

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФАЦИЙ* АЛЬБУМИНА

М.Э. Бузоверя¹, Ю.П. Щербак¹, И.В. Шишпор¹, С.Н. Шатохина², В.В. Шабалин³

¹Саровский физико-технический институт – филиал Национального исследовательского ядерного университета “МИФИ”, Саров

²Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского “МОНИКИ”, Москва

³Государственный архитектурно-строительный университет “СПбГАСУ”, Санкт-Петербург

На примере анализа микроструктуры сывороточного альбумина продемонстрирован подход к интерпретации структур фаций биожидкостей. Наблюдаемые морфологические особенности фаций рассмотрены с точки зрения структурной модели блок-сополимерных систем. Выявлена зависимость морфологии центральной части фаций сывороточного альбумина от концентрации, при этом выделены три области концентраций белка, принципиально отличающиеся морфологическими признаками: от 0,2 до 0,6 %; от 2,0 до 4,0 %; от 5,0 до 9,5 %.

Ключевые слова: сывороточный альбумин, фация, морфологические особенности, структурообразование биологических жидкостей, надмолекулярная структура

Введение

Многообразие процессов, протекающих в высыхающих каплях биожидкостей, привлекает к их изучению специалистов разного профиля. Интерес к проблеме вызван широким спектром приложений, к числу которых можно отнести производство микро- и наноструктур в микроэлектронике, мембранные технологии, медицинскую диагностику и др. [1–3]. К примеру, в области клинической диагностики в последние годы быстрыми темпами развивается новое направление – функциональная морфология биожидкостей [4]. Диагностика различных патологических состояний организма основана на морфологическом анализе микроструктур, полученных на стеклянной подложке

в результате высыхания капли биожидкости при комнатных условиях. Несмотря на большой объём исследований, выполненных в этой области знаний, вопросы, связанные с теоретическим описанием процесса и экспериментальным установлением основных физико-химических закономерностей, по-прежнему остаются в центре внимания. Одной из задач, необходимой для унификации диагностических методик, является научно-обоснованная интерпретация структур фаций. Необходимость такого анализа обусловлена как научными, так и практическими соображениями.

Вопросы механизма структурообразования биологических жидкостей находятся в стадии интенсивного изучения. В качестве модели чаще всего рассматриваются растворы альбу-

* – Термин “фация” обычно используется в геологии, биогеографии и почвоведении. В контексте данной статьи фация означает элементарную морфологическую единицу микроструктуры альбумина

мина [5–9]. В настоящее время исследования, связанные с изучением механизма формирования фаций из белковых систем, проводятся, главным образом, без учета специфики структурных превращений. В работах [10, 11] в общих чертах был рассмотрен подход к идентификации структур фаций биожидкостей, основанный на концепции надмолекулярной системной организации полимерных тел. Подробности формирования тех или иных морфологических образований (морфоз) не обсуждались. Цель настоящей работы – развитие подходов к интерпретации микроструктур биологических жидкостей.

Особенности строения биологических полимеров. Молекулярные характеристики

Основной составляющей живой материи являются белки – полимеры природного происхождения. Многочисленные данные, относящиеся к структурам различных многокомпонентных полимерных систем, свидетельствуют о различных уровнях структурной гетерогенности в полимерных системах. В связи с этим при изучении особенностей структурообразования фаций альбумина микроанализ следует начать с особенностей молекулярного уровня, который определяет специфику структур микроуровня.

Белки жидкостей организма относятся к глобулярным белкам. Их первичная структура аналогична структуре статистического сополимера и образована из остатков порядка 20 типов аминокислот. Разнообразие и многофункциональность аминокислотных остатков определяет специфичность пространственного строения белка, а макромолекулярность обеспечивает потенциальную возможность большого числа конформаций макромолекулы при формировании её вторичных и третичных структур. Макромолекулы белковых полимеров чаще всего имеют форму неразветвленной цепи/или цепи с небольшими разветвлениями. Благодаря такой линейной форме макромолекул биополимеры обладают рядом типичных для них свойств – эластичностью, способностью образовывать нити, определять высокую вязкость растворов. Эти типичные для полимерных материалов свойства определяются гибкостью их линейных молекул, способных к колебательно-вращательному движению отдельных звеньев вокруг соединяющих их оди-

нарных связей. Благодаря вращению отдельных звеньев макромолекула изгибается и может конформироваться в широких пределах [12, 13].

