

Комплексная природа термических фазовых превращений в растворах альбумина

© А.О. Вонти,¹ А.В. Ильинский,² В.М. Капралова,¹ Е.Б. Шадрин^{2,¶}

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251 Санкт-Петербург, Россия

² Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе, 194021 Санкт-Петербург, Россия

¶ e-mail: shadr.solid@mail.ioffe.ru

(Поступило в Редакцию 2 августа 2017 г.)

Диэлектрическими и оптическими методами выявлена сложная природа фазовых превращений глобула–клубок–клубковый ассоциат в растворах человеческого сывороточного альбумина. Получены импедансметрические и нефелометрические кривые температурных зависимостей параметров фазовых превращений в альбумине, введенном в стандартный физиологический раствор. Импедансметрическим методом выявлен двухстадийный механизм фазового перехода глобула–клубок, а нефелометрическим методом установлен двухстадийный механизм фазового перехода клубок–клубковый ассоциат. Определены концентрационные зависимости критических индексов и температур обоих фазовых переходов.

DOI: 10.21883/JTF.2018.06.46028.2450

Введение

В последнее десятилетие доказана связь многих серьезных нейродегенеративных заболеваний живых организмов с изменением конформации белковых молекул, входящих в состав биологических жидкостей и, в частности, спинно-мозговой жидкости. К таким заболеваниям, обозначаемым как конформационные, относятся хорей Хантингтона, болезни Альцгеймера и Паркинсона [1]. На сегодняшний день подобные нейродегенеративные заболевания неизлечимы, однако общепризнана необходимость ранней диагностики таких заболеваний. Поэтому представляется актуальным исследование механизмов процессов, позволяющих осуществлять ранний контроль конформационных изменений белковых молекул. При этом несмотря на развитие новейших методов нейровизуализации исследование биофизических параметров спинномозговой жидкости остается одним из важнейших методов диагностики патологических состояний, возникающих при нейрохирургических заболеваниях [2].

Главным белком в составе ликвора, выполняющим основные биологические функции, является альбумин, находящийся, наряду с другими компонентами, в физиологическом растворе, представляющем собой несущую основу спинномозговой жидкости [2]. В связи со сказанным контроль состояния основных белков ликвора является актуальной задачей. Указанный контроль может быть осуществлен как электрическими, так и оптическими методами, причем эти методы, взаимно дополняя друг друга, контролируют различные биофизические параметры фазовых превращений в растворах белков. Поэтому целью настоящей работы явилась постановка экспериментов, исключающих влияние на результаты опыта других составных частей ликвора и позволяющих определять параметры фазовых превращений в молеку-

лах белка — альбумина, помещенных в стандартный физиологический раствор.

1. Образцы

Человеческий сывороточный альбумин представляет собой глобулярный белок с молекулярной массой 69 kDa, состоящий из 585 аминокислотных остатков. Его цепь образует 9 петель, уложенных в 3 относительно независимых домена. Третичная структура альбумина зафиксирована 17 дисульфидными мостиками [3].

Образцы для описываемых в настоящей работе экспериментов были получены последовательным разбавлением исходного препарата человеческого сывороточного альбумина. Препарат альбумина производства ФГУП „НПО „Микроген“ Минздрава России представлял собой 10% раствор в дистиллированной воде человеческого сывороточного альбумина, в который добавлены хлористый натрий (NaCl) (150 mmol/l) и каприловокислый натрий $C_7H_{15}COONa$ (17 mmol/l).

2. Методика эксперимента

В наших исследованиях применялись два макроскопических метода исследования: импедансметрия и нефелометрия, воспринимающих раствор альбумина как сплошную среду и контролирующих температурные изменения макроскопических параметров этой среды. Так, метод импедансметрии позволяет наблюдать за термической трансформацией усредненной диэлектрической проницаемости среды, а метод нефелометрии — за термическим изменением усредненного сечения рассеяния света макроэлементами среды. При этом использованные методы не позволяют контролировать термическую

трансформацию свойств отдельных микроэлементов среды. С учетом того обстоятельства, что низкочастотная поляризуемость как альбуминовых глобул, так и клубков невелика [3], метод термоимпедансметрии контролирует главным образом макроскопический дипольный момент растворителя, поляризуемость молекул которого на порядки выше, и позволяет тем самым опосредованно исследовать изменение состояния белковых глобул, например, при фазовом переходе глобула–клубок. Эта способность определяется радикальным уменьшением усредненной диэлектрической проницаемости раствора ввиду резкого падения концентрации свободных молекул воды при фазовом переходе глобула–клубок. Эти молекулы, вовлекаемые в структуру гидратной оболочки клубка, теряют способность к ориентационной поляризуемости, тогда как деформационная поляризуемость молекул воды мала [3].

Аналогичное утверждение справедливо по отношению к методу нефелометрии. А именно белковый клубок, окруженный гидратной оболочкой, не способен рассеивать оптическое излучение видимого диапазона ввиду своего малого размера, на порядки меньшего длины световой волны. Резкое возрастание сечения рассеяния возникает лишь при приближении размера клубкового ассоциата, формируемого слипающимися белковыми клубками, к длине световой волны, что и фиксируется методом нефелометрии. Таким образом, метод нефелометрии, как и термоимпедансметрический метод, опосредованно контролирует процессы фазовых превращений, но в данном случае уже процессы слипания альбуминовых клубков в клубковый ассоциат.

2.1. Метод термоимпедансметрии

Для исследования электрических свойств раствора альбумина в работе использована разработанная в ФТИ им. А.Ф. Иоффе установка для измерения температурной зависимости электрического импеданса биологических жидкостей [4]. Схема установки представлена на рис. 1.

