

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДАННЫХ СКАНИРУЮЩЕЙ КАЛОРИМЕТРИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ КРИВОШЕЙ У ДЕТЕЙ

Куркин А.М.¹, Гончарова Л.А.¹, Николаев А.А.¹, Бородкова А.А.¹, Николаева Н.Н.¹

¹ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, e-mail: chimnik@mail.ru

На сегодняшний день не существует единого мнения о происхождении спонтанно возникающего синдрома острой кривошеи и этиологических факторах его рецидивирования. Перспективным представляется исследование патогенетической связи этой патологии с системной дисплазией соединительной ткани. Дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC) является аналитическим методом, который измеряет молярную теплоемкость образцов в зависимости от температуры. В настоящее время известно, что метод DSC может быть применен для исследования клинического статуса человека. Цель работы: исследование возможности применения дифференциальной сканирующей калориметрии для диагностики рецидивирующей кривошеи у детей. Плазма здоровых людей дает воспроизводимую термограмму, которая возникает в результате взвешенной суммы термической денатурации наиболее распространенных плазменных белков. DSC-анализ плазмы у детей, больных кривошеей, выявил значительные изменения в термограмме. Согласно полученным результатам, для термограммы плазмы крови детей, больных рецидивирующей кривошеей, наибольшее значение имеет изменение температурных максимумов первого и второго переходов, отношение избыточных удельных теплоемкостей основного и второго переходов и общая площадь термограммы. Причем отмечается достоверный рост температурных максимумов и отношения избыточных удельных теплоемкостей основного и второго переходов и снижение общей площади термограммы. Применение метода DSC может быть потенциальным инструментом для диагностики, мониторинга и скрининга больных.

Ключевые слова: дети, рецидивирующая кривошея, дифференциальная сканирующая калориметрия, плазма крови, протеом.

USE OF SCANNING CALORIMETRY DATA FOR DIAGNOSTICS OF RECURRENT CURVES IN CHILDREN

Kurkin A.M.¹, Goncharova L.A.¹, Nikolaev A.A.¹, Borodkova A.A.¹, Nikolaeva N.N.¹

¹Astrakhan State Medical University of Ministry of Health of Russia, Astrakhan, e-mail: chimnik@mail.ru

To date, there is no consensus on the origin of the spontaneously arising syndrome of acute torticollis and the etiological factors of its recurrence. It is promising to study the pathogenetic relationship of recurrent sUBLuxations in the cervical spine with systemic dysplasia of connective tissue. Differential Scanning Calorimetry (DSC) is an analytical method that measures the molar heat capacity of a sample as a function of temperature. Recently, it has been shown that DSC can be used to investigate a person's clinical status. The purpose of this work is to investigate the possibility of using differential scanning calorimetry for the diagnosis and prognosis of recurrent torticollis in children. Plasma in healthy people produces a reproducible thermogram that results from a weighted sum of thermal denaturation of the most common plasma proteins. DSC-analysis of plasma in children with torticollis revealed significant changes in the thermogram. For the thermogram of the blood plasma of children with recurrent torticollis, the change in the temperature maxima of the first moment temperature and second moment temperature, ratio of the excess specific heat capacities of the main and second transitions; and the total area of the thermogram are of greatest importance. Moreover, there is a significant increase in the temperature maxima and the ratio of the excess specific heats of the main and second transitions and a decrease in the total area of the thermogram. The use of the DSC method provided a potential tool for early diagnosis, monitoring and screening of patients.

Keywords: childrens, recurrent torticollis, differential scanning calorimetry, blood plasma, proteome.

На сегодняшний день не существует единого мнения о происхождении спонтанно возникающего синдрома острой кривошеи и этиологических факторах его рецидивирования. Перспективным представляется исследование патогенетической связи рецидивирующих подвывихов в шейном отделе позвоночника с системной дисплазией соединительной ткани

[1]. В рамках этой концепции ставятся вопросы о нарушении развития соединительной ткани, изменении темпов синтеза и формирования коллагена и эластина, нарушении структуры непосредственно самих волокон вследствие их недостаточной поперечной сшивки [2]. В основе этих патологических изменений, возможно, лежат мутации генов, ферментативные расстройства, неблагоприятные факторы окружающей среды. Решение этих вопросов невозможно без многостороннего биохимического и биофизического исследования, в том числе и белков плазмы крови.

Дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC) является аналитическим методом, который измеряет молярную теплоемкость образцов в зависимости от температуры. При анализе образцов белка профили DSC предоставляют информацию о термической стабильности, служат для оценки конформации белковой молекулы, позволяют измерять температуру теплового перехода (температура плавления, T_m) и энергию, необходимую для разрушения взаимодействий, стабилизирующих третичную структуру (энтальпия ΔH) белков.

В настоящее время считается, что DSC может быть применен для исследования клинического статуса человека [3-5]. Термограмма плазмы у здоровых лиц отражает усредненную сумму профилей денатурации наиболее распространенных белков плазмы. DSC-анализ плазмы у больных людей выявил значительные изменения в термограммах, которые, как предполагается, обусловлены не изменениями концентрации основных белков плазмы, а взаимодействием малых молекул или пептидов с этими белками [6]. Более тщательное исследование термограмм больных показало специфичность, характерную для каждого заболевания. Термограммы изменчивы и имеют характерные особенности для каждой патологии. Это обстоятельство свидетельствует о том, что термографический профиль плазмы крови может быть полезен в качестве метода клинического диагностического скрининга. Механизмы специфических для заболеваний изменений в термограммах в настоящее время изучаются, но мы предполагаем, что они отражают наличие биомаркеров болезни, которые изменяют или взаимодействуют с белками плазмы, тем самым влияя на их характеристики денатурации. Существует концепция, которая предполагает, что низкомолекулярные пептиды, присутствующие в плазме, создают сеть белково-белковых и пептид-белковых взаимодействий [7].

Цель работы: исследование возможности применения дифференциальной сканирующей калориметрии для диагностики рецидивирующей кривошеи у детей.

