

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ СКАНИРУЮЩАЯ КАЛОРИМЕТРИЯ ПРОТЕОМА СМЕШАННОЙ СЛЮНЫ В НОРМЕ И ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.

А.А. НИКОЛАЕВ, А.А.БОРОДКОВА, Н.Н.НИКОЛАЕВА.

*ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава РФ,
Астрахань, e-mail: chimnik@mail.ru*

В ходе выполнения работы установлены следующие характеристики термограммы смешанной слюны здоровых людей: для протеома смешанной слюны человека характерна термограмма с двумя основными пиками теплоемкости конформационного перехода молекул белков в процессе их денатурации, которая и дает основной «всплеск» теплопродукции. Температурный максимум 1 пика у здоровых составил $63,17 \pm 0,32^{\circ}\text{C}$, температурный максимум 2 пика у здоровых составил $69,11 \pm 0,42^{\circ}\text{C}$. У больных, страдающих воспалительными заболеваниями поджелудочной железы максимум 1 пика $65,77 \pm 0,54^{\circ}\text{C}$, а у больных опухолевыми заболеваниями поджелудочной железы $68,07 \pm 0,62^{\circ}\text{C}$. Температурный максимум 2 пика в группе 2 (воспалительные заболевания поджелудочной железы) $71,31 \pm 0,81^{\circ}\text{C}$, в группе 3 (опухолевые заболевания поджелудочной железы) $73,14 \pm 0,94^{\circ}\text{C}$.

Наиболее характерным для термограммы протеома смешанной слюны людей, страдающих заболеваниями поджелудочной железы, является, изменение соотношения энтальпии в первом и втором пиках. Если в контроле это соотношение колеблется в пределах 2,2-2,3, то в опытных группах оно меньше единицы (группа 2-0,94; группа 3-0,89). Достоверных различий в площади пика S2 в группах 2 и 3 не выявлено.

Таким образом, удалось охарактеризовать характер термограммы протеома смешанной слюны больных с заболеваниями поджелудочной железы и установить факт повышения термоустойчивости этих белков у больных с заболеваниями поджелудочной железы. Выявлена возможность применения метода ДСК для исследования смешанной слюны человека.

Ключевые слова: дифференциальная сканирующая калориметрия, смешанная слюна. протеом, болезни поджелудочной железы.

DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY OF MIXED SALIVON PROTEOM IN NORMAL AND IN DISEASES OF THE PANCREAS.

A.A. NIKOLAEV, A.A.BORODKOVA, N.N.NIKOLAEVA.

Astrakhan State Medical University, Astrakhan, e-mail: chimnik@mail.ru

In the course of the work, the following characteristics of the thermogram of mixed saliva of healthy people were established: the proteome of mixed human saliva is characterized by a thermogram with two main peaks of heat capacity of the conformational transition of protein molecules in the process of their denaturation, which gives the main "burst" of heat production. The maximum temperature of 1 peak in healthy people was $63.17 \pm 0.320^{\circ}\text{C}$, the maximum temperature of 2 peaks in healthy people was $69.11 \pm 0.420^{\circ}\text{C}$. In patients with inflammatory diseases of the pancreas, a maximum of 1 peak is $65.77 \pm 0.540^{\circ}\text{C}$, and in patients with tumoral diseases of the pancreas, $68.07 \pm 0.62^{\circ}\text{C}$. A temperature maximum of 2 peaks in group 2 (inflammatory diseases of the pancreas) $71.31 \pm 0.81^{\circ}\text{C}$, in group 3 (tumor diseases of the pancreas) $73.14 \pm 0.940^{\circ}\text{C}$.

The most characteristic thermogram of proteome mixed saliva of people suffering from diseases of the pancreas is the change in the ratio of enthalpy in the first and second peaks. If in the control this ratio varies between 2.2-2.3, then in the experimental groups it is less than one (group 2-0.94; group 3-0.89). No significant differences in the S2 peak area in groups 2 and 3 were found.

