

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

Говорова Юліана Сергіївна

УДК: 57.043:612.111.11/13:536.42

**ВПЛИВ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР ТА МОЛЕКУЛЯРНОГО ОТОЧЕННЯ
НА ФАЗОВІ ПЕРЕХОДИ
У ГЕМОГЛОБІНВМІСНИХ СИСТЕМАХ**

03.00.19 – кріобіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Харків – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Зінченко Олександра Василівна, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, провідний науковий співробітник відділу кріобіофізики, м. Харків

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Жегунов Геннадій Федорович, Харківська державна зооветеринарна академія МАП України, завідувач кафедри хімії та біохімії, м. Харків

кандидат біологічних наук, доцент
Бєлих Ірина Анатоліївна, Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут» МОН України, доцент кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії, м. Харків

Захист відбудеться «31» травня 2016 р. о 13:30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Автореферат розісланий «20» квітня 2016 року.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01,
доктор біологічних наук, професор

Л.Ф. Розанов

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Проблема впливу низьких температур та криозахисних агентів на біологічні молекули, зокрема білки, у сучасній кріобіології все більше привертає увагу дослідників. Тим не менш рішення ряду кріобіологічних задач не можливо без розгляду деяких аспектів молекулярної біофізики. Особливий інтерес у цьому напрямі має дослідження таких фундаментальних фізичних явищ, як фазові переходи у біологічних системах під впливом різних кріобіологічних факторів.

У кріобіологічних дослідженнях водних систем, які містять біологічні макромолекули, зокрема білки, важливе значення мають фазові переходи у різних температурних діапазонах. По-перше, це низькотемпературні фазові переходи, такі як кристалізація, склування і плавлення, які можуть бути додатковими чинниками пошкодження біологічних об'єктів у ході їх кріоконсервування (Зинченко А.В. и др., 2010), і, по-друге, перехід білку з нативного стану у розгорнутий, який має місце у позитивному діапазоні температур. Цей процес має назву анфолдінгу білків і може аналізуватися за допомогою термічної денатурації (E.P. Melo et al., 1997). Термоденатурація білків частіше за все протікає незворотно, тому для її аналізу застосовуються, як термодинамічний, так і кінетичний підходи (Любарев и др., 2000). У ряді робіт здійснене дослідження впливу різних неелектролітів на термоденатурацію білків, як до (Navarro F. et al., 2015; Tretyakova T. et al., 2013; Kumar V. et al., 2009; Li J. et al., 2015), так і після низькотемпературного впливу (Зинченко А.В. и др., 1997, 2013; Rodrigues Furlan L.T. et al., 2012). При цьому показано, що під дією цих факторів термодинамічні та кінетичні параметри денатурації білків будуть відрізнятися у тій чи іншій мірі. Таким чином, дослідження процесу термоденатурації можна розглядати, як методологічний підхід для виявлення наслідків дії низьких температур і зміни молекулярного оточення на білки.

Одним із перших і важливих етапів технології кріоконсервування є процес інкубування біоб'єктів у криозахисних середовищах, при якому можливі зміни міжмолекулярних взаємодій у системі, що сприяють різним порушенням структури білків та ін. Білки достатньо чутливі до змін молекулярного оточення у системі, що робить необхідним їх вивчення у присутності кріопротекторів, а також інших макромолекул під дією низьких температур з метою удосконалення технології кріоконсервування.

Одним з найважливіших функціональних білків є гемоглобін, який відповідає за перенесення кисню у кровоносній системі людини та тварин. Дослідженню гемоглобіну присвячена достатня кількість робіт (Schechter A.N., 2008; Fotouhia L. et al., 2014). Однак є ще достатньо багато питань у вивченні впливу факторів кріоконсервування на структурно-функціональний стан гемоглобіну, зокрема не достатньо висвітлені такі проблеми, як вплив низьких температур і молекулярного оточення на фазові переходи гемоглобінвмісних систем.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана у відділі кріобіофізики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини

НАН України у рамках науково-дослідної теми № 61 «Вплив низьких температур на біологічну активність окремих фракцій водно-сольових екстрактів плаценти» (№ ДР0111U001201).

Мета і задачі дослідження. Мета роботи – визначення впливу низьких температур і молекулярного оточення на фазові переходи у гемоглобінвмісних системах.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі задачі:

- Проаналізувати вплив гліцерину (ГЛ), диметилсульфоксиду (ДМСО) і оксиетильних похідних гліцерину зі ступенем полімеризації $n=5$ (ОЕГ _{$n=5$}) і $n=25$ (ОЕГ _{$n=25$}) на процес термоденатурації гемоглобіну людини.
- Дослідити вплив охолодження до -196°C на процес термоденатурації гемоглобіну людини у присутності ДМСО та ОЕГ _{$n=25$} .
- Вивчити вплив кріопротекторів на процес термоденатурації гемоглобіну коня і бика. Здійснити аналіз термостабільності гемоглобіну людини, порівняно з термостабільністю гемоглобіну бика і коня, у присутності 1,2-ПД.
- Провести аналіз впливу гемоглобінвмісних фракцій екстрактів плаценти, як до, так і після її охолодження до -196°C , на термоденатурацію мембранозв'язаних білків еритроцитів.
- Виявити дію заморожування і зберігання плаценти за -20 і -196°C на фазові переходи у гемоглобінвмісних фракціях з екстракту плаценти, а також вплив фракцій екстрактів плаценти на фазові переходи у суспензіях еритроцитів з додаванням досліджених фракцій.

Об'єкт дослідження – вплив фізико-хімічних факторів кріоконсервування на фазові переходи у системах, які містять білки.

Предмет дослідження – вплив низьких температур та молекулярного оточення на теплову денатурацію і низькотемпературні фазові переходи у гемоглобінвмісних системах.

Методи дослідження. Для вирішення поставлених задач у роботі були використані такі методи:

- диференціальна скануюча мікрокалориметрія – для визначення теплофізичних і кінетичних параметрів денатурації гемоглобіну; термостабільності мембранозв'язаних білків еритроцитів;
- низькотемпературна скануюча калориметрія – для аналізу фазових переходів у фракціях екстрактів плаценти і у суспензіях еритроцитів;
- спектрофотометрія – для визначення концентрації білків у використаних у роботі зразках.

Наукова новизна одержаних результатів.

1. Вперше досліджений вплив кріопротектору, що традиційно використовується у кріобіології (диметилсульфоксид), а також нових, розроблених в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини, оксиетильних похідних гліцерину зі ступенем полімеризації $n=5$ і 25 на термоденатурацію гемоглобіну людини. Для всіх розглянутих систем розраховані термодинамічні параметри плавлення білку. Показано, що ці кріопротектори мають дестабілізуючий вплив на термостабільність гемоглобіну. Вперше проведений порівняльний аналіз ГЛ, ДМСО, ОЕГ _{$n=25$} , ОЕГ _{$n=5$} ,

та 1,2-ПД на термоденатурацію гемоглобіну людини. Встановлено, що за ступенем зниження термостабільності гемоглобіну ці кріопротектори можна розташувати у ряд: ГЛ < ОЕГ_{n=25} < ОЕГ_{n=5} < ДМСО < 1,2-ПД. Також вперше проведений кінетичний аналіз денатурації гемоглобіну з гліцерином, ОЕГ_{n=25}, ОЕГ_{n=5} та ДМСО. Виявлено, що всі досліджені кріопротектори, за винятком гліцерину, знижують значення енергії активації процесу денатурації гемоглобіну.

2. Вперше досліджений вплив ДМСО і ОЕГ_{n=25} концентрацією від 0 до 50% на термостабільність гемоглобіну людини після заморожування до -196°C . Показано, що заморожування до -196°C розчинів гемоглобіну людини з 15% – 50% ДМСО та 30% – 50% ОЕГ_{n=25} призводить до підвищення температур денатурації гемоглобіну порівняно з гемоглобіном, який не піддавався низькотемпературному впливові у присутності кріопротектору.

3. Вперше був здійснений термодинамічний та кінетичний аналіз впливу кріопротекторів на термоденатурацію гемоглобіну бика і коня. Порівняльний аналіз конформаційної стабільності гемоглобіну людини, бика і коня з 1,2-ПД показав, що гемоглобін людини є найменш стійким до впливу даного кріопротектору.

4. Вперше був встановлений вплив фракцій екстрактів плаценти різних молекулярних мас, як до, так і після заморожування плаценти до -196°C , на термостабільність білків у складі еритроцитарних мембран. Встановлено, що зареєстровані зміни термодинамічних параметрів денатурації мембранозв'язаних білків у присутності фракцій екстрактів мають оборотний характер.

5. Вперше був здійснений аналіз низькотемпературних фазових переходів у сумішах фракцій різних молекулярних мас з екстракту плаценти (яка була піддана низькотемпературному впливові) з суспензією еритроцитів. Показано, що додавання до суспензій еритроцитів фракцій екстрактів плаценти викликає зниження температури і ентальпії плавлення евтектики.

Практичне значення одержаних результатів. Дослідження впливу кріопротекторів та низьких температур на процес термоденатурації гемоглобіну можуть бути використані при розробці середовищ для кріоконсервування еритроцитів людини, бика і коня.

Дослідження термостабільності біомакромолекул методом калориметрії може бути додатковим методом оцінки структурного стану білків після кріоконсервування.

Результати дисертаційної роботи можуть бути рекомендовані для використання у курсі лекцій навчальних закладів з предметів «Кріобіофізика», «Методи аналізу біологічних систем», «Біотехнологія клітин і білків».

Особистий внесок здобувача. Автором дисертаційної роботи самостійно здійснено аналіз даних літератури. Винесені на захист положення та експериментальні дані отримані за його безпосередньою участю. Автором особисто виконана статистична обробка і первинний аналіз результатів та сформульовано висновки. Разом із науковим керівником, професором Зінченко О.В., визначені мета, задачі роботи та способи їх вирішення, здійснена інтерпретація отриманих результатів та зроблені остаточні висновки.

