

Исследование влияния диметилсульфоксида на тепловую денатурацию гемоглобина человека до и после низкотемпературного воздействия

Ю.С. Говорова

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Study of Dimethyl Sulfoxide Effect on Thermal Denaturation of Human Hemoglobin Prior to and after Low Temperature Exposure

Yu.S. Govorova

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

Процесс низкотемпературного консервирования биологических систем сопровождается действием ряда повреждающих факторов, в частности возможны определенные изменения пространственной организации белков. Тепловая денатурация может служить маркером, отражающим эти явления. Одним из прямых экспериментальных методов исследования структурных изменений белков по их термоденатурации является дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Этот подход позволяет оценить как термодинамические, так и кинетические параметры денатурации макромолекул. Гемоглобин – один из белков, который можно использовать в качестве модели при изучении влияния различных криопротекторов на его термостабильность. В данной работе в качестве криопротектора был выбран диметилсульфоксид (ДМСО), широко применяющийся в последние десятилетия при криоконсервировании различных биологических объектов. В связи с этим настоящая работа посвящена исследованию влияния ДМСО концентрацией от 0 до 50% на кинетические и термодинамические параметры тепловой денатурации гемоглобина человека до и после низкотемпературного замораживания до -196°C с помощью метода ДСК.

Термограммы регистрировали на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре «ДАСМ-4» (НПО «Биоприбор», Россия). Область сканирования температуры – от 25 до 90°C при избыточном давлении $2,5$ атм. Скорость нагрева – 1 град/мин. Нами рассчитаны значения калориметрической энтальпии денатурации, энергии активации и температуры денатурации для растворов гемоглобина с различными концентрациями ДМСО до и после низкотемпературного воздействия.

Температура денатурации гемоглобина в буферном растворе без криопротектора составляет $(72,5 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$. Добавление 50% ДМСО к раствору гемоглобина, не подвергнутому замораживанию, снижает температуру денатурации белка до $(51 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$, что свидетельствует о понижении термостабильности гемоглобина. Замораживание растворов гемоглобина с криопротектором в диапазоне концентраций от 0 до 25% приводит к незначительному понижению температуры денатурации гемоглобина на 1°C , в то время как в диапазоне от 25 до 50% – повышению значений температуры денатурации на $(1,3-1,7)^{\circ}\text{C}$ по сравнению с таковыми без низкотемпературного воздействия.

В работе проведен анализ влияния ДМСО на кооперативность денатурации гемоглобина до и после замораживания. Показано, что снижение кооперативности денатурации наблюдается после замораживания при высоких концентрациях ДМСО. Обсуждаются возможные механизмы действия низких температур на пространственную организацию гемоглобина в присутствии криопротектора.

The process of low temperature preservation of biological systems is accompanied by the effect of some damaging factors, particularly, the certain changes in protein spatial organization are possible. Thermal denaturation may serve as a marker reflecting these phenomena. One of the direct experimental methods in studying structural changes in proteins on their thermodenaturation is differential scanning calorimetry (DSC). This approach allows evaluating both thermodynamic and kinetic parameters of macromolecule denaturation. Hemoglobin is one of the proteins that may be used as a model in studying the effect of different cryoprotectants on thermostability of biomolecules. We selected dimethyl sulfoxide (DMSO) as a cryoprotectant, widely applied in recent decades in cryopreservation of different biological objects. This research was concerned with the investigation of the effect of DMSO concentrations from 0 to 50% on kinetic and thermodynamic parameters of thermal denaturation of human hemoglobin prior to and after low temperature exposure down to -196°C using DSC method.

Thermograms were recorded with a differential adiabatic scanning microcalorimetry DASM-4 (Biopribor, Russia). The temperature scan range was from 25 to 90°C under overpressure of 2.5 atm. The heating rate was 1 deg/min. We calculated the values of calorimetric enthalpy of denaturation, activation energy and denaturation temperature for hemoglobin solutions supplemented with different concentrations of DMSO before and after low temperature exposure.

Denaturation temperature of hemoglobin in cryoprotectant-free buffer solution was $(72.5 \pm 0.2)^{\circ}\text{C}$. Supplementation with 50% DMSO of hemoglobin solution not subjected to freezing decreased the denaturation temperature of protein down to $(51 \pm 0.2)^{\circ}\text{C}$, testifying to a reduced hemoglobin thermostability. Freezing of hemoglobin solutions with cryoprotectant with concentration from 0 to 25% resulted in a slight decrease in temperature of hemoglobin denaturation by 1°C , whereas in DMSO concentration range from 25 to 50% there was a rise in temperature denaturation values by $(1.3-1.7)^{\circ}\text{C}$ if compared to the indices without low temperature effect.

The investigation dealt also with analysis of the influence of DMSO on the cooperativity of hemoglobin denaturation process before and after freezing. The reduction of denaturation cooperative properties was shown to be observed after freezing at high concentrated DMSO. Possible mechanisms of low temperature effect on spatial organization of hemoglobin in cryoprotectant presence are discussed.