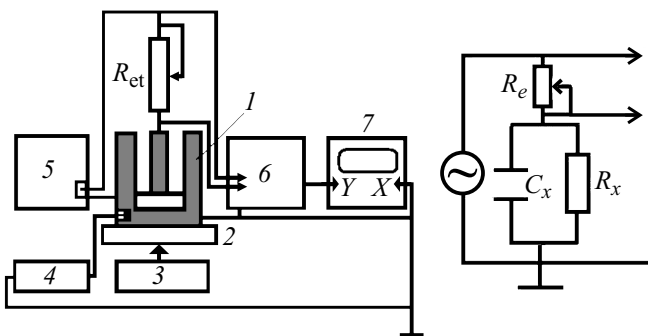


Рис. 1. Блок-схема термоимпедансметрической установки и ее электрическая эквивалентная схема. 1 — измерительная кювета, 2 — нагреватель, 3 — блок питания нагревателя, 4 — измеритель температуры, 5 — генератор, 6 — фазометр, 7 — регистрирующее устройство.

Частота колебаний напряжения, подаваемого на кювету (частота регистрации), 3,6 МГц, амплитуда напряжения 800 мВ, диапазон изменения температуры кюветы 20–100°С. Измерительная кювета представляла собой цилиндрический конденсатор с зазором между обкладками 1 мм, высотой 20 мм и наружным диаметром зазора 15 мм; объем исследуемой жидкости равнялся 1,2 мл; скорость нагрева составляла 0,025°С/с. Погрешность определения разности фаз колебаний между опорным напряжением и измеряемым током составляла 0,001 рад (0,06 градуса), погрешность измерения температуры — 0,1°С. Для измерения столь малых разностей фаз использован фазометр высокого класса точности, не применяемый в промышленных установках импедансметрии. Укажем, что промышленный прибор прямого измерения полного импеданса кюветы не способен регистрировать слабые особенности на температурной зависимости фазового сдвига.

При проведении измерений термоимпедансметрическим методом к электродам кюветы с раствором белка прикладывалось переменное электрическое напряжение, что вызывало протекание дрейфового тока, обусловленного смещением ионов Na^+ , Cl^- и $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{COO}^-$, окруженных своими гидратными оболочками, и тока смещения, обусловленного ориентационной поляризуемостью во внешнем поле свободных молекул воды. Данная система может быть смоделирована эквивалентной схемой, состоящей из параллельно соединенных друг с другом резистора и конденсатора. В такой схеме тангенс угла между вектором результирующего тока и током смещения зависит, согласно общепринятым физическим соображениям [5], от частоты $\text{tg } \delta = I_a/I_c = 1/\omega CR$. При низких частотах δ близок к 90°, а при высоких частотах он стремится к нулю. В нашем случае была выбрана сравнительно высокая частота (3,6 МГц) с целью подавления дрейфовой составляющей полного тока I_a , не несущей информации о фазовых превращениях в альбумине. Таким образом, зависимость фазового сдвига от температуры оказывалась обусловленной реактивной (емкостной) составляющей тока I_c , отражающей изменение числа свободных молекул, ориентирующихся во внешнем электрическом поле и обеспечивающих макроскопический дипольный момент образца.

2.2. Оптический метод

Для наблюдения и исследования полной необратимой ассоциации молекул белка в дополнение к термоимпедансметрическому в настоящей работе использован метод светорассеяния (нефелометрии).

Оптическая схема установки для регистрации сигнала тиндалевского рассеяния света раствором белка приведена на рис. 2.

Ассоциацию молекул альбумина можно наблюдать, пропуская через раствор альбумина свет, испытывающий тиндалевское рассеяние на клубковых ассоциатах, поперечник которых сравним с длиной световой волны.

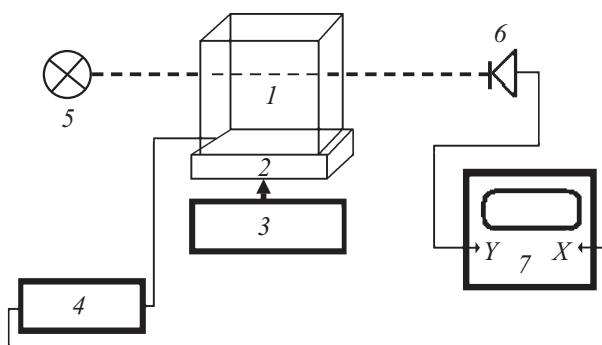


Рис. 2. Оптическая схема установки по исследованию фазовых переходов методом тиндалевского рассеяния света (регистрация пропускания): 1 — кювета с раствором альбумина, 2 — нагреватель, 3 — блок питания нагревателя, 4 — измеритель температуры, 5 — источник света, 6 — фотодиод, 7 — регистрирующее устройство.

Контролировать ход этого процесса следует, измеряя на выходе системы интенсивность оптического сигнала. Таким образом, по термическому изменению интенсивности оптического сигнала пропускания регистрируется процесс ассоциации белковых клубков, усиливающийся с повышением температуры.

3. Результаты эксперимента

В настоящей работе выполнены термоимпедансметрические (ТИМ) и термонепелометрические (ТНМ) измерения физических свойств растворов альбумина.

