

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ГЕНЕТИКИ,
БИОТЕХНОЛОГИИ И ИНЖЕНЕРИИ ИМЕНИ Н.И. ВАВИЛОВА»

На правах рукописи

СОЛДАТОВ ДМИТРИЙ АЛЕКСЕЕВИЧ

**Белки теплового шока в диагностике и профилактике онкологических
заболеваний**

4.2.1 Патология животных, морфология, физиология, фармакология и
токсикология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
Староверов Сергей Александрович

Саратов 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. ВВЕДЕНИЕ	3
II. ОБЗОР ЛИТЕАТУРЫ	12
2.1. Белки теплового шока (HSP)	9
2.1.2. Основные функции шаперонов в организме человека	13
2.1.3. Пептидсвязывающая функция HSP	16
2.1.4. Роль шаперонов в поддержании внутриклеточного гомеостаза	18
2.1.5. HSP как биомаркеры онкологических заболеваний	21
2.2. Новообразования молочной железы у животных	23
2.3. Коллоидное золото и его свойства	29
2.4. Наночастицы золота в диагностике и терапии онкологических заболеваний	31
III. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
3.1. Методология, материалы и методы исследования	36
3.2. Результаты исследований и их анализ	50
3.2.1. Выделение HSP из клеточной линии МН22а	50
3.2.2. Получение конъюгатов золотых наночастиц с HSP и их характеристика	51
3.2.3. Оценка иммунологических свойств конъюгатов наночастиц золота и HSP на лабораторных животных	54
3.2.4. Изучение онкопротекторных свойств конъюгата белков теплового шока с наночастицами золота	59
3.2.5. Выделение HSP из клеточных линий рака молочной железы кошек и их характеристика	66
3.2.6. Изучение биодинамики HSP у кошек	71
IV. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	78
V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	83
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	85
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	86
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	87
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	110
ПРИЛОЖЕНИЕ	111

I. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследований.

Опухоли являются одной из основных причин заболеваемости и смертности у животных. Особенно это актуально для мелких непродуктивных животных. Это в первую очередь связано с тем, что кошки (в том числе собаки) как домашние животные, живут достаточно долго, чтобы развить спонтанные опухоли. За период 2014–2017 гг. у кошек наиболее распространена неоплазия молочных желез (49%), на втором месте находятся лимфопролиферативные заболевания (18%) [7]. Некоторые породы генетически более восприимчивы к определенным типам опухолей.

Конечно, кошки не подвергаются воздействию основных канцерогенных факторов, с которыми сталкиваются люди. Тем не менее, кошки, живущие рядом с людьми, подвергаются воздействию тех же факторов окружающей среды, которые связаны с увеличением числа опухолей у человека.

Возникновение опухолей у кошек является серьезной проблемой в ветеринарной медицине. В современном обществе животное рассматривается как член семьи, поэтому современная ветеринарная медицина предъявляет большие требования к разработке эффективных методов диагностики и терапии. Хирургия является распространенным методом лечения неоплазий, в большинстве случаев, владельцы часто воздерживаются от выбора более дорогих методов лечения, таких как химиотерапия или лучевая терапия. В регионах нашей страны такие процедуры как химиотерапия или лучевая терапия мало востребованы в связи с высокой ценой на подобные услуги. Это стимулирует развитие ветеринарной онкологии [54].

Биопсия опухолевой ткани долгое время была золотым стандартом диагностики рака, но этот тип диагностики имеет ограничения из-за своей инвазивности [52]. Биопсия, хотя и считается некоторыми исследователями эффективной, не приводит к окончательному диагнозу [193]. Поэтому

интенсивно развиваются неинвазивные подходы. Методы, используемые для диагностики рака, можно разделить следующим образом:

- Неспецифический.
- Использование опухолевых маркеров.
- Визуализация (эндоскопическая, гистологическая и цитологическая).

Важным направлением в диагностике рака является неинвазивное исследование, основанное на онкомаркерах. Различные типы опухолей выделяют характерные вещества, которые в определенных концентрациях могут быть определены в крови. Многие виды рака связаны с сывороточными онкомаркерами (лактат дегидрогеназа, альфа-фетопротеин, хорионический гонадотропин человека, рецептор эпидермального фактора роста человека, простатспецифический антиген [24], карциноэмбриональный антиген [46], которые необходимы для диагностики и лечения. Содержание онкомаркеров в сыворотке крови должно быть известно при постановке диагноза, чтобы контролировать реакцию на химиотерапию и рецидивы у пациентов во время наблюдения и после завершения терапии [87]. При диагностике особое внимание следует уделять использованию белков теплового шока (HSP), которые выполняют функцию молекулярных шаперонов. HSP - это высококонсервативные внутриклеточные белки, которые участвуют в сворачивании белка в ответ на стресс или высокую температуру. Именно белки теплового шока могут применяться в диагностике и в иммунотерапии.

Иммунотерапия злокачественных опухолей является важной областью биомедицинских исследований. Современные методы иммунотерапии рака включают цитокинотерапию [264], ингибирование иммунных контрольных точек [216], адаптивную клеточную терапию [216] и противоопухолевые вакцины [32]. Противораковые вакцины стимулируют противоопухолевый иммунитет. Основная идея таких вакцин заключается в том, что злокачественные клетки сверхэкспрессируют опухолевые антигены, на которые может быть установлен Т-клеточный иммунный ответ. Любая

противоопухолевая вакцина включает в себя следующие элементы: (1) антиген, (2) носитель, который определяет доставку антигена в лимфоидные органы, и (3) адъювант, который усиливает иммуногенность антигена [107]. Успешный перенос этого подхода из лаборатории в клинику критически зависит от преодоления связанных с этим проблем. Во-первых, введенная вакцина может плохо накапливаться в лимфатических узлах. Во-вторых, антиген может быть неэффективно обработан и представлен дендритными клетками. Это предотвращает индукцию достаточного Т-клеточного ответа $CD8^+$ [167,234].

В последние десятилетия наноносители широко применяются как системы доставки лекарственных средств и биомолекул. Органические и неорганические наночастицы в опухолевых вакцинах значительно повышают стабильность антигена и его накопление в лимфатических узлах, поглощение, процессинг и перекрестную презентацию антигенпредставляющими клетками [238,20,101]. Среди всех доступных наночастиц для этой цели одной из наиболее популярных являются наночастицы золота (GNPS) [222,225]. Они действуют как носители антигена, так и в качестве адъювантов [90]. GNPS могут служить адъювантами для повышения эффективности вакцин, стимулировать антигенпредставляющие клетки и обеспечивать контролируемое высвобождение антигенов. GNP химически инертны, биосовместимы и просты в изготовлении. Кроме того, их поверхность может быть легко функционализирована биомолекулами, включая антигены различной природы [28,91,234].

Несмотря на огромное количество публикаций о применении GNP в исследованиях рака, нет соответствующих сообщений об использовании GNP в комбинации с HSP для противоопухолевой вакцинации. А также о применении данных препаратов в ветеринарии.

Степень разработанности темы. Российские и зарубежные ученые занимались изучением роли шаперонов в развитии опухолевого роста:

(Богатюк М.В., 2017) описывала роль белка теплового шока 27кДа при неоплазии молочной железы у людей; (Albakova Z., 2021) проводившая исследования по идентификации опухолевых клеток в моче; (Кайгородова, Е.В. 2014; Матчук О.Н., 2020; Юнусова Н.В., 2022; Banstola A., 2020; Shi L., 2017).

На сегодняшний день имеются исследования об использовании наночастиц в биомедицинских целях: (Alkilany A., 2010) в своем исследовании получал золотой нанокompозит – PLGA с последующим его применением в биомедицинских целях; (Dykman L.A., 2017) описывал иммунологические свойства наночастиц золота; (Liu X., 2008) провел работу по изучению иммуноанализа с целью выявления биомаркеров рака с использованием наночастиц золота.

Однако никогда не проводилось комплексное исследование, направленное на профилактику и диагностику рака у животных с применением HSP и наночастиц золота. Кроме того, не устанавливалась характеристика влияния данных компонентов на организм лабораторных животных.

Цель и задачи исследования. Цель работы – изучение белков теплового шока в диагностике и для профилактики при аденокарциноме кошек.

Для достижения заданной цели нами были поставлены следующие задачи.

1. Выделение HSP из клеточной линии МН22а и их характеристика.
2. Получение конъюгатов золотых наночастиц с HSP и их характеристика.
3. Оценка иммунологических свойств конъюгатов наночастиц золота и HSP на лабораторных животных.
4. Изучение онкопротекторных свойств конъюгата белков теплового шока с наночастицами золота.

5. Выделение HSP из клеточных линий неоплазий молочной железы кошек и их характеристика.

6. Изучение биодинамики HSP у кошек

Научная новизна. Впервые в ветеринарной практике разработан прототип тест системы для диагностики рака молочной железы у кошек. Препарат сконструирован на основе конъюгатов белков теплового шока и наночастиц золота в качестве носителя для профилактики рака молочной железы у кошек.

Обоснована возможность его применения животным. Нами были дополнены сведения о применении нано-препаратов на основе наночастиц золота и белков теплового шока для иммунокоррекции неопластических процессов у животных. Из опухоли молочной железы кошек выделены белки теплового шока и дана их характеристика. Доказана возможность прогнозирования развития опухолевого процесса у онкологически больных животных с помощью циркулирующих белков теплового шока в сыворотке крови и золотых наночастиц.

Объект исследований – Клеточные линии гепатомы мышины, спонтанные опухоли молочной железы у кошек.

Предмет исследования – Конъюгат на основе наночастиц золота и белков теплового шока.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы состоит в том, что полученные в ходе исследования данные влияния конъюгата на основе наночастиц золота и белков теплового шока на опухолевые линии клеток расширяют понимание о взаимодействии белков теплового шока с наноносителями на основе коллоидного золота. Определены онкопротекторные способности данного конъюгата на лабораторной модели неопластических линий клеток МН-22а гепатома мыши.

Результаты проведённых исследований могут служить теоретической и практической базой для создания диагностической тест системы к белкам

теплового шока у онкологически больных животных и конструирования ветеринарного препарата на основе белков теплового шока для профилактики развития неоплазий у домашних животных.

Практическая значимость работы заключается в том, что результаты наших исследований обосновывают применение данного конъюгата для диагностики и профилактики онкологических заболеваний у кошек при аденокарциноме молочной железы.

Результаты исследований внедрены в практику ветеринарных клиник города Саратова. Проводился отбор сыворотки крови у онкологически больных животных для испытания прототипа диагностической тест-системы на основе белков теплового шока. Что позволяет поставить верный диагноз на ранних этапах развития новообразований молочной железы у кошек.

Методология и методы исследований.

Методологическим подходом к решению поставленных задач явилось системное изучение объектов исследования, анализ и обобщение полученных результатов [1].

Предмет исследований включал, выделенные из клеточной линии, белки теплового шока и их конъюгация с ЗНЧ. Конъюгаты антигенов с наночастицами золота и их применение в профилактических и диагностических целях против неоплазий у животных.

