

УДК 577.322.72:547.42:536.6

А.В. Зинченко*, Ю.С. Говорова, А.М. Компаниец

Влияние оксиэтилированного глицерина со степенью полимеризации $n = 5$ на термостабильность гемоглобина человека

UDC 577.322.72:547.42:536.6

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

Effect of Oxyethylated Glycerol with Polymerization Degree $n = 5$ on Human Hemoglobin Thermostability

Реферат: Методом дифференциальной адиабатической сканирующей микрокалориметрии исследовано влияние оксиэтилированного производного глицерина со степенью полимеризации $n = 5$ ($OЭГ_{n=5}$) на термодинамические и кинетические параметры плавления гемоглобина. Показано, что $OЭГ_{n=5}$ снижает температуру и калориметрическую энтальпию термоденатурации гемоглобина с ростом концентрации криопротектора в растворе. Предполагается, что увеличение концентрации криопротектора вызывает разрыхление молекул гемоглобина, способствуя тем самым снижению термостабильности белка. Показана возможность применения кинетического подхода при анализе процесса плавления гемоглобина.

Ключевые слова: плавление, гемоглобин, термостабильность, оксиэтилированное производное глицерина со степенью полимеризации $n = 5$, дифференциальная адиабатическая сканирующая микрокалориметрия.

Реферат: Методом дифференціальної адіабатичної скануючої мікрокалориметрії досліджено вплив оксиетильованого похідного гліцерину зі ступенем полімерізації $n=5$ ($OЭГ_{n=5}$) на термодинамічні і кінетичні параметри плавлення гемоглобіну. Показано, що $OЭГ_{n=5}$ знижує температуру і калориметричну ентальпію термоденатурації гемоглобіну зі збільшенням концентрації криопротектора в розчині. Припускається, що збільшення концентрації криопротектора викликає розпушування молекул гемоглобіну, сприяючи зниженню термостійкості гемоглобіну. Показана можливість застосування кінетичного підходу при аналізі процесу плавлення гемоглобіну.

Ключові слова: плавлення, гемоглобін, термостійкість, оксиетильоване похідне гліцерину зі ступенем полімерізації $n = 5$, дифференціальна адиабатична скануюча мікрокалориметрія.

Abstract: The effect of oxyethylated derivative of glycerol with polymerization degree $n = 5$ ($OEG_{n=5}$) on thermodynamic and kinetic parameters of hemoglobin melting was studied by the method of differential adiabatic scanning microcalorimetry. It was shown that increase of $OEG_{n=5}$ concentration in solution resulted in reduction of the temperature and calorimetric enthalpy of hemoglobin thermodenaturation. It was suggested that the increasing of cryoprotective concentration induced the loosening of hemoglobin molecules thereby contributing to the reduction of thermal stability of protein. The possibility of using kinetic approach when analyzing hemoglobin melting process was shown.

Key words: melting, hemoglobin, thermal stability, oxyethylated derivative of glycerol with polymerization degree $n = 5$, differential adiabatic scanning microcalorimetry.

В последние десятилетия значительное число работ посвящено изучению влияния криопротекторов на конформационную стабильность макромолекул [1, 2, 7]. Эти исследования важны как для раскрытия механизмов криоповреждения-криозащиты биологических объектов, так и для создания новых методов их криоконсервирования.

В криобиологии наряду с традиционно используемыми криопротекторами (глицерин, диметилсульфоксид, этиленгликоль и др.) создаются и исследуются новые. Одним из перспективных спо-

Recent decades are characterized with a significant number of researches concerned with the study of cryoprotectants effect on conformational stability of macromolecules [1, 2, 7]. These studies are important both for revealing the mechanisms of cryodamage and cryoprotection in biological objects and for developing new methods of their cryopreservation.

Cryobiological applications demand along with traditionally used cryoprotectants (glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol *etc.*) a screening and investigation of the new ones. One of the perspective ways

Отдел криобиофизики и отдел криопротекторов, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;
тел.: (+38 057) 373-31-41, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: alexazin@mail.ru

Поступила 25.12.2012
Принята в печать 04.06.2013

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №2. – С. 135–142.
© 2013 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Cryobiophysics, and Department of Cryoprotectants, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 373 3141, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: alexazin@mail.ru

Received December 25, 2012
Accepted June 6, 2013

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 2. – P. 135–142.
© 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

