

УДК 57.083:57.084

ПОЛУЧЕНИЕ ФАГОВЫХ АНТИТЕЛ НА БЕЛКИ ТЕПЛОВОГО ШОКА, ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ У МЫШЕЙ С КСЕНОТРАСПЛАНТИРОВАННЫМИ ОПУХОЛЯМИ

© 2023 г. Л. А. Дыкман¹, С. А. Староверов^{1, 2}, Р. Д. Выршиков¹,
К. К. Фурсова³, Ф. А. Бровко³, Д. А. Солдатов², О. И. Гулий¹. *

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов — обособленное
структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки
ФИЦ “Саратовский научный центр РАН”, Саратов, 410049 Россия

²Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии
и инженерии им. Н.И. Вавилова, Саратов, 410012 Россия

³Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Московская область, 142290 Россия

*e-mail: guliy_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 07.02.2023 г.

После доработки 28.02.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

С использованием “наивной” фаговой библиотеки scFv человека проведена аффинная селекция мини-антител, специфичных к белкам теплового шока, выделенным из клеток гепатомы линии МН22а и плазмоцитомы линии Sp2/0-Ag14 мыши. С помощью полученных фаговых антител методами дот-иммуноанализа и твердофазного иммуноферментного анализа изучена динамика концентрации белков теплового шока в сыворотке крови мышей с имплантированными опухолевыми клетками линии МН22а. Начиная с 14 сут после ксенотрансплантации, наблюдался постепенный рост уровня белков теплового шока в сыворотке крови. Установлено, что после имплантации опухолевых клеток рост опухоли сопровождался достоверным повышением накопления белков теплового шока в сыворотке крови. Показано, что миниантитела, специфичные к белкам теплового шока, являются эффективным инструментом для определения и мониторинга накопления белков теплового шока в сыворотке крови животных.

Ключевые слова: белки теплового шока, фаговая библиотека антител, культуры опухолевых клеток, ксенотрансплантированные опухоли, иммуноанализ

DOI: 10.31857/S0555109923040050, **EDN:** QYSAXC

Белки теплового шока (БТШ) известны, прежде всего, как высококонсервативные шаперонные белки, участвующие в сворачивании, сборке и разборке белковых комплексов [1]. Эти белки являются внутриклеточными и органеллоспецифичными молекулами, но также встречаются в цитозоле, плазматической мембране, внеклеточных везикулах, биологических жидкостях и кровотоке. Изначально они характеризовались как белки, индуцирующиеся в клетках при стрессовом воздействии, особенно при тепловом шоке [2]. БТШ играют важную роль в опухолевых процессах, поскольку участвуют в различных связанных с раком действиях, таких как пролиферация клеток, метастазирование и устойчивость к противоопухолевым препаратам [3]. Внутриклеточные БТШ, особенно Hsp27, Hsp72 и Hsp90, накапливаются

до высоких концентраций при многих типах рака. Предполагается, что БТШ пролиферируют в раковых клетках в ответ на фолдинговые стрессы, возникающие при злокачественной трансформации и опухолевой прогрессии [4, 5]. Функции БТШ связаны с возникновением, прогрессированием и метастазированием рака, а также с резистентностью к терапии рака. Кроме того, изучается потенциальное использование БТШ для усиления эффектов химио-, радио- и иммунотерапии [6, 7]. БТШ имеют множество клинических применений в качестве биомаркеров для диагностики и прогнозирования рака, а также в качестве потенциальных терапевтических мишеней для противоракового лечения [8].

Шаперонная активность БТШ, по сути, опосредует эффективный захват, процессинг и кросс-пре-

зентацию опухолевых пептидных антигенов (Аг) дендритными клетками [9, 10]. Поэтому БТШ играют важную роль в формировании противоопухолевого адаптивного иммунного ответа [11]. Установлено, что белок Hsp70, попадая в межклеточное пространство, вызывает иммунный ответ, снижающий скорость роста опухолей [12]. БТШ стимулируют продукцию хемокинов, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов [13]. Термостабильные белки из семейства БТШ активно используют в качестве адъювантов при разработке противоопухолевых вакцин для целого ряда онкологических заболеваний [14–17]. Некоторые из этих разработок дошли до третьей фазы клинических исследований [18–21]. Показана принципиальная возможность использования БТШ, конъюгированных с наночастицами золота (НЧЗ), для противоопухолевой вакцинации [22].

В литературных источниках появляется все больше доказательств того, что БТШ сверхэкспрессированы во многих типах злокачественных опухолей, что само по себе способствует инвазии и метастазированию [12, 23, 24]. Например, показано, что уровни БТШ повышены при ряде видов рака, а их сверхэкспрессия связана с плохим прогнозом и ответом на терапию [5, 25, 26]. Таким образом, БТШ являются своеобразными маркерами для ранней диагностики опухолей и прогноза при мониторинге лечения у пациентов с распространенными видами рака — онкомаркерами [27–29]. БТШ также могут служить вспомогательными маркерами при необходимости дополнительного подтверждения диагноза на фоне других симптомов и при оценке эффективности противоопухолевой терапии. Оценка уровня БТШ в сыворотке крови онкологических больных становится значимой областью исследований, направленных на разработку средств для практического применения в клинической онкологии. Для диагностики онкомаркеров в биологических жидкостях используют, в частности, различного рода иммунохимические методики, в том числе биосенсоры [30–32].