Объектом исследований являлись новообразования домашних кошек, лабораторные животные (белые нелинейные мыши, мыши линии BALb/c, белые нелинейные крысы wistar, кролики), наночастицы коллоидного золота конъюгированные с белками теплового шока.

Экспериментальные работы проводили на нелинейных белых мышах, беспородных белых крысах при подкожном введении для заражения клеточными линиями, а также на кроликах породы советская шиншилла с целью получения антигенов. Производственный опыт проведен на сыворотке спонтанно зараженных кошек.

Цифровой материал подвергался статистической обработке с вычислением критерия Стьюдента на персональном компьютере с использованием стандартной программы вариационной статистики Microsoft Excel.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Конъюгаты золотых наночастиц и белков теплового шока являются стабильными и обладают иммуногенными свойствами.
2. Отсутствие опухолевого роста при трансплантации опухолевых клеток линии МН22а – гепатома мыши при иммунизации животных конъюгатом термостабильного антигена с наночастицами золота.
3. Антигены, полученные от онкологически больных животных, могут служить биомаркером для ранней диагностики опухолей.

Степень достоверности и апробация результатов исследования.

Основные положения, заключение и практические предложения, сформулированные в диссертации, отвечают целям и задачам работы, а клинические, диагностические и экспериментальные исследования проведены на современном сертифицированном оборудовании. Достоверность полученных результатов проанализирована и подтверждается статистической обработкой данных.

Материалы диссертации доложены, обсуждены и одобрены на Межвузовской научной студенческой конференции по морфологии и физиологии за 2020 год (г. Саратов); Национальной научно-практической студенческой конференции «Актуальные вопросы морфологии, физиологии патоморфологии», посвященной 90-летию Заслуженного деятеля науки Российской Федерации, доктора ветеринарных наук, профессора, Почетного работника ВПО РФ Демкина Григория Прокофьевича (2021 г., г. Саратов); Конференции профессорско-преподавательского состава и аспирантов по итогам научно-исследовательской, учебно-методической и воспитательной работы за 2021 год (г. Саратов);

Международной научно-практической конференции «Современные научные тенденции в ветеринарии» (01 декабря 2022, г. Саратов); I этап Всероссийского конкурса на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Министерства сельского хозяйства Российской Федерации по Приволжскому Федеральному округу в номинации «Биологические науки» (2021 г., г. Саратов); II этап Всероссийского конкурса на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Министерства сельского хозяйства Российской Федерации по Приволжскому Федеральному округу в номинации «Биологические науки» (2021 г., г. Казань); Международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, посвященной памяти заслуженного деятеля науки, доктора ветеринарных наук, профессора кафедры «Болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза» Колесова Александра Михайловича (2021 г., г. Саратов). Международной конференции «Современные проблемы ветеринарной фармации и патологии животных» (14 апреля 2022 г. Саратов); На конференции профессорского-преподавательского состава и аспирантов по итогам научно-исследовательской, учебно-методической и воспитательной работы за 2022 год, посвященной 110-летию Вавиловского университета (15-17 февраля 2023 г; ФГБОУ ВО Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 11 научных работ, в том числе 3 – в изданиях, рекомендованных ВАК, получен патент РФ на изобретение, 3 – в изданиях, индексируемых в международной базе данных Scopus, глава в международной коллективной монографии. Общий объем публикаций 7,05 печ. л., из них 4,93 печ. л. принадлежит лично автору.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 122 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора

литературы, методологии и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, практических предложений, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, приложений. Работа иллюстрирована 1 таблицей и 28 рисунками. Список литературы включает 274 источников, в том числе 263 – иностранных авторов.

II. ОБЗОР ЛИТЕАТУРЫ

2.1. Белки теплового шока (HSP)

Белки теплового шока (HSP) — это семейство высококонсервативных белков, которые экспрессируются в небольших количествах в нормальных условиях, но индуцируются в ответ на клеточные стрессы, включая тепловой шок, гипоксию, генотоксические агенты, недостаток питательных веществ и сверхэкспрессию онкопротеинов [34,144,274,51]. Многие HSP выполняют свои функции в качестве молекулярных шаперонов, стабилизируя белки для обеспечения их правильного сворачивания, ингибируя вызванную стрессом агрегацию белков или регулируя клеточную сигнализацию и транскрипционные сети [34,26]. Повышенная экспрессия HSP в стрессовых условиях часто транскрипционно регулируется фактором теплового шока 1 (HSF1). В ответ на стрессовые условия HSF1 фосфорилируется и образует гомотримеры, а затем связывается с элементами теплового шока (HSE), расположенными выше по течению генов HSP и активирует транскрипцию генов теплового шока.

Белки стабильны в своей физиологической среде и, таким образом, при стрессе подвержены неправильному свертыванию и агрегации [26]. Для поддержания функции белка и клеточного гомеостаза необходимы молекулярные шапероны, особенно в условиях стресса. Молекулярные шапероны представляют собой большое семейство белков, которые обеспечивают правильную сборку определенных полипептидных цепей. Помимо своей основной роли в фолдинге белков, шапероны участвуют в транспорте и деградации белков, диссоциации агрегатов и рефолдинге

белков, денатурированных стрессом, и сборке макромолекулярных комплексов. Действительно, многие молекулярные шапероны входят в число HSP, избирательно экспрессирующихся в клетках, подвергающихся метаболическому стрессу [26]. Таким образом, молекулярные шапероны как механизм белкового гомеостаза были задействованы в качестве первой линии защиты от таких заболеваний, как сердечно-сосудистые заболевания, алкогольный гепатит, катаракта, муковисцидоз, фенилкетонурия, что позволяет использовать их в качестве молекулярного маркера для диагностики. Эксперименты показали, что сверхэкспрессия шаперонов у мышей эффективно подавляла нейродегенерацию [183,137].

Так было установлено, что HSP27 действует как шаперон для образования мультимерных комплексов в клетках, стабилизации денатурированных или агрегированных белков и возвращения их в исходную форму [183].

При воздействии нагревания нормальные клетки начинают интенсивно синтезировать белки стресса, белки теплового шока (HSP, белки теплового шока), обладающие шаперонной функцией. Поэтому их называют шаперонами [218].

Шапероны регулируют изменения в расположении белков через мембраны во время транспорта. Они регулируют конформацию - расположение белков при незначительном повреждении [180].

Более поздние исследования показали присутствие молекулярных шаперонов в фолдинге вновь синтезированных белков, они участвуют в их транспорте через мембраны, а также встраивании в различные органеллы [147].

Шапероны ингибируют изменение конформации белков при повышении температуры в клетке до 42 °С. Клетка может адаптироваться, и диапазон этой адаптации ограничен, и клетка повреждается сильным стрессом [218]. Из этого следует, что при частичном повреждении любых белковых структур в организме можно наблюдать выброс шаперонов

определенной молекулярной массы, которые будут возвращать в норму конформацию белков.

2.1.2 Основные функции шаперонов в организме человека

Клетки оптимально растут в узком диапазоне физиологических условий (температур, pH) но имеют способность к приспособлению к умеренным отклонениям от таких условий. Одной из наиболее хорошо изученных клеточных адаптаций является реакция на тепловой шок (HSR) [13]. В условиях теплового шока многие клеточные белки либо защищают клетки от гибели, либо запускают апоптоз, когда нанесенный ущерб необратим. Эти белки называются белками теплового шока (HSP) [131]. Немногие из нескольких таких Hsp защищают белки от агрегации, разворачивают агрегированные белки, чтобы сделать их сворачивающимися совместимыми, и рефолдируют поврежденные белки. Эти белки называются шаперонами [181]. Молекулярный шаперон — это основной класс белков, присутствующих на всех уровнях клеточной организации, от бактерий до человека. Они имеют различную организацию и функции в зависимости от клеточного расположения и сложности организма. Бактериальные белки-шапероны находятся только в цитозоле, так как не являются компарментализованными, но у высших организмов они также локализованы в митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме и хлоропластах.

Молекулярные шапероны обнаруживаются во всех компартментах клетки, где происходят сворачивание или, в более общем смысле, конформационные перестройки белков. Хотя синтез белка является основным источником развернутых полипептидных цепей, другие процессы также могут генерировать развернутые белки. При нефизиологически высоких температурах или в присутствии некоторых химических веществ белки могут становиться структурно лабильными и даже разворачиваться. В конечном итоге это приведет к потере функции пораженных белков и

накоплению белковых агрегатов. Клетка реагирует на эту угрозу, вырабатывая увеличивающееся количество специфических защитных белков, явление, называемое реакцией на тепловой шок или реакцией на стресс [99]. Было обнаружено, что многие из этих белков являются молекулярными шаперонами.

Термин «молекулярный шаперон» используется для описания функционально родственного набора белков. По молекулярной массе молекулярные шапероны делятся на несколько классов или семейств. Клетка может экспрессировать несколько членов одного и того же семейства шаперонов. Например, дрожжи *S.cerevisiae* продуцируют 14 различных версий шаперона Hsp70 [71]. Белки из одного и того же класса молекулярных шаперонов часто обнаруживают значительную степень гомологии последовательностей и структурно и функционально родственны, тогда как между шаперонами из разных семейств почти нет гомологии. Однако, несмотря на это разнообразие, большинство молекулярных шаперонов имеют общие функциональные особенности.

Очевидно, что основным свойством любого молекулярного шаперона является его способность связывать развернутые или частично свернутые полипептиды. На ранних стадиях фолдинга или при неправильном фолдинге гидрофобные остатки белка частично доступны для растворителя и, таким образом, делают его уязвимым для агрегации. Ассоциация этих видов гидрофобных белков с молекулярными шаперонами эффективно подавляет агрегацию. Низкая специфичность гидрофобного взаимодействия и конформационная гибкость интермедиатов укладки обеспечивают беспорядочное действие шаперонов: они связываются с большим разнообразием полипептидов, сильно различающихся аминокислотной последовательностью и конформацией. Однако, поскольку большинство нативных белков и многие промежуточные продукты позднего фолдинга не имеют гидрофобных участков, они больше не являются субстратами для молекулярных шаперонов.

Структурно-функциональная организация шаперонов эволюционно сохраняется в пределах одного и того же царства, но различается между ними. На основе общей молекулярной массы основные шапероны классифицируются как: HSP60 (GroEL/GroES, Cpn60/Cpn10, HSP60/HSP10, Tric/CCT, Thermosome), HSP70 (DnaK, DnaJ, GrpE, HSP70), HSP90 (HSP90), TRAP, HtpG), HSP100 (ClpA, ClpB, ClpP), sHSP и триггерный фактор [206, 125]. Другими важными белками-шаперонами, играющими роль в развитии теплового шока, являются префолдин, калнексин/кальретикулин, GRP94, GRP170, AAA 231 ATPasesPPIases, PDIases, NAC (Nascent polypeptide Associated Complex), CasA 232 и HtpX [70].

Особым интересом для нас обладают шапероны HSP27, HSP70 и HSP90. Именно они достаточно изучены и применяются в гуманитарной медицине для диагностических исследований при различного рода опухолях.

