

ПРОИСХОЖДЕНИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ЖИВОЙ КЛЕТКИ. О ДВУХ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ АСИММЕТРИЯХ – ИОННОЙ И ХИРАЛЬНОЙ

*В.А. Твердислов, Л.В. Яковенко, А.В. Дмитриев,
А.А. Жаворонков, И.Л. Твердислова*

*Кафедра биофизики физического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова
tverd07@mail.ru*

*«Переживаемая нами эпоха должна
служить не к разъединению,
а к сближению задач об организованном
и неорганизованном в природе.*

*Не только в области жизни, но и в области неживой материи.
Физико-механическая модель живой материи
есть стройность».*

Н. А. Умов

1. Введение

*«Развитие Вселенной с момента ее возникновения выглядит
как непрерывная последовательность нарушений симметрии...*

Феномен жизни естественно вписывается в эту картину».

Фриман Дж. Дайсон

Если считать, что предназначение человечества состоит в том, чтобы познать Вселенную и осознать себя, то одной из ключевых проблем на этом пути является проблема происхождения жизни. Естественным путем. На Земле.

По этому поводу написано множество статей и книг, но однозначного ответа на этот вопрос в них нет. И, учитывая сегодняшний уровень наших знаний, он не скоро появится. Тем не менее на некоторые вопросы, в частности об отдельных стадиях происхождения жизни на Земле, уже сейчас можно дать более или менее правдоподобные ответы. Гипотезы панспермии (космического инфицирования Земли простейшими организмами или биомолекулами) и сотворения мы здесь рассматривать не будем, поскольку они заменяют одни вопросы другими, но ответа на основной вопрос о происхождении жизни не дают.

Жизнь на Земле основана на соединениях углерода, и основные процессы ее протекают в водной среде. Вода – универсальный растворитель, облегчающий протекание многих химических реакций. Углерод лучше других элементов подходит для формирования органических молекул, поскольку легко образует связи со многими другими атомами. К настоящему времени экспериментально показано, что практически все простейшие биологически важные органические соединения могли образоваться в естественных условиях на древней Земле в ходе природных физико-химических процессов. Биомакромолекулы – белки и нуклеиновые кислоты, а также углеводы и липиды – составляют основу современной жизни. Все они обладают свойством *хиральности*, речь о котором пойдет ниже.

Для всех живых клеток характерно неравномерное и неравновесное распределение веществ и ионов между клеткой и окружающей средой. Среди этих распределений особое место занимают несимметричные распределения неорганических катионов – натрия и калия, магния и кальция. Зеркальные стереоизомеры хиральных соединений – энантиомеры – аминокислот, сахаров, фосфолипидов несимметричны по их содержанию в биосфере. Ввиду общности характера этих распределений, их следует считать двумя фундаментальными асимметриями в живых системах. Их всеобщность порождает вопрос об их возникновении: возникли ли они в ходе биологической эволюции или их возникновение было предопределено физико-химическими факторами предбиологической эволюции.

Предлагавшиеся ранее механизмы возникновения асимметричных распределений ионов и энантиомеров аминокислот и сахаров либо содержали внутренние противоречия, либо были умозрительными, т.е. не были подтверждены хотя бы косвенными экспериментальными данными. В частности, наиболее распространенные представления о происхождении пробионтов основаны на свойствах равновесных гетерогенных термодинамических систем, в то время как живые клетки – существенно неравновесные системы.

Одной из физических проблем возникновения живых систем является проблема возникновения информации: был ли выбор решений (возможных путей развития) на важнейших стадиях предбиологической эволюции случайным или предопределенным. В первом случае информация создавалась в процессе эволюции, во втором – реализовалась информация, скрытая в неживой системе. Выявление факторов селективного преимущества и механизмов их действия в предбиологических системах на разных стадиях эволюции позволяет ответить на этот вопрос.

Для решения проблем, связанных с возникновением предшественников клеток, обладающих необходимым набором свойств живых клеток – дискретностью, неравновесностью, определенным ионным составом,

хиральной чистотой белков, сахаров и липидов, аппаратом конвариантного матричного синтеза, способностью к самовоспроизведению, возбудимостью и подвижностью, – необходимо согласование двух подходов: экстраполяции свойств известных неравновесных систем на все более сложные иерархические системы и реконструкции возможного пути эволюции наиболее простых живых систем и их подсистем. При движении «снизу», т.е. от геохимических систем к биохимическим, необходимо выяснить, какие именно системы обладали свойствами, достаточными для возникновения предшественников клеток. При движении «сверху» – какие свойства систем были необходимы для реализации того или иного пути эволюции пробионтов. Таким образом, могут быть получены необходимые и достаточные условия возникновения предшественников клеток.

Знаменательно, что проблемы молекулярной асимметрии важны не только в вопросах биогенеза, но непосредственно связаны с состоянием нынешней биосферы. Значительным достижением молекулярной геронтологии последних лет стало обнаружение такого факта: по мере старения организмов происходит частичная рацемизация некоторых аминокислотных остатков в белках.

Некоторые вещества, не свойственные природным экосистемам, могут накапливаться в различных их частях и влиять на их устойчивость. Так, например, для антропогенных загрязнений экосистем антиподами естественных стереоизомеров хиральных веществ механизмы биологической деградации обычно отсутствуют, что может приводить к их накоплению и переносу на значительные расстояния. Это – новая проблема, без эффективного решения которой возможны экологические кризисы с непредсказуемыми последствиями.

2. Дискретность, размеры клеток. О двух фундаментальных асимметриях

«Присущая явлениям симметрия – это максимальная симметрия, совместимая с существованием явления. Определенные элементы симметрии могут сосуществовать с определенными явлениями, но они не являются необходимыми; необходимо лишь отсутствие определенных элементов симметрии.

Именно асимметрия создает явление».

Пьер Кюри (1894)

Нам известны только *дискретные* формы жизни – одноклеточные и многоклеточные организмы. Присущая им вариабельность служит основой биологической эволюции – конкуренции, приспособляемости в изменяющихся условиях среды. Гипотетические *распределенные* формы жиз-

3. Проблемы регуляции в живых и предбиологических системах

ни, наподобие описанной С.Лемом в «Солярисе», нам неизвестны и представляются с точки зрения требований эволюционного развития маловероятными.

Размеры живых клеток достаточно разнообразны, однако их средний размер составляет несколько микрометров. По-видимому, эта величина обусловлена диффузионными ограничениями, восходящими к стадии добиологического образования предшественников клеток и обусловленными необходимостью соответствия скорости работы ферментов и диффузионного обеспечения их молекулами субстратов. Все живые клетки являются дискретными образованиями, принципиально удаленными от состояния термодинамического равновесия. Первичной основой этого служит асимметричное распределение неорганических ионов между клетками и окружающей средой (рис. 1).

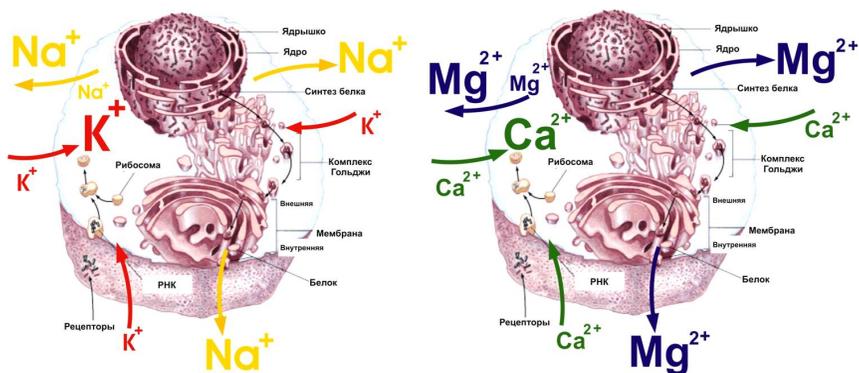


Рис. 1. Схемы трансмембранного переноса одно- и двухвалентных катионов в клетках, обеспечивающего их термодинамическую неравновесность

Все живые клетки в большей или меньшей степени аккумулируют ионы калия из обогащенной ионами натрия внешней среды, такой как морская вода или кровь (лимфа) млекопитающих. То же относится и к основным двухвалентным катионам – кальцию и магнию. Кальций накапливается в клетках, однако концентрация свободного кальция крайне мала из-за высокой константы связывания с биологическими молекулами и структурами клетки.

По-видимому, основой термодинамической неравновесности протоклеток стала ионная асимметрия между ними и окружающей средой. Протонные градиенты в настоящей работе мы сознательно не рассматриваем, считая проблему предметом дальнейших исследований, поскольку их энергоёмкость существенно уступает ионным градиентам. Тем более что в этом случае речь идет о градиентах, а не об асимметриях.

Без специализированных механизмов поддержания ионной асимметрии мембранными насосами, приобретенными уже в ходе биологической эволюции, электрохимические градиенты исчезают. Но и неживая природа, оказывается, способна создавать неравновесную ионную асимметрию.

Уникальной находкой природы стало использование одномерных цепей, белков и нуклеиновых кислот в качестве информационно значимых молекул (напомним, что запись информации на магнитных и оптических носителях также является одномерной). Необходимое условие для этого – хиральная чистота мономеров: L-аминокислот и D-сахаров.

Более 100 лет назад, в 1904 году, лорд Кельвин в своей лекции в Балтиморе, посвященной динамике молекул и волновой природе света, дал общее определение хиральных объектов («*хиральность*» – от греческого *χείρ* – рука). Вне зависимости от своей физической природы хиральным объектом считается тот, который не может быть совмещен со своим отображением в плоском зеркале: ни перемещениями, ни поворотами, ни изменениями масштаба. Наши левые и правые руки – хиральные объекты. Как герой пьесы Бомарше не подозревал, что говорит прозой, так мы обычно не замечаем, что живем в мире хиральных предметов и образов: от галактик и живых организмов, вплоть до элементарных частиц.

Жизнь на Земле построена на основе углерода (других форм жизни не знаем). Углерод может образовывать четыре равноценные химические связи, направленные из центра правильного тетраэдра к его вершинам. К хиральным веществам относятся соединения, включающие асимметричный атом углерода с четырьмя различными заместителями, имеющими с ним ковалентные связи. Они образуют *зеркальные изомеры* – *энантиомеры*, обладающие оптической активностью – способностью вращать плоскость поляризации света (L – влево, D – вправо). Существуют молекулы, включающие более одного несимметричного углерода. Хиральная асимметрия в биосфере однозначно реализуется на генетическом уровне и в биосинтезе. Обычный пример: L-аминокислоты, D-сахара.

