

УДК 57.043

**ТЕРМОДИНАМІЧНИЙ АНАЛІЗ ДЕНАТУРАЦІЇ ГЕМОГЛОБІНУ
У ПРИСУТНОСТІ ОКСИЕТИЛЬОВАНОГО ПОХІДНОГО ГЛІЦЕРИНУ
ЗІ СТУПЕНЕМ ПОЛІМЕРИЗАЦІЇ $n=5$ ПІСЛЯ ОХОЛОДЖЕННЯ ДО -196°C**

Ю.С. Говорова¹, О.В. Зінченко², О.М. Боброва³, А.М. Компанієць⁴

^{1,2,3,4}Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, 61015, Україна

Останнім часом активно досліджується вплив різних кріопротекторів на структуру та властивості білків після низькотемпературного зберігання. Вирішення подібних задач не можливо без розгляду деяких аспектів молекулярної біофізики. Особливий інтерес у цьому напрямі має визначення впливу кріопротекторів на таке фундаментальне фізичне явище, як перехід білку з нативного стану у розгорнутий, який має назву анфолдінгу білку [1] і може аналізуватися за допомогою дослідження термічної денатурації. Оксигетильований гліцерин зі ступенем полімеризації $n=25$ (ОЕГ _{$n=25$}) – перспективний кріопротектор, який показав добрі результати при кріоконсервуванні еритроцитів людини [2]. У зв'язку з цим, ця робота пов'язана з дослідженням впливу ОЕГ _{$n=25$} у концентрації від 5 до 50% на термічну денатурацію гемоглобіну людини після заморожування до -196°C , а також порівняльний аналіз отриманих результатів з термостабільністю гемоглобіну у присутності ДМСО у концентрації від 5 до 50%. Термостабільність аналізувалася за зміною термодинамічних параметрів термоденатурації білку з різними концентраціями дослідженого кріопротектору до та після низькотемпературного впливу.

Дослідження термоденатурації гемоглобіну проводили на диференціальному адиабатичному скануючому калориметрі (ДАСМ-4). Прилад дає можливість досліджувати теплові ефекти розтягнутих при температурі теплових процесів внутрішньомолекулярних перетворень біологічних речовин, які знаходяться у розчині з низькою їх концентрацією (0,1%), як функцію від температури. Похибка вимірювання приладу ДАСМ-4: температури $\pm 0,1\%$, потужності $\pm 1\%$. Область сканування температури – від 20°C до 100°C . Термодинамічні параметри денатурації гемоглобіну розраховувались за допомогою відповідних термограм. Термограми реєстрували при нагріванні зі швидкістю $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ при надлишковому тискові 2,5 атм. Концентрації білків використаних у роботі зразків вимірювались методом спектрофотометрії. Одноразове швидке охолодження розчинів гемоглобіну виконували шляхом занурення зразків вагою 1 г у рідкий азот, середня швидкість охолодження при цьому складала 200 град/хв. Нагрівання зразка здійснювали на водяній бані за температури 40°C .

За допомогою отриманих термограм нами були зареєстровані температури денатурації гемоглобіну з ОЕГ _{$n=25$} , розраховані значення зміни калориметричної ентальпії денатурації білку з кріопротектором, побудовані відповідні графіки температури і калориметричної ентальпії денатурації білку (ΔH_{cal}) з кріопротектором до та після низькотемпературного впливу.

Термостабільність гемоглобіну після низькотемпературного впливу з ОЕГ _{$n=25$} у концентрації від 5 до 30% достовірно не змінюється, подальше збільшення концентрації кріопротектору призводить до підвищення температури денатурації білку, який був підданий заморожуванню. Стосовно значень зміни калориметричної ентальпії денатурації гемоглобіну, то загалом збільшення концентрації ОЕГ _{$n=25$} у розчині гемоглобіну після заморожування призводить до підвищення значень ΔH_{cal} денатурації білку.

У роботі також був проведений порівняльний аналіз зміни температури денатурації гемоглобіну у присутності ОЕГ _{$n=25$} та ДМСО [3], як до, так і після заморожування-

відігрівання розчинів гемоглобіну з криопротекторами. $OEG_{n=25}$ у концентрації від 5 до 30 % і ДМСО концентрацією від 5 до 15% не впливають на термостабільність гемоглобіну, який був підданий заморожуванню до -196°C , про що свідчать достовірно незмінні значення температури денатурації. Подальше збільшення концентрації $OEG_{n=25}$ і ДМСО призводить до підвищення температури денатурації гемоглобіну після заморожування, порівняно з гемоглобіном, що не був підданий низькотемпературному впливу. ДМСО при концентрації від 15 до 50% підвищує температуру денатурації гемоглобіну на $(2\pm 0,1)^{\circ}\text{C}$, $OEG_{n=25}$ – на $(3\pm 0,1)^{\circ}\text{C}$, порівняно з температурою денатурації гемоглобіну, який не заморожувався у присутності криопротектору. Зареєстровані відмінності, імовірно, пов'язані з тим, що молекули ДМСО взаємодіють з поверхнею білку, в основному, по гідрофобному механізму, а полярна S = O група бере участь в утворенні водневих зв'язків між молекулами води і ДМСО, внаслідок чого змінюється структура води [4].

Література

1. Thermal unfolding of proteins at high pH range studied by UV absorbance / E. Pinho Melo, M.R. Aires-Barros, S.M.V. Costa, J.M.S. Cabral // J. Biochem. Biophys. Methods. – 1997. – Vol. 34. – P. 45 – 59.
2. Компаниец А.М. Криоконсервирование эритроцитов под защитой олигомера оксиэтилированного глицерина // А.М. Компаниец, А.В. Николенко, В.В. Чеканова, Ю.П. Троц // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т.15, №3. – P. 561–565.
3. Зинченко А.В. Влияние диметилсульфоксида на тепловую денатурацию гемоглобина человека / А.В. Зинченко, Е.Н. Боброва, Ю.С. Говорова // Матеріали ІХ Міжнародної науково-технічної конференції «Актуальні питання біологічної фізики та хімії» БФФХ-2013. – С. 83-85.
4. Григорян К.Р. Влияние диметилсульфоксида и диэтилсульфоксида на термическую денатурацию человеческого сывороточного альбумина / Ш.А. Маркарян, М.Г. Азгаурян // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т.19, №4. – P. 33–37.