

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА В
ИММУНОДИАГНОСТИКЕ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

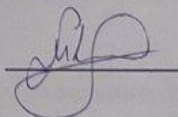
АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2-го курса 241 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.04.01 Биология
Биологического факультета

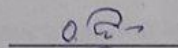
Шардина Виталия Владимировича

Научный руководитель:
канд. биол. наук



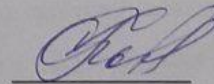
М. В. Каневский

Научный консультант:
в.н.с ИБФРМ РАН,
док. биол. наук, проф.



О. И. Гулий

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,
док. биол. наук проф.



С.А. Коннова

Саратов 2024

ВВЕДЕНИЕ

Возрастающая частота онкологических заболеваний привлекает внимание исследователей всего мира, стимулируя разработку новых методов диагностики. В соответствии с данными Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), рак занимает второе место среди основных причин смерти, уступая только сердечно-сосудистым заболеваниям. Только в 2022 году от злокачественных новообразований скончались 9,6 миллионов человек. Несмотря на значительный прогресс в понимании биологии рака и методах его лечения, развитие диагностических технологий в этой области требует дальнейшего совершенствования. Публикация рекомендаций ВОЗ перед Всемирным днем борьбы против рака (4 февраля) направлена на повышение шансов на выживание для пациентов с раком, акцентируя внимание медицинских служб на ранней диагностике и лечении заболевания на ранних стадиях.

Биопсия опухолевой ткани долгое время являлась золотым стандартом диагностики рака, однако она ограничена своей инвазивностью. В связи с этим активно развиваются неинвазивные методы диагностики рака, включая исследования на основе онкомаркеров. Различные опухоли выделяют характерные вещества, которые могут обнаруживаться в крови при определенных концентрациях. Хотя положительный результат теста на онкомаркеры не всегда является определением наличия злокачественной опухоли, но он может послужить причиной назначения дальнейших обследований.

Особый интерес представляет использование в диагностике белков теплового шока (БТШ), которые выступают в роли молекулярных шаперонов. Они представляют собой консервативные и филогенетически древние белки, присутствующие во всех клетках живых организмов. БТШ синтезируются постоянно во всех тканях и регулируются не только тепловым стрессом, но и другими видами стресса, в том числе вирусными инфекциями, воспалением и физиологическими процессами. Они включают несколько

групп, объединенных в семейства в зависимости от молекулярной массы: БТШ-Н (БТШ110), БТШ-С (БТШ90), БТШ-А (БТШ70), DNAJ (БТШ40), семейство малых БТШ-В (мБТШ), а также семейство шаперонинов БТШ-D/E (БТШ60/БТШ10). Каждое семейство БТШ выполняет свои функции в клетке. Они играют роль в сворачивании белков, транспортировке их через мембраны и защите от денатурации в условиях стресса. Белки теплового шока также участвуют в защите клеток от апоптоза и в процессах очищения организма от мертвых клеток. Их потенциальное применение в онкодиагностике может открыть новые возможности для более раннего выявления раковых заболеваний и улучшения прогноза для пациентов.

В течение долгого времени БТШ рассматривались как типичные внутриклеточные молекулы, узко специфичные для органелл. Но исследования показывают, что БТШ можно обнаружить не только в цитозоле и плазматической мембране, но и во внеклеточных пространствах, внеклеточных везикулах, биологических жидкостях и даже в кровотоке. Уровни и локализация БТШ в клетках часто аномальны при различных типах рака. С раскрытием их иммуномодулирующей противоопухолевой активности, интерес к использованию шаперонов в клинической онкологии увеличивается. Сейчас выделяются два основных подхода к использованию БТШ:

- Пептидсвязывающая функция БТШ и их способность доставлять определенные опухолевые антигены в антигенпрезентирующие клетки, что способствует формированию специфического иммунного ответа.