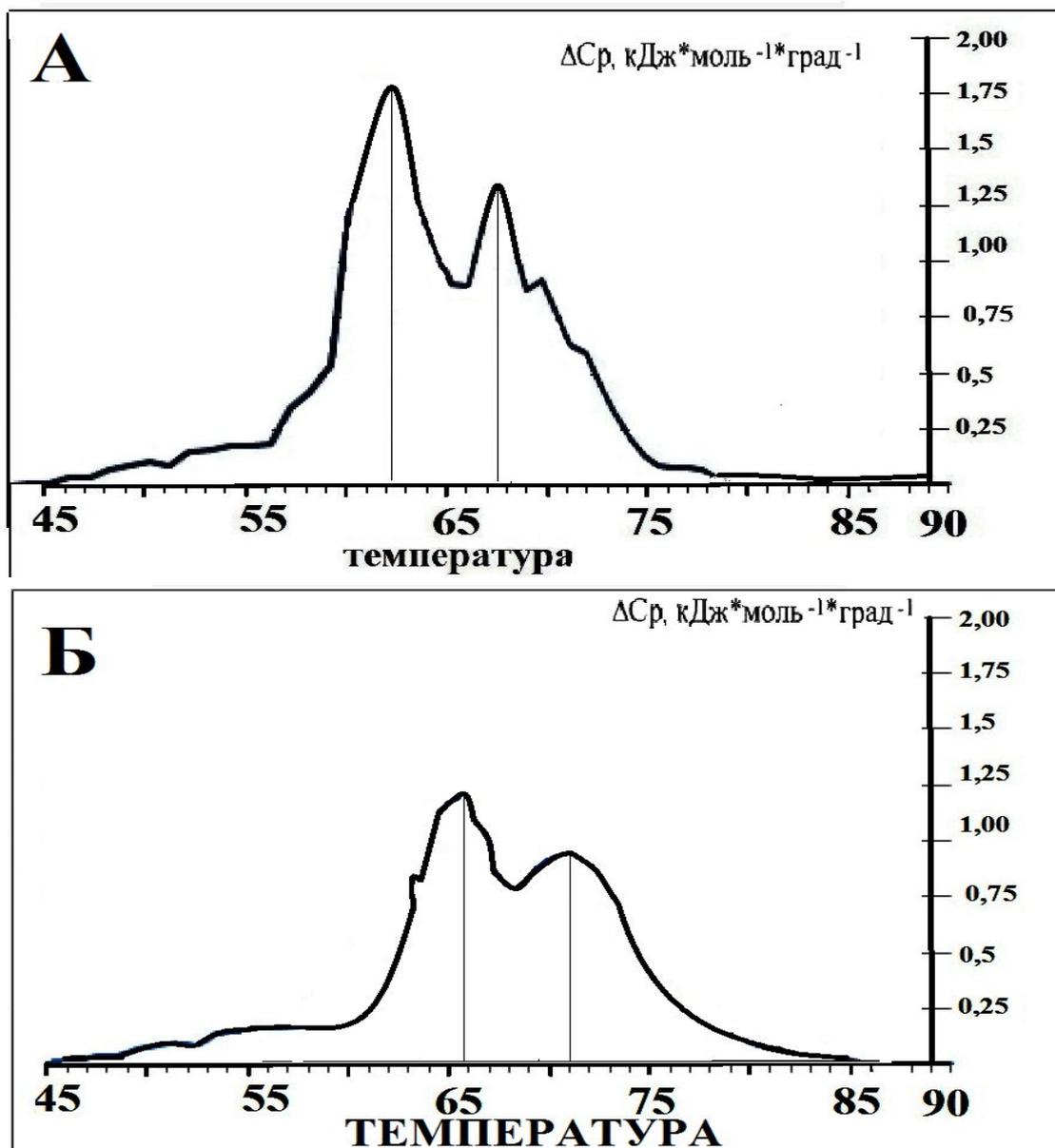
Материалы и методы исследования. Проанализированы образцы плазмы 72 детей, больных рецидивирующей кривошеей, находившихся на лечении в отделении травматологии и ортопедии областной детской клинической больницы им. Н.Н. Силищевой г. Астрахани с

2014 по 2017 год (основная группа), и 14 здоровых детей (контрольная группа). Образцы плазмы были анонимны и лишены всей демографической и клинической информации. Анализ DSC образцов плазмы показал нормированные, коррелированные по глубине термограммы для каждого образца. На этом этапе клиническая и демографическая информация была предоставлена для последующего анализа.

Все образцы плазмы (100 мкл) диализовали в течение 24 ч при 4 °С против 10 мМ фосфата калия, 150 мМ NaCl, pH 7,5, а затем разбавили в 25 раз тем же буфером перед использованием. Анализ DSC проводили с помощью прибора MicroCal VP-Capillary (MicroCal, LLC). Калибровка сигнала мощности и калибровка температуры с использованием стандартов температуры углеводов проводились на основе технического описания завода-изготовителя. Калибровку теплоемкости тепловой денатурации белков оценивали с использованием биологических стандартов лизоцима и РНКазы-А. Сканирование DSC регистрировалось от 20° до 110 °С при шаге 1° С/мин с предварительным термостатированием 15 минут. Для каждого образца плазмы были получены дублирующие сканирования DSC. Термограммы были построены как зависимость избыточной теплоемкости ΔC_p (кДж*моль⁻¹*град⁻¹) образца от температуры. Теплоемкость денатурированного белка выше, чем нативного. Причины и механизмы этого явления детально исследованы и отражены в теоретических обзорах [8]. Исходные данные DSC были скорректированы для инструментальной базовой линии путем вычитания подходящего контрольного сканирования буфера. Исправленные сканирования были нормализованы для общей концентрации белка, которая определялась калориметрически с использованием набора для анализа белка бицинхониновой кислоты (Immundiagnostik, K7822BCA). Данные анализировали с использованием программного обеспечения Origin версии 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA).

Результаты. Ранее было показано [6], что термограмма плазмы, полученная от здоровых индивидуумов, является репрезентативной для термической денатурации наиболее распространенных белков плазмы, распределенных в соответствии с их средними нормальными концентрациями в плазме.

