

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ОДНОСТАДИЙНЫХ ПЕРЕХОДОВ ПРИ ВЫСОКОМ ДАВЛЕНИИ. ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ РАССМОТРЕНИЕ

© 2015 г. С.А. Потехин, А.Е. Егоров, Р.С. Хусаинова*

Институт белка РАН, 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 4

E-mail: spot@vega.protres.ru;

**Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3*

Поступила в редакцию 05.06.15 г.

Изучено возможное влияние высокого давления на тепловую денатурацию биополимеров. Анализ проведен с использованием равновесной модели перехода между двумя состояниями. Получены формулы, определяющие зависимость термодинамических параметров перехода (энтальпия, энтропия и температура перехода) от давления. Давление может оказывать на структуру макромолекулы как стабилизирующее, так и дестабилизирующее влияние в зависимости от изменения объема при переходе. Зависимость температуры перехода от давления не может иметь локальных экстремумов. Показано, что в зависимости от скачка (инкремента) коэффициента расширения и изменения температуры перехода энтальпия перехода может как расти с ростом давления, так и падать. Показано также, что при увеличении давления изменения объема и энтальпии при переходе не могут менять знак.

Ключевые слова: сканирующая микрокалориметрия, высокое давление, теоретический анализ, переход между двумя состояниями, макромолекулы.

С точки зрения термодинамики интерес к воздействию высокого давления на молекулярные объекты ничуть не меньше, чем к воздействию температуры. Однако если каждый год в мировой литературе печатаются тысячи (если не десятки тысяч) статей с результатами изучения воздействия температуры на различные объекты и/или процессы, то статей по воздействию давления на один-два порядка меньше. В первую очередь столь сильный дисбаланс определяется отсутствием на рынке приборов, необходимых для подобных исследований.

Давление является экстенсивным параметром, термодинамически сопряженным с объемом (интенсивный параметр). Таким образом, изучая перераспределение заселенностей между различными состояниями под воздействием давления, можно рассчитать изменения объемов, соответствующих переходам между этими состояниями.

Наиболее полную картину о числе и термодинамических параметрах реализующихся состояний при постоянном давлении способен дать метод сканирующей микрокалориметрии [1–4]. Достоинством этого метода по сравнению с другими, используемыми при изучении воздействия температуры на макромолекулы, яв-

ляется то, что измеряемым параметром в данном случае является энтальпия, а интенсивный параметр, сопряженный с экстенсивным параметром, – температура. Это существенно повышает надежность термодинамического анализа получаемых кривых. С другой стороны, не так давно появился сканирующий микрокалориметр, способный работать при давлениях до 500 МПа [5]. Прибор позволяет получать фазовые диаграммы биологических макромолекул в координатах $T - P$, что позволяет рассчитать изменения объема и коэффициентов изотермической сжимаемости и изобарического расширения при переходах. Возможности такого подхода продемонстрированы нами ранее [6–10].

Для того чтобы ясно себе представлять, как могут меняться термодинамические параметры того или иного термодинамического процесса под воздействием давления и какую термодинамическую информацию можно извлечь из полученных зависимостей, необходимо, в частности, проанализировать поведение простейших термодинамических моделей, в той или иной степени моделирующих реальные конформационные переходы в макромолекулах. Как известно, наиболее широко используемая модель –

модель перехода между двумя состояниями. Данная работа посвящена теоретическому рассмотрению поведения этой модели в координатах $T - P$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы рассмотрим влияние высокого давления на температуру одностадийного равновесного термодинамического перехода и его другие термодинамические функции. В первую очередь мы изучим вопрос применительно к данным сканирующей микрокалориметрии. Как известно, регистрируемыми параметрами перехода в эксперименте с использованием сканирующей микрокалориметрии являются температура перехода T_m и его энтальпия ΔH_m . Пусть макромолекула при нормальном атмосферном давлении P_o и температуре $T_{m,o}$ претерпевает конформационный переход с энтальпией $\Delta H_{m,o}$ и энтропией $\Delta S_{m,o}$. Главный вопрос, который мы будем решать, – как изменятся эти параметры перехода при давлении P .