собов их создания является оксиэтилирование различных мономеров: глицерина, этиленгликоля, амидов и др. [5]. Оксиэтилирование известных криопротекторов приводит к тому, что синтезированные олигомеры утрачивают способность проникать в клетки и в отличие от исходного вещества приобретают свойства криопротекторов экзоцеллюлярного действия. Так, синтезированные оксиэтильные производные глицерина с разной степенью полимеризации ($n = 5$, $n = 25$, $n = 30$) позволили расширить спектр экзоцеллюлярных веществ, используемых в качестве криопротекторов для различных биологических объектов [5]. В связи с этим важно исследовать влияние новых криопротекторов на конформационную стабильность белков, при изменении которой нарушается функциональная активность макромолекул. Изучение стабильности пространственной структуры белков в растворах неэлектролитов, обладающих криозащитным действием, представляет определенный научный интерес при анализе межмолекулярных взаимодействий в сложных системах, включающих биологические макромолекулы, и практический – при разработке методов и технологий криоконсервирования.

Одним из прямых экспериментальных подходов в исследовании термодинамических и кинетических параметров, характеризующих термическую денатурацию макромолекул, является дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Аналогичный подход использовали при изучении влияния глицерина, 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и этиленгликоля (ЭГ) [4] на теплофизические параметры перехода спираль-клубок молекул гемоглобина человека.

Целью настоящей работы было исследование влияния оксиэтилированного глицерина со степенью полимеризации $n = 5$ (ОЭГ _{$n=5$}) на термодинамические (температура и энтальпия) и кинетические (энергия активации) параметры плавления гемоглобина человека на основе анализа ДСК-термограмм.

Постановка данной задачи обусловлена тем, что одним из первых этапов криоконсервирования биологического материала является его инкубирование в криозащитных средах, в результате которого могут происходить определенные изменения в пространственной организации белков, влияющие на их термостабильность.

Материалы и методы

Гемоглобин (HbA) получали из отмытых эритроцитов донорской крови: 1 мл цельной крови и 10 мл физиологического раствора NaCl смешивали

of their development is oxyethylation of various monomers such as glycerol, ethylene glycol, amides *etc.* [5]. Due to oxyethylation of the known cryoprotectants the synthesized oligomers lose the ability to penetrate into the cells and in contrast to the original substance acquire the properties of cryoprotectants of exocellular action. So the synthesized oxyethylated glycerol derivatives with different polymerization degree ($n = 5$, $n = 25$, $n = 30$) allowed to extend the spectrum of exocellular substances used as cryoprotectants for various biological objects [5]. Herewith it is important to study the effect of new cryoprotectants on conformational stability of proteins the changes of which affect functional activity of macromolecules. Investigating the stability of protein steric structure in solutions of non-electrolytes possessing a cryoprotective effect is of a special scientific interest when analyzing the molecular interactions in complex systems, including biological macromolecules, and of practical interest during the development of cryopreservation methods and techniques.

One of the direct experimental approaches for studying the thermodynamic and kinetic parameters characterizing thermal denaturation of macromolecules is differential scanning calorimetry (DSC). A similar approach was used to investigate the influence of glycerol, 1,2-propanediol (1,2-PD) and ethylene glycol (EG) [4] on thermophysical parameters of the helix-coil transition of human hemoglobin molecules.

This research was aimed to investigate the impact of oxyethylated glycerol with a polymerization degree $n = 5$ (OEG _{$n=5$}) on thermodynamic (temperature and enthalpy) and kinetic (activation energy) parameters of human hemoglobin thawing based on the analysis of DSC thermograms.

Such a setting of the task was stipulated by the fact that one of the first cryopreservation stages of biological material is its incubation in cryoprotective media which could result in appearance of certain changes in the steric organization of proteins affecting their thermal stability.

Materials and methods

Hemoglobin (HbA) was obtained from the washed erythrocytes of donor blood, *viz.* 1 ml of whole blood and 10 ml of physiological NaCl solution were mixed and centrifuged at 1,500g during 5 min, and the supernatant was removed. Washing was performed thrice. The derived erythromass was hemolysed in hypotonic solution (5 mM phosphate buffer, pH 7.8) and centrifuged at 27,500g for 15 min. Hemoglobin concentration was determined spectrophotometrically. Protein concentration in calorimeter cell was 5 mM. Oxyethylated glycerol $n = 5$ (Barva, Ukraine) was



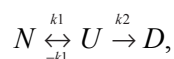
и центрифугировали при 1500g в течение 5 мин, надосадочную жидкость удаляли. Процедуру отмывания проводили 3 раза. Полученную эритро массу гемолизировали в гипотоническом растворе (фосфатный буфер 5 мМ, pH 7,8) и центрифугировали при 27500g в течение 15 мин. Концентрацию гемоглобина определяли спектрофотометрическим методом. Концентрация белка в калориметрической ячейке составляла 5 мМоль. Оксигенированный глицерин $n = 5$ («Барва», Украина) был очищен и идентифицирован в отделе криопротекторов Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