Одно из существенных направлений при диагностике рака связано с неинвазивными исследованиями на основе онкомаркеров. Важнейшей составляющей при разработке диагностических систем для индикации онкомаркеров является подбор соответствующего биорецептора. В качестве биоселективного агента (элемента распознавания) преимущественно используют антитела (Ат), специфичные к определяемому Аг. Существует несколько технологий получения Ат, в основном, связанных с иммунизацией животных. В последнее время в молекулярной биологии стали использовать генно-инженерные технологии клонирования узнающих фрагментов — гипервариабельных участков иммуноглобулинов G (IgG), которые являются относительно дешевыми и мо-

гут конкурировать по селективности с гибридными технологиями. 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.

Технология фагового дисплея была разработана в середине 80 гг. Она основана на экспрессии чужеродного белка на поверхности нитчатого бактериофага M13 путем вставки гена, кодирующего фрагмент эндонуклеазы рестрикции EcoRI, в единую рамку трансляции с белком минорной оболочки рIII нитчатого бактериофага [33]. В 1990 гг. метод фагового дисплея был использован для экспонирования антигенсвязывающих фрагментов IgG на поверхности бактериофага fd [34]. Метод не требует использования животных, длительных процедур иммунизации, дорогих сред и культур животных клеток. Рекомбинантные фаговые Ат (миниантитела) успешно зарекомендовали себя в качестве биорецепторов в различных биосенсорных системах [35–37], в том числе для детекции БТШ микобактерий, вызывающих туберкулез [38], и клеток карциномы легкого человека A549 *in vitro* [39]. Хотя в настоящее время полная замена моноклональных и поликлональных IgG фрагментами Ат неживотного происхождения маловероятна, фаговые Ат следует рассматривать как ценный дополнительный или даже альтернативный вариант, особенно в тех случаях, когда их адаптируемость является истинным преимуществом. Преимущество фаговых антител заключается в отсутствии необходимости иммунизации животных, что значительно сокращает время получения стабильных клонов, продуцирующих антитела, с нескольких месяцев до нескольких недель. Кроме того, стратегия селекции фаговых антител может быть адаптирована к индивидуальным потребностям исследования не только при онкодиагностике, но и оценке эффективности противораковой терапии [35–39].

Цель исследования — получение фаговых Ат к БТШ, выделенным из клеток опухолевых линий гепатомы и плазмоцитомы, и их использование для иммунодиагностики и анализа динамики накопления БТШ в плазме крови мышей при трансплантации опухоли и в сыворотке крови спонтанно заболевших животных.

МЕТОДИКА

Культивирование клеток. В экспериментах использовали клетки гепатомы линии МН22а и плазмоцитомы линии Sp2/0-Ag14 мыши. Клеточные линии были получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Россия). Нарастивание клеток проводили на среде Игла в модификации Дульбекко (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM; Биолот, РФ) с

добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (“БиоЛог”, РФ), 100 ед./мл пенициллина (“Gibco”, Ирландия), 100 мкг/мл стрептомицина (“Gibco”, Ирландия) и 292 мкг/мл L-глутамина (“Gibco”, Ирландия). Культуры клеток росли в стерильных флаконах для адгезионных клеточных культур до достижения монослоя.

Получение тотальной фракции термостабильных антигенов из клеток линии МН22а. После достижения монослоя проводили выделение клеточных БТШ по методу, описанному в работах [40, 41]. Культуральный флакон с клеточным монослоем прогревали при 42°C в течение 1 ч и затем инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Далее проводили лизирование клеток. Флакон аккуратно промывали 4 раза 10 мл подогретого раствора Хэнкса (“ПанЭко”, РФ). Затем добавляли 15 мл культуральной среды DMEM с 4 mM L-глутамин и 2 mM фенилметилсульфонил фторида (“Sigma-Aldrich”, США). Флакон инкубировали 1 ч при 37°C при покачивании на шейкере. После отмывки во флакон с клеточным монослоем добавляли 10 мл буфера Cytomix (“Bio-Rad”, США) и замораживали флакон при –20°C, затем оттаивали при 37°C. Эту процедуру повторяли 3 раза. Суспензию переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 10000 g 15 мин. Как вариант данного способа использовали снятие клеток с монослоя трипсинизацией, а затем проводили лизис 7×10^6 опухолевых клеток по описанной процедуре. Полученные препараты освещали центрифугированием при 20000 g в течение 20 мин, определяли концентрацию белка в лизате по методу Брэдфорд и замораживали при –70°C. Как показано ранее [22] лизат нагретых клеток содержал все основные семейства БТШ.

Далее лизат клеток осаждали сульфатом аммония при 40% насыщения с последующим центрифугированием при 20000 g в течение 20 мин и 4°C. Полученный супернатант осаждали сульфатом аммония при конечном насыщении 80%, затем также центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин и 4°C. Осадок, полученный после второго центрифугирования, растворяли в 4 мл дистиллированной воды и диализовали против 0.2 М фосфатно-солевой буфера (ФСБ), pH 7.2, при 4°C в течение 48 ч с частой сменой буфера. Полученные после этого экстракты использовали для дальнейшей хроматографической очистки.