Биополимер, построенный из стереоизомеров строго определенного вида (L или D), является *гомохиральным*; биополимер, построенный из смеси стереоизомеров, – *рацемическим* или *гетерохиральным*.

Впервые нарушение зеркальной симметрии наблюдал Луи Пастер, известный миру более как микробиолог. В 1848 г. он открыл, что виноградная кислота в результате кристаллизации превращается в смесь L- и D-изомеров кристаллов винной кислоты [1]. Кислота, получающаяся из D-кристаллов, совпадает с винной кислотой, образующейся при брожении виноградного сока; кислота, получающаяся из L-кристаллов, не наблюдается в природе.

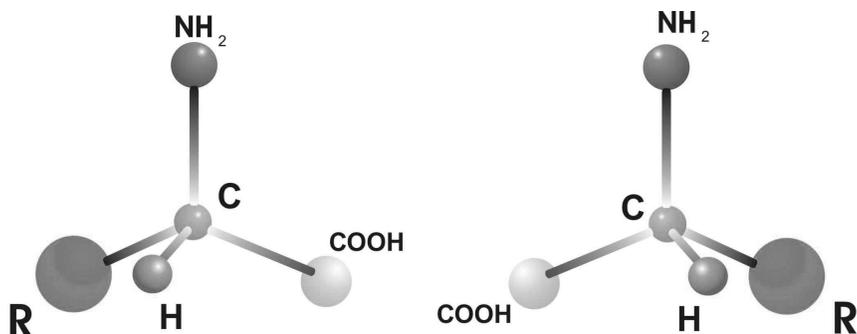


Рис. 2. Зеркальные изомеры L и D аминокислот

Естественный вопрос, зачем нужна гомохиральность живым системам, имеет общий и вполне ясный ответ. Гетерохиральные неразветвленные биополимеры (нуклеиновые кислоты и белки) потеряют свою уникальную стереоспецифичность, если в них случайным образом будут входить мономеры-энантиомеры. Гетерохиральные (по дезоксирибозе) ДНК потеряют необходимое свойство комплементарного взаимодействия в двойной спирали. Белки-ферменты, рецепторы, переносчики, шапероны также утратят свою уникальную пространственную конфигурацию, необходимую для специфического комплементарного узнавания своих субстратов и лигандов. Вместе с тем и другие хиральные участники межмолекулярных взаимодействий также должны иметь уникальную трехмерную структуру. Можно представить себе и такую ситуацию, что в биополимерах, например в белках, строго определенным образом сочетаются L- и D-изомеры аминокислот. В таком случае неизмеримо возрос бы необходимый ресурс генетической информации: триплетный код из четырех нуклеотидов в ДНК стал бы недостаточен для кодирования (сейчас избыточного) наших 20 распространенных в биосфере аминокислот.

На самом деле хиральных соединений в живых организмах намного больше – их не менее половины из всех типов биомолекул. По всем классам соединений биологические системы во всей биосфере гомохиральны (L или D). Это принципиально, и от этого свойства живой материи пошло представление о «хиральной чистоте биосферы». Существенно, хотя обычно это не обсуждается в общебиологическом плане, что и все фосфолипиды в биосфере гомохиральны. Объяснение этому состоит в том, что «на входе» и «на выходе» их метаболизма стоят «хиральные фильтры» – ферменты.

Гомохиральность – обязательный критерий для всех участников всех метаболических путей всех живых организмов. Правда, имеются и исключения, как всегда, подтверждающие правило. Многие биологиче-

ские виды способны использовать зеркальные изомеры обычных аминокислот и сахаров [2]. Это – некоторые виды бактерий, включающие в свои оболочки сахара «левой» хиральности в качестве естественной защиты. По крайней мере некоторые D-аминокислоты могут включаться в метаболический круговорот клеток эукариотов, имеющих специализированные ферменты – рацемазы. Совсем недавно обнаружено, что в организме человека клетками нервной ткани вырабатывается в качестве нейромедиатора D-серин, являющийся дублером нейротрансмиттера глутамата. Опиоидные пептиды содержат D-аминокислоты. Но эти молекулы – исключения, для которых существуют свои стереоспецифические ферменты. Во всех случаях использование нетипичных энантиомеров в клетках связано со специальными ферментами, которые сами построены из L-аминокислот.

По основным физико-химическим параметрам энантиомеры не различаются и в обычных химических реакциях образуются в равных количествах, составляя так называемую рацемическую смесь. Однако в живых клетках для рибосомального синтеза белков используются только L-аминокислоты, а в состав нуклеиновых кислот входят только D-сахара. Биологический смысл хиральной чистоты биосферы понятен: гомохиральность белков и нуклеиновых кислот обуславливает стабильность их структур, обеспечивающих их функционирование, и, кроме того, для биохимических преобразований гомохиральных соединений требуется гораздо меньше ферментов, чем для таких же преобразований гетерохиральных соединений [3–5].

Поддержание хиральной чистоты невозможно без затрат энергии. Приведем оценку энергетических затрат на создание хиральной и ионной асимметрии клетки.

Энергетическая стоимость хиральной чистоты белков, нуклеиновых кислот и липидов

При постоянных температуре и давлении изменение свободной энергии при рацемизации одного из энантиомеров хирального соединения имеет только энтропийную составляющую. В соответствии с формулой Шеннона

$$S = -k \sum_i p_i \ln p_i = -k(p_d \ln p_d + p_l \ln p_l) = -k[p \ln p + (1-p) \ln(1-p)],$$

где $p_d = p$ и $p_l = (1-p)$ – вероятности случайного выбора L- или D-изомера из смеси.

Для хирально чистой системы энтропия, приходящаяся на одну частицу, равна $S = 0$, а для рацемической смеси энантиомеров $S = k \ln 2$, поскольку $p = 0,5$. Таким образом, изменение энтропии при образовании по $N/2$ правых и левых изомеров из рацемической смеси, содержащей N

частиц, составляет $\Delta S = -k \cdot N \cdot \ln 2$, а соответствующее изменение свободной энергии

$$\Delta G = -T\Delta S = kT \cdot N \cdot \ln 2.$$

Оценим количество остатков аминокислот и сахаров в клетке.

Пусть радиус клетки равен r , ее средняя плотность ρ и массовые доли органических веществ в ней равны w_i (%), где $i = 1, 2, 3$ для белков, углеводов и нуклеиновых кислот соответственно. Средние молярные массы этих веществ обозначим M_i . Тогда количество хиральных частиц в объёмной фазе клетки составит $N = N_A \frac{4\pi r^3 \rho}{300} \sum_{i=1}^3 \frac{w_i}{M_i}$, а минимальная свободная энергия, необходимая для выделения из рацемической смеси $2N$ частиц двух хирально чистых систем, содержащих по N энантиомеров каждая, равна $\Delta G_{ANS} = kT 2N \ln 2 = \frac{8\pi r^3 \rho RT \ln 2}{300} \sum_{i=1}^3 \frac{w_i}{M_i}$.

Детальный химический состав клетки сильно зависит от ее типа. Однако для оценок можно использовать данные для любой хорошо изученной клетки. Известны данные по химическому составу клетки *E.coli* (% масс.): белки – 15, ДНК – 1, РНК – 5, углеводы – 3. Средние молярные массы (Да) для аминокислот, сахаров и остатков нуклеиновых кислот можно принять равными 115, 170 и 340 соответственно. Размер клетки пока возьмем равным 6 мкм, т.е. промежуточному значению между типичными размерами прокариот и эукариот. Плотность клетки примем равной плотности воды. Подставив эти данные в приведенное выше выражение, получим

$$\Delta G_{T,p} \approx 8 \cdot 3,1 \cdot 27 \cdot 10^{-18} \cdot 10^3 \cdot 8,3 \cdot 0,7 \cdot \left(\frac{15}{115} + \frac{3}{170} + \frac{7}{340} \right) \approx 4 \cdot 10^{-12} \cdot 0,17 \approx 7 \cdot 10^{-13} \text{ Дж.}$$

При обсуждении проблемы хиральной чистоты биосферы, как правило, рассматриваются только аминокислоты и нуклеиновые кислоты, а липиды обычно не упоминаются. Поскольку фосфолипиды представляют собой двойные сложные эфиры жирных кислот и 3-фосфоглицерина обычно с модифицированной фосфатной группой, то средний атом углерода в остатке глицерина оказывается хиральным. Поэтому фосфолипиды могут существовать в виде двух стереоизомеров: L и D, но в живой природе встречаются только L-фосфолипиды [6]. Причина такой селективности, вероятно, не та же, что при отборе энантиомеров аминокислот и нуклеиновых кислот.

Поскольку от конформации молекул липидов процессы биосинтеза явно не зависят, клетке должно было бы быть безразлично, какие стереоизомеры входят в состав ее мембраны. Скорее всего, так и было в случае

предшественников протоклеток, когда фосфолипидные мембраны формировались спонтанно из тех липидных компонентов, которые были им доступны, т.е. имелись в достаточном количестве в окружающей среде.

Однако при переходе пробионтов к автономному существованию ситуация изменилась, поскольку протоклетка должна была синтезировать липиды сама. Ферменты липидного обмена современных прокариот обладают практически абсолютной специфичностью к L-фосфолипидам. Оптимальная структура каталитического центра для синтеза L-фосфолипидов должна сильно отличаться от таковой для D-фосфолипидов (из общих соображений: они довольно протяженны и должны быть зеркально симметричными, т.е. малыми изменениями структуры фермента изменить его специфичность не удастся). Видимо, фермент для синтеза L-фосфолипидов, построенный из L-аминокислот, «дешевле» или эффективнее соответствующего фермента для синтеза D-фосфолипидов.