В роботах [1–13, 15–20], опублікованих із співавторами, особистий внесок здобувача полягає в наступному:

- у роботах [1, 5, 6, 8–15, 18] – виконання експериментальних досліджень методом диференціальної скануючої адіабатичної калориметрії впливу кріопротекторів на термостійкість гемоглобіну, розрахунок термодинамічних і кінетичних параметрів термоденатурації білку з кріопротекторами різних концентрацій, аналіз та інтерпретація результатів;

- у роботах [2, 3, 17, 19] – виконання експериментальних досліджень методом низькотемпературної скануючої калориметрії фазових переходів у фракціях екстрактів плаценти людини та у сумішах даних фракцій з суспензіями еритроцитів, аналіз та інтерпретація результатів;

- у роботах [4, 20] – участь у виконанні експериментальних калориметричних досліджень фазових переходів у екстрактах плаценти за температури нижче нуля, інтерпретація результатів;

- у роботі [7] – участь у інтерпретації результатів, оформленні матеріалу до статті;

- у роботі [16] – виконання експериментальних досліджень впливу фракцій екстрактів плаценти (як до, так і після заморожування плаценти за температури -196°C) різних молекулярних мас на термостійкість еритроцитарних мембран людини.

В усіх роботах – оформлення матеріалів у вигляді статей або тез.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи були представлені на вітчизняних і міжнародних конференціях, серед яких:

- щорічні Міжнародні конференції «Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии» (м. Севастопіль, Україна, 2010, 2011, 2012, 2013);

- 12th Kharkiv Young Scientists Conference on Radiophysics, Electronics, Photonics and Biophysics (м. Харків, Україна, 2012);

- щорічна міжнародна конференція «Биология – наука XXI века» (м. Пушино, Росія, 2013, 2014);

- конференції молодих вчених «Холод в биологии и медицине» ІПКіК НАН України (м. Харків, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014);

- наукова конференція, присвячена 40-річчю ІПКіК НАН України, «Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины» (м. Харків, 2012).

Публікації. За матеріалами, що ввійшли до дисертації, опубліковані 20 робіт: 7 статей у наукових спеціалізованих виданнях (5 з них – у фахових виданнях України, 2 – у закордонних), 13 тез доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях.

Структура дисертації. Матеріали дисертації викладені на 138 сторінках друкованого тексту, з яких 114 сторінок основного змісту. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали і методи дослідження», 3 розділів з результатами, аналізом, узагальненням та обговоренням власних досліджень, а також висновків та переліку літератури (208 джерел) на 24 сторінках. Робота ілюстрована 55 рисунками і 4 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** наведено загальну характеристику роботи, обґрунтовано актуальність теми дисертації, вказано зв'язок роботи з науковими програмами і темами, сформульовано мету і основні задачі дослідження, виділено особистий внесок здобувача, вказано наукову новизну і практичне значення роботи, наведено дані про апробацію і публікацію результатів та структуру дисертації.

У **першому розділі** представлено огляд літератури за темою дисертації. Розглянуто літературні дані, які на сучасному рівні висвітлюють актуальність проблеми впливу низьких температур і кріопротекторів на теплову денатурацію білків, як в ізольованому стані, так і у складі еритроцитарної мембрани. Окрему увагу приділено дослідженням низькотемпературних фазових переходів у водних системах, які містять білки. На основі аналізу літературних даних мотивований вибір об'єктів і сформульований напрям дослідження.

У **другому розділі** розглянута загальна характеристика матеріалів і методів дослідження, методика виконання розрахунків, приведені дані про умови здійснення експериментів, характеристики досліджених препаратів і об'єктів.

Для отримання якнайбільш повної інформації про фазові переходи у досліджених білкових системах був обраний метод ДСК, який у роботі представлений двома приладами: диференціальним скануючим адіабатичним мікрокалориметром та низькотемпературним скануючим диференціальним калориметром.

Дослідження термоденатурації білків проводили на диференціальному скануючому калориметрі ДАСМ-4 (СКББП РАН, Пуціно, Росія). Прилад дає можливість досліджувати теплові ефекти розтягнутих при температурі теплових процесів внутрішньомолекулярних перетворень біологічних речовин, які знаходяться у розчині з низькою концентрацією (0,1%), як функцію від температури. Принцип дії ДАСМ-4 полягає у реєстрації різниці теплових потужностей, що виділяються чи поглинаються у калориметричних камерах, які прогріваються з постійною швидкістю у адіабатичних умовах. Калориметр працює з компенсацією різниці теплових потужностей, які виникають у процесі прогріву досліджуваної і порівняльної рідин. Сигнал, пропорційний потужності компенсації, реєструється двокоординатним самописцем у залежності від температури. Похибка вимірювання приладу ДАСМ-4: температури $\pm 0,1\%$, потужності $\pm 1\%$.

Область сканування температури – від 20°C до 100°C . Термодинамічні та кінетичні параметри денатурації гемоглобіну та інших білків розраховувались за допомогою відповідних термограм. Термограми реєстрували при нагріванні зі швидкістю $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ при надлишковому тискові 2,5 атм. Температура денатурації є індикатором термостабільності білків (Chiu M.H., 2011, Shiba K. et al., 2010, Badea E. et al., 2013).

Дослідження низькотемпературних фазових переходів виконувалося на диференціальному скануючому калориметрі, розробленому у ІПКіК НАН України. 0,5 г фракцій ЕПЛ змішували з 0,5 г суспензій еритроцитів і інкубували протягом 2 год при 4°C . Термограми реєстрували при нагріванні зі швидкістю $0,5^{\circ}\text{C}$ у діапазоні

-150...0°C. Охолодження зразків проводили шляхом занурення у рідкий азот з середньою швидкістю 200 /хв. Термограми реєстрували при нагріванні зі швидкістю 0,5°C. Похибка вимірювання теплопоглинання $\pm 2,5^\circ\text{C}$.

Матеріалами для дослідження були обрані гемоглобін людини та тварин, фракції плаценти людини та еритроцити людини. Донорська кров (чоловіча, A(II)⁺), була надана Харківським обласним Центром служби крові. Кров тварин отримували з яремної вени дорослих самців. Експерименти проводили згідно з «Загальними принципами експериментів на тваринах», схваленими V Національним конгресом з біоетики (м. Київ, Україна, 2013), погодженими з положеннями «IV Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (ETS 123, Страсбург, Франція, 1986). Всі експерименти узгоджені з Комітетом з біоетики ІПКіК НАН України. Зразки крові тварин стабілізували консервантом «Глюгіцир» («Біофарма», Україна).

Еритроцити відмивали від плазми і формених елементів крові одноразовим центрифугуванням протягом 5 хвилин при 1500 g. Наступні 2 відмивання здійснювали шляхом центрифугування при тих же умовах у десятиразовому об'ємі ізотонічного відмивного розчину (0,155 М NaCl і 5мМ натрій-фосфатний буферний розчин (рН 7,4)).

Розчин гемоглобіну отримували за стандартною методикою (Кузнецова Н.П., 2008), з деякими модифікаціями, яка включає відмивання еритроцитів, їх гемоліз (5мМ натрій-фосфатний буфер (рН 7,8)) і центрифугування для видалення стромы еритроцитів. Далі проводили центрифугування при 27500 g протягом 15 хвилин. Отриманий розчин розподіляли на надосад і осад. Супернатант є розчином гемоглобіну.

Для отримання тіней еритроцитів здійснювали відмивання осаду мембран еритроцитів ще 2 рази. Осад є тінями еритроцитів. Усі процедури проводилися при 4°C.

Екстракт плаценти і фракції екстрактів отримували, як зазначено у роботах (Погожих Д.Н. и др., 2008). Плаценту заморожували до -20°C (у морозильній камері) і -196°C (у рідкому азоті) зі швидкістю 1-2°/хв і зі швидкістю 200°/хв, відповідно, і зберігали протягом 6 міс. Відігрівання здійснювали на водяній бані при 20°C. Усі спектрофотометричні дослідження виконували на спектрофотометрі «PyeUnicam SP 8000», Великобританія.

Розчини кріопротекторів готували зважуванням на аналітичних вагах. Похибка зважування не перевищувала 0,01%. Розчини гемоглобіну інкубували у присутності кріопротекторів протягом 1 години при 4°C. Інкубування мембран еритроцитів з фракціями екстрактів плаценти людини (ЕПЛ) (змішування 1:1) складало 2 години. Відмивання мембран еритроцитів виконувалося дворазовим осаджуванням шляхом центрифугування 10-кратним об'ємом фізіологічного розчину.

Концентрації білків використаних у роботі зразків вимірювались методом спектрофотометрії на спектрофотометрі «PyeUnicam SP 8000», Великобританія.

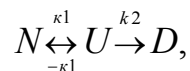
У роботі використовували такі кріопротектори: 1,2-ПД, ДМСО, гліцерин («Макрохим», Україна), ОЕГ_{n=5} і ОЕГ_{n=25} («Барва», Україна).

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.

Отримані результати обробляли статистично за допомогою програм “STATISTICA 10” і “Origin 8”. Дані оцінювали, використовуючи непараметричний критерій Манні-Уїтні, виражали у вигляді $M \pm m$. Достовірно відмінними вважали результати при $p < 0,05$.

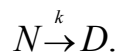
У **третьому розділі** наведені результати досліджень впливу кріопротекторів і низьких температур на термічну денатурацію гемоглобіну методом ДСК. Ці дослідження важливі для розкриття механізмів кріопошкодження-кріозахисту біологічних структур.

Процес денатурації гемоглобіну (HbA) протікає у дві стадії (Sengupta B., 2005): перша – оборотна дисоціація тетрамера на протомери, друга – кінетично необоротний перехід у денатурований стан. Таким чином, денатурація гемоглобіну підпорядковується двостадійній моделі Ламрі-Ейринга (Любарев А.Е. и др., 2000; Vyazovkin S., 2015), яка є найбільш поширеною схемою моделювання незворотної денатурації:



де N – нативний стан білку; U – проміжний оборотний стан; D – денатурований стан.

