

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

Кафедра биохимии и биофизики

ИММУНОДИАГНОСТИКА БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4-го курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология
Биологического факультета

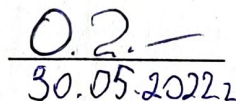
Шардина Виталия Владимировича

Научный руководитель:
канд. биол. наук



М. В. Каневский

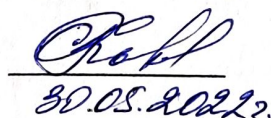
Научный консультант:
вед.н.с ИБФРМ РАН,
докт. биол. наук



30.05.2022

О. И. Гулий

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,
профессор, докт. биол. наук



30.05.2022

С.А. Коннова

Саратов 2022

ВВЕДЕНИЕ

Неуклонный рост численности онкологических заболеваний привлекает внимание ученых всего мира к развитию новых методов их диагностики. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), онкологические заболевания занимают второе место в списке основных причин смерти после заболеваний сердечнососудистой системы. В 2020 г. от злокачественных новообразований умерли 9,8 млн. человек. В то время как понимание биологии опухоли, а также методы клинического вмешательства значительно улучшились, прогресс в развитии диагностических технологий при онкозаболеваниях с упором на раннюю диагностику все еще нуждается в совершенствовании.

Биопсия опухолевой ткани долгое время была золотым стандартом диагностики рака, однако данный вид диагностики имеет ограничения, связанные с инвазивностью ее проведения. Поэтому активно развиваются неинвазивные подходы для диагностики рака. Одно из важных направлений при диагностике рака связано с неинвазивными исследованиями на основе онкомаркеров. Разные виды опухолей выделяют характерные для них вещества, которые определяются в крови при определенных концентрациях. Несмотря на то, что положительный результат при определении онкомаркеров не всегда свидетельствует о наличии злокачественного образования, на основании положительного результата назначается детальное обследование.

Особое внимание заслуживает применение в диагностике белков теплового шока (HSP), выполняющих функцию молекулярных шаперонов. HSP относятся к семейству высоко консервативных внутриклеточных белков, участвующих в укладке белков в ответ на стрессы или высокую температуру.

Аномальные уровни экспрессии и/или субклеточная локализация HSP были обнаружены при различных видах рака. С открытием их иммуномодулирующей противоопухолевой активности все большее

внимание исследователей привлекает возможность использования шаперонов в клинической онкологии.

В литературных источниках появляется все больше доказательств того, что HSP сверхэкспрессированы во многих типах злокачественных опухолей, а повышение уровня HSP усиливается за счет гиперактивации HSF (Heat Shock Factor), что само по себе способствует инвазии и метастазированию опухоли. Таким образом, активированный HSF и повышенный уровень HSP является своеобразными биомаркерами для ранней диагностики опухолей и прогноза при мониторинге лечения у пациентов с распространенными видами рака.

Одной из важных составляющих при разработке диагностических систем для индикации онкологических маркеров является подбор соответствующего биорецептора. В качестве биоселективного агента (элемента распознавания) преимущественно используют антитела, специфичные к определяемому антигену. Существует несколько технологий получения антител. В последнее время в молекулярной биологии стали использоваться генно-инженерные технологии клонирования узнающих фрагментов – гипервариабельных участков иммуноглобулинов (фаговых антител), которые являются относительно дешевыми и могут конкурировать по селективности с гибридными технологиям. К такому методу относится технология фагового дисплея, в основе которой лежит экспонирование чужеродных пептидов или белков на поверхности фаговых частиц в составе одного из химерных белков оболочки. Данный метод не требует использования животных, длительных процедур иммунизации, дорогих сред и культур животных клеток. Фаговые рекомбинантные антитела успешно зарекомендовали себя в качестве биорецепторов в различных биосенсорных системах.

Цель работы - получение антител, специфичных к белкам теплового шока, и изучение возможности их применения в качестве биорецептора для

in vitro онкодиагностики методами дот-иммуноанализа и иммуноферментного анализа.