С другой стороны, стабилизация структуры клеточной мембраны белками предполагает белково-липидные взаимодействия. Возможно, энтальпия образования белково-липидного комплекса из компонентов одной хиральности по абсолютной величине больше энтальпии образования комплекса из гетерохиральных компонентов. Тогда это могло бы послужить фактором преимущества при отборе липидов в ходе эволюции пробионтов. Еще одним физико-химическим фактором, который мог повлиять на возникновение гомохиральных липидных мембран, могут быть различные распределения спонтанно образующихся пор в гомохиральных и гетерохиральных липидных бислоях.

Энергетическую стоимость создания хирально чистой бислоистой липидной мембраны у модельной клетки диаметром 6 мкм можно оценить следующим образом. Считая, что одна молекула фосфолипида занимает площадь $S_0 = 0,4 \text{ нм}^2$, в бислоистой сферической мембране такой клетки будет содержаться $N = 2 \frac{4\pi r^2}{S_0} \approx \frac{24 \cdot 9 \cdot 10^{-12}}{40 \cdot 10^{-20}} = 5,4 \cdot 10^8$ молекул фосфолипи-

дов. Уменьшение энтропии при разделении смеси $2N$ частиц двух сортов на две системы, каждая из которых содержит по N частиц одного сорта, составляет $\Delta S = k 2N \ln 2$. Поэтому изменение свободной энергии при формировании хирально чистой бислоистой липидной мембраны из рацемической смеси фосфолипидов вдвое большего объема примерно равно $\Delta S_L = 1,38 \cdot 10^{-23} \cdot 11 \cdot 10^8 \cdot \ln 2 \approx 10^{-14} \text{ Дж} \cdot \text{К}^{-1}$. При 300 К такому изменению энтропии соответствует увеличение свободной энергии на

$$\Delta G_L = T \Delta S_L = \frac{16\pi r^2}{S_0} kT \ln 2 \approx 3 \cdot 10^{-12} \text{ Дж.}$$

Поскольку свободные энергии рацемизации липидов и остальных хиральных веществ зависят от объема (радиуса) модельной клетки поразному, существует такой размер клетки, при котором эти величины совпадают. Оценим его из условия $\frac{\Delta G_{ANS}}{\Delta G_L} = 1$, которое дает

$$r = \frac{600}{\rho N_A S_0 \sum_{i=1}^3 \frac{w_i}{M_i}} \approx \frac{600}{10^3 \cdot 6 \cdot 10^{23} \cdot 40 \cdot 10^{-20} \cdot 0,17} \approx 14 \cdot 10^{-6} \text{ м.}$$

Таким образом,

для клетки диаметром 28 мкм энергии рацемизации липидного бислоя и объемной фазы совпадают и равны примерно $7 \cdot 10^{-9}$ Дж.

Энергетическая стоимость создания ионной асимметрии клетки

Для оценки энергетической стоимости ионной асимметрии рассмотрим клетку с окружающей средой как замкнутую систему. Свободная энергия каждой подсистемы равна $G_{T,P} = \sum_i \mu_i n_i$, где μ_i – электрохимический потенциал i -го компонента, n_i – число молей этого компонента в подсистеме. Изменения свободной энергии всей системы при изменении числа частиц в подсистемах равно

$$\Delta G_{T,P} = \Delta G_{T,P}^{(1)} + \Delta G_{T,P}^{(2)}$$

или

$$\Delta G_{T,P} = \sum_i (\mu_i^{(1)} \Delta n_i^{(1)} + \mu_i^{(2)} \Delta n_i^{(2)}) = \sum_i (\mu_i^{(1)} - \mu_i^{(2)}) \Delta n_i^{(1)},$$

поскольку $\Delta n_i^{(1)} = -\Delta n_i^{(2)}$. Изменение числа молей компонента в клетке можно выразить в виде $\Delta n_i = \Delta c_i \cdot V$, где V – объем клетки, а электрохимические потенциалы ионов формально определяются соотношениями:

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln c_i + z_i F \phi,$$

где μ_i^0 – стандартный химический потенциал i -го иона, z_i – его валентность, ϕ – электростатический потенциал, F – число Фарадея. Следовательно, изменение свободной энергии системы, сопровождающее изменение ионного состава клетки, можно записать в виде:

$$\Delta G_{T,P} = RTV \sum_i \Delta c_i \left(\ln \left(\frac{c_i^{(1)}}{c_i^{(2)}} \right) - \frac{z_i F}{RT} \Delta \phi_m \right),$$

где ϕ_m – мембранный потенциал клетки.

Таблица 1. Концентрации ионов для аксона кальмара

Концентрации ионов (ммоль/л)	K ⁺	Na ⁺	Cl ⁻
Снаружи	10	420	500
Внутри	360	70	160

Используя значения внутриклеточных концентраций ионов для аксона кальмара, приведенные в таблице 1, получим:

$$\begin{aligned} \Delta G_{T,P} &\approx 8,3 \cdot 310 \cdot 1,1 \cdot 10^{-16} \cdot [0,35 \cdot (\ln 36 + 96500 / (8,3 \cdot 300)) \cdot 0,05 - \\ &- 0,35 \cdot (-\ln 6 + 96500 / (8,3 \cdot 300)) \cdot 0,05 - 0,34 \cdot (\ln 3 - 96500 / (8,3 \cdot 300)) \cdot 0,05] \approx \\ &\approx 3 \cdot 10^{-13} \cdot 0,35 \cdot (4+2) \approx 6 \cdot 10^{-13} \text{ Дж.} \end{aligned}$$

Для клетки диаметром 28 мкм $\Delta G_{T,P} \approx 6 \cdot 10^{-12}$ Дж, поскольку ее объем почти на порядок больше.

Таким образом, энергетические затраты на отбор хирально чистых аминокислот и нуклеиновых кислот для небольших клеток практически совпадает с величиной свободной энергии, необходимой для создания ионной асимметрии, но почти на порядок меньше свободной энергии, необходимой для отбора одного из стереоизомеров липидов, входящих в бислойную липидную мембрану. Различие станет еще больше, если учесть наличие липидов во внутренних структурах клетки.

Этот простой подсчет показывает, что поддержание хиральной чистоты белков, нуклеиновых кислот и липидов с помощью термодинамических механизмов потребовало бы от клетки затрат энергии, на порядок превышающих свободную энергию, запасенную в виде неравновесного распределения ионов между клеткой и средой. Поэтому хиральная чистота внутренней среды клетки может поддерживаться только за счет кинетических механизмов – запретов на реакции со стереоантиподами, что обеспечивается высокой селективностью соответствующих ферментов и энергетически ничего не стоит.

Эта ситуация сходна с парадоксом Гиббса: если бы не было «непроницаемости» ферментов для антиподов, существующее распределение энантиомеров хиральных соединений обеспечило бы клетке огромный запас свободной энергии. В существующей ситуации количество свободной энергии, запасенное в таком неравновесном распределении веществ, ничтожно и обусловлено только ошибками ферментов и очень медленной спонтанной рацемизацией соединений.

Однако у предшественников клеток ферменты были несовершенны. Поэтому у них ошибки в выборе «нужного» энантиомера могли происходить гораздо чаще. Ошибки в выборе нуклеиновых и аминокислот долж-

ны были иметь, как правило, летальный исход и поэтому не запоминались системой. Ошибки в выборе молекул липидов приводили к изменению термодинамических и механических свойств мембран, но не обязательно к гибели протоклетки. При делении дочерняя протоклетка наследовала только часть дефектных липидов и добавляла к ним самостоятельно синтезированные или усвоенные из окружающей среды молекулы, часть которых также была дефектной. Возможно, что это было основой для возникновения клеток разных типов.

Знаменательно, что две основные асимметрии, характерные для живых систем, стоят, с энергетической точки зрения, практически одинаково. Это наводит на мысль о том, что в ходе добиологической эволюции они возникли в результате процессов одной природы и в одном и том же месте. Но где? И какие именно процессы привели к возникновению этих асимметрий?

Пожалуй, главная идея настоящего раздела состоит в том, что бифуркация, в результате которой появились две неравновесные асимметрии, фундаментальные для живых систем, могли возникнуть и, вероятно, возникли в одно и то же время и в одном и том же месте в ходе общих процессов. Это место – неравновесная граница океан–атмосфера.

Поверхность Земли получает от Солнца световой энергии в среднем немного более $10 \text{ МВт} \cdot \text{см}^{-2}$. Световая энергия поглощается в верхних слоях океана толщиной в десятки метров, а излучается обратно из слоя толщиной в доли миллиметра. Это связано с тем, что поглощается свет во всем диапазоне солнечного спектра, а излучается в инфракрасной (тепловой) области. Поскольку вода хорошо поглощает инфракрасный свет, он может излучаться только из тонкого верхнего слоя океана.

Морская поверхность является термодинамически неравновесной структурой, поскольку испарение воды и инфракрасное излучение в атмосферу охлаждают на $0,5\text{--}3,0 \text{ }^\circ\text{C}$ поверхностный слой в $100\text{--}300 \text{ мкм}$. В результате на поверхности океана образуется тонкая «холодная пленка». В возникающем значительном градиенте температуры могут происходить термодиффузионные процессы разделения ионов и органики, могут формироваться регулярные динамические структуры (колебательные и волновые).

3. Физико-химические предпосылки возникновения жизни

«Живые организмы – это объекты, далекие от равновесия и отделенные от него неустойчивостями».
И. Пригожин

В настоящей статье мы будем говорить о спонтанных природных физико-химических процессах, которые могли бы привести к возникнове-

нию предшественников живых клеток. Именно предшественников, а не самих живых клеток. Нам придется обратиться к идеям 70–30-летней давности относительно процессов еще более далеких, по-видимому, имевших место на Земле более 3-х млрд лет назад. Речь пойдет не столько о «биохимическом преопределении» появления живого, но о более раннем, базовом «физико-химическом, геофизическом преопределении». Естественно, мы опираемся на классические исследования и публикации А.И. Опарина, Дж.Б.С. Холдейна, Дж.Д. Бернала, М.Г. Руттена и их последователей [7–12].

Опубликованная в 1924 г. книга А.И. Опарина (1894–1880) «Возникновение жизни на Земле» стимулировала интерес ученых к проблемам происхождения жизни и абиогенного синтеза. Проблемами абиогенного синтеза занимался академик А.Н. Бах (1857–1946), сотруднику которого удалось показать, что в реакциях формальдегида с цианидом могут образовываться аминокислоты, которые затем конденсируются с образованием олиго- и полипептидов. Но особенно успешными были серии экспериментов, проведенные в начале 1950-х гг. С.Л. Миллером (р. 1930), бывшим тогда аспирантом известного ученого Г.К. Юри (1893–1981, Нобелевская премия 1934 г. за открытие дейтерия).