По определению температурой перехода при любом давлении $T_m(P)$ называется температура, при которой изменение свободной энергии Гиббса $\Delta G(T_m, P)$ между начальным и конечным состояниями обращается в ноль:

$$\Delta G(T_m, P) = \Delta H(T_m, P) - T_m \Delta S(T_m, P) = 0. \quad (1)$$

Учитывая это соотношение, изменение энтропии при переходе может быть легко оценено из экспериментальных данных обычным способом [1]:

$$\Delta S(T_m, P) = \frac{\Delta H(T_m, P)}{T_m}. \quad (2)$$

Еще один важный параметр, характеризующий переход, – изменение парциального объема макромолекулы при переходе $\Delta V(T_m, P)$. В соответствии с законом Клаузиуса–Клайперона зависимость температуры фазового перехода от давления выражается следующим соотношением:

$$\frac{dT_m}{dP} = \frac{\Delta V(T_m, P)}{\Delta S(T_m, P)} = \frac{T_m \Delta V(T_m, P)}{\Delta H(T_m, P)}. \quad (3)$$

Таким образом, имея зависимость температуры перехода от давления, а также теплоту перехода, в каждой экспериментальной точке легко оценить изменение парциального объема при фазовом переходе:

$$\begin{aligned} \Delta V(T_m, P) &= \frac{\Delta H(T_m, P)}{T_m} \frac{dT_m}{dP} = \\ &= \Delta H(T_m, P) \frac{d \ln T_m}{dP} = \Delta H(T_m, P) \gamma(P, T_m). \end{aligned} \quad (4)$$

Здесь функция γ – отношение изменения объема к изменению энтальпии при переходе:

$$\gamma(P, T_m) = \frac{d \ln T_m}{dP} = \frac{\Delta V_m}{\Delta H_m}. \quad (5)$$

Оценим, как будут меняться основные термодинамические функции перехода при изменении давления. Ясно, что в ходе калориметрических экспериментов при разных давлениях температура перехода также меняется. Зависимости термодинамических функций, характеризующих переход, будут выражаться через полные производные этих функций по давлению следующим образом:

$$\begin{aligned} \frac{d\Delta H_m}{dP} &= \left(\frac{\partial \Delta H}{\partial P} \right)_T + \left(\frac{\partial \Delta H}{\partial T} \right)_P \frac{dT_m}{dP} = \\ &= -T_m \left(\frac{\partial \Delta V}{\partial T} \right)_P + \Delta V_m + \Delta c_{p,m} \frac{dT_m}{dP} = \\ &= -\alpha_m T_m \Delta V_m + \Delta V_m + \Delta c_{p,m} \frac{dT_m}{dP}, \end{aligned} \quad (6)$$

$$\begin{aligned} \frac{d\Delta S_m}{dP} &= \left(\frac{\partial \Delta S}{\partial P} \right)_T + \left(\frac{\partial \Delta S}{\partial T} \right)_P \frac{dT_m}{dP} = \\ &= - \left(\frac{\partial \Delta V}{\partial T} \right)_P + \frac{\Delta c_{p,m}}{T_m} \frac{dT_m}{dP} = -\alpha_m \Delta V_m + \Delta c_{p,m} \frac{d \ln T_m}{dP}, \end{aligned} \quad (7)$$

$$\begin{aligned} \frac{d\Delta V_m}{dP} &= \left(\frac{\partial \Delta V}{\partial P} \right)_T + \left(\frac{\partial \Delta V}{\partial T} \right)_P \frac{dT_m}{dP} = \\ &= -\beta_m \Delta V_m + \alpha_m \Delta V_m \frac{dT_m}{dP} = \\ &= \Delta V_m \left(\alpha_m \frac{dT_m}{dP} - \beta_m \right). \end{aligned} \quad (8)$$

Величины термодинамических функций без индекса m здесь означают величины этих функций при произвольных условиях, а не только при температуре перехода. При давлении и температуре перехода значения функций с индексом и без индекса совпадают.

В вышеуказанных формулах использованы также следующие обозначения: $\Delta c_{p,m} = \left(\frac{\partial \Delta H}{\partial T} \right)_p$ – скачок теплоемкости при переходе, $\alpha_m = \frac{1}{\Delta V_m} \left(\frac{\partial \Delta V}{\partial T} \right)_p$ – кажущийся коэффициент теплового расширения перехода, $\beta_m = \frac{1}{\Delta V_m} \left(\frac{\partial \Delta V}{\partial P} \right)_T$ –

