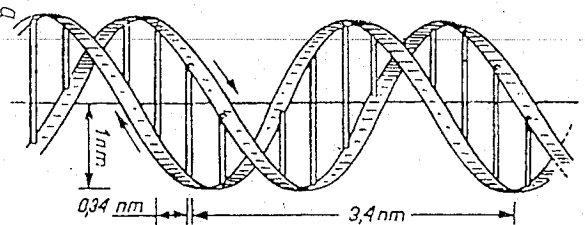
Kwasy dezoksyrybonukleinowe (DNA) składają się z nukleotydów, których najważniejszymi elementami są zasady azotowe: adenina, guanina, cytozyna i tymina (oznaczane odpowiednio skrótami: A, G, C, T). W kwasach rybonukleinowych występują zasady: A, G, C oraz uracyl (U); w pewnych rodzajach kwasów nukleinowych występują także „nieotypowe” nukleotydy, jednakże w mniejszych ilościach.

Istotną rolę kwasów nukleinowych w komórkach jest przechowywanie i przekazywanie informacji genetycznej. Informacja ta zawiera się w kolejności ułożenia (sekwencji) nukleotydów w łańcuchu polinukleotydowym. Sekwencja trzech nukleotydów (triplet) stanowi informację dotyczącą położenia jednego aminokwasu w łańcuchu polipeptydowym cząsteczki białkowej.

Ilość informacji potrzebna dla ustalenia rodzaju aminokwasu w danym miejscu łańcucha peptydowego wynosi około 4,3 bita, jest to bowiem wybór jednego aminokwasu z około dwudziestu możliwych. Ilość informacji zawarta w położe-

niu jednego nukleotydu wynosi około 2 bity (wybór jednego nukleotydu z czterech możliwych). Triplet nukleotydowy zawiera więc około 6 bitów informacji. Jest to pewien nadmiar w stosunku do potrzeb kodowania sekwencji aminokwasów; niecała pojemność informacyjna kwasów nukleinowych jest wykorzystywana.

Istotną właściwością nukleotydów, pozwalającą na przekazywanie informacji, jest zdolność określonych zasad azotowych do łączenia się w pary. A może łączyć się z T (lub U), G łączy się z C (ryc. 8.1.b).

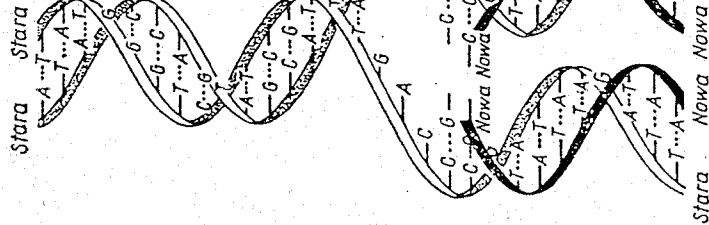


Ryc. 8.6. a — Schemat podwójnego heliksu DNA utworzonego przez dwa komplementarne łańcuchy, b — pojedynczy łańcuch RNA. Widoczne odcinki podwójnego heliksu.

Dzieje się to dzięki dopasowaniu struktury przestrzennej zasad, tak iż mogą między nimi powstawać wiązania wodorowe, a także inne rodzaje oddziaływań. Stosunkowo prosta, jednolita budowa łańcucha polinukleotydowego sprawia, iż wtórna struktura tych makrocząsteczek wykazuje większą regularność niż w białkach. Typową strukturą — zwłaszcza DNA — jest podwójny heliks składający się z dwóch różnych, lecz komplementarnych łańcuchów. Konformacja taka umożliwia utworzenie maksymalnej liczby wiązań pomiędzy parami komplementarnych zasad.

Również pojedyncze łańcuchy RNA mogą odcinkami przybierać konformacje podwójnego heliksu tam, gdzie istnieją sekwencje wzajemnie komplementarnych zasad. Przykład podano na ryc. 8.6.

Struktura podwójnego heliksu jest niezbędna dla prawidłowej replikacji (powielania DNA w żywych komórkach) oraz dla biosyntezy RNA na matrycy DNA (ryc. 8.7).



Ryc. 8.7. Replikacja DNA.

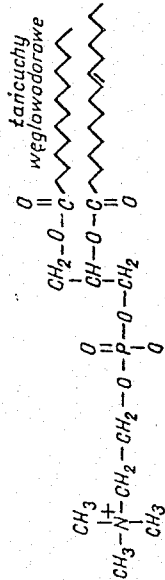
Właściwości optyczne kwasów nukleinowych. Ze względu na skład chemiczny — obecność zasad purynowych i pirymidynowych — kwasy nukleinowe charakteryzują się silną absorpcją promieniowania nadfioletowego, z maksimum absorpcji w zakresie 260 nm. Cecha ta ułatwia wykrywanie i ilościowe oznaczenie kwasów nukleinowych. Ze względu na wzajemne oddziaływanie zasad, absorpcja kwasów nukleinowych o konformacji podwójnego heliksu jest o 30–40% mniejsza od absorpcji pojedynczego łańcucha polinukleotydowego. Jest to tzw. zjawisko hipochromazji. Dzięki niemu można spektrofotometrycznie śledzić procesy tworzenia i rozpadu struktur helikalnych w kwasach nukleinowych.