В первых экспериментах Миллера при коронном электрическом разряде в смеси газов NH_3 , H_2 , CH_4 и насыщенного водяного пара (имитировавшей древнюю атмосферу), продолжавшихся несколько дней, образовывались аминокислоты и некоторые другие органические соединения, характерные для современных организмов. Эти эксперименты были затем многократно и успешно повторены в разных лабораториях.

При вариациях химического состава смеси (добавлении HCN , формальдегида, H_2S и т.д.) и замене электрического разряда на ультрафиолет или тепловое воздействие удалось получить не только аминокислоты, но и некоторые нуклеиновые основания, порфирины, сахара, компоненты липидов. К настоящему времени практически все основные биологически важные органические соединения были получены в лабораторных экспериментах, моделирующих условия, существовавшие около 4 млрд лет назад в различных местах на Земле.

Живая природа использовала все размерности окружающего нас реального физического мира. К точечным компонентам живого, крайне малым по сравнению с размерами организмов или клеток, можно отнести, например, неорганические ионы и молекулы воды. К одномерным (линейным) компонентам следует отнести неразветвленные полимеры – белки и нуклеиновые кислоты. К двумерным – мембраны, к трехмерным – объемные образования – клетки и органеллы, формируемые компонентами более низких размерностей.

Предварительно рассмотрим несколько соображений общего характера. Далее будут изложены экспериментальные данные относительно формирования прототипов клеток в природных условиях.

Основными постулатами будем считать следующие.

1. Период «абиогенной молекулярной эволюции» обеспечил необходимыми органическими веществами процесс самоорганизации прото-клеток.
2. Начальные стадии предбиологической эволюции происходили в «первичном бульоне» в эстуариях древнего океана, ионный состав которого с тех пор существенно не изменился.
3. Дискретность живых организмов обусловлена требованиями эволюции и естественного отбора. В водной среде обособленность образований, содержащих водорастворимые ингредиенты, обеспечивается гидрофобными оболочками – мембранами.
4. Прото-клетка должна обладать определенным запасом свободной энергии для создания систем реагирования и регуляции нарождающегося метаболизма. В морской воде естественными претендентами на роль регуляторов (специфических, осмотических, электрических) являются неорганические ионы.
5. Классические схемы возникновения ионной несимметрии основаны на избирательной адсорбции некоторых ионов морской воды (например, K^+ или Ca^{2+}), их концентрировании ионообменниками – алюмосиликатами, кварцем или же коацерватами. Они неприемлемы, поскольку перераспределение ионов морской воды в данном случае завершается термодинамическим равновесием – нет запаса свободной энергии. «Предрасположенность» ряда адсорбентов к калию или кальцию существенна для процессов регуляции. «Игра» природы «на поле катионов» связана с преимущественно полианионной природой биомакромолекул.
6. Принципиальной характеристикой перераспределения неорганических ионов между первичными клетками и морской водой должно быть *приблизительное осмотическое равенство при отсутствии термодинамического равновесия*. Простейший вариант определен естественными причинами – *прото-клетка обогащается ионами, которых мало в морской воде, взамен тех, которых там много*. Концентрации активных осмотических частиц внутри и снаружи примерно равны, но вместе с ионной асимметрией в системе появляется запас свободной энергии.
7. В условиях неспецифического синтеза органических хиральных соединений образуется их рацемическая смесь, что заведомо не соответствует особенностям живых систем.

Должна ли была природа «ждать» биологической эволюции или могла «приступить» к фракционированию энантиомеров на предбиологической стадии?

Естественен вопрос: существует ли природная система, в которой возможно возникновение обособленных структур – везикул, образованных амфифильными поверхностно-активными веществами? При этом везикулы должны содержать электролит, инвертированный по ионному составу по отношению к морской воде, и смесь абиогенно возникших хиральных соединений с выраженным изменением соотношения исходных L- и D-компонентов в их смесях.

Когда же, где и в результате каких естественных процессов могла появиться жизнь на Земле?

Рассказывают, что ученики А.И. Опарина – классика, основателя коацерватной гипотезы происхождения жизни – на семинарах, кивая в сторону своего немолодого уже учителя, утверждали, что, «по свидетельству очевидцев, жизнь на Земле зародилась в эстуариях мирового океана». Действительно, имеется много подтверждений этой точки зрения, и мы ее придерживаемся. Далее будет приведено прозорливое высказывание А.И.Опарина, связанное с современными представлениями о фракционировании компонентов гетерогенных жидких смесей ионов и веществ в периодических полях (см. раздел «параметрический насос»).

По современным данным вода начала конденсироваться на поверхности Земли около 4 млрд лет назад. В это время образовывались и исчезали т.н. «дарвиновские лужи» – водоемы с горячей водой, насыщенной минеральными соединениями. Поверхность Земли подвергалась интенсивной бомбардировке метеоритами, которая завершилась около 3,8 млрд лет назад. Атмосфера имела восстановительный характер, свободного кислорода в ней практически не было. Интенсивность гроз была очень высокой, что создавало необходимые условия для абиогенного синтеза органических соединений. Кроме того, аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, порфирины, различные углеводороды и производные этих соединений, содержащие кислород, азот, серу, фосфор, в огромных количествах выбрасываются вулканами. Поэтому можно считать, что уже в самом начале геологической эволюции Земли разнообразных органических соединений на ней было достаточно для протекания химической эволюции, приведшей к появлению живых систем.

Все современные организмы построены на основе клеток – дискретных единиц живого. Поскольку клеточная мембрана есть у всех клеток, ее образование в ходе эволюции представляет собой необходимую стадию формирования предшественников клетки.

По палеонтологическим данным первые прокариоты, образовывавшие строматолиты – биогенные слоистые породы, представляющие

собой окаменевшие сообщества цианобактерий, – существовали уже 3,5 млрд лет назад. По данным изотопного анализа углерода первые автотрофы появились около 3,8 млрд лет назад.

Обычно считается, что для случайного образования клетки не хватило бы времени жизни Вселенной. Однако, по другим оценкам, прокариоты могли появиться из «первичного бульона» – растворов абиогенно синтезированных органических соединений – за времена, не превышающие 10 млн лет. В любом случае первые клеточные формы жизни сформировались из неклеточных форм за время не более 300 млн лет – очень короткий срок по геологическим меркам.

Мы упоминали о классических исследованиях А.И. Опарина, Дж.Б.С. Холдейна, Дж.Д. Бернала, С.Фокса и их последователей, посвященных моделям происхождения предшественников клеток, или протоклеток. В оригинальных работах этих и других авторов специально подчеркивается, что коацерваты Опарина, протеиноиды Фокса, маригранулы Эгами и т.д. в определенных условиях покрываются оболочкой, напоминающей клеточную мембрану. Однако существенно, что *все предложенные ранее модели протоклеток исходно строились как равновесные*. Живые системы – неравновесны [13].

Коацерватная теория происхождения предшественников клеток предполагала, что агрегаты абиогенно возникших органических молекул – коацерваты – способны избирательно адсорбировать неорганические ионы морской воды, например, калий. Это умозрительное предположение имеет вполне реальную основу: современные органические ионообменникатиониты способны с высокой селективностью связывать неорганические катионы. Вместе с тем и природные неорганические адсорбенты глины-алюмосиликаты обладают способностью избирательно связывать катионы. Однако процесс адсорбции ведет к насыщению, равновесию, а равновесные системы не способны к реагированию на внешние возмущения, в частности, на механические, температурные, химические, электрические, кроме как смещением к новому равновесию. Активный регуляторный ответ возможен исключительно в исходно неравновесной системе (в нынешних живых системах – это, к примеру, реакция возбудимых клеток, основанная на перераспределении ионов между цитоплазмой и внешней средой).

К приведенным рассуждениям примыкает соображение, высказанное Дж. Берналом, относительно преимущественного синтеза одного из энантиомеров хиральных молекул на поверхности оптически активных кристаллов, например, шпатов, кварца. Подобный энантиомер-селективный поверхностный катализ в принципе представить можно, однако его должна сменять энергоакцепторная стадия десорбции молекул. Таким

образом, опять встает вопрос о включении в процесс внешнего источника энергии, периодически подключающегося.

Хотя образование упомянутых структур происходит в неравновесных условиях, сами они представляют собой равновесные системы. Этим они коренным образом отличаются от живых клеток, которые находятся в состоянии устойчивого неравновесия, постоянного обмена веществом с окружающей средой. Скорее всего, предшественники клеток образовались в условиях, исходно обеспечивших их исходную неравновесность, которая затем закрепилась уже в ходе биологической эволюции.

Помимо обмена веществ, как мы уже говорили, неравновесность клеток характеризуется двумя важнейшими асимметриями. Речь идет о распределении ионов щелочных и щелочно-земельных металлов и «хиральной чистоте» биологических систем.

В цитоплазме живых клеток концентрация ионов калия выше концентрации ионов натрия в 10–30 раз, а в окружающей среде – морской воде или межклеточной жидкости – соотношение концентраций этих ионов обратное. Такое распределение ионов приводит к возникновению разности электрических потенциалов на мембране, или трансмембранного потенциала. На поддержание ионной асимметрии клетка тратит до одной трети своих энергетических запасов. Это означает, что такая асимметрия и соответствующий ей трансмембранный потенциал играют очень важную роль в жизни клетки. Действительно, постоянство химического состава внутренней среды клетки обеспечивает оптимальные условия для процессов метаболизма в ней в конкретных условиях.

По-видимому, ионная асимметрия между клеткой и средой уже на самых ранних стадиях добиологической эволюции обеспечивала существенное эволюционное преимущество протоклеткам, ею обладавшим. За счет ионной асимметрии создавался запас свободной энергии, необходимый для осуществления энергоемких внутриклеточных процессов, сопряженных процессов переноса веществ через мембраны. Кроме того, она могла играть и информационную, сигнальную роль, поскольку нарушение целостности мембраны протоклетки сразу обнаруживалось по возникавшим при этом ионным токам.