Thus, it was possible to characterize the nature of the thermogram of the proteome of mixed saliva of patients with diseases of the pancreas and to establish the fact that the increase of the thermal stability of these proteins in patients with diseases of the pancreas. The possibility of using the DSC method for the study of mixed human saliva has been revealed.

Keywords: differential scanning calorimetry, mixed saliva. proteome, pancreatic disease.

Введение. Основным способом оценки тепловой денатурации белков служит дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Обнаружение того факта, что термограммы, тепловой денатурации белков сыворотки крови, изменяются в ходе развития

болезни послужило развитию применения ДСК в клинической диагностике. Анализ суммы белков плазмы крови людей методом ДСК стал применяться для диагностики болезней с 2007 года. Появились обнадеживающие результаты применения метода ДСК в прогнозе опухолей молочной железы, некоторых злокачественных заболеваний крови, опасных осложнений сахарного диабета, прогноза развития псориаза. Полученные предварительные данные показывают зависимость характера термограмм не только от нозологической формы, но и стадии развития. Поджелудочная железа и слюнные железы тесно связаны как по строению, так и по механизмам регуляции секреции. Неоднократно делались попытки использовать смешанную слюну в диагностике заболеваний поджелудочной железы[1]. Рак поджелудочной железы служит причиной смерти ежегодно около 176000 человек только в США, Японии и Великобритании. Причина - поздняя диагностика. Отсутствуют и показатели прогноза некроза поджелудочной железы. Следовательно, без внедрения новых методов диагностики, трудно рассчитывать на значительные успехи в диагностике и, соответственно, в лечении этой патологии.

Цель работы: исследование возможности применения дифференциальной сканирующей калориметрии для диагностики и прогноза заболеваний поджелудочной железы.

Материалы и методы исследования. Наше исследование представляло собой биохимическое исследование белков смешанной слюны здоровых людей и больных опухолями поджелудочной железы. Все исследованные образцы классифицировались по результатам анализа амбулаторных карт и лабораторного исследования в результате было сформировано 3 группы наблюдения: 1.Здоровые. Концентрация белка более 2,0 г\л. Активность амилазы 160-320 ЕД. Группа включает 36 образцов и служит контролем. 2.Больные (воспалительные заболевания поджелудочной железы). Концентрация белка более 2,0 г\л. Активность амилазы 640-2560 ЕД. Группа включает 39 образцов. 3.Больные (опухолевые заболевания поджелудочной железы). Концентрация белка более 2,0 г\л. Активность амилазы 80-160 ЕД. Группа включает 48 образцов. Слюну собирали натощак в 10,0 мл пробирки. Все образцы предварительно трехкратно замораживали оттаивали, для коагуляции муцинов [1]. Затем, пробирки центрифугировали при 8000 об\мин в течение 10 минут. После центрифугирования слюна отделялась, образцы маркировались и хранились при -28С, до исследования. Перед проведением сканирующей калориметрии образцы (10,0 мл) диализовали против стандартного фосфатного буфера (1,7 мМ KH_2PO_4 , 8,3 мМ KH_2PO_4 , 150 мМ NaCl , 15 мМ цитрата натрия, рН 7,5) в течение 24 часов при 4°С для нормализации буферных условий для всех образцов. **Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК).** Калориметрию проводили с помощью прибора ДСМ-2М1 со встроенным