Zanik struktury helikalnej (rozwiniecie podwójnego heliksu) DNA jest procesem analogicznym do denaturacji białek. Jednakże w przypadku kwasów nukleinowych proces ten jest znacznie łatwiej odwracalny.

### 8.1.3. Lipidy

Zasadniczym składnikiem lipidów są kwasy tłuszczowe o kilkunastowęglowych łańcuchach węglowodorowych, połączone estrowymi z glicerolem lub, rzadziej, z innymi substancjami typu złożonych alkoholi. Tłuszcze proste, stanowiące główną część materiału zapasowego tkanki tłuszczowej, zbudowane są tylko z tych składników. Tłuszcze złożone mogą zawierać ponadto reszty kwasu fosforowego, zasady azotowe (kolaminę, cholinę), cukry i inne składniki. Przykład budowy tłuszczu złożonego typu lecytyny, stanowiącego jeden z głównych składników błon komórkowych, podaje ryc. 8.8.

Hydrofobowy i amfifilny charakter lipidów. Węglowodorowo łańcuchy kwasów tłuszczowych nadają tłuszczom charakter hydrofobowy. Tłuszcze nie rozpuszczają się w wodzie, gdyż oddziaływanie typu van der Waalsa pomiędzy kwasami tłuszczowymi są silniejsze od oddziaływań pomiędzy tłuszczem a polarnym

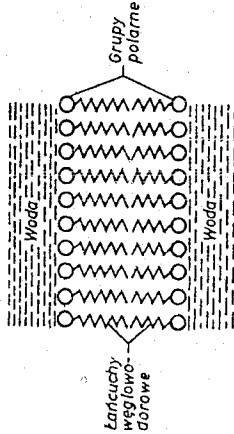


Ryc. 8.8. Schemat budowy cząsteczki lecytyny. Grubszą kreską zaznaczono hydrofilne obszary cząsteczki.

rozpuszczalnikiem, jakim jest woda. Z drugiej znów strony polarne grupy tłuszczów złożonych (reszty fosforanowe, zjonizowane zasady azotowe) są grupami hydrofilnymi i ich kontakt z wodą jest energetycznie korzystny.

Z tego powodu cząsteczki tłuszczów złożonych mają charakter amfifilny, dwoisty w stosunku do wody. Hydrofobowe części cząsteczek — kwasy tłuszczowe — unikają kontaktu z wodą, zaś polarne części cząsteczek kierują się ku środowisku wodnemu.

W rezultacie tłuszcze złożone kontaktując się z wodą tworzą struktury spełniające obydwie warunki. Mogą to być np. micelle lub warstwy dwucząsteczkowe (ryc. 8.9); w obydwóch przypadkach takie uporządkowanie umożliwia kontakt



Ryc. 8.9. Schemat dwucząsteczkowej warstwy lipidowej w środowisku wodnym.

grup polarnych z wodą, zaś hydrofobowe obszary cząsteczek pozostają w kontakcie z sobą, tworząc wewnętrzne środowisko niewodne.

Szczególnie ciekawe jest tworzenie warstw dwucząsteczkowych, ponieważ badania za pomocą mikroskopu elektronowego wykazały, iż błony komórek zwierzęcych i organelli komórkowych są, przynajmniej w pewnym stopniu, zbudowane według podobnego schematu i wykazują zbliżone właściwości fizyczne.

Spośród wszystkich substancji składników budulcowych komórki, tłuszcze są najlepszymi izolatorami elektrycznymi. Wynika to zarówno z charakteru samych cząsteczek, jak też i z faktu, że błony lipidowe i tkanka tłuszczowa

Tabela 8.2

Porównanie właściwości lipidowych warstw dwucząsteczkowych i naturalnych błon biologicznych

	Błony lipidowe dwucząsteczkowe	Błony biologiczne
Grubość (w nm)	6,0–7,5	6–10
Pojemność elektryczna jednostki powierzchni (w $\mu F \cdot m^{-2}$ )	$(0,4–1,0) \cdot 10^4$	$(0,5–1,3) \cdot 10^4$
Opór elektryczny jednostki powierzchni (w $\Omega \cdot m^2$ )	$10^2–10^3$	$10^2–10^3$
Napięcie przebicia (w mV)	150–200	około 100
Napięcie powierzchniowe (w $N \cdot m^{-1}$ )	$(0,5–2,0) \cdot 10^{-3}$	$(0,03–1) \cdot 10^{-3}$

odznaczają się bardzo małą zawartością wody i jonów. Stała dielektryczna tkanki tłuszczowej wynosi 5-6; dla porównania stała dielektryczna tkanki mięśniowej wynosi około 80-85, zaś skóry 40-50. Wytężalność dwuczastezkowych błon lipidowych na przebicie jest rzędu  $10^7$  V · m<sup>-1</sup>.