В водных растворах молекулы альбумина находятся в виде глобул, и большинство неполярных групп создаёт гидрофобные области внутри глобулы, а гидрофильные – на поверхности. Руководствуясь таким положением, отвлечемся от многообразия аминокислотных остатков и разделим их на две группы – на полярные (блоки A) и неполярные (блоки B). Тем самым, вместо 20 типов элементов ансамбля будем рассматривать только два типа. Такой подход был применён Фишером при изучении пространственного строения белков [14]. Применим такое упрощенное рассмотрение при изучении структурообразования фаций биожидкостей на примере альбумина.

В работе [15] отмечается, что структуры блок-сополимеров и глобулярных белков имеют общую особенность – они обладают предельными по размеру мотивами (фрагментами) микроскопической структуры и образуют регулярные структуры, подобные кристаллам. Блоки A и B в макромолекуле блок-сополимера несовместимы и существуют в виде отдельных фаз. Морфология таких систем изначально двухфазна. Установлено, что разделение происходит уже на микроуровне. Это объясняется наличием химической связи между блоками, которые ограничивают размер фаз. В результате микрофазового разделения образуются микрообласти гетерогенной структуры с размерами до нескольких десятков нанометров, которые могут приобретать пластинчатую, цилиндрическую, шарообразную формы. Уникальной особенностью таких материалов является способность образовывать сетчатую структуру за счёт физических, а не химических узлов. Это, в свою очередь, является следствием контролируемой морфологии в системах AB, содержащих гибкие и жесткие блоки [16]. Каждый из блоков выполняет определённую функцию. Мягкий блок определяет гибкую эластомерную природу сополимера, а жесткий играет роль узлов физической сетки и наполнителя. Такое поведение является следствием двухфазности этих систем. Существование таких узлоподобных структур в блок-сополимерных системах установлено экспериментально [15].

В свете этих положений, логично принять гидрофильные остатки сывороточного альбу-

мина за гибкие блоки A, гидрофобные – за жёсткие блоки B.

Надмолекулярная структура блок-сополимеров

Блок-сополимеры обнаруживают и надмолекулярную структуру, образованную в результате агрегации однородных полимерных блоков и состоящую из двух обычно несовместимых фаз коллоидного размера [16]. Морфология двухфазных блок-сополимеров зависит от соотношения объёмной доли блоков A и B, а также метода получения образцов. Основной компонент обычно составляет непрерывную фазу, в которой распределены дискретные домены другого компонента. В зависимости от состава блок-сополимера возможно образование трех основных форм сегрегированных доменов: шары, стержни и ламели. При низкой объёмной доле последнего компонента (блоков B) образуются домены сферической формы, при высокой доле – цилиндры, при равной доле – непрерывные ламеллярные структуры, а также возможна инверсия фаз.

При получении пленок блок-сополимера большое влияние на морфологию оказывает выбор растворителя. Первыми во время испарения растворителя будут осаждаться менее гидратированные блоки. Эти блоки образуют дискретные домены, диспергированные в непрерывной матрице второго набухшего блока. Пленки с обращенной морфологией можно получить простым подбором растворителя, предпочтительного для первого блока.

По морфологическим исследованиям различных блок-сополимеров методами микроскопии, в основном электронной, существует достаточное количество опубликованных работ. К примеру, в работах [16, 17] даны ссылки на оригинальные статьи, в основном, это работы зарубежных авторов. Микроструктура блок-сополимеров разной природы здесь представлена сферическими, цилиндрическими или ламеллярными структурными элементами.

Учитывая универсальность явления микрофазового расслоения в системах блок-сополимерных и слабозаряженных полиэлектролитов (включая белки) [18, 19] и ступенчатый характер образования надмолекулярных систем [12], нам представляются интересными результаты работы по особенностям надмолекулярной организации аморфных блок-сополимеров.