- Роль шаперонов, особенно БТШ90, в поддержании внутриклеточного гомеостаза. Выключение функции БТШ различными фармакологическими агентами может привести к гибели раковых клеток и замедлению роста опухоли.

Появляется все больше доказательств сверхэкспрессии БТШ во многих типах злокачественных опухолей. При этом уровень БТШ увеличивается за счет гиперактивации ФТШ (фактор теплового шока), что, в свою очередь,

способствует инвазии и метастазированию опухоли. Например, работы демонстрируют, что уровень БТШ повышен при различных формах рака и связан с неблагоприятным прогнозом и реакцией на терапию при раке молочной железы и простаты. Таким образом, активированный HSF и повышенный уровень БТШ являются потенциальными биомаркерами для ранней диагностики опухолей и оценки эффективности лечения у пациентов с распространенными формами рака.

При создании диагностических систем для выявления онкологических маркеров, важной частью является выбор подходящего биорецептора. В качестве элемента распознавания чаще всего используют антитела, специфические к целевому антигену. Существует несколько методов получения антител, но в последнее время молекулярные биологи все чаще прибегают к генно-инженерным технологиям клонирования узнающих фрагментов — гипервариабельных участков иммуноглобулинов, известных как фаговые антитела. Эти антитела относительно недорогие в производстве и могут соперничать с гибридными технологиями по своей селективности.

Одним из таких методов является технология фагового дисплея, которая основана на способности фаговых частиц экспонировать чужеродные пептиды или белки на своей поверхности. Этот метод был разработан Джорджем Смитом, который продемонстрировал возможность экспрессии чужеродного белка на поверхности нитчатого бактериофага M13. Суть технологии заключается в интеграции гена, кодирующего фрагмент эндонуклеазы рестрикции EcoRI, в единую рамку трансляции с минорным белком оболочки рIII нитчатого бактериофага. Преимуществом этого метода является отсутствие необходимости использования животных, проведения долгих процедур иммунизации, а также экономия на дорогих средах и культурах животных клеток. Фаговые рекомбинантные антитела уже успешно применяются в различных биосенсорных системах.

Цель работы заключается в получении антител, специфичных к белкам теплового шока, и оценке их потенциала в качестве биорецепторов

для *in vitro* онкодиагностики с использованием методов дот-иммуноанализа и иммуноферментного анализа.

Для достижения этой цели были сформулированы и решены следующие задачи:

1. Выделение белков теплового шока из опухолевых клеток и хроматографический анализ полученных белков.

2. Отработка методики получения антител, специфичных к белкам теплового шока с использованием неиммунной фаговой библиотеки scFv человека.

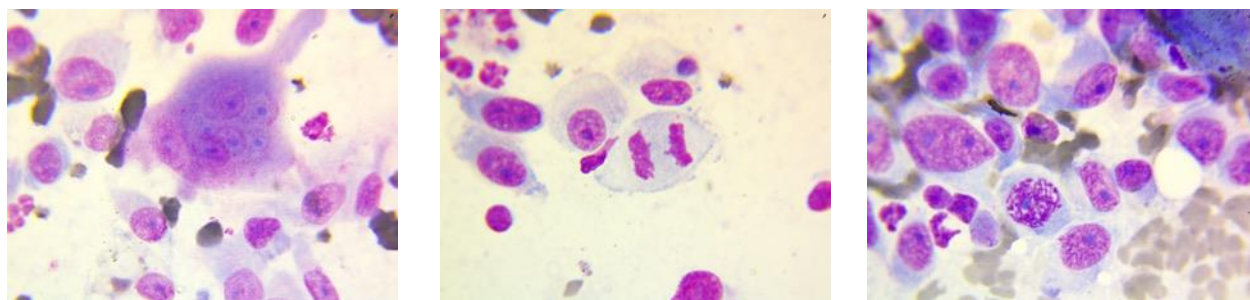
3. Определение уровня содержания белков теплового шока в сыворотке крови больных животных с помощью методов дот-иммуноанализа и иммуноферментного анализа, используя полученные рекомбинантные антитела.

