

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.03.116>

УДК 536.6:[615.361:615.451.1:618.46]:577.352.332

**Ю.С. Говорова¹, О.В. Зінченко¹, О.Ю. Семенченко¹,
О.М. Боброва¹, Е.О. Нардід¹, О.А. Нардід^{1, 2}**

¹ Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків

² Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна

E-mail: yu.govorova7@gmail.com

ДСК-дослідження дії фракцій екстрактів плаценти людини на термічну стабільність білкових комплексів еритроцитарних мембран

Представлено академіком НАН України А.М. Гольцевим

Методом диференціальної адиабатичної сканувальної калориметрії досліджено вплив фракцій екстрактів плаценти на теплову денатурацію мембранозв'язаних білків еритроцитів. На термограмі денатурації білих тіней еритроцитів зареєстровано чотири переходи. Показано, що додавання фракцій екстрактів плаценти до суспензії мембранозв'язаних білків еритроцитів призводить до підвищення значень температури денатурації всіх груп білків, за винятком спектрину.

Ключові слова: фракції екстрактів плаценти, тіні еритроцитів, диференціальна сканувальна калориметрія, теплова денатурація.

Багато років плацента людини привертає увагу дослідників через її важливу роль у розвитку і зростанні ембріона [1]. Безліч біологічних функцій плаценти визначається не тільки набором індивідуальних білків, що входять до її складу, а також різноманітними їхніми комплексами. Таким чином, характеристика мультибілкових комплексів плаценти є важливим кроком у розумінні функціонування плаценти [2].

Відомо, що отримані з екстрактів плаценти фракції збільшують стійкість еритроцитів до нефізіологічних факторів середовища [3]. Такий вплив екстрактів, можливо, обумовлений взаємодією білків плаценти з мембранами еритроцитів. У зв'язку з цим дослідження білкових фракцій екстрактів плаценти людини (ЕПЛ), а також їх вплив на різноманітні модельні системи також має певний інтерес.

Для аналізу дії фракцій ЕПЛ різних молекулярних мас на мембранозв'язані білки еритроцитів на молекулярному рівні застосовується метод диференціальної сканувальної калориметрії (ДСК). Калориметрія – прямий метод, який дає змогу вимірювати термодинамічні і кінетичні параметри теплової денатурації білків і вивчати енергетику процесів, пов'язану

© Ю.С. Говорова, О.В. Зінченко, О.Ю. Семенченко, О.М. Боброва, Е.О. Нардід, О.А. Нардід, 2018

з їх конформаційними перетвореннями [4]. Ми ставили за мету дослідження термоденатурації білків, що входять до складу фракцій ЕПЛ, а також аналіз дії цих фракцій на теплову денатурацію білків еритроцитарних мембран.

Матеріали і методи. Екстракт плаценти отримували таким чином: свіжоодержану плаценту відмивали ізотонічним розчином NaCl, подрібнювали на фрагменти 3×2 см, які теж ретельно відмивали фізіологічним розчином. Відмиті фрагменти плаценти з фізіологічним розчином (1 : 1) гомогенізували на високошвидкісному гомогенізаторі РТ-1 У4.2 протягом 3 хв. Далі гомогенати витримували протягом 12 год при 4°C та центрифугували 25 хв при 1500 g. Надосадову рідину пропускали через мембранний фільтр 0,45 мкм ("Millipore Corp. Carrigtwohill", Ірландія). Отриманий фільтрат є водно-сольовим екстрактом плаценти. Окремі фракції екстрактів виділяли методом гель-хроматографії з використанням сефадексу G-100 [5]. Досліджували три типи фракцій: з мол. масою <4 , 50–60 та >150 кДа.

