

ПОНИЖЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ ОКСИЭТИЛЬНОГО ПРОИЗВОДНОГО ГЛИЦЕРИНА СО СТЕПЕНЬЮ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ $n=25$ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ И НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ ХРАНЕНИИ

Говорова Ю.С.

*Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины,
Харьков, Украина*

Исследование влияния низких температур и криопротекторов на белки является перспективным направлением в современной криобиологии. Оксиэтильное производное глицерина со степенью полимеризации $n=25$ (ОЭГ _{$n=25$}) является олигомером оксиэтилированного глицерина, показавшим хорошие результаты в качестве криопротектора при криоконсервировании эритроцитов человека [1]. Исследование термостабильности белков является дополнительным методом оценки их структурного состояния после хранения при низких температурах. В связи с чем, целью данной работы было исследование влияния ОЭГ _{$n=25$} в концентрации до 50% на термостабильность молекул гемоглобина человека в течении 3 мес при температуре -196°C методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Данный метод широко используется для анализа теплового анфолдинга белков [2].

Термодинамические и кинетические параметры денатурации гемоглобина рассчитывались с помощью соответствующих термограмм, зарегистрированных со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ при избыточном давлении 2,5 атм. Область сканирования температуры – от 20°C до 100°C . Раствор гемоглобина человека (в изотоническом натрий-фосфатном буферном растворе (рН 7,4)) инкубировался с ОЭГ _{$n=25$} соответствующей концентрации в течении 1 часа при 4°C , затем замораживался путем погружения в жидкий азот (средняя скорость охлаждения при этом составляла 200 град/мин). Полученный образец делился на две группы: первая использовалась в качестве контроля при однократном замораживании, а вторая хранилась в течении 3 месяцев.

На основании полученных термограмм были определены температуры денатурации, рассчитаны калориметрические энтальпии и значения энергии активации денатурации гемоглобина с исследованными концентрациями ОЭГ _{$n=25$} , а также построены зависимости данных параметров от концентрации криопротектора. Эндотермический пик на термограммах соответствует процессу необратимой денатурации молекул гемоглобина. Температура денатурации гемоглобина в исходном буферном растворе (без замораживания) составляет $(71\pm 0,2)^{\circ}\text{C}$. С ростом концентрации криопротектора температура денатурации монотонно убывает. Значения калориметрической энтальпии и энергии активации также понижаются при увеличении концентрации ОЭГ _{$n=25$} . Однократное замораживание гемоглобина с ОЭГ _{$n=25$} показало, что зависимость температуры денатурации белка от концентрации криопротектора можно разделить на 2 области: область сохранения термической стабильности близкой к значениям денатурации белка без замораживания (0–30% ОЭГ _{$n=25$}) и область снижения термической стабильности (30–50% ОЭГ _{$n=25$}) гемоглобина. При хранении гемоглобина с ОЭГ _{$n=25$} при температуре -196°C (3 мес) подобная тенденция сохраняется, однако дополнительно регистрируется экзотермический пик, который соответствует, предположительно, агрегации молекул белка.

Библиографические ссылки

1. Pakhomova Y.S., Kompaniets A.M., Kuleshova L.G. Transformation of Erythrocytes During Cryopreservation // Probl. Cryobiol. Cryomed. 2016. Vol. 26. P. 349–360.
2. Mazurenko S. et al. Exploration of Protein Unfolding // Sci Rep. 2017. Vol.7. P. 17-23.