2.1.3 Пептидсвязывающая функция HSP

Термин, «молекулярный шаперон», был предложен в 1978 Ronald Laskey, который использовал этот термин для описания нуклеоплазмина, белка, который связывает и переносит гистоны в ядро, экранируя положительный заряд гистонов за счет собственного кислотного характера [190].

Успешное выполнение клеточных процессов зависит от скоординированных взаимодействий белков. После синтеза на рибосомах в виде линейных последовательностей аминокислот подавляющее большинство белков должны складываться в четко определенные трехмерные структуры (свои нативные состояния), чтобы достичь функциональности. Хотя некоторые недавно транслированные белки способны спонтанно сворачиваться, значительная часть белков менее эффективна в сворачивании и подвержена неправильному сворачиванию, проблема усугубляется очень переполненным клеточным окружением.

Однако высокая концентрация белка и температура способствуют агрегации как нежелательной побочной реакции, конкурирующей с продуктивной укладкой [145]. В отличие от сборки белка, которая описывает упорядоченное объединение нескольких полипептидных цепей в определенный функциональный олигомер, агрегация является неупорядоченная, неспецифическая ассоциация полипептидных цепей, приводящая к образованию гетерогенных белковых частиц, лишенных какой-либо биологической функции.

Учитывая количество энергии, которое клетка уже вложила в синтез нового полипептида, неудивительно, что развились стратегии, способствующие продуктивной укладке белка в его активную конформацию. В ходе молекулярной эволюции полипептидные последовательности, вероятно, отбирались не только на основе их биологических свойств, но также и на том, могут ли они продуктивно складываться. Чтобы увеличить доступное конформационное пространство, клетки разработали молекулярные шапероны, набор белков, которые связываются с развернутыми полипептидами, тем самым предотвращая агрегацию и способствуя продуктивной укладке АТФ-зависимым образом [113].

В живой клетке все белки должны сворачиваться в одних и тех же условиях. Это достигается с помощью сложного белкового механизма, шаперонов, которые влияют на спонтанную реакцию сворачивания белков, тем самым предотвращая агрегацию. Важно отметить, что эти молекулярные шапероны не предоставляют специфической стерической информации для фолдинга целевого белка, а скорее ингибируют непродуктивные взаимодействия и, таким образом, позволяют белку более эффективно сворачиваться в его нативную структуру.

Молекулярные шапероны обнаруживаются во всех компартментах клетки, где происходят сворачивание или, в более общем смысле, конформационные перестройки белков. Хотя синтез белка является основным источником развернутых полипептидных цепей, другие процессы

также могут генерировать развернутые белки. При нефизиологически высоких температурах или в присутствии некоторых химических веществ белки могут становиться структурно лабильными и даже разворачиваться. В конечном итоге это приведет к потере функции пораженных белков и накоплению белковых агрегатов. Клетка реагирует на эту угрозу, вырабатывая увеличивающееся количество специфических защитных белков, явление, называемое реакцией на тепловой шок или реакцией на стресс. Было обнаружено, что многие из этих белков являются молекулярными шаперонами.

Термин «молекулярный шаперон» используется для описания функционально родственного набора белков. По молекулярной массе молекулярные шапероны делятся на несколько классов или семейств. Клетка может экспрессировать несколько членов одного и того же семейства шаперонов. Белки из одного и того же класса молекулярных шаперонов часто обнаруживают значительную степень гомологии последовательностей и структурно, и функционально родственны, тогда как между шаперонами из разных семейств почти нет гомологии. Однако, несмотря на это разнообразие, большинство молекулярных шаперонов имеют общие функциональные особенности.

Важность шаперонов для жизнеспособности клеток иллюстрируется тем фактом, что делеции их генов часто смертельны или вызывают серьезные клеточные дефекты, такие как снижение устойчивости к стрессу. Если активность специфического шаперона отсутствует или снижена до субнормального уровня, следствием может быть заболевание. Как можно отметить, шапероны становятся молекулярными мишенями для терапии неоплазий, трансплантации тканей и синдрома септического шока. В зависимости от их соответствующего вклада для вмешательства может потребоваться ингибирование или стимуляция активности шаперонов.

На основании ниже изложенного можно заключить, что шапероны являются жизненно необходимым компонентом клетки, отвечающими за

восстановление полипептидных цепей и обратное сворачивание белков, без потери их функциональных свойств.

2.1.4 Роль шаперонов в поддержании внутриклеточного гомеостаза

Процесс формирования вторичной и высокоспецифической пространственной структуры белка в ходе его рибосомного синтеза, называемый сворачиванием, или фолдингом (folding), необходим для образования активных и жизнеспособных белков. Некоторые белки в силу особенностей своей аминокислотной последовательности, топологии, размера или функции не способны самопроизвольно организовываться в функциональные трехмерные структуры и проявляют склонность к формированию искаженных (misfolded) структур и к агрегации.

Эндоплазматический ретикулум (ER) является точкой входа для белков в секреторном пути. Приблизительно 30% всех вновь синтезированных белков доставляются в их конечные клеточные точки через этот путь [115]. Растворимые белки транслоцируются в просвет ER, тогда как трансмембранные белки интегрируются в липидный бислой [135]. После достижения своего «места назначения» белок будет складываться должным образом и продвигаться до его конечного пункта назначения, или если складывание происходит неэффективно, белок может быть нацелен на ER, связанную с деградацией (ERAD) цитозольную протеасому [252,226,136,25,50]. Эти три события: транслокация белка, складывание белка и деградация белка способствуют группе факторов, называемых молекулярными шаперонами.

Правильному сворачиванию таких белков обычно способствуют ферменты-фолдазы (например, протеиндисульфидизомераза или пептидилпролил-цис-транс-изомераза), катализирующие сборку полипептидной цепи путем образования ковалентных промежуточных комплексов, либо молекулярные шапероны - группа вспомогательных специализированных белков, предохраняющих растущую цепь от ошибочных внутренних и внешних контактов. Белок проявляет стабильность

и способность взаимодействовать с другими веществами, только если он правильно сложен. Утрата нативной конформации может привести к ряду патологических изменений в организме. Белок, свернутый в нативную структуру более компактный, имеет гидрофобное ядро и гидрофильную поверхность, имеет множество взаимодействий между боковыми группами АК остатков по сравнению с белком в развернутой конформации. Во время синтеза белков, N-концевая область полипептида синтезируется раньше, чем C-концевая. Для формирования нативной конформации необходима полная аминокислотная последовательность белка. Правильное сворачивание вновь синтезируемых белков в клетке и белков с частично нарушенной структурой, а также сохранение структуры белков в условиях стресса обусловлено функционированием шаперонов семейств Hsp70, Hsp60 и Hsp90. Фолдинг растущего в процессе трансляции полипептида обеспечивается его взаимодействием сначала с фактором TF, а затем, при достаточном удлинении полипептидной цепи - с системой шаперона Hsp70. В процессе синтеза белков hsp70, благодаря строению их активного центра, способны закрывать склонные к агрегации участки полипептида, обогащенные гидрофобными радикалами аминокислот до завершения синтеза. Синтезированные белки, имеющие на поверхности элементы, характерные для несвернутых молекул, в частности гидрофобные радикалы, попадают в полость шапероновых колец. В специфической среде этих полостей происходит перебор возможных конформаций, пока не будет найдена единственная, энергетически наиболее выгодная. Формирование конформаций и высвобождение белка сопровождается гидролизом АТФ в экваториальной области. Обычно такой шаперонозависимый фолдинг требует затрат значительного количества энергии.

Так же можно отметить что, те же шапероны, участвующие в «складывании» подложки, также могут вызвать его протеолиз. Фактически, все три класса шаперона участвуют в нацеливании белков на деградацию в дополнение к катализованию складывания. Неудивительно, что многие

заболевания связаны с дефектами в AR, связанном с ER, механизмом контроля качества (ERQC). Например, муковисцидоз, дефицит антитрипсина, болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона и нефрогенный вклад диабета, когда специфические белки либо не могут сложиться должным образом и нацелены на деградацию, либо скрываются от механизма деградации и накапливаются как токсичные агрегаты [154, 177].

В ряде случаев шапероны неспособны собрать белки в их первоначальные структуры, тем самым обеспечивая им в дальнейшем неправильное функционирование, которое может приводить к негативным последствиям на организм.

2.1.5 HSP как биомаркеры онкологических заболеваний

Биомаркеры неоплазий обычно классифицируются на три категории: прогностические, прогнозирующие и фармакодинамические. Биомаркеры опухоли в крови полезны для мониторинга роста опухоли и оценки влияния противоопухолевой терапии неинвазивными методами [10, 12, 5]. Среди HSP HSP70 часто сверхэкспрессируется в опухолевых клетках и может активно высвобождаться в экзосомоподобных липидных везикулах. Оценка липосомального и свободного HSP70 в сыворотке и плазме с использованием ELISA может дать полезный инструмент для обнаружения опухолей и мониторинга клинического исхода пациентов [48]. Более того, растворимый HSP70 был полезен для обнаружения опухолей на ранних стадиях. Валидация HSP70 в качестве опухоли-специфического биомаркера была изучена для мониторинга результатов лучевой терапии на моделях мышей с опухолями и у пациентов с неоплазиями [39, 212, 38]. Abe et al. указал, что HSP70 является маркером неоплазии простаты. Несмотря на то, что уровни HSP70 в плазме не были более эффективными, чем специфичный антиген (PSA) в качестве предиктора диагноза пациентов с неоплазией предстательной железы, но его использование наряду с PSA может быть полезно при выявлении пациентов с неоплазией простаты на ранней стадии, которые могут быть пропущены с помощью скрининга PSA [21]. Другие

результаты свидетельствуют о том, что четыре члена семейства HSP70, другими словами, два белка, регулируемые глюкозой (GRP78 и GRP75) и белок HSP70 (HSP70.1) играют важную роль в патогенезе НСС (гепатоцеллюлярная карцинома), связанным с HCV (вирус гепатита С), и могут быть молекулярными мишенями для диагностики и лечения заболевания. [207]. HSP27 как потенциальный биомаркер может помочь в диагностике ГЦК (гепатоцеллюлярная карцинома) [129].

Обнаружение новых антигенов, связанных с опухолью, и аутоантитела у больных неоплазией могут способствовать диагностике злокачественных опухолей на ранней стадии и помогут определить эффективность новых видов иммунотерапии. Аутоантитела против HSP70 в сыворотках от пациентов с плоскоклеточным раком пищевода обеспечили перспективный способ для выявления новых сывороточных маркеров, которые могут иметь клиническое значение против рака [208]. HSP70 часто был сверхэкспрессирован неопластическими клетками мочевого пузыря и мог использоваться в качестве биохимического маркера у пациентов с неоплазией мочевого пузыря [66]. Исследователи обнаружили, что повышенные уровни HSP60, HSP70 и HSP90 могут отличить пациентов с раком мочевого пузыря мышц (MIBC) от пациентов с немышечным инвазивным раком мочевого пузыря (NMIBC). Однако высокие уровни HSP не могли различать пациентов с NMIBC от пациентов с гематурией и без неоплазии мочевого пузыря. Напротив, оценка уровней HSP60 и IL-13 одновременно может обнаружить все случаи MIBC и большинство случаев NMIBC [173]. Pick et al указал, что экспрессия HSP90 в злокачественных клетках была примерно в два-десять раз выше, чем в нормальных клетках, указывающих на его важную роль в росте и выживании опухолевых клеток, которые можно рассматривать как эффективную лекарственную мишень [133].