автосамплером (MicroCal, LLC.). Электрическая калибровка дифференциальной мощности и температуры проводились в соответствии с инструкцией завода-изготовителя. Промежуточный контроль прибора проводили с использованием биологических стандартов лизоцима и РНКазы-А. Образцы диализованной смешанной слюны разбавляли в 12 раз, чтобы получить подходящую концентрацию белка для анализа ДСК. Сканирование DSC регистрировалось от 20⁰ до 110⁰С со скоростью сканирования 1⁰С/мин. При разработке каждой группы экспериментов предварительно проводили сканирование буфера и биологических стандартов [2]. Определение концентрации белка проводили бицинхониновым методом, с использованием коммерческих наборов (Pierce BCA Protein Assay kit). Содержание белка в испытуемом растворе рассчитывают по калибровочному графику [3]. Полученные результаты исследований обработаны с помощью пакета статистического анализа Statistica 6, SPSS V 10.0.5, программ «STATLAND», «EXCEL-97», «Basic Statistic» с учетом стандартных методик вариационной статистики, включая вычисление критерия t Стьюдента для оценки достоверности различий. Данные представлены в виде $M \pm m$, достоверные различия обсуждались при $t < 0,001$. [4] Данные ДСК анализировали с использованием программного обеспечения Origin 7 (Origin Lab Corporation.). Полученные данные ДСК усредняли до базовой линии вычитанием термограммы буфера. Далее термограммы были нормализованы по общей концентрации белка, которая была определена колориметрически (см. выше). После нормализации термограммы DSC плазмы корректировали для ненулевых базовых линий. Конечные термограммы были построены как избыточная удельная теплоемкость ΔC_p (кДж*моль⁻¹*град⁻¹) по отношению к температуре [5].

Результаты исследования. ДСК можно использовать для исследования здоровья человека [6,7,8]. График тепловой денатурации белков плазмы у здоровых людей отражает сумму профилей денатурации наиболее распространенных белков. ДСК-анализ протеома плазмы обнаружил большие отличия в графиках, полученных от больных людей по сравнению со здоровыми индивидуумами. Эти изменения обусловлены не просто изменениями концентрации мажорных белков плазмы, а и комплексообразованием регуляторов или пептидов с ними [9]. Детальное изучение графиков тепловой денатурации протеома плазмы крови больных показало специфичность, характерную для каждого заболевания. Эти графики изменяются при изменении состояния больного и могут возвращаться к первоначальному виду при выздоровлении. Это показывает, что термографический профиль плазмы крови может быть использован для клинической диагностики [10]. Механизмы изменения процессов тепловой денатурации белков человека при изменении условий их микроокружения отражены в теоретических обзорах [11].

Мы провели исследование возможности применения ДСК смешанной слюны человека для диагностики и прогноза заболеваний поджелудочной железы

Ранее было показано [9], что термограмма смешанной слюны человека, полученная от здоровых взрослых людей соответствует графикам тепловой денатурации самых распространенных полипептидов.

Для протеома смешанной слюны человека характерна термограмма с двумя основными пиками теплоемкости конформационного перехода молекул белков в процессе их денатурации, которая и дает основной «всплеск» теплопродукции.

Первый переход в диапазоне $50-60^{\circ}\text{C}$ сходит на базовую линию от которой нарастает амплитуда второго перехода около $60-70^{\circ}\text{C}$. Дисперсия, связанная с каждым групповым профилем, была рассчитана с помощью стандартных отклонений при каждой температуре и стандартного отклонения теплоемкости в зависимости от температуры. Здоровые люди из группы контроля дают минимальную дисперсию во всем температурном диапазоне. Группы 2 и 3, показывали значительно более высокую (более 140 % от контроля) дисперсию.

На основании полученных данных термограммы протеома смешанной слюны человека, был рассчитан средний график тепловой денатурации протеома смешанной слюны, который учитывает конкретные данные о лицах, привлеченных в данное исследование (рис.1).