3.1. Результаты ТИМ измерений

На рис. 3 представлена температурная зависимость разности фаз $\Delta\delta$ между полным током через измери-

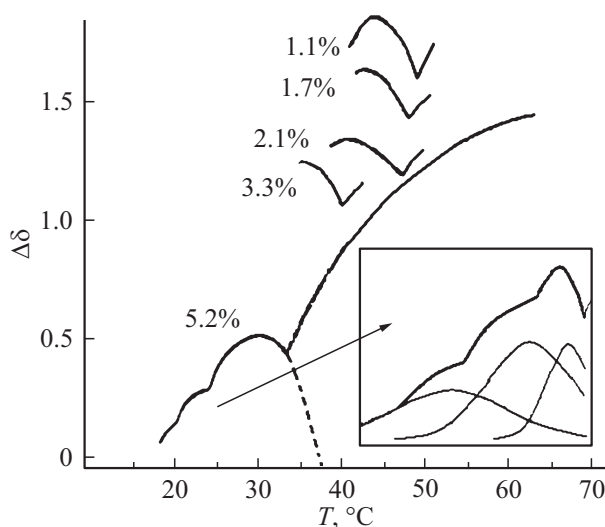


Рис. 3. Термоимпедансметрическая кривая при различных концентрациях альбумина в физиологическом растворе.

тельную кювету и емкостной составляющей тока. Эта зависимость представляет собой в целом возрастающую с температурой функцию.

В области низких температур (20–40°C) на ТИМ кривой наблюдается отчетливая структура. Наиболее выраженная особенность кривой представляет собой спад, экстраполированный штриховой линией к температуре $T_{c1} = 38^\circ\text{C}$ (для концентрации 5.2 wt.%). На вставке показано также возможное разложение наблюдаемой структуры на три гауссовы функции. Параметры получаемых гауссиан позволяют получить численные значения температур различных этапов расплавления белковой глобулы.

Участок ТИМ кривой, отмеченный на рис. 3 штрихом непосредственно перед $T = 38^\circ\text{C}$, может быть описан в терминах критических индексов, величина которых, как показывает эксперимент, свидетельствует в пользу перколяционной природы данной стадии фазового перехода.

Как известно [6], критические индексы — это параметры, характеризующие поведение различных термодинамических характеристик системы во флуктуационной области, т.е. в непосредственной окрестности точек фазовых переходов. Их поведение обычно описывается степенным законом, показателем которого является критический индекс. Критические индексы имеют универсальный характер. Они не зависят от физической природы вещества, но определяются только размерностью пространства, числом компонент и тензорными свойствами параметра порядка, а также общим характером взаимодействия микроэлементов системы (дальнодействие или короткодействие) [7].

Наши результаты показывают, что термическое поведение фазового сдвига на участке ТИМ кривой перед точкой T_{c1} описывается степенным законом вида $\Delta\delta \sim 1 - (T - T_{c1})^{-\alpha}$, где $\Delta\delta$ — наблюдаемый сдвиг фаз, T — температура, T_{c1} — температура перколяционного фазового перехода, α — показатель степени, т.е. критический индекс. Соответствие экспериментальных данных такому степенному закону, а также значение показателя степени (критического индекса) являются, как будет показано ниже, свидетельствами совершения в системе перколяционного фазового перехода.

На рис. 4 представлены зависимости температур фазовых переходов и критических индексов от концентрации растворов n : 1.1; 1.3; 1.7; 2.1; 2.6; 3.3; 5.2 wt.%. Следует обратить внимание на то, что температура перколяционного фазового перехода T_{c1} падает с ростом концентрации (рис. 4, а), а критический индекс α , отражающий скорость резкого изменения поляризуемости системы с температурой, увеличивается при росте концентрации n (рис. 4, б).

3.2. Результаты оптических измерений

Вторым экспериментальным результатом настоящей работы является получение температурной зависимости

интенсивности тиндалевского рассеяния света (нефелометрической кривой), а также зависимости как температуры, к которой стремится нефелометрическая кривая в процессе ее резкого возрастания, так и критического индекса этого возрастания от концентрации раствора белка.

На рис. 5 представлена температурная зависимость тиндалевского рассеяния света. Эксперимент показывает, что резкий рост интенсивности рассеянного света наблюдается в области температур 60–70°C перед точкой $T_{c2} = 68^\circ\text{C}$ фазового перехода „клубок–клубковый ассоциат“ (более подробно см. ниже). Обращает на себя внимание тот факт, что описанная ранее ТИМ кривая (рис. 3) располагается при значительно более низких температурах, чем термонепелометрическая кривая. Кроме того, ТИМ кривая имеет большее число особенностей, чем кривая рассеяния света. Этот факт приводит к заключению, что ТИМ кривая более чувствительна к различным внешним воздействиям на раствор белка, чем нефелометрическая кривая.

Температурное поведение интенсивности тиндалевского рассеяния света описывается степенным законом