P-HSP27 был использован в качестве потенциального биомаркера для прогнозирования роли аутофагии, вызванной химиотерапией в ответе на

терапию остеосаркомы. Увеличение P-HSP27 было связано с высокой чувствительностью к противоопухолевым препаратам, когда аутофагия была ингибирована. Увеличение P-HSP27 было связано с высокой чувствительностью к противоопухолевым препаратам, когда аутофагия была ингибирована. Результаты показали, что P-HSP27 может представлять собой прогностический биомаркер того, будет ли комбинированная терапия с модуляторами аутофагии и химиотерапевтическими препаратами для общей выживаемости пациентов [224]. Так же было установлено что, концентрации антител против HSP20 обратно коррелировали с прогрессированием опухоли при неоплазии яичников [31]. Текущие исследования продемонстрировали аномальную экспрессию HSPs в различных опухолях человека: яичников, толстого отдела кишечника, молочной железы, легких и простаты. Экспрессия HSP показала плохой прогноз пациентов с колоректальным раком и раком желудка [204]. Kappa et al. показали, что HSP10 и HSP60 являются актуальными биомаркерами для ранней диагностики канальцевой аденомы как в эпителии, так и в слизистой оболочке, и его дифференциация от более развитых злокачественных поражений. Таким образом, HSP10 и HSP60 могут потенциально рассматриваться как удобные мишени для терапии [214].

Белки теплового шока представляют особый интерес в диагностике новообразований не только у людей, но и у животных. Шапероны позволят диагностировать новообразования на ранних стадиях, а также проводить дифференцировку некоторых заболеваний, таких как поликистозная мастопатия и карцинома МЖ у млекопитающих.

2.2.1 Новообразования молочной железы у животных

Во время онкогенеза молочной железы маркеры клеточно-специфической дифференцировки обычно сохраняются. Морфологическая оценка в сочетании с этими иммунофенотипическими различиями может

быть использована для установления точного диагноза [130,237]. Диагноз новообразование молочной железы у собак является одной из наиболее частых проблем ветеринарных патологов в странах, где препубертатная или пубертатная овариогистерэктомия обычно не проводится, в таких случаях опухоли молочной железы очень распространены.

Опухоли молочной железы собак (СМТ) характеризуются различной морфологией, образуя простые (эпителиальные просветные или миоэпителиальные клетки), смешанные (эпителиальные просветные и / или миоэпителиальные клетки и костные / хрящевые метапластические ткани) и мезенхимальные опухоли; Опухоли, характеризующиеся миоэпителиальной пролиферацией, также часто наблюдаются [65,179]. Доброкачественные смешанные опухоли очень распространены и образуются в результате пролиферации доброкачественных железистых эпителиальных и миоэпителиальных клеток с мезенхимальными метапластическими элементами, прежде всего хрящевой и костной ткани.

Карциномы являются наиболее распространенными злокачественными СМТ и классифицируются по их морфологическим признакам. В простых карциномах происходит пролиферация только 1 типа клеток (просветные эпителиальные или миоэпителиальные клетки), в то время как сложные карциномы характеризуются двухклеточной пролиферацией [179]. В простых карциномах наблюдается увеличение злокачественности от тубулопапиллярного к твердому анапластическому подтипу. Сложные карциномы обычно ассоциируются с лучшим исходом [179]. Истинные злокачественные смешанные опухоли (карциносаркомы) и саркомы редки [179]. При обычной диагностике сложная морфология СМТ может вызывать пролиферацию различных типов клеток, особенно причина разного прогноза, связанного с различными гистологическими подтипами [78]. Хотя классификация СМТ, опубликованная Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 1999 году, и все еще может применяться в рутинной ветеринарной диагностической патологии. Недавно была

опубликована новая схема гистологической классификации, в том числе несколько новых гистологических типов: крибриформаная карцинома, комедокарцинома, микропапиллярная карцинома, и карцинома и злокачественная миоэпителиома.

Маркеры дифференцировки, используемые в исследованиях СМТ, включают маркеры эпителиальных клеток, маркеры миоэпителиальных клеток и маркеры мезенхимальных клеток.

Исторически маркеры дифференцировки клеток были использованы для изучения гистогенез опухолей молочной железы у собак, в первую очередь роль миоэпителиальных клеток в генезисе смешанных опухолей на основе иммунофенотипа [142,15,237]. Несколько теорий были предложены о происхождении костных и хрящевых метапластических элементов на основе исследований ИНС (иммуногистохимии) спонтанных опухолей молочной железы у собак: метаплазии из эпителиальных клеток, метаплазия из стромы соединительной ткани, или метаплазия из базальных / миоэпителиальных клеток [142,237]. Ряд исследований ИНС поддерживали миоэпителиальные клетки гистогенеза на основе иммунофенотипа и обнаружили, что миоэпителиальные клетки могут подвергаться метапластической трансформации в мезенхимальные клетки по механизмам, которые не совсем понятны. В то время как супрабазальные миоэпителиальные клетки сохраняют свой *immunoprofile*, интерстициальные миоэпителиальные клетки теряют экспрессию эпителиальных маркеров (Kertins) и приобретают фибробластический фенотип с повышенной виментиной экспрессией [83]. Эти иммуногистохимическое исследование подтверждает эпителиально-мезенхимальных переход (анти) гипотез с участием миоэпителиальных клеток, которые будут проходить миоэпителиал - мезенхимальный перехода (NNT). Однако экспериментальные исследования на основе экспрессии генов, могли бы дать объяснения, включая происхождение компонентов мезенхимальных стволовых из молочных клеток [102]. Доступны несколько маркеров миоэпителиальных клеток, которые имеют эксклюзивный или

предпочтительный паттерн миоэпителиальной экспрессии. Тем не менее, эти антитела демонстрируют различия с точки зрения чувствительности и специфичности [132]. Маркеры гладкомышечных клеток (кальпонин, SMA) чувствительны, но в дополнение к миоэпителиальным клеткам, они также взаимодействуют с стромальными миофибробластами и клетками гладких мышц сосудов [72,79,259]. P63 является высокочувствительным и специализированным ядерным миоэпителиальным маркером, и одним из его преимуществ является то, что он не экспрессируется миофибробластами и клетками гладких мышц сосудов [79]. Базальные кератины (K5 и K14) маркируют миоэпителиальные клетки и не маркируют стромальные фибробласты, но они обладают низкой специфичностью, потому что некоторые эпителиальные клетки (нормальные и неопластические) будут экспрессировать кератины базального типа [79,142,15,174].

СМТs в миоэпителиальных клетках и ее изменчивая морфология, которую они часто имеют может увеличить трудность предоставления точного морфологического диагноза. В комплексных и смешанных опухолях молочной железы у собак были обнаружены четыре морфологии миоэпителиальных клеток: покоящиеся и пролиферирующие миоэпителиальные клетки, а также интерстициальные веретенообразные и звездчатые миоэпителиальные клетки [142, 15, 244].

Фенотип базальных / миоэпителиальных клеток был описан в подгруппе новообразований, традиционно рассматриваемых как простые карциномы, с использованием иммуногистохимических маркеров миоэпителиальных клеток [77,15,112,141,174].

Карцинома и злокачественная миоэпителиома, состоит из популяции клеток эпителия просвета и миоэпителиальных клеток [65]. Миоэпителиальные клетки могут демонстрировать заметные различия в своей морфологии в диапазоне от веретенообразных клеток до округлых клеток и до многоугольных клеток. Карцинома и злокачественная

миоэпителиома требуют ИНС, чтобы идентифицировать двойную популяцию эпителиальных клеток просвета и миоэпителиальных клеток [65].

У людей фиброаденомы являются наиболее частыми доброкачественными опухолями, тогда как наиболее распространенным типом неоплазий молочной железы является так называемая инвазивная протоковая карцинома [267]. Особые виды неоплазий молочной железы составляют до 25% всех случаев неоплазий молочной железы. Классификация ВОЗ признает существование нескольких различных гистологических особых типов: дольчатый (5-15%), трубчатый (2%), крибриформный (0,8% -3,5%), медуллярный (1% -7%), папиллярный (1% -2%) и микропапиллярная (2%) карцинома. В отличие от собак, миоэпителиальная пролиферация редко встречается при раке молочной железы человека. Опухоли, демонстрирующие дифференцировку в миоэпителиальные клетки, такие как аденомиоэпителиома или чисто злокачественная миоэпителиома, встречаются редко и обычно имеют преимущественно рост веретенообразных клеток.

Хотя двухфазные опухоли связаны со снижением злокачественности у собак [179] и человека, злокачественная миоэпителиома имеют отчетливое клиническое поведение и плохой прогноз у людей [33]. Tsuda et al [253] показали, что опухоли молочной железы человека высокой степени, проявляющие миоэпителиальную дифференцировку, имеют агрессивный характер поведения. Необходимы дополнительные исследования, чтобы понять роль миоэпителиальных клеток в развитии неоплазии молочной железы у собак и их прогностическое значение в этих новообразованиях [174]. В исследованиях на людях прогрессирование опухолей молочной железы в миоэпителиальных клетках по важности всегда недооценивают; Однако в настоящее время считается, что эти клетки появились с двойной функцией, действуя как в качестве супрессоров опухолей, так и промоторов. Миоэпителиальные клетки считаются естественными супрессорами опухолей/инвазий путем секреции различных антиангиогенных и

антиинвазивных факторов. Однако миоэпителиальные клетки, связанные с протоковой карциномой *in situ*, демонстрируют аномальное поведение, теряют свои нормальные функции подавления опухоли и способствуют стромальной инвазии (секретируя различные молекулы при деградации базальной мембраны), гипоксии и воспалению. Тем не менее, лежащие в основе молекулярные механизмы функций миоэпителиальных клеток во время прогрессирования опухоли все еще неясны.

Рак молочной железы человека был тщательно изучен ИНС, а именно, распределением белков цитоскелета, таких как кератины. Большинство карцином демонстрируют положительную маркировку люминальных кератинов, что указывает на дифференцированный железистый фенотип [1]. Однако становится все более очевидным, что некоторые виды неоплазий молочной железы, такие как карциномы, показывают частичную или полную базальную / миоэпителиальную дифференцировку при иммуногистохимической оценке и характеризуются экспрессией молекул, обычно обнаруживаемых в базальном / миоэпителиальном компартменте нормальной молочной железы [213,253]. Эта «базальная» дифференциация подняла внимание патологов, так как эти опухоли имеют агрессивное биологическое поведение и плохой прогноз пациента (см. ниже) [253].