Хроматографическая очистка антигенов. Очистку Ag проводили методом ионообменной хроматографии на колонке Toyopearl DEAE-650 (“Sigma-Aldrich”, США), образцы анализировали на хроматографе NGC Quest 10 (“Bio-Rad”, США). Носитель уравнивали 0.05 М Трис-HCl, pH 7.5. Диализованный образец (100 мкл), содержащий 240 мкг белка, наносили на колонку. Элюцию белков проводили, используя ступенчатый градиент

от 0 до 0.5 М NaCl и собирали фракции содержащие БТШ. Значения оптической плотности элюатов контролировали при 280 нм с помощью спектрофотометрического детектора Spectronic-21 (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Аффинная селекция Ат из фаговой библиотеки. Ат, специфичные к БТШ, получали с использованием неиммунной фаговой библиотеки однопочечных вариабельных фрагментов (scFv) человека (разнообразие 10^9 независимых клонов) [42]. В работе использовали процедуру селекции Ат, адаптированную под данную комбинаторную фаговую библиотеку и описанную в статье [43]. БТШ, выделенные из опухолевых клеток, иммобилизовали на мембране из поливинилиденфторида (PVDF), обработанной метанолом, в течение ночи при 4°C. Затем мембрану блокировали 2%-ным сухим молоком в ФСБ в течение 1 ч на шейкере при комнатной температуре, трижды промывали в ФСБ и использовали для селекции Ат. Мембрану с иммобилизованным Ag инкубировали с 10^{11} фаговых частиц в объеме 200 мкл библиотеки на шейкере при комнатной температуре в течение 1 ч. Неспецифически сорбировавшиеся фаговые частицы отмывали 15 раз в ФСБ. Оставшиеся фаги элюировали 0.1 М глицин-HCl буфером pH 2.5 (500 мкл) на шейкере при комнатной температуре. Элюат фагов собирали и нейтрализовали 500 мкл 1 М Трис-HCl, pH 9.5.

Компетентную культуру *Escherichia coli* TG1 получали, выращивая клетки до логарифмической фазы роста при 37°C без встряхивания для образования F-пилей. Нейтрализованный элюат (1 мл) использовали для заражения *E. coli* TG1. После 30 мин инкубации культуры при 37°C без встряхивания инфицированные клетки осаждали центрифугированием при 2000 g 10 мин и пересевали на среду 2xYT (“BD Difco”, США) со 100 мкг/мл ампициллина (“Gibco”, Ирландия) и 1% глюкозы. Посев инкубировали на шейкере при 37°C в течение ночи. 1 мл культуры пересевали на 10 мл свежей 2xYT со 100 мкг/мл ампициллина и 1% глюкозы и инкубировали на шейкере при 37°C до достижения оптической плотности 0.4–0.6 при 600 нм (~3 ч). Затем клетки инкубировали 30 мин при 37°C без встряхивания и добавляли 10^{11} частиц желперного фага M13KO7. После 30 мин инкубации при 37°C без встряхивания инфицированные клетки осаждали центрифугированием при 2000 g 10 мин и пересевали на среду 2xYT со 100 мкг/мл ампициллина, 50 мкг/мл канамицина (“Gibco”, Ирландия) и 100 мкг/мл изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (“Thermo Fisher Scientific”, США). Посев инкубировали на шейкере при 30°C в течение ночи. После чего клетки осаждали центрифугированием при 2000 g 20 мин, супернатант дополнительно освещали от дебриса центрифугированием при 10000 g 20 мин.

К супернатанту добавляли 1/5 объема раствора ПЭГ/NaCl, инкубировали при 0°C до образования видимого преципитата, который затем осаждали центрифугированием при 4000 g 1 ч. Осадок ресуспендировали в 1 мл ФСБ, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч до полного растворения и осветляли центрифугированием при 12000 g в течение 10 мин. Супернатант, содержащий фаговые частицы, диализовали против ФСБ через диализную мембрану с пределом исключения 14–16 кДа при 4°C в течение суток 4-кратно меняя буфер. К диализату добавляли глицерин до конечной концентрации 50% и хранили при температуре –20°C до использования в следующем раунде селекции. По описанной выше схеме было проведено три последовательных раунда селекции.

Синтез наночастиц золота и получение конъюгатов с биоспецифическими зондами. Золотые наносферы диаметром 15 нм получали по методу Френса [44], используя реакцию восстановления HAuCl_4 цитратом натрия. Восстановление проводили при нагревании 242.5 мл 0.01%-ного водного раствора HAuCl_4 (“Sigma-Aldrich”, США) в колбе Эрленмейера на магнитной мешалке с обратным водяным холодильником. После закипания добавляли 7.5 мл 1%-ного водного раствора цитрата натрия (“Fluka”, Швейцария). Диаметр синтезированных НЧЗ был определен методами спектрофотометрии, трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) и динамического рассеяния света (ДРС).