### 8.2. Fizyczne metody badania makrocząstek

#### 8.2.1. Metody rentgenograficzne

Najbardziej szczegółowe informacje dotyczące struktury i konformacji makrocząstek uzyskujemy obecnie dzięki zastosowaniu metod dyfrakcji promieni rentgenowskich. Metody te można stosować głównie w tych przypadkach, gdy udaje się otrzymać badaną substancję całkowicie jednorodną (oczyszczoną) i uzyskać ją w formie kryształicznej. Zasada badania struktury makrocząstek jest w tym przypadku analogiczna do metod badania struktur substancji małocząstkowych (por. rozdz. 3.1.4), wymaga jednak o wiele bardziej złożonych pomiarów i obliczeń ze względu na bardzo dużą liczbę atomów w makrocząstkach.

Dzięki takim badaniom udało się poznać strukturę przestrzenną wielu białek. Struktury podane na ryc. 8.4 i 8.5 są schematami opracowanymi na podstawie badań rentgenograficznych.

Substancje makrocząstkowe, których nie udaje się uzyskać w postaci kryształicznej można niekiedy utrzymać w postaci częściowo uporządkowanej, np. w formie równoległe ułożonych włókien lub warstw. Struktury takie dają również dyfrakcje rentgenowskie, jednakże ilość informacji uzyskiwanych z tych niecałkowicie uporządkowanych układów jest mniejsza niż w przypadku substancji kryształicznych. Takimi właśnie metodami poznano helikalną strukturę dwuniciowego DNA (p. str. 181).

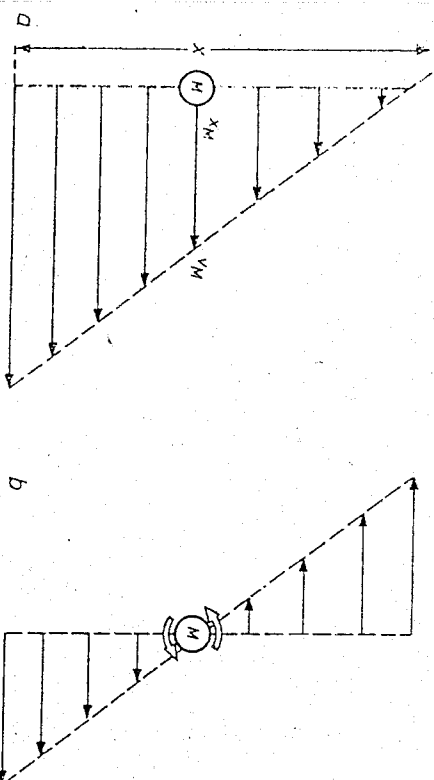
#### 8.2.2. Metody hydrodynamiczne

Wiele metod badania makrocząstek opiera się na badaniu własności ich roztworów. Metody te, ogólnie biorąc, nie dają tak pełnej informacji o strukturze jak badania rentgenowskie, jednakże są one bardziej uniwersalne oraz łatwiejsze w wykonaniu. Dają one informacje o wielkości makrocząstek oraz przybliżone dane o ich kształcie. W pierwszym przybliżeniu można traktować makrocząstkę jako kulę o określonej masie, zawieszoną w rozpuszczalniku, którego cząsteczki są bardzo małe w porównaniu z makrocząstkami. Jako następne, lepsze przybliżenie, można traktować makrocząstkę jako elipsoidy obrotowe. Metody hydrodynamiczne są w stanie wyznaczyć stosunek osi długiej do krótkiej elipsoidu, który w roztworze zachowuje się tak, jak cząsteczka danej substancji makrocząstkowej. Będzie to tzw. równoważny elipsoid stanowiący model makrocząsteczki. Należy jednak pamiętać, że jest to tylko przybliżony model, a rzeczywisty kształt cząsteczki, jakkolwiek często

w ogólnych zarysach zbliżony do tego modelu, jest w rzeczywistości bardziej złożony.

Lepkość roztworów makrocząstek. Lepkość roztworu zawierającego makrocząsteczki jest większa od lepkości samego rozpuszczalnika. Wyjaśnią to rozwiązania (ryc. 8.10a,b).

Makrocząsteczki  $M$  znajdujące się w cieczy, w której występuje gradient prędkości (a więc w będącej w ruchu cieczy rzeczywistej), poruszają się z prędkością  $v_M$  odpowiadającą ich położeniu w cieczy  $x_M$ . Prędkości poszczególnych warstw cieczy są mniejsze lub większe od  $v_M$ , zależnie od ich położenia  $x$ , jak widać na ryc. 8.10a. Gdy rozpatrzmy względne prędkości cieczy w stosunku



Ryc. 8.10. Zachowanie się makrocząsteczki w cieczy, w której występuje gradient prędkości:  $x$  — prędkości warstw cieczy względem nieruchomego układu odniesienia,  $b$  — prędkości cieczy względem makrocząsteczki  $M$ .

do  $v_M$  (przyjmujemy środek cząsteczki  $M$  jako układ odniesienia), przedstawiają się one jak na ryc. 8.10b. Jak widać, na cząsteczkę  $M$  o skończonych wymiarach działa w takim układzie para sił, wprowadzającą cząsteczkę  $M$  w ruch obrotowy. Utrzymanie tego ruchu w roztworze o określonej lepkości wymaga dodatkowego nakładu energii, co przejawia się jako zwiększenie lepkości całego układu. Einstein wyprowadził wzór na lepkość roztworów zawierających kuliste cząsteczki nie adsorbujące na sobie rozpuszczalnika:

$$\eta = \eta_0(1 + 2,5 \Phi)$$

gdzie:

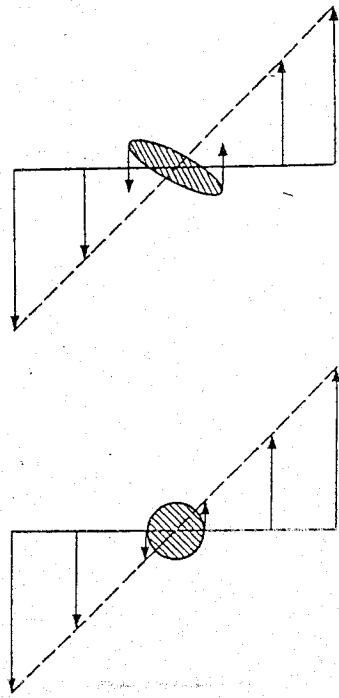
$\eta_0$  — lepkość rozpuszczalnika,

$\Phi$  — stosunek objętości zajętej przez cząsteczki kuliste do objętości roztworu.

Jak widać z ryc. 8.11 w danym gradientie prędkości na cząsteczkę o kształtach wydłużonych działa większa para sił niż na cząsteczkę kulistą o tej samej objętości. Roztwory zawierające makrocząsteczki o kształtach znacznie odbiegających od kulistego wykazują większą lepkość niż wynikałoby to ze wzoru

Einsteina. Dokładniejsza analiza tych zjawisk pozwala na uzyskanie informacji o przybliżonym kształcie makrocząsteczek.

Makrocząsteczki o bardzo wydłużonych kształtach mają tendencję do ustawiania się równoległe do kierunku przepływu cieczy, tym większą im większy jest gradient prędkości w cieczy. Wpływa to na zmianę wartości współczynnika lepkości  $\eta$ , który zależy wówczas od wielkości gradientu. Ciecz, dla których współczynnik  $\eta$  nie jest wielkością stałą, nazywamy cieczami nienuetonowskimi.



Ryc. 8.11. Pary sił działające na makrocząsteczki o różnych kształtach w gradientie prędkości cieczy.

Opisana powyżej orientacja asymetrycznych makrocząsteczek w cieczach o dużym gradientie prędkości przejawia się również we właściwościach optycznych takich roztworów. Stają się one dwójłomne, tak jak niektóre kryształy, choć w mniejszym stopniu. Zjawisko to nazywamy dwójłomnością prądową. Ilościowe pomiary takiej dwójłomności dają również informacje o kształcie makrocząsteczek.

Dyfuzyja makrocząsteczek w roztworze. Współczynnik dyfuzji  $D$  (rozdz. 4.9) zależy między innymi od rozmiarów i kształtów cząsteczek dyfundujących. Z pomiarów współczynnika dyfuzji można więc wnosić o cechach charakterystycznych makrocząsteczki. Przykładowo, dla cząsteczek kulistych zależność współczynnika dyfuzji od promienia  $r$  cząsteczki wyraża się wzorem

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad 8.1$$

gdzie:

$\eta$  — lepkość rozpuszczalnika.

Wzór 8.1 można otrzymać następująco. Przemieszczenie 1 mola substancji z miejsca o stężeniu  $c$  do miejsca o stężeniu  $c - dc$  (ryc. 4.6) wymaga wykonania pracy równej zmianie potencjału chemicznego, korzystając ze wzoru 4.34

$$dW_m = -d\mu = RT \frac{dc}{c}$$

Dyfundujące cząsteczki napotykają opór  $F$ , proporcjonalny do ich prędkości  $v = \frac{dx}{dt}$ , czyli

$$F = -fv \text{ albo } F = -f \frac{dx}{dt} \quad 8.3$$

Współczynnik oporu  $f$  zależy od rozmiarów i kształtu cząsteczek oraz od lepkości  $\eta$  rozpuszczalnika. Dla cząsteczek kulistych jest  $f = 6\pi\eta r$  i siła oporu wyraża się wzorem Stokesa

$$F = 6\pi\eta r v \quad 8.4$$

Praca wykonana przy przemieszczeniu 1 mola — to jest  $N_A$  cząsteczek na odległość  $dx$  wynosi

$$dW_m = -N_A F dx = -N_A f v \frac{dx}{dt} dx \quad 8.5$$

Z porównania 8.5 i 8.2 jest

$$-N_A f \frac{dx}{dt} = RT \frac{1}{c} \frac{dc}{dx}$$

Korzystając z prawa Ficka (4.33) z uwzględnieniem  $k = R/N_A$  oraz  $dn = c dV = c S dx$  ( $c$  — stężenie molowe) otrzymuje się

$$D = \frac{kT}{f} \quad 8.6$$

Dla cząsteczek kulistych otrzymuje się poszukiwany wzór 8.1.