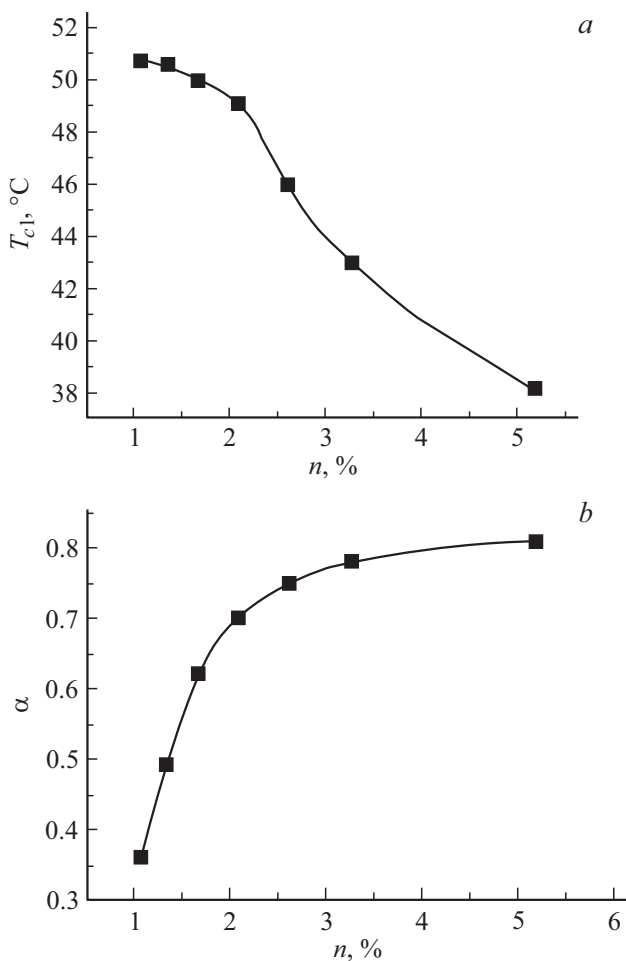


Рис. 4. Зависимость температуры T_{c1} (a) и критического индекса α (b) фазового перехода от концентрации n альбумина в растворе.

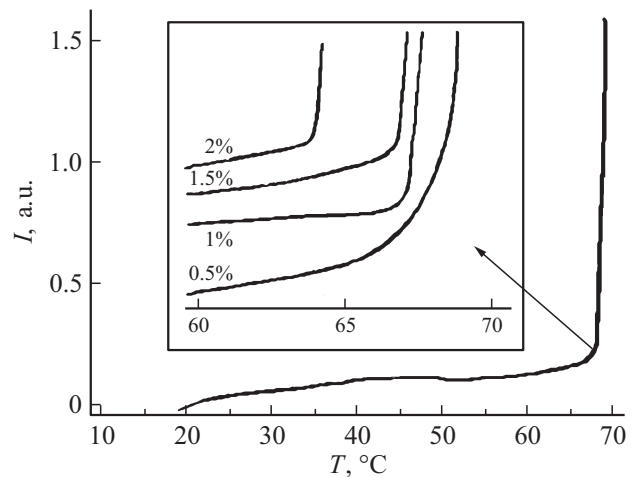


Рис. 5. Кривые температурной зависимости интенсивности тиндалевского рассеяния света.

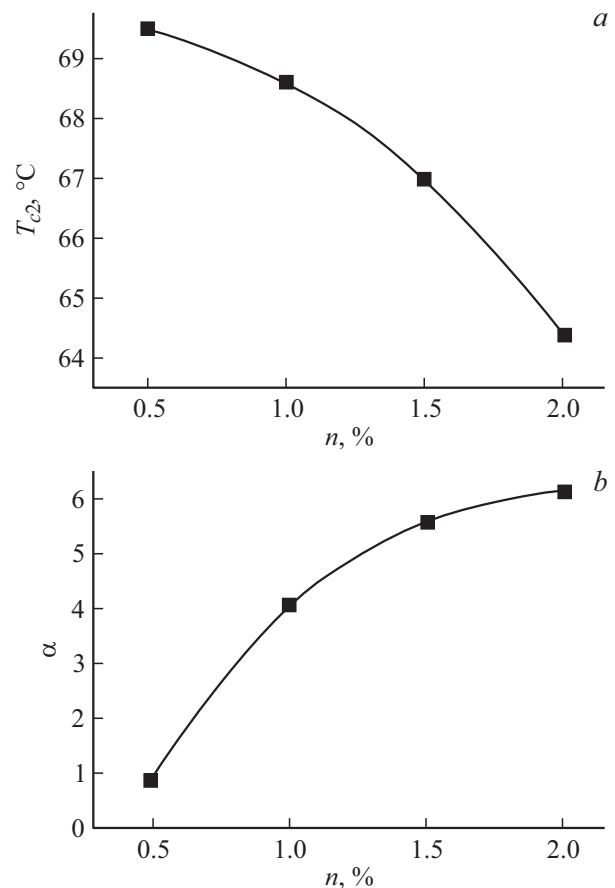


Рис. 6. Зависимость температуры T_{c2} фазового перехода, наблюдаемого нефелометрическим методом (a), и критического индекса α (b) от концентрации раствора n .

вида $I \sim (T_{c2} - T)^\alpha$, где I — измеряемая интенсивность рассеянного света, T — температура, T_{c2} — температура полной ассоциации клубков, т.е. образования бесконечного клубкового кластера, α — показатель степени, т.е.

критический индекс процесса приближения системы к перколяционному порогу в процессе совершения второй ассоциативной стадии комплексного фазового перехода „клубок—клубковый ассоциат“.

На вставке рис. 5 в увеличенном масштабе представлен температурный ход интенсивности тиндалевского рассеяния света для различных концентраций раствора альбумина (0,5, 1, 1,5 и 2 wt.%). Как показано на данном рисунке, температура начала резкого увеличения интенсивности рассеянного света зависит от концентрации раствора, причем с его увеличением температура T_{c2} , являющаяся асимптотой возрастающей нефелометрической кривой, сдвигается в сторону низких температур.

На рис. 6 представлены графики зависимости T_{c2} и критического индекса α от концентрации альбумина в растворе. Из приведенных графиков следует, что полученные зависимости монотонны.

Следует обратить внимание на то, что температура резкого возрастания интенсивности светорассеяния, как указывалось, падает с ростом концентрации, тогда как критический индекс, отражающий „скорость“ (производную по температуре) резкого подъема интенсивности светорассеяния с температурой $I(T)$, увеличивается при росте концентрации.