Термограммы регистрировали на дифференциальном адиабатическом сканирующем калориметре ДАСМ-4 (СКБ БП Пушино, Россия). Область сканирования – от 25 до 80°C при избыточном давлении 2,5 атм. Скорость нагрева – 1 град/мин. Данный калориметр предназначен для высокочувствительного теплового анализа жидкостей в интервале температур от –10 до 130°C и позволяет регистрировать тепловые эффекты растянутых по температуре процессов внутримолекулярных превращений биологических веществ, находящихся в растворе с низкой исходной концентрацией (~0,1%), а также их парциальную теплоемкость, как функцию от температуры.

Термограммы обрабатывали с помощью программного пакета MS Excel. Данные интерпретировали согласно описанным ранее методам [3, 4]. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием пакета «Origin 7.5» («OriginLab Corporation», США).

Результаты и обсуждение

Процесс денатурации гемоглобина (HbA) протекает в две стадии: первая – обратимая диссоциация тетрамера на протомеры, вторая – кинетически необратимый переход в денатурированное состояние [8, 10]. Таким образом, плавление гемоглобина подчиняется двухстадийной модели Ламри-Эйринга, являющейся наиболее распространенной схемой моделирования необратимой денатурации [10]:



где N – нативное состояние белка; U – промежуточное обратимое состояние; D – денатурированное состояние.

Если скорость второй стадии велика по сравнению с первой, то модель Ламри-Эйринга может быть сведена к одностадийной необратимой модели: $N \rightarrow D$ [9].

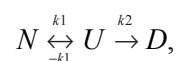
purified and identified at the Department of Cryoprotectants of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine).

Thermograms were recorded with a differential adiabatic scanning microcalorimeter DASM-4 (Special Construction Bureau of Biological Instrumentation, Puschino, Russia). Scan area was within 25...80°C at a pressure of 2.5 atmospheres. Heating rate was 1 deg/min. This calorimeter is intended for a high-sensitive thermal analysis of liquids within the temperature range from –10 to 130°C and enables to reveal the thermal effects of temperature stretched intramolecular transformations of biological substances being in solution with low initial concentration (~0.1%) as well as their thermal capacity as a function of temperature.

Thermograms were processed with MS Excel. The data were interpreted according to the papers [3, 4]. Experimental data were statistically processed with Origin 7.5 (OriginLab Corporation, USA).

Results and discussion

Hemoglobin (HbA) denaturation proceeds in two stages: the first one is reversible tetramer dissociation into protomers, the second one is kinetically irreversible transition to denaturated state [8, 10]. Thus, the melting of hemoglobin complies with Lumry-Eyring's two-stage model, which is the most common pattern of irreversible denaturation modeling [10]:



where N is a native state of protein; U represents intermediate reversible condition; D is a denaturated state.

If the rate of the second stage is high comparing with the first one the model of Lumry-Eyring can be reduced to one-stage irreversible model: $N \rightarrow D$ [9].

Calorimetric profiles characteristic for hemoglobin denaturation in the presence of OEG_{n=5} are shown in Fig. 1. Endothermic peak in the thermograms displays a denaturing process of native Hb as well as the protein in the presence of 25 and 50% OEG_{n=5}. Denaturation temperature (T_d) of native hemoglobin makes 343 K. In the presence of OEG_{n=5} the shape of hemoglobin absorption curve generally coincides with the thermodenaturation peak of globular proteins. Melting temperature and curve shape of hemoglobin absorption are properly agreed with the data for human hemoglobin presented reported previously [2, 4, 8].

To test the reversibility or irreversibility of denaturation process, we performed the procedure of sample re-warming [3]: after revealing the hemoglobin dena-

Характерные калориметрические профили денатурации гемоглобина в присутствии ОЭГ_{n=5} приведены на рис. 1. Эндотермический пик на термограммах отображает процесс денатурации нативного Нб, а также белка с добавлением 25 и 50% ОЭГ_{n=5}. Температура денатурации (T_d) нативного гемоглобина составляет 343 К. В присутствии ОЭГ_{n=5} форма кривой теплопоглощения гемоглобина в целом совпадает с формой пика термоденатурации глобулярных белков. Температура плавления и форма кривой теплопоглощения гемоглобина хорошо согласуются с данными, приведенными в литературе для гемоглобина человека [2, 4, 8].

Для проверки обратимости или необратимости процесса денатурации нами была проведена процедура повторного прогрева образца [3]: после регистрации пика денатурации гемоглобина образец охлаждали, затем заново снимали зависимость теплоемкости от температуры. При повторном сканировании поглощения тепла не наблюдалось, что указывает на необратимость процесса денатурации гемоглобина.