В данной работе [13] было проанализировано теоретически, а затем получено экспериментально подтверждение агрегации однотипных блоков в образцах блок-сополимеров не только на молекулярном, но и на надмолекулярном уровне. Также были выявлены и приведены микрофотографии агрегатов в структурах макроскопических образцов блок-сополимера бутадиена и стирола на надмолекулярном уровне: сферы, эллипсоиды, длинные цилиндрические стержни, укладываемые в различные регулярные системы, а также слоистые образования. Таким образом, было показано, что в блок-сополимерных системах реализуется сценарий агрегации с расслоением компонентов и образованием структур определенного морфотипа не только на молекулярном (нано-), но и на надмолекулярном уровне.

Структурная гетерогенность полимеров

Многочисленные данные, относящиеся к структурам различных многокомпонентных полимерных систем, свидетельствуют о наличии в них различных уровней структурной гетерогенности. Применительно к полимерам термин “структура” дифференцирован к различным масштабным критериям. В общем случае следует разделять внутреннюю структуру цепей и их внешнюю (вторичную) структурную организацию. Последнюю относят к категории надмолекулярной структуры. Она охватывает все уровни структур в полимерах, имеющих размеры не меньше размеров макромолекул, в качестве которых могут выступать единичные упорядоченные области – домены (микроглобулы и первичные кристаллы); агрегаты доменов (микрофибриллы, ламели); агрегаты микрофибрилл (макрофибриллы) и ламелей (мультиламели и кристаллиты); агрегаты глобул (макроглобулы и суперкристаллы). В реальных полимерных изделиях вследствие неидеальной стереорегулярности или кинетических и термодинамических условий образуются элементы с различной степенью упорядоченности. В связи с этим предлагается упростить терминологию по размеру морфологических элементов [17], оставив следующие масштабные признаки: гранулы – до 100 мкм; агломераты – до 10 мкм; первичные частицы – до 1 мкм; домены – до 100 нм; микродомены – до 10 нм. Это перечисление, однако, не даёт исчерпы-

вающей трактовки морфологической иерархии.

Особенностью полимерных тел является многообразие их надмолекулярных структур и легкость перехода их в разные морфологические (изомерные) формы. Существует много моделей, описывающих строение полимерных тел: модель бахромчатой мицеллы, модель Йе-ха, модель паракристаллического состояния, модель меандров, модель перекрывающихся статистических клубков [16–18] и т.д. Общим во всех моделях, начиная с модели бахромчатой мицеллы, является наличие в полимерном теле зон упорядоченности и относительного порядка. Это принципиальная черта первой модели, которая отражает сущность надмолекулярной организации полимеров. Отличие более поздних моделей друг от друга и модели бахромчатой мицеллы состоит лишь в трактовке связи упорядоченных объемов между собой и в способах их относительного расположения в пространстве.

В одной из последних моделей (модель плоскостной упаковки макромолекул) [17] элементарным надмолекулярным образованием считается первичная область с упорядоченным расположением сегментов макромолекул размером от одного до нескольких десятков нанометров. Эти объемы называются по-разному: домен, глобула, кристаллит. Главный признак объема – одномерность ориентации цепей внутри домена и неупорядоченное их состояние на границе. Эта модель, в отличие от других, учитывает только наличие зон порядка и беспорядка. Аморфные и кристаллизующиеся полимеры в рамках модели отличаются только внутренней организацией упорядоченных зон. В кристаллизующихся полимерах организация достигает высокой степени завершенности с реализацией дальнего порядка, а в аморфных – упорядоченность имеет определенную степень незавершенности. Принимая этот тезис, появляется возможность описывать свойства аморфных и кристаллических полимеров в рамках единой модели [17, 20].

Независимо от способности полимеров к кристаллизации наличие таких образований в объеме реально как для кристаллизующихся, так и аморфных полимеров. Главное содержание этой модели заключается в принципиальной отвлеченности от деталей внутреннего строения упорядоченных зон и выделения основной черты – наличие упорядоченных, более

уплотненных ассоциатов и неупорядоченных, разрыхленных зон.