4. Обсуждение результатов

Совокупность полученных данных позволяет внести, как будет показано ниже, новые положения в общепринятую качественную модель механизмов термической трансформации молекул альбумина.

4.1. Плотная упаковка глобулы

Плотная упаковка глобулы сильно ограничивает способность пептидных диполей молекулы белка изменять свою ориентацию и величину дипольного момента под действием внешнего электрического поля [3] и тем самым экранировать внешнее поле. Основной причиной неспособности глобул обеспечить экранировку внешнего электрического поля, т.е. создать уверенно регистрируемый электрический отклик на внешнее электрическое воздействие, является низкая поляризуемость глобулы. Она, в свою очередь, обусловлена неспособностью глобулы ни к ориентации во внешнем электрическом поле, меняющемся с частотой 3,6 МГц, ни к ее дрейфу во внешнем поле, ни к деформационным изменениям глобулярного дипольного момента под действием внешнего поля [3].

В то же время способность к таким процессам молекул растворителя в десятки раз выше, чем у глобул, поскольку диэлектрическая проницаемость совокупности свободных молекул воды равна $\epsilon = 81$. Для физиологического раствора, т.е. смеси 0,9% раствора NaCl и 0,3% раствора $C_7H_{15}COONa$ в воде, ϵ немного меньше ($\epsilon = 76$) ввиду наличия гидратной оболочки вокруг

ионов солей. Экранирующая способность возрастает с ростом температуры и концентрации солевого раствора [8]. Отсюда следует, что экранирующая способность растворителя играет принципиальную роль в наблюдении процесса трансформации молекул альбумина при повышении температуры.

4.2. Физиологический раствор

В воде, не содержащей примесей, атом кислорода в составе молекулы воды находится в состоянии sp^3 -гибридизации, формируя тетраэдрическую конфигурацию гибридных орбиталей [9]. Две из них создают σ -связи с атомами водорода, имеющими высокую степень ионности благодаря смещению пика электронной плотности в сторону атома кислорода, а две оставшиеся заняты двумя неподеленными электронными парами, способными создавать водородные (O—H)-связи с другими молекулами воды и формировать тетраэдрическую структурную сетку воды (рис. 7, а). При растворении хлорида натрия или каприловокислого натрия в воде происходит его гидролиз: образование координационных связей между молекулами воды и ионами Na^+ , Cl^- или $C_7H_{15}COO^-$.

Встраиваясь в тетраэдрическое окружение первой координационной сферы и занимая место молекулы воды, ион Na^+ , Cl^- или $C_7H_{15}COO^-$ оказывается окруженным первым (внутренним) слоем гидратной оболочки, состоящим из 4-х молекул воды (рис. 7, б). Обратим внимание на то, что в отличие от молекулы воды, окруженной четырьмя аналогичными молекулами, все четыре связи иона Na^+ в первом слое являются координационными, так как ион Na^+ имеет электронную конфигурацию $1S^1(2)2S^1(2)2P^3(6)3S^1(0)3P^3(0)$ (верхние индексы указывают число атомных орбиталей, числа в скобках — количество электронов на них) и находится в состоянии sp^3 -гибридизации. Одна $3s$ - и три $3p$ -орбитали создают 4 пустые гибридные орбитали, принимающие на себя неподеленные пары молекул воды и создающие четыре

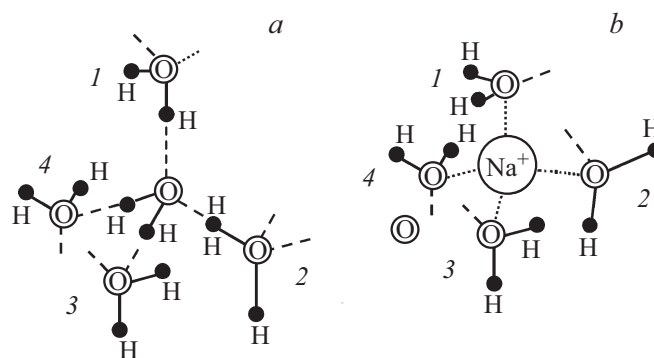


Рис. 7. Структурная сетка связей молекул воды (а) и гидратного окружения иона натрия (б). σ -связи показаны сплошными линиями, координационные связи — пунктиром, водородные связи — штрихом.

координационные связи. Выигрыш энергии при образовании координационных связей превосходит выигрыш при образовании водородных связей [10]. Более высокие координационные сферы (последующие слои) гидратной оболочки вокруг иона Na^+ формируются за счет водородных связей молекул воды с молекулами воды первой сферы и между собой. Они содержат гораздо большее число молекул воды (вторая — не менее 10, третья — более 30).

Анализируя поведение иона Cl^- с электронной конфигурацией $1s^1(2)2s^1(2)2p^3(6)3s^1(2)3p^3(6)4s^1(0)4p^3(0)$, приходим к выводу, что предельная насыщенность электронами 3-й электронной оболочки иона Cl^- обеспечивает возможность 4-й электронной оболочке создать четыре гибридные sp^3 -орбитали, также формирующие координационные связи с молекулами воды. Так образуется первый слой гидратной оболочки вокруг иона Cl^- . Аналогично этому возникают гидратные оболочки вокруг ионов $(\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}_2)^-$. Однако координационные связи иона хлора с молекулами воды менее прочны, чем иона Na^+ , и тем более иона $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{COO}^-$ [3].