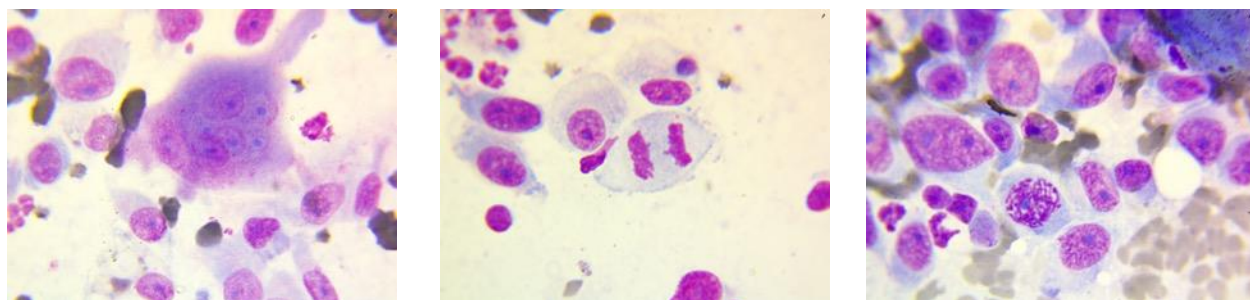
Для достижения цели были поставлены и решались следующие задачи:

- выделение белков теплового шока из опухолевых клеток
- хроматографический анализ белков теплового шока
- отработка технологии получения антител, специфичных к белкам теплового шока, с применением неиммунной фаговой библиотеки scFv человека
- определение белков теплового шока в сыворотке крови больных животных методами дот-иммуноанализа и иммуноферментного анализа с использованием отселектированных рекомбинантных антител

Структура и объем работы. Бакалаврская 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 115 источника на русском, английском и немецком языках. Работа изложена на 57 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 (рис. 1).



А

В

С

Рисунок 1 – Цитологическое исследование опухоли окраска Лейкодыф 200; увеличение 100Х (А – пациент №1, В – пациент №2, С – пациент №3)

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 рис. 2 представлены данные по контролю роста клеток, выделенных из опухоли животных, с помощью фазово-контрастной микроскопии.

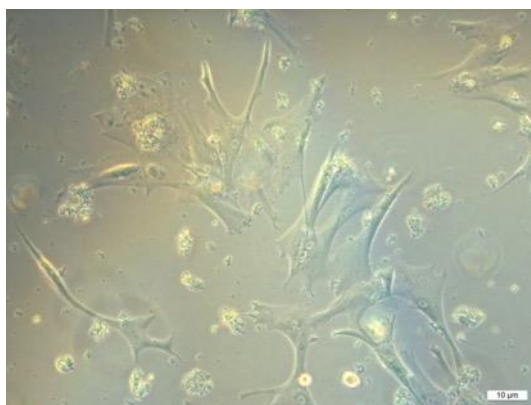


Рисунок 2 – Рост клеток, выделенных из опухоли; фазовый контраст; увеличение 40Х.