Якщо швидкість другої стадії велика (як у нашому випадку), то ця модель може бути зведена до одностадійної незворотної моделі денатурації (Любарев А.Е. и др., 2000):



Для перевірки оборотності або незворотності процесу денатурації нами була здійснена процедура повторного прогріву зразка: після реєстрації піку денатурації гемоглобіну зразок охолоджували, потім заново знімали залежність теплоємності від температури. При повторному скануванні поглинання тепла не спостерігалось, що вказує на незворотність процесу денатурації гемоглобіну. У випадку незворотної денатурації макромолекул проводиться також кінетичний аналіз цього процесу (Любарев А.Е. и др.).

У зв'язку з цим, нами виконаний термодинамічний і кінетичний аналіз денатурації гемоглобіну людини у присутності ГЛ, ОЕГ_{n=5} та ОЕГ_{n=25}, ДМСО, 1,2-ПД. Дані для термоденатурації гемоглобіну у присутності 1,2-ПД були отримані з літературних джерел (Соловьева А.С. и др., 1997). Із термодинамічного аналізу визначали температури і калориметричні ентальпії (ΔH_{cal}) денатурації; із кінетичного аналізу – енергію активації (E_a) процесу денатурації гемоглобіну.

Характерні калориметричні профілі денатурації гемоглобіну людини у буферному розчині і у присутності ОЕГ_{n=5} концентрацією 25% і 50% наведені на рис. 1.

На підставі отриманих термограм визначені температури, розраховані калориметричні ентальпії (ΔH_{cal}) денатурації гемоглобіну, побудовані залежності

цих параметрів від концентрації досліджених кріопротекторів. Як видно на рисунку 2, збільшення концентрації кріопротекторів, окрім гліцерину, призводить до зниження температури денатурації білку. Значення температури денатурації гемоглобіну у присутності гліцерину концентрацією до 40% достовірно не змінюються.

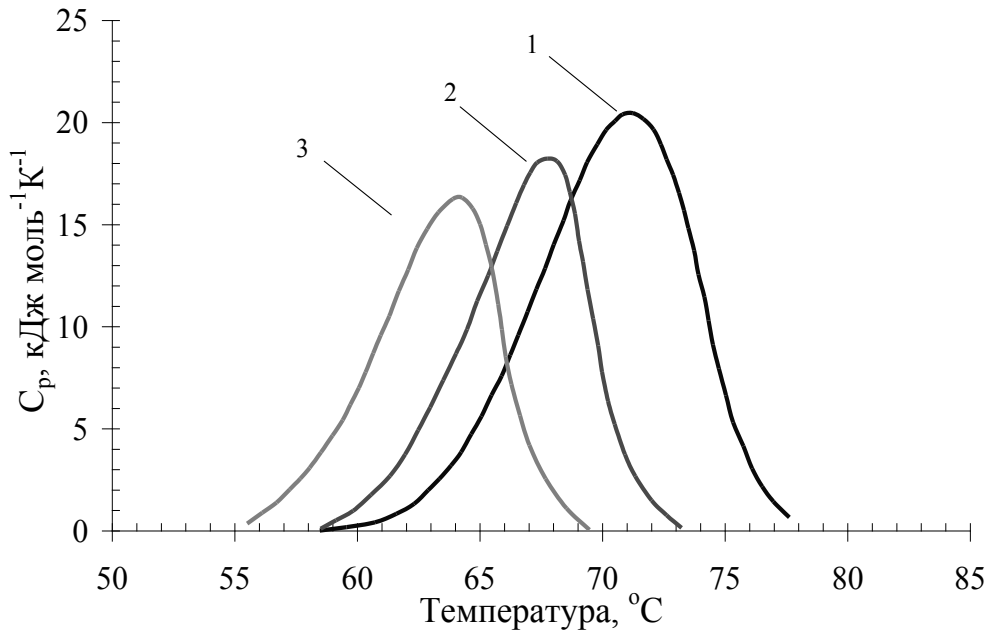


Рис.1.
Термограми денатурації розчинів гемоглобіну з ОЕГ_{n=5}:
1 – без кріопротектору;
2 – 25% ОЕГ_{n=5};
3 – 50% ОЕГ_{n=5}.

За ступенем зниження термостабільності гемоглобіну у присутності кріопротекторів, їх можна розташувати у наступний ряд: ГЛ < ОЕГ_{n=25} < ОЕГ_{n=5} < ДМСО < 1,2-ПД. Зниження термостабільності гемоглобіну у присутності 1,2-ПД може пояснюватися зміною просторової упаковки простетичної групи і глобінової частини молекули білку (Солов'єва А.С., 1997).

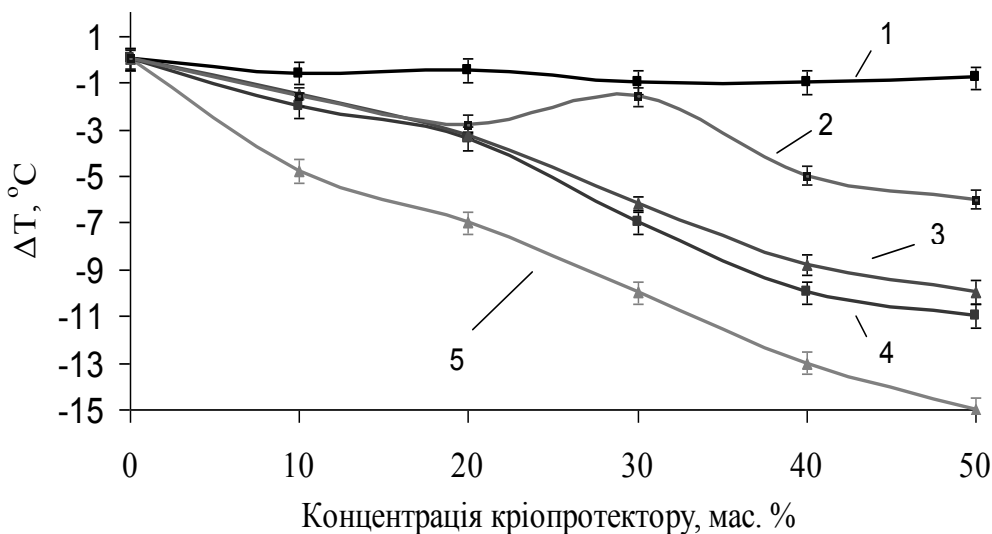


Рис.2.
Залежності зміни температури денатурації гемоглобіну людини від концентрації кріопротекторів:
1 – з ГЛ;
2 – з ОЕГ_{n=25};
3 – з ОЕГ_{n=5};
4 – з ДМСО;
5 – з 1,2-ПД.

Далі нами здійснений кінетичний аналіз денатурації гемоглобіну з кріопротекторами за даними ДСК. Для цього, використовуючи один з підходів Sanchez-Ruiz (Sanchez-Ruiz J.M. et al. 1988), розраховані E_a процесу термоденатурації гемоглобінів за тангенсом кута нахилу залежностей $\ln[vCpex/(\Delta Hcal-Q)]$ від $1/T$. Приклад даних залежностей для гемоглобіну з ОЕГ_{n=5} показаний на рис. 3.

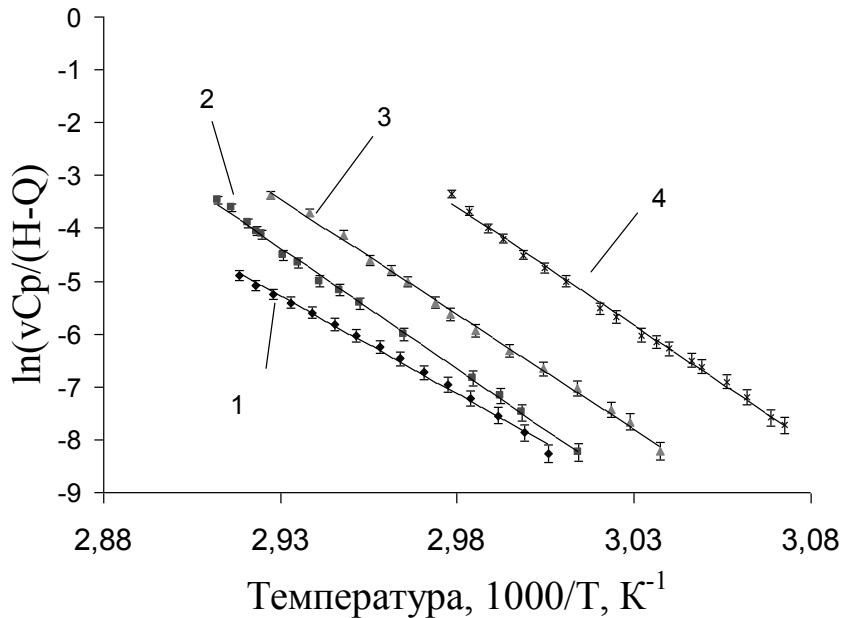


Рис. 3. Залежності $\ln[vCpex/(\Delta Hcal-Q)]$ від $1/T$ для денатурації гемоглобіну людини у присутності ОЕГ_{n=5} різної концентрації:
 1 – без ОЕГ_{n=5};
 2 – 8% ОЕГ_{n=5};
 3 – 25% ОЕГ_{n=5};
 4 – 50% ОЕГ_{n=5}.

Залежності для денатурації гемоглобіну у присутності інших кріопротекторів мають подібний лінійний характер у даних координатах, що говорить про застосованість використаної нами моделі денатурації (Любарев А.Е. и др., 2000).