Карцинома молочной железы кошек (FMC) была предложена в качестве полезной модели неоплазий молочной железы человека на основе возраста заболеваемости, факторов риска, гистопатологии, прогностических аспектов, характера метастазирования и ответа на терапию [126]. Ежегодная заболеваемость неоплазией молочной железы кошек оценивалась в 13-25 случаев на 100 000 кошек женского пола. Кошачьи опухоли молочной железы являются наиболее частым новообразованием, вызывающим смерть у кошек [53] и третье наиболее часто диагностируемое новообразование после лимфогематопоэтических и кожных опухолей и составляет 12% всех новообразований и 17 % таковых у кошек женского пола. Предыдущие исследования выявили связанный с породой риск развития рака молочной

железы у сиамских кошек, у которых риск развития FMC был в два раза выше по сравнению с другими породами [95,96,127]. Новообразования молочной железы встречаются преимущественно у кошек среднего и старшего возраста со средним возрастом от 10 до 12 лет [272]. Новообразования молочной железы кошек, обычно классифицируемые в соответствии с критериями Всемирной организации здравоохранения, обычно представлены карциномами *in situ* или инвазивными карциномами. Инвазивные карциномы включают: дольковый, тубулярный и крибриформный типы, в то время как реже встречаемые, включают карциносаркому, карциному или саркому, муцинозную карциному и карциному с плоскоклеточной дифференцировкой [178,273]. К сожалению, более 80 % опухолей молочной железы кошек являются злокачественными и влекут за собой быстрое прогрессирование и метастазирование на ранней стадии [169,272]. Интервал между диагнозом опухоли молочной железы кошки и смертью варьируется от менее чем 6 месяцев до ,примерно, 12 месяцев [182]. Однако, несмотря на усилия, предпринятые во время операции, кошки, перенесшие мастэктомию, демонстрируют высокую частоту хирургических неудач либо в виде неадекватного удаления первичных новообразований, местного рецидива и /или метастазов, которые предполагают наличие микрометастазов во время операции [93,268]. Метастазирование является наиболее разрушительной и опасной для жизни проблемой у женщин с раком молочной железы и поэтому стало важным объектом исследований [269]. FMCS обычно метастазируют в легкие и регионарные лимфатические узлы, а иногда и в другие органы [153]. Злокачественные опухоли распространяются в лимфатические узлы через лимфатические сосуды из - за выработки опухолью факторов роста, которые прямо или косвенно усиливают процесс лимфангиогенеза [55]. Мышиные модели рака молочной железы незаменимы, поскольку они дают возможность исследовать механизмы метастазирования, генетического прогрессирования рака и роли ангиогенеза и лимфангиогенеза [269].

Существующие на данный момент времени методы определения вида новообразования дорогостоящие и относительно длительны по времени, в то время как сроки постановки диагноза имеют критическое значение для благоприятного исхода терапевтических мероприятий при данном заболевании. Поэтому разработка методов ранней диагностики рака МЖ является на наш взгляд актуальной проблемой.

2.3.1 Коллоидное золото и его свойства

За последнее десятилетие наночастицы золота (ЗНЧ-GNPs) широко используются в различных биомедицинских целях, включая аналитическое химическое и биологическое зондирование; геномику и иммуноанализы; оптическую биовизуализацию и мониторинг клеток и тканей; обнаружение и фотодинамическую терапию патогенных микроорганизмов; обнаружение и фототермолиз раковых клеток и опухолей; заживление ран; и целенаправленную доставку из лекарств, пептидов, ДНК и антигенов [89,247,62]. Уникальные оптические свойства GNPs связаны с локализованными плазмонными возбуждениями в металлических наноструктурах [151] взаимодействие со светом. Эти возбуждения приводят к локальным полям, усиленным резонансом, и, соответственно, к усиленным оптическим явлениям, таким как поглощение, комбинационное рассеяние и различные нелинейные эффекты [239,9]. Многофункциональные наноконпозиты, сочетающие терапевтические, диагностические и сенсорные методы в единой наноструктуре, широко используются в новой области нанобиотехнологий, называемой тераностикой [197,61,196,248,256,249]. Хотя термин “тераностика” была впервые применена совсем недавно [197, 110], в настоящее время это быстро развивающаяся и перспективная направление в области плазмоники и наномедицины [266,148]. Первая демонстрация использования GNP различных размеров и форм для тераностической наномедицины появилась в работах Loo et al. [186] (для золотых наноболочек), Lapotko et al. [160] (для золотых наносфер) и Hleb et al. [159] (для золота наностержни). В 2010 году, Lukianova-Hleb et al. [11] представили

полную концепцию тераностики. В настоящее время многофункциональные наноконпозиты на основе GNP [184] предлагают новые терапевтические методы, сочетая уникальные оптические свойства плазмонных GNP со свойствами мезопористого диоксида кремния функционализировали с помощью соответствующего фотосенсибилизатора (PS) и молекулярных зондов [184]. Другим примером являются магнитные наночастицы на основе оксида железа и наноконпозиты, сочетающие магнитно - резонансную визуализацию с компонентами, нацеленными на рак [271]. При использовании GNPS и наноконпозитов *in vivo* исследователи неизбежно сталкиваются с проблемами биораспределения частиц, фармакокинетики и возможной токсичности частиц [28, 149]. Золотые наночастицы достаточно хорошо изучены, поэтому мы использовали их в своих исследованиях, так как они обладают самой низкой токсичностью из известных наночастиц и биодоступностью.

2.3.2 Наночастицы золота в диагностике и терапии онкологических заболеваний

Благодаря недавним достижениям в области нанотехнологий и медицины, многочисленные наночастицы и наноматериалы возникли из различных объемных элементов, таких как золото, серебро, железо, медь, кобальт, платина и т. Д., Которые синтезируются биологическим или физикохимическим путем [191,45]. Возможность манипулировать характеристиками наночастиц, такими как их физические, химические и биологические свойства, открывает множество возможностей для изучения этих наночастиц при доставке лекарств в качестве агентов контрастирования изображений и для диагностических целей [17]. Среди различных органических и неорганических наночастиц наночастицы золота обладают уникальными оптическими свойствами и свойствами поверхностного плазмонного резонанса (ППР), благодаря которым они стали предпочтительным выбором для исследователей, особенно в области

биологии и фармацевтики. Благодаря оптическим свойствам наночастиц золота, они особенно используются в терапевтических методах сверхчувствительного обнаружения и визуализации, необходимых для лечения смертельных заболеваний, таких как рак.

В клеточной биологии эффективными инструментами стали различные типы золотых наночастиц, такие как золотые наностержни, наноклетки, нанозвезды, нанокубы и наносферы. Их применение в диагностике неоплазий и терапевтических разработках связано с их благоприятными оптическими и физическими свойствами, которые обеспечивают потенциальную платформу для разработки тераностики рака. Оптические свойства наночастиц золота зависят от ППР (поверхностного плазмонного резонанса). В принципе, SPR - это процесс, при котором электроны золота резонируют в ответ на входящее излучение, заставляя их как поглощать, так и рассеивать свет. Кроме того, некоторые наночастицы золота особой формы вносят вклад в сечения захвата фотонов, которые в четыре-пять раз больше, чем у фототермических красителей. Эти свойства используются для получения локального нагрева либо для разрушения клеток, либо для высвобождения лекарства, лежащего в основе терапевтических применений. Кроме того, наночастицы золота обладают настраиваемыми свойствами, которые позволяют синтезировать наночастицы определенного размера и желаемой формы, что приводит к сдвигу плазмонного резонанса от 520 до 800–1200 нм (сложные формы) [68, 6]. Ученые Susie et al. продемонстрировали изменение оптических свойств и резонанса наночастиц золота (от 500 до 1200) за счет небольшого изменения формы наночастиц от наносфер 15–30 нм до наностержней 2,5–7,5 нм. Соотношение сторон (AR) [119, 231]. Диапазон между 800 и 1200 нм является терапевтически полезными, потому что ткань тела умеренно прозрачна для ближнего инфракрасного (NIR) света, что дает возможность терапевтического воздействия на глубокие ткани с помощью фототермических и фотоизображающих подходов. Еще одно важное свойство - доступная площадь поверхности. Хорошо известно, что площадь

поверхности наночастиц обратно пропорциональна их размеру, что приводит к большому отношению площади поверхности к объему. Другими словами, наночастицы имеют большую площадь поверхности, доступную для загрузки лекарственного средства [85]. Доступная площадь поверхности также играет решающую роль для применения наночастиц золота в диагностике рака, особенно в фотоизображении и фототермической терапии. В фототермической терапии более мелкие наночастицы предпочтительны, поскольку свет в основном адсорбируется наночастицами и, таким образом, эффективно преобразуется в тепло для разрушения клетки, тогда как при фотоизображении более предпочтительны наночастицы большего размера из-за их более высокой эффективности рассеяния. Кроме того, биологические реакции на наночастицы имеют тенденцию масштабироваться с увеличением площади поверхности. Это означает что, когда наночастицы подвергаются воздействию биологической среды, такой как сыворотка или плазма, большее количество белков из окружающей среды связывается с небольшими наночастицами с большим отношением площади поверхности к объему, чем с теми, которые имеют больший размер и меньшую площадь поверхности и отношение к объему. Наряду с вышеупомянутыми свойствами, специализированная функционализация поверхности наночастиц золота также вызвала значительный интерес. Возможность конъюгировать наночастицы золота с различными биологически активными фрагментами, особенно с аминными и тиоловыми группами, предоставляет возможности для важных биомедицинских приложений, начиная от диагностики, нацеленной на специфическую доставку лекарств / генов, визуализации и определения маркеров электронной микроскопии [198, 140].

Несмотря на все эти преимущества, биосовместимость наночастиц золота является решающим фактором, который необходимо учитывать перед клиническим применением. Хотя инертный характер наночастиц золота делает их относительно биосовместимыми, цитотоксичность наночастиц, которая более или менее, зависит от их формы, размера, свойств поверхности

и химического состава, требует дополнительной оценки. После того, как частицы интернализуются клетками, белки, присутствующие в физиологической среде, образуют покрытие, называемое «коронай» на поверхности наночастиц, в результате чего образуется комплекс наночастица-белок [2]. Эта белковая корона довольно сложна и вариабельна по структуре и играет ключевую роль в биораспределении наночастиц по всему телу. Добровольская и др. сообщили, что необработанная плазма обычно содержит ок. 3700 белков, а наночастицы золота, которые контактируют с плазмой, образуют «комплекс белковой короны», содержащий менее 100 белков [44]. Золотые наночастицы внутри комплекса короны содержат на своей поверхности опсоины, которые распознаются иммунными клетками (часть ретикулоэндотелиальной системы (RES)). Эти белки в конечном итоге определяют путь интернализации наночастиц и в конечном итоге влияют на судьбу наночастиц в организме (т.е. скорость и путь выведения из кровотока и тела, объем распределения, расположение органов и т. Д.) [124]. До сих пор сообщалось, что из комплекса короны в плазме были выделены различные белки, такие как альбумин, фибриноген, иммуноглобулин G (IgG), иммуноглобулин M (IgM), трансферрин и т. Д. Этот комплекс короны может вызывать изменения в частицах. размер и заряд, которые, в свою очередь, влияют на процесс интернализации в макрофагах и на общее распределение в организме. Некоторые белки позволяют макрофагам легко распознавать наночастицы; например, опсоины и фибриногены IgG, как сообщается, способствуют фагоцитозу и удалению наночастиц из организма [185], в то время как дизопсоины, такие как альбумины, вызывают длительную циркуляцию наночастиц в крови [49]. Чтобы предотвратить иммунное распознавание наночастиц, ученые ввели процесс, называемый «пегилирование». При таком подходе наночастицы «прячутся», маскируя свою поверхность слоем полиэтиленгликоля (PEG-ПЭГ). Это спасает их от иммунного распознавания, по сути продлевая их нахождение в кровяном русле. ПЭГилирование может быть выполнено путем

ковалентного связывания, которое захватывает или адсорбирует цепи ПЭГ на поверхности наночастицы. После интернализации наночастиц их можно использовать для визуализации опухолей, PTT и PDT. Хотя пегилирование может помочь избежать быстрого распознавания RES, полное предотвращение редко достигается, поскольку наночастицы все еще могут распознаваться и поглощаться системой RES. Несмотря на то, что в этом направлении была проделана большая работа, многие проблемы остаются, и их необходимо решить, прежде чем пегилирование можно будет применить на практике.