В данной работе мы проводили расчеты для второй необратимой стадии денатурации гемоглобина, модель которой описана выше.

При необратимом плавлении белков кинетический анализ более предпочтителен, так как дает возможность рассчитать энергии активации и константы скоростей процесса денатурации [3, 9].

Для определения параметров уравнения Аррениуса из экспериментальных кривых, удовлетворяющих одностадийной необратимой модели, Sanchez-Ruiz и соавт. [9] предложили 4 способа расчета энергии активации. В настоящей работе с целью определения энергии активации мы воспользовались одним из них. Из уравнения Аррениуса для константы скорости $k = A \exp(-E_a/RT)$ и уравнения для константы скорости, полученного Sanchez-Ruiz и соавт. [3, 10], $k = v C_p^{ex}(\Delta H - Q)$ отношение E_a/R может быть определено как тангенс угла наклона зависимости $\ln [v C_p^{ex}/(\Delta H_{cal} - Q)]$ от $1/T$, где E_a – энергия активации; R – универсальная газовая постоянная; ΔH – энтальпия денатурации, которая определяется как площадь под кривой зависимости избыточной теплоемкости от температуры; Q – текущее количество теплоты, поглощаемое в процессе денатурации; T – текущая температура.

На рис. 2 приведены графики в координатах $(\ln [v C_p^{ex}/(\Delta H_{cal} - Q)]; 1/T)$ для системы гемоглобин-ОЭГ_{n=5} для второй стадии денатурации гемоглобина.

Как указывалось выше, плавление гемоглобина подчиняется двустадийной необратимой модели.

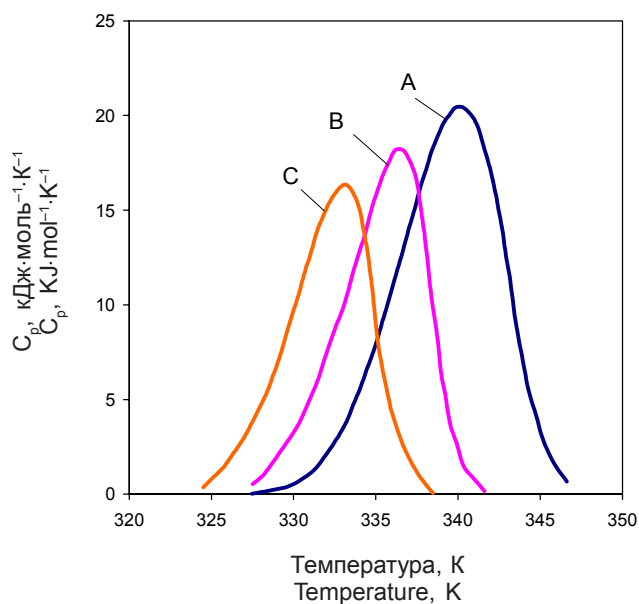


Рис. 1. Термограммы гемоглобина в присутствии ОЭГ_{n=5}: А – в физиологическом растворе; В – в растворе 25% ОЭГ_{n=5}; С – 50% ОЭГ_{n=5}.

Fig. 1. Thermograms of hemoglobin with OEG_{n=5}: A – in physiological saline; B – in solution of 25% of OEG_{n=5}; C – 50% of OEG_{n=5}.

After the denaturation peak the sample was cooled, then we recorded the dependence of thermal capacity vs. temperature again. Repeated scanning did not reveal any heat absorption, indicating the irreversibility of hemoglobin denaturation.

In this paper we performed the calculations for the second irreversible stage of hemoglobin denaturation, the model of which is described above.

During the irreversible melting of proteins the kinetic analysis is more preferable because it allows to calculate the activation energy and the rate constants for denaturation [3, 9].

To determine the parameters of the Arrhenius equation from the experimental curves satisfying a one-stage irreversible model, Sanchez-Ruiz *et al.* [9] proposed four ways of calculating the activation energy. In this paper, in order to determine the activation energy we used one of them. From the Arrhenius equation for the rate constant $k = A \exp(-E_a/RT)$ and the equation for rate constant obtained by Sanchez-Ruiz *et al.* [3, 10] $k = v C_p^{ex}(\Delta H - Q)$, the ratio of E_a/R can be determined as the slope of the dependence $\ln [v C_p^{ex}/(\Delta H_{cal} - Q)]$ vs. $1/T$, where E_a is an activation energy; R – universal gas constant; ΔH – enthalpy of denaturation determined as the area under the curve of dependence of excessive thermal capacity from temperature; Q is a current amount of heat absorbed during denaturation; T is a current temperature.



