



УДК 536.6:612.111.11:547.569.2

## КАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕНАТУРАЦИИ ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА С ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ

**А.В. Зинченко,  
Ю.С. Говорова**

*Институт проблем криобиологии  
и криомедицины НАН Украины,  
Украина, 61015, г. Харьков,  
ул. Переяславская, 23*

*E-mail: ju-st7@yandex.ua, alexa-  
zin@mail.ru*

В данной работе методом дифференциальной сканирующей адиабатической калориметрии исследовано влияние диметилсульфоксида концентрацией от 0 до 50% на термоденатурацию гемоглобина человека. Проведен термодинамический и кинетический расчет параметров денатурации белка с данным криопротектором. Повышение концентрации диметилсульфоксида приводит к понижению значений энергии активации, температуры и калориметрической энтальпии денатурации гемоглобина. Такие изменения термодинамических и кинетических параметров денатурации белка в присутствии диметилсульфоксида можно объяснить разрыхлением молекул гемоглобина и, как следствие, снижением их термостабильности и степени кооперативности.

Ключевые слова: гемоглобин, термоденатурация, диметилсульфоксид, дифференциальная сканирующая калориметрия.

### Введение

Консервирование биологических систем с использованием низких температур в последние десятилетия получило широкое развитие [1]. Начальным этапом криоконсервирования биообъектов является инкубирование их с криозащитными средами. Так, инкубирование белков с криопротекторами может вызывать определенные изменения в пространственной организации белков, что отражается на их функциональных свойствах. Например, исследование гемоглобина на этапах криоконсервирования является актуальным в связи с важным его функциональным свойством – участием в процессе дыхания. В настоящей работе в качестве криопротектора был выбран диметилсульфоксид (ДМСО), широко применяющийся в последние десятилетия при криоконсервировании различных биологических объектов, таких как эритроциты, эмбрионы, спермии и другие [1, 2]. Одним из прямых экспериментальных подходов в исследовании изменения пространственной организации белков по их термоденатурации является дифференциальная сканирующая калориметрия, позволяющая оценить термодинамические и кинетические параметры денатурации макромолекул [3]. Исследование влияния данного криопротектора на термоденатурацию гемоглобина человека с помощью метода ДСК, а также расчет термодинамических и кинетических параметров плавления данного белка с криопротектором не проводился, что и явилось целью данной работы.

### Материалы и методы

Гемоглобин (HbA) получали из отмывтых эритроцитов донорской крови: 1 мл цельной крови и 10 мл физиологического раствора NaCl смешивали и центрифугировали при 1500g в течение 5 мин, надосадочную жидкость удаляли. Процедуру отмывания проводили 3 раза. Полученную эритромассу гемолизировали в гипотоническом растворе (5 мМоль фосфатный буфер, pH 7.8) и центрифугировали при 27500g в течение 15 мин. Концентрацию гемоглобина определяли спектрофотометрическим методом. Концентрация белка в калориметрической ячейке составляла около 5 мМоль. В данной работе использовался диметилсульфоксид марки х.ч. (Реахим, Россия). Растворы криопротекторов готовили взвешиванием на аналитических весах.

Термограммы регистрировали на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4 (СКБ БП Пушино, Россия). Область сканирования – от 25 до 80°C при избыточном давлении 2.5 атм. Скорость нагрева – 1 град./мин. Термограммы обрабатывали с помощью программного пакета Microsoft Office Excel. Данные интерпретировали согласно [3, 4]. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием пакета Origin 7.5 (OriginLab Corporation, США). Данные в таблице для  $\Delta H_{cal}$  и  $E_a$  приведены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

### Кинетический анализ данных ДСК

Как указано в работах [5, 6], процесс денатурации гемоглобина необратимый и подчиняется двустадийной модели Ламри-Эйринга. На первой стадии происходит обратимая диссоциация тетрамера на протомеры, на второй – кинетический необратимый переход в развернутое состояние (анфолдинг). В данной работе мы проводим кинетический анализ второй стадии, модель которой можно представить в виде:  $U \xrightarrow{k} D$ , где  $U$  – нативное состояние белка;  $D$  – денатурированное состояние белка;  $k$  – константа скорости процесса денатурации.

Для проверки обратимости или необратимости процесса денатурации нами была проведена процедура повторного прогрева образца: после регистрации пика денатурации гемоглобина, образец охлаждали, затем заново снимали зависимость теплоемкости от температуры. При повторном сканировании поглощение тепла не наблюдалось, что указывает на необратимость процесса денатурации гемоглобина.