Jak widać z 8.1 współczynnik dyfuzji jest odwrotnie proporcjonalny do promienia kulistej makrocząsteczki. Dla makrocząsteczek o tej samej objętości, lecz o innych kształtach, jest on mniejszy, gdyż większa jest wówczas siła tarcia. Współczynnik dyfuzji dla większości białek są rzędu  $10^{-11} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ . Substancje małowiskozowe mają współczynniki dyfuzji 10–100-krotnie wyższe. Wartości samych współczynników dyfuzji są obecnie rzadko stosowane dla charakterystyki makrocząsteczek, natomiast wraz z danymi sedimentacji w ultrawirówce dają one możliwość wyliczenia masy cząsteczkowej.

Sedymentacja w ultrawirówce. Przez sedymentację rozumie się osiadczenie cząsteczek zawieszonych w ośrodku dyspersyjnym (rozpuszczalniku) w polu grawitacyjnym lub odśrodkowym.

Siła grawitacji działając na makrocząsteczki w roztworach nie wywołuje żadnych dających się obserwować efektów: prędkości ruchów termicznych (Brown) wielokrotnie przewyższają ewentualną sedymentację, jaką mogłoby wywołać ziemskie pole grawitacyjne. Dopiero mikroskopowej wielkości zawiesziny sedymentują w tych warunkach. Jednakże jesteśmy w stanie wytworzyć w specjalnie skonstruowanych przyrządach — ultrawirówkach — pola sił odśrodkowych przewyższających kilkadziesiąt tysięcy razy siły grawitacji. W tych warunkach daje się zaobserwować sedymentację makrocząsteczek. Zjawisko to stwarza możliwość wyznaczania mas molowych z pomiarów szybkości sedymentacji i dyfuzji. Podstawą jest wzór Svedbenga.

$$M = \frac{RT_s}{D(1 - \bar{V}\rho)} \quad 8.7$$

gdzie:

$$s = \frac{dx}{dt} \omega^2 x \quad 8.8$$

jest współczynnikiem sedymentacji, wyrażającym liczbowo prędkość sedymentacji ( $dx/dt$ ) w polu odśrodkowym o przyspieszeniu jednostkowym ( $a = \omega^2 \cdot x = 1 \text{ m/s}^2$ ),  $\bar{V} = V/m$  (stosunek objętości cząsteczki do jej masy) wyraża objętość właściwą substancji makrocząsteczkowej w roztworze, a  $p$  gęstość rozpuszczalnika. Dla typowych białek wielkość  $\bar{V}$  mieści się w granicach 0,73-0,75 l/kg.

Wzór 8.7 można wyprowadzić w następujący sposób. Na cząsteczkę o masie  $m$  działa siła odśrodkowa oraz siła wyporu określona prawem Archimedesa. „Pozorna” masa cząsteczki wynosi

$$m' = m - V\rho$$

gdzie  $V$  oznacza objętość cząsteczki, więc  $V\rho$  jest masą rozpuszczalnika wypartego przez cząsteczkę. Tę masę pozorną można wyrazić przez

$$m' = m \frac{1 - \bar{V}\rho}{1 - \rho}$$

Na cząsteczkę znajdującą się w odległości  $x$  od osi obrotu rotora działa siła odśrodkowa

$$F_{\text{odś}} = m(1 - \bar{V}\rho)\omega^2 x$$

Gdy siła ta zrówna się z przeciwnie skierowaną siłą oporu  $S$ , czyli spełniony będzie warunek

$$m(1 - \bar{V}\rho)\omega^2 x = f \frac{dx}{dt} \quad 8.9$$

makrocząsteczki będą sedymentowały w kierunku ultrawirówki ze stałą prędkością  $v = dx/dt$  ku pierścieniu rotora. Stąd masa cząsteczki

$$m = \frac{f}{\omega^2 x(1 - \bar{V}\rho)}$$

Uwzględniając zależność  $S, G$  oraz  $M = mN$ , otrzymujemy wzór Svedberga 8.7.

Należy zwrócić uwagę, iż wzór 8.7 jest słuszny nie tylko dla cząsteczek kulistych, lecz dla każdego kształtu. Stosunek  $\frac{S}{D}$  występujący we wzorze Svedberga nie zawiera  $f$ , pozostaje więc stały, niezależnie od kształtu makrocząsteczki. Wyrażenie na współczynnik dyfuzji zostało wyprowadzone przy założeniu: iż roztwór substancji makrocząsteczkowej zachowuje się jak roztwór idealny; warunek ten nie zawsze bywa spełniony. Aby zbliżyć się do niego należy przeprowadzać pomiary dyfuzji i sedymentacji dla kilku stężeń badanej substancji, a wartości  $D$  oraz  $s$  ekstrapolować do zerowego stężenia (nieskończenie dużego rozcieńczenia) roztworu.

Jeżeli eksperyment ultrawiwowania prowadzić dostatecznie długo, makrocząsteczki sedymentujące w kувецie wytworzą gradient stężenia tak znaczny, że strumień dyfuzyjny zrówna się ze strumieniem sedymentacyjnym.