кажущийся коэффициент изотермического сжатия перехода. Необходимо заметить, что коэффициенты α_m и β_m не являются истинными скачками парциальных коэффициентов изобарического теплового расширения $\Delta \alpha_p = \alpha_{p,2} - \alpha_{p,1}$ и изотермической сжимаемости $\Delta \chi_T = \Delta \chi_{T,2} - \Delta \chi_{T,1}$, но связаны с ними следующими соотношениями:

$$\Delta \alpha_p = \frac{1}{V_2} \left(\frac{\partial V_2}{\partial T} \right)_p - \frac{1}{V_1} \left(\frac{\partial V_1}{\partial T} \right)_p \approx \quad (9)$$

$$\approx \frac{1}{\bar{V}} \left(\frac{\partial \Delta V}{\partial T} \right)_p = \frac{\Delta V_m}{\bar{V}} \alpha_m,$$

$$\Delta \chi_T = -\frac{1}{V_2} \left(\frac{\partial V_2}{\partial P} \right)_T + \frac{1}{V_1} \left(\frac{\partial V_1}{\partial P} \right)_T \approx \quad (10)$$

$$\approx -\frac{1}{\bar{V}} \left(\frac{\partial \Delta V}{\partial P} \right)_p = \frac{\Delta V_m}{\bar{V}} \beta_m.$$

Здесь индексы 1 и 2 соответствуют начальному и конечному состояниям соответственно и \bar{V} есть средний парциальный объем, соответствующий этим состояниям. При выводе вышеуказанных соотношений предполагалось, что $\Delta V \ll V_1, V_2$, что хорошо выполняется в большинстве интересующих нас случаев (белки, липиды и т.д.) [6,7].

Для получения аналитического вида зависимости энтальпии как функции давления выражение (6) разделим на величину энтальпии ΔH_m (энтальпия – положительная величина) и преобразуем к следующему виду:

$$\begin{aligned} \frac{d \ln \Delta H_m}{dP} &= -\alpha_m \frac{dT_m}{dP} + \frac{d \ln T_m}{dP} + \frac{\Delta c_p}{\Delta H_m} \frac{dT_m}{dP} = \quad (11) \\ &= \frac{dT_m}{dP} \left(\frac{1}{T_m} - \alpha_m + \frac{\Delta c_p}{\Delta H_m} \right). \end{aligned}$$

Аналогично, используя выражения (7) и (8), получим:

$$\begin{aligned} \frac{d \ln \Delta S_m}{dP} &= -\alpha_m \frac{\Delta V_m}{\Delta S_m} + \frac{\Delta c_p}{\Delta H_m} \frac{dT_m}{dP} = \quad (12) \\ &= \frac{dT_m}{dP} \left(\frac{\Delta c_p}{\Delta H_m} - \alpha_m \right), \end{aligned}$$

$$\frac{d \ln \Delta V_m}{dP} = \alpha_m \frac{dT_m}{dP} - \beta_m. \quad (13)$$

Интегрируя уравнения (11)–(13) от нормального давления P_0 до давления P (соответствует температуре перехода T_m) и принимая во внимание, что $dT_m = \frac{dT_m}{dP} dP$, получим:

$$\begin{aligned} \Delta H_m &= \Delta S_{m,0} T_m \exp \left(\int_{T_0}^{T_m} \left(\frac{\Delta c_p}{\Delta H_m} - \alpha_m \right) dt \right) = \quad (14) \\ &= \Delta S_{m,0} T_m \exp(I_1(P) - I_2(P)), \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \Delta S_m &= \Delta S_{m,0} \exp \left(\int_{T_0}^{T_m} \left(\frac{\Delta c_p}{\Delta H_m} - \alpha_m \right) dt \right) = \quad (15) \\ &= \Delta S_{m,0} \exp(I_1(P) - I_2(P)), \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \Delta V_m &= \Delta V_{m,0} \exp \left(\int_{T_0}^{T_m} \alpha_m dt - \int_{P_0}^P \beta_m dp \right) = \quad (16) \\ &= \Delta V_{m,0} \exp(I_2(P) - I_3(P)). \end{aligned}$$

Таким образом, зависимости основных термодинамических функций от давления определяются тремя основными интегралами:

$$I_1(P) = \int_{T_{m,0}}^{T_m} \frac{\Delta c_p}{\Delta H_m} dt, \quad (17)$$

$$I_2(P) = \int_{T_{m,0}}^{T_m} \alpha_m dt, \quad (18)$$

$$I_3(P) = \int_{P_0}^P \beta_m dp. \quad (19)$$

На основании вышеприведенных формул легко получить зависимость логарифма температуры перехода от давления:

$$\begin{aligned} \frac{d \ln T_m}{dP} &= \frac{\Delta V_m}{\Delta H_m} = \frac{\Delta V_{m,0} \exp(I_2(P) - I_3(P))}{\Delta S_{m,0} T_m \exp(I_1(P) - I_2(P))} = \\ &= \frac{\Delta V_{m,0}}{\Delta H_{m,0}} \frac{T_0}{T_m} \exp(2I_2(P) - I_1(P) - I_3(P)). \end{aligned} \quad (20)$$