Перед конъюгацией 15-нм НЧЗ со стафилококковым белком А (“Sigma-Aldrich”, США) или с козьими Ат к IgG кролика (“Sigma-Aldrich”, США) определяли “золотое число” — минимальное количество белка, защищающее определенный объем золя от солевой агрегации [45]. Для этого в 96-луночном микротитровальном планшете двукратно по 20 мкл титровали водный раствор белка с начальной концентрацией 1 мг/мл. В каждую лунку добавляли по 200 мкл 15-нм НЧЗ ($A_{520} = 1.0$) и по 20 мкл 1.7 М NaCl и определяли минимальную стабилизирующую концентрацию. При получении конъюгата НЧЗ со стафилококковым белком А “золотое число” составило 6 мг/мл, с козьими Ат к IgG кролика — 12 мг/мл. Конъюгацию проводили простым смешением реагентов без использования сшивающих агентов, используя концентрацию белка на 20% превышающую “золотое число”.

Дот-блот иммуноанализ. Дот-иммуноанализ проводили по следующей методике [45]: в качестве образцов на PVDF мембрану, обработанную метанолом, или нитроцеллюлозную мембрану в виде серии точек наносили по 1 мкл двойных разведений хроматографически очищенного Аг либо полученной от животных сыворотки и инкубировали в течение ночи при 4°C для фиксации Аг. За-

тем проводили блокирование мембраны с нанесенным на нее Аг в течение 1 ч 2%-ным сухим молоком, разведенным в 10 мМ ФСБ, pH 7.2. Затем мембрану инкубировали на шейкере при комнатной температуре в течение 1 ч в растворе фаговых Ат с концентрацией 10^{12} фагов/мл. После трехкратной промывки в ФСБ мембрану инкубировали на шейкере в 2 мл ФСБ с 50 мкл раствора кроличьих антифаговых Ат. При наличии биоспецифического взаимодействия Ат связывались с Аг, адсорбированным на мембране. Далее мембрану трижды отмывали в ФСБ от неспецифически связанных Ат и погружали в раствор конъюгата НЧЗ ($A_{520} = 1$) со стафилококковым белком А в случае БТШ, либо с козьими Ат к IgG кролика в случае сывороток. Связывание конъюгата с комплексом Аг-Ат можно было визуально наблюдать в виде серии красных пятен. Аналогично проводили дот-иммуноанализ с использованием в качестве маркера моноклональных Ат к IgG кролика, меченных пероксидазой хрена (“Jackson ImmunoResearch”, Великобритания).

После электрофореза хроматографически очищенного Аг в ПААГ с ДДС по Лэммли образцы переносили полусухим способом на PVDF мембрану и инкубировали в течение 1 ч в блокирующем ФСБ, содержащем 0.1%-ный Твин 20 и 5% обезжиренного сухого молока. Затем мембрану инкубировали в течение 1 ч в полученных фаговых Ат с концентрацией 10^{12} фагов/мл. После трехкратной отмывки мембрану погружали в раствор кроличьих антифаговых Ат. Затем мембрану трижды отмывали в ФСБ от неспецифически связанных Ат и погружали в раствор конъюгата НЧЗ ($A_{520} = 1$) со стафилококковым белком А.

Иммуноферментный анализ. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) проводили по общепринятой схеме [46]. В лунку планшета адсорбировали полученную от животных сыворотку (в качестве отрицательного контроля использовали сыворотку от здорового животного), разведенную 1 : 20 0.05 М карбонат-бикарбонатным буфером, pH 9.6, в серии двойных разведений и инкубировали в течение ночи при 4°C. Затем лунки промывали трехкратно ФСБ и блокировали свободные сайты связывания 200 мкл 2% сухого молока в 0.05 М карбонат-бикарбонатным буфере 1 ч на шейкере при 37°C. После чего в каждую лунку вносили разведенные в 100 раз миниантитела к БТШ и инкубировали в течение 1 ч на шейкере при 37°C. Затем после трехкратной отмывки добавляли в лунки по 100 мкл кроличьих антифаговых Ат, разведенных 1 : 500 в 10 мМ ФСБ (pH 7.4) и инкубировали в течение 1 ч на термошейкере при 37°C. После этого проводили трехкратную отмывку и добавляли в лунки по 100 мкл козьих Ат к IgG кролика, меченных пероксидазой хрена (“Sigma-Aldrich”, США), разведенных 1 : 500 в 10 мМ ФСБ

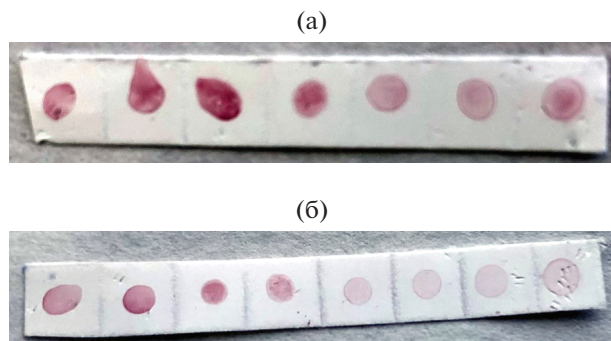


Рис. 1. Дот-иммуноанализ Аг, выделенных из клеток линии MN22a (а) и линии Sp2/0-Ag14 (б) с использованием миниантител, полученных из неиммунной фаговой библиотеки scFv человека после третьего раунда селекции. Вторичные Ат — кроличьи антифаговые IgG. Мечение — конъюгат НЧЗ со стафилококковым белком А. (Двойные разведения, начальная концентрация 1 мг/мл).