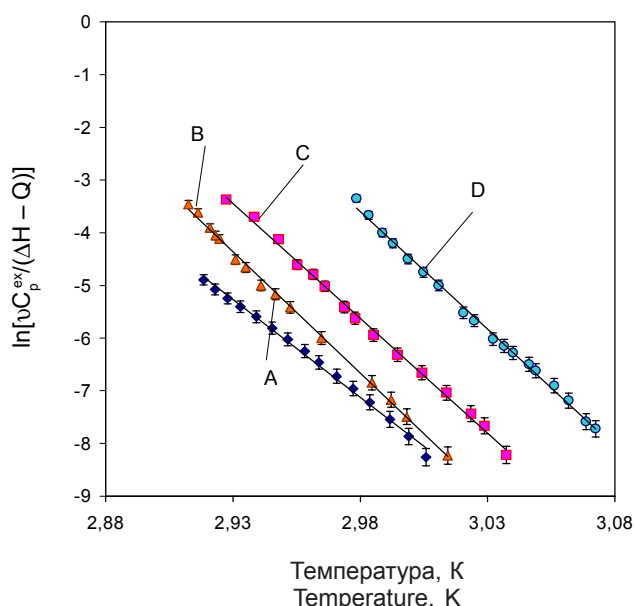


Рис. 2. Зависимость $\ln[vC_p^{ex}/(\Delta H - Q)]$ от обратной температуры для гемоглобина с добавлением ОЭГ: А – в физиологическом растворе; В – в растворе 8,75% ОЭГ_{n=5}; С – 25% ОЭГ_{n=5}; D – 50% ОЭГ_{n=5}.

Fig. 2. Dependence $\ln[vC_p^{ex}/(\Delta H - Q)]$ on reciprocal temperature of hemoglobin with addition of OEG: A – in physiological saline; B – 8.75% OEG_{n=5}; C – 25% OEG_{n=5}; D – 50% OEG_{n=5}.

Одним из критериев применимости данной модели является линейность графика в координатах $(\ln [vC_p^{ex}/(\Delta H_{cal} - Q)]; 1/T)$ [3, 9]. Зависимости в указанных координатах для гемоглобина с добавлением исследованных концентраций криопротектора линейны (рис. 2). Это свидетельствует о том, что присутствие ОЭГ_{n=5} не влияет на необратимость плавления гемоглобина и подтверждает применимость кинетического подхода при анализе процесса плавления гемоглобина.

Большинство процессов, отвечающих за необратимость денатурации белков, протекают медленно, и в каждый момент времени система находится в локальном равновесии, несмотря на то, что денатурация белков необратима и форма пика денатурации в данном случае не меняется. Описание таких процессов возможно с использованием моделей равновесной термодинамики [3].

Учитывая вышеизложенное, из полученных термограмм были рассчитаны calorimetric enthalpies (ΔH_{cal}) и температуры плавления гемоглобина, построены зависимости ΔH_{cal} и T_d от концентрации ОЭГ_{n=5} (рис. 3 и таблица). Как видно на рис. 3, при добавлении 5% ОЭГ_{n=5} значения температуры денатурации и calorimetric enthalpy в пределах погрешности равны таковым для HbA в буферном растворе, что свидетельствует о сохранении конформационной стабильности

Figure 2 shows the plots in the coordinates $(\ln [vC_p^{ex}/(\Delta H_{cal} - Q)]; 1/T)$ for hemoglobin-OEG_{n=5} system obtained for the second stage of hemoglobin denaturation.

As mentioned above hemoglobin melting is subjected to the two-stage irreversible model. One of the criteria for the applicability of this model is the linearity of the curve in the coordinates $(\ln [vC_p^{ex}/(\Delta H_{cal} - Q)]; 1/T)$ [3, 9]. The dependencies in the given coordinates for hemoglobin in the presence of the studied concentrations of cryoprotectants are linear (see Fig. 2). This indicates that the presence of OEG_{n=5} does not affect the irreversible melting of hemoglobin and confirms the applicability of kinetic approach when analyzing the hemoglobin melting.

Most processes responsible for the irreversible denaturation of proteins occur slowly and in each time-point the system is in local equilibrium, despite the fact that protein denaturation is irreversible, and denaturation peak shape in this case does not change. Description of these processes is possible using equilibrium thermodynamics models [3].