Ионы натрия и калия были выбраны природой для создания асимметричной ионной системы по той простой причине, что это самые распространенные ионы морской воды и поэтому их концентрации могут быть достаточно высокими, чтобы обеспечить необходимую мощность источника свободной энергии. Кроме того, перераспределение ионов натрия и калия между клеткой и средой не приводит к дополнительным осмотическим нагрузкам на мембрану при сохранении постоянной их суммарной концентрации.

4. Гипотетический сценарий происхождения предшественников клеток

«Когда некоторые причины вызывают некоторые следствия, то элементы симметрии причин должны обнаруживаться в вызванных ими следствиях. Когда определенные следствия проявляют определенную асимметрию, то эта асимметрия должна обнаруживаться в породивших их причинах».
Пьер Кюри (1894)

Прямые наблюдения показали, что холодная пленка на водной поверхности действительно существует. Она устойчива и при разрушении восстанавливается за доли секунды. Перепад температуры в ней на первый взгляд невелик – 0,5–3,0 К. Но если учесть, что этот перепад приходится на слой толщиной около 0,5 мм, то средний градиент температуры будет не менее $1000 \text{ К}\cdot\text{м}^{-1}$, а в самом верхнем слое он может быть значительно выше.

В тонком поверхностном слое концентрация солей выше, чем в воде на глубине, поскольку соли не испаряются вместе с водой. Разные ионы имеют разные коэффициенты диффузии, поэтому в неравновесном поверхностном слое океана соотношение их концентраций может отличаться от соотношения концентраций на глубине.

Неравномерность распределения ионов между поверхностным и глубинным (более 0,5 м) слоями характеризуют коэффициентом фракционирования: $\alpha_f = \frac{[K_s] \cdot [Na_b]}{[Na_s] \cdot [K_b]}$, где $[K]_s$, $[Na]_s$ – молярные концентрации ионов калия и натрия в поверхностном слое морской воды, $[K]_b$, $[Na]_b$ – молярные концентрации ионов калия и натрия в объемной фазе морской воды. Такой же коэффициент фракционирования можно использовать для описания асимметрии распределения ионов между клеткой и окружающей средой, но тогда индексы s и b относятся к внутри- и внеклеточной средам соответственно. Для большинства клеток коэффициент разделения ионов калия и натрия равен 50–100.

Мы исследовали состав поверхностной пленки в Белом, Черном, Каспийском и Японском морях [14, 15]. По понятным причинам, там, где влажность близка к абсолютной и испарение минимально (это Белое море, университетская биостанция на Полярном круге), холодная пленка практически отсутствует и фракционирование ионов незначительно. Противоположная ситуация отмечена на Каспийском море: температура высока,

воздух сух, испарение воды значительно, холодная пленка контрастна, фракционирование максимально.

Инвертированность ионного состава холодной пленки наиболее ярко проявляется при образовании «пленочных» микробрызг, возникающих при разрыве пузырей воздуха, поднимающихся на поверхность морской воды (рис. 3). Более тяжелые «реактивные» капли, как правило, падают обратно. Поведение пленочных микробрызг, обогащенных калием и кальцием и имеющих размеры, сравнимые с клеточными (примерно 10 мкм), более сложно. Частично с их участием формируются облака.

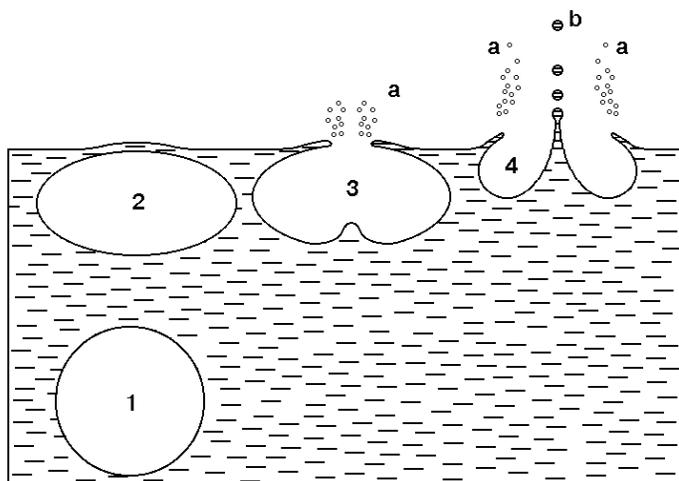


Рис. 3. Механизм образования аэрозоля при барботировании поверхности раствора. Последовательные стадии разрушения пузырька на поверхности отмечены цифрами от 1 до 4; а – пленочные капли, б – реактивные капли

В таблице 2 приведены коэффициенты фракционирования в поверхностных слоях различных морей в естественных условиях. Легко видеть, что его величина прямо связана со степенью неравновесности системы: при высокой влажности холодная пленка практически отсутствует (Белое море) и фракционирование незначительно, при сухом воздухе (Каспийское море) испарение интенсивно и фракционирование максимально.

Воспроизведение наблюдений в лабораторных условиях показало, что неравновесное распределение ионов в тонком поверхностном слое раствора сопровождается возникновением в нем разности электрических

потенциалов около 5 мВ. Существенно, что в отсутствие испарения ни фракционирования ионов, ни разности потенциалов не возникало.

Таблица 2. Коэффициент фракционирования (α_f) ионов калия и натрия в поверхностном слое толщиной 0,05 мм в разных морях

Море	α_f
Белое море	2,5
Черное море	7,0
Каспийское море	9,8
Японское море	2,4

Обнаруженные эффекты фракционирования ионов не могут быть объяснены только на уровне простых моделей термодиффузии. Хотя известно, что более тяжелые частицы концентрируются в холодной зоне температурного градиента (дегидратированные ионы калия и кальция имеют более высокую атомную массу по сравнению с натрием и магнием), термодиффузионная модель недостаточна для описания высокой степени фракционирования ионов, наблюдаемой в эксперименте. Математическое моделирование процессов на границе раздела электролит-воздух с учетом разных типов конвекции при тепломассообмене между фазами остается сложной и на настоящий момент окончательно не решенной задачей.

Особенностью полученных нами результатов является то, что полученные в экспериментах значения коэффициентов фракционирования значительно превосходят все теоретические предсказания. Равновесные и линейные неравновесные модели с учетом поверхностной адсорбции и термодиффузии ионов дают его значения на порядок меньшие наблюдаемых. По-видимому, требуется учет нелинейных эффектов, в частности конвективных потоков [16, 17].

Около 50 лет назад Р.Дж. Голдэйкр обратил внимание на то, что частицы морских аэрозолей, образующихся при разрушении волн, лопах воздушных пузырьков у поверхности воды и т.п., имеют размеры клеток, и предположил, что они могли играть какую-то роль в процессах предбиологической эволюции. Однако имевшихся тогда данных было недостаточно, чтобы это предположение обосновать [18].

Эксперименты показали, что солевой состав пленочных капель соответствует солевому составу тонкого поверхностного слоя океана в том месте, где они образовались. Это означает, что аэрозоль содержит относи-

тельно больше ионов калия, чем морская вода, и меньше натрия (облака с наибольшим содержанием калия формируются над Красным морем).

Размеры этих капель – от 1 до 10 мкм – вполне соответствуют ожидаемым размерам предшественников клетки. Подхваченные воздушными потоками пленочные капли могут находиться в атмосфере до трех лет и за это время побывать в разных климатических зонах – от полярных до экваториальных.

Амфифильные соединения, к которым относятся и фосфолипиды, обладают поверхностной активностью, т.е. концентрируются на границе раздела океан-атмосфера. Это приводит к тому, что и поверхность аэрозольных капель оказывается покрытой монослоем амфифила. По мере испарения воды монослой конденсируется, становится плотным и затрудняет дальнейшее усыхание капли. Длительное путешествие аэрозольной капли в верхних слоях атмосферы создает благоприятные условия для синтеза некоторых органических соединений, в частности, жирных кислот.

При падении аэрозольной частицы обратно на поверхность воды она формирует второй слой молекул амфифила, например, фосфолипида, и оказывается покрытой уже бислойной мембраной. Поскольку молекулы второго слоя обращены наружу своими полярными участками, такая везикула легко погружается в воду. Отдельные стадии описанного процесса показаны на рис. 4.

Таким образом, существует естественный процесс, который приводит к формированию относительно стабильных везикул, покрытых бислойной (липидной) мембраной, имеющих клеточные размеры и солевой состав, инвертированный по одновалентным катионам по отношению к морской воде. Одно это выдвигает такие везикулы в число кандидатов на роль предшественников клеток.

Но оказалось, что неравновесный поверхностный слой водного раствора обладает еще одним удивительным свойством, экспериментально обнаруженным в лабораторных условиях: аэрозольные капли, полученные из растворов рацемических смесей аминокислот, были обогащены L-энантиомером соответствующей аминокислоты по сравнению с ее D-энантиомером. Преобладание одного из энантиомеров в смеси характери-

зуют коэффициентом хиральной асимметрии $\eta = \frac{[L] - [D]}{[L] + [D]}$ (в квадратных

скобках – концентрации соответствующих энантиомеров). В экспериментах с растворами валина, лейцина и глутамина были получены значения η в диапазоне от 0 до 0,05, причем фракционирование энантиомеров зависело от степени неравновесности поверхностного слоя и исчезало в равновесных условиях. Эти данные были подтверждены с помощью ЯМР.

3. Проблемы регуляции в живых и предбиологических системах

В последнее время был разработан новый метод определения фракционирования энантиомеров хиральных соединений, основанный на особенностях отражения мощного лазерного излучения (т.н. генерация второй оптической гармоники) от поверхности раствора. Эксперименты с использованием этого метода также подтверждают наличие фракционирования энантиомеров аминокислот и сахаров на неравновесной границе раздела раствор–воздух.

Что касается механизмов фракционирования энантиомеров аминокислот, то самые общие соображения о разделении хиральных молекул в комбинированных гравитационных, магнитных, электрических полях в сочетании с конвекцией приведены в работах В.А.Аветисова, В.И.Гольданского и В.В.Кузьмина [3, 4]. Ниже приведена таблица 3, заимствованная из этой публикации. Сами авторы придерживаются точки зрения, согласно которой дискриминация энантиомеров в рацемате аминокислот связана с неодинаковой кинетикой образования гомохиральных и гетерохиральных полипептидных цепей, а инициация «преимущества» для одного из энантиомеров вызвана какой-либо флуктуацией.