4. Установление минимальной определяемой концентрации белков теплового шока в сыворотке крови больных животных.

Структура и объем работы. Магистерская работа состоит из введения, 3 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований и их обсуждение), заключения, выводов, списка используемой литературы. Список литературы включает 144 источника на русском, английском и немецком языках. Работа изложена на 67 страницах машинописного текста.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В работе проводили исследования по отработке технологии получения фаговых антител, специфичных в отношении HSP, выделенных из клеточных линий, полученных от спонтанно заболевших животных (кошек). Онкологический диагноз (фибросаркома) был подтвержден сотрудниками кафедры «Болезни животных и ветеринарно-санитарной экспертизы» ФГБОУ ВО СГАУ (д.б.н. Староверовым С.А. и д.вет.н, профессором Козловым С.В.). Диагноз был выявлен у 3-х кошек разных возрастов на основании клинических проявлений и цитологического исследования (рисунок 1).



А

В

С

(А – пациент №1, В – пациент №2, С – пациент №3)

Рисунок 1 – Цитологическое исследование опухоли окраска Лейкодиф 200; увеличение 100Х

Как видно из представленных данных, фон препарата образован крупнозернистым эозинофильным секретом единичными эритроцитами, нитями хроматина, нитями коллагена и обломками клеток. В препарате выявлены атипичные клетки от овальной до веретенообразной формы, расположенные по одиночке и группами. Клетки с большими от округлых до овальных ядрами (хроматин крупнозернистый), ядрышки базофильные, хорошо заметны от 1 до 3.

Далее сотрудниками кафедры «Болезни животных и ветеринарно-санитарной экспертизы» ФГБОУ ВО СГАУ из опухоли были выделены клетки, которые выращивали для дальнейшего получения НСП. На рисунке 2 представлены данные по контролю роста клеток, выделенных из опухоли животных, с помощью фазово-контрастной микроскопии.

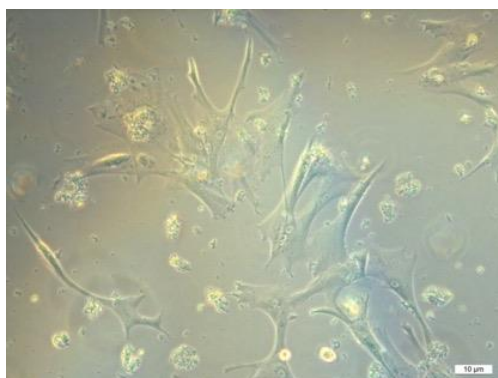


Рисунок 2 – Клетки, выделенные из опухоли на адгезионном планшете; фазовый контраст; увеличение 40Х.

На следующем этапе из культуры клеток выделяли HSP и проводили их хроматографическую очистку. Результат хроматографического анализа выделенного белка представлен на рисунке 3, видно, что максимум пика приходится на промежуток от 6,5 до 7 мл, что соответствует HSP-антигену.