Considering the above mentioned, the obtained thermograms were used to calculate calorimetric enthalpies (ΔH_{cal}) and hemoglobin melting temperatures, and the dependences of ΔH_{cal} and T_d vs. the concentration OEG_{n=5} were plotted (Fig. 3 and Table). As could be seen in the Fig. 3 the values of denaturation temperature and calorimetric enthalpy after addition of 5% OEG_{n=5} were equal within the measurement accuracy to the indices for HbA in buffer solution, testifying to

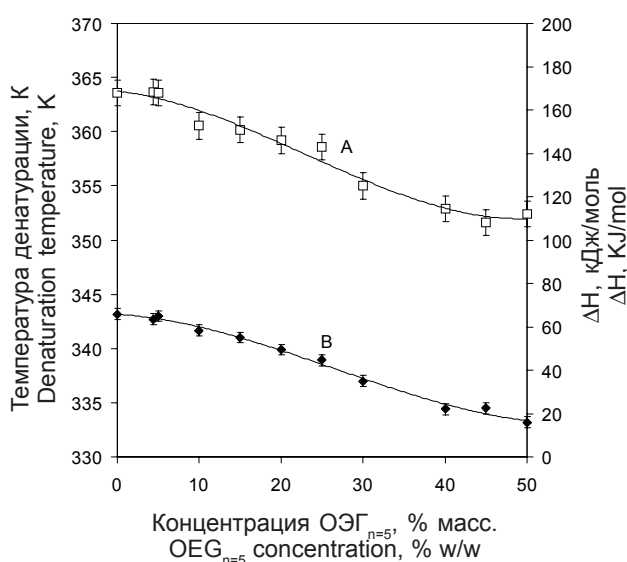


Рис. 3. Зависимости изменения энтальпии (А) и температуры (В) денатурации гемоглобина от концентрации ОЭГ_{n=5} в растворе.

Fig. 3. Dependences of changes in denaturation enthalpy (A) and temperature (B) vs. OEG_{n=5} concentration.

молекул гемоглобина в присутствии данного вещества. Это может быть объяснено тем фактом, что при концентрации 5 масс. % ОЭГ_{n=5} гидратация по данным ИК-спектроскопии и ДСК составляет больше 20 молекул воды на молекулу неэлектролита, что соответствует 1,15 г воды на 1 г и больше [11], в то время как гидратация гемоглобина – 0,51 г воды на 1 г гемоглобина [6]. Поскольку молекулы ОЭГ_{n=5} и гемоглобина окружены таким количеством молекул воды, при котором они не взаимодействуют или взаимодействуют друг с другом слабо, конформация гемоглобина не изменяется. Повышение концентрации ОЭГ_{n=5} в растворе белка выше 5 масс. % приводит к монотонному снижению как температуры денатурации гемоглобина, так и калориметрической энтальпии плавления (таблица). Таким образом, можно предположить, что используемое вещество в данном случае вызывает разрыхление молекул гемоглобина, снижая тем самым термостабильность белка [6]. Аналогичное влияние снижения термостабильности гемоглобина в присутствии ЭГ и 1,2-ПД было установлено в другой работе [4] и предполагалось, что влияние криопротекторов обусловлено изменением пространственной упаковки протетической группы и глобиновой части молекул. Снижение значений энергий активации при росте концентрации криопротектора в растворе также подтверждает предположение о разрыхлении молекул гемоглобина (таблица), в основе которого лежит идея о том, что увеличение концентрации криопротектора вызывает изменение гидратного окружения молекул как гемоглобина, так и ОЭГ_{n=5} и приводит к уменьшению количества воды, связанной и с криопротектором, и с гемоглобином. Вследствие этого происходят изменения в гидратных слоях ОЭГ_{n=5} и гемоглобина, затрагивающие прочно связанную воду, вследствие чего молекулы воды в гидратном окружении белка заменяются на молекулы криопротектора.

Таким образом, изменение энтальпии и температуры денатурации для всех исследованных нами растворов гемоглобина с добавками оксиэтилированного глицерина со степенью полимеризации $n = 5$ объясняется влиянием данного криопротектора на гидратную оболочку молекул гемоглобина. Оксигэтилированный глицерин, возможно, встраивается в гидратную оболочку белка и вызывает изменение его пространственной структуры.