Или для производной температуры перехода по давлению получим:

$$\begin{aligned} \frac{dT_m}{dP} &= T_{m,0} \frac{\Delta V_{m,0}}{\Delta H_{m,0}} \exp(2I_2(P) - I_1(P) - I_3(P)) = \\ &= T_{m,0} \frac{\Delta V_{m,0}}{\Delta H_{m,0}} \exp(-F(P)). \end{aligned} \quad (21)$$

Здесь $F(P) = I_1(P) - 2I_2(P) + I_3(P)$. Очевидно, что функция $F(P)$ обращается в ноль при нормальном давлении. Интересно заметить, что

$$\frac{dF(P)}{dP} = \frac{d^2 T_m}{dP} / \frac{dT_m}{dP}. \quad (22)$$

Отсюда следует важное утверждение, касающееся температуры перехода как функции давления. Первая и вторая производные температуры перехода по давлению могут обращаться в ноль только одновременно, т.е. при одинаковом давлении. (Можно показать, что это утверждение следует из более общих термодинамических соотношений.) Таким образом, зависимость температуры перехода от давления не может иметь локальных экстремумов. Использование полиномов второй степени для экстраполяции температурных зависимостей на область более высоких давлений, как это было сделано нами в первой работе [7], приводит к ошибочному утверждению о наличии максимума у этой функции. Тем не менее использование полиномов второй степени для интерполяции монотонно увеличивающихся или монотонно уменьшающихся функций в рабочем диапазоне давлений и температур вполне оправдано.

Уравнение (21) может быть легко проинтегрировано в предположении постоянства α_m и β_m , и в результате получим [9]:

$$\begin{aligned} T_m &= T_{m,0} + \frac{1}{\left(\frac{\Delta c_p}{\Delta H_m} - 2\alpha_m \right)} \times \\ &\times \ln(1 - k[\exp(-\beta_m \Delta P) - 1]). \end{aligned} \quad (23)$$

Здесь

$$\begin{aligned} k &= \frac{\frac{\Delta c_p}{\Delta H_m} - 2\alpha_m}{\beta_m} \left(\frac{dT_m}{dP} \right)_0 = \\ &= \frac{\frac{\Delta c_p}{\Delta H_m} - 2\alpha_m}{\beta_m} \frac{\Delta V(T_{m,0}, P)}{\Delta S(T_{m,0}, P)} = \\ &= \frac{\frac{\Delta c_p}{\Delta H_m} - 2\alpha_m}{\beta_m} \frac{T_{m,0} \Delta V(T_{m,0}, P)}{\Delta H(T_{m,0}, P)}. \end{aligned}$$

Зависимость энтальпии денатурации макромолекулы от приложенного давления. Для того чтобы понять, чем определяется величина изменения энтальпии денатурации под воздействием давления, рассмотрим те вклады, которые определяют эти изменения. Очевидно, что под воздействием давления температура перехода будет изменяться, а изменение энтальпии денатурации будет складываться из двух членов:

$$d\Delta H_m = \left(\frac{\partial \Delta H}{\partial T} \right)_P dT_m + \left(\frac{\partial \Delta H}{\partial P} \right)_T dP. \quad (24)$$

Первый член обусловлен изменением температуры денатурации и различием парциальных значений теплоемкости молекулы в денатурированном и нативном состояниях. Ясно, что для нагрева или охлаждения на несколько градусов белка в нативном и в денатурированном состояниях потребуется подать или забрать разное количество тепла, и соответственно это различие приведет к изменению энтальпии денатурации:

$$\left(\frac{\partial \Delta H}{\partial T} \right)_P \Delta T_m = \Delta c_p \Delta T_m. \quad (25)$$

Второй член уравнения (24) имеет двоякую природу. Действительно, так как

$$\begin{aligned} \left(\frac{\partial \Delta H}{\partial P} \right)_T &= T_m \left(\frac{\partial \Delta S}{\partial P} \right)_T + \Delta V_m = \\ &= \Delta V_m - T_m \left(\frac{\partial \Delta V}{\partial T} \right)_P, \end{aligned} \quad (26)$$

из-за разницы в парциальном объеме при обычном и повышенном давлении очевидный вклад во второй член уравнения (24) будет давать различие в работе, выполняемой белком при денатурации. Кроме того, существенный вклад будет давать член, связанный с изменением ΔS

при увеличении давления при постоянной температуре.