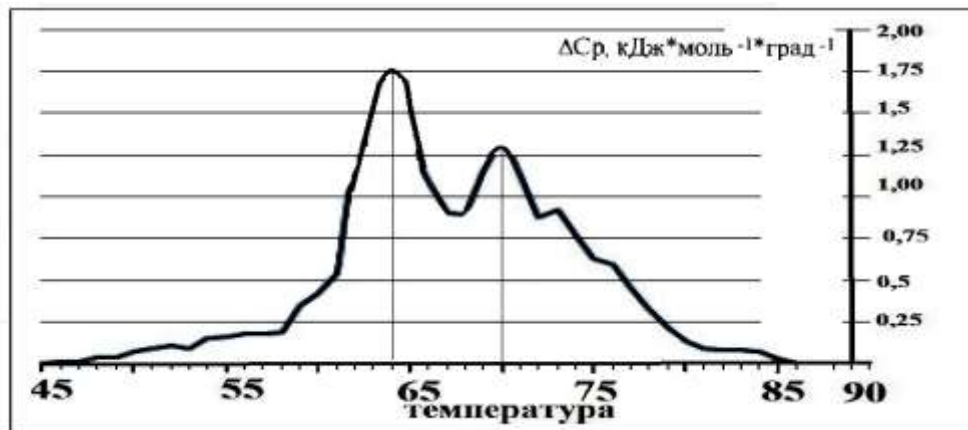


Рисунок 1 - Термограмма протеома смешанной слюны человека (усредненная). Сплошная линия демонстрирует средний температурный профиль избыточной удельной теплоемкости (C_p) по отношению к температуре белков слюны.

Для текущего исследования термограммы белков смешанной слюны, полученные от больных заболеваниями поджелудочной железы (группы 2 и 3) были также усреднены для получения профилей «опытных групп», с учетом протоколов материала, собранного в данной работе (рис. 2). У здоровых людей термограмма более консолидирована и имеет более высокие и острые пики. Известно [12], что наблюдаемая экспериментально

энтальпия процесса (ΔH_{cal}) может отличаться от расчетной эффективной энтальпии Вант-Гоффа, так как ΔH_{cal} определяется площадью пика, а ΔH_v определяется остротой (формой) пика - более острому переходу соответствует большее значение ΔH_v . Для строго одностадийных процессов, проходящих в равновесных условиях, $\Delta H_v = \Delta H_{cal}$. Если $\Delta H_v < \Delta H_{cal}$ это говорит о том, что процесс денатурации проходит через промежуточные состояния. Если же $\Delta H_v \geq \Delta H_{cal}$ это указывает на межмолекулярные взаимодействия.

Для протеома смешанной слюны человека характерна термограмма с двумя основными пиками теплоемкости конформационного перехода молекул белков в процессе их денатурации, которая и дает основной «всплеск» теплопродукции. Практически площадь пиков и их форма вычисляется на основе планиметрического анализа. Площадь рассчитывают по традиционным геометрическим формулам, а остроту пиков отношением высоты к основанию [13]. В нашем исследовании в контрольной группе площадь первого пика (S_1) составила $45,5 \pm 2,4 \text{ см}^2$, а площадь второго пика (S_2) $20,0 \pm 4,4 \text{ см}^2$. В группах людей, страдающих заболеваниями поджелудочной железы, результаты распределились следующим образом. В группе 2 площадь первого пика (S_{1-2}) составила $29,25 \pm 8,4 \text{ см}^2$, а площадь второго пика (S_{2-2}) $31,5 \pm 4,0 \text{ см}^2$. В группе 3 площадь первого пика (S_{1-3}) составила $26,5 \pm 7,4 \text{ см}^2$, а площадь второго пика (S_{2-3}) $33,1 \pm 3,8 \text{ см}^2$. Как следует из таблицы 1, эти различия с нормой достоверны. Причем площадь второго пика (S_2) избыточной удельной теплоемкости протеома смешанной слюны людей, страдающих заболеваниями поджелудочной железы, не только достоверно отличается от аналогичного в группе 1, но и более чем в 1,5 раза больше по площади, что свидетельствует об абсолютном увеличении теплопродукции именно в этом регионе температур.

Наиболее характерным для термограммы протеома смешанной слюны людей, страдающих заболеваниями поджелудочной железы, является, на этом уровне исследования, изменение соотношения энтальпии в первом и втором пиках. Если в контроле это соотношение колеблется в пределах 2,2-2,3, то в опытных группах оно меньше единицы (группа 2-0,94; группа 3-0,89). Достоверных различий в площади пика S_2 в группах 2 и 3 не выявлено.