Учитывая вышеизложенное, применим эту структурную модель к интерпретации фаций альбумина.

Экспериментальная часть

Рассмотрим некоторые экспериментальные результаты микроструктурного анализа фаций сывороточного альбумина водно-солевых растворов разной концентрации. Как отмечалось в работе [11], для структуры всей фации и отдельных структурных элементов характерна ярко выраженная морфологическая гетерогенность. Наиболее рельефно структурные эффекты проявляются в центральной части фаций альбумина, поэтому особенности подхода к интерпретации структур фаций и их характеристика в первую очередь будут продемонстрированы на примере микроструктур, типичных для этой области фаций.

Микроструктуру фаций исследовали методом оптической микроскопии с использованием программно-аппаратного комплекса на базе микроскопа “Полам Р211-М”.

В работе был использован водный раствор сывороточного альбумина человека 10 % производства ФГУП НПО “Микроген” МЗ РФ (Нижний Новгород). Раствор альбумина доводился до нужной концентрации хлоридом натрия 0,9 %.

В данной работе рассмотрены фации, полученные из водно-солевых растворов сывороточного альбумина человека с концентрациями от 0,2 до 9,5 %. О механизме образования структуры фаций из раствора альбумина концентрации 10,0 % и выше целесообразно говорить отдельно, так как образование трещин, характерных для этих концентраций, сопровождается некоторым закономерным изменением структуры.

Фации для оптической микроскопии готовили методом открытой дегидратации на твердой подложке [4]. На поверхность чистого обезжиренного предметного стекла, расположенного строго горизонтально, с помощью пипеточного микродозатора наносили 0,15 мл готового раствора. Образцы высушивались при температуре от +20 до +25°C и относительной влажности от 28 до 35 % при минимальной подвижности окружающего воздуха. Продолжительность периода высыхания составила от

12 до 24 ч. Далее полученные фации исследовали с помощью оптического микроскопа.

Как видно из представленных на рис. 1 результатов, структура центральной зоны хорошо согласуется с морфологической моделью физической сетки блок-сополимеров, представленной ранее.

Домены (основной мотив центральной зоны) связаны более разупорядоченными межструктурными зонами беспорядка в единую физическую сеть. Специфическая особенность доменов фаций для всех исследованных концентраций – многослойность/спиральность структуры и наличие выраженного центра. Для слоистых рыхлых доменов, характерных для низких концентраций (рис. 1а, б), межструктурная зона представлена хаотично расположенными в бесструктурной матрице единичными фрагментами слоевых структур. По мере повышения концентрации раствора за счёт процесса самоагрегации меняется упаковка элементов как в самих слоях, так и между ними. Заполнение пространства доменов осуществляется за счёт мелких субструктур (глобул, стержней/цилиндров), расходящихся радиально от центра и разветвляющихся доста-

точно часто для того, чтобы заполнить объём. Домены уплотняются. При этом структура пространства между ними (зоны относительного беспорядка) также видоизменяется. От рыхлых, практически бесструктурных промежутков она трансформируется в зону мелких разупорядоченных дендритов при концентрациях от 2,0 до 5,0 % (рис. 1г), и практически исчезает при концентрациях раствора свыше 8,0 % (рис. 1д). В фациях альбумина с концентрацией 10,0 % образуется однородная структура с основным мотивом в виде плотного домена с конкрецией в центре.

Следующая морфологическая особенность структур фаций сывороточного альбумина, на которую следует обратить внимание: при концентрации альбумина 2,0 % и выше в фациях появляются структуры, которые можно отнести к типу нерегулярных дендритов (рис. 2а). В литературе они называются дендриты-ежи (рис. 2в) [15]. Следует обратить внимание на пленку молочного цвета в центре структурного элемента (рис. 2б) и сравнить с изображением дендрита-ежа полиэтилена, полученного из 0,3 % раствора в толуоле (рис. 2г). Серое центральное пятно в структуре (рис. 2г),