Температура денатурации, калориметрическая энтальпия и энергия активации денатурации гемоглобина в присутствии ОЭГ_{n=5} (данные приведены как среднее значение \pm стандартное отклонение)

Denaturation temperature, calorimetric enthalpy and hemoglobin denaturation activation energy with OEG_{n=5} (data presented as a mean \pm standard error)

Концентрация ОЭГ _{n=5} , % OEG _{n=5} concentration, %	T _d , К	ΔH_{cal} , кДж/моль ΔH_{cal} , KJ/mol	E _a , кДж/моль E _a , KJ/mol
0	343,2 \pm 0,2	168 \pm 10	328 \pm 15
4,38	342,8 \pm 0,2	168 \pm 10	306 \pm 17
10	341,7 \pm 0,2	152 \pm 10	298 \pm 17
25	338,9 \pm 0,2	143 \pm 8	250 \pm 16
50	333,2 \pm 0,2	112 \pm 6	216 \pm 17

preservation of conformational stability of hemoglobin molecules in the presence of this substance. This can be explained by the fact that if the concentration of OEG_{n=5} made 5% w/w the hydration according to the data of infrared spectroscopy and DSC made more than 20 molecules of water per molecule of non-electrolyte, corresponding to 1.15 g of water per 1 g and even more [11], while hydration of hemoglobin is 0.51 g of water per 1 g of hemoglobin [6]. Considering that molecules of OEG_{n=5} and hemoglobin are surrounded by such number of water molecules which does not allow to interact or only slightly interact with each other, the conformation of hemoglobin does not change. The increasing of OEG_{n=5} concentration in protein solution above 5% w/w results in monotonic reduction of both temperature of hemoglobin denaturation and calorimetric enthalpy of melting (Table). Thus, we may suggest that the used substance in this case induced loosening of hemoglobin molecules, reducing thermal stability of protein. Similar effect of hemoglobin thermal stability reduction in the presence of EG and 1,2-PD was found previously [4]. It was suggested that the found effect of studied substances was stipulated by the changes in steric arrangement of prosthetic group and globin part of molecules. The decrease of activation energy values during concentration increase of cryoprotectant in solution also confirms the suggestion about loosening of hemoglobin molecules (Table), which is based on hypothesis that increasing of studied cryoprotectant concentration induced the change of hydrate environment of both hemoglobin and OEG_{n=5} molecules and results in decrease of water amount bounded with cryoprotectant and hemoglobin. All this provokes the



Следует отметить, что информация об изменении термостабильности белков в присутствии криопротекторов, полученная из термодинамических и кинетических показателей, позволяет определить предельные концентрации веществ, влияющих на конформационную стабильность белка, и является в связи с этим важным аспектом при разработке технологии консервирования с использованием криозащитных сред.

Выводы

Показано, что повышение концентрации ОЭГ_{n=5} выше 5 масс. % в растворе гемоглобина вызывает снижение температуры и калориметрической энthalпии термоденатурации белка. Эти факты указывают на то, что изменение межмолекулярных взаимодействий в растворе гемоглобина в присутствии ОЭГ_{n=5} приводит к разрыхлению молекул гемоглобина человека и снижению его термостабильности.

Показана применимость кинетического подхода для исследования процесса термоденатурации гемоглобина с используемым криопротектором.

Литература

1. Ковригин Е.Л., Потехин С.А. Микрокалориметрическое исследование влияния диметилсульфоксида на тепловую денатурацию лизоцима // Биофизика. – 1996. – Т. 41, №6. – С. 1201–1206.
2. Лапшина Е.А., Заводник И.Б., Игнатенко В.А., Степура И.И. Термостабильность и функциональные свойства гемоглобина человека в присутствии алифатических спиртов // Молекулярная биология. – 1992. – Т. 26, №2. – С. 315–320.
3. Любарев А.Е., Курганов Б.И. Изучение необратимой тепловой денатурации белков методом дифференциальной сканирующей калориметрии // Успехи биологической химии. – 2000. – Т. 40. – С. 43–84.
4. Соловьева А.С. Калориметрические исследования термоденатурации изолированных и мембраносвязанных белков в присутствии некоторых криопротекторов до и после охлаждения до -196°C: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1999. – 15 с.
5. Шраго М.И., Гучок М.М., Калугин Ю.В. Некоторые принципы направленного синтеза криопротекторов // Актуальные проблемы криобиологии / Под ред. Н.С.Пушкаря и А.М. Белоуса. – Киев: Наукова думка, 1981. – С. 157–201.
6. Arosio D., Kwansa H.E., Gering H. et al. Statistic and dynamic light scattering approach to the hydration of hemoglobin in the presence of osmolites // Biopolymers. – 2002. – Vol. 63, №1. – P. 1–11.
7. Meng F.-G., Hong Y.-K., He H.-W. et al. Osmophobic Effect of Glycerol on Irreversible Thermal Denaturation of Rabbit Creatine Kinase // Biophys. J. – 2004. – Vol. 87, №4. – P. 2247–2254.
8. Michnik A., Drzazga Z., Kluczevska A., Michalik K. Differential scanning microcalorimetry study of the thermal denaturation of haemoglobin // Biophys. Chem. – 2005. – Vol. 118, №2–3. – P. 93–101.
9. Sanchez-Ruiz J.M. Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry // Biochem. J. – 1992. – Vol. 64, №4. – P. 921–935.

changes in hydrate layers of OEG_{n=5} and hemoglobin affecting tightly bound water, and leading to replacement of water molecules by cryoprotectant ones in hydrate environment of protein.