Анализ остроты пиков, как отношения высоты пиков к их основанию дает возможность абстрагироваться от конкретных размеров термограмм, т.к. выражается в относительных величинах. Различия в остроте пиков еще более заметны и достоверны.

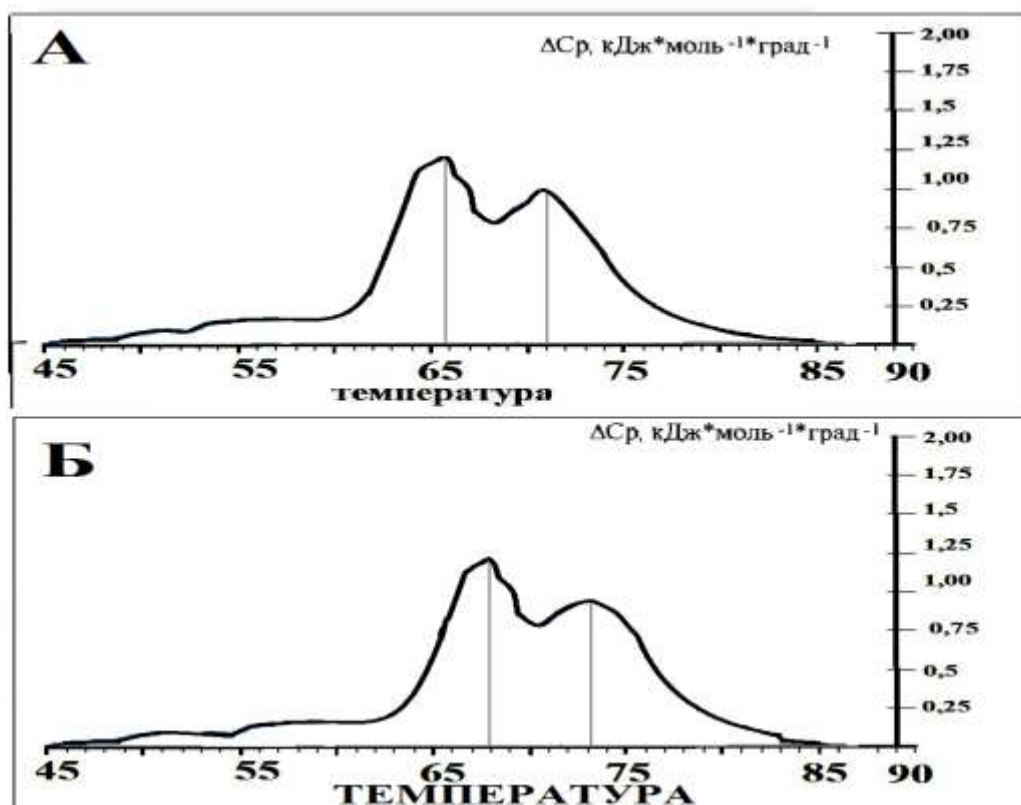


Рисунок 2 - Термограммы протеома смешанной слюны больных заболеваниями поджелудочной железы (усредненные). А - группа 2 (Больные воспалительными заболеваниями поджелудочной железы.); Б - группа 3 (Больные опухолевыми заболеваниями поджелудочной железы)

Выше было указано, что острота пиков более достоверно характеризует энтальпию процесса чем их площадь и поэтому мы, при анализе термограмм, предлагаем ввести понятие «коэффициент энтальпии» который рассчитывается как сумма остроты основных пиков термограммы. В нашем случае в контроле этот коэффициент составил 4,18, а в группе больных, страдающих заболеваниями поджелудочной железы (группа 2) - 3,17, что составляет 75,9 % от контроля, а в группе 3 -3,15, что составляет 75,3 % от контроля.