Таким образом, одна трехслойная гидратная оболочка как иона Na^+ , так и ионов Cl^- или $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{COO}^-$, способна вывести из свободного состояния в физиологическом растворе несколько десятков молекул воды, переведя их в связанное состояние в составе гидратных оболочек и тем самым лишая их способности к ориентационной поляризуемости.

4.3. Расплавленная глобула

Белковая глобула также окружена большим числом диполей, состоящих из молекул воды или ионов Na^+ , Cl^- или $(\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}_2)^-$, окруженных своими гидратными оболочками. Эти элементы формируют гидратную оболочку глобулы (рис. 8).

При наложении переменного электрического поля наблюдается импедансметрический сигнал, который в основном обусловлен ориентационной и частично деформационной поляризуемостью свободных молекул воды. Действительно, поляризуемость глобулы низка, вклад дрейфа ионов $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{COO}^-$, натрия и хлора, окруженных своими оболочками, в экранировку внешнего поля на сравнительно высокой частоте регистрации (3.6 МГц), хотя и отличен от нуля, также невелик ввиду их малой дрейфовой подвижности.

В условиях присутствия внешнего переменного электрического поля при росте температуры постепенно растет ориентационная поляризуемость молекул воды благодаря разрыхлению связей между ними за счет тепловой энергии кТ, и сигнал экспериментально регистрируемого фазового отклика слабо растет. На его фоне наблюдается структура в виде серии максимумов и минимумов, полезный в отношении зондирования электрических свойств глобулы. Этот сигнал связан с тем, что за счет энергии кТ постепенно разрушается третичная структура глобулы. На начальном этапе данного

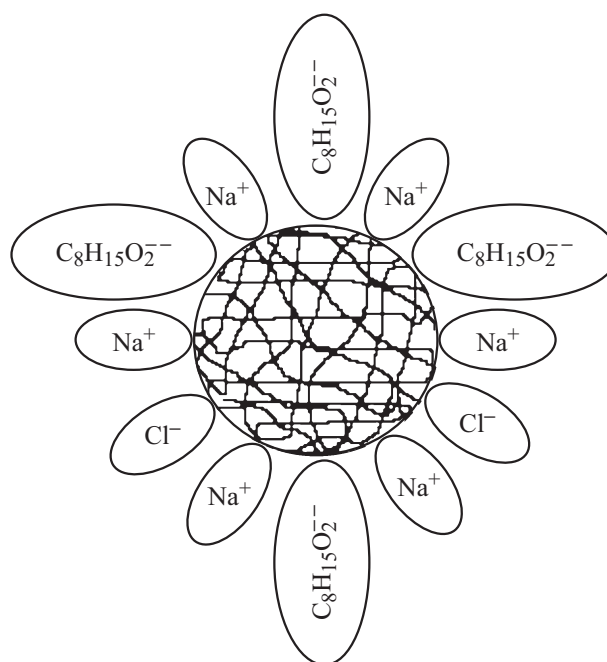


Рис. 8. Оболочка глобулы, состоящая из тетракоординированных молекул воды и ионов Na^+ , Cl^- и $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{COO}^-$, заключенных в свои гидратные оболочки. Связи, стабилизирующие гидратную оболочку глобулы, не показаны.

процесса разрушения глобула становится рыхлой. Хаотичная термическая бомбардировка глобулы молекулами воды разрывает на начальном этапе наиболее слабые связи, стабилизирующие глобулу, и степень разрыхления глобулы нарастает [11]. При этом возникающие после разрыва связей свободные гидрофильные радикалы присоединяют молекулы воды — гидратируются, в результате чего объем разрыхленной глобулы возрастает. Наряду с этим упомянутые радикалы присоединяют и ионы $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{COO}^-$, натрия и хлора, окруженные своими гидратными оболочками.

При этом целостность гидратной оболочки увеличенного размера, которая нарушается извлечением ее элементов внутрь разрыхленной глобулы, восстанавливается за счет дополнительно привлекаемых из физраствора свободных молекул воды. Таким образом, число связанных с глобулой молекул воды возрастает. Тем самым и без того ограниченное количество свободных элементов растворителя, способных экранировать внешнее электрическое поле, немонотонно изменяется, проходя через минимумы, обусловленные последовательным разрывом по мере роста кТ трех типов внутренних связей глобулы различной прочности [11]. Это приводит к немонотонной зависимости полезного сигнала от температуры, наблюдаемой на эксперименте (рис. 3).

4.4. Переход глобула — клубок

При приближении температуры к критической величине T_{c1} рыхлая глобула разворачивается в клубок

с поперечником, не менее чем на порядок превышающим поперечник глобулы (по оценкам [12] с 5 до 50 nm). Клубок остается внутри гидратной оболочки сильно увеличенного размера, модифицированной захватом извне элементов растворителя различных типов. А именно происходит термическая активизация процесса присоединения элементов растворителя (физраствора) к возрастающей по объему гидратной оболочке. Описанные процессы имеют место при совершении первого (частично термически обратимого) фазового перехода — перехода „глобула–клубок“. Импедансметрическим методом при этом регистрируется резкий спад сигнала при совершении второго — геометрического (перколяционного) — фазового перехода. Резкий спад сигнала обусловлен процессом образования бесконечного кластера из контактирующих друг с другом глобул в гидратных оболочках, между которыми полностью отсутствует свободная вода. Таким образом, здесь совершается фазовый переход, обусловленный нарастающим дефицитом свободных молекул воды в физрастворе из-за их включения в состав гидратных оболочек нарастающего числа вновь и вновь разворачивающихся глобул. Все это совершается в интервале температур 30–38°C. Сказанное иллюстрируется рис. 3, причем экстраполяция степенной функции спада фазового сдвига к его нулевому значению дает величину T_{c1} , варьирующую в пределах от 38 до 53°C и определяемую концентрацией раствора. При температуре T_{c1} образуется, как указывалось, бесконечный перколяционный кластер, состоящий из наноразмерных белковых клубков, заключенных в свои гидратные оболочки и поглотивших из растворителя львиную долю свободных молекул воды, способных экранировать внешнее электрическое поле. Однако полного нуля фазового сигнала на эксперименте не наблюдается (рис. 3), так как продолжающееся повышение температуры приводит к разрыхлению внешних слоев гидратных оболочек клубков, что сопровождается постепенным отрывом от них наименее прочно связанных молекул воды. Способность всей системы к экранированию внешнего поля медленно возрастает с температурой. Это соответственно приводит к некоторому возрастанию ТИМ сигнала. В конце концов при дальнейшем нагреве импедансметрический сигнал перестает изменяться, приближаясь к постоянному значению (рис. 3).