Одним из критериев соответствия экспериментальных данных обсуждаемой модели денатурации белка является совпадение значений энергии активации ( $E_a$ ), вычисленной различными способами [3, 7]. Для определения значений энергии активации термоденатурации гемоглобина из экспериментальных кривых использовали два подхода Sanchez-Ruiz и соавт. [7]. В первом случае  $E_a$  вычисляли из формулы:

$$E_a = eRC_p^{ex} T^2 / \Delta H,$$

где  $E_a$  – энергия активации;  $C_p^{ex}$  – избыточная теплоемкость;  $R$  – универсальная газовая постоянная;  $\Delta H$  – энтальпия денатурации, которая определяется как площадь под кривой зависимости избыточной теплоемкости от температуры;  $T$  – текущая температура.

Во втором случае – отношение  $E_a/R$  определяли как тангенс угла наклона зависимости  $\ln(v C_p^{ex} / (\Delta H_{cal} - Q))$  от  $1/T$ , где  $Q$  – текущее количество теплоты, поглощаемое в процессе денатурации,  $v$  – скорость нагрева [7].

### Результаты и обсуждение

На рисунке 1 представлены типичные термограммы денатурации гемоглобина в присутствии ДМСО различной концентрации. Эндотермический пик на термограммах отображает процесс денатурации Hb. Форма пика денатурации для нативного гемоглобина хорошо согласуется с данными, указанными в литературе [5, 8]. Температура денатурации нативного гемоглобина составляет 344 К.

На основании анализа полуширины и формы пиков плавления можно судить о степени кооперативности данного процесса [3, 4]. Денатурация нативного гемоглобина представляет собой высококооперативный переход. В присутствии ДМСО значения полуширины пиков возрастают, что говорит о понижении кооперативности процесса денатурации белка.

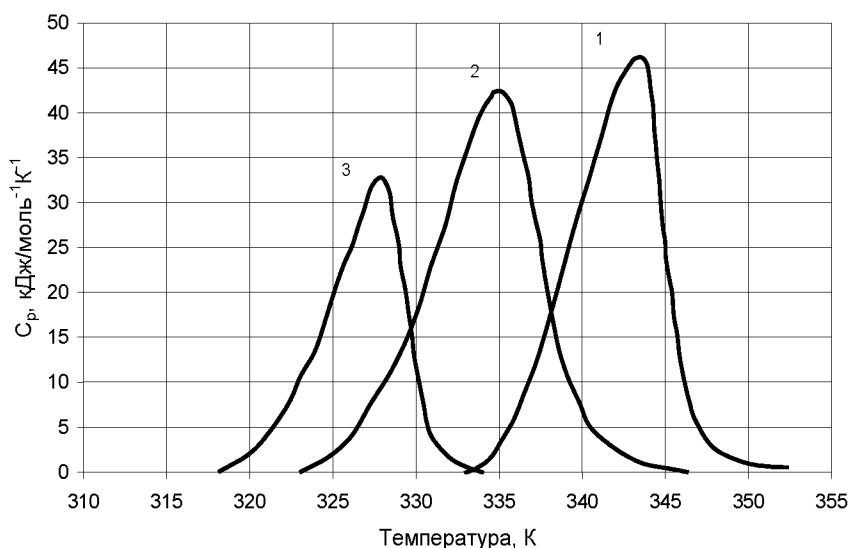


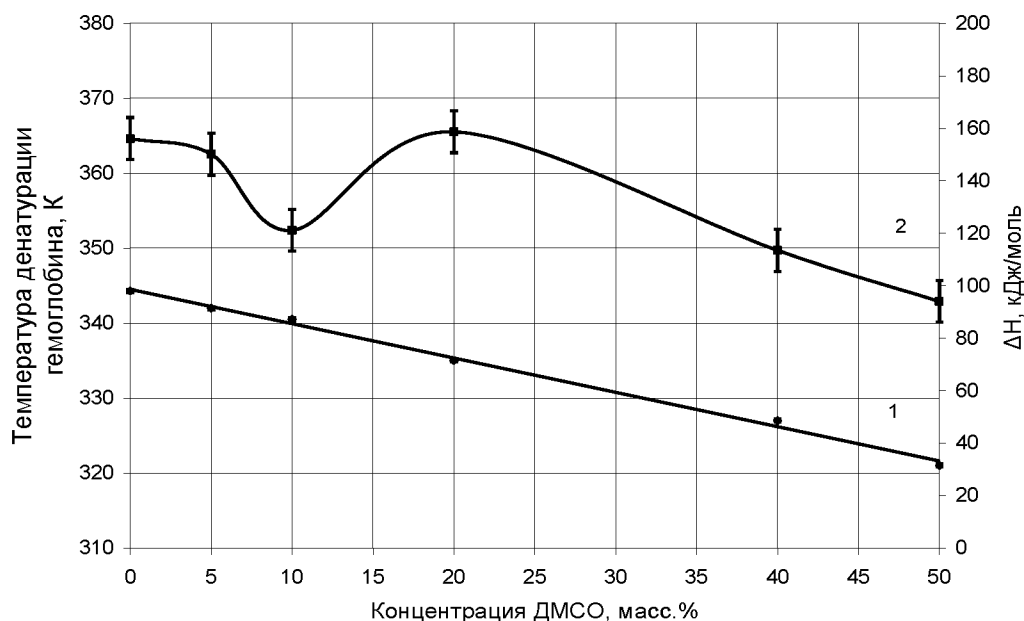
Рис. 1. Термограммы гемоглобина в присутствии ДМСО: 1 – нативный; 2 – 20% ДМСО; 3 – 40% ДМСО