Таблица 3. Физические факторы фракционирования хиральных соединений

Типы факторов	Возможный эффект	Условный кинетический фактор
Статическое магнитное поле	Нет	
Статическое электрическое поле	Нет	
Гравитационное поле	Нет	
Постоянное электрическое + постоянное магнитное поле	Нет	
Вращение + гравитационное поле	Нет	
Постоянное магнитное + гравитационное поле	Нет	
Циркулярно поляризованный свет	Да	$10^{-4} - 10^{-2}$
Вращение + постоянное магнитное + постоянное электрическое поле	Да	$\leq 10^{-4}$
Вращение + постоянное магнитное + гравитационное поле	Да	$\leq 10^{-4}$
Постоянное магнитное поле + линейно поляризованный свет	Да	$\leq 10^{-4}$
Глобальные физические факторы на уровне внутриядерных взаимодействий и элементарных частиц		$10^{-9} - 10^{-17}$

(*Avetisov V.A., Goldanski V.I., Kuz'min V.V. Handedness, origin of life and evolution. // Physics Today. – 1991, July, p. 33–41).*

Для разделения смеси энантиомеров достаточно воздействия некоторых физических факторов, например циркулярно поляризованного света, или комбинации конвекции с постоянным магнитным полем плюс постоянное электрическое или гравитационное поле. Возможны комбинации постоянного магнитного поля и линейно поляризованного света и т.п. Поскольку наши эксперименты проводились в темноте, действие света можно не учитывать. Однако постоянное электрическое поле на границе раздела фаз всегда существует, как и постоянное магнитное поле. При испарении воды возникают конвекционные потоки – «вращение». Таким образом, необходимый набор дифференцирующих хиральные молекулы факторов на границе океан–атмосфера имеется.

Напомним, что в эксперименте, в равновесных условиях, когда не происходит испарения воды, холодная пленка не формируется и фракционирования ионов и энантиомеров не происходит.

Обнаруженное фракционирование энантиомеров невелико, но его вполне достаточно для реализации эволюционного преимущества гомохиральности определенного типа при образовании полипептидов и полинуклеотидов. Фактором отбора энантиомеров в поверхностном слое может быть влияние собственного электрического поля тонкого поверхностного слоя в совокупности с геомагнитным полем Земли на формирование ассоциатов молекул аминокислот.

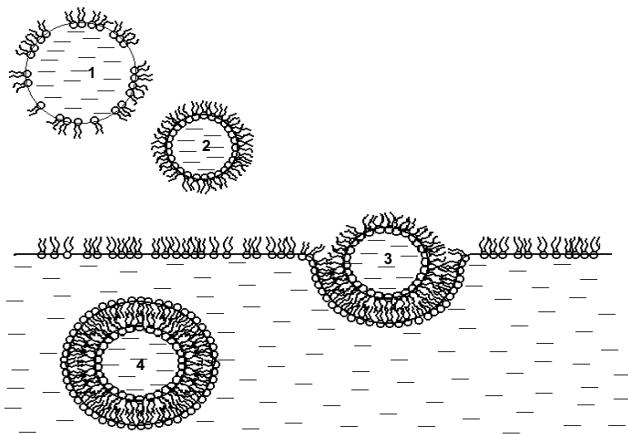


Рис. 4. Стадии образования бислоевой липидной везикулы при падении капли аэрозоля на поверхность океана: 1– капля аэрозоля, покрытая разреженным монослоем амфифила; 2 – конденсация монослоя амфифила при испарении капли; 3 – «одевание» капли вторым монослоем при падении на поверхность океана; 4 – сформировавшаяся везикула

Таким образом, нами установлено, что, когда на поверхности раствора находится разреженный монослой фосфолипидов, при разрыве на ней пузырьков воздуха образуются липидные везикулы, захватывающие раствор из поверхностного слоя, обогащенный ионами калия и кальция и L-аминокислотами (рис. 4). Подобные образования могут рассматриваться как прототипы клеток, способные служить объектами отбора в процессе биологической эволюции. Эта идея неоднократно обсуждалась в литературе, однако вне связи с ионной и хиральной асимметрией.

Отметим еще один замечательный факт, касающийся сопряженности возникновения ионной и хиральной асимметрий в пенах, образуемых поверхностно-активными веществами (ПАВ). Молекулы ПАВ адсорбируются на поверхности раствора, образуя монослой. При барботировании такого раствора на его поверхности образуется пена, захватывающая тонкие поверхностные слои (ТПС) разделов фаз раствор–воздух, находящиеся на свободной поверхности раствора и на поверхности газового пузырька [19]. Поскольку монослой ПАВ на поверхности раствора неплотный, скорость испарения воды в его присутствии изменяется незначительно [3] и можно было ожидать, что в пенах также будет наблюдаться фракционирование ионов и стереоизомеров аминокислот.

Это предположение было проверено нами экспериментально. Через раствор рацемата лейцина, находящийся в термостатированной ячейке и содержащий ионы натрия или калия и в качестве ПАВ Triton X-100, пропускали воздух. Образующуюся пену собирали, осаждали и с помощью поляриметра определяли оптическую активность полученного раствора.

Удельные оптические активности растворов L- и D-изомеров одинаковы по модулю, но противоположны по знаку, поэтому рацемический раствор не вращает плоскость поляризации света. В условиях, близких к равновесным (при разности температур между объемной фазой и воздухом 0,3 °C), перераспределения энантиомеров аминокислоты между объемной фазой и поверхностным слоем не обнаружено. Однако при разности температур 8,8 °C хиральная поляризация $\eta = \frac{C_L - C_D}{C_L + C_D}$, где C_L и C_D – концентрации L- и D-лейцина, соответственно составила 0,12±0,03 в присутствии ионов калия и 0,06±0,01 в присутствии ионов натрия.

Таким образом, обнаружена прямая зависимость хиральной поляризации от содержания ионов калия или натрия. Невольно вспоминаются жидкие калиевые мыла и твердые натриевые.

Качественно полученный результат можно объяснить следующим образом. В равновесных условиях хиральная поляризация всегда отсутствует. В неравновесных системах возможны ситуации, когда за счет кинетических ограничений возникают стационарные состояния с ненулевой хиральной поляризацией.

Формирование различных биологически важных молекул абиогенным путем иногда требует взаимно исключаящих условий. Однако все эти условия вполне могли существовать в разных местах на Земле.

5. Параметрическое разделение многокомпонентных жидких смесей в гетерогенных системах при периодических внешних воздействиях

«При этом стали подвергаться постоянным, в ряде случаев ритмически повторяющимся изменениям как внутренняя структура составляющих мембраны макромолекул, так и способ их агрегирования между собой. Это могло создать известный ритм поглощения веществ из внешней среды поверхностью живого тела и их передачи внутрь этого тела».

А. И. Опарин

Есть основания полагать, что колебательные и, возможно, автоволновые процессы, свойственные вообще открытым системам и большинству биологических систем на различных уровнях организации, участвуют в процессах параметрического фракционирования ионов и хиральных молекул на неравновесной границе океан – атмосфера.

Краткое изложение принципа параметрического разделения в модельных, природных геологических и биологических системах состоит в следующем [20]. Работа параметрического насоса основана на взаимодействии двух синхронных периодических полей с гетерогенной системой, содержащей твердую и жидкую фазы, и смесь веществ, распределенных между ними. Одно периодическое поле (например, температура) является параметром, определяющим периодическое перераспределение компонентов смеси между фазами. Другое, синхронное с ним, периодическое поле (например, поле механических сил, поверхностное натяжение, электрическое поле) смещает одну фазу (или ее компоненты) относительно другой в прямом и обратном направлениях. В результате циклической работы параметрического насоса возникают встречные потоки разделяемых компонентов против градиентов их химических или электрохимических потенциалов.

Авторами осуществлено экспериментальное разделение ионов калия и натрия с помощью ионообменной колонки, температура которой периодически изменялась, а раствор синхронно возвратно-поступательно смещался специальной помпой. Сходные результаты были получены на

ионообменной мембране при смещении ионов переменным электрическим полем. В той же статье изложена теория фракционирования.

Конвективные процессы на неравновесных границах раствор–воздух вполне отвечают критериям параметрического фракционирования [21]. Природные циклические процессы в поверхностных градиентах температур, рН, ионной силы или же пульсирующие градиенты способны существенно усиливать процессы фракционирования ионов или изомеров органических соединений на границах раздела вода–воздух. Отсюда следует, что параметрическое разделение смесей могло быть важным не только для первичных этапов биопоза, но и сейчас является важнейшим экологическим фактором.

6. Молекулярные основы сопряжения ионной и хиральной асимметрий в ион-транспортных системах мембран

*«Кто неправильно застегнул первую пуговицу,
уже не застегнется как следует».
Иоганн Вольфганг Гёте*

Хиральная асимметрия непосредственным образом связана с ионной асимметрией клеток. Данная связь опосредована через белковые (полипептидные) ион-транспортующие системы, в частности ионные каналы мембран. Ион-специфичные каналы обладают уникальной пространственной конфигурацией, обеспечивающей избирательную проницаемость. Что касается ионных насосов, то детальные их структуры пока неизвестны.

Все неравновесные системы стремятся к равновесию и увеличению энтропии. Живые организмы как неравновесные системы стремятся к балансу L/D энантиомеров. В процессе старения наблюдается увеличение содержания D-аминокислот в различных тканях организма человека и животных. Относительно других соединений надежных данных нет.

Выяснение механизмов возрастной рацемизации аминокислот стало в последние годы одним из важных направлений молекулярной геронтологии [22]. Установлено, что в тканях с медленным обменом белков с возрастом и при ряде заболеваний заметно (в разы) увеличивается содержание D-аминокислотных остатков (в первую очередь – аспартата и в определенной степени серина). Это касается костной ткани (зубов млекопитающих), роговицы глаз и хрусталика, особенно при развитии катаракты. Наряду с этим, спонтанная рацемизация аминокислот отмечена в амилоидных белках клеток мозга (в частности, при болезнях Альцгеймера и

Паркинсона), в миелине, в клетках легких, в эритроцитах, в эластинах соединительной ткани и эпителиальных клеток под действием ультрафиолетового облучения, а также в клетках артериальных сосудов при развитии атеросклероза.