Использованный в настоящей работе в дополнение к ТИМ методу, оптический (нефелометрический) метод регистрации свойств бесконечного кластера, состоящего из элементов с поперечниками нанометрового диапазона, не может, как и термоимпедансметрия, давать информацию об индивидуальных свойствах белковых клубков внутри гидратных оболочек. Действительно, световые волны с длинами микрометрового диапазона (380–760 nm) при своем взаимодействии с совокупностью вплотную расположенных нанометровых элементов с характерными размерами до 100 nm воспринимают такую систему как сплошную среду. Отсюда следует,

что процесс образования наноэлементного перколяционного кластера, инициируемого фазовым переходом глобула–клубок, разумно исследовать либо, как описано выше, с помощью электрических методов, либо с помощью излучения с длинами волн порядка единиц нанометров, т. е. излучения рентгеновского диапазона. Последнее может привести к необратимым изменениям состояния белковых молекул, искажая результаты измерений.

При анализе экспериментальных результатов мы исходим из того, что фазовый переход глобула–клубок является фазовым переходом первого рода, так как требует для своего совершения подводимой извне энергии [13], в частности, термической. При таком переходе в общем случае скачком меняются первичные параметры материала, такие как плотность, симметрия структурных элементов, коэффициент преломления, коэффициент поглощения и т. п. [14]. Для глобулы, разворачивающейся в клубок, данными параметрами являются ее плотность и коэффициент оптического поглощения в ИК области в полосах поглощения воды, так как связанная вода гидратной оболочки имеет иной колебательный спектр, нежели свободная [15].

В то же время перколяционный фазовый переход с образованием бесконечного клубкового кластера представляет собой геометрический фазовый переход второго рода, не требующий подведения энергии [16,17], а требующий лишь создания условий для своего совершения в виде формирования элементов новой фазы в толще старой. При фазовом переходе второго рода скачком меняются вторичные параметры материала: теплоемкость (dQ/dT), сжимаемость (dV/dP), электрическая восприимчивость (dP_{dip}/dE_{el}) [13]. Для раствора белков вторичным параметром является меняющаяся электрическая восприимчивость системы (dP_{dip}/dE_{el}), что использовано нами при постановке эксперимента.

Оба рода фазовых переходов характеризуются при приближении к точке перехода степенной (критической) зависимостью параметра порядка. Для перехода глобула–клубок параметром порядка служит плотность тех связей в глобуле, которые разрушаются при разворачивании в клубок [11,18].

Величины критических индексов (показатели степени упомянутых зависимостей) для фазовых переходов первого рода лежат в области „малых“ значений критических индексов (около 0.001–0.01), тогда как величины критических индексов фазовых переходов второго рода лежат в области „больших“ значений критических индексов (около 0.3–2.7). Такие значения критических индексов типичны для теории протекания (перколяции) [16], что и наблюдается нами в ТИМ экспериментах (рис. 4).

4.5. Клубковые ассоциаты

При нагреве раствора белка до температур, выходящих далеко за область насыщения ТИМ кривой, происходит термическое разрушение гидратных оболочек

белковых клубков, что позволяет им ассоциироваться друг с другом за счет ван-дер-ваальсовых связей [15] с образованием клубковых конгломератов (ассоциатов), поперечники которых относятся к микрометровому диапазону. Разрушение гидратных оболочек клубков представляет собой пример фазового перехода первого рода, так как требует для своего совершения подвода внешней термической энергии. В то же время слипание клубков друг с другом в процессе формирования клубковых ассоциатов является фазовым переходом второго рода, не требующим подвода энергии извне. Условием образования бесконечного перколяционного кластера из клубковых ассоциатов является предшествующее этому совершению фазового перехода первого рода, связанного, как указывалось, с термическим разрушением гидратных оболочек белковых клубков.

Поскольку в данном случае бесконечный кластер образован клубковыми ассоциатами с поперечниками микрометрового диапазона, зондирование их свойств оказывается возможным с помощью оптического излучения видимого диапазона. Экспериментально результат зондирования, показывающий образование ассоциатов, выражается в виде резкого возрастания интенсивности тиндалевского рассеяния света. Причем при приближении температуры к точке T_{c2} и образовании бесконечного кластера из белковых клубков интенсивность светорассеяния растет по степенному закону, как и предписано перколяционному фазовому переходу [16] (рис. 5), а соответствующие критические индексы относятся к категории „больших“ (рис. 5). Опыт показывает, что данный фазовый переход является в отличие от предыдущего необратимым.