Strumień dyfuzyjny:

$$\frac{dn}{dt} = -DS \frac{dc}{dt} = -\frac{kT}{f} S \frac{dc}{dx}$$

Strumień sedymentacyjny:

$$\frac{dn}{dt} = cs \frac{dx}{dt} = cs \frac{m(1 - \bar{V}\rho)\omega^2 \cdot x}{f}$$

Z porównania wynika

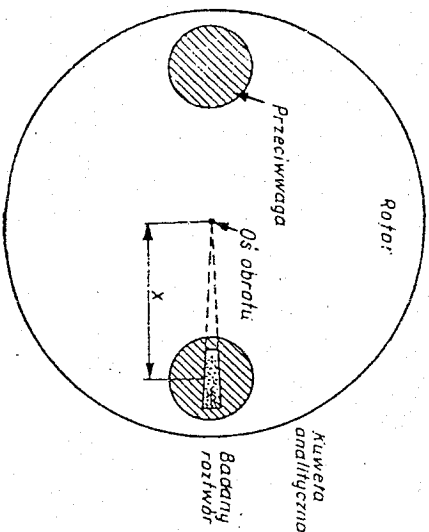
$$m(1 - \bar{V}\rho)\omega^2 x dx = \left(-kT \frac{dc}{c}\right)$$

Calculując to wyrażenie w granicach stężeń  $c_1$  i  $c_2$ , odpowiadającym odległościom  $x_1$  i  $x_2$  od osi obrotu, otrzymuje się

$$M = \frac{RT \ln c_2/c_1}{2(1 - \bar{V}\rho)\omega^2(x_2 - x_1)^2}$$

Wyrażenie to jest podstawą drugiej metody wyznaczenia masy cząsteczkowych zwanej metodą równowagi sedymentacyjnej. Metoda ta nie wymaga wyznaczenia współczynnika dyfuzji  $D$  w oddzielnym doświadczeniu.

Istotną częścią ultrawirówki jest rotor o promieniu kilku centymetrów, wirujący z prędkością do ok. 1000 obrotów na sekundę (ryc. 8.12).



Ryc. 8.12. Schemat rotora ultrawirówki analitycznej.

W rotorze tym osadzona jest kувета zawierająca w swej części sektorowej (kształtu wycinka koła o środku zgodnym ze środkiem rotora) badany roztwór. Specjalny układ optyczny pozwala na śledzenie i rejestrowanie zmian stężenia w poszczególnych częściach kуветы podczas ultrawiwowania.

### 8.2.3. Optyczne metody badania makrocząsteczek

**Rozpraszanie światła.** Roztwory makrocząsteczek jako roztwory koloidowe wykazują zjawisko rozpraszania światła, znane od dawna jako tzw. efekt Tyndalla.

Na skutek tego, natężenie światła  $I$  przechodzącego przez warstwę roztworu o grubości  $l$  jest mniejsze od natężenia światła padającego  $I_0$

$$I = I_0 e^{-\tau l}$$

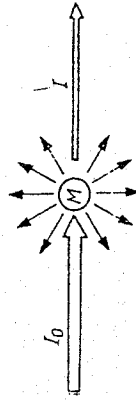
gdzie  $\tau$  jest współczynnikiem rozpraszania światła. Zależy on od różnicy współczynników załamania światła substancji makrocząsteczkowej i rozpusz-



czalnika ( $n - n_0$ ), od masy cząsteczkowej  $M$ , stężenia roztworu  $c$  oraz od długości fali świetlnej  $\lambda$

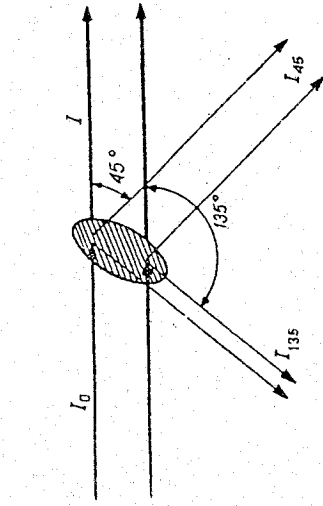
$$\tau = \frac{32\pi^3 n_0^2}{3\lambda^4 N_A} \left( \frac{n - n_0}{c} \right)^2 \cdot cM$$

Wyrażenie to pozwala na wyliczenie masy cząsteczkowej na podstawie pomiaru współczynnika rozpraszania światła.



Ryc. 8.13. Rozpraszanie światła przez makrocząsteczkę.

W powyższym przedstawieniu zjawiska potraktowaliśmy makrocząsteczkę jako punkty rozpraszające światło. Dla cząsteczek o wymiarach porównywalnych z długością fali świetlnej należy uwzględnić interferencje promieni rozproszonych od różnych punktów tej samej makrocząsteczki (ryc. 8.14). Natężenie światła rozproszonego zależy wówczas od kąta, pod którym prowadzimy obserwację. Na rycinie 8.15 pokazano stosunek natężenia światła rozproszonego pod kątem  $45^\circ$  do natężenia pod kątem  $135^\circ$ , jako funkcję parametru wymiaru cząsteczki  $\left(\frac{x}{\lambda}\right)$ , tj. stosunku jej średnicy lub długości do długości fali światła użytego do pomiaru.



Ryc. 8.14.

Ryc. 8.14. Rozpraszanie światła przez makrocząsteczkę o wymiarach porównywalnych z długością fali świetlnej  $\lambda$  (długość osi elipsoidalnego  $\frac{\lambda}{20}$ ).

