

УДК 57.536.483

К.Р. Григорян*, Ш.А. Маркарян, М.Г. Азнаурян

Влияние диметилсульфоксида и диэтилсульфоксида на термическую денатурацию человеческого сывороточного альбумина

UDC 57.536.483

K.R. GRIGORYAN*, S.A. MARKARIAN, M.G. AZNAURYAN

Effect of Dimethyl Sulfoxide and Diethyl Sulfoxide on Thermal Denaturation of Human Serum Albumin

Методами электронной и флуоресцентной спектроскопии изучено влияние диметилсульфоксида (ДМСО) и диэтилсульфоксида (ДЕСО) на термическую (тепловую и холодовую) денатурацию сывороточного альбумина человека в температурном интервале от -20 до 90°C . Выявлено, что при тепловой денатурации в присутствии ДЭСО наблюдается переход кислотного характера при температуре $47,61^{\circ}\text{C}$, а при холодной денатурации прямые гидрофобные взаимодействия сульфоксидов с поверхностью белка приводят к образованию стабильной “ледяной” оболочки, которая предохраняет белок от необратимых структурных изменений.

Ключевые слова: альбумин, термическая денатурация, электронная спектроскопия, флуоресцентная спектроскопия, диметилсульфоксид, диэтилсульфоксид.

Методами електронної та флуоресцентної спектроскопії досліджено вплив диметилсульфоксиду (ДМСО) і діетилсульфоксиду (ДЕСО) на термічну (теплову та холодову) денатурацію сироваткового альбуміну людини в температурному інтервалі від -20 до 90°C . Встановлено, що за теплової денатурації у присутності ДЕСО спостерігається перехід кислотного характеру при температурі $47,61^{\circ}\text{C}$, а за холодової денатурації прямі гідрофобні взаємодії сульфоксидів з поверхнею білка приводять до появи стабільної “льодяної” оболонки, яка захищає білок від необоротних структурних змін.

Ключові слова: альбумін, термічна денатурація, електронна спектроскопія, флуоресцентна спектроскопія, диметилсульфоксид, діетилсульфоксид.

The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) and diethyl sulfoxide (DESO) on thermal (heat and cold) denaturation of human serum albumin within temperature range from -20 to 90°C was investigated by electron and fluorescent spectroscopy. It has been established that at heat induced denaturation in the presence of DESO an acid-neutral transition was observed at 47.61°C . It was shown that at cold induced denaturation the direct hydrophobic interactions of sulphoxide molecules with protein surface result in the formation of stable “ice” layer, providing the protein protection from irreversible structure changes.

Keywords: albumin, thermal denaturation, electron spectroscopy, fluorescent spectroscopy, dimethyl sulfoxide, diethyl sulfoxide.

Денатурированная форма белка – структурное состояние, которое зависит от вида денатурации (нагревание, замораживание, влияние давления), и свойств среды (соразтворитель, pH, ионная сила) [11, 16, 21]. В нативном белке доминируют нековалентные сегмент-сегментные взаимодействия, а также взаимодействия аминокислотных остатков с молекулами окружающего растворителя. В “разворачивании” белка растворитель играет главную роль, так как межмолекулярные взаимодействия модулируются свойствами и составом растворителя.

Для защиты биологических молекул при замораживании используют различные криозащитные вещества: натуральные сахара, обеспечивающие

Denaturated form of protein is a structural state depending on denaturation type (heating, freezing, pressure effect) as well as medium properties (cosolvent, pH, ionic strength) [11, 16, 21]. In native protein the non-covalent segment-segment interactions prevail as well as those of amino acid residues with molecules of surrounding solvent. In protein unfolding the solvent plays the main role, since intermolecular interactions are modulated by the solvent properties and composition.

To protect biological molecules during freezing different cryoprotective agents are used: natural sugars, providing the protection without penetration into a cell; polyalcohols, alcohols, glycerol, penetrating

Ереванский государственный университет

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. А. Манукяна 1, Ереван, Армения 0025; факс: (+37410) 57-64-21; электронная почта: kara@ysu.am

Yerevan State University, Yerevan, Armenia

* To whom correspondence should be addressed: 1, A. Manukyan str., Yerevan, Armenia; fax: (+387410) 57 6421, e-mail: kara@ysu.am

защиту без проникновения в клетку; полиспирты, глицерин, которые проникают в клетку и уменьшают вероятность образования кристаллов льда. Установлено, что растворы, содержащие диметилсульфоксид (ДМСО), диэтилсульфоксид (ДЭСО), являются эффективными криопротекторами [5, 14, 23]. Криопротекторные свойства ДМСО обусловлены его способностью замещать молекулы воды, связанные с клеточными элементами, и влиять на структуру воды.