Таким образом, полученные нами „большие“ значения электрических и оптических критических индексов подтверждают правомочность применения теории перколяции к растворам белков. Кроме того, полученные нами экспериментальные значения величин критических индексов с определенностью свидетельствуют о совершении электрического и оптического перколяционных фазовых переходов, наблюдаемых, как указывалось, либо за счет снижения диэлектрической восприимчивости системы при извлечении из растворителя свободных молекул воды, либо за счет роста интенсивности тиндалевского рассеяния света при образовании клубковых ассоциатов микрометрового размера.

Обратим внимание на то, что как в случае термоимпедансметрии, так и в случае термонейлометрии температуры T_{c1} и T_{c2} обоих фазовых переходов уменьшаются с ростом концентрации альбумина в растворе. Критические индексы, отражающие резкость термического изменения экспериментально наблюдаемых величин (будь то импедансметрия или нефелометрия), напротив, увеличиваются с концентрацией. Объяснение данного факта, с нашей точки зрения, заключается в том, что рост концентрации альбумина сопровождается в обоих случаях увеличением вероятности возникнове-

ния бесконечного перколяционного кластера при росте концентрации альбумина.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что методами импедансметрии и нефелометрии экспериментально зафиксированы многостадийные комплексные фазовые превращения в растворах сывороточного альбумина со следующими стадиями: глобула—расплавленная глобула—клубок—клубковый ассоциат—бесконечный клубковый кластер.

Заключение

Резюмируя, следует сказать, что в настоящей работе показана возможность непосредственного наблюдения импедансметрическим методом поэтапного разрыхления в температурном интервале 20–40°С белковой глобулы в растворе альбумина, завершающегося фазовым переходом „глобула—клубок“, который инициирует формирование бесконечного перколяционного кластера, состоящего из белковых клубков, окруженных гидратными оболочками. Этот двустадийный фазовый переход предшествует (на 20°С) последующему, также двустадийному фазовому переходу: лавинообразному заполнению объема раствора белка сеткой слипшихся друг с другом макроскопических клубковых конгломератов в интервале температур 60–70°С. Данный фазовый переход, инициированный термическим разрушением гидратных оболочек белковых клубков, является также двустадийным и наблюдается оптическим методом путем контроля интенсивности тиндалевского рассеяния света.

Учитывая то важное обстоятельство, что альбумин является главным белком спинно-мозговой жидкости (ликвора), можно констатировать, что экспериментально полученная в настоящей работе информация способна расширить возможности диагностики патологий центральной нервной системы человека и животных после установления корреляции между параметрами комплексного фазового перехода в ликворе и конкретными видами патологий [2,19,20].

Список литературы

- [1] *Иллариошкин С.Н.* Конформационные болезни мозга. М.: Янус-К, 2003.
- [2] *Иванова Н.Е., Шадрин Е.Б., Васькова Н.Л., Пашкевич М.Э.* // Успехи современного естествознания. 2015. С. 568–571.
- [3] *Волькенштейн М.В.* Биофизика. М.: Наука, 1988: *Кришталлик Л.И.* // УФН. 2012. Т. 182. № 12.
- [4] *Ильинский А.В., Иванова Н.Е., Шадрин Е.Б., Юткина Н.Л.* Устройство для определения электрических параметров жидкой среды. Патент на изобретение № 2205392, 27.05.2003.
- [5] *Калашиников С.Г.* Электричество. М.: Физматлит, 2003.
- [6] *Эфрос А.Л.* Физика и геометрия беспорядка. М.: Наука, 1982.

- [7] *Васильев А.Н.* Квантовополевая ренормгруппа в теории критического поведения и стохастической динамике. Изд-во ПИЯФ, СПб. 1998.
- [8] *Gavish N., Promislow K.* // arXiv:1208.5169v2 [Physics.chem-ph] 1 Jul 2016.
- [9] *Зиганшин М.А., Горбачук В.В.* Курс лекций по физической и коллоидной химии. Изд-во Каз. ун-та Казань, 2007; *Семиохин И.А.* Физическая химия: Учебник. Изд-во МГУ, 2001.
- [10] *Hoffner G., Djian P.* // Biochemie. 2002. Vol. 84. P. 273–278.
- [11] *Финкельштейн А.В., Птицын О.Б.* Физика белка. М. КДУ, 2012.
- [12] *Гросберг А.Ю., Хохлов А.Р.* Статистическая физика макромолекул. М.: Наука, 1989. 344 с.
- [13] *Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М.* Теоретическая физика. Т. 5. М.: Наука, 1988.
- [14] *Гантмахер В.Ф., Долгополов В.Т.* // УФН 2008. Т. 178. Вып. 1. С. 3–24.
- [15] *Финкельштейн А.В.* Физика белковых молекул. Изд-во инс-т комп. исследований, 2014. 424 с.
- [16] *Шкловский Б.И., Эфрос А.Л.* // УФН. 1975. Т. 117. Вып. 3. С. 401–435.
- [17] *Эфрос А.Л.* Физика и геометрия беспорядка. М.: Наука, 1982.
- [18] *Давыдов А.С.* Биология и квантовая механика. Киев: Наукова думка, 1979.
- [19] *Иванова Н.Е., Шадрин Е.Б., Васькова Н.Л.* // Саратовский научно-медицинский журнал. 2013. Т. 9. № 1. С. 71–77.
- [20] *Капралова В.М., Назарова Е.А., Иванова Н.Е., Шадрин Е.Б.* Конформационные изменения альбумина как диагностический параметр // НТВ СПбГПУ. Физ. мат. науки. 2012. Т. 3 (153). С. 83–91.