

Возможности оптической микроскопии в изучении особенностей надмолекулярной структуры белковых систем

© М.Э. Бузовера, И.В. Шишпор

Саровский физико-технический институт — филиал Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования „Национальный исследовательский ядерный университет „МИФИ“,
607186 Саров, Нижегородская область, Россия
e-mail: ira.shishpor@yandex.ru; buzoverya@expd.vniief.ru

(Поступило в Редакцию 10 ноября 2015 г.)

Описан флуктуирующий характер надмолекулярных структур фаций альбумина. Выделено два устойчивых состояния надмолекулярной организации фаций при комнатной температуре. Показаны возможности оптической микроскопии в оценке „динамичности“ надмолекулярной структуры сывороточного альбумина человека.

Введение

Представленный материал является продолжением работ по исследованию физико-химического механизма структурообразования пленок из водно-белковых растворов биополимерных композиций [1–4]. В ходе изучения микроструктуры фаций альбумина было замечено, что в исследованном диапазоне концентраций (от 0.2 до 10%) можно выделить два характерных состояния, отличающихся системной организацией (СО) фации. Мы их назвали как упорядоченное и неупорядоченное. С целью выяснения причин этого экспериментального факта были проведены исследования микроструктуры сывороточного альбумина человека (САЧ) в интервалах температур от 22 до 25°C. Некоторые результаты исследований приведены в настоящей работе.

Учитывая большой интерес специалистов в области нанотехнологий к капельным технологиям и самоорганизации белковых структур, полученные результаты могут быть полезны при создании структур с нужными динамическими свойствами.

Экспериментальная часть

I. Материалы

Исходный 10%-ный водный раствор сывороточного альбумина человека (ФГУП „НПО „Микроген“ МЗ РФ, Нижний Новгород) разводили 0.9%-ным раствором хлорида натрия до заданных концентраций. Приготовление образцов осуществлялось методом открытой дегидратации на твердой подложке [5,6]. На чистое предметное стекло наносили каплю раствора объемом 10–20 μl . Затем высушивали при комнатной температуре от 22 до 25°C и относительной влажности воздуха 30–50%. Температура и влажность контролировались с помощью лабораторного термогигрометра ИВТМ-7.

В результате дегидратации водно-солевого белкового раствора образуется фация/пленка, подготовленная для дальнейшего исследования методами оптической микроскопии.

II. Микроструктурные исследования

Исследования микроструктуры проводили на аппаратно-программном комплексе „Морфо“ на базе оптического микроскопа „ПОЛАМ 211Р“. Для компьютерной обработки изображений и получения количественных характеристик использовали программу *Protoblood*, входящую в библиотеку программ „Морфо“ [7]. Программа позволяет оцифровывать микроскопические изображения белковых пленок; получать количественные параметры, как отдельных элементов структуры, так и давать интегральную оценку структурной организации в виде комплексных индексов.

Результаты и обсуждение

В настоящей работе были исследованы изображения фаций водно-солевых растворов сывороточного альбумина человека в интервале концентраций от 0.2 до 9.5%. Для каждой концентрации число экспериментальных точек составляло не менее 6. Все образцы были разделены на две группы по морфологическому критерию в зависимости от характера их системной организации (упорядоченный и неупорядоченный типы).

Для упорядоченного состояния 10%-ного водного раствора характерна радиальная симметрия трещин; наличие сферических, хорошо оформленных конкреций (рис. 1, *a*). Неупорядоченное состояние характеризуется иррадиальным расположением трещин и в основном слившимися конкрециями (рис. 1, *b*).

Несколько иначе выглядят фации, полученные из водно-солевых растворов альбумина с содержанием белка менее 10%. В таких фациях нет структурных элементов в виде магистральных трещин и конкреций; однако два состояния, упорядоченное и неупорядоченное, также хорошо прослеживаются.

Для фаций с невысокой концентрацией белка (до 9%) характерна ярко выраженная зональная структура. Наиболее плотно структурные элементы упакованы в слое,