На основе данных термограмм были построены зависимости температуры (1) и изменения calorиметрической энтальпии (2) денатурации гемоглобина от концентрации ДМСО ( $C_{\text{ДМСО}}$ ) (рисунок 2 и таблица). При добавлении криопротектора температура денатурации монотонно убывает и близка к линейной, что подтверждает литературные данные о линейной зависимости стабильности белка от концентрации осмолита [9]. В то время как зависимость  $\Delta H$  от концентрации ДМСО носит более сложный характер, так, на общем фоне снижения calorиметрической энтальпии от концентрации криопротектора в диапазоне от 5 до 20% ДМСО наблюдается минимум calorиметрической энтальпии, возможно, связанный с разрыхлением молекул гемоглобина и ослабление связей гема с глобином. При 20% ДМСО рост calorиметрической энтальпии, вероятно, обусловлен стабилизацией молекул гемоглобина и вызван некоторой модификацией гидратной оболочки глобиновой части молекул белка.

Таблица

**Температуры, calorиметрические энтальпии и энергии активации процесса денатурации гемоглобина в присутствии различных концентраций ДМСО**

$C_{\text{ДМСО}}$ , масс. %	T, K	$\Delta H$ , кДж/моль	$E_{a1}$ , кДж/моль	$E_{a2}$ , кДж/моль
0	344±0.2	156±10	360.4±17	362±12
5	342±0.2	150±10	383.9±17	376±12
10	341±0.2	121±10	343.2±17	323±12
20	335±0.2	159±10	300.4±17	317±12
40	327±0.2	113±9	292.9±17	327±12
50	321±0.2	94±8	266.9±16	293±11



*Рис. 2.* Зависимости температуры (1) и изменения энтальпии (2) денатурации от концентрации ДМСО

На рисунке 3 представлены зависимости  $\ln(v C_p^{\text{ex}} / (\Delta H - Q))$  от  $1/T$  анфолдинга гемоглобина с добавлением ДМСО. Линейность графиков в данных координатах [3] указывает на пригодность используемой нами модели денатурации Ламри-Эйринга в данном эксперименте. Нами были также рассчитаны значения энергии активации для процесса денатурации гемоглобина с ДМСО концентрацией от 0 до 50%. Энергия активации для нативного гемоглобина составляет 361 кДж/моль.

Значения энергии активации, вычисленные с использованием подходов, рассмотренных выше (см. Кинетический анализ данных ДСК), представлены в таблице, и совпадают в пределах погрешности эксперимента, что говорит о применимости используемой нами модели денатурации для гемоглобина с ДМСО. В таблице  $E_{a1}$  – энергия активации вычислена с использованием формулы -1 подход,  $E_{a2}$  – определен по тангенса угла наклона (см. рис. 3) – 2 подход.

