

Калориметрическое исследование термоденатурации гемоглобина в присутствии криопротекторов

Ю.С. ГОВОРОВА, А.В. ЗИНЧЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Calorimetric Investigation of Hemoglobin Thermodenaturation with Cryoprotectants

YU.S. GOVOROVA, A.V. ZINCHENKO

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

Термодинамические характеристики процесса тепловой денатурации белков под влиянием различных физико-химических факторов позволяют судить о конформационных изменениях молекул. Так, состав среды и температура играют существенную роль в поддержании нативной конформации макромолекул. Эти факторы являются важными в криобиологии при разработке технологий консервирования низкими температурами биологических систем в присутствии криозащитных сред.

В настоящей работе методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) проведено исследование влияния глицерина, 1,2-пропандиола (1,2-ПД), диметилсульфоксида (ДМСО) и оксиэтилированного глицерина со степенью полимеризации $n = 5$ ($OEG_{n=5}$) на термодинамические и кинетические параметры термоденатурации гемоглобина человека и некоторых сельскохозяйственных животных на основе анализа ДСК термограмм.

Гемоглобин получали из крови человека, лошади и быка по известной методике. Концентрация гемоглобина, определенная методом спектрофотометрии, составляла 5 мМоль. Термограммы регистрировали на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4. Область сканирования – от 25 до 90°C. Скорость нагрева – 1 град/мин.

Нами рассчитаны значения калориметрической энтальпии, энергии активации и температуры термоденатурации гемоглобина с добавлением различных концентраций глицерина, 1,2-ПД, ДМСО и $OEG_{n=5}$. Расчетные значения энергии активации значительно превышают значения калориметрической энтальпии термоденатурации гемоглобина. Построены зависимости калориметрической энтальпии и температуры денатурации гемоглобина от концентрации глицерина, 1,2-ПД, ДМСО и $OEG_{n=5}$. Показано, что используемые криопротекторы приводят к снижению температуры и сложному поведению калориметрической энтальпии термоденатурации гемоглобина с ростом концентрации криопротектора в растворе. Эти факты указывают на то, что $OEG_{n=5}$, 1,2-ПД и ДМСО способствуют разрыхлению молекул гемоглобина человека, быка и лошади, а также понижению термостабильности белка. Исключение составляет глицерин, который не вызывает существенного отклонения температуры денатурации гемоглобина в пределах концентрации глицерина 0–40 масс. %.

Таким образом, глицерин, являясь химическим шапероном, способствует сохранению термостабильности гемоглобина, т. е. стабилизирует белки неспецифически к структуре макромолекул в их совместных комплексах, образующихся за счет слабых взаимодействий (гидрофобных, Ван-дер-ваальсовых, водородных связей). Степень подобного воздействия зависит от строения молекулы гемоглобина.

Thermodynamic characteristics of thermal denaturation of proteins under the effect of various physical and chemical factors allow to estimate the conformational changes of molecules. Thus, medium composition and temperature play an important role in maintaining native conformation of macromolecules. These factors are important for cryobiology in development of low temperature preservation technologies of biological systems with cryoprotective media.

In the present work there was performed by differential scanning calorimetry (DSC) the study of glycerol, 1,2-propanediol (1,2-PD), dimethyl sulfoxide (DMSO) and oxyethylated glycerol with the polymerization degree $n = 5$ ($OEG_{n=5}$) effect on thermodynamic and kinetic parameters of human hemoglobin thermodenaturation, and some livestock animals on the basis of DSC thermogram analysis.

Hemoglobin was derived from human, bovine and canine blood according to the standard method. Hemoglobin concentration determined by spectrophotometry, was 5 mM. Thermograms were recorded with a differential scanning microcalorimeter DASM-4. Scan area was from 25 to 90°C. Heating rate was 1 deg/min.

We calculated the values of calorimetric enthalpy, activation energy and hemoglobin thermodenaturation temperature with the addition of various concentrations of glycerol, 1,2-PD, DMSO, and $OEG_{n=5}$. Calculated values of activation energy are significantly higher than calorimetric enthalpy ones of hemoglobin thermodenaturation. There were built the dependences of calorimetric enthalpy and hemoglobin thermodenaturation temperature on concentration of glycerol, 1,2-PD, DMSO, and $OEG_{n=5}$. It was shown that the use of cryoprotectants resulted in temperature reduction and complex behavior of calorimetric enthalpy of hemoglobin thermodenaturation with increasing cryoprotective concentration in solution. These facts suggest that the $OEG_{n=5}$, 1,2-PD and DMSO contribute to loosening of molecules of human, bovine, canine hemoglobin, as well as a decrease of protein thermal stability. Glycerol, which does not cause a significant deviation of hemoglobin denaturation temperature within the range of glycerol concentration 0-40 % w/w is an exception.

Thus, glycerol, being a chemical chaperone, enables to preserve hemoglobin thermal stability, *i. e.* nonspecifically stabilizes proteins to the structure of macromolecules in their combined complexes formed by weak interactions (hydrophobic, Van der Waals, hydrogen bonds). The rate of this effect depends on the structure of hemoglobin molecule.