Білі тині еритроцитів отримували з еритроцитів донорської крові (чоловіча, А(II)+), яка була надана Харківським обласним центром служби крові. Еритроцити відокремлювали від плазми і формених елементів крові одноразовим центрифугуванням протягом 5 хв при 1500 g. Подальші два відмивання проводили у десятиразовому обсязі фізіологічного розчину. Тині отримували шляхом триразового відмивання строми еритроцитів від гемоглобіну при 20 000 g протягом 15 хв (5 mM натрій-фосфатний буферний розчин (рН 7,8)). Дослідження термоденатурації фракцій ЕПЛ і мембранозв'язаних білків еритроцитів проводили на диференціальному сканувальному адіабатичному мікрокалориметрі ДАСМ-4. Термограми реєстрували за умов нагрівання зі швидкістю $1^\circ\text{C}/\text{хв}$. Область сканування – від 20 до 100°C . Для статистичної обробки результатів використовували критерій Манна–Уїтні.

Результати і їх обговорення. На термограмі низькомолекулярної фракції ЕПЛ (<4 кДа) зареєстровано дві хвилеподібні особливості з розмитими максимумами в широких діапазонах температур, які являють собою суперпозицію піків денатурації біологічних компонентів фракції (рис. 1, а).

На калориметричних профілях фракції <4 кДа у температурному діапазоні 25 – 70°C розмитий перехід відповідає, вірогідно, денатурації груп біомолекул, таких як білки [6], пептиди і ліпіди [7], хвилеподібна особливість на термограмі в температурному діапазоні 70 – 115°C , імовірно, обумовлена плавленням амінокислот, нуклеотидів та ін.

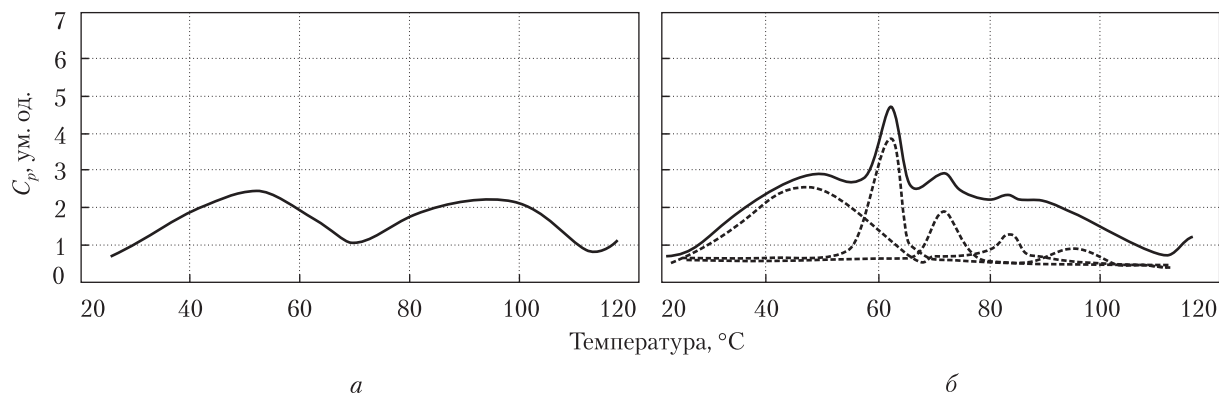


Рис. 1. Термограми фракції ЕПЛ з мол. масою <4 кДа (а) і 50–60 кДа (б)

На термограмах фракції >150 кДа досліджених ЕПЛ, як і для фракції <4 кДа, також спостерігається два переходи з розмитими максимумами, які відповідають денатурації груп макромолекул. Однак перший перехід у випадку фракції >150 кДа зміщений на 10 °С у високотемпературну область порівняно з таким для фракції <4 кДа і знаходиться в межах 30–80 °С. Другий перехід денатурації груп макромолекул реєструється в межах 80–120 °С.