(рН 7.4) и инкубировали в течение 1 ч на термощейкере при 37°C. Затем трижды отмывали карбонат-бикарбонатным буфером. В качестве субстрата пероксидазы использовали 100 мкл 0.006%-ного ортофенилендиамина (“Flucka”, Швейцария) в 0.1 М цитратном буфере, рН 6.0, содержащем 0.01% пероксида водорода. Инкубацию с субстратом проводили в темноте. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 0.1 М серной кислоты. Результаты реакции регистрировали на микропланшетном спектрофотометре Multiskan Accent+ (“Thermo Fisher Scientific”, США) при длине волны 490 нм.

Имплантация животным опухолевых клеток. В исследовании были использованы белые мыши линии BALB/c (18–20 г). Мыши были приобретены в Отделе экспериментальных животных с vivarium Российского научно-исследовательского противочумного института “Микроб” (Россия). Животным подкожно трансплантировали опухолевые клетки MN22a. Их вводили в холку в дозе 1×10^9 кл./мышь ($n = 4$). Первые признаки опухолей появились через 14 дней после заражения; на 37 сут опухоли были наиболее отчетливо выражены. В процессе наблюдения проводили забор крови на наличие БТШ в сыворотке.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика синтезированных НЧЗ. Диаметр синтезированных НЧЗ был определен методами спектрофотометрии, ТЭМ и ДРС. Максимум спектра поглощения полученного золя составил $\lambda_{\max} = 518.7$ нм, при этом оптическая плотность была $A_{520} = 1.15$. По данным ТЭМ и ДРС, средний диаметр полученных наночастиц составил 15.4 нм. Число частиц в 1 мл при $A_{520} = 1$ составляло 1.6×10^{12} .

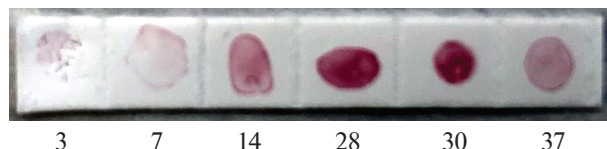


Рис. 2. Динамика накопления БТШ в сыворотке крови мышей после имплантации опухоли (с 3 по 37 сут), определенная методом дот-иммуноанализа с использованием миниантител, полученных из неиммунной фаговой библиотеки scFv человека после третьего раунда селекции. Вторичные Ат — кроличьи антифаговые IgG. Мечение — конъюгат НЧЗ с козьими Ат к IgG кролика.

Проверка активности миниантител к БТШ. Для получения фаговых Ат к БТШ, выделенным из клеток опухолевых линий гепатомы и плазмоцитомы, проводили три раунда селекции. Активность полученных после трех раундов селекции миниантител проверяли методом дот-иммуноанализа, с использованием в качестве анализата хроматографически очищенного термостабильного Аг (начальная концентрация 1 мг/мл), а в качестве маркера — конъюгата НЧЗ со стафилококковым белком А (рис. 1). Минимальное количество Аг, обнаруживаемое предложенным способом анализа, составило ~15 пг (седьмое разведение). Оценку специфичности полученных фаговых Ат осуществляли с использованием Вестерн-блота. Фаговые Ат специфически распознавали пептиды в области 45–66 кДа.

Анализ накопления БТШ в сыворотке крови мышей с ксенотрансплантированными опухолями. С использованием полученных фаговых Ат методом дот-иммуноанализа была качественно изучена динамика концентрации БТШ в сыворотке крови мышей с имплантированными опухолевыми клетками линии MN22a (рис. 2). С 14 дня после трансплантации визуально наблюдалось усиление окрашивания комплексов Аг-Ат, выявляемое с применением конъюгата НЧЗ с козьими Ат к IgG кролика, что свидетельствовало о нарастании концентрации БТШ в сыворотке крови.

С помощью полученных фаговых Ат методом твердофазного ИФА была количественно изучена динамика концентрации БТШ в сыворотке крови мышей с имплантированными опухолевыми клетками линии MN22a. После имплантирования опухолевых клеток мышам наблюдали рост опухоли, начиная с 14 дня после трансплантации. В этот период отмечалось повышение уровня БТШ в сыворотке крови мышей, их концентрация составила 0.15 ± 0.05 мкг/мл. В дальнейшем наблюдался постепенный рост концентрации БТШ в сыворотке крови и на 37 сут (когда опухоль была наиболее выражена) уровень БТШ в сыворотке составил 0.35 ± 0.1 мкг/мл (рис. 3). Приведенные в работе результаты, полученные с помощью фа-

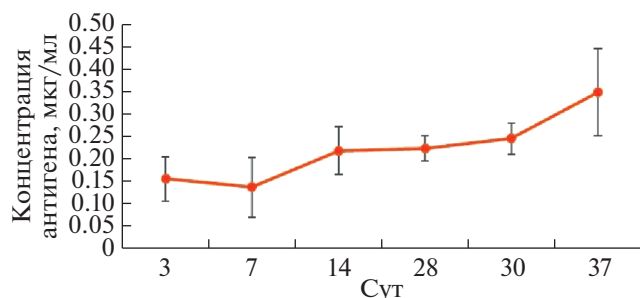


Рис. 3. Динамика изменения концентрации БТШ в сыворотке крови мышей после имплантации опухоли, определенная методом твердофазного ИФА с использованием миниантител, полученных из неиммунной фаговой библиотеки scFv человека после третьего раунда селекции. Вторичные Ат — кроличьи антифаговые IgG. Выявление — козы Ат к IgG кролика, меченные пероксидазой хрена.