Кінетичний аналіз процесу денатурації гемоглобіну показав, що додавання кріопротекторів, крім гліцерину, до розчину гемоглобіну призводить до зниження енергії активації процесу денатурації. Найбільш виражений ефект зниження значень енергії активації денатурації гемоглобіну спостерігається у разі додавання ОЕГ_{n=5}. Так, зниження енергії активації процесу денатурації при 50% концентрації кріопротекторів в розчині гемоглобіну становить для ОЕГ_{n=25} – 144 ± 15 кДж/моль, для ДМСО – 94 ± 13 кДж/моль, для ОЕГ_{n=5} – 67 ± 11 кДж/моль. Значення енергії активації в присутності гліцерину залишаються достовірно однаковими. Таким чином, гліцерин сприяє збереженню термостабільності молекул гемоглобіну. Згідно з даними літератури, гліцерин стабілізує білки неспецифічно до структури макромолекул в їх спільних комплексах, що утворюються за рахунок слабких зв'язків типу водневих, гідрофобних і Ван-дер-ваальсових (Мартиросова Е.И., 2007). Також відомо, що поверхневі гідрофобні залишки білку у гліцериновому середовищі можуть мігрувати у внутрішнє оточення білку, зменшуючи контакт із середовищем, і можуть ковалентно зв'язуватися з поліпептидними ланцюгами білку, призводячи до більш щільної упаковки його поверхні (Gekko K., 1981), що, на нашу думку, може призводити до збереження термостабільності гемоглобіну у присутності гліцерину.

У роботі також проводився аналіз впливу заморожування гемоглобіну у присутності кріопротекторів ДМСО і ОЕГ_{n=25} на термоденатурацію гемоглобіну людини. Відповідні термограми для денатурації білку з ДМСО показані на рис. 4.

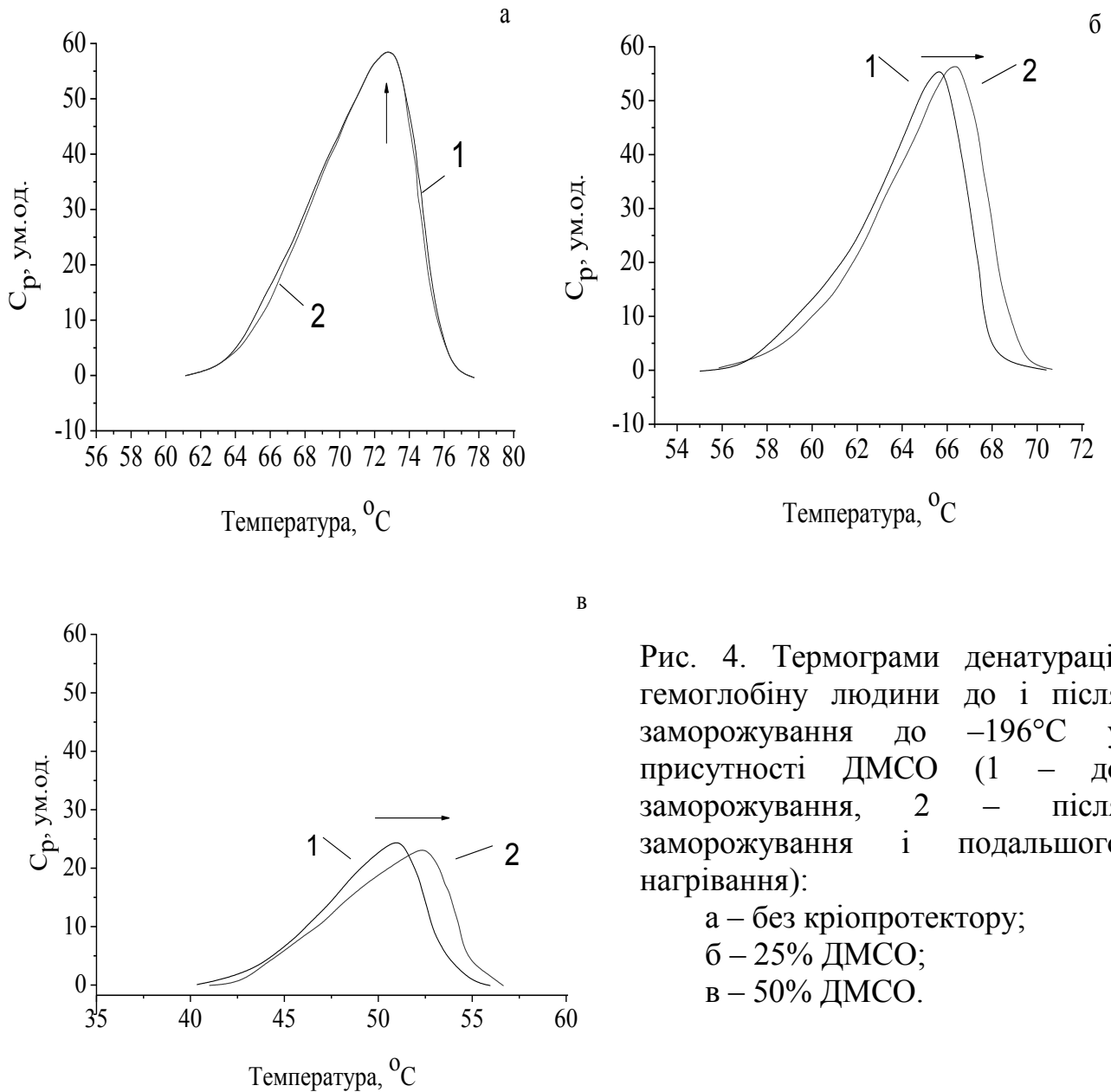


Рис. 4. Термограми денатурації гемоглобіну людини до і після заморожування до -196°C у присутності ДМСО (1 – до заморожування, 2 – після заморожування і подальшого нагрівання):

- а – без кріопротектору;
- б – 25% ДМСО;
- в – 50% ДМСО.

Залежності зміни температури денатурації гемоглобіну у кріопротекторному середовищі, як до, так і після заморожування-відігрівання розчинів гемоглобіну з кріопротекторами показані на рис. 5. ОЕГ_{n=25} концентрацією від 0 до 30 % і ДМСО концентрацією від 0 до 15% (рис. 5) не впливають на термостабільність гемоглобіну, який був підданий заморожуванню до -196°C , про що свідчать достовірно незмінні значення температури денатурації.

Подальше збільшення концентрації ОЕГ_{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 $(2\pm 0,1)^\circ\text{C}$, $\text{OEG}_{n=25}$ – на $(3\pm 0,1)^\circ\text{C}$, порівняно з температурою денатурації гемоглобіну, який не заморожувався у присутності кріопротектору. Відомо, 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 (Григорян Р.И. и др., 2009).

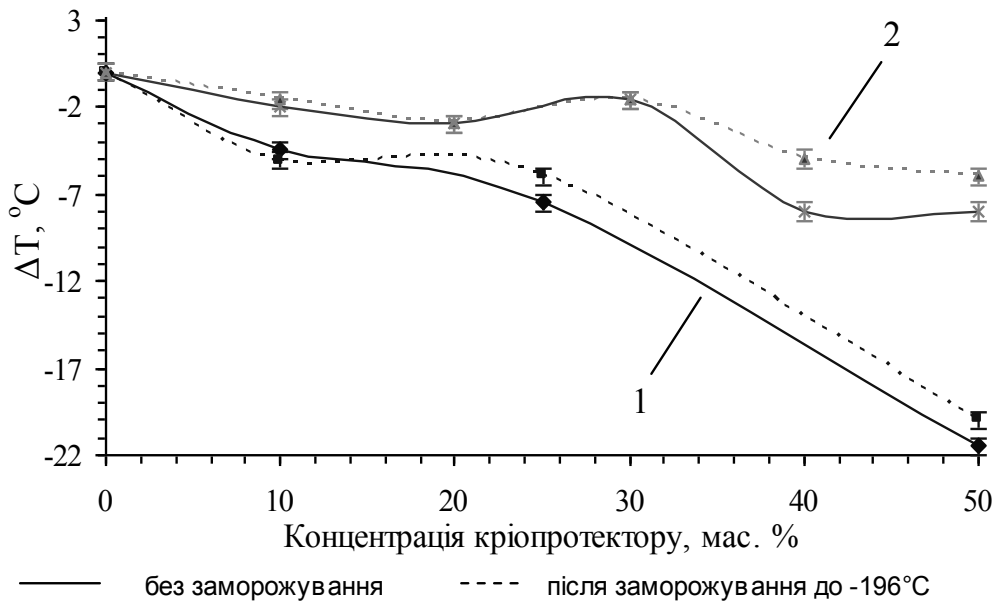


Рис.5. Вплив ДМСО (1) $\text{OEG}_{n=25}$ (2) і на температуру денатурації гемоглобіну людини після заморожування-відігрівання

Відомо, що гемоглобіни різних тварин мають видову специфічність (Sanyal M. et al., 2013; Kamariah N. et al., 2014). Гемоглобін людини і бика відрізняється 12 амінокислотами у α -ланцюзі і 17 у β -ланцюзі, а гемоглобін людини і коня – 13 і 17, відповідно (Grant V., 1985). Відмінності в амінокислотних послідовностях можуть призвести до змін термоденатурації гемоглобінів. У зв'язку з цим, являє інтерес термодинамічне і кінетичне дослідження термостабільності гемоглобіну коня і бика у присутності кріопротекторів, а також порівняльний аналіз отриманих даних з термодинамічними і кінетичними параметрами денатурації гемоглобіну людини.

Термограми денатурації гемоглобіну коня у присутності ДМСО і гліцерину показані на рис. 6 і 7. Виявлено, що гліцерин сприяє достовірному підвищенню температури і калориметричної ентальпії денатурації гемоглобіну коня, в той час як 1,2-ПД і ДМСО є денатурантами гемоглобіну при концентрації 5% і вище. Причому даний ефект виражений значніше у разі 1,2-ПД. Так, 40% 1,2-ПД знижує температуру денатурації гемоглобіну коня на $(13\pm 0,1)^\circ\text{C}$, ДМСО – на $(11\pm 0,1)^\circ\text{C}$.