Судячи з вигляду калориметричної термограми процесу денатурації фракції 50–60 кДа (рис. 1, б), можна припустити наявність на ній п'яти ендотермічних піків. Деконволюція піків показала, що термограма денатурації фракції 50–60 кДа являє собою суперпозицію п'яти ендотермічних піків (див. рис. 1, б, штрихові лінії). Виявлені максимальні значення температур ендотермічних піків такі: а – 45 °С, б – 62 °С, в – 71 °С, г – 83 °С, д – 95 °С. Інтерпретація піків:

- 1) перехід при близько 45 °С, імовірно, відповідає денатурації термолабільних білків;
- 2) в ендотермічний інтенсивний пік при близько 62 °С значний внесок може здійснювати денатурація альбуміну;
- 3) перехід при близько 71 °С, найімовірніше, обумовлений денатурацією гемоглобіну;
- 4) переходи при близько 83 і 95 °С, імовірно, відповідають денатурації нуклеотидів і інших біологічних компонентів.

У ході дослідження теплової денатурації мембран еритроцитів було виявлено чотири максимуми, які в літературі прийнято позначати А, В, С і D, при $(51 \pm 0,1)$ °С, $(58 \pm 0,1)$ °С, $(67 \pm 0,1)$ °С і $(80 \pm 0,1)$ °С відповідно (рис. 2, крива 1). Існують декілька класифікацій цих денатураційних переходів [9]. Так, згідно з класифікацією Shnugov [8] перехід А являє собою термоденатурацію білків мембранного каркаса спектрину (смуги 1 і 2 при електрофоретичному розділенні білків еритроцитарної мембрани) і анкірину (смуга 2,1); перехід В – білків смуги 4,2, 4,9 і актину (смуга 5); перехід С – білків смуги 3 (білок, який переносить аніони), смуги 4,1, гліцеральфосфат – дегідрогенази (смуга 6); перехід D – тропоміозину (смуга 7) [8]. У роботах інших дослідників були отримані подібні переходи при вивченні теплової денатурації тіней еритроцитів методом ДСК [9, 10].

Експозиція протягом 2 год суспензії еритроцитарних мембран з фракціями ЕПЛ з різною молекулярною масою призводить до таких трансформацій на калориметричних профілях: незалежно від молекулярної маси фракції екстрактів на термограмах спостерігається зміщення температур піків денатурації білків (В', С', D') у область більш високих температур (таблиця). Винятком є пік А', значення температури якого залишаються в межах похибки незалежно від молекулярної маси фракції.

За наявності фракцій екстрактів плаценти в суспензіях еритроцитарних мембран спостерігається значне збільшення інтенсивності піка А' (див. рис. 2). Зміна інтенсивності решти піків (В', С', D') залежить від молекулярної маси фракції. Так, наприклад, фракція 50–60 кДа ЕПЛ містить у своєму складі гемоглобін, температура денатурації якого становить 71 °С, що спричиняє значне підвищення інтенсивності піка С' при додаванні відповідної фракції.

Зміни параметрів піків денатурації білків еритроцитарних мембран, які спостерігаються за наявності фракцій, можуть бути обумовлені декількома факторами. По-перше, може відбуватися зв'язування білків еритроцитарних мембран з активними компонентами фрак-