В работах [13, 15] приведены результаты исследования структурных особенностей водных растворов ДМСО и ДЭСО. В настоящее время изучается поведение биологических молекул в смешанных растворителях. В работах [3, 7, 12] приведены данные об изменении термостабильности ДНК, фосфолипидных липосом и *E. coli* в зависимости от количества добавляемого соразтворителя – диалкилсульфоксида.

Цель работы – изучить влияние ДМСО и ДЭСО на температурные зависимости спектральных свойств сывороточного альбумина человека в температурном интервале $-20...90^{\circ}\text{C}$.

Материалы и методы

Использовали сывороточный альбумин человека (САЧ) с содержанием жирных кислот менее 0,005% и ДМСО (Sigma, США), раствор хлорида натрия (“Ликвор”, Армения). ДЭСО был синтезирован и очищен согласно методике [4]. Во всех экспериментах растворы белка готовили на основе бинарной смеси раствора хлорида натрия и сульфоксида. В работе использовали одинаковую концентрацию белка 0,4 мг/мл. Концентрацию белка в растворе определяли с помощью УФ-спектроскопии при $\lambda = 280$ нм. Молярный коэффициент поглощения принимали равным $36,500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Концентрация ДМСО составляла 7,5–37,5%, ДЭСО – 0,25–25,0% (v/v).

УФ-спектрометрические измерения проводили с помощью спектрометра Specord 50PC (Германия) и термостата Lauda A100 (Германия). Скорость сканирования температуры составляла $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Кривые плавления нормировали (от 0 до 1) с помощью компьютерной программы ORIGIN 7.5. Для анализа кривых плавления использовали модель Эйринга и Ламри “нативный белок – обратимая денатурация – необратимая денатурация”. По кривым плавления определяли температуру отдельных стадий денатурации белка с абсолютной погрешностью расчета $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$.

Флуоресцентные измерения проводили с помощью флуоресцентного спектрофотометра Varian Cary Eclipse (Австралия) в температурном интервале $-20...20^{\circ}\text{C}$. Спектры регистрировали в интервале $\lambda = 310-450$ нм при длине волны возбуждения

into a cell and preventing ice crystal formation. It has been established that the solutions, containing dimethyl sulfoxide (DMSO), diethyl sulfoxide (DESO), are effective cryoprotectants [5, 14, 23]. Cryoprotective properties of DMSO are stipulated by its ability to substitute water molecules, bound with cell elements and affect water structure.

Structural peculiarities of DMSO and DESO aqueous solutions are presented in the [13, 15]. At present the behavior of biological molecules in mixed solvents has been studied. The effect of added cosolvent, dialkyl sulfoxide, on the thermostability of DNA, phospholipid liposomes and *E. coli* is presented in [3, 7, 12].

The aim of the research is to study the effect of DMSO and DESO on temperature dependences of spectral properties of human serum albumin within temperature range of $-20...90^{\circ}\text{C}$.

Materials and methods

Human serum albumin (HSA) with the content of fatty acids less than 0.005% and DMSO (Sigma, USA), sodium chloride solution (“Likvor”, Armenia) were used. DESO was synthesized and purified according to the method [4]. In all the experiments the solutions were prepared using binary mixture of sodium chloride and sulfoxide solution. The same protein concentration of 0.4 mg/ml was used. The protein concentration was determined by UV-spectroscopy at $\lambda = 280$ nm, using molar coefficient of absorption of $36.500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. The concentrations of DMSO and DESO were kept 7.5–37.5%, and 0.25–25.0% (v/v), correspondingly.

UV spectrometric measurements were performed using spectrometer (Specord 50PC, Germany) and thermostat (Lauda A100, Germany). The temperature scanning rate was $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. The melting curves were normalized (from 0 to 1) using computer software ORIGIN 7.5. For analysis of melting curves the model of Eyring and Lamry “native protein – reversible denaturation – irreversible denaturation” was used. From melting curves the temperature of certain denaturation stages was determined with absolute accuracy of calculations of $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$.

Fluorescent measurements were performed by the fluorescent spectrophotometer (Varian Cary Eclipse, Australia) within temperature interval $-20...20^{\circ}\text{C}$. The spectra were recorded within the range $\lambda = 310-450$ nm and excitation wavelength $\lambda = 295$ nm. The width of excitation and emission slits was 5 nm. For low temperature measurements the cryostat Optistat DN (Oxford Instruments, UK) was used. The studied samples were placed into cryostat at room temperature, afterwards the temperature was lowered with liquid nitrogen. The temperature reduction with the rate of $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ($\pm 0.1^{\circ}\text{C}$) was controlled by the temperature controller (ITC-502S, UK). The melting curves of

$\lambda = 295$ нм. Значения ширины входной и выходной щелей составляли 5 нм. Для низкотемпературных измерений использовали криостат Optistat DN (Oxford Instruments, Великобритания). Исследуемые образцы помещали в криостат при комнатной температуре, после чего снижали температуру жидким азотом. Понижение температуры со скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) контролировали с помощью температурного регулятора ИТС-502S (Великобритания). Кривые плавления холодовой денатурации нормировали (от 0 до 1) с помощью компьютерной программы ORIGIN 7.5.