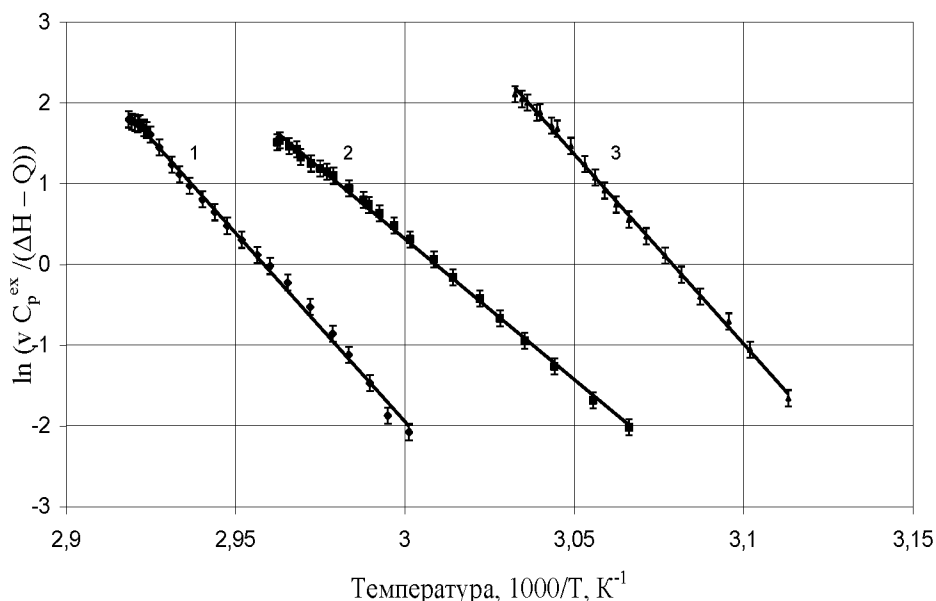


Рис. 3. Зависимости  $\ln(v C_p^{ex} / (\Delta H - Q))$  от обратной температуры для гемоглобина с добавлением ДМСО: 1 – без ДМСО; 2 – 20% ДМСО; 3 – 40% ДМСО

Полученные значения энергии активации для нативного гемоглобина хорошо согласуются с данными, приведенными в литературе [5]. В присутствии криопротектора происходит понижение значений энергии активации, что свидетельствует о понижении термостабильности белка [10] и подтверждает предположение о разрыхлении молекул гемоглобина человека.

Таким образом, ДМСО в диапазоне концентраций 0–50% не влияет на необратимость процесса денатурации белка и приводит к разрыхлению молекул гемоглобина человека и понижению его термостабильности и степени кооперативности.

### Литература

1. Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. акад. НАН Украины А.Н. Гольцева. – Х.: Райдер, 2012. – 768 с.
2. Долгосрочное хранение эритроцитов методом замораживания при умеренно низких ( $-60^{\circ}$ – $-40^{\circ}$ С) температурах / Н.Т. Терехов, М.М. Петров, М.П. Буденная, Н.В. Тимченко // Метод. реком. – К.: Здоров'я, 1986. – 16 с.
3. Любарев А.Е., Курганов Б.И. Изучение необратимой тепловой денатурации белков методом дифференциальной сканирующей калориметрии // Успехи биол. химии. – 2000. – Т. 40. – С. 43–84.
4. Зинченко А.В., Соловьева А.С. Сравнение микрокалориметрического плавления гемоглобина из донорской и кордовой крови до и после низкотемпературного воздействия // Проблемы криобиологии. – 2000. – №1. – С. 32–35.
5. Differential scanning microcalorimetry study of the thermal denaturation of haemoglobin / A. Michnik, Z. Drzazga, A. Kluczevska, K. Michalik // Biophys. Chem. – 2005. – Vol. 118, №2–3. – Pp. 93–101.
6. Sengupta Bidisa, Swenson Jan. Properties of normal and glycated human hemoglobin in presence and absence of antioxidant // Biochem. and Biophys. Res. Com. – 2005. – Vol. 334, №3. – Pp. 954–959.
7. Sanchez-Ruiz Jose M. Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry // Biophys. J. – 1992. – Vol. 61. – Pp. 921–935.
8. Термостабильность и функциональные свойства гемоглобина человека в присутствии алифатических спиртов / Е.А. Лапшина, И.Б. Заводник, В.А. Игнатенко, И.И. Степура // Мол. биол. – 1992. – Т. 26, №2. – С. 315–320.
9. Daniel Harries and Jorg Rosgen. A Practical Guide on How Osmolytes Modulate Macromolecular Properties // Meth. in Cell Biol. – 2008. – Vol. 84. – P. 679–735.
10. Patrícia S. Santiago, José Wilson P. Carvalho, Marco M. Domingues, Nuno C. Santos, Marcel Tabak Thermal stability of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: determination of activation parameters by optical spectroscopic and differential scanning calorimetric studies // Biophys. Chem. – 2010. – Vol. 152. – Pp. 128–138.

**CALORIMETRIC RESEARCH OF HUMAN HEMOGLOBIN DENATURATION WITH DIMETHYL SULFOXIDE**

**A.V. Zinchenko,  
Yu.S. Govorova**

*Institute for Problems of Criobiology and  
Criomedicine of the National Academy  
of Sciences of Ukraine,  
23 Pereyaslavskaya St, Kharkov,  
61015, Ukraine*

*E-mail: ju-st7@yandex.ua, alexa-  
zin@mail.ru*

The effect of 0 to 50% dimethyl sulfoxide concentration on thermal denaturation of human hemoglobin was studied by the method of differential scanning adiabatic calorimetry. The thermodynamic and kinetic calculation was done. Increase of dimethyl sulfoxide concentration results in decrease activation energy values, temperature and calorimetric enthalpy of hemoglobin denaturation. Such changes of thermodynamic and kinetic parameters of protein denaturation in the presence of dimethylsulfoxide can be explained by loosening of hemoglobin molecules and as a result, decrease of their thermal stability and degree of cooperativity.

Key words: hemoglobin, thermal denaturation, dimethyl sulfoxide, differential scanning calorimetry.