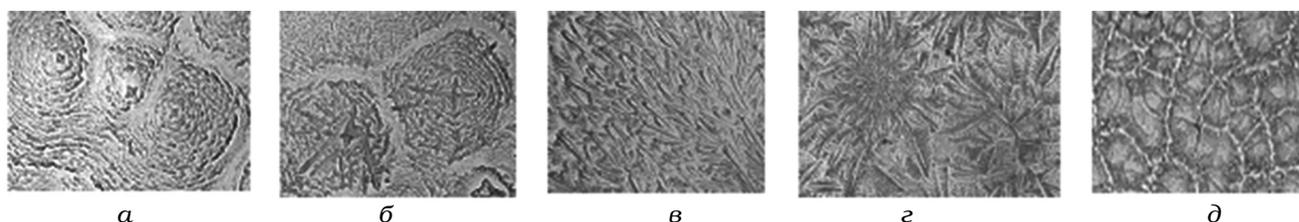


Рис. 1. Характерные фрагменты центральной зоны фации альбумина: а – от 0,2 до 0,6 %; б – 1,0 %; в – от 2,0 до 4,0 %; г – свыше 5,0 %; д – 8,0 %. Ув. $\times 25$

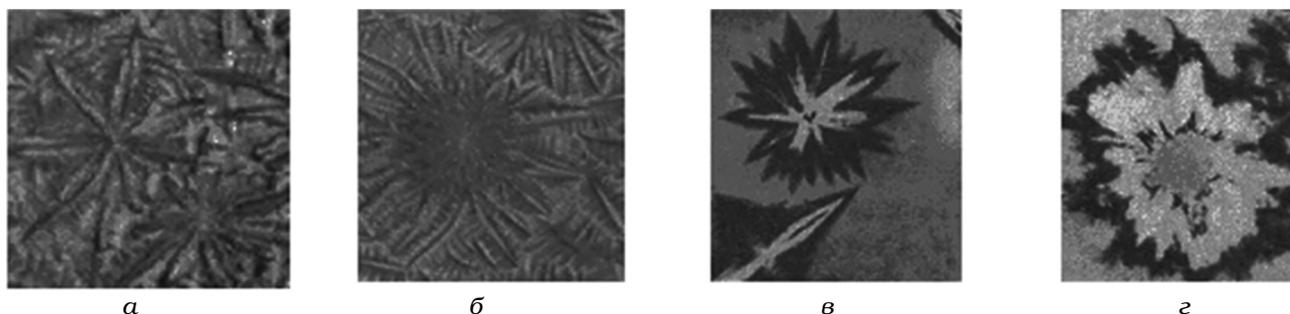


Рис. 2. Микрофотографии дендритов-ежей. Структуры получены: а – в фациях из 2,0 % водно-солевого раствора сывороточного альбумина (собственные результаты); б – в фациях из 5,0 % водно-солевого раствора альбумина (собственные результаты); г – в полиэтилене из 0,04 % раствора ксилола [15]; д – в полиэтилене из 0,3 % раствора толуола [15]

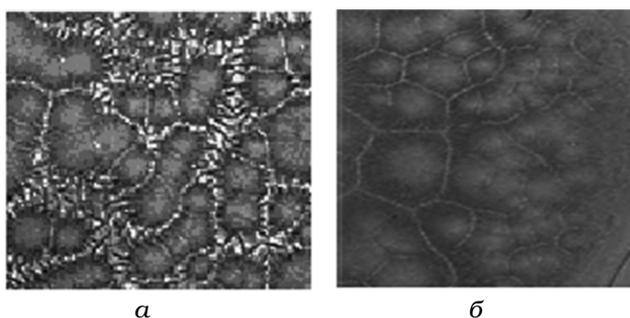


Рис. 3. Фрагмент фазы раствора (собственные результаты): а – в фазах альбумина из 5,0 % водно-солевого раствора; б – в фазах альбумина из 9,0 % водно-солевого раствора. Ув. $\times 25$

согласно данным [15], представляет собой неразрешенную область сколлапсированных разветвлений дендрита. В фазах из растворов альбумина эта область выглядит как на рис. 2б

Анализ микроструктуры фазий показал, что с ростом концентрации раствора альбумина наблюдаемое уплотнение центральной зоны фазий сначала сопровождается появлением сколлапсированных областей в структурных образованиях. Потом следует повышение количества таких структур (рис. 3а), а затем начинается образование пленки путём слияния этих структур (рис. 3б).