Известны патологии, связанные с нарушениями работы ионных каналов, хотя данных о хиральных нарушениях в каналах на нынешний момент не имеется. Избирательность каналов заведомо связана с их аминокислотной гомохиральностью. Можно ожидать, что замена L-аминокислот на одноименные D-аминокислоты канала приведет к изменению его пространственной конфигурации и, как следствие, к потере его ионной селективности. Тем более что аспарагиновая кислота, аспарат в каналах присутствуют. Нами было выполнено теоретическое сравнение ионной избирательности природной L-формы потенциал-независимого калиевого канала KcsA (L-KcsA) и его гипотетического LD двойника, в котором половина L-аминокислот была заменена на D-энантимеры (LD – KcsA).

Структура калиевых каналов KcsA из *Streptomyces lividans* изучена с помощью рентгеновской кристаллографии с разрешением 3,2 Å [23]. Канал KcsA является тетрамером. На рис. 5 представлен поперечный срез канала, демонстрирующий две из четырех его субъединиц. Рядом с N-концом каждой субъединицы имеется наружная спираль, которая пронизывает мембрану от цитоплазматической стороны до наружной поверхности. За наружной спиралью следует короткая спираль, направленная в пору. Затем располагается внутренняя спираль, которая возвращается к цитоплазматической стороне. В каждой субъединице петля между центральным концом короткой спирали и внутренней спиралью формирует структуру ионной поры. Четыре такие петли, объединяясь, образуют узкий проход, ответственный за ионную избирательность канала – селективный фильтр (I). Относительно большая центральная полость (II) и нижняя внутренняя пора (III) соединяют селективный фильтр с цитоплазмой.

Избирательность для калия обеспечивается размерами и молекулярным строением селективного фильтра. Диаметр фильтра составляет около 3 Å, и известные аминокислоты в его стенке ориентированы таким образом, что последовательные кольца, образованные четырьмя карбонильными группами (по одной от каждой субъединицы), обращены внутрь поры. Диаметр поры достаточен для прохождения дегидратированного иона калия (диаметр около 2,7 Å). Следует заметить, что дегидратация проникающего иона могла потребовать значительной энергии. Однако этот фактор минимизируется за счет пересольватирования: кислороды стенки канала заменяют атомы кислорода воды в гидратной оболочке иона. Ионы меньшего размера, такие как натрий (диаметр 1,9 Å) или литий (диаметр 1,2 Å), не способны проникнуть через калиевый канал, поскольку они не смогут сформировать достаточно плотный контакт одновремен-

но со всеми четырьмя кислородами, поэтому они остаются частично гидратированными. Ионы большего размера, такие как цезий (диаметр 3,3 Å), не могут проникнуть через пору из-за своих размеров. Эти структурные основы ионной избирательности вполне согласуются с традиционными воззрениями на ионную проницаемость каналов [24, 25].

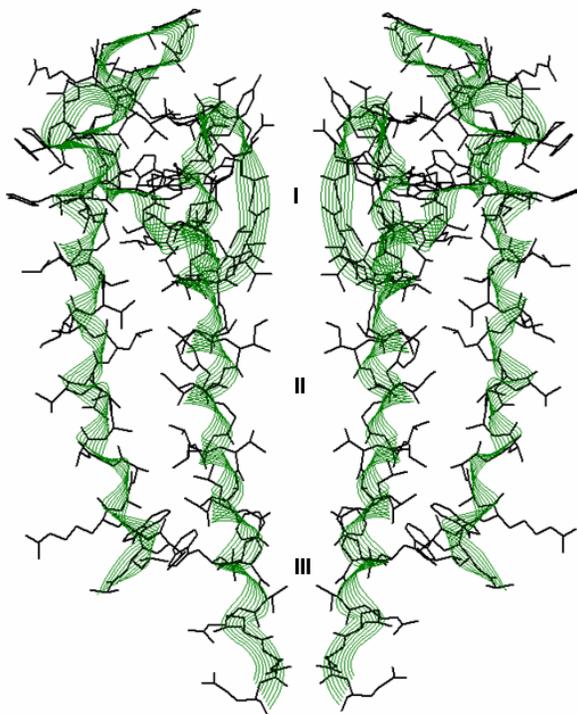


Рис. 5. Поперечный срез калиевого канала KcsA. Представлены две из четырех субъединиц: I – селективный фильтр, II – центральная полость, III – пора, соединяющая канал с цитоплазмой

Универсальный подход к объяснению ионной избирательности основан на сравнительном анализе профилей потенциальной энергии Li^+ , Na^+ , K^+ в поре канала L-KcsA [25, 26]. Очевидно, что в рамках такого подхода объяснить калиевую избирательность канала можно наличием более глубокой потенциальной ямы в области селективного фильтра для ионов K^+ , чем для ионов Li^+ , Na^+ , или же совпадением значения энергии дегидратации и глубины потенциальной ямы иона K^+ .

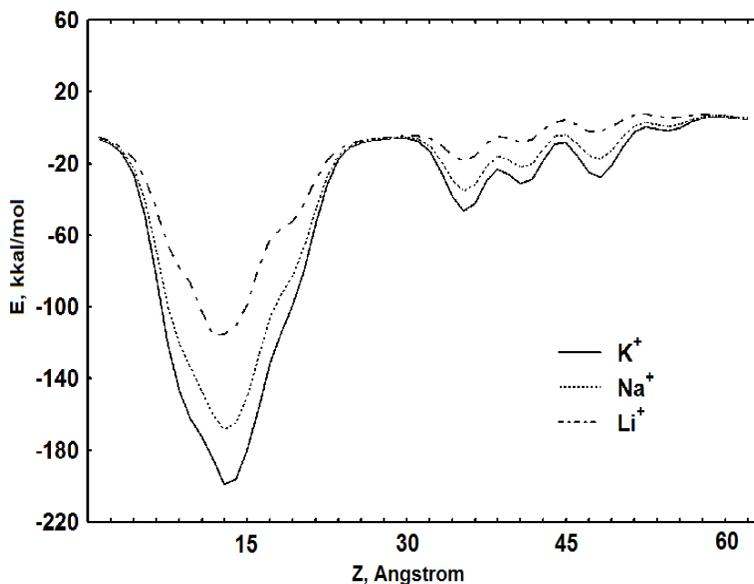


Рис. 6. Зависимость результирующей энергии ионов от координаты оси канала L-KcsA, (в условных энергетических единицах)

Нами был предложен метод расчета энергетических профилей ионов в мембранных каналах, основанный на разделении и независимом расчете энергий дальних и ближних взаимодействий, который, в отличие от методов силовых полей, позволяет получать адекватные распределения энергии ионов. Используя данный метод, мы провели расчеты дальних взаимодействий одним из методов силового поля, специально параметризованным для моделирования структуры биополимеров, а ближних взаимодействий – одним из квантово-химических методов, пригодным для исследования белков. Был использован метод Хоффмана в параметризации Вольфсберга–Гельмгольца. При этом разделение дальних и ближних взаимодействий возможно, если расстояние от иона до атомов канала составляет около 5 \AA , что подтверждается сравнением функций энергии взаимодействия в системе ион – аминокислота, рассчитанных методом силового поля и методом квантовой химии.

Результаты сравнительного анализа рассчитанных энергетических профилей ионов в природных гомохиральных и виртуальных гетерохиральных каналах позволили количественно объяснить их ионную избира-

тельность. При этом проникновение иона в канал количественно объясняется равенством глубины потенциальной ямы и энергии дегидратации соответствующего иона.

Сравнительный анализ профилей энергии $E = E(Z)$, где Z – координата вдоль оси канала, позволяет объяснить калиевую избирательность канала (рис. 6). Минимум потенциальной энергии иона калия в области селективного фильтра с учетом эффективной константы диэлектрической проницаемости среды, характеризующей область селективного фильтра и принимающей значение 2,5, составляет -79 ккал/моль. Эта величина соответствует экспериментальной энергии дегидратации данного иона (таблица 4). Там же приведены энергии дегидратации величины глубины потенциальных ям в фильтре для ионов лития и натрия, для которых необходимое условие прохождения в канал уже не выполняется – канал для них непроницаем.

Таблица 4. Энергии (ккал/моль) дегидратации и глубины потенциальных ям ионов в каналах L-KcsA и LD-KcsA

Канал	L-KcsA			LD-KcsA		
	Li ⁺	Na ⁺	K ⁺	Li ⁺	Na ⁺	K ⁺
Энергия дегидратации	121	97	79	121	97	79
Глубина потенциальной ямы	48	64	79	24	44	56

Из той же таблицы 4 видно, что для гетерохирального канала LD-KcsA глубины потенциальных ям для всех ионов меньше, чем соответствующие энергии дегидратации, поэтому данный канал не способен пропускать ни одного из этих трех катионов. Таким образом, можно считать, что изомеризация природных мембранных каналов с последующей их энергетической оптимизацией приводит к существенному нарушению их природной четвертичной структуры. При этом в неприродных LD-изомерах мембранных каналов нарушается присущее природным каналам свойство ионной избирательности. Как следствие, это может приводить к нарушению биологических функций, обусловленных их ионной избирательностью.

6. Хиральная безопасность биосферы как биогеофизическая проблема

«Пришло время научиться рассматривать развитие общества ... в единстве процессов развития Природы и Человека – того, что является фундаментом нашей жизни».

Н. Н. Моисеев

Биосфера со свойственной ей хиральной асимметрией, закрепившейся в ходе биологической эволюции на уровне L-аминокислот и D-сахаров, фосфолипидов, а также некоторых биологически активных веществ биогенного происхождения, сталкивается с мощным потоком хиральных соединений, формируемым нефтяной, оптической, химической, перерабатывающей, фармацевтической, агрохимической, пищевой промышленностью и т.д. [28, 29].