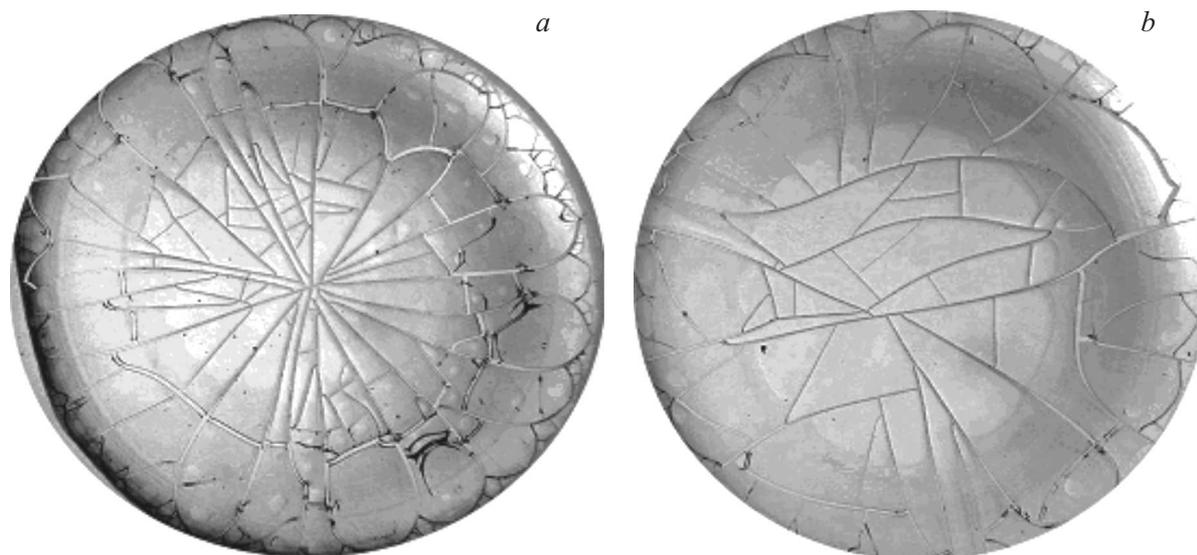


Рис. 1. Фазии 10%-ного водного раствора альбумина: *a* — упорядоченный тип CO, *b* — неупорядоченный тип CO.



Рис. 2. Фазии 0.6%-ного водно-солевого раствора САЧ: *a* — упорядоченный тип CO, *b* — неупорядоченный тип CO.

прилегающем к подложке. Структура этого слоя выявляется слабо. Изменение структур в зависимости от концентрации белка более четко фиксируется в центральной зоне фазий. Поэтому описание и формализация изображений проводились в основном для этой зоны.

На рис. 2–4 представлены фазии упорядоченного и неупорядоченного типа, характерные для разных диапазонов концентраций водно-солевых растворов САЧ.

Микроструктурные исследования во всем исследованном диапазоне концентраций позволили выявить существенную разницу в системной организации упорядоченного (фазии А) и неупорядоченного состояния фазий (фазии Б). Основным морфологическим различием является тип и плотность упаковки структур.

Так, для фазий в диапазоне концентраций белка от 0.2 до 0.6% присуща микрогетерогенность, неоднородность и лабильность структур (рис. 2). Здесь реализуется широкий набор структурных форм: игольчатых, кольцевых, пластинчатых, комбинированных. В целом структуры рыхлые и слабосвязанные друг с другом. Это свидетельствует о том, что локальные концентрации по диаметру и толщине пробы существенно отличаются от средней концентрации раствора. Этот интервал концентраций мы назвали областью концентрационной неустойчивости. Для CO типа А (упорядоченное) характерно наличие рыхлых кольцевых структур (доменов) с центром структурообразования. Для CO типа Б наблюдается асимметрия фазии, распад доменов с переходом в слоистую структуру.