Наличие сколлапсированных структур в фазах может служить экспериментальным подтверждением высказанного в нашей предыдущей работе [10] предположения рассматривать растворы альбумина как полиэлектролитные системы, для которых скачкообразный

коллапс является характерным свойством. Установлено [21], что при ухудшении качества растворителя (снижении его активности) полиэлектролитный гель стремится сколлапсировать. Однако резкое уменьшение объема областей с контрионами (и/или уменьшение объема самого образца) энтропийно невыгодно. Под контрионами в данном случае следует понимать так называемые противоions – ионы, обеспечивающие нейтрализацию заряда ионогенной группы за счет его экранизации противоположно заряженным ионом, подходящим под действием кулоновской силы вплотную к ионогенной группе из окружающей среды (растворителя). Ковалентной связи при этом не образуется [22]. Альтернативой в данном случае является образование микроструктуры с чередующимися агрегатами гидрофобных звеньев и сильно набухшими областями, в которых находятся большинство заряженных звеньев и контрионов. При этом число невыгодных контактов звеньев с растворителем существенно уменьшается без значительного изменения объема геля [23].

Обобщая результаты морфологического анализа фазий альбумина в области концентраций от 0,2 до 9,5 %, можно выделить три области концентраций белка, принципиально отличающиеся морфологическими характеристиками центральной части фазий (табл. 1).

Заключение

На примере анализа микроструктуры центральной части фазий альбумина продемонстрирован подход к интерпретации морфо-

Таблица 1

Морфологические особенности центральной зоны фазий альбумина

Концентрация альбумина	Описание морфологии	Стадия формирования структуры
от 0,2 до 0,6 %	Разобъённые рыхлые многослойные домены	Возникновение первичных микрогелевых структур
1,0 %	Распад доменов на мелкие фрагменты	Структурный переход/инверсия фаз
от 2,0 до 4,0 %	Домены дендритного типа трансформируются во фрактальные структуры через промежуточные формы. Появление сколлапсированных структур в центре доменов.	Уплотнение доменов внутри, на поверхности и свободного объёма между ними
от 5,0 до 9,5 %	Уплотнение структуры фазии за счёт повышения однородности доменов и их сближения	Формирование монолитной сетчатой структуры геля

логических особенностей фаций биожидкостей в терминах физической химии полимеров.

При рассмотрении структуры всей фации в целом данный подход следует применять с некоторыми дополнениями, связанными с наличием зон, межфазных границ и поверхностных слоев между ними.