Таблица 1 - Планиметрический анализ усредненных термограмм избыточной удельной теплоемкости протеома смешанной слюны здоровых людей (контроль) и больных, страдающих заболеваниями поджелудочной железы (опытные группы 2 и 3)

Компоненты термограммы	Площадь см ²	P	P-1
ПИК 1 контрольная группа	45,5±2,4		
ПИК 1 опытная группа №2	29,25±6,4	≤0,01	
ПИК 1 опытная группа №3	26,5±7,4	≤0,01	≥0,05
ПИК 2 контрольная группа	20,0±4,4		

ПИК 2 опытная группа №2	31,5±4,0	≤0,05	
ПИК 2 опытная группа №3	33,1±3,8	≤0,05	≥0.05

Примечание: P- достоверность различий группы 1 (здоровые) и групп 2 и 3; P-2 – достоверность различий между группами 2 и 3.

К сожалению, ни по площади, ни по остроте пиков не обнаружено различий между воспалительными и опухолевыми заболеваниями поджелудочной железы, но термограммы протеома смешанной слюны больных заболеваниями поджелудочной железы резко отличаются от термограмм здоровых людей.

Для сравнения термограмм протеомов, мы, применили несколько параметров: 1. температура максимума пиков; 2. теплоемкость первичного перехода в диапазоне 60-65C [Cpex (пик 1)]; 3. теплоемкость вторичного перехода при 68-72C [Cpex (пик 2)]; 4. отношение первой и второй амплитуд перехода [Cpex (Peak 1)] / [Cpex (Peak 2)]. Некоторые параметры термограммы оказались не чувствительны к проявлениям патологического состояния. Различия в избыточной удельной теплоемкости основного перехода оказались недостоверными. Различия в избыточной удельной теплоемкости второго перехода минимальны. Самые большие различия имеются по температурным максимумам, как 1 так и 2 пиков (P≤0,001).

Температурный максимум 1 пика у здоровых составил 63,17±0,32⁰C, в группе 2 (воспалительные заболевания поджелудочной железы) 65,77±0,54⁰C, в группе 3 (опухолевые заболевания поджелудочной железы) 68,07±0,62⁰C. Температурный максимум 2 пика у здоровых составил 69,11±0,42⁰C, в группе 2 (воспалительные заболевания поджелудочной железы) 71,31±0,81⁰C, в группе 3 (опухолевые заболевания поджелудочной железы) 73,14±0,94⁰C.

В группах больных отношение избыточных удельных теплоемкостей основного и второго переходов более чем на 10% выше чем в контроле. Он интегрирует термодинамические параметры состояний, через которые проходят полипептиды в ходе разрушения третичной структуры.

Проведено также исследование влияния низкомолекулярных лигандов на характер термограммы. Было исследовано влияние нескольких веществ: неостигмина метилсульфат (0,001 M), n-нитрофениловый эфир диэтилфосфорной к-ты (0,001 M), Парахлормеркурибензоат (0,001 M), Фтористый натрий (0,1 M). Все они относятся к ингибиторам различных типов эстераз, т.к, как известно, в смешанной слюне высока активность этих ферментов. Показано, что фтористый натрий и парахлормеркурий бензоат влияли на характер термограммы. Эти изменения касались сдвига первой и второй точек температурного перехода на 2,3-3,1 градуса и снижение амплитуды термограммы. Это

можно объяснить повышением термостабильности ферментов слюны при связывании ингибитора. Другие испытанные вещества не оказывали подобного эффекта.

Заключение. Установлены следующие характеристики термограммы смешанной слюны здоровых людей: для протеома смешанной слюны человека характерна термограмма с двумя основными пиками теплоемкости конформационного перехода молекул белков в процессе их денатурации, которая и дает основной «всплеск» теплопродукции. Температурный максимум 1 пика у здоровых составил $63,17 \pm 0,32$ °C, температурный максимум 2 пика у здоровых составил $69,11 \pm 0,42$ °C.