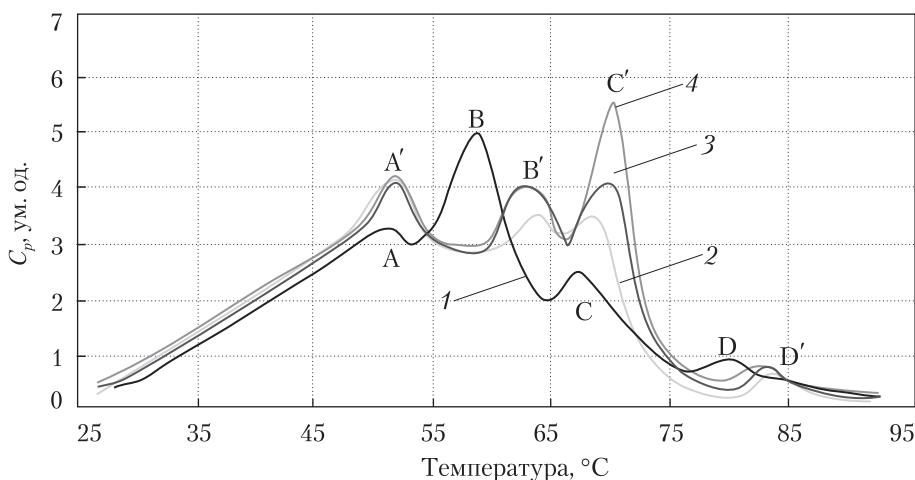


Рис. 2. Термограми денатурації мембранних білків еритроцитів: 1 – без фракцій ЕПЛ; 2 – з фракцією <4 кДа; 3 – з фракцією >150 кДа; 4 – з фракцією 50–60 кДа

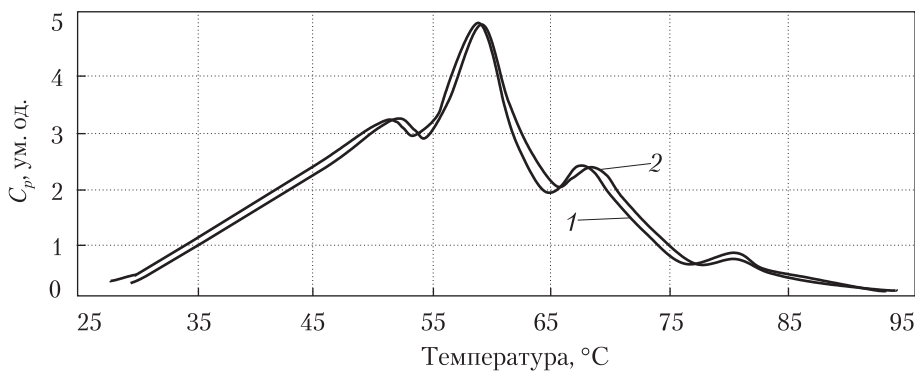


Рис. 3. Термограми денатурації мембранних білків еритроцитів: 1 – контроль; 2 – після інкубування з фракцією <4 кДа і подальшого відмивання від фракції

Значення температур денатурації мембранних білків еритроцитів за наявності фракцій екстрактів плаценти людини

Мол. маса фракції, кДа	Пік			
	A'	B'	C'	D'
Без фракцій	51 ± 0,1	58 ± 0,1	67 ± 0,1	80 ± 0,1
>150	51 ± 0,1	62 ± 0,1*	70 ± 0,1*	82 ± 0,1*
50–60	51 ± 0,1	62 ± 0,1*	71 ± 0,1*	82 ± 0,1*
<4	51 ± 0,1	63 ± 0,1*	69 ± 0,1*	83 ± 0,1*

* $p < 0,05$ відносно тіней без фракцій ЕПЛ.

цій, по-друге — зареєстровані в сумішах піки обумовлені суперпозицією піків плавлення як білків мембран, так і біологічних складових компонентів фракцій.

З метою перевірки першого припущення суспензії тіней еритроцитів після 2 год інкубування з дослідженими фракціями відмили від фракцій натрій-фосфатним буферним розчином. На рис. 3 наведені як приклад термограми термоденатурації мембранних білків до інкубування (крива 1) і після інкубування і відмивання від низькомолекулярної фракції <4 кДа (крива 2). Термограми практично ідентичні. Цей факт вказує на те, що якщо зв'язування мембранних білків з біологічними компонентами фракцій і відбувається, то воно має оборотний характер.