Традиционные подходы к доставке химиотерапевтических препаратов, то есть пероральное или внутривенное введение, приводят к распространению лекарственного средства по всему организму, при этом только часть лекарственного средства достигает места опухоли. Однако это может иметь побочные эффекты на здоровые ткани и органы. Эту проблему побочных эффектов можно обойти с помощью подходов к целевой доставке лекарств, которые можно определить, как процесс, в котором конкретное биологически активное соединение или лекарство высвобождается в определенном месте контролируемым образом. Развитие наночастиц открыло огромные возможности для доставки лекарств. Из-за своего небольшого размера они могут эффективно проходить через капилляры, чтобы достичь своих клеток-мишеней. Химиотерапевтические препараты могут быть загружены или прикреплены к наночастицам и могут быть нацелены либо пассивно, либо активно на место опухоли. Ткань опухоли обычно имеет протекающую сосудистую сеть, что позволяет наночастицам легко накапливаться. Это также известно, как эффект повышенной проницаемости и удерживания (EPR). Эта форма пассивного нацеливания использует патофизиологические свойства опухолевой ткани. Однако у этого подхода есть определенные ограничения, которые включают произвольное нацеливание и неэффективное диспергирование лекарств в опухолевых клетках. Кроме того, не все опухоли проявляют EPR эффект. При активном

нацеливании лиганды опухолеспецифических биомаркеров, таких как моноклональные антитела, аптамеры, пептиды и витамины, конъюгируются на поверхности наночастиц. Затем эти лиганды взаимодействуют со своими рецепторами на опухолевых клетках, обеспечивая эндоцитоз и последующее высвобождение лекарства. Таким образом, активное нацеливание предлагает более высокую вероятность эндоцитоза по сравнению с подходом пассивного нацеливания [84].

Применение наночастиц в онкологии является перспективным направлением в медицине и ветеринарии, которое поможет открыть новые способы диагностики и лечения многих заболеваний. Одним из таких заболеваний является карцинома молочной железы у кошек.

III. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Методология, материалы и методы исследования

Работа выполнялась в период с 2019 по 2023 год на базе кафедры «Болезни животных и ветеринарно–санитарная экспертиза» ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова». Ряд исследований были выполнены на базе ИБФРМ Обособленное структурное подразделение ФИЦ СНЦ РАН [5]. Научно-производственные исследования проводились в условиях ветеринарных клиник для животных УНТЦ -0«Ветеринарный госпиталь», ветеринарный кабинет Солдатова Л. В. г. Саратов.

Предмет исследований включал, выделенные из клеточной линии, белки теплового шока и их конъюгация с ЗНЧ. Конъюгаты антигенов с наночастицами золота и их применение в профилактических и диагностических целях против неоплазий у животных.

Объектом исследований являлись новообразования домашних кошек, лабораторные животные (белые нелинейные мыши, мыши линии BALb/c, белые нелинейные крысы wistar, кролики), наночастицы коллоидного золота конъюгированные с белками теплового шока [5]. Экспериментальная часть диссертационной работы делилась на шесть последовательных этапов, представленных на (Рисунке 1).

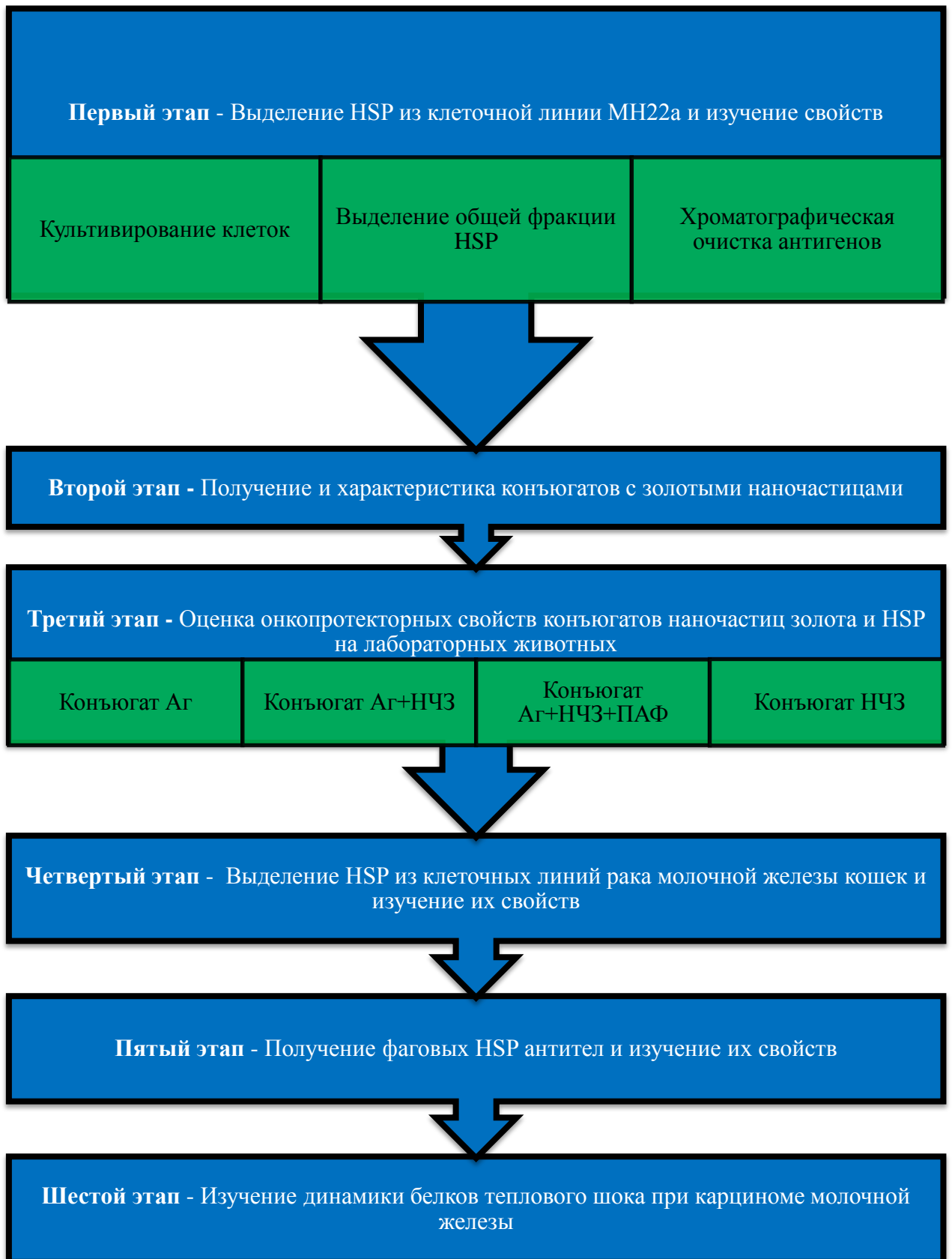


Рисунок 1 – Схема экспериментальных исследований

На первом этапе наших исследований нами были выделены белки теплового шока из клеточной линии МН-22а с последующим изучением их свойств:

Осуществлялось культивирование опухолевых клеток. Использовали клетки мышинной гепатомы МН22а, клетки карциномы шейки матки HeLa и клетки эмбриональной почки свиньи SPEV-2. Все клетки были получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург. Петербург, Россия. Клетки выращивали на среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM) с 10% фетальной бычьей сывороткой, 100 единиц/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 292 мкг/мл L-глутамин. Их выращивали в стерильных флаконах с адгезивными культурами до образования монослоев [234].

После образования монослоев выделяли HSP. Культуральный флакон с монослоем МН22а прогревали при 42 °С в течение 1 ч и инкубировали при 37 °С в течение 2 ч. Клетки лизировали, и флакон осторожно четыре раза промывали 10 мл нагретого раствора Хэнкса. Затем добавляли 15 мл DMEM, содержащей 4 мМ глутамин и 2 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF). После встряхивания флакона при 37 °С в течение 1 ч и промывания в него добавляли 10 мл буфера Cytomix (120 мМ KCl, 0,15 мМ CaCl₂, 2 мМ ЭДТА, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ K₂HPO₄/KH₂PO₄, 25 мМ HEPES, и 2 мМ PMSF, pH 8,0) и, наконец, замораживали при -20 С и оттаивали при 37 С. Эту процедуру повторяли трижды. Затем суспензию переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 10000× g в течение 15 мин [234].

Затем клеточный лизат осаждали сульфатом аммония до 40% насыщения и осадок центрифугировали при 20000× g в течение 20 мин при 4 °С. Полученную надосадочную жидкость осаждали сульфатом аммония до конечного насыщения 80%, осадок центрифугировали при 20000× g в течение 20 мин при 4 °С. Осадок, полученный после второго центрифугирования, растворяли в 4 мл дистиллированной воды и подвергали диализу против 0,2 М фосфатно-солевого буфера (ФСБ), pH 7,2, при 4 °С в

течение 48 ч с частой сменой буфера. Таким же образом выделяли антигены из клеток HeLa и SPEV-2. Полученные экстракты использовали для дальнейшей хроматографической очистки.

Антигены очищали ионообменной хроматографией на колонке Toyopearl DEAE-650 (SigmaAldrich, Сент-Луис, Миссури, США) с использованием хроматографа NGC Quest 10 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Фазу уравнивали 0,05 М Трис-НСl, рН 7,5.