говых Ат, соответствуют показателям уровня БТШ (в норме и при опухолевом процессе), определенного методом твердофазного ИФА с использованием моноклональных Ат [47].

Поскольку изменение уровня БТШ в сыворотке животных является маркером не только для диагностики, но и для прогноза лечения опухоли, был проведен анализ изменения уровня БТШ в сыворотке крови спонтанно заболевших животных. Известно, что иммунохимическая детекция БТШ с использованием антител зависит не от видов лабораторных животных, а от наличия БТШ в опухолях и сыворотках крови [48, 49]. В экспериментах использовали трех стерилизованных кошек возрастом 9 (K1; фибросаркома), 12 (K2; аденома молочной железы) и 13 (K3; аденокарцинома молочной железы) лет с подтвержденными онкологическими диагнозами. Кроме клинических признаков диагноза были подтверждены цитологическими и гистопатологическими исследованиями. С использованием дот-иммуноанализа установлено, что полученные фаговые Ат способны выявлять как выделенный и очищенный Аг (начальная концентрация 1 мг/мл), так и Аг, присутствующий в сыворотке крови спонтанно заболевших животных (рис. 4). Полученные миниантитела выявляли как выделенный из опухолевых клеток Аг (минимально выявляемое количество ~15 нг), так и детектировали Аг в сыворотках крови спонтанно заболевших животных.

Таким образом, показано, что фаговые Ат имеют большой потенциал для эффективного мониторинга накопления БТШ в сыворотке крови животных с имплантированными опухолями как качественно — с использованием дот-иммуноанализа, так и количественно — с применением твердофазного ИФА.

Следует отметить, что фаговые Ат имели ряд преимуществ перед другими типами Ат, в том числе:



Рис. 4. Дот-иммуноанализ БТШ, выделенного из клеток линии МН22а (а; двойные разведения, начальная концентрация 1 мг/мл), и в сыворотке крови спонтанно заболевших животных (б) с использованием миниантител, полученных из неиммунной фаговой библиотеки scFv человека после третьего раунда селекции. Вторичные Ат — кроличьи антифаговые IgG. Выявление — моноклональные Ат к IgG кролика, меченные пероксидазой хрена. Пояснения к обозначениям приведены в тексте.

- отсутствие необходимости использования лабораторных животных и длительного поддержания культур клеток эукариот;

- время получения индивидуальных клонов-продуцентов миниантител составляло 10–14 дней, по сравнению с несколькими месяцами в случае гибридомной технологии или процедуры иммунизации животных;

- относительная простота получения Ат и их низкая себестоимость.