Таким чином, показано, що досліджені фракції ЕПЛ викликають зміщення значень температур піків денатурації В', С' і D' мембранозв'язаних білків у напрямі високих температур на 4–5 °С, 2–4 °С та 2–3 °С відповідно. Значення температури денатурації піка А' залишається постійним незалежно від молекулярної маси фракції. Зміни інтенсивності піків В', С', D' залежать від молекулярної маси фракції. Виявлено, що зміни температур денатурації мембранозв'язаних білків еритроцитів за наявності фракцій екстрактів плаценти мають оборотний характер.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Parolini O., Soncini M. Placenta as a source of stem cells and as a key organ for fetomaternal tolerance. *Regenerative medicine using pregnancy-specific biological substances*. London: Springer. 2011. P. 11–23. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-84882-718-9_2
2. Wang F., Wang L., Xu Zh., Liang G. Identification and analysis of multi-protein complexes in placenta. *PLoS ONE*. 2013. **8**, № 4. e 62988. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062988>
3. Nardid O., Repina S., Rozanova E., Cherkashina Ya., Nardid E. Properties of aqueous-saline human placental extracts and their fractions after storage of placenta at various subzero temperatures. *J. Exp. Integr. Med.* 2015. **5**, № 4. P. 172–177. doi: <https://doi.org/10.5455/jeim.231115.or.141>
4. Любарев А.Е., Курганов Б.И. Изучение необратимой тепловой денатурации белков методом дифференциальной сканирующей калориметрии. *Успехи биол. химии*. 2000. № 1–3. С. 43–84.
5. Зінченко А.В., Боброва Е.Н., Говорова Ю.С., Розанова Е.Д., Карпенко В.Г. Влияние низкотемпературного хранения плаценты человека на фазовые переходы во фракциях экстрактов плаценты и в смесях фракций с клетками. *Пробл. криобиологии и криомедицины*. 2015. **25**, № 2. С.122–130.
6. Ku T., Lu P., Chan C., Wang T., Lai S., Lyu P., Hsiao N. Predicting melting temperature directly from protein sequence. *Comput. Biol. Chem.* 2009. **33**. P. 445–450. doi: <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2009.10.002>
7. Marangoni A. G., Suresh S. N. *Physical properties of lipids*. Washington: CRC Press, 2002. 592 p.
8. Лапшина Е.А., Заводник И.Б. Термостабильность белков эритроцитарных мембран при варьировании эритроцитарной силы и состава среды. *Биофизика*. 1994. **39**, № 6. С. 1015–1020.
9. Matveev A.V., Akoev V.R., Tarakhnovskii Yu.S., Deev A.A., Bryukhanov V.M., Zhadan G.G., Shnyrov V.L. A comparative study of structural transitions in erythrocyte membranes of adult donors and neonates. *Bull. Exp. Biol. Med.* 1997. **123**, № 2. P. 196–200. doi: <https://doi.org/10.1007/BF02766443>
10. Ivanov I.T., Brahler M., Georgieva R., Baumler H. Role of the membrane proteins in thermal damage and necrosis of red blood cells. *Thermochim. Acta*. 2007. **456**, № 1. P. 7–12. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tca.2007.01.020>