Наиболее характерным для термограммы протеома смешанной слюны людей, страдающих заболеваниями поджелудочной железы, является, изменение соотношения энтальпии в первом и втором пиках. Если в контроле это соотношение колеблется в пределах 2,2-2,3, то в опытных группах оно меньше единицы (группа 2-0,94; группа 3-0,89). Достоверных различий в площади пика S2 в группах 2 и 3 не выявлено.

Таким образом, удалось охарактеризовать характер термограммы протеома смешанной слюны больных с заболеваниями поджелудочной железы и, установить факт повышения термоустойчивости этих белков у больных с заболеваниями поджелудочной железы. Выявлена возможность применения метода ДСК для исследования смешанной слюны человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Schafer C.A. Saliva diagnostics: utilizing oral fluids to determine health status./ C.A. Schafer, M.Yakob, P. Lima, P. Camargo, D.T.Wong // Monogr Oral Sci.- 2014 -v.24-№1-pp.88-98.
2. Garbett N.C. Election of cervical cancer biomarker patterns in blood plasma and urine by differential scanning calorimetry and mass spectrometry./ N.C.Garbett, M.L.Merchant, C.W. Helm, A. B.Jenson, B. Klein, J.B Chaires.//. PLoS One. -2016,- v.9-№1-pp.847-851
3. Walker Y.M. The bicinchoninic acid (bca) assay for protein quantitation./ Y.M.Walker// Methods Mol Biol.-1994-v.32-№1-pp.5-8.
4. Морозов, Ю.П. Основы высшей математики и статистики. / Ю.П.Морозов - М.: Академия. -2018-202 с.
5. Vega S Deconvolution analysis for classifying gastric adenocarcinoma patients based on differential scanning calorimetry serum thermograms/ S.Vega ,M.A.Garcia-Gonzalez, A. Lanas, A. Velazquez-Campoy, O Abian O // Sci Rep. 2015 -№5-pp.7988-7997.
6. Garbett N.C. Differential scanning calorimetry of blood plasma for clinical diagnosis and monitoring./ N.C. Garbett, C.S. Mekmaysy, C.W.Helm, A.B. Jenson, // Exp Mol Pathol-2009-vol.86- №2-pp.186–191.

7. Zapf I. DSC analysis of human plasma in breast cancer patients./ I.Zapf, T. Fekecs, A. Ferencz, G.Tizedes, G. Pavlovics// *Thermochim Acta* 2011-vol.-524-№1- pp. 88–91.
8. Michnik A. Differential scanning calorimetry study of blood serum in chronic obstructive pulmonary disease./ A. Michnik, Z. Drzazga, K. Michalik, A. Barczyk, I.Santura. // *J. Therm Anal Calorim*- 2010-v.102,- №.1- pp. 57–60.
9. Garbett N.C. Calorimetry Outside the Box: A New Window into the Plasma Proteome/ N.C.Garbett, J. J. Miller, A.B. Jenson, C.W. Helm// *Biophysical Journal* 2008-v.94-№3-pp. 1377–1383.
10. Zhou M. An investigation into the human serum “interactome”/ M. Zhou, D.A. Lucas, K.Chan, H.J. Issaq, I. Petricoin// *Electrophoresis*-2014-v.25-№4-pp.1289– 1298.
11. Любарев, А.Е. Изучение необратимой тепловой денатурации белков методом дифференциальной сканирующей калориметрии/ А.Е.Любарев, Курганов Б.И.//*Успехи биологической химии*.-2000- т.4, с.43-84.
12. Privalov P.L. Heat capacity and conformation of proteins in the denatured state./ P.L.Privalov, E.I.Tiktopulo, S.Y.Venyaminov, Y.V.Griko, G.I.Makhatadze. // *Mol. Biol*-1989-v.205-№4 p.737-750.
13. Sturtevant J.M. [Calorimetric studies of biopolymers.](#)/ J.M.Sturtevant // *Protein Sci.*- 2016- v.5-№2-pp.391-404.