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

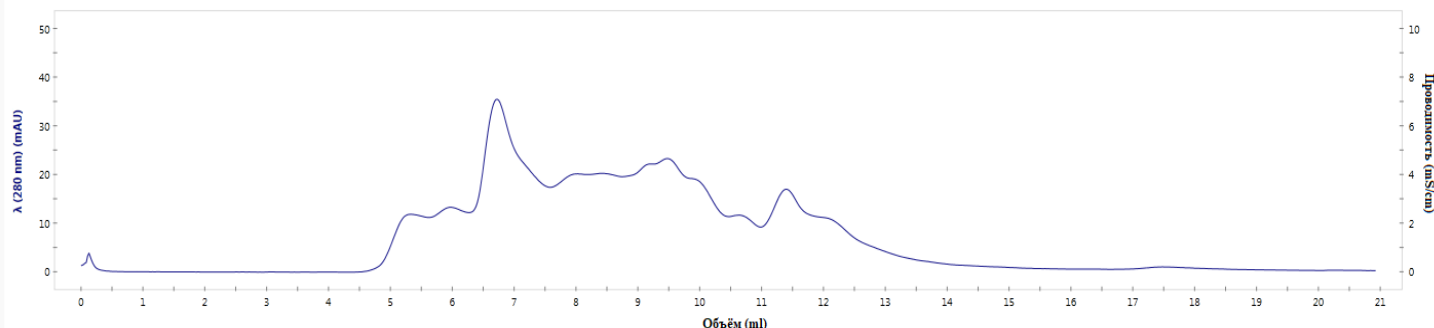


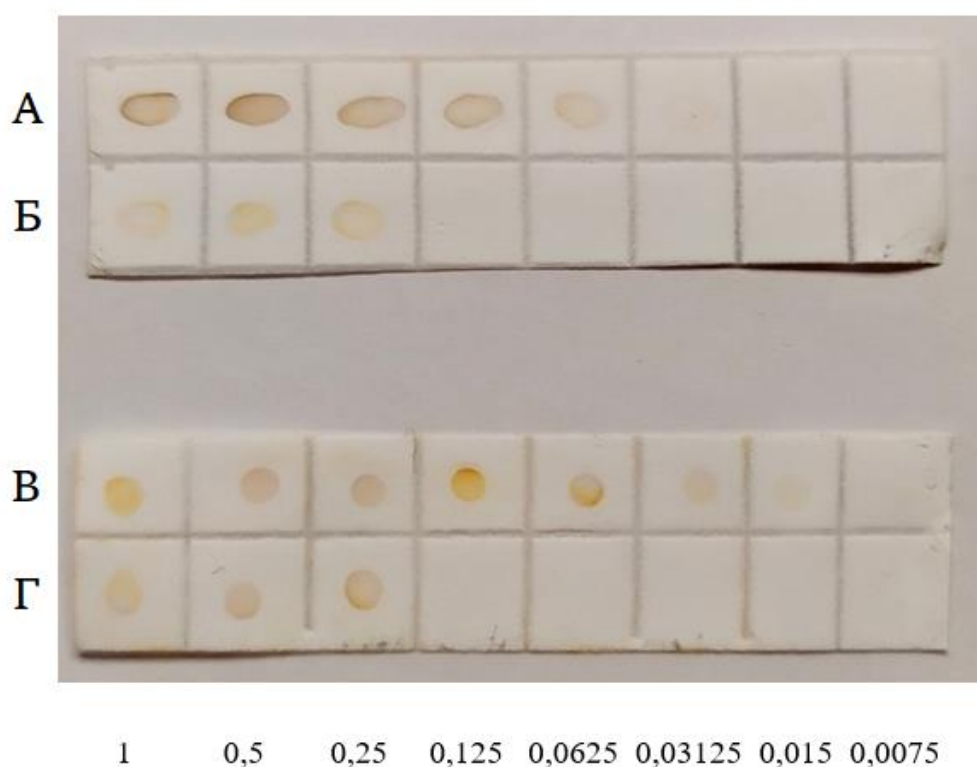
Рисунок 3 – Хроматограмма выделенного HSP-антигена

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).