Для текущего исследования термограммы плазмы здоровых детей были усреднены для получения профиля «здорового контроля», специфичного для исследования, который учитывает конкретные протоколы сбора и обработки, используемые в данной работе. Термограммы опытной группы были также усреднены (рис. Б).



Профиль термограмм исследованных образцов плазмы детей основной и контрольной групп.

Средние температурные профили избыточной удельной теплоемкости (C_{pex}) по отношению к температуре группы А (здоровые дети) и группы В (больные рецидивирующей кривошеей)

Как видно из рисунка, средние термограммы здоровых детей и детей, страдающих рецидивирующей кривошеей, различны и показывают постепенное изменение формы профиля. Основной переход в диапазоне 60-65 °С постепенно уменьшается с увеличением амплитуды второго перехода около 71 °С. Дисперсия, связанная с каждым групповым профилем, была исследована путем расчета стандартных отклонений при каждой температуре и стандартного отклонения теплоемкости в зависимости от температуры. Здоровые дети (группы контроля) показали наименьшую дисперсию во всем температурном

диапазоне. Основная группа показывала более высокую дисперсию. Долгое время из сложных кривых теплопоглощения удавалось извлекать весьма ограниченную информацию из-за отсутствия адекватных методов их анализа. Привалов П.Л. [9] показал, что на основе важных свойств калориметрических кривых можно существенно уменьшить число неизвестных параметров и, сделав некоторые допущения, получить практически однозначную интерпретацию кривой теплопоглощения. Исходя из того что экспериментальная термограмма содержит (по крайней мере теоретически) всю информацию для полной характеристики равновесных процессов денатурации, Schön A et al. [10] предложили ряд новых параметров для определения термодинамических характеристик.

Для сравнения термограмм протеомов плазмы крови детей основной и контрольной групп мы, как и другие исследователи [3; 5], оценивали несколько параметров. Это в первую очередь температура максимума пиков, теплоемкость первичного перехода в диапазоне 60-65С [Срех (пик 1)]; теплоемкость вторичного перехода при 68-72С [Срех (пик 2)]; отношение первой и второй амплитуд перехода [Срех (Peak 1)] / [Срех (Peak 2)]. Из-за сложности форм термограммы была рассчитана также площадь профиля денатурации относительно температурной оси.

Основные характеристики термограмм исследованных образцов плазмы крови

ПОКАЗАТЕЛЬ	Здоровые дети (n=14)	Больные (n=72)	P
Температурный максимум 1 пика	62,17±0,32	65,71±0,47	≤0,001
Температурный максимум 2 пика	66,77±0,45	71,02±0,64	≤0,001
Срех (пик1), избыточная удельная теплоемкость основного перехода	1,72±0,11	1,22±0,29	≥0,05
Срех (пик2), избыточная удельная теплоемкость второго перехода	1,39±0,16	0,89±0,17	≤0,05
Отношение избыточных удельных теплоемкостей основного и второго переходов	1,23	1,37	≤0,01
Площадь термограммы, кал / г	50260,23±428,1	36727,81±537,2	≤0,001

В таблице приведены основные параметры, используемые нами для оценки совокупного протеома плазмы крови на основе его термодинамических характеристик. Некоторые параметры термограммы не показали чувствительность к патологическому состоянию, а именно, различие в избыточной удельной теплоемкости основного перехода

оказалось недостоверным. На грани достоверности и различия в избыточной удельной теплоемкости второго перехода. При этом не вызывает сомнения достоверность различий сдвига температурных максимумов как 1, так и 2 пиков ($P \leq 0,001$). Доказана и информативность такого показателя, как отношение избыточных удельных теплоемкостей основного и второго переходов. В группе больных детей этот показатель более чем на 10% выше, чем в контроле.