У роботі (Liu Ch. et al., 1998) показано, що зміни конформації гема гемоглобіну коня відбуваються вже при наявності 10% ДМСО у розчині, що автори пояснювали розділенням субодиниць четвертинної структури білку, а при 50% ДМСО нативне оточення гему повністю руйнується. Цими ж авторами показано, що у випадку підвищення концентрації ДМСО від 30%, водневі зв'язки гема і жорсткий поліпептидний каркас гемоглобіну розриваються, призводячи до того, що залишки

триптофану, які не виступають назовні, виходять у більш гідрофобне оточення (Liu Ch. et al., 1998). Триптофан у білках, як відомо, є гідрофобним залишком. Можна припустити, що при підвищенні концентрації кріпротекторів у розчині гемоглобіну, молекули неелектроліту зв'язуються з гідрофобними залишками білку, які стали доступними у результаті розходження субодиниць гемоглобіну, сприяючи зниженню термостабільності білку.

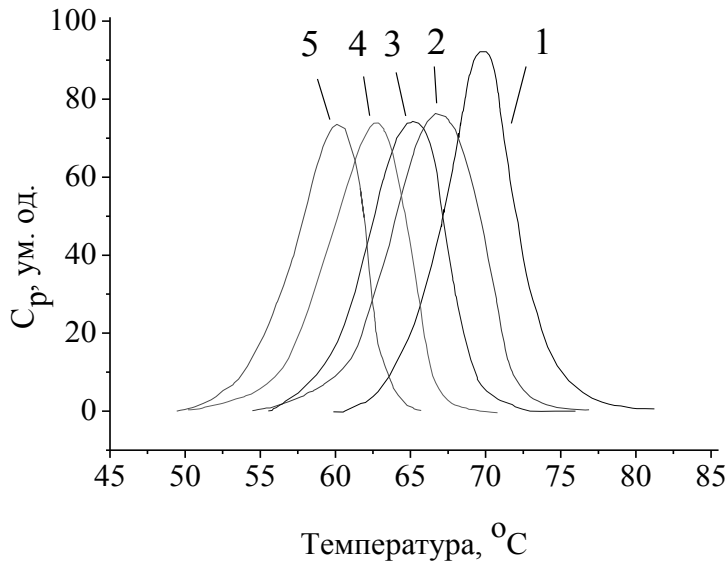


Рис. 6. Термограми денатурації гемоглобіну коня у присутності ДМСО:

1. без кріпротектору;
2. 10% ДМСО;
3. 20% ДМСО;
4. 30% ДМСО;
5. 40% ДМСО.

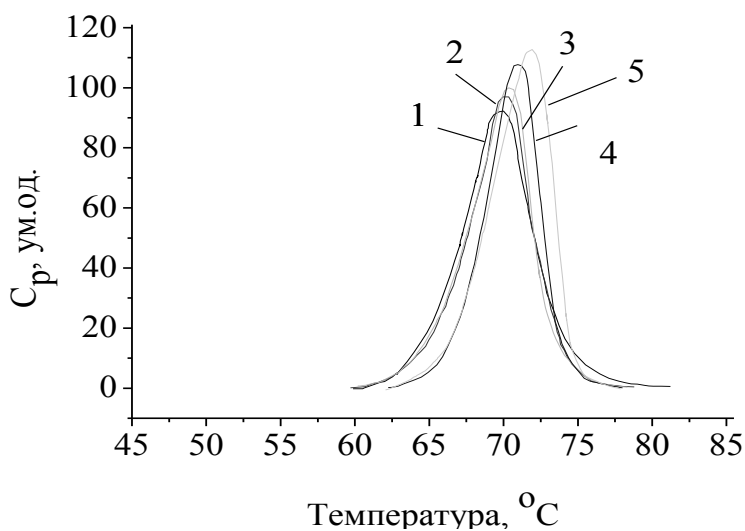


Рис. 7. Термограми денатурації гемоглобіну коня у присутності гліцерину:

1. без кріпротектору;
2. 10% гліцерину;
3. 20% гліцерину;
4. 30% гліцерину;
5. 40% гліцерину.

Аналогічні дослідження були проведені і для гемоглобіну бика. Повний аналіз дії гліцерину як дестабілізуючого фактору на гемоглобін бика здійснити складно, оскільки, як показали дослідження, гліцерин викликає агрегацію молекул гемоглобіну бика, що підтверджується представленою термограмою денатурації гемоглобіну бика у присутності 10% гліцерину (рис. 8). При подальшому збільшенні концентрації кріпротектору агрегація виражена сильніше. У зв'язку з цим, недоцільно проводити розрахунок ΔH_{cal} денатурації гемоглобіну в присутності гліцерину, оскільки має місце суперпозиція піків денатурації та агрегації, які мають протилежні знаки. Як показали експериментальні дослідження, найбільш достовірний ефект дестабілізації конформації гемоглобіну бика спостерігається при

додаванні 1,2-ПД у дослідженому діапазоні концентрацій, порівняно з іншими кріопротекторами.

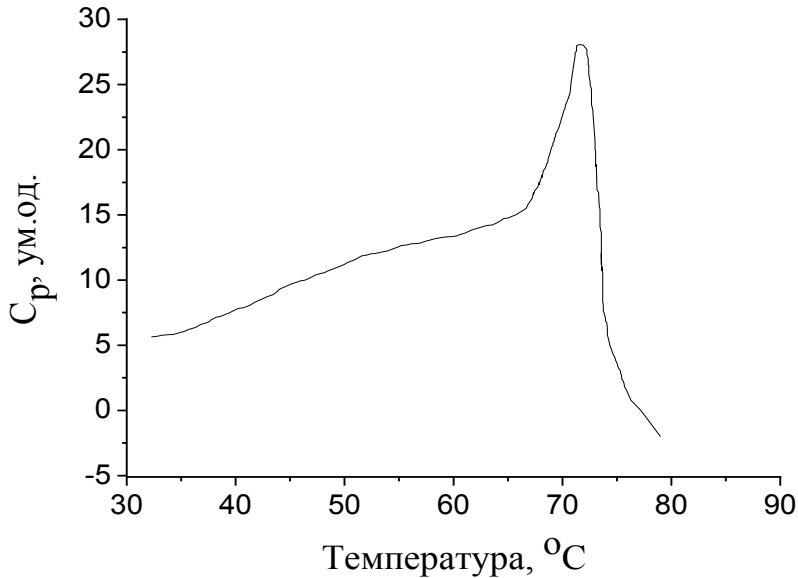


Рис. 8. Термограма денатурації гемоглобіну бика у присутності 10% гліцерину

Відомо, що коефіцієнт проникності мембран еритроцитів людини до 1,2-ПД вище, чим для ДМСО і гліцерину (Межидов С.Х, 1999; Гордиенко О.И. и др., 2001), до того ж кріоскопічні дослідження показали наявність більшої кількості 1,2-ПД, порівняно з ГЛ і ДМСО, яка не усувається із суспензії еритроцитів людини, коня і бика у ході процедури відмивання (Кучков В.Н., Зинченко В.Д., 2010). У зв'язку з цим, у роботі приведений порівняльний аналіз впливу кріопротекторів на термостабільність гемоглобіну людини, коня і бика на прикладі 1,2-ПД. Найбільш термостабільним у присутності даного кріопротектору є гемоглобін коня, найбільш чутливим - гемоглобін людини. Можна припустити, що подібні зміни викликаються міжвидовими відмінностями первинної структури гемоглобіну.

На основі аналізу наших експериментальних даних з термоденатурації гемоглобінів у кріопротекторному середовищі та даних із літературних джерел можна відзначити, що на гідратну оболонку різних білків, і гемоглобіну в тому числі, можуть впливати співрозчинники. Вважається, що відбувається процес заміщення молекул води молекулами кріопротектору у гідратній оболонці білку. Однак для білку існує певна кількість молекул води, яка може бути замінена молекулами неелектроліту, після перевищення даної кількості настає дестабілізація і, відповідно, денатурація молекули (Y.L. Khmelnsky et al., 1991). Можна припустити, що зміна гідрофобно-гідрофільного балансу у присутності кріопротекторів є причиною зниження або підвищення стабільності білкової молекули.

На прикладі порівняльного дослідження денатурації гемоглобіну людини, бика і коня підтверджено, що інкубація біоб'єктів у кріозахисних середовищах на першому етапі технології кріоконсервування не є байдужим процесом, бо на цьому етапі кріопротектори надають, як стабілізуючий, так і дестабілізуючий вплив на макромолекули. Наявність в суспензіях гемоглобіну неелектролітів, на нашу думку,

сприяє зміні міжмолекулярних взаємодій в досліджуваних системах, викликаючи зміну термостабільності гемоглобіну і сприяючи денатураційним процесам.

Подальші розділи роботи присвячені дослідженням фазових переходів складних гемоглобінвмісних систем з іншим молекулярним оточенням. У **четвертому розділі** представлено ДСК-дослідження гемоглобінвмісних фракцій екстрактів плаценти людини, як до, так і після заморожування-відігрівання плаценти, на термічну денатурацію мембранозв'язаних білків еритроцитів на прикладі рожевих і білих тіней еритроцитів.

Для вивчення термостабільності гемоглобіну була обрана фракція ЕПЛ 50-60 кДа, яка містить гемоглобін. Термограма денатурації фракції 50-60 кДа після процедури деконволюції у програмі OriginPro 7.5 є суперпозицією чітко виражених п'яти ендотермічних піків (рис. 9, пунктирна лінія). Як видно, на термограмах фракцій екстрактів плаценти після її заморожування до -196°C , не реєструються відмінності термостабільності основних компонентів фракцій від контролю.