В дальнейшем фаговые Ат к опухолевым Аг могут быть использованы для мониторинга иммунного ответа как у животных с ксенотрансплантированными опухолями, так и у спонтанно заболевших животных. Полученные результаты могут послужить основой для создания диагностических тест-систем, в том числе, биосенсорных, для мониторинга роста опухолей ненаружной локализации, когда болезнь поначалу протекает без внешних проявлений, а также для прогнозирования эффективности процессов лечения и вакцинации. Полученные в работе фаговые Ат, специфичные к БТШ, являются перспективными для применения в качестве распознающего элемента биосенсоров при диагностике опухолей. Большинство сенсорных систем для индикации онкологических заболеваний ориентированы на применение в качестве сенсорного элемента Ат [31] и фаговых Ат [50], аптамеров [51], амплификации микроРНК на основе дуплекс-специфической нуклеазы [52], а также мониторинга активных форм кислорода [53, 54]. Представленное исследование отличается от уже описанных методов тем, что ориентировано на использование фаговых Ат в качестве эффективного инструмента для мониторинга накопления БТШ. В дальнейшем полученные фаговые Ат могут быть использованы в качестве распознающего элемента сенсорных систем при определении БТШ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного Фонда проект № 19-14-00077.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание лабораторных животных и обращение с ними осуществлялись в соответствии с требованиями “Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных” Минздрава РФ, положениями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” и законодательством Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Schlesinger M.J.* // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. № 21. P. 12111–12114.
2. *Richter K., Haslbeck M., Buchner J.* // Mol. Cell. 2010. V. 40. P. 253–266.
3. *Albakova Z., Siam M.K.S., Sacitharan P.K., Ziganshin R.H., Ryazantsev D.Y., Sapozhnikov A.M.* // Transl. Oncol. 2021. V. 14. № 2. 100995.
<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100995>
4. *Arrigo A.P., Gibert B.* // Cancers. 2014. V. 6. P. 333–365.
5. *Calderwood S.K., Gong J.* // Trends Biochem. Sci. 2016. V. 41. P. 311–323.
6. *Das J.K., Xiong X., Ren X., Yang J.-M., Song J.* // J. Oncol. 2019. V. 2019. 3267207.
<https://doi.org/10.1155/2019/3267207>
7. *Hu C., Yang J., Qi Z., Wu H., Wang B., Zou F., Mei H., Liu J., Wang W., Liu Q.* // MedComm. 2022. V. 3. № 3. e161.
<https://doi.org/10.1002/mco2.161>
8. *Staroverov S.A., Kozlov S.V., Brovko F.A., Fursova K.K., Shardin V.V., Fomin A.S. et al.* // Biosens. Bioelectron. X. 2022. V. 11. 100211.
<https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100211>
9. *Murshid A., Gong J., Stevenson M.A., Calderwood S.K.* // Expert Rev. Vaccines. 2011. V. 10. № 11. P. 1553–1568.
10. *Троицкая О.С., Новак Д.Д., Рухтер В.А., Коваль О.А.* // Acta Naturae. 2022. T. 14. № 1. C. 40–53.
11. *Shevtsov M., Multhoff G.* // Front. Immunol. 2016. V. 7. P. 171.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00171>
12. *Komarova E.Y., Suezov R.V., Nikotina A.D., Aksenov N.D., Garaeva L.A., Shtam T.A. et al.* // Sci. Rep. 2021. V. 11. 21314.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-00734-4>
13. *Tsan M.F., Gao B.* // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2004. V. 286. № 4. P. C739–C744.
14. *Maki R.G., Livingston P.O., Lewis J.J., Janetzki S., Klimstra D., Desantis D., Srivastava P.K., Brennan M.F.* // Dig. Dis. Sci. 2007. V. 52. № 8. P. 1964–1972.
15. *Bolhassani A., Rafati S.* // Expert Rev. Vaccines. 2008. V. 7. № 8. P. 1185–1199.
16. *Kang J., Lee H.-J., Lee J., Hong J., Kim Y.H., Disis M.L., Gim J.-A., Park K.H.* // J. Immunother. Cancer. 2022. V. 10. e004702.
<https://doi.org/10.1136/jitc-2022-004702>
17. *Alberti G., Vergilio G., Paladino L., Barone R., Cappello F., de Macario E.C. et al.* // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. 7792.
<https://doi.org/10.3390/ijms23147792>
18. *Testori A., Richards J., Whitman E., Mann G.B., Lutzky J., Camacho L. et al.* // J. Clin. Oncol. 2008. V. 26. № 6. P. 955–962.
19. *Lin M.J., Svensson-Arvelund J., Lubitz G.S., Marabelle A., Melero I., Brown B.D., Brody J.D.* // Nat. Cancer. 2022. V. 3. P. 911–926.
20. *Fritah H., Rovelli R., Chiang C.L.-L., Kandalafi L.E.* // Cancer Treat. Rev. 2022. V. 106. 102383.
<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2022.102383>
21. *Liu J., Fu M., Wang M., Wan D., Wie Y., Wei X.* // J. Hematol. Oncol. 2022. V. 15. P. 28.
<https://doi.org/10.1186/s13045-022-01247-x>
22. *Dykman L.A., Staroverov S.A., Kozlov S.V., Fomin A.S., Chumakov D.S., Gabalov K.P. et al.* // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 22. 14313.
<https://doi.org/10.3390/ijms232214313>
23. *Jolly C., Morimoto R.I.* // J. Natl. Cancer Inst. 2000. V. 92. № 19. P. 1564–1572.
24. *Yun C.W., Kim H.J., Lim J.H., Lee S.H.* // Cells. 2020. V. 9. № 1. P. 60.
<https://doi.org/10.3390/cells9010060>
25. *Cornford P.A., Dodson A.R., Parsons K.F., Desmond A.D., Woolfenden A., Fordham M., Neoptolemos J.P., Ke Y.* // Cancer Res. 2000. V. 60. № 24. P. 7099–7105.
26. *Saini J., Sharma P.K.* // Curr. Drug Targets. 2017. V. 19. № 13. P. 1478–1490.
27. *Ciocca D.R., Calderwood S.K.* // Cell Stress Chaperon. 2005. V. 10. № 2. P. 86–103.
28. *Seigneuric R., Mjahed H., Gobbo J., Joly A.-L., Berthenet K., Shirley S., Garrido C.* // Front. Oncol. 2011. V. 1. P. 37.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2011.00037>
29. *Ramirez-Valles E.G., Rodríguez-Pulido A., Barraza-Salas M., Martínez-Velis I., Meneses-Morales I., Ayala-García V.M., Alba-Fierro C.A.* // Technol. Cancer Res. Treat. 2020. V. 19. 1533033820957033.
<https://doi.org/10.1177/1533033820957033>
30. *Mahato K., Maurya P.K., Chandra P.* // 3 Biotech. 2018. V. 8. P. 149.
<https://doi.org/10.1007/s13205-018-1148-8>
31. *Cavallaro S., Horak J., Hååg P., Gupta D., Stiller C., Sahu S.S., Görgens A. et al.* // ACS Sens. 2019. V. 4. № 5. P. 1399–1408.
32. *Baghbaderani S.S., Mokarian P., Moazzam P.* // Curr. Anal. Chem. 2022. V. 18. № 1. P. 63–78.
33. *Smith G.P.* // Science. 1985. V. 228. № 4705. P. 1315–1317.
34. *McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G., Chiswell D.J.* // Nature. 1990. V. 348. № 6301. P. 552–554.
35. *Zhao F., Shi R., Liu R., Tian Y., Yang Z.* // Food Chem. 2021. V. 339. 128084.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128084>
36. *Ye J., Guo J., Li T., Tian J., Yu M., Wang X. et al.* // Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2022. V. 21. № 2. P. 1843–1867.
37. *Guliy O.I., Evstigneeva S.S., Dykman L.A.* // Biosens. Bioelectron. 2023. V. 222. 114909.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114909>
38. *Trilling A.K., De Ronde H., Noteboom L., Van Houwelingen A., Roelse M., Srivastava S.K. et al.* // PLoS One.