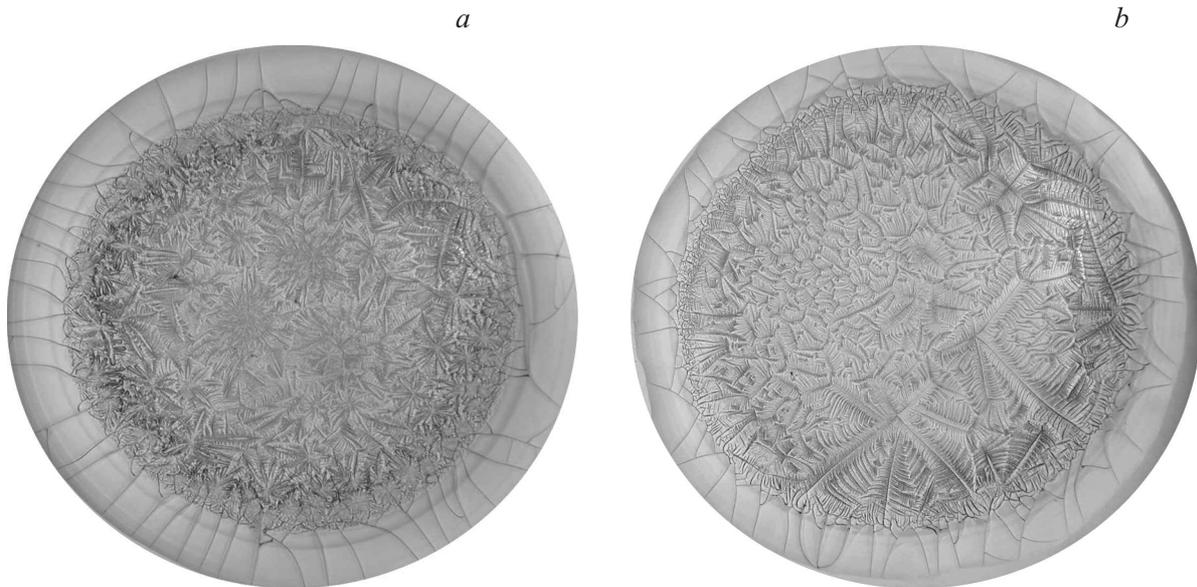


Рис. 3. Фазии 2.0%-ного водно-солевого раствора САЧ: *a* — упорядоченный тип, *b* — неупорядоченный тип.

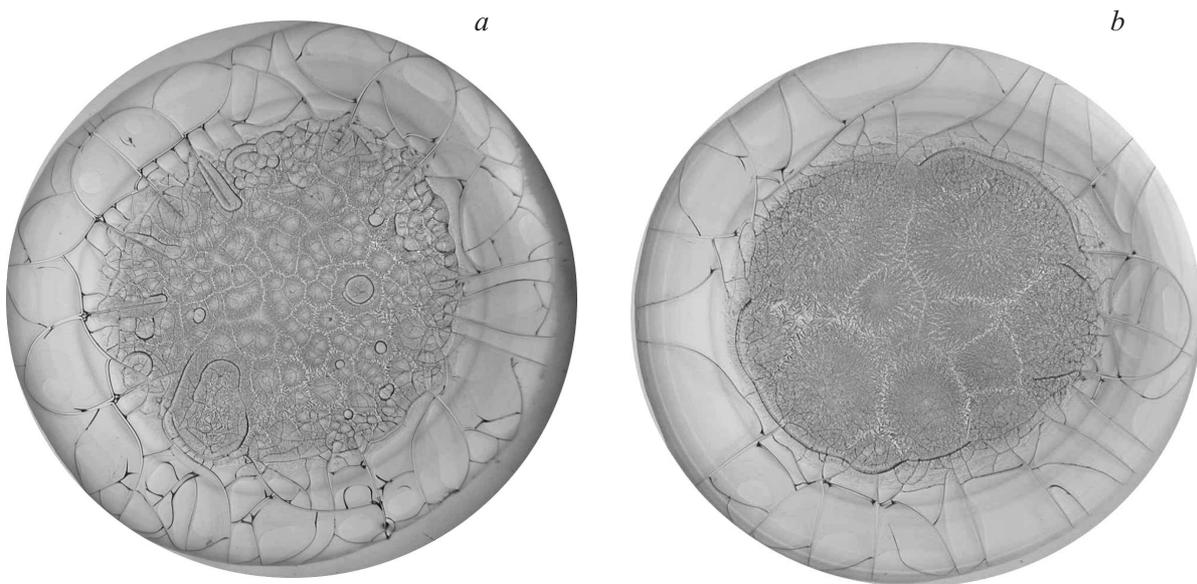


Рис. 4. Фазии 6.0%-ного водно-солевого раствора САЧ: *a* — упорядоченный тип СО, *b* — неупорядоченный тип СО.

По мере увеличения содержания белка повышается ассоциативное упорядочение: происходит уплотнение, как самих доменов, так и их связанности (рис. 3). Структура в целом становится однороднее. При этом наличие двух типов фазий также фиксируется.

Начиная с 6% и выше меняется тип фазий (рис. 4). Основной структурный элемент центральной зоны — сферическое образование. В фазии типа А — это глобулоподобная микрочастица; в фазии типа Б реализуется типичная полиэдрическая структура, где основной структурный элемент — „набухшая глобула“. Тонкие структурные эффекты в виде межфазных и граничных слоев, областей расслоения и начала образования сплошной пленки в настоящей работе мы не рассматриваем.

Таким образом, в ходе микроструктурных исследований по визуальному критерию нами было выявлено два состояния фазий САЧ: упорядоченное и неупорядоченное.

Далее представляло интерес проведение количественной параметризации изображений с целью оценки возможности разделения двух структурных состояний и выявления зависимостей количественных характеристик микроструктур от концентрации белковых растворов.