Измерения pH проводили на pH-метре Jenway 4330 (Великобритания). Абсолютная погрешность измерения составляла $\pm 0,003$ единиц pH.

Результаты и обсуждение

Сывороточный альбумин человека является одним из важнейших транспортных белков плазмы крови и составляет 60% от общего количества сывороточных белков. Третичная структура альбумина сформирована из трех доменов (I, II, III), которые образуют сердцевидную молекулу. Аминокислотная последовательность и структура доменов сходны. На поверхности белка расположено одинаковое число гидрофильных и гидрофобных аминокислотных остатков, контактирующих с водным раствором. Выявлено, что все домены альбумина подвергаются денатурации независимо друг от друга [18].

Влияние ДМСО и ДЭСО на тепловую денатурацию альбумина исследовали при $20\text{--}90^\circ\text{C}$ методом УФ-спектроскопии. В этих условиях термическое “разворачивание” альбумина описывается многоступенчатым механизмом по аппроксимационной модели Эйринга и Ламри [19], согласно которой денатурация альбумина имеет обратимую и необратимую стадии. Первая стадия – превращение “нативный белок – обратимое развернутое состояние” ($63,20^\circ\text{C}$), вторая – необратимая денатурация ($74,30^\circ\text{C}$).

На рис. 1 приведены УФ-профили термической денатурации альбумина в присутствии ДМСО и ДЭСО, по которым определяли температуру обратимой T_{m1} и необратимой T_{m2} денатурации (приведены в таблице). В присутствии ДЭСО кривая денатурации характеризуется трехступенчатым переходом: дополнительно появляется переход при $47,61^\circ\text{C}$ (T_{m3}). Ход кривой указывает на наличие трех форм, что можно объяснить изменением pH растворов. Из данных таблицы следует, что в присутствии ДМСО pH растворов практически не изменяется, а в присутствии ДЭСО – резко падает до 3,5. Кислотно-денатурированная форма белков описывается как состояние “расплавленной глобулы”, т. е. как преобладающая промежуточная форма

денатурации были нормализованы (от 0 до 1) с помощью ORIGIN 7.5 software.

Measurements of pH values were performed on pH-meter Jenway 4330 (UK). Absolute accuracy of measurements was ± 0.03 pH units.

Results and discussion

Human serum albumin is one of the most important blood plasma transport proteins and makes 60% of total amount of serum proteins. Tertiary structure of albumin developed of three domains (I, II, III) form heart-shaped molecule. Amino acid sequence and structure of domains are similar. On the protein surface the same number of hydrophilic and hydrophobic amino acid residues, being in contact with aqueous solution are located. It has been revealed that all albumin domains denature independently [18].

The effect of DMSO and DESO on heat denaturation of albumin was studied at $20\text{--}90^\circ\text{C}$ by UV-spectroscopy method. Under these conditions the thermal “unfolding” of albumin is described by multistep mechanism according to Eyring and Lamry approximation model, according which the albumin denaturation has reversible and irreversible stages. The first stage is the transformation of “native protein – reversible unfolded state” (63.20°C), the second one is irreversible denaturation (74.30°C).

Fig. 1 shows the UV-profiles of thermal denaturation of albumin in the presence of DMSO and DESO by means of which the temperature values of reversible T_{m1} and irreversible T_{m2} denaturations were found (shown in Table). In the presence of DESO the denaturation curve is characterized by three-step transition: additional transition appears at 47.61°C (T_{m3}). The trend of curve points to the presence of three forms that may be explained by the change in pH of solutions.

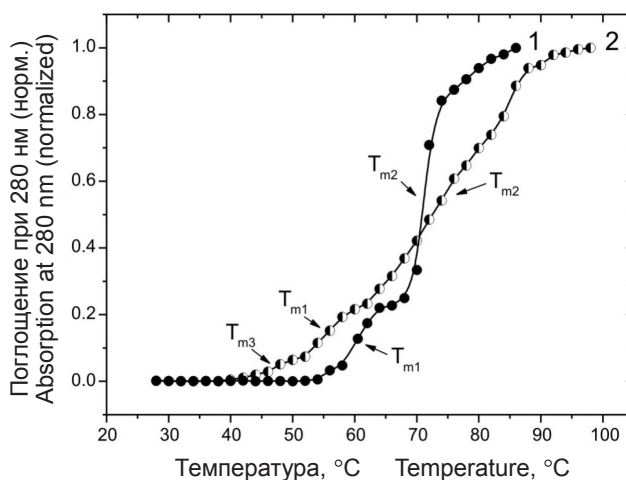


Рис. 1. УФ-профили термической денатурации альбумина в присутствии 15% ДМСО (1) и 25% ДЭСО (2).