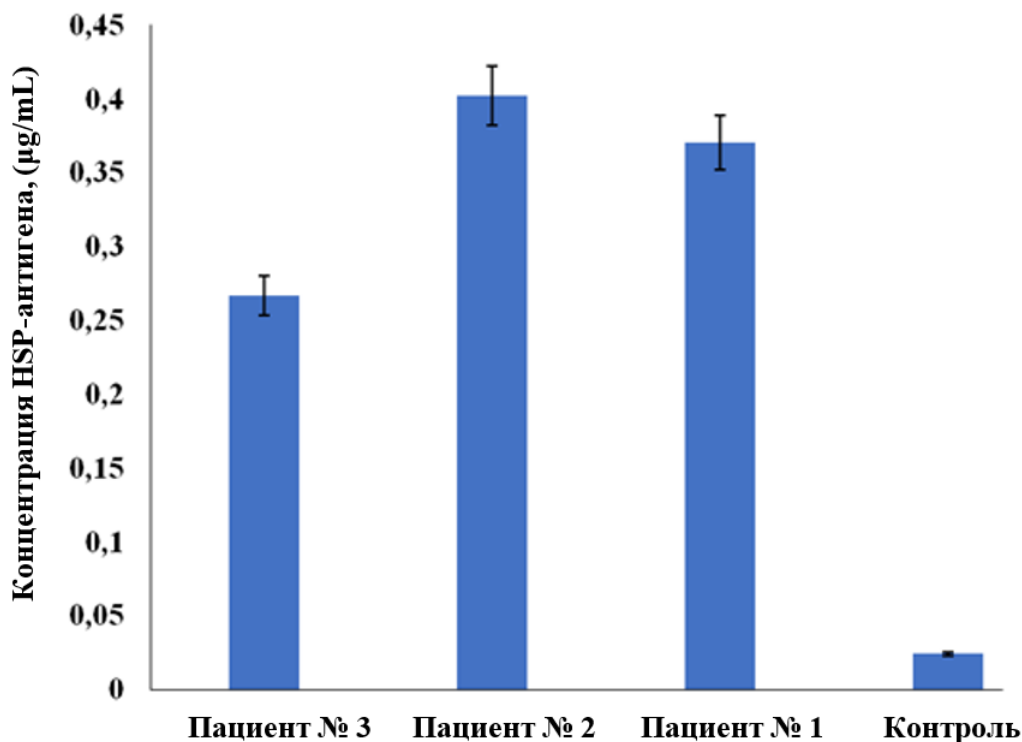
А – контроль (HSP-антиген), Б - пациент №1, В - пациент №2, Г - пациент №3. Цифры на рисунке соответствуют концентрациям HSP-антигена (мкг/мл)

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 рис. 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 рис. 5.



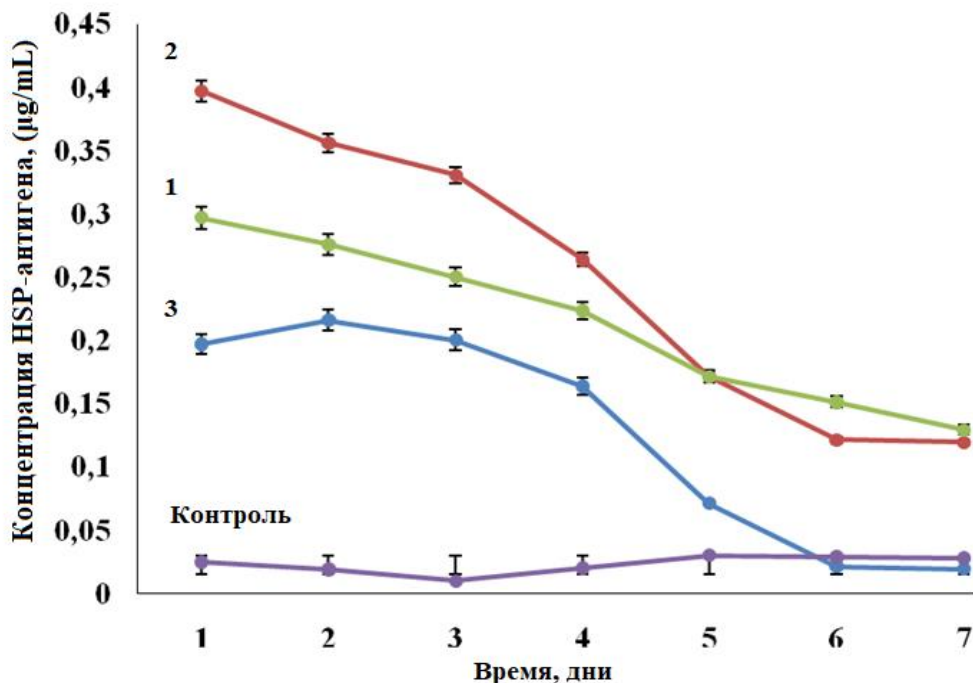
Контроль – здоровое животное $p < 0,05$

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

Анализируя полученные данные (рис. 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 dot-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.