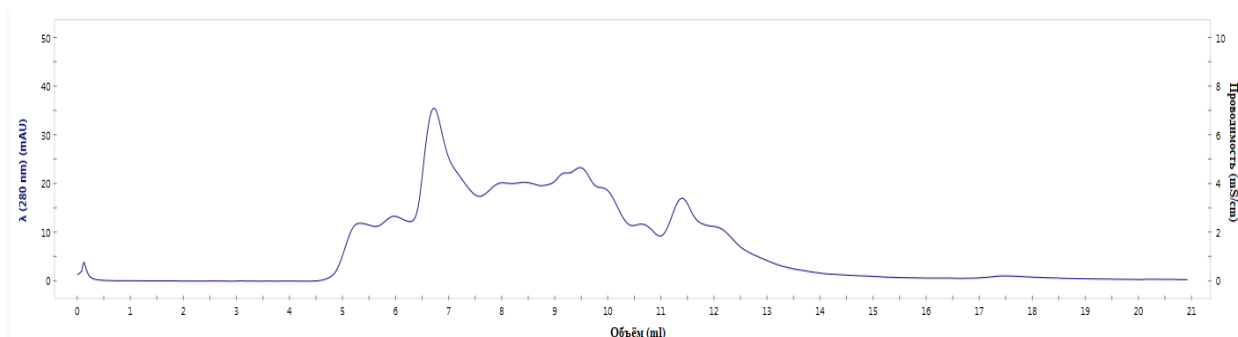


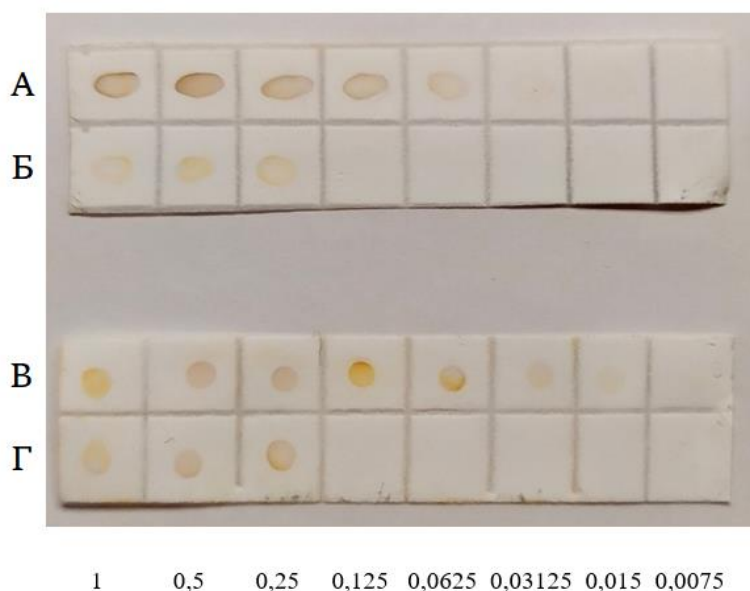
Рисунок 3 – Хроматограмма выделенного HSP-антигена

На следующем этапе проводилась наработка фаговых антител, специфичных к HSP. Для получения фаговых антител, специфичных к HSP, оптимальным носителем выбрана мембрана «Western S». Установлено, что количество антигена, используемого для иммобилизации, должно быть не менее 5×10^{12} бактериофагов/мл; подобран элюент (100 мМ раствор триэтиламин), для его нейтрализации выбран 1 М Трис-НСl (рН 7,4). В дальнейшем проводили 3 дополнительных раунда селекции антител. Контроль специфичности антител проводили методом дот-иммуноанализа. Титр антител определяли методом ИФА. Титр полученных фаговых антител составил 1:2400.

С использованием отработанной методики было проведено 4 раунда селекции фаговых антител к HSP. Начальная концентрация антигена составляла 100 мг/мл. Концентрация фаговых частиц, определенная методом спектрофотометрии, с использованием формулы: $A_{269} - A_{320}$, составила $\sim 2 \times 10^{14}$ фагмид/мл.

Специфичность фаговых антител определяли методом дот-иммуноанализа. Суть метода дот-иммуноанализа заключается в визуализации специфического взаимодействия адсорбированного на мембране антигена и меченых (коллоидными или молекулярными метками)

антител. В работе использовали стратегию вторичного мечения, аналогично, как описано, то есть сначала проводили биоспецифическую реакцию белок HSP/фаговые антитела, а затем визуализировали ее с помощью поликлональных кроличьих антифаговых антител. Для определения минимальной концентрации антигена, визуально детектируемого с помощью фаговых антител методом дот-иммуноанализа, использовали белок HSP/фаговые антитела, полученные после 4-го раунда селекции, и белок HSP в концентрациях (мкг/мл): 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125, 0,015 и 0,0075. В качестве метки использовали антикроличьи антитела, меченые пероксидазой (200 мкл конъюгата на 1 мл фосфатного буферного раствора), при визуальном контроле (около 20 мин).



