

# Исследование влияния оксиэтилированного глицерина со степенью полимеризации $n = 25$ на конформационную стабильность гемоглобина человека

Ю.С. Говорова, А.В. Зинченко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Investigation of Influence of Oxyethylated Glycerol with Polymerization Degree $n = 25$ on Conformational Stability of Human Hemoglobin

Yu.S. Govorova, A.V. Zinchenko

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Консервирование биологических систем с использованием низких температур в последние десятилетия получило широкое развитие [А.М. Белоус, В.И. Грищенко, 1994]. Начальный этап криоконсервирования биологических объектов – инкубирование с криозащитными средами. Этот процесс может вызывать определенные изменения в пространственной организации белков, что отражается на их термоденатурации. Одним из прямых экспериментальных подходов в исследовании термоденатурации белков является дифференциальная сканирующая калориметрия, позволяющая оценить термодинамические и кинетические параметры плавления макромолекул [G. Bruylants, 2005]. Оксигэтилированный глицерин со степенью полимеризации  $n = 25$  (ОЭГ <sub>$n=25$</sub> ) – новый криопротектор экзоцеллюлярного действия, показавший хорошие результаты при криоконсервировании эритроцитов человека [А.М. Компаниец, В.В. Чеканова, 2012]. В настоящей работе методом дифференциальной сканирующей калориметрии на основе анализа пика плавления проведено исследование влияния ОЭГ <sub>$n=25$</sub>  на термодинамические и кинетические параметры денатурации гемоглобина человека. Концентрация криопротектора составляла от 0 до 50%.

Термограммы регистрировали на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4 (Россия). Область сканирования – от 25 до 90°C при избыточном давлении 2,5 атм. Скорость нагрева – 1 град/мин.

Процесс денатурации гемоглобина (HbA) необратимый и описывается двустадийной моделью  $N \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} U \xrightarrow{k_2} D$ , включающей частичное обратимое разворачивание белка (стадия 1) и необратимую денатурацию (стадия 2) [P.S. Santiago, 2010]. Кинетический анализ проводился согласно методике, приведенной в литературе для подобных моделей денатурации белков [А. Любарев, 2000].

Нами были рассчитаны температуры, калориметрические энтальпии, а также энергии активации процесса денатурации гемоглобина в зависимости от концентрации криопротектора. Показано, что повышение концентрации ОЭГ <sub>$n=25$</sub>  в растворе гемоглобина приводит к понижению стабильности пространственной структуры белка. Проведен сравнительный анализ влияния на конформационную стабильность гемоглобина криопротекторов ОЭГ <sub>$n=25$</sub>  и ОЭГ <sub>$n=5$</sub> .

Preservation of biological systems using low temperatures has been widely developed in the last decades [A.M. Belous, V.I. Grischenko, 1994]. The initial stage of cryopreservation of biological objects is incubating in cryoprotective media. This process can cause some changes in the spatial organization of proteins, reflected in their thermodenaturation features. One of the direct experimental approaches in the study of proteins thermodenaturation is differential scanning calorimetry that permits to assess the thermodynamic and kinetic parameters of macromolecules melting [G. Bruylants, 2005]. Oxyethylated glycerol with polymerization degree  $n = 25$  (OEG <sub>$n=25$</sub> ) a new cryoprotectant with exocellular affect, revealed good effect for the cryopreservation of human erythrocytes [A.M. Kompaniets, V.V. Chekanova, 2012]. Differential scanning calorimetry was applied to study the influence of OEG <sub>$n=25$</sub>  on the thermodynamic and kinetic parameters of the denaturation of human hemoglobin on the basis of melting peak analysis.

Thermograms were recorded on a differential scanning adiabatic microcalorimeter DASM-4 (Russia). Scan area was from 25 to 90°C at a excess pressure of 2.5 atm. Heating rate was 1 deg/min.

The process of denaturation of hemoglobin (HbA) is irreversible and is described by two-stage model  $N \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} U \xrightarrow{k_2} D$ , including the partial reversible unfolding of the protein (Stage 1) and the irreversible denaturation (Stage 2) [P.S. Santiago, 2010]. The kinetic analysis was carried out according the technique reported for similar models of proteins denaturation [A. Lyubarev, 2000].

We calculated temperatures, calorimetric enthalpies and activation energies of hemoglobin denaturation depending on concentration of cryoprotectant. It was shown that increasing of OEG <sub>$n=25$</sub>  concentration in hemoglobin solution led to the decreasing of the stability of protein spatial structure. Comparative analysis of the influence of OEG <sub>$n=25$</sub>  and OEG <sub>$n=5$</sub>  cryoprotectants on hemoglobin conformational stability was also carried out.