Fig. 1. UV-profiles of thermal denaturation of albumin in the presence of 15% DMSO (1) and 25% DESO (2).

Значения температуры плавления альбумина
в присутствии ДМСО и ДЭСО
Values of melting temperature of albumin in the
presence of DMSO and DESO

Растворитель Solvent	pH	Температура денатурации, °C enaturation temperature, °C		
		T _{m1}	T _{m2}	T _{m3}
H ₂ O*	7,4	63,43	74,35	–
H ₂ O#	7,4	63,20	74,30	–
H ₂ O#	4,3	63,10	74,00	46,20
ДМСО-H ₂ O MSO-H ₂ O	7,5	59,99	74,52	–
ДЭСО-H ₂ O ESO-H ₂ O	3,5	51,85	74,44	47,61

Примечание: * – полученные данные; # – данные [19].

Notes: * – finding data; # – data of [19].

ма белка при денатурации между нативной и денатурированной [17]. Известно, что белки могут формировать “расплавленную глобулу”, если гидрофобные взаимодействия имеют сравнительно сильный и быстрый характер [8]. На рис. 2 приведены флуоресцентные спектры альбумина в присутствии ДМСО при 20°C. Установлено, что с увеличением концентрации ДМСО (с 7,5% до 37,5%) наблюдаются повышение интенсивности флуоресценции триптофана и коротковолновое смещение эмиссии, что свидетельствует о возрастании гидрофобности микроокружения триптофана в присутствии ДМСО.

Таким образом, при высоких концентрациях ДМСО прямые гидрофобные взаимодействия сульфоксидов с поверхностью белка могут приводить к денатурации альбумина. Этот эффект проявляется при более низких концентрациях ДЭСО. При интерпретации данных тепловой денатурации альбумина в присутствии ДЭСО важно учитывать изменение pH растворов.

Многие белки находятся в нативном состоянии при 10...40°C, при более высоких температурах происходит обратимая денатурация, а при низких температурах – холодная денатурация [20]. Многие физико-химические свойства белков зависят от изменения структуры растворителя вследствие снижения температуры [6, 9]. В водных растворах понижение температуры приводит к образованию большой фракции гексагонального льда, при этом неполярные группы белка экспонируют в льдообразную водную фазу и происходит холодная денатурация [22].

Сывороточный альбумин человека содержит только один триптофановый остаток (Trp-214), который погружен в гидрофобную полость в домене

From table it follows that in the presence of DMSO the pH of the solutions does not practically change and in the presence of DESO sharply reduces down to 3.5. Acid-denaturated form of proteins is described as an intermediate form of protein at denaturation between native and denaturated one [17]. It is known that proteins can form “molten globule” if hydrophobic interactions are strong and rapid [8]. Fig. 2 demonstrates the fluorescent spectra of albumin in presence of DMSO at 20°C. It has been established that with the increase of DMSO concentration (from 7.5 up to 37.5%) an increase of fluorescence intensity for tryptophan and short wave shift of the emission is observed that testifies to a rising hydrophobicity of tryptophan microenvironment in the presence of DMSO.

Thus, under high concentrations of DMSO the direct hydrophobic interactions of sulfoxides with protein surface may lead to albumin denaturation. This effect is manifested under lower DESO concentrations. When interpreting the data on heat denaturation of albumin in the presence of DESO it is important to consider the changes in solution pH values.

Many proteins are in native state at 10...40°C, under higher temperatures reversible denaturation takes place and the cold induced denaturation under low temperatures [20]. Many physical and chemical properties of proteins depend on the changes in the solvent structure due to temperature reduction [6, 7]. In aqueous solutions the temperature lowering results in the formation of big fraction of hexagonal ice, herewith non-polar groups of proteins contact with ice forming aqueous phase and the cold denaturation takes place [22].

Human serum albumin contains only one tryptophan residue (trp-214), immersed into hydrophobic

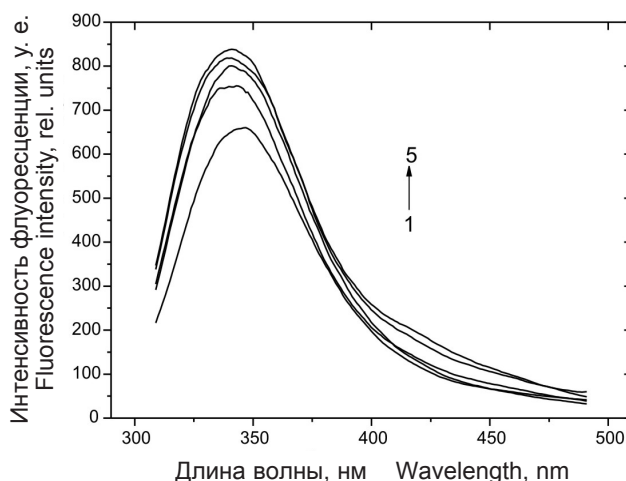


Рис. 2. Спектры флуоресценции альбумина в присутствии ДМСО (1 – 0%; 2 – 7,5%; 3 – 18,75%; 4 – 30,0%; 5 – 37,5%) при температуре 20°C и длине волны возбуждения 295 нм.