На рис. 5–7 представлены зависимости некоторых количественных характеристик микроструктуры САЧ от концентраций в фазиях упорядоченного и неупорядоченного типа. К примеру, параметр *SrSize* является количественной величиной, характеризующей средний размер

элемента структуры. На рис. 5 видно, что изменение данного параметра в зависимости от концентрации имеет разную направленность: в фациях с упорядоченным типом *SrSize* растет с увеличением концентрации; в фациях с неупорядоченным типом *SrSize* практически не изменяется.

Диапазон концентраций белка от 0.6 до 2.0% условно можно назвать „зоной перестройки“, поскольку здесь наблюдается изменение характера структурообразования и переход к новому типу фаций с образованием новых структурных субъединиц. Визуально это можно наблюдать на изображениях фаций (рис. 2, 3). На графике рис. 5 этот переход количественно выражается „точкой перегиба/пересечения“ в районе концентрации 0.6%.

Следующий индекс деструкции *Destr* — количественная величина, определяющая совокупность основных признаков системной организации фации. Данный индекс учитывает „гидрофильную компоненту“ и снижается при увеличении вязкости материала. На графике рис. 6 видно

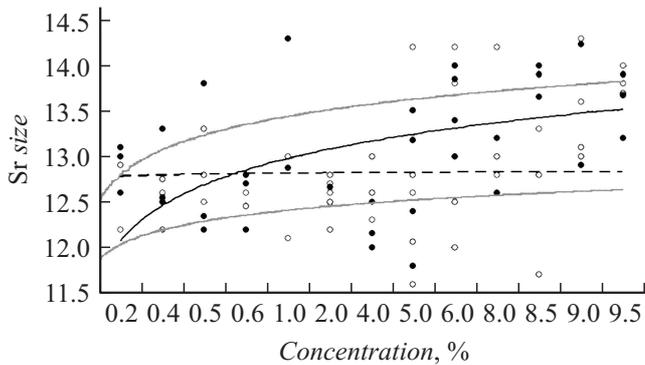


Рис. 5. Зависимость размеров структурных элементов от концентрации альбумина. Сплошная линия (черный фон маркера) — количественные характеристики *SrSize* для упорядоченного типа; штриховая линия (прозрачный фон маркера) — для неупорядоченного типа СО. Серые линии соответствуют 95%-ному доверительному интервалу.

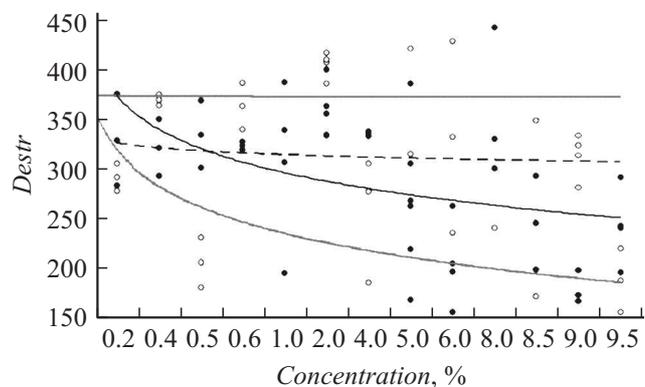


Рис. 6. Зависимость комплексного индекса деструкции от концентрации альбумина. Сплошная линия (черный фон маркера) — количественные характеристики *Destr* для упорядоченного типа; штриховая линия (прозрачный фон маркера) — для неупорядоченного типа СО. Серые линии соответствуют 95%-ному доверительному интервалу.

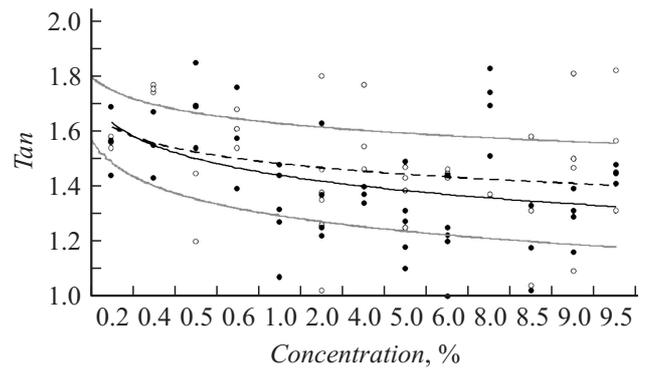


Рис. 7. Зависимость индекса *Tan* от концентрации альбумина. Сплошная линия (черный фон маркера) — количественные характеристики *Tan* для упорядоченного типа; штриховая линия (прозрачный фон маркера) — для неупорядоченного типа СО. Серые линии соответствуют 95%-ному доверительному интервалу.