Площадь термограммы является интегральным показателем, основанным на фундаментальных термодинамических соотношениях и на последовательном нахождении параметров элементарных переходов, отнесенных к единице площади термограммы с учетом массы белка во внесенном образце. Этот показатель обобщает термодинамические параметры состояний, через которые проходят макромолекулы в процессе плавления структуры, если зависимость ее молярной энтальпии от температуры определена с достаточной точностью. Он достоверно демонстрирует снижение калориметрической энтальпии денатурации у детей основной группы.

Обсуждение результатов. Протеом плазмы человека представляет собой сложную жидкость, которая содержит более 3000 отдельных белков и пептидов, в количествах, варьирующих от пикограмм до десятков миллиграммов на миллилитр [11]. При этом не более 20 белков протеома плазмы составляют 99% массы плазмы. Очевидно, что в оставшемся 1% содержится значительная информация, и было предпринято много усилий для изучения этих минорных компонентов плазмы [12]. DSC обеспечивает альтернативный хроматографии и электрофорезу метод изучения нефракционированного протеома плазмы. Плазма у здоровых людей дает воспроизводимую термограмму, которая возникает в результате взвешенной суммы термической денатурации наиболее распространенных плазменных белков. DSC-анализ плазмы у детей, больных кривошеей, выявил значительные изменения в термограмме, которые касаются в первую очередь сдвига температурных максимумов как 1, так и 2 пиков ($P \leq 0,001$). Сдвиг первого (основного) максимума можно расценить как повышение температурной устойчивости белков протеома плазмы, относящихся к так называемым базисным белкам [12], среди которых «львиную» долю составляет сывороточный альбумин. В пользу такого предположения говорит и снижение суммарной калориметрической энтальпии протеома, выраженное в достоверном снижении общей площади термограммы, рассчитанной планиметрическим методом и выраженной в условных калориях на единицу массы белка внесенного образца. Некоторые параметры термограммы не показали достоверных изменений, а именно, различие в избыточной удельной теплоемкости основного перехода и различия в избыточной удельной теплоемкости второго перехода оказались недостоверными. На наш взгляд, это укладывается

в общую картину повышения устойчивости к температурной денатурации «базисных» белков протеома, т.к. высота пиков, отражающая соответственно удельную теплоемкость основного и второго переходов, снижается незначительно и не образует заметных расщеплений пиков, что свидетельствует об однотипном незначительном повышении термостабильности основных белков протеома.

При анализе этих изменений актуальными являются две проблемы. Во-первых, клинико-диагностическая ценность и детерминированность термограмм. Во-вторых, интерпретация наблюдаемых на термограмме изменений как признаков изменения протеома плазмы крови и характера этих изменений.

Что касается первого вопроса, то, по нашему мнению, для термограммы плазмы крови детей, больных рецидивирующей кривошеей, наибольшее значение имеет изменение температурных максимумов первого и второго переходов, отношение избыточных удельных теплоемкостей основного и второго переходов и общая площадь термограммы. Причем отмечается достоверный рост температурных максимумов и отношения избыточных удельных теплоемкостей основного и второго переходов и снижение общей площади термограммы. Важнейшим критерием для оценки диагностической и прогностической значимости термограмм являются их изменения не по отношению к здоровым людям, а сравнение с другой патологией. В настоящее время для интерпретации данных DSC не накопилась достаточно широкая информационная база. Данные [13-15], которые уже получены относительно сахарного диабета, системной красной волчанки, рака шейки матки, позволяют выявлять в показателях термограмм специфические черты, что дало основание использовать метод DSC в качестве потенциального инструмента для ранней диагностики, мониторинга и скрининга другой патологии, в частности рецидивирующей кривошеи.

Заключение. Таким образом, интерпретация термодинамических изменений термограмм для понимания биохимических сдвигов в протеоме плазмы крови имеет существенное значение, т.к. метод ДСК позволяет оценить такие характеристики белков, которые не определяются другими методами. В частности, изменение термодинамических характеристик, а именно, как в нашем случае, повышение термостабильности белков, обусловлено взаимодействием компонентов протеома (это доказано для альбумина) [12] с низкомолекулярными лигандами (метаболитами), как образующимися в ходе развития патологического процесса, так и являющимися продуктами функционирования генома индивидуума и создающие уникальные композиции с протеомом. Это позволяет, используя метод ДСК, оценить не только общие изменения протеома, но и изменение характера межмолекулярных взаимодействий в нем. Применение метода DSC может быть потенциальным инструментом для диагностики, мониторинга и скрининга больных с

различной патологией, в частности, как показали наши исследования, метод информативен в обследовании детей с рецидивирующей кривошеей.