Надійшло до редакції 24.11.2017

REFERENCES

1. Parolini O., Soncini M. (2011). Placenta as a source of stem cells and as a key organ for fetomaternal tolerance. In *Regenerative medicine using pregnancy-specific biological substances* (pp. 11-23). London: Springer. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-84882-718-9_2
2. Wang, F., Wang, L., Xu, Zh. & Liang, G. (2013). Identification and analysis of multi-protein complexes in placenta. *PLoS ONE*, 8, No. 4. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062988>
3. Nardid, O., Repina, S., Rozanova, E., Cherkashina, Ya. & Nardid, E. (2015). Properties of aqueous-saline human placental extracts and their fractions after storage of placenta at various subzero temperatures. *J. Exp. Integr. Med.*, 5, No. 4, pp. 172-177. doi: <https://doi.org/10.5455/jeim.231115.or.141>
4. Lyubarev, A. E. & Kurganov, B. I. (2000). The studying of irreversible protein denaturation by differential scanning calorimetry method. *Uspehi biologicheskoy himii*, 40, No. 1-3, pp. 43-84 (in Russian).
5. Zinchenko, A. V., Bobrova, E. N., Govorova, Yu. S., Rozanova, E. D. & Karpenko, V. G. (2015). Effect of low temperature storage of human placenta on phase transitions in fractions of placental extracts and in mixtures of the fractions with cells. *Probl. Cryobiol. Cryomed.*, 25, No. 2, pp. 122-130.
6. Ku, T., Lu, P., Chan, C., Wang, T., Lai, S. Lyu, P. & Hsiao, N. (2009). Predicting melting temperature directly from protein sequence. *Comput. Biol. Chem.*, 33, pp. 445-450. doi: <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2009.10.002>
7. Marangoni, A. G. & Suresh, S. N. (2002). *Physical properties of lipids*. Washington: CRC Press.
8. Lapshina, E. I. & Zavodnik, I. B. (1994). Thermostability of erythrocyte membrains proteins with erythrocyte and medium compounds varying. *Biophysika*, 39, No. 6, pp. 1015-1020 (in Russian).
9. Matveev, A. V., Akoev, V. R., Tarakhnovskii, Yu. S., Deev, A. A., Bryukhanov, V. M., Zhadan, G. G. & Shnyrov, V. L. (1997). A comparative study of structural transitions in erythrocyte membranes of adult donors and neonates. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 123, No. 2, pp. 196-200. doi: <https://doi.org/10.1007/BF02766443>
10. Ivanov, I. T., Brahler, M., Georgieva, G. & Baumler, H. (2007). Role of the membrane proteins in thermal damage and necrosis of red blood cells. *Thermochim. Acta*, 456, No. 1, pp. 7-12. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tca.2007.01.020>

Received 24.11.2017

Ю.С. Говорова¹, А.В. Зинченко¹, А.Ю. Семенченко¹,
Е.Н. Боброва¹, Э.О. Нардид¹, О.А. Нардид^{1,2}

¹ Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

² Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

E-mail: yu.govorova7@gmail.com

ДСК-ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ФРАКЦИЙ ЭКСТРАКТОВ
ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА НА ТЕРМИЧЕСКУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ
БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН

Методом дифференциальной адиабатической сканирующей калориметрии исследовано влияние фракций экстрактов плаценты на тепловую денатурацию мембраносвязанных белков эритроцитов. На термограмме денатурации белых тений эритроцитов зарегистрировано четыре перехода. Показано, что добавление фракций экстрактов плаценты к суспензии мембраносвязанных белков приводит к повышению значений температуры денатурации всех групп белков, за исключением спектрина.

Ключевые слова: фракции экстрактов плаценты, тени эритроцитов, дифференциальная сканирующая калориметрия, тепловая денатурация.

*Yu.S. Govorova*¹, *O.V. Zinchenko*¹, *O.Yu. Semenchenko*¹,
*O.M. Bobrova*¹, *E.O. Nardid*¹, *O.A. Nardid*^{1,2}

¹ Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the NAS of Ukraine, Kharkiv

² V.N. Karazin Kharkiv National University
E-mail: yu.govorova7@gmail.com

DSC INVESTIGATION OF THE INFLUENCE
OF HUMAN PLACENTA FRACTIONS ON THE THERMAL STABILITY
OF PROTEIN COMPLEXES OF ERYTHROCYTE MEMBRANES

The effect of placenta extracts fractions on the thermal denaturation of erythrocyte membrane-bound proteins is investigated by differential adiabatic scanning calorimetry. Four transitions are registered on a denaturation thermogram of white erythrocyte ghosts. Adding the placenta extracts fractions to the suspension of erythrocyte membrane-bound proteins leads to increasing the temperature of all protein groups except spectrin.

Keywords: *placenta extracts fractions, erythrocyte ghosts, differential scanning calorimetry, thermal denaturation.*