общую направленность к снижению величины *Destr* при увеличении концентрации белка, причем в фациях с упорядоченным типом СО уменьшение значений индекса заметнее. Здесь также имеется точка пересечения в районе концентрации 0.6%.

Интерес представлял также количественный индекс *Tan*, который является характеристикой фрактальной размерности. На графике рис. 7 видно уменьшение данной величины при увеличении концентрации в фациях обоих типов СО, что соответствует наблюдаемым структурным перестройкам в сторону упорядочивания и уплотнения системной организации.

Таким образом, автоматизированная обработка позволила выявить разницу в количественных характеристиках двух состояний фаций. Проведенная статистическая обработка не выявила статистически достоверных различий между пробами упорядоченного и неупорядоченного типов, все пробы относятся к одной генеральной совокупности данных. Однако анализ графиков все же позволяет выделить следующую тенденцию. Количественные изменения показателей структурных характеристик в выборках упорядоченного и неупорядоченного состояний описываются однотипными зависимостями, но имеют разные коэффициенты, что отражается в крутизне графиков по всем трем индексам.

Заключение

Известно, что свойства полимерных структур закладываются на молекулярном уровне, а реализуются на надмолекулярном уровне. Развивая концепцию надмолекулярной системной организации в приложении к биополимерным системам, возможным объяснением наблюдаемому эффекту может служить флуктуационный характер структурной организации самой белковой глобулы [8].

Кроме того, водные растворы белков обладают способностью в зависимости от температуры, ионной силы,

pH среды, концентрации модулирующих веществ претерпеть неденатурационные структурные изменения, которые имеют характер механизма регуляции функциональных свойств. К примеру, в работе [9] констатируется, что для сывороточного альбумина человека характерно наличие в физиологической области температур термоиндуцированных структурных перестроек (ТСП), осуществляющих регуляцию транспорта веществ гидрофобной природы и коллоидно-осмотического давления в системе крови. Эти ТСП обнаружены в некоторых температурных областях и отражают несколько конформаций белка, равновесие между которыми зависят от температуры и которые различаются сродством мест связывания, скоростью связывания и растворяющей способностью воды, примыкающей к поверхности белка. В работе [8] при помощи поляризационно-флуоресцентного метода были исследованы особенности конформационного состояния некоторых нативных белков в интервалах физиологически оптимальных температур и обнаружены две формы нативного белка: А ($T = 10\text{--}15^\circ\text{C}$) и Б ($T = 25\text{--}45^\circ\text{C}$) с обратимым кооперативным переходом между ними при $T = 15\text{--}22^\circ\text{C}$.

Поэтому можно предположить, что одним из возможных объяснений наблюдаемого феномена может быть наличие двух форм нативного белка и обратимого кооперативного перехода между ними в исследуемой области температур от 22 до 25°C .

Список литературы

- [1] Бузоверя М.Э., Шишпор И.В., Потехина Ю.П., Щербак Ю.П. // ЖТФ. 2012. Т. 82. Вып. 7. С. 123–128.
- [2] Бузоверя М.Э., Шишпор И.В., Щербак Ю.П. // ЖТФ. 2012. Т. 82. Вып. 9. С. 87–94.
- [3] Бузоверя М.Э., Шишпор И.В., Щербак Ю.П. // ЖТФ. 2014. Т. 59. № 10. С. 1550–1555.
- [4] Бузоверя М.Э., Шишпор И.В., Щербак Ю.П., Шатохина С.Н., Шабалин В.В. // Медицинская физика. 2015. Т. 66. № 2. С. 31–34.
- [5] Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Морфология биологических жидкостей человека. М.: Хризостом, 2001. 304 с.
- [6] Бузоверя М.Э., Шишпор И.В., Кутная Ж.Б., Байбулатова Л.Б., Конторщикова К.Н. Методика пробоподготовки биожидкостей для количественной микроскопии: Методическое пособие. Нижний Новгород: НГМА, 2003. 16 с.
- [7] Бузоверя М.Э., Сельченков В.Л., Щербак Ю.П., Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Пакет прикладных программ для морфологического анализа биожидкостей „Морфотест“. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ № 2003612503 от 13.11.03.
- [8] Конев С.В., Мажуль В.М., Черницкий Е.А. // ДАН СССР. 1968. Т. 183. № 5. С. 1201–1204.
- [9] Сироткин В.А., Королев Д.В. // Биофизическая химия. 2005. Т. 79. № 2. С. 352–358.