На колонку наносили уравновешенный образец (100 мкл), содержащий 240 мкг белка. Элюаты собирали в виде фракций с использованием ступенчатого градиента от 0 до 0,5 М NaCl. Поглощение элюатов контролировали при 280 нм с помощью спектрофотометра Spectronic-21 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Второй этап включал получение конъюгатов с золотыми наночастицами и изучение их физико-химических свойств. Для этого осуществлялось получение золотых наночастиц для дальнейшей работы. Золотые наносферы синтезировали по методике Френса [109] путем восстановления HAuCl_4 цитратом натрия. Порцию деионизированной воды объемом 240 мл нагревали до кипения в колбе Эрленмейера, снабженной водоохлаждаемой обратной холодильником. Затем в колбу добавляли 2,5 мл 1% водного раствора HAuCl_4 (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) и 7,75 мл 1% цитрата натрия (Fluka, Buchs, Швейцария). Смесь энергично перемешивали. Средний размер частиц определяли с помощью спектрофотометрии, просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ, Libra 120, Carl Zeiss, Оберкохен, Германия) и динамического светорассеяния (DLS, Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Малверн, Великобритания [234, 8].

Для получения конъюгатов смешивали 150 мкл стафилококкового протеина А (концентрация 1 мг/мл) и 25 мл коллоидного раствора золота (оптическая плотность $A_{520} = 1$). Смесь перемешивали в течение 10 минут. Затем к реакционной смеси добавляли 500 мкл 1% ПЭГ-20000 и смесь перемешивали еще 5 мин. Образцы центрифугировали при 12 000 g в течение

40 мин, а затем сливали надосадочную жидкость. Осадок повторно растворяли в буфере, состоящем из 10 mM PBS, 0,02 M NaN₃, 0,02% ПЭГ-20000 и 30% глицерина, так что абсорбция образца A518 равнялась 5.

Перед конъюгацией мы оценили «золотое число» (минимальное количество антигена, которое защищает соль от агрегации соли) ЗНЧ с белками теплового шока, полученными из лизата цельных клеток МН22а. Для этого 20 мкл водного раствора антигена (исходная концентрация 1 мг/мл) дважды титровали на 96-луночном микротитрационном планшете. В каждую лунку добавляли 200 мкл 15-нм ЗНЧ (поглощение A520 = 1,0) и 20 мкл 1,7 M NaCl. Минимальная стабилизирующая концентрация для выделенного антигена составила 12 мкг/мл. Конъюгацию осуществляли простым смешиванием без использования связующих агентов [4]. Используемая концентрация антигена превышала золотое число на 20%. Следует отметить, что избыток растворимого антигена не только не мешает иммунизации, но и способствует увеличению продукции антител [242, 4].

Спектры экстинкции ЗНЧ и ЗНЧ+АГ регистрировали на спектрофотометре Specord S-300 (Analytik Jena, Йена, Германия). Изображения трансмиссионной электронной микроскопии получали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа Libra-120 (Carl Zeiss, Оберкохен, Германия). Дзета-потенциал частиц и конъюгатов измеряли с использованием метода рассеяния света на красителе с помощью Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, UK). Все измерения проводились в Центре коллективного пользования научноисследовательским оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ИБФРМ РАН, Саратов [234].

Дот- иммуноанализ проводили следующим образом [88]: экстракты клеток МН22а наносили серией точек на поливинилиденфторидную мембрану Western S (Millipore, Burlington, MA, USA). Мембрану блокировали в течение 1 ч 2%-ным обезжиренным сухим молоком, разведенным в 10 mM PBS, pH 7,2, после чего инкубировали в течение 1 ч в растворе антител,

предварительно разведенных 1:150. Выделенные HSP идентифицировали с использованием мышиных поликлональных антител против GRP94 (Affinity Bioscience, Цинциннати, Огайо, Германия), HSP 90 кДа альфа В1 (HSP90aB1), HSP 70 кДа 1А (HSPA1A), HSP 70 кДа 1В (HSPA1B) и HSP 70 кДа 1В (HSPA1B). 27 кДа (Cloud-Clone, Кэти, Техас, США). Когда происходило биоспецифическое взаимодействие, антитела связывались с антигеном, адсорбированным на мембране. Затем мембрану отмывали от неспецифически связанных антител и погружали в раствор ЗНЧ, конъюгированных со стафилококковым белком А (поглощение $A_{520} = 1$). Через 5–60 мин связывание конъюгата с комплексом антиген-антитело наблюдалось визуально в виде серии красных пятен [234].

Проводили электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) по Лэммли [157]. В каждый гель были включены стандарты белка-маркера молекулярной массы (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США). После электрофореза гели окрашивали Кумасси бриллиантовым синим R-250 (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США). Для вестерн-блоттинга образцы после электрофореза переносили на мембрану Western S с помощью полусухого блоттинга и инкубировали мембрану в течение 1 ч в блокирующем буфере, содержащем 10 мМ PBS, 0,1% Tween 20 и 5% обезжиренного сухого молока. Наконец, мембрану инкубировали в течение 1 ч в растворе сыворотки, содержащей антитела, и результаты реакции детектировали с помощью ЗНЧ, конъюгированных со стафилококковым белком А (поглощение $A_{518} = 1$).

На третьем этапе были проведены исследования по изучению онкопротекторных свойств конъюгатов HSP/Au Np на лабораторной модели.

Для выявления иммуногенности полученных препаратов проводили иммунизацию белых беспородных крыс.

Препарат вводится внутривентриально (500 мкл на крысу). Иммунизация проводилась 2-х кратно с интервалом в 10 дней исследование

пролиферативной активности и титра АТ проводятся через 7 дней после последней иммунизации.

1 группа Антиген АГ+ Физиологический раствор вводится по 500 мкл внутрибрюшинно доза 6,24 мкг.

2 группа Антиген АГ+ КЗ вводится по 500 мкл внутрибрюшинно доза 6,24 мкг.

3 группа Антиген АГ+ КЗ вводится + ПАФ 1000 мкл внутрибрюшинно доза 6,24 мкг.

4 группа (контроль) вводится 500 мкл КЗ.

Титр полученных антител в сыворотке крови определяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) с применением меченных пероксидазой хрена антител к IgG мышей (Jackson ImmunoResearch, UK), используя синтетический пептид в качестве иммобилизованного антигена. Результаты реакции регистрировали на микропланшетном спектрофотометре Plate Screen [3]. При постановки иммуноферментного анализа сыворотка от исследуемых животных разводилась в 10 раз, после чего проводили ее двоичное титрование.

Спленоциты выделяли по следующей методике: селезенка перетиралась в ступке с раствором Хенкса и пропускалась через нейлоновый фильтр. Мононуклеарные клетки выделяли на градиенте фикол-верографина, лизировали эритроциты 0,83% хлористым аммонием.

Изучали изменение пролиферативной активности с использованием фитогемагглютинином (ФГА), липополисахарида (ЛПС) и антигена.

При исследовании способности лимфоцитов отвечать пролиферацией на стимуляцию фитогемагглютинином (ФГА) и конканавалином А можно судить о функциях Т-клеток, на стимуляцию липополисахаридом — о функциях В-клеток, а на стимуляцию митогеном лаконоса — о кооперативных процессах между Т- и В-лимфоцитами. Пролиферативный ответ лимфоцитов на антигены позволяет составить представление о выраженности специфической сенсibilизации организма.

Оценка пролиферативной активности лимфоцитов в МТТ-тесте: клетки с ФГА (опыт) и без него (контроль) разделить по 200 мкл в лунки планшета (по 4 лунки на каждый образец). Планшет поместить в инкубатор с CO₂ или эксикатор, в котором созданы соответствующие условия для инкубации: влажность (вода на дне эксикатора) и атмосфера, обогащенная CO₂ (зажженная свеча). Эксикатор поместить в термостат при 37° С. Длительность инкубации — 72 ч. Через 72 ч во все лунки добавить по 20 мкл 0,5% раствора МТТ и инкубировать планшет еще 3,5 ч. Маточный раствор МТТ готовят на фосфатном буфере в концентрации 5 мг/мл и хранят при 4° С в темной посуде не более 2 недель. Осторожно отсосать 165–170 мкл надосадка из лунок и добавить по 150 мкл ДМСО (в вытяжном шкафу), для растворения образовавшихся гранул формазана, содержимое лунок необходимо тщательно пипетировать либо использовать микрошейкер для встряхивания планшет. Оптическую плотность (OD) раствора измеряют в иммуноферментном анализаторе при длине волны 560 нм. Коэффициент пролиферации вычисляют по формуле: $K = OD \text{ опыт} / OD \text{ контроль}$.

ЗНЧ с антигеном ЗНЧ в комплексе с белками теплового шока, полученными из лизата цельных клеток МН22а, использовали для иммунизации белых мышей линии BALB/c (18– 20 г). Животные были разделены на шесть групп по пять штук в каждой. Группа 1 получала раствор антигена, разведенного в PBS (3 мкг; 250 мкл); группа 2 — конъюгат ЗНЧ с антигеном (3 мкг; 250 мкл); группа 3 — конъюгат, эмульгированный 1:1 с полным адьювантом Фрейнда (CFA) (3 мкг; 500 мкл); группа 4 — раствор ЗНЧ (250 мкл). Животных иммунизировали внутрибрюшинно двумя инъекциями с интервалом 10 дней между ними. Через семь дней после последней иммунизации животным вводили подкожные трансплантаты опухолевых клеток МН22а в область спины. Их вводили в холку в дозе 1×10^9 клеток/мышь. Первые признаки опухолей появились через 14 дней после заражения; на 21-й день опухоли были наиболее отчетливо видны. На 24-й день животных подвергали эвтаназии при этом брали кровь для определения

титра антител и содержания интерферона (γ) и интерлейкинов (1 и 6). Кроме того, выделяли перитонеальные клетки для измерения дыхательной активности (тест МТТ) и оценивали гистологию опухоли [234].

За животными ухаживали и обращались с ними в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных, Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, и законодательством Российской Федерации. Использование животных также было одобрено учреждением, в котором проводились эксперименты.

Титр антител оценивали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с мечеными пероксидазой хрена вторичными антителами против IgG мыши (Jackson Immuno Research, Кембридж, Великобритания) [228]. Результаты реакции регистрировали на планшетном анализаторе (Hospitex Diagnostics, Sesto Fiorentino, Италия). Сыворотки животных разбавляли в 10 раз и затем дважды титровали. Концентрацию интерлейкинов в сыворотке крови определяли методом ИФА с наборами реагентов для ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИФН- γ (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия [234].

Для выделения перитонеальных макрофагов животных подвергали эвтаназии с применением средств для наркоза (Изофлуран) методом транслокации шейных позвонков, а затем фиксировали на спине. Делали разрез по средней линии передней брюшной стенки и осторожно отделяли кожный лоскут, соблюдая осторожность, чтобы не повредить брюшину. После прокола иглой, соединенной со шприцем, в брюшную полость вводили 50 мл PBS, pH 7,2. Затем осторожно массировали переднюю брюшную стенку и через 5–7 мин пипеткой Пастера через разрез, сделанный в брюшине, отбирали перитонеальную жидкость и фильтровали в пробирку через нейлоновый фильтр. Клетки трижды отмывали центрифугированием в PBS при 750 \times g, после чего ресуспендировали в 1 мл PBS и подсчитывали в камере Горяева. Перитонеальные макрофаги культивировали по стандартным методикам [163,234].