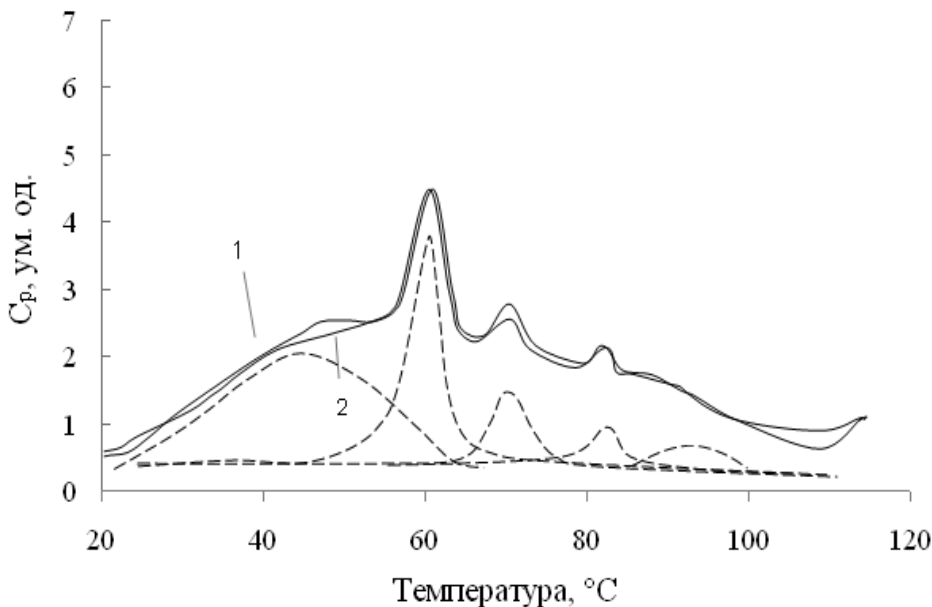


Рис.9. Термограми денатурації фракції 50-60 кДа з екстракту плаценти:
1 – зі свіжовиготовленого екстракту плаценти
2 – з плаценти, яка була заморожена до -196°C .
(пунктирною лінією позначені піки денатурації, отримані за допомогою процедури деконволюції)

Термограма рожевих тіней еритроцитів, а також термограма тіней у присутності фракції 50-60 кДа, показана на рис. 10. На термограмах зареєстровані 4 переходи, які, згідно з загальноприйнятою класифікацією, відповідають термоденатурації спектрину і анкірину (А'), білків смуги 4.2, 4.9 і актину (В'), гемоглобіну (С') і тропоміозину (D') (Brandts J.F. et al., 1977). Додавання фракції 50-60 кДа призводить до зміни інтенсивностей і температур переходів всіх груп білків. Для переходу, відповідного денатурації гемоглобіну, значення температури не змінюється.

Змішування суспензії білих тіней і фракцій екстрактів плаценти людини різних молекулярних мас призводить до зміни температур і інтенсивностей основних переходів мембранозв'язаних білків еритроцитів на калориметричних термограмах (рис.11). Так, у присутності фракцій екстрактів плаценти в суспензіях

еритроцитарних мембран спостерігається істотне збільшення інтенсивності піку A'' . Зміна інтенсивності інших піків (B'' , C'' , D'') залежить від молекулярної маси фракції (рис. 11).

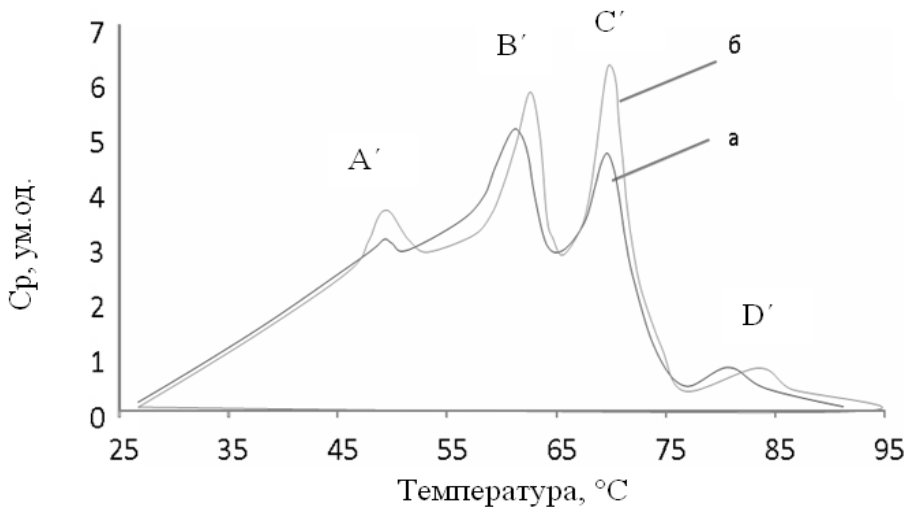


Рис. 10. Термограми денатурації мембранозв'язаних білків у рожевих тінях еритроцитів:
а – без фракції;
б – з фракцією 50-60 кДа.

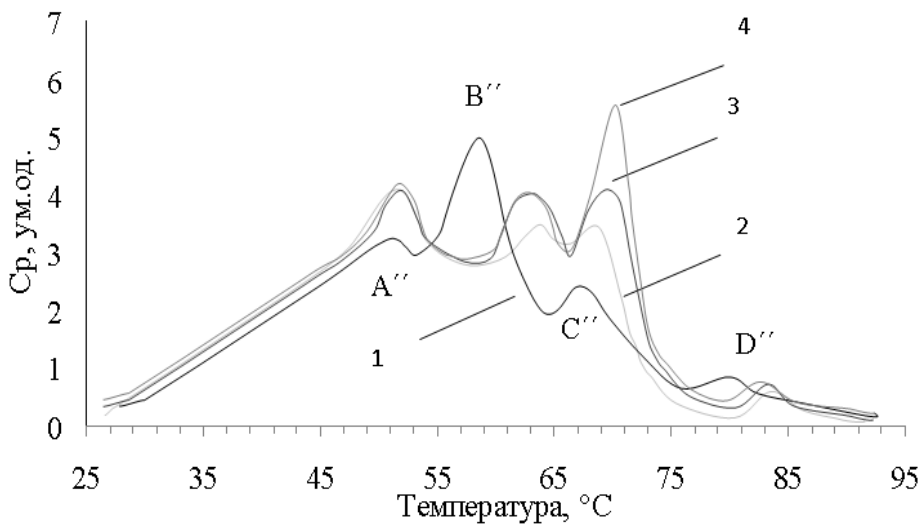


Рис. 11. Термограми денатурації мембранозв'язаних білків у білих тінях еритроцитів:
1 – без фракцій;
2 – з фракцією <4 кДа;
3 – з фракцією >150 кДа;
4 – з фракцією 50-60 кДа).

Відмивання суспензії тіней еритроцитів від фракцій ЕПЛ після двогодинного інкубування показало відсутність зв'язування мембранних білків з біологічними компонентами фракцій або оборотний характер зв'язування.

Подальше вивчення механізмів впливу фракцій ЕПЛ на гемоглобінвмісні системи знайшло продовження у експериментальних дослідженнях наступного розділу роботи.

У **п'ятому розділі** представлені дані про низькотемпературні фазові переходи у суспензіях еритроцитів з фракціями екстракту плаценти, отриманої, як до, так і після заморожування плаценти при -196°C . Відомо, що за допомогою аналізу характеру прояву фазових переходів можна отримати дані про міжмолекулярні взаємодії у системі і про утворення комплексів між її компонентами. З цією метою було проведено дослідження низькотемпературних фазових переходів у фракції 50-60 кДа, а також у суміші даної фракції з еритроцитами.

На ДСК-термограмах фракцій 50–60 кДа з ЕПЛ були зареєстровані один екзотермічний і два ендотермічні ефекти (рис. 12):

1 – вузький екзотермічний пік відображає, імовірно за все, інверсію молекул, які мають вуглець-вуглецеві зв'язки. Даний ефект, на нашу думку, може бути пов'язаний з інверсією, або з процесом ізомеризації і для його позначення використовують термін «звернення конфігурації» (Потапов В.М, 1988), або з поліморфізмом (Лосев Е.А., 2014). Цей перехід є низькоенергетичним процесом і відображає зміну конформації молекул.

2 – вузький інтенсивний ендотермічний пік відповідає плавленню евтектичних складів;

3 – плавлення системи.

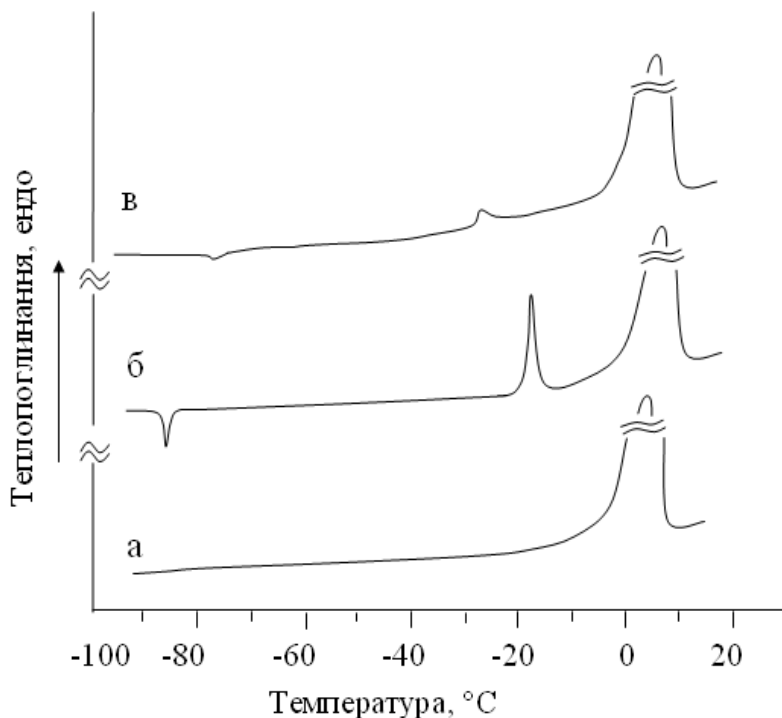


Рис. 12. Термограми:
а – суспензія еритроцитів;
б – фракція 50-60 кДа;
в – суспензія еритроцитів з фракцією 50–60 кДа.