Fig. 2. Fluorescence spectra of albumin in the presence of DMSO (1 – 0%; 2 – 7.5%; 3 – 18.75%; 4 – 30.0%; 5 – 37.5%) at 20°C and 295 nm excitation wavelength.

II. Флуоресценция триптофана в нативных белках чувствительна к изменениям полярности окружающей среды. С понижением температуры интенсивность флуоресценции триптофана увеличивается, однако максимум эмиссии и форма спектра не меняются, что можно объяснить изменением экранирования триптофанового остатка. При дальнейшем понижении температуры резко снижается интенсивность флуоресценции и раствор альбумина переходит в кристаллическое состояние. Последующее повышение температуры (до 20°C) приводит к восстановлению спектральных характеристик флуоресценции. По спектральным характеристикам после отогрева замороженной плазмы крови можно установить изменение состояния поверхностных (полярных и неполярных) участков белков плазмы [2]. Наши исследования показали, что спектральные характеристики альбумина восстанавливаются после отогрева, что свидетельствует об обратимом характере происходящих структурных изменений.

На рис. 3 представлены флуоресцентные профили холодной денатурации альбумина в присутствии ДМСО и ДЭСО в температурном интервале -20...20°C. При отсутствии сульфоксидов низкотемпературные исследования невозможны, так как раствор замерзает. Флуоресцентные профили денатурации характеризуются двухступенчатым переходом: в случае ДМСО $T_{c1} = 10,86^\circ\text{C}$ и $T_{c2} = -1,38^\circ\text{C}$; ДЭСО – $T_{c1} = 12,75^\circ\text{C}$ и $T_{c2} = -1,94^\circ\text{C}$. Нелинейное изменение спектральных характеристик при температурах ниже 0°C отражает поэтапное затормаживание подвижности кооперативной водно-белковой матрицы. В работе [1] показано, что при температурах -10...-20°C замерзают слабосвязанные с белком слои воды, а при -50...-60°C замерзает близлежащая к белку вода, составляющая кооперативную систему с его поверхностными областями. Как видно из полученных данных, воздействие, достигаемое при использовании ДМСО (20%), проявляется при более низких концентрациях ДЭСО (0,25%).

Возможно, влияние органического соразвителя на процесс денатурации белка объясняется изменением полярности растворителя. В случае диалкилсульфоксидов полярность соразвителя не играет определяющей роли, так как диэлектрические константы ДМСО и ДЭСО практически не отличаются в температурном интервале 20...50°C (диэлектрические константы изменяются с 46,6 до 43,0 и с 44,1 до 39,4 соответственно) [10]. Фактически полярность растворителя не может рассматриваться как важный фактор денатурации альбумина в присутствии ДМСО и ДЭСО. Молекулы ДМСО взаимодействуют с поверхностью белка в основном за счет гидрофобных взаимодействий,

cavity in the domain II. Tryptophan fluorescence in native proteins is sensitive to the changes of environmental polarity. With the temperature reduction the fluorescence intensity of tryptophan increases, however the maximum of emission and spectrum form remain unchanged that may be explained by the change of tryptophan residue shielding. With further lowering of the temperature the fluorescence intensity falls and albumin solution transits into crystal state. Subsequent temperature rise (up to 20°C) leads to recovery of fluorescence spectral characteristics. On spectral characteristics after thawing of blood plasma one may reveal the changes in state of surface (polar and non-polar) sites of plasma proteins [2]. Our studies show that spectral characteristics of albumin are reduced after thawing testifying to the reversibility of structural changes.

Fig. 3 shows fluorescent profiles of cold denaturation of albumin in the presence of DMSO and DESO within temperature range of -20...20°C. In the absence of sulfoxides low temperature studies are impossible because of the solution freezing. Fluorescent profiles of denaturation are characterized by two-stage transition: for DMSO $T_{c1} = 10,86^\circ\text{C}$ and $T_{c2} = -1,38^\circ\text{C}$; for DESO $T_{c1} = 12,75^\circ\text{C}$ and $T_{c2} = -1,94^\circ\text{C}$. The non-linear change of spectral characteristics at temperatures lower than 0°C reflects stage-by-stage inhibition of cooperative water-protein matrix mobility. In [1] it has been shown that at temperatures of -10...-20°C the loosely bound with protein water layers freeze, and at -50...-60°C the neighboring to protein water consisting the cooperative system with its surfaces freeze. The obtained data show the effect achieved for DMSO (20%) can be reached at lower DESO concentrations (0.25%).