Дыхательную активность перитонеальных макрофагов измеряли по способности клеток восстанавливать нитротетразолиевый синий [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид] до формазана (тест МТТ) [43]. Экспериментальные и контрольные клетки (по 200 мкл каждого вида) добавляли в лунки микротитрационного планшета и помещали планшет в CO₂-инкубатор. Через 72 ч во все лунки добавляли по 20 мкл 0,5% раствора МТТ и инкубировали планшет еще 3,5 ч. Исходный раствор МТТ (5 мг/мл) готовили с PBS и хранили при 4°C в темном сосуде не более 2 нед. Затем из лунок осторожно отбирали 165–170 мкл надосадочной жидкости и добавляли 150 мкл ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов формазана. Содержимое лунок тщательно пипетировали; в качестве альтернативы для встряхивания планшетов использовали микрошейкер. Поглощение раствора измеряли на устройстве для считывания микропланшетов Spark-10M (Tecan, Männedorf, Швейцария) при 560 нм. Коэффициент пролиферации рассчитывали по формуле $K = A_{exp}/A_{control}$.

Животных умерщвляли смещением шейных позвонков под наркозом. Размер опухоли измеряли микрометром с ценой деления 0,1 мм. Для гистологического исследования целые опухоли помещали в емкость с 10% нейтральным водным забуференным раствором формальдегида, 96° спиртом и фиксатором Карнуа. Из фиксированных опухолей по стандартной методике изготавливали парафиновые блоки (среда для заливки Histomix; БиоВитрум, Санкт-Петербург, Россия). Срезы получали на выдвижном микротоме MICROM HM 450 (Германия).

Для микроскопического исследования срезы окрашивали гематоксилин-эозином по методу Эрлиха. Окрашенные срезы заливали канадским бальзамом (Панреак, Барселона, Испания) под покровное стекло и просматривали на биологическом микроскопе Микромед С-1 (Биомед, Санкт-Петербург, Россия). Микрофотографии были сделаны камерой PowerShot A460 IS (Canon, Токио, Япония).

На четвертом этапе проводился отбор опухолей молочной железы у больных животных (кошки) и осуществлялось выделение клеточных линий из этих новообразований по методу Агилера [128] с нашими модификациями.

Для выделения HSP использовали трех стерилизованных кошек в возрасте 9 (K1), 12 (K2) и 13 (K3) лет с подтвержденным онкологическим диагнозом. Уход за животными и обращение с ними соответствовали требованиям Министерства здравоохранения Российской Федерации (работа клиник экспериментальной биологии) и Европейской конвенции по защите позвоночных. Животные, используемые в экспериментальных и других научных целях. Диагноз был подтвержден клинической картиной и цитологическими исследованиями. Цитологический анализ проводили с помощью набора реагентов Leucodif 200 (Lachema, Чешская Республика). После удаления неоплазии опухолевые клетки были выделены. С этой целью опухоль измельчали на кусочки размером 2-4 мм, центрифугировали при 2000 g в течение 5 мин, ресуспендировали в 0,3% растворе химотрипсина и инкубировали при 37 °C в течение 30 мин в термошейкере. После промывки при 2000 г в течение 5 мин процедуру с химотрипсином повторяли в течение 10 мин. После повторной промывки клетки ресуспендировали в модифицированной среде Eagle's компании Dulbecco (БиолоТ, Россия) с 10% фосфатно-буферным физиологическим раствором (PBS; БиолоТ), пенициллин (100 ед/мл), стрептомицин (100 мкг/мл), L-глутамин (292 мкг/мл) и 10% сыворотки. Клетки выращивали в культуральной чашке на шесть лунок, после чего их удаляли путем трипсинизации и выращивали в культуральных колбах.

Образцы были взяты сразу после хирургического удаления опухоли. Опухоль была разрезана на мелкие кусочки, и на одном предметном стекле было сделано несколько отпечатков. Затем препарат высушивали и окрашивали набор реагентов Leucodif 200 (Lachema, Чешская Республика). Окрашенные мазки-отпечатки просматривали на биологическом микроскопе

Микромед С-1 (Биомед, Санкт-Петербург, Россия). Микрофотографии были сделаны камерой CANON PowerShot A460 IS (Canon, Токио, Япония).

На пятом этапе нашей работы мы получали фаговые антитела, специфичных к белкам теплового шока, и занимались изучением их характеристик. Для этого, после того, как был сформирован монослой, клеточный HSP были выделены, как описано ранее. Полученный осадок использовали для дальнейшей хроматографической очистки HSP. Клетки МН-22а, HeLa и SPEV культивировали в модифицированном Dulbecco Среда Eagle's с 10% PBS (BioloT), пенициллином (100 ед/мл), стрептомицином (100 мкг/мл) и L-глутамином (292 мкг/мл). Белки очищали на колонке Toyopearl DEAE-650 (1 см × 5 см; Sigma, США) с помощью хроматографа NGC Quest 10 (Bio-Rad, США). Фазу уравнивали 0,05 М трис–HCl (pH 7,5). Уравновешенный образец (100 мкл), содержащий 240 мкг HSP, наносили на колонку. Элюаты собирали в виде фракций с использованием ступенчатого градиента 0-0,5 м NaCl в H₂O. Значения поглощения элюатов контролировали при 280 нм с помощью спектрофотометра Spectronic 21 (Thermo Scientific, США). Электрофорез додецилсульфата натрия в полиакриламидном геле (SDS–PAGE) (10%) было выполнено в соответствии с Laemmli (1970) и Osborne and Brooks (2006). Для каждого геля использовали стандартные белки-маркеры молекулярной массы (Sigma). Гели были окрашены Кумасси Ярко-синий R-250.

HSP (далее - антигены HS), выделенные из опухолевых линий, были иммобилизованы на деионизированном метанолом поливинилидендифториде (PVDF) мембрана. Затем мембрану блокировали 2%-ным сухим молоком в PBS в течение 1 ч на шейкере при комнатной температуре, трижды промывают в PBS и используют для сбора антител. Антитела, специфичные к антигенам, были получены с использованием неиммунной библиотеки фагов scFv человека (Ulitin et al., 2005). Фаговые антитела были аффинно отобраны, как описано в работе Staroverov et al. (2021). Компетентная культура была

заражена кишечной палочкой (TG-1.14). Фаг подвергали осаждению при 4000 g в течение 1 ч, и осадок ресуспендировали.

Была исследована способность выбранного фага связываться с антигеном методом точечного иммуноанализа, как описано у Kumar-Pawaiya [155]. С этой целью 3 μ L антигена, разведённого капельно в воде (концентрация, 90–0.01 μ г/мл) наносили на нейтрализованную метанолом PVDF мембрану и мембрану инкубировали в течение ночи при 4° C для фиксации. После промывания тремя сменами PBS, мембрану блокировали 2 мл 2% сухого обезжиренного молока с 10¹² фаг/мл и инкубировали на шейкере при комнатной температуре в течение 1 ч. После трех промывок в PBS, мембрану инкубировали на шейкере в течение 2 мл PBS с 50 μ L поликлональной сыворотки кролика против цельной библиотеки. После трехкратной промывки мембрану помещали в 2 мл антикроличьих антител, меченных пероксидазой хрена (Sigma–Aldrich, США). Антитела разводили 1:500 с 10 мм PBS (pH 7,4). Мембрану инкубировали при 37 ° C в течение 1 ч на термошейкере. Положительным контролем были мембраны с нанесенным ϕ 1-фаговым и хелперным фагами из целой библиотеки.

Шестой этап включал в себя изучение динамики белков теплового шока при карциноме молочной железы.

В условиях клиники у онкологически больных животных (кошек) брали кровь по 2 мл в пробирки и центрифугировали (800 - 1 Электрическая центрифуга, Китай) при 3000 оборотов в минуту для дальнейшего получения сыворотки крови. Забор крови осуществлялся из передней подкожной вены предплечья. В результате получали сыворотку в объеме 1 мл.

ИФА осуществлялся по методу Beatty et al. [40]. Сыворотки, отобранные у спонтанно заболевших кошек, были разведены 1:20 в 0,05 M карбонат–бикарбонатным буфером (pH 9,6), адсорбированы на дне чашки и инкубированы в течении ночи при 4°С. Сыворотки от здоровых кошек использовались в качестве отрицательного контроля. Связывание HSP кошек проявляли с помощью кроличьих антител, комплекс HSP-антитело выявлялся

козьими анти-кроличьими антителами к IgG кролика. Брали субстрат пероксидазы 100 μ L от 0,006% о-фенил-энедиамина (Fluka, Швейцария) в 0,1 М цитратном буфере (pH 6,0), кон-содержит 0,01% перекиси водорода. Реакция была остановлена с помощью 100 μ L 0,1 М серной кислоты. Оптическое поглощение изучали на мультискан спектрофотометр Ascent + с микропланшетом (Thermo Scientific, США) при 490 нм. В ИФА положительным контролем был антиген HS, выделенный из опухолевых клеток молочной железы спонтанно заболевших животных. Отрицательным контролем был антиген HS выделенный из клеток мышинной гепатомы MH22a. В обоих случаях методика выделения была одинаковой.

После выращивания клеточных линий в течение 10 ч культуральные колбы исследовались с помощью лазерного диссектора Leica LMD 7000 (Leica Microsystems, Германия; метод фазового контраста, TL-PH; увеличение, \times 40) на базе ИБФРМ Обособленное структурное подразделение ФИЦ СЦ РАН, г. Саратов.

Данные обрабатывались с помощью стандартных процедур, интегрированных в Excel Программное обеспечение 2007 (Microsoft Corp., США). Использовали *U*-тест Манна-Уитни для сравнения непрерывных переменных. Исследовали три группы животных. Были сформированы группы в разное время, потому что животные заболели спонтанно. Р значение рассчитывали относительно контрольной группы (клинически здоровых животные). Контрольная группа состояла из трех животных, и кровь была взята для анализа в аналогичные сроки. Были рассмотрены различия значений при $P \geq 0,05$.

Результаты статистически обработаны с использованием стандартных процедур, интегрированных в программу Excel 2019 (Microsoft, Redmond, WA, USA). После нахождения среднего арифметического значения и стандартного отклонения для заданной выборки данных определяли стандартную ошибку среднего арифметического и ее доверительные границы с учетом коэффициента Стьюдента (n , p) [количество измерений $n = 3$,

уровень значимости = 95% ($p = 0,05$)]. Достоверность различий между отдельными выборками оценивали с помощью двухвыборочного непарного t -критерия Стьюдента с неравными дисперсиями. Различия считались достоверными, когда экспериментально найденное значение p_{exp} было $0,05$. Различия считали достоверными при выполнении неравенства $p \geq 0,05$. Кроме того, в этих случаях контролировали также соблюдение неравенства $t, t(n, p)$ при $n = (df + 1)$ (где df – число степеней свободы), $p = 0,05$, где $t = |x_1 - x_2| / (s_1^2 + s_2^2)^{1/2}$, x_1 и x_2 – среднеарифметические значения, s_1 и s_2 – их стандартные ошибки для двух выборок экспериментальных данных. Различия