Ryc. 8.15. Zależność natężenia światła rozproszonego ( $I_{45^\circ}/I_{135^\circ}$ ) od parametru długości cząstek koloidalnych dla różnych typów cząstek.

**Rozpraszanie promieni rentgenowskich.** Analogicznie do fal świetlnych również promieniowanie rentgenowskie ulega rozproszeniu na makrocząsteczkach w roztworze. W tym przypadku użyteczne informacje otrzymujemy analizując natężenie promieniowania rozproszonego jako funkcję kąta rozproszenia, dla kątów bardzo małych, tj. promieni bardzo bliskich promieniowi przechodzącemu. Obserwuje się charakterystyczne maksima i minima natężenia, wywołane interferencją, analogicznie jak wspomniano w podrozdz. 8.2.1. Za pomocą tej metody można uzyskiwać informacje o wymiarach i kształcie makrocząsteczek, a w przypadku układów bardziej złożonych (np. wirusów) również niektóre dane o wewnętrznej budowie tych cząsteczek. Należy zaznaczyć, że informacje o wewnętrznej strukturze otrzymane tą metodą nie są tak obfite, jak uzyskiwane metodami dyfrakcji rentgenowskich na materiałach uporządkowanych w formie kryształów lub włókien.

**Metody spektrofotometryczne.** Widma absorpcyjne makrocząsteczek (zwłaszcza białek i kwasów nukleinowych) w nadfioletcie dostarczają nam wielu informacji dotyczących ich składu chemicznego.

Wykorzystanie efektu hipochromacji do wykrywania obecności helikalnych struktur w kwasach nukleinowych zostało już omówione poprzednio (str. 182). Cenne informacje o rozmieszczeniu reszt aminokwasów aromatycznych w cząsteczkach białka daje tzw. metoda perturbacji rozpuszczalnikowych. Położenie maksimum absorpcji promieniowania nadfioletowego przez te reszty aminokwasowe przypada na obszar około 280 nm, lecz w pewnym, choć niewielkim stopniu, zależy od stałej dielektrycznej środowiska. Zmieniając ten parametr przez dodanie do roztworu białka rozpuszczalnika organicznego (np. glicerolu) wywołuje się zmianę widma absorpcyjnego — w tym przypadku przesunięcie maksimum pochłaniania w stronę fal dłuższych — ale tylko tych reszt aminokwasowych, które znajdują się na powierzchni cząsteczki białka są w kontakcie z rozpuszczalnikiem. Pozostałe reszty aromatyczne, znajdujące się wewnątrz makrocząsteczki, nie ulegają perturbacji.

Badania widm absorpcyjnych w podczerwieni dają m.in. informacje dotyczące wiązań wodorowych w makrocząsteczkach — ich liczby i ukierunkowania. Wiązania te ograniczają bowiem ruchliwość grup (np.  $>C=O$  i  $H-N<$ ), których różnice poziomów oscylacyjnych odpowiadają kwantom promieniowania podczerwonego. Ze względu na silną absorpcję promieniowania podczerwonego przez wodę, badania takie wykonuje się na materiałach w fazie stałej lub też na roztworach w ciężkiej wodzie,  $D_2O$ . Absorpcja spolaryzowanego promieniowania podczerwonego umożliwia niekiedy poznanie ukierunkowania wiązań wodorowych w makrocząsteczkach. Promieniowanie podczerwone — pewne jego pasma — jest najsilniej pochłaniane, gdy wektor elektryczny jego drgań jest równoległy do kierunku wiązań wodorowych. Badania takie wykonuje się na próbkach odpowiednio zorientowanych, w formie włókien lub błon.

Dywersja skręcalności optycznej. Cząsteczki o budowie asymetrycznej wykazują — jak wiadomo — zjawisko skręcania płaszczyzny polaryzacji. Współczynnik skręcalności optycznej  $\alpha$ , zależy od długości fali światła, w którym

dokonyjemy pomiaru. Zależność tę ( $\alpha$  jako funkcja  $\lambda$ ) nazywamy dyspersją skręcalności optycznej (ang.: Optical Rotatory Dispersion, w skrócie ORD). W pobliżu optycznej altrywanych pasm absorpcji (pasm absorpcji asymetrycznych grup w cząsteczce) krzywa dyspersji wykazuje charakterystyczne ekstrema. Występowanie wtórnych struktur w makrocząsteczkach wnosi nowe elementy asymetrii do cząsteczek i odbija się na przebiegu krzywych ORD. Szczególnie wyraźnie zaznacza się obecność struktur helikalnych. Metoda ORD pozwala na określenie, jaka liczba reszt aminokwasowych w cząsteczce białkowej znajduje się w konformacji  $\alpha$ -helikalnej, jaka zaś w konformacji  $\beta$  oraz w formie nieregularnie ułożonego łańcucha polipeptydowego.

Andrzej Morawiecki

## 9. Biotfizyka komórki

### 9.1. Ogólne właściwości żywych komórek jako układów fizycznych

Komórka jest podstawowym elementem budowy żywych organizmów. W wielu przypadkach pojedyncze komórki są kompletnymi organizmami, w innych ulagły one wyspecjalizowaniu i mogą funkcjonować tylko jako części składowe złożonego organizmu.