При змішуванні суспензій еритроцитів з фракціями на термограмах реєструється зниження інтенсивності піків інверсії і евтектичного плавлення і зміна значень їх температур (Рис. 12, в). Так, температури інверсії підвищуються на $(8 \pm 0,8)^\circ\text{C}$, температури плавлення евтектики знижуються на $(5 \pm 0,7)^\circ\text{C}$. Тепловий ефект плавлення евтектики у присутності клітин знижується приблизно у 9 разів, а інверсії – у 3,5 рази.

Для виявлення закономірностей дії білкових компонентів фракцій екстрактів плаценти людини також були проведені дослідження з фракціями до 4 кДа і більше 150 кДа, як до, так і після заморожування і зберігання при -20 і -196°C .

Зберігання плаценти при -20 і -196°C протягом 6 місяців не впливає на температури фазових переходів, як у фракціях екстрактів, отриманих з цієї плаценти, так і в сумішах, які містять вказані фракції і суспензії еритроцитів.

Зареєстровані відмінності фазових переходів на термограмах у присутності клітин свідчать про те, що природа процесів, які відбуваються при їх розвитку, різна. Можна припустити, що зв'язування частини молекул, які беруть участь в

інверсії, з клітинними мембранами перешкоджає розвитку цього процесу і, таким чином, знижує інтенсивність і підвищує температуру інверсії. Зміни міжмолекулярних взаємодій у системах у присутності клітин призводять до того, що більшість молекул не бере участі в утворенні евтектичних складів, а на термограмах реєструється слабкий ендотермічний пік плавлення евтектики.

ВИСНОВКИ

У результаті здійсненого дослідження встановлені термодинамічні та кінетичні характеристики фазових переходів у гемоглобінвмісних системах в результаті дії на них низьких температур і зміни молекулярного оточення. Основні результати, отримані в роботі, можна сформулювати таким чином:

1. Вивчення термодинамічних і кінетичних параметрів термоденатурації гемоглобіну людини показало, що присутність у розчині гемоглобіну кріозахисних сполук різної концентрації має як стабілізуючий, так і дестабілізуючий вплив на конформаційну стабільність макромолекули. Виявлено, що за ступенем дії досліджених кріопротекторів, в плані зниження термостабільності гемоглобіну людини, їх можна розташувати у ряд: ГЛ < ОЕГ_{n=25} < ОЕГ_{n=5} < ДМСО < 1,2-ПД.

2. Кінетичний аналіз процесу денатурації гемоглобіну людини у кріопротекторному середовищі показав, що додавання кріопротекторів, крім гліцерину, до розчину гемоглобіну призводить до зниження енергії активації денатурації гемоглобіну. Найбільший достовірно виражений ефект впливу кріопротекторів на денатурацію гемоглобіну спостерігається у разі додавання ОЕГ_{n=5}, порівняно з ДМСО і ОЕГ_{n=25}. Зниження енергії активації процесу денатурації гемоглобіну при 50% концентрації кріопротекторів в розчині гемоглобіну становить для ОЕГ_{n=5} – 144±15 кДж/моль, для ДМСО – 94±13 кДж/моль, для ОЕГ_{n=25} – 67±11 кДж/моль. Значення енергії активації процесу денатурації гемоглобіну у присутності гліцерину складають 343±19 кДж/моль. Отже, гліцерин сприяє збереженню термостабільності молекул гемоглобіну у розчині.

3. У присутності ДМСО концентрацією від 0 до 15% і ОЕГ_{n=25} концентрацією від 0 до 30% не спостерігається достовірної зміни термостабільності гемоглобіну, підданого заморожуванню, порівняно з незамороженим гемоглобіном у присутності кріопротектору. Подальше підвищення концентрації ДМСО і ОЕГ_{n=25} до 50% у розчині гемоглобіну призводить до підвищення температури денатурації гемоглобіну, підданого заморожуванню, на (2±0,1)°С і (3±0,1)°С.

4. Порівняльний аналіз термоденатурації гемоглобіну людини, бика і коня з 1,2-ПД показав, що в присутності 40% даного кріопротектору температура денатурації гемоглобіну людини знижується на (19±0,1)°С, бика – на (14±0,1)°С, коня – на (13±0,1)°С.

5. Заморожування плаценти до –196°С не призводить до достовірних змін термостабільності основних компонентів гемоглобінвмісних фракцій екстрактів плаценти людини. Показано, що додавання фракцій екстрактів плаценти до суспензії мембранозв'язаних білків еритроцитів призводить до підвищення температури денатурації основних переходів мембранозв'язаних білків еритроцитів,

за винятком спектрину, на $((2\pm 0,1) \dots (5\pm 0,1))^\circ\text{C}$, в залежності від молекулярної маси фракції. Ці зміни термостабільності мембранозв'язаних білків еритроцитів у присутності фракцій екстрактів плаценти мають оборотний характер.

6. Показано, що додавання до суспензій еритроцитів гемоглобінвмісних фракцій екстрактів плаценти викликає підвищення температури інверсії на $(8\pm 0,8)^\circ\text{C}$ і зниження температури плавлення евтектики на $(5\pm 0,7)^\circ\text{C}$, зниження інтенсивності піків інверсії в 3,5 рази і піку плавлення евтектики в 9 разів. Зберігання плаценти при -20 і -196°C протягом 6 місяців не впливає на температури фазових переходів, як у фракціях екстрактів, отриманих з цієї плаценти, так і в сумішах, які містять вказані фракції і суспензії еритроцитів.

ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Зинченко А.В. Влияние оксиэтилированного глицерина со степенью полимеризации $n=5$ на термостабильность гемоглобина человека / А.В. Зинченко, Ю.С. Говорова, А.М. Компаниец // Проблемы криобиологии. – 2013. – Т.23, №2. – с. 135-142.

2. Зинченко А.В. Фазовые переходы в смесях клеточных суспензий с фракциями экстрактов плаценты человека при температуре ниже 0°C / А.В. Зинченко, Е.Н. Боброва, Ю.С. Говорова // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т.21, №3. – С. 314-321.

3. Влияние низкотемпературного хранения плаценты человека на фазовые переходы во фракциях экстрактов плаценты и в смесях фракций с клетками / А.В. Зинченко, Е.Н. Боброва, Ю.С. Говорова, Е.Д. Розанова, В.Г. Карпенко // Проблемы криобиологии. – 2015. – Т.25, №2. – С. 122-130.

4. Зинченко А.В. Влияние автоклавированных экстрактов плаценты человека на фазовое поведение суспензий клеток при температуре ниже 0°C / А.В. Зинченко, Е.Н. Боброва, М.И. Щетинский, Ю.С. Говорова // Проблемы криобиологии. – 2013. – Т.23, №1. – С. 40-48.

5. Zinchenko A.V. Comparative Analyses of Cryoprotective Agents Influence on Thermodynamic and Kinetic Parameters of Equine and Human Hemoglobin Molecules / A.V. Zinchenko, Yu.S. Govorova // Cryoletters. – 2014. – Vol.35, №6. – P. 516-520

6. Зинченко А.В. Калориметрическое исследование денатурации гемоглобина человека с диметилсульфоксидом / А.В. Зинченко, Ю.С. Говорова // Научные ведомости БелГУ. Серия естественные науки. – 2014. – Т.174, №3. – С. 89-93.

7. Зинченко А.В. Фазовые переходы в суспензиях эритроцитов с экстрактами криоконсервированной плаценты / А.В. Зинченко, Е.Н. Боброва, Ю.С. Говорова // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – Т.2, №3. – С. 163-166.

8. Зинченко А.В. Влияние некоторых криопротекторов на термостабильность гемоглобина быка / А.В. Зинченко, Ю.С. Говорова, В.В. Чеканова, А.М. Компаниец // Материалы VI Международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии», 26-30 апреля 2010. – Севастополь. – С. 135-138.

9. Говорова Ю.С. Дифференциальная сканирующая адиабатическая калориметрия как метод изучения конформационной стабильности белков в

криобиологии / Ю.С. Говорова, А.В. Зинченко // Материалы 34-й ежегодной конференции молодых ученых «Холод в биологии и медицине», 27-28 мая 2010. – Харьков. – С. 23.

10. Влияние оксиэтилированного производного глицерина со степенью полимеризации $n=5$ на термостабильность гемоглобина человека / А.В. Зинченко, Ю.С. Говорова, В.В. Чеканова, А.М. Компаниец // Матеріали VIII Міжнародної науково-технічної конференції «Актуальні питання біологічної фізики та хімії» БФФХ – 2012, 23-27 мая 2012. – Севастополь. – С. 98-99.

11. Говорова Ю.С. Кинетический анализ плавления гемоглобина в присутствии оксиэтилированного производного глицерина / Ю.С. Говорова, А.В. Зинченко // Холод в биологии и медицине. 36-я ежегодная конференция молодых ученых, 22-24 мая 2012, – Харьков. – С. 23.

12. Govorova Yu.S. Influence of some cryoprotectants on conformational stability of haemoglobin / Yu.S. Govorova, A.V. Zinchenko // XIII Kharkiv Young Scientists Conference on Radiophysics, Electronics, Photonics and Biophysics [Электронный ресурс]: Conference Proceedings CD-ROM. - Kharkiv, 2013. - 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

13. Зинченко А.В. Влияние диметилсульфоксида на тепловую денатурацию гемоглобина человека / А.В. Зинченко, Е.Н. Боброва, Ю.С. Говорова // Матеріали IX Міжнародної науково-технічної конференції «Актуальні питання біологічної фізики та хімії» БФФХ-2013. – С. 83-85.

14. Говорова Ю.С. Исследование влияния диметилсульфоксида на тепловую денатурацию гемоглобина человека до и после низкотемпературного воздействия / Ю.С. Говорова // Холод в биологии и медицине. 38-я ежегодная конференция молодых ученых. – Проблемы криобиологии, – 2014, –Т. 24, № 2. – С. 181.