Thus, the changes of enthalpy and denaturation temperature in all the studied solutions of hemoglobin supplemented with of oxyethylated glycerol of $n = 5$ polymerization degree could be explained by effect of this cryoprotectant on a hydrate shell of hemoglobin molecule. Oxyethylated glycerol, probably, incorporates into hydrate shell of protein and provokes the changes in its steric structure.

It should be noted that information about the changes in protein thermal stability in the presence of cryoprotectants obtained from thermodynamic and kinetic indices enables to determine the admissible concentrations of substances, which affect the conformational stability of a protein, and due to this could be an important aspect during development of preservation technologies which utilize cryoprotective media.

Conclusion

It was shown that the increasing of OEG_{n=5} concentration in hemoglobin solution over 5% w/w induced the reduction of temperature and calorimetric enthalpy of thermal denaturation of protein. These facts pointed to the loosening of human hemoglobin molecules and reduction of its thermal stability due to the changes in molecular interactions in hemoglobin solution in the presence of OEG_{n=5}.

There was shown the possibility of using kinetic approach to study thermodenaturation of hemoglobin with the used cryoprotectant.

References

1. Kovrigin E.L., Potekhin S.A. Microcalorimetric study of dimethyl sulfoxide effect on thermal denaturation of lysozyme // Biofizika. – 1996. – Vol.41, N6. – P. 1201–1206.
2. Lapshina E.A., Zavodnik I.B., Ignatenko V.A., Stepuro I.I. Thermal stability and functional properties of human hemoglobin in the presence of aliphatic alcohols // Molekulyarnaya Biologiya. – 1992. – Vol. 26, N2. – P. 315–320.
3. Lyubarev A.E., Kurganov B.I. Investigation of irreversible thermal denaturation of proteins by differential scanning calorimetry // Uspekhi Biologicheskoy Khimii. – 2000. – Vol. 40. – P. 43–84.
4. Solovyeva A.S. Calorimetric studies of thermal denaturation of isolated and membrane-bound proteins with some cryoprotectants prior to and after cooling down to -196°C: Author's abstract of thesis of the candidate of biological sciences. – Kharkov, 1999. – 15 p.
5. Shrago M.I., Guchok M.M., Kalugin Yu.V. Some principles of directed synthesis of cryoprotectants // In: Aktualnye problemy kriobiologii / Ed. by N.S. Pushkar, A.M. Belous. – Kiev: Naukova Dumka, 1981. – P. 157–201.
6. Arosio D., Kwansa H.E., Gering H. et al. Statistic and dynamic light scattering approach to the hydration of hemoglobin in the



10. Sengupta B., Swenson J. Properties of normal and glycosylated human hemoglobin in presence and absence of antioxidant // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – Vol. 334, №3. – P. 954–959.
11. Zhivotova E.N., Zinchenko A.V., Kuleshova L.G. et al. Low-temperature phase behaviour of the binary system water-oxyethylated glycerol of polymerization degree $n = 5$ and intermolecular interactions in the system // *Mol. Phys.* – 2008. – Vol. 106, №14. – P. 1751–1759.
- presence of osmolites // *Biopolymers.* – 2002. – Vol. 63, N1. – P. 1–11.
7. Meng F.-G., Hong Y.-K., He H.-W. et al. Osmophobic Effect of Glycerol on Irreversible Thermal Denaturation of Rabbit Creatine Kinase // *Biophys. J.* – 2004. – Vol. 87, N4. – P. 2247–2254.
8. Michnik A., Drzazga Z., Kluczevska A., Michalik K. Differential scanning microcalorimetry study of the thermal denaturation of haemoglobin // *Biophys. Chem.* – 2005. – Vol. 118, N2–3. – P. 93–101.
9. Sanchez-Ruiz J.M. Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry // *Biochem. J.* – 1992. – Vol. 64, N4. – P. 921–935.
10. Sengupta B., Swenson J. Properties of normal and glycosylated human hemoglobin in presence and absence of antioxidant // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – Vol. 334, N3. – P. 954–959.
11. Zhivotova E.N., Zinchenko A.V., Kuleshova L.G. et al. Low-temperature phase behaviour of the binary system water-oxyethylated glycerol of polymerization degree $n = 5$ and intermolecular interactions in the system // *Mol. Phys.* – 2008. – Vol. 106, N14. – P. 1751–1759.