Список литературы

1. Громова О.А. Молекулярные механизмы воздействия магния на дисплазию соединительной ткани // Дисплазия соединительной ткани. - 2008. - № 1. - С. 23-32.
2. Ситкалиева Ф.С. Недифференцированная дисплазия соединительной ткани и нарушения метаболизма коллагена при патологии шейного отдела позвоночника у детей / Ф.С. Ситкалиева, А.Н. Тарасов // Актуальные проблемы педиатрии. Сборник материалов XV Конгресса педиатров России с международным участием. – М., 2010. - С. 808.
3. Garbett N.C., Mekmaysy C.S., Helm C.W. et al. Differential scanning calorimetry of blood plasma for clinical diagnosis and monitoring. *Exp. Mol. Pathol.* 2009, vol. 86, pp. 186–191.
4. Zapf I., Fekecs T., Ferencz A. et al. DSC analysis of human plasma in breast cancer patients. *Thermochim Acta* 2011, vol. 524, pp. 88–91.
5. Michnik A., Drzazga Z., Michalik K. et al. Differential scanning calorimetry study of blood serum in chronic obstructive pulmonary disease. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2010, vol. 102, no. 1, pp. 57–60.
6. Garbett N.C., Miller J.J., Jenson A.B. et al. Calorimetry Outside the Box: A New Window into the Plasma Proteome *Biophysical Journal* 2008, vol. 94, no. 3, pp. 1377–1383.
7. Zhou M., Lucas D.A., Chan K.C. et al. An investigation into the human serum “interactome”. *Electrophoresis* 2014, vol. 25, no. 4, pp. 1289–1298.
8. Любарев Е.А. Изучение необратимой тепловой денатурации белков методом дифференциальной сканирующей калориметрии / Е.А. Любарев, Б.И. Курганов // Успехи биологической химии. – 2000. - Т. 40. - С. 43-84.
9. Privalov P.L. Microcalorimetry of proteins and their complexes. *Methods Mol Biol* 2009, v. 490, no. 1, pp. 1-39. DOI: 10.1007/978-1-59745-367-7_1.
10. Schön A., Clarkson B.R., Jaime M., Freire E. Temperature stability of proteins: Analysis of irreversible denaturation using isothermal calorimetry. *Proteins* 2017, v. 85, no. 11, pp. 2009-2016. DOI: 10.1002/prot.25354.
11. Omenn G.S., States D.J., Adamski M. et al. Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics* 2005, no. 5, pp. 3226–3245.
12. Garbett N.C., Miller J.J., Jenson A.B., Chaires J.B. Calorimetric analysis of the plasma

proteome. *Semin. Nephrol.* 2009, vol. 27, no. 6, pp. 621-626.

13. Kendrick S.K., Zheng Q., Garbett N.C., Brock G.N. Application and interpretation of functional data analysis techniques to differential scanning calorimetry data from lupus patients. *PLoSOne* 2017, vol. 2, no. 11, p. 154-161.

14. Garbett N.C., Merchant M.L., Chaires J.B., Klein J.B. Calorimetric Analysis of the Plasma Proteome: Identification of Type 1 Diabetes Patients With Early Renal Function Decline *Biochim Biophys Acta* 2013, vol. 1830, no. 10, pp. 4675–4680. DOI:10.1016/j.bbagen.2013.05.007.

15. Garbett N.C., Merchant M.L., Helm C.W. et al. Detection of cervical cancer biomarker patterns in blood plasma and urine by differential scanning calorimetry and mass spectrometry. *PLoS One* 2014, vol. 9, no. 1, pp. 84710. DOI: 10.1371/journal.pone.0084710. eCollection 2014.