15. Говорова Ю.С. Исследование влияния оксиэтилированного глицерина со степенью полимеризации $n=25$ на конформационную стабильность гемоглобина человека / Ю.С. Говорова, А.В. Зинченко // Тез. докл. конф. «Проблемы криобиологии и криомедицины». – Проблемы криобиологии и криомедицины. – т.23, №2. – 2013. – С. 173.

16. Говорова Ю.С. Влияние фракций экстрактов плаценты на термостабильность мембраносвязанных белков эритроцитов / Ю.С. Говорова, А.В. Зинченко, Е.Н. Боброва // Биология – наука XXI века: 17-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. – Пущино, 21 – 25 апреля 2014. – С.88-89.

17. Говорова Ю.С. Фазовые переходы в суспензиях клеток с экстрактами плацент / Ю.С. Говорова, А.В. Зинченко, Е.Н. Боброва // Биология – наука XXI века: 17-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. – Пущино, 21 – 26 апреля 2013 г. – С. 105–106.

18. Зинченко А.В. Калориметрическое исследование термоденатурации гемоглобина в присутствии криопротекторов / А.В. Зинченко, Ю.С. Говорова // Тез. докл. конф. «Проблемы криобиологии и криомедицины». – Проблемы криобиологии. – 2012. – т.22, №3. – С. 248.

19. Влияние фракций экстрактов плаценты человека на фазовые переходы в клеточных суспензиях эритроцитов и *Sacharomyces cerevisiae* / Ю.С. Говорова, А.В. Зинченко // Тез. докл. конф. «Проблемы криобиологии и криомедицины». – Проблемы криобиологии. – т.21, №2. – 2011. – С. 209.

20. Низкотемпературные фазовые переходы в суспензии клеток *Saccharomyces cerevisiae* в присутствии низкомолекулярной фракции экстрактов плаценты человека / А.В. Зинченко, Е.Д. Розанова, Е.Н. Боброва, Ю.С. Говорова // Матеріали VII Міжнародної науково-технічної конференції «Актуальні питання біологічної фізики та хімії» БФФХ-2011. – С. 77–79.

АНОТАЦІЯ

Говорова Ю.С. Вплив низьких температур та молекулярного оточення на фазові переходи у гемоглобінвмісних системах. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – криобіологія (біологічні науки). – Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, Харків, 2016.

У роботі вивчались фазові переходи у гемоглобінвмісних системах в результаті дії на них низьких температур і зміни молекулярного оточення. У якості таких систем був обраний ізольований гемоглобін, гемоглобін у складі тіней еритроцитів, гемоглобін у фракціях екстрактів плаценти людини та суспензії еритроцитів. Вивчення термодинамічних та кінетичних параметрів термоденатурації гемоглобіну показало, що присутність у розчині білку криозахисних речовин різної концентрації має як стабілізуючий, так дестабілізуючий вплив на конформаційну стабільність макромолекули. За зниженням термостабільності гемоглобіну людини досліджені криопротектори можна розташувати у ряд: ГЛ < ОЕГ_{n=25} < ОЕГ_{n=5} < ДМСО. Показано, що заморожування розчинів гемоглобіну з 40 та 50% концентрацією досліджених в роботі криопротекторів призводить до збільшення термостабільності заморожуваного білку, порівняно з білком, який не був підданий низькотемпературному впливу. Показано, що зміни фазових переходів у системах, які містять тіні еритроцитів і фракції екстрактів плаценти, мають оборотний характер. Заморожування плаценти до -196°C не викликає відмінностей значень температур і характеру фазових переходів у досліджених системах.

Ключові слова: криобіологія, фазові переходи, термоденатурація, гемоглобін, екстракт плаценти, диференціальна скануюча калориметрія.

АННОТАЦИЯ

Говорова Ю.С. Влияние низких температур и молекулярного окружения на фазовые переходы в гемоглобинсодержащих системах. – На правах рукопису.

Дисертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.19 – криобиология (биологические науки). – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 2016.

Методами дифференциальной сканирующей калориметрии изучались фазовые переходы в гемоглобинсодержащих системах в результате действия на них таких криобиологических факторов, как понижение температуры до -196°C и влияние

криопротекторов. В качестве таких систем был выбран изолированный гемоглобин, гемоглобин в составе теней эритроцитов, фракции экстрактов плаценты, содержащие гемоглобин, и суспензии эритроцитов.

Калориметрические эксперименты по изучению термостабильности белков проводили на приборе ДАСМ-4. Область сканирования – от 20°C до 100°C. Термограммы регистрировали при нагреве со скоростью 1°C/мин при избыточном давлении 2,5 атм. Термостабильность белка анализировалась на основе пика плавления на соответствующих термограммах. В работе получены значения температур, а также рассчитаны значения калориметрических энтальпий и энергий активации процесса денатурации гемоглобина в присутствии различных концентраций, как традиционно используемых в криобиологической практике криопротекторов (глицерин, ДМСО), так и новых, разработанных в ИПКиК НАН Украины (оксиэтильных производных глицерина). Изучение термодинамических и кинетических параметров денатурации гемоглобина показало, что наличие в растворе криозащитных соединений различной концентрации оказывает, как стабилизирующее, так и дестабилизирующее влияние на конформационную стабильность макромолекулы. По понижению термостабильности гемоглобина человека исследованные криопротекторы можно расположить в ряд: глицерин < ОЭГ_{n=25} < ОЭГ_{n=5} < ДМСО < 1,2-ПД. Кинетический анализ процесса денатурации гемоглобина человека с криопротекторами показал, что добавление криопротекторов, кроме глицерина, к раствору гемоглобина приводит к понижению энергии активации. Наиболее выраженный эффект влияния криопротекторов на денатурацию гемоглобина наблюдается в случае добавления ОЭГ_{n=5} по сравнению с ДМСО и ОЭГ_{n=25}. Снижение энергии активации при 50% концентрации криопротектора в растворе гемоглобина составляет для ОЭГ_{n=5} – 144±15 кДж/моль, для ДМСО – 94±13 кДж/моль, для ОЭГ_{n=25} – 67±11 кДж/моль. Значения энергии активации в присутствии глицерина остаются приблизительно одинаковыми и составляют, в среднем, 343±19 кДж/моль.

Сравнительный анализ конформационной стабильности гемоглобина человека, быка и коня в присутствии 1,2-ПД показал, что 40% данного криопротектора понижает температуру денатурации гемоглобина человека (19±0,1)°C, быка – на (14±0,1)°C, коня – на (13±0,1)°C.

Однократное замораживание до –196°C и оттаивание раствора гемоглобина человека не приводит к изменению его конформационной стабильности, в то время как наличие криопротектора в растворе белка приводит к повышению термостабильности замороженного гемоглобина, по сравнению с контролем.

Исследование термостабильности теней эритроцитов в присутствии фракций экстрактов плаценты, как до, так и после низкотемпературного воздействия, показало изменение интенсивности и сдвиг пиков денатурации мембранных белков в сторону более высоких температур. Однако природа данных изменений носит обратимый характер и не обусловлена образованием стойких химических связей.

Исследования низкотемпературных фазовых переходов в системах, содержащих фракции экстрактов плаценты и суспензии эритроцитов, проводили на низкотемпературном дифференциальном сканирующем калориметре,

разработанном в ИПКиК НАНУ. Термограммы снимали на этапе нагрева со скоростью $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Анализ температур и энтальпий основных переходов исследованных систем показал, что добавление во фракции экстрактов плаценты суспензии эритроцитов вызывает повышение температуры инверсии на $(8\pm 0,8)^{\circ}\text{C}$ и снижение температуры плавления эвтектики на $(5\pm 0,9)^{\circ}\text{C}$, снижение интенсивности пиков инверсии в 3,5 раза и пика плавления эвтектики в 9 раз. Эти факты объясняются изменением межмолекулярных взаимодействий в системе. Замораживание до -196°C не приводит к изменению температуры и характера фазовых переходов в исследованных системах.

Полученные результаты углубляют фундаментальные представления о влиянии низких температур и криопротекторов на белковые системы на молекулярном уровне. Исследование низкотемпературного воздействия на процесс термоденатурации исследованных белковых молекул в присутствии криопротекторов позволяет оценить эффективность криозащитного действия данных неэлектролитов, что представляет практическую ценность при разработке технологий криоконсервирования биологических объектов.

Ключевые слова: криобиология, фазовые переходы, термоденатурация, гемоглобин, фракции экстракта плаценты, дифференциальная сканирующая калориметрия.

SUMMARY

Govorova Yu.S. Low Temperature and Molecular Environment Influence on Phase Transitions of Hemoglobin-containing Systems. – Manuscript.

Thesis for obtaining the scientific degree of the Candidate of biological sciences degree in the speciality 03.00.19 – Cryobiology. – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2016.

Phase transitions in hemoglobin-containing systems caused by low temperature exposure and molecular environment changes were studied in this thesis. Such systems included isolated hemoglobin, hemoglobin within erythrocyte ghosts, hemoglobin of fractions of human placenta extracts and suspensions of red blood cells. The study of thermodynamic and kinetic parameters of hemoglobin thermal denaturation showed that the presence of cryoprotective agents of different concentrations in protein solution had stabilizing or destabilizing effect on conformational stability of macromolecules. By the caused decrease in thermal stability of human hemoglobin the studied cryoprotectants could be arranged in the following row: glycerol < OEG_{n=25} < OEG_{n=5} < DMSO < 1.2-PD. It is shown that freezing of hemoglobin solutions with 40 and 50% concentration of studied cryoprotectants increased thermal stability of frozen-thawed protein if compared with the protein that not subjected to low-temperature effect. It was shown that the changes of phase transitions in systems containing erythrocytes ghosts and placenta extract fraction were reversible. Freezing placenta down to -196°C did not cause any changes in values and character of phase transitions in the studied systems.

Key words: cryobiology, phase transitions, thermal stability, hemoglobin, placenta extract, calorimetry.