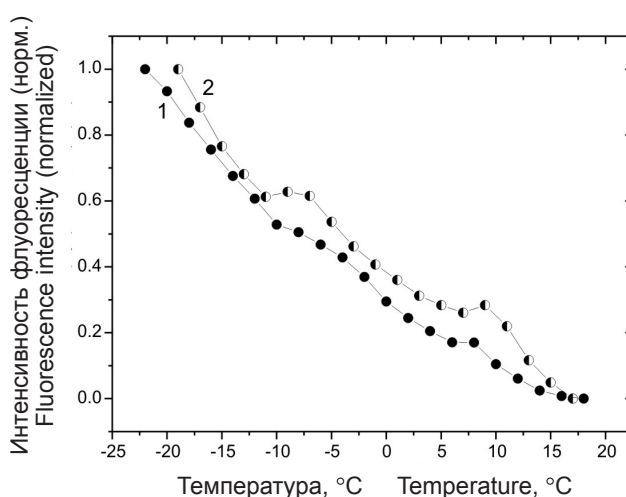


Рис. 3. Флуоресцентные профили холодной денатурации альбумина в присутствии 20% ДМСО (1) и 0,25% ДЭСО (2).

Fig. 3. Fluorescence profiles of cold denaturation of albumin in the presence of 20% DMSO (1) and 0.25% DESO (2).

а полярная S=O группа участвует в образовании водородных связей между молекулами воды и сульфоксида, вследствие чего меняется структура воды. В случае ДЭСО эти взаимодействия становятся более выраженными. Как показали наши исследования, в присутствии ДМСО и ДЭСО снижается температура денатурации, однако при низких температурах уменьшение гидрофобных взаимодействий и связывание молекул сульфоксида с активными полостями на поверхности белка приводят к формированию стабильной “ледяной” оболочки, которая предохраняет белок от необратимых структурных изменений.

Выводы

Полученные результаты позволяют заключить, что при тепловой денатурации альбумина в присутствии ДЭСО проявляется переход кислотного характера при температуре 47,61°C. В присутствии ДМСО и ДЭСО температура тепловой денатурации САЧ снижается, по-видимому, в результате гидрофобного взаимодействия сульфоксидов с поверхностью белка. Причем для ДЭСО этот эффект наблюдается при значительно меньших концентрациях, чем для ДМСО. Флуоресцентные измерения свидетельствуют, что образование гидрофобной оболочки предохраняет белок от необратимых структурных изменений при низких температурах.

Литература

1. Дюбко Т.С. О некоторых аспектах применения флуоресцентного анализа в криобиологии // Вестник ХНУ. Серия: биология.– 2006.– №748.– С. 221–231.
2. Дюбко Т.С., Морозова Т.Ф., Липина О.В., Ромоданова Е.О. Влияние замораживания на плазму донорской крови // Вестник ХНУ. Серия: биология.– 2006.– №729.– С. 128–133.
3. Маркарян Ш.А., Баграмян К.А., Аракелян В.Б. Кинетические параметры роста *E. coli* после глубокого замораживания в присутствии диэтилсульфоксида // Пробл. криобиологии.– 2003.– №2.– С. 11–15.
4. Пат. Республики Армения N20010041. Способ очистки диэтилсульфоксида / Ш.А. Маркарян, Н.Ц. Тадевосян.– Заявлено: 15.11.2001, Опубл. 30.12.2002.
5. Aussedat J., Boutron P., Coquilhat P. et al. Organ preservation at low temperature: a physical and biological problem // J. Phys. I France.– 1993.– Vol. 3, N2.– P. 515–531.
6. Bonincontro A., Cinelli S., Onori G., Stravato A. Dielectric behavior of lysozyme and ferricytochrome-c in water/ethylene-glycol solutions // Biophys. J.– 2004.– Vol. 86, N2.– P. 1118–1123.
7. Bonora S., Markarian S.A., Trincherо A., Grigorian K.R. DSC study on the effect of DMSO and DESO on phospholipid liposomes // Thermochimica Acta.– 2005.– Vol. 433, N1–2.– P. 19–26.
8. Daggett V., Fersht A. Is there a unifying mechanism for protein folding? // Trends Biochem. Sci.– 2003.– Vol. 28, N1.– P. 18–25.
9. Fink A.L. Effects of cryoprotectants on enzyme structure // Cryobiology.– 1986.– Vol. 23, N1.– P. 28–37.
10. Gabrielian L.S., Markarian S.A. Temperature dependence of the dielectric relaxation of liquid dimethyl- and diethylsulfoxides // J. Mol. Liq.– 2004.– Vol. 112, N3.– P. 137–140.