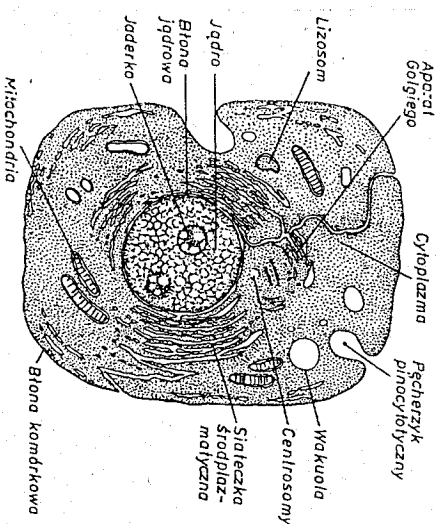
Istnieje znaczna różnorodność komórek pod względem wielkości, budowy i spełnianych funkcji. Znane są komórki długości kilkunastu lub nawet przeszło stu centymetrów (włókna nerwowe, niektóre jednokomórkowe glony); są także organizmy jednokomórkowe wielkości około 1  $\mu\text{m}$ . Starając się opisać typowe, wspólne dla większości komórek właściwości, możemy mówić o pewnej abstrakcyjnej „typowej komórce”, mającej cechy spotykane najczęściej.

Taka „typowa komórka” miałaby wymiary (długość i średnicę) 1–3  $\mu\text{m}$ , objętość ok. 2–3  $\mu\text{m}^3$ . Około 70% suchej masy komórkowej stanowiłoby białka, 15% kwasy nukleinowe, 10% lipidy i 5% węglowodany. W komórce takiej ogólna liczba makrocząsteczek byłaby rzędu  $10^7$ . Komórka typu sekretoryjnego wyższych zwierząt jest przedstawiona schematycznie na ryc. 9.1.

Komórki takie otoczone są błoną cytoplazmatyczną, zawierają wewnątrz jądro, również otoczone błoną, mająca złożoną strukturę. W cytoplazmie komórki można wyróżnić układ kanałów siateczki (retikulum) endoplazmatycznej i różne organelle, jak: mitochondria, rybosomy, pęcherzyki pinocytarne, układ Golgiego i inne. W cytoplazmie zielonych komórek roślinnych występują także chloroplasty. Jak widać cytoplazma komórki wykazuje znaczną złożoność struktury.

Rozpatrując żywy organizm, np. organizm jednokomórkowy, jako układ fizyczny możemy wskazać cechy charakterystyczne, które w pewien sposób wyróżniają go spośród innych układów, nie żywych, jakże spotyka się w przyrodzie. Omówimy poniżej kilka z tych cech; każda z nich oddzielnie nie stanowi kryterium wyróżniającego organizm żywy od nieżywego, jednak wszystkie one występując wspólnie są charakterystyczne dla zjawiska życia.

Odrębność od otoczenia. Organizm żywy jest zawsze wyraźnie oddzielony od otoczenia powierzchniami granicznymi (granicami faz). Nigdy nie stwierdza się ciągłego przejścia pomiędzy organizmem żywym a środowiskiem. Granicami oddzielającymi są błony komórkowe, pokryte niekiedy dodatkowymi warstwami (np. śluzu, dodatkową błoną o większej odporności mechanicznej itp.); u organizmów bardziej złożonych granicami są warstwy specjalnych komórek ochronnych. Analogiczne powierzchnie graniczne występują wewnątrz komórki, oddzielając poszczególne organelle od reszty cytoplazmy.



Ryc. 9.1. Uogólniony schemat budowy komórki.

Odrębność od otoczenia przejawia się także odrębnością składu chemicznego. Organizmy żywe zawsze zawierają liczne składniki bądź nie występujące w ogóle w środowisku, bądź występujące w zupełnie odmiennych stężeniach i proporcjach. Przykładami mogą być specyficzne substancje makrocząsteczkowe syntetyzowane wewnątrz komórki i tam funkcjonujące lub wybiórczo wychwytywane z otoczenia jako składniki pokarmowe. Szczególnie wyraźnie można też prześledzić tę odrębność na przykładzie jonów nieorganicznych. Organizmy żyjące w wodach słodkich z reguły mają w swoich komórkach wyższe stężenie jonów ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) niż wynosi ono w środowisku zewnętrznym. Przeciwnie zaś, organizmy żyjące w wodach o dużym zasoleniu (oceany) usuwają nadmiar jonów i ich stężenie wewnątrz komórki może być niższe od zewnętrznego. Z reguły też stosunek stężeń  $\frac{\text{K}^+}{\text{Na}^+}$  wewnątrz komórki jest wyższy niż na zewnątrz.

Opisana odrębność od otoczenia utrzymywana jest tak długo, jak długo organizm żyje. Po jego śmierci zaczynają przeważać procesy prowadzące do zniwelowania tych różnic. Wytłumaczenie tego faktu wiąże się ze zrozumieniem przemian energetycznych w organizmach i podane jest dalej.

Wysoki stopień organizacji. Została już podkreślona wysoka złożoność żywej komórki. Obserwujemy ją zarówno na poziomie cząsteczkowym (budowa białek i innych makrocząsteczek), jak też i na poziomie struktur subkomórko-