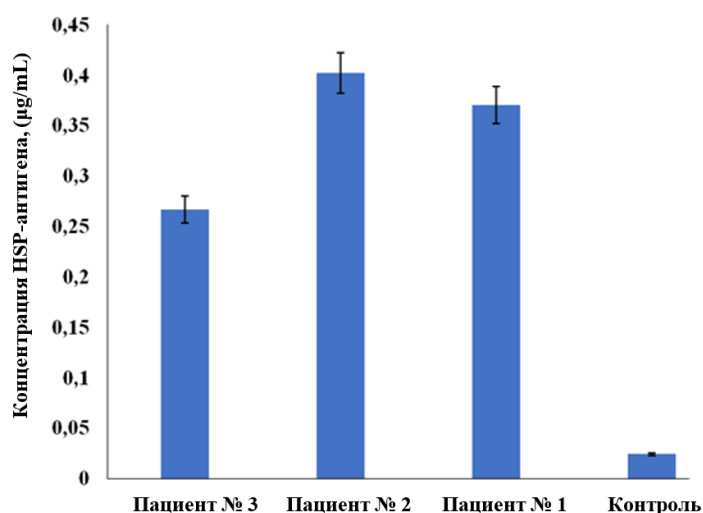
А – контроль (HSP-антиген), Б - пациент №1, В - пациент №2, Г - пациент №3. Цифры на рисунке соответствуют концентрациям HSP-антигена (мкг/мл)

Рисунок 4 – Дот-иммуноанализ фаговых антител, специфичных к HSP, полученных с использованием овечьей фаговой библиотеки после 4-го раунда селекции при детекции HSP-антигена

Из данных, представленных на рисунке 4А видно, что конъюгат связывался с комплексом антиген-антитело, что можно было визуально наблюдать в виде серии пятен.

Важным этапом при развитии метода определения антигена является получение результата в реальных образцах. Поэтому на следующем этапе проводили анализ возможности применения полученных фаговых антител для определения HSP в сыворотке больных животных, у которых был подтвержден онкологический диагноз с помощью стандартного гистологического анализа. Из данных, представленных на рисунке 4 (Б, В, Г) видно, что при анализе HSP-антигена в сыворотке больных животных (пациенты № 1, 2, 3) фаговые антитела связываются с антигеном, при этом минимальные детектируемые концентрации составляют 0,25 мкг/мл (для пациентов № 1 и 3) и 0,015 мкг/мл (для пациента №2). Следовательно, полученные в работе фаговые антитела способны детектировать белок HSP с помощью метода дот-иммуноанализа в сыворотке животных, при этом минимальная определяемая концентрация составляет 0,015 мкг/мл (различимое связывание метки, отличное от фонового уровня).

Для подтверждения полученных данных, проводились исследования по выявлению HSP-антигенов в сыворотке спонтанно заболевших животных с помощью иммуноферментного анализа, результаты которого представлены на рисунке 5.