The effect of organic cosolvent on protein denaturation is probably explained by the changes in solvent polarity. In case of dialkyl sulphoxides the polarity of cosolvent does not play a determining role, since dielectric constants of DMSO and DESO do not practically differ within temperature range of 20...50°C (dielectric constants vary from 46.6 to 43.0 and from 44.1 to 39.4, correspondingly) [10]. In fact, polarity of solvent cannot be considered as an important factor of albumin denaturation in the presence DMSO and DESO. DMSO molecules interact with protein surface mainly due to hydrophobic interactions, and polar S=O group participates in the formation of hydrogen bonds between molecules of water and sulfoxide, leading to the change in water structure. In case of DESO these interactions become more pronounced. Our findings showed that in the presence of DMSO and DESO the temperature of denaturation is reduced, however under low temperatures the decrease in hydrophobic interactions and binding of sulfoxide molecules with active cavities on protein surface result in the formation of stable “ice” layer, preventing protein from irreversible structural changes.

Conclusions

Obtained results enable to conclude that at thermal denaturation of albumin in the presence of DESO a transition of acid character at 47.61°C is observed. In the presence of DMSO and DESO the temperature of thermal denaturation of HSA reduces probably as a result of hydrophobic interactions of sulphoxides with protein surface. Moreover, for DESO this effect is observed at lower concentrations if compared with DMSO. The fluorescent measurements testify the formation of hydrophobic layer prevents the protein against irreversible structural changes under low temperatures.

References

1. Dyubko T.S. About some aspects of application of fluorescent analysis in cryobiology // Bull. of Kharkov National University. Series: Biology.– 2006.– N748.– P. 221–231.
2. Dyubko T.S., Morozova T.F., Lipina O.V., Romodanova E.O. Effect of freezing on donor's blood plasma // Bull. of Kharkov National University. Series: Biology.– 2006.– N729.– P. 128–133.
3. Markarian S.A., Bagramyan K.A., Arakelyan V.B. Kinetic parameters of *E. coli* growth after deep freezing in diethyl sulfoxide presence // Problems of Cryobiology.– 2003.– N2.– P. 11–15.
4. Patent of Republic of Armenia N20010041. Method of purification of diethyl sulphoxide // S.A. Markarian, N.T. Tadevosyan.– Filed in: 15.11.2001. Published in 30.12.2002.
5. Aussedat J., Boutron P., Coquilhat P. et al. Organ preservation at low temperature: a physical and biological problem // J. Phys. I France.– 1993.– Vol. 3, N2.– P. 515–531.
6. Bonincontro A., Cinelli S., Onori G., Stravato A. Dielectric behavior of lysozyme and ferricytochrome-c in water/ethylene-glycol solutions // Biophys. J.– 2004.– Vol. 86, N2.– P. 1118–1123.