2011. V. 6. № 10. e26754.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026754>
39. Vostakolaei M.A., Molavi O., Hejazi M.S., Kordi S., Rahmati S., Barzegari A., Abdolalizadeh J. // *J. Cell. Biochem.* 2019. V. 120. № 9. P. 14711–14724.
 40. Skarga Y., Vrublevskaya V., Evdokimovskaya Y., Morenkov O. // *Biomed. Chromatogr.* 2009. V. 23. № 11. P. 1208–1216.
 41. Aguilera R., Saffie C., Tittarelli A., Gonzalez F.E., Ramirez M., Reyes D. et al. // *Clin. Cancer Res.* 2011. V. 17. № 8. P. 2474–2483.
 42. Улитин А.Б., Капралова М.В., Ламан А.Г., Шепеляковская А.О., Булгакова Е.В., Фурсова К.К. и др. // Доклады Академии наук. 2005. Т. 405. № 4. С. 555–558.
 43. Staroverov S.A., Kozlov S.V., Fomin A.S., Gabalov K.P., Khanadeev V.A., Soldatov D.A. et al. // *ADMET & DMPK.* 2021. V. 9. № 4. P. 255–266.
 44. Frens G. // *Nature Phys. Sci.* 1973. V. 241. P. 20–22.
 45. Дыкман Л.А., Богатырев В.А. // *Биохимия.* 1997. Т. 62. № 4. С. 411–418.
 46. Shah K., Maghsoudlou P. // *Br. J. Hosp. Med.* 2016. V. 77. № 7. P. C98–C101.
 47. Gunther S., Ostheimer C., Stang S., Specht H.M., Mozes P., Jesinghaus M. et al // *Front. Immunol.* 2015. V. 6. P. 556.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00556>
 48. Romanucci M., Bastow T., Della Salda L. // *Cell Stress Chaperon.* 2008. V. 13. № 3. P. 253–262.
 49. Ramkaran, Preeti, Kumar R., Kumar S., Gera S. // *Pharma Innov. J.* 2019. V. 8. № 2. P. 431–434.
 50. Petrenko V.A., Gillespie J.W., Xu H., O'Dell T., De Plano L.M. // *Viruses.* 2019. V. 11. 785.
<https://doi.org/10.3390/v11090785>
 51. Yu Q., Zhao Q., Wang S., Zhao S., Zhang S., Yin Y., Dong Y. // *Anal. Biochem.* 2020. V. 594. 113591.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113591>
 52. Djebbi K., Xing J., Weng T., Bahri M., Elaguech M.A., Du C. et al // *Anal. Chim. Acta.* 2022. V. 1208. 339778.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339778>
 53. Li Y., Hu K., Yu Y., Rotenberg S.A., Amatore C., Mirkin M.V. // *J. Am. Chem. Soc.* 2017. V. 139. № 37. P. 13055–13062.
 54. Vaneev A.N., Gorelkin P.V., Garanina A.S., Lopatukhina H.V., Vodopyanov S.S., Alova A.V. et al. // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. P. 8010–8014.

Preparation of Phage Antibodies to Heat Shock Proteins and Studying the Dynamics of their Accumulation in Mice with Xenotransplant Tumors

L. A. Dykman^a, S. A. Staroverov^{a, b}, R. D. Vyrshchikov^a, K. K. Fursova^c,
 F. A. Brovko^c, D. A. Soldatov^b, and O. I. Guliy^{a, *}

^a*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms – Research Institution
 Saratov Federal Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia*

^b*Saratov State Vavilov Agrarian University, Saratov, 410012 Russia*

^c*The Branch of the Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic
 Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia*

*e-mail: guliy_olga@mail.ru

Using a naïve human scFv phage library, affinity selection of miniantibodies specific to heat shock proteins isolated from MH22a hepatoma cells and Sp2/0-Ag14 plasmacytoma cells was carried out. Using the obtained phage antibodies by dot-immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay, the dynamics of the concentration of heat shock proteins in the blood serum of mice with implanted tumor cells of the MH22a line was studied. Starting from the 14th day after xenotransplantation, there was a gradual increase in the level of heat shock proteins in the blood serum. It was found that after implantation of tumor cells, tumor growth was accompanied by a significant increase in the accumulation of heat shock proteins in the blood serum. It has been shown that miniantibodies specific to heat shock proteins are an effective tool for determining and monitoring the accumulation of heat shock proteins in the blood serum of animals.

Keywords: heat shock proteins, antibody phage library, tumor cell cultures, xenotransplanted tumors, immunoassay