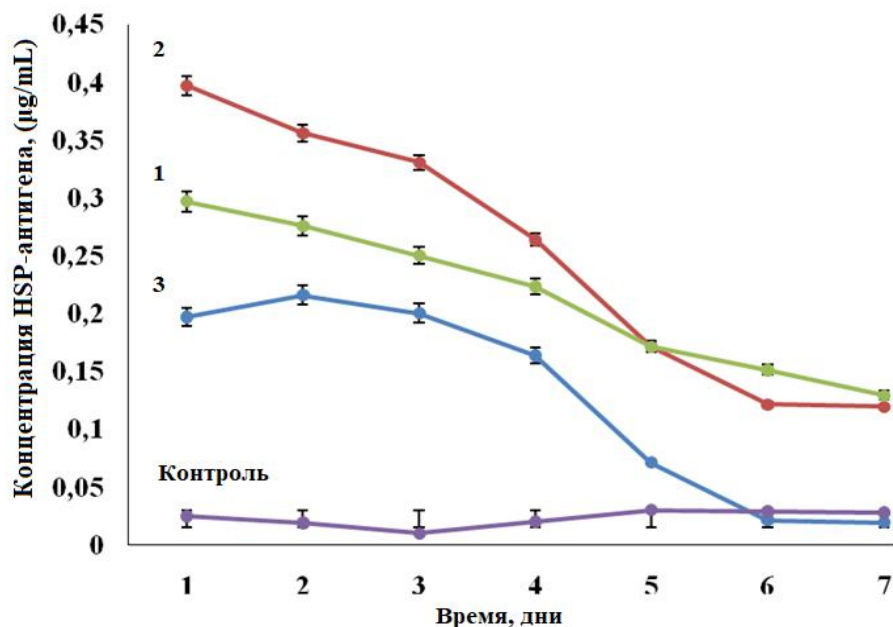


Контроль – здоровое животное $p < 0,05$

Рисунок 5 – Выявление HSP-антигена в сыворотке крови спонтанно зараженных животных при использовании фаговых антител, специфичных к HSP-антигену

Анализируя полученные данные (рисунок 5) важно отметить, что рост HSP-антигена в сыворотке крови у животных с диагнозом аденома молочной железы наблюдался во всех трех случаях. Увеличение уровня HSP у пациентов № 1, № 2 и № 3 составило примерно в 8 раз, по сравнению с контролем.

Поскольку изменение уровня HSP в сыворотке животных является маркером не только для диагностики, но и для прогноза лечения после удаления раковой опухоли, был проведен анализ изменения уровня HSP в сыворотке крови животных, у которых опухоль удалили хирургическим путем. Наблюдение проводилось в течение 7 дней после проведения операции. В качестве контроля использовали кровь от клинически здорового животного. Как видно из данных, представленных на рис. 6, концентрация HSP в сыворотке крови у животных после проведения операции по удалению опухоли, понижался: у пациента № 1 в 1,8 раз, у пациента № 3 в 2,4 раза, у пациента № 2 в 3,2 раза по истечении 7 дней после операции.



Начальная концентрация HSP: пациент № 1 - 0,297, пациент № 2 - 0,397 мкг/мл, пациент № 3 - 0,197 мкг/мл

Рисунок 6 – Динамика изменения уровня HSP в сыворотке крови у спонтанно заболевших животных после хирургического удаления опухолей.

Дополнительно было показано, что полученные фаговые антитела не взаимодействуют с белками, выделенными из клеточных линий МН-22а, HeLa и SPEV и обладают специфичностью только к HSP.

Следовательно, антиHSP фаговые антитела имеют потенциал для применения не только в качестве диагностического маркера рака, но и для неинвазивного контроля лечения.

ВЫВОДЫ

1. Применение технологии неиммунной фаговой библиотеки scFv человека позволило получить антитела, специфичные к белкам теплового шока.
2. Впервые показана возможность использования фаговых антител для определения белков теплового шока в сыворотке животных методами дот-иммуноанализа и иммуноферментного анализа.
3. Установлено, что фаговые антитела, специфичные к белкам теплового шока, не взаимодействуют с другими белками, выделенными из клеточных линий МН-22а, HeLa и SPEV.
4. Определен нижний предел детекции белков теплового шока в сыворотке крови животных, который составил 0,015 мкг/мл.
5. Фаговые антитела, специфичные к белкам теплового шока, имеют потенциал для применения не только в качестве диагностического маркера рака, но и для неинвазивного контроля лечения.