11. *Johannesson H., Denisov V., Halle B.* Dimethyl sulfoxide binding to globular proteins: a nuclear magnetic relaxation dispersion study // *Protein Sci.*– 1997.– Vol. 6, N8.– P. 1756–1763.
12. *Markarian S.A., Asatryan A.A., Grigoryan K.R., Sargsyan H.R.* Effect of DESO on the thermal denaturation of DNA // *Biopolymers.*– 2006.– Vol. 81, N1.– P. 1–5.
13. *Markarian S.A., Asatryan A.M., Zatikyan A.L.* Volumetric properties of aqueous solutions of diethylsulfoxide at temperatures from 298.15 K to 343.15 K // *J. Chem. Therm.*– 2005.– Vol. 37, N8.– P. 768–777.
14. *Markarian S.A., Bonora S., Bagramyan K.A., Arakelyan V.B.* Glass-forming property of the system diethyl sulphoxide/water and its cryoprotective action on *Escherichia coli* survival // *Cryobiology.*– 2004.– Vol. 49, N1.– P. 1–9.
15. *Markarian S.A., Zatikyan A.L., Grigoryan V.V., Grigoryan G.S.* Vapor pressures of pure diethyl sulfoxide from (298.15 to 318.15) K and vapor-liquid equilibria of binary mixtures of diethyl sulfoxide with water // *J. Chem. Eng. Data.*– 2005.– Vol. 50, N1.– P. 23–25.
16. *Michnik A., Drzazga Z.* Effect of ethanol on the thermal stability of human serum albumin // *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.*– 2007.– Vol. 88, N2.– P. 449–454.
17. *Muzammil S., Kumar Y., Tayyab S.* Molten globule-like state of human serum albumin at low pH // *Eur. J. Biochem.*– 1999.– Vol. 266, N1.– P. 26–32.
18. *Peters T.J.* All about albumin biochemistry, genetics and medical applications.– San Diego, CA: Academic Press, 1996.– 432 p.
19. *Pico G.A.* Thermodynamic features of the thermal unfolding of human serum albumin // *Inter. J. Biol. Macromol.*– 1997.– Vol. 20, N1.– P. 63–73.
20. *Privalov P.* Protein folding.– New York: W.H. Freeman and Company, 1992.– 127 p.
21. *Schellman J.A.* Protein stability in mixed solvents: a balance of contact interaction and excluded volume // *Biophys. J.*– 2003.– Vol. 85, N1.– P. 108–125.
22. *Tsai C.-J., Maizel J.V., Nussinov R.* The hydrophobic effect: a new insight from cold denaturation and a two-state water structure // *Crit. Rev. Bioch. Mol. Biol.*– 2002.– Vol. 37, N2.– P. 55–69.
23. *Yu Z.-W., Quinn P.J.* Dimethyl sulphoxide: a review of its application in cell biology // *Biosci. Rep.*– 1994.– Vol. 6, N6.– P. 259–281.
7. *Bonora S., Markarian S.A., Trincherio A., Grigorian K.R.* DSC study on the effect of DMSO and DESO on phospholipid liposomes // *Thermochimica Acta.*– 2005.– Vol. 433, N1–2.– P. 19–26.
8. *Daggett V., Fersht A.* Is there a unifying mechanism for protein folding? // *Trends Biochem. Sci.*– 2003.– Vol. 28, N1.– P. 18–25.
9. *Fink A.L.* Effects of cryoprotectants on enzyme structure // *Cryobiology.*– 1986.– Vol. 23, N1.– P. 28–37.
10. *Gabrielian L.S., Markarian S.A.* Temperature dependence of the dielectric relaxation of liquid dimethyl- and diethylsulfoxides // *J. Mol. Liq.*– 2004.– Vol. 112, N3.– P. 137–140.
11. *Johannesson H., Denisov V., Halle B.* Dimethyl sulfoxide binding to globular proteins: a nuclear magnetic relaxation dispersion study // *Protein Sci.*– 1997.– Vol. 6, N8.– P. 1756–1763.
12. *Markarian S.A., Asatryan A.A., Grigoryan K.R., Sargsyan H.R.* Effect of DESO on the thermal denaturation of DNA // *Biopolymers.*– 2006.– Vol. 81, N1.– P. 1–5.
13. *Markarian S.A., Asatryan A.M., Zatikyan A.L.* Volumetric properties of aqueous solutions of diethylsulfoxide at temperatures from 298.15 K to 343.15 K // *J. Chem. Therm.*– 2005.– Vol. 37, N8.– P. 768–777.
14. *Markarian S.A., Bonora S., Bagramyan K.A., Arakelyan V.B.* Glass-forming property of the system diethyl sulphoxide/water and its cryoprotective action on *Escherichia coli* survival // *Cryobiology.*– 2004.– Vol. 49, N1.– P. 1–9.
15. *Markarian S.A., Zatikyan A.L., Grigoryan V.V., Grigoryan G.S.* Vapor pressures of pure diethyl sulfoxide from (298.15 to 318.15) K and vapor-liquid equilibria of binary mixtures of diethyl sulfoxide with water // *J. Chem. Eng. Data.*– 2005.– Vol. 50, N1.– P. 23–25.
16. *Michnik A., Drzazga Z.* Effect of ethanol on the thermal stability of human serum albumin // *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.*– 2007.– Vol. 88, N2.– P. 449–454.
17. *Muzammil S., Kumar Y., Tayyab S.* Molten globule-like state of human serum albumin at low pH // *Eur. J. Biochem.*– 1999.– Vol. 266, N1.– P. 26–32.
18. *Peters T.J.* All about albumin biochemistry, genetics and medical applications.– San Diego, CA: Academic Press, 1996.– 432 p.
19. *Pico G.A.* Thermodynamic features of the thermal unfolding of human serum albumin // *Inter. J. Biol. Macromol.*– 1997.– Vol. 20, N1.– P. 63–73.
20. *Privalov P.* Protein folding.– New York: W.H. Freeman and Company, 1992.– 127 p.
21. *Schellman J.A.* Protein stability in mixed solvents: a balance of contact interaction and excluded volume // *Biophys. J.*– 2003.– Vol. 85, N1.– P. 108–125.
22. *Tsai C.-J., Maizel J.V., Nussinov R.* The hydrophobic effect: a new insight from cold denaturation and a two-state water structure // *Crit. Rev. Bioch. Mol. Biol.*– 2002.– Vol. 37, N2.– P. 55–69.
23. *Yu Z.-W., Quinn P.J.* Dimethyl sulphoxide: a review of its application in cell biology // *Biosci. Rep.*– 1994.– Vol. 6, N6.– P. 259–281.

*Поступила 15.01.2008
Рецензент Е.Д. Розанова*

Accepted in 15.01.2008