Список литературы

1. Функциональная морфология биологических жидкостей. // Материалы III Всероссийской научно-практической конференции. – Москва, 2004, 116 с.
2. Процессы самоорганизации в высыхающих каплях многокомпонентных жидкостей: эксперименты, теории, приложения. // Материалы I Международной конференции. – Астрахань, 2010, 208 с.
3. Процессы самоорганизации в высыхающих каплях многокомпонентных жидкостей: эксперименты, теории, приложения. // Материалы II Международной конференции. – Астрахань, 2012, 241 с.
4. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Морфология биологических жидкостей человека. – М.: Хризостом, 2001, 304 с.
5. Тарасевич Ю.Ю., Аюпова А.К. Влияние диффузии на разделение компонентов биологической жидкости при клиновидной дегидратации. // Журнал техн. физики, 2003, **73**, № 5, С. 13–18.
6. Тарасевич Ю.Ю. Механизмы и модели дегидратационной самоорганизации биологических жидкостей. // Успехи физ. наук, 2004, **174**, №7, С. 779–790.
7. Бузовера М.Э., Сельченков В.Л., Щербак Ю.П. и соавт. Методология исследования структур биологических жидкостей. // Вестник Саровского ФИЗТЕХА, 2002, № 3, С. 26–32.
8. Бузовера М.Э., Балакшина М.А. Реологическая модель процесса пленкообразования из раствора белков. // Мед. физика, 2003, № 2(18), С. 39–42.
9. Бузовера М.Э., Шишпор И.В., Щербак Ю.П. Экспериментальное исследование микроструктур фаций сывороточного альбумина. // Журнал техн. физики, 2012, **82**, № 9, С. 87–94.
10. Бузовера М.Э., Шатохина С.Н., Шабалин В.Н. Кристаллографические методы в изучении феномена старения природных и синтетических полимеров. // “Проблемы геронтологии”. Сб. материалов 2-ой научно-практической конференции. – Москва, 1998, С. 133–140.
11. Бузовера М.Э., Щербак Ю.П., Шишпор И.В., Потехина Ю.П. Микроструктурный анализ биологических жидкостей. // Журнал техн. физики, 2012, **82**, № 7, С. 123–128.
12. Марихин В.А., Мясникова Л.П. Надмолекулярные структуры. – Ленинград: Химия, 1977, 240 с.
13. Хоффман М. Кинетика агрегации и размеры элементов надмолекулярной структуры некристаллизующихся блоксополимеров. Многокомпонентные полимерные системы. Под ред. Р.Ф. Голда. – М.: Химия, 1974.
14. Волькенштейн М.В. Физика ферментов. – М.: Наука, 1967, 200 с.
15. Вундерлих Б. Физика макромолекул. – М.: Мир, 1976, 643 с.
16. Ношей А., Мак-Грат Дж. Блок-сополимеры. Критический обзор. – М.: Мир, 1980, 478 с.
17. Липатов Ю.С. Коллоидная химия полимеров. – Киев: Наукова думка, 1984, 344 с.
18. Калашникова В.Г. Особенности кристаллизации блок-сополимеров. Смеси и сплавы полимеров. – Киев: Наукова думка, 1978, С. 109–118.
19. Борю В.Ю., Ерухович И.Я. Структурные фазовые переходы в растворах слабозаряженных полиэлектролитов. // ДАН СССР, 1986, **286**, № 6, С. 1373–1376.
20. Бартенев Г.М., Френкель С.Я. Физика полимеров. – Ленинград: Химия, 1990, 432 с.
21. Хохлов А.Р. Восприимчивые гели. // Соросовский образовательный журнал, 1998, № 11, С. 138–142.
22. Ершов Ю.А., Попков В.А., Берлянд А.С., Книжник А.З. Общая химия. Биофизическая химия. Химия биогенных элементов: учеб. для вузов. – М.: Высшая школа, 2000, 560 с.
23. Хохлов А.Р., Дормидонтова Е.Е. Самоорганизация в ион-содержащих полимерных системах. // Успехи физ. наук, 1997, **167**, № 2, С. 113–128.

MORPHOLOGICAL FEATURES OF ALBUMIN FILMS

M.E. Buzoverya¹, I.V. Shishpor¹, Y.P. Shcerbak¹, S.N. Shatokhina², V.V. Shabalin³

¹ *Sarov State Physics Technical Institute – the branch National Research Nuclear University “MEPhI”, Sarov, Russia*

² *Moscow Regional Research and Clinical Institute “MONIKI”, Moscow, Russia*

³ *Saint-Peterburg State University of Architecture and Civil Engineering, Saint-Peterburg, Russia*

By the example of the analysis of albumins microstructure the approach to interpretation of structures of bioliquids films is shown. Observable morphological features of films are considered from the point of view of structural model the block-polymers of systems. Dependence of morphology of the central part of albumins films from concentration is revealed, thus is allocated three areas of concentration of the fiber, essentially distinguished by morphological attributes: from 0.2 up to 0.6 %; from 2.0 up to 4.0 %; from 5.0 up to 9.5 %.

Key words: *albumin, bioliquids film, morphological features, structurization of biological liquids, supramolecular structure*

E-mail: buzoverya@expd.vniief.ru; ypshcerbak@mail.ru; ishishpor@yandex.ru