Как было показано нами ранее, зависимость энтальпии, измеренной путем микрокалориметрического эксперимента при различных давлениях, будет меняться в соответствии с уравнением (14). Принимая во внимание, что величины интегралов $I_1(P)$ и $I_2(P)$ в реальных экспериментах достаточно малы, и полагая, что подынтегральные выражения мало меняются в зависимости от давления, выражение (14) можно разложить по степеням аргумента с точностью до линейного члена следующим образом:

$$\begin{aligned} \Delta H_m(\Delta T) &= \quad (24) \\ &= \Delta H_{m,0} \left(1 + \frac{\Delta T}{T_{m,0}} \right) \exp \left(- \left(\alpha_m - \frac{\Delta c_p}{\Delta H_m} \right) \Delta T \right) \approx \\ &\approx \Delta H_{m,0} \left(1 + \frac{\Delta T}{T_{m,0}} \right) \left(1 - \left(\alpha_m - \frac{\Delta c_p}{\Delta H_m} \right) \Delta T \right) \approx \\ &\approx \Delta H_{m,0} \left(1 + \left(\frac{1}{T_{m,0}} - \left(\alpha_m - \frac{\Delta c_p}{\Delta H_m} \right) \right) \Delta T \right). \end{aligned}$$

Таким образом, при $\left(\alpha_m - \frac{\Delta c_p}{\Delta H_m} \right) = \frac{1}{T_{m,0}}$ энтальпия не будет меняться при изменении температуры под воздействием давления. При $\left(\alpha_m - \frac{\Delta c_p}{\Delta H_m} \right) < \frac{1}{T_{m,0}}$ энтальпия будет расти с ростом температуры перехода и падать при ее уменьшении. Если $\left(\alpha_m - \frac{\Delta c_p}{\Delta H_m} \right) > \frac{1}{T_{m,0}}$, энтальпия будет падать с ростом температуры перехода и увеличиваться при ее уменьшении.

Такое поведение энтальпии перехода наблюдается на серии гомологичных фосфолипидов (диацилфосфатидилхолинов) с разной длиной ацильных «хвостов». Как было показано нами ранее [9], с ростом давления энтальпия перехода гель-жидкий кристалл падает для липидов с длинными «хвостами» и растет для липидов с короткими «хвостами».

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 14-04-00993-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. L. Privalov and S. A. Potekhin, *Methods Enzimol.* **131**, 4 (1986).
2. С. А. Потехин, *Высокомолекуляр. соединения, Сер. С* **54**, 1077 (2012).
3. E. Freire and R. L. Biltonen, *Biopolymers* **17**, 463 (1978).
4. S.-J. Kidokoro and A. Wada, *Biopolymers* **26**, 213 (1987).
5. С. А. Потехин, А. А. Сенин, Н. Н. Абдурахманов и Е. В. Межбурд, Патент № 2364845, зарегистрирован 20 августа 2009 года.
6. S. A. Potekhin, A. A. Senin, N. N. Abdurakhmanov, and R. S. Khusainova, *Biochim. Biophys. Acta (Biomembranes)* **1778**, 2588 (2008).
7. S. A. Potekhin, A. A. Senin, N. N. Abdurachmanov, and E.I Tiktopulo, *Biochim. Biophys. Acta (Proteins and Proteomics)* **1794**, 1151 (2009).
8. S. A. Potekhin, A. A. Senin, N. N. Abdurakhmanov, and R. S. Khusainova, *Biochim. Biophys. Acta (Biomembranes)* **1808**, 1806 (2011).
9. S. A. Potekhin, A. A. Senin, and R. S. Khusainova, *Thermochim. Acta* **560**, 17 (2013).
10. A. Y. Yegorov and S. A. Potekhin, *Thermochim. Acta* **610**, 10 (2015).

Thermodynamic Analysis of Two State Transitions under High Pressure. Theoretical Consideration

S.A. Potekhin*, A.E. Yegorov*, and R.S. Khusainova**

** Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 4, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

Possible effects of high pressure on heat denaturation of biopolymers have been analyzed. The study was made using an equilibrium model of transition between two states. Equations used to determine the dependence of thermodynamic parameters of transition (enthalpy, entropy and transition temperature) on pressure were formulated. Pressure may have both stabilizing and destabilizing effects on the macromolecule structure depending on the change in the volume upon transition. The dependence of the transition temperature on pressure cannot have local extremums. It is demonstrated that depending on the increment (jump) of the partial expansion coefficient and the change of the transition temperature, the enthalpy of transition can both grow with the pressure growth or decrease. It is also shown that when the pressure grows, the changes in the volume and enthalpy under denaturation cannot change their signs.

Key words: scanning microcalorimetry, high pressure, theoretical analysis, two state transition, macromolecules