Из десятков тысяч синтезируемых в мире органических соединений менее 30% соединений, используемых в фармацевтической промышленности, около 25% веществ, используемых в агрохимической промышленности (многие бициды созданы на основе хиральных нейропептидов, полусинтетических соединений стереоизомера традиционного пестицида), можно считать гомохиральными. Положительное или отрицательное действие лекарственных веществ, инсектицидов, органолептических проявлений принципиальным образом связано с их хиральной чистотой. В противном случае эффект их воздействия может быть губительным для живых организмов. Как правило, лекарства имеют положительный эффект в «левой» форме, что связано со стереоспецифической организацией клеточных рецепторов, транспортных систем, комплементарностью взаимодействия белков и нуклеиновых кислот с лигандами. Вместе с тем восприимчивость организмов к L-изомерам заведомо не является исключительно положительным свойством, т.к. и L-изомеры могут вызывать нежелательные эффекты. В качестве примера можно привести историю использования препарата *талидамид*, его L-изомер обладал положительным действием, а «правый» – выраженным тератогенным эффектом. Примеров такого рода имеется множество: антиопухольный препарат *сарколизин* активен лишь в «левой» форме, антикоагулянт *варфарин* и ряд противоспалительных средств замедляют метаболические процессы только в L-форме, *инсулин*, *допамин*, многие синтетические гормоны также должны быть хирально чистыми «левыми» изомерами. Существенным представляется учет эффективного влияния «сверхмалых доз» хиральных соединений на биологические системы.

Масштаб опасности «хирального загрязнения» переоценить трудно. Изомерные соединения могут вызывать мутации у растений, у сельскохозяйственных животных, у «полезных» насекомых и у вредителей, стимулировать рост заболеваемости в различных регионах, не только в зонах эмиссии. В составе аэрозолей хиральные поллютанты переносятся барическими водными и ветровыми потоками из зон эмиссии на расстояния межконтинентального масштаба.

На сегодняшний день не существует системы хирального биосферного мониторинга и регламентирующих норм ПДК, однако можно с уверенностью прогнозировать, что в ближайшие десятилетия опасность «хиральных загрязнений» приобретет глобальный характер.

Заключение

«Все мы родились из земли и воды».
Ксенофан Колофонский
(ок. 570 – 480 гг. до н.э.)

Суммируя некоторые положения развиваемой авторами гипотезы относительно роли сопряженного возникновения ионной и хиральной асимметрий в происхождении предшественников живых клеток, отметим:

1. Перераспределение ионов и энантиомеров хиральных соединений между объемной фазой и неравновесным тонким поверхностным слоем морской воды соответствует характерным для живых систем ионной и хиральной асимметриям и фиксируется при образовании аэрозоля. Ионная и хиральная асимметрии между тонким поверхностным слоем и объемной фазой раствора сформировались не независимо. Обогащение неравновесного тонкого поверхностного слоя раствора ионами калия способствовало увеличению его хиральной поляризации (в т.ч. в пенах). Периодические процессы в гетерогенных системах приводили к параметрическому разделению ионов и органических молекул.

2. Формирование замкнутых липидных везикул из аэрозольных капель могло привести к возникновению предшественников клеток. Будучи достаточно стабильными, они включали в себя абиогенно образовавшиеся биологически важные молекулы и их комплексы, которые могли эволюционировать до тех пор независимо. Предшественники клетки могли обеспечивать захваченным биомолекулярным комплексам хирально чистую среду с подходящим ионным составом, что могло давать таким комплексам существенное эволюционное преимущество.

3. В живых клетках избирательность ион-транспортных систем обеспечивается гомохиральностью аминокислотных остатков белков.

4. Вырабатывается новый аспект в проблеме экологической безопасности биосферы, учитывающий сопряженное перераспределение ионов и энантиомеров неприродных хиральных соединений в неравновесных природных гетерогенных системах.

5. Появляется новый вопрос в области молекулярной геронтологии: в какой мере «возрастная рацемизация» хиральных соединений в организмах сопряжена с нарушениями ионного гомеостаза клеток.

P.S. И теперь – относительно двух широко известных и очень давних гипотез о происхождении Жизни. В них можно увидеть определенные аналогии с обсуждавшимися нами гипотезами и их взаимодополняемость.

Одна библейская – Бог создал человека из глины. Мы говорили ранее относительно адсорбентов – глиноалюмосиликатов, являющихся ионообменниками с повышенным сродством к калию. При адсорбционном насыщении система равновесна. По этой причине библейская гипотеза представляется вполне приемлемой, хотя формально ограничивается термодинамически равновесным случаем. Однако они же, глины, могли быть катализаторами простых органических реакций. На этой стадии предбиологической эволюции могло начаться «привыкание» первичного метаболизма к калиевой среде. Как только мы переходим от равновесной адсорбции к катализу, то в этом аспекте система может рассматриваться только как неравновесная.

Другая гипотеза – эллинская – об Афродите, которая вышла из пены морской. Собственно, этот случай мы и рассматривали, когда говорили о поверхностно-активных веществах, брызгах, пенах и везикулах. Поэтому древнегреческая гипотеза представляется вполне адекватной рассматриваемой проблеме и действительно отражает термодинамически неравновесный случай. Эта гипотеза не отрицает первую, но в нашем рассмотрении дополняет ее.

Настоящая работа выполнена при частичной поддержке Грантов РФФИ №05-05-64655, №05-05-64974, №05-05-64165.

Литература

1. Гутина В.Н., Кузьмин В.В. Теория молекулярной диссимметрии Л.Пастера. // М.: Наука, 1990, 215 с.
2. Noriko Fujii, Takeshi Saito. Homochirality and Life. // The Chemical Record, Vol. 4, 2004, pp. 267–278.
3. Goldanskii V.I., Kuz'min V.V. Chirality and cold origin of life. // Nature. 1991, v. 352, p.114

4. Аветисов В.А., Гольданский В.И. Физические аспекты нарушения зеркальной симметрии биоорганического мира. // Успехи физич. наук. 1996, т. 166, №8, с. 873–891.
5. Чернавский Д.С. Проблемы происхождения жизни и мышления с точки зрения современной физики. // УФН. 2000, т. 170, №2, с. 157–183.
6. Small D.M. The physical chemistry of lipids: from alkanes to phospholipids. // In: Handbook of lipid research. Ed.: D.J. Hanahan. 1986, New York, London: Plenum Press, 672 p.
7. Опарин А.И. The Origin of Life on the Earth. // Academic Press, Inc., New York, 1957. А.И.Опарин. Жизнь как форма движения материи. //М.: Изд. АН СССР, 1963, 48 с.
8. Haldane J.B.S. In: The Origins of Prebiological Systems. // N.Y.: Academic Press, 1965 (Rationalist Ann., 1929, v. 3).
9. Кенъон Д., Стейнман Г. Биохимическое предопределение. // М.: «Мир», 1972, 336 с.
10. Bernal J.D., The Origin of Life. // London: Weidenfeld and Nicolson, 1967, 345 pp.
11. Rutten M.G., The Origin of Life (by natural causes). // Amsterdam, London, New York: Elsevier, 1971.
12. Шноль С.Э. Физико-химические факторы биологической эволюции. // М.: «Наука», 1979, 262 с.
13. Блюменфельд Л.А. Проблемы биологической физики. Изд. 2-е. // М.: Гл. ред. физ.-мат. лит.изд-ва «Наука», 1977, 336 с.
14. Яковенко Л.В., Твердислов В.А. Поверхность Мирового океана и физические механизмы предбиологической эволюции. // Биофизика. 2003, т.48, №6, с.1137–1146.
15. Твердислов В.А., Яковенко Л.В. Активные среды, автоволны и самоорганизация. От физико-химических систем к биологическим и социальным системам. // Российский химический журнал. (Журнал российского химического общества им. Д.И.Менделеева), 2000, т. 44, вып. 3, с. 21–32.
16. Яковенко Л.В., Кожевников А.А., Твердислов В.А., Салов Д.В. Численное моделирование распределения температуры и концентраций ионов с учетом конвекции в тонком поверхностном слое раствора. // В сб.: Нелинейные явления в открытых системах. М.: РАН, Государственный институт физико-технических проблем, 1997, с. 109–120.
17. Рабинович Г.Д., Гуревич Р.Я., Боброва Г.И. Термодиффузионное разделение жидких смесей. Минск: «Наука и техника», 1971, 244с.

18. Dobson C.M., Ellison G.B., Tuck A.F., Vaida V. Atmospheric aerosols as prebiotic chemical reactors. // Proc. Nat. Acad. Sci. 2000, v. 97, p. 11864–11868.
19. Канн К.Б. Капиллярная гидродинамика пен. // Новосибирск: «Наука» (Сиб. отд.), 1989, 167 с.
20. Яковенко Л.В., Салов Д.В., Твердислов В.А. Принцип параметрического разделения компонентов жидких смесей в периодических полях. // В сб.: Нелинейные явления в открытых системах, с. 59–66. М.: Гос. ИФТП, 1995.
21. Смирнов А.Н., Лапшин В.Б., Балышев А.В., Лебедев И.М., Гончарук В.В., Сыроешкин А.В. Структура воды: гигантские гетерофазные кластеры воды. // Химия и технология воды. 2005, т. 37, №2, с. 111–137.
22. Noriko Fujii. D-Amino Acid in Elderly Tissues. // Biol. Pharm. Bull. 2005, v. 28, No. 9, p. 1585–1589.
23. Doyle D.A., Morais C.J., Pfuetzer R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity // Science. 1998, v. 280, p. 69–77.
24. Laio A., Torre V. Physical Origin of Selectivity in Ionic Channels of Biological Membrane // Biophys. J. 1999, v. 76, p. 129–148.
25. Eisenberg R.S. Channels as Enzymes. // J. Memb. Biol. 1990, v. 115, p. 1–12.
26. Дмитриев А.В., Твердислов В.А. Сравнительный анализ методов расчета потенциала ионных каналов // Биофизика. 2004, т. 49, с. 506–510.
27. Дмитриев А.В., Барышников В.Г., Марков И.В., Твердислов В.А. Об использовании приближенных силовых полей для расчета распределения электростатического потенциала мембранных каналов // Журнал структурной химии. 2005, т. 45, №5, с. 624–628.
28. Твердислов В.А., Сидорова В.В. Хиральная безопасность биосферы как биофизическая проблема. // Биофизика. 2004, т. 49, №3, с. 529–538.
29. Твердислов В.А., Сидорова В.В., Яковенко Л.В. Хиральная асимметрия биомолекул и экологическая безопасность. // Технологии живых систем. 2005, т. 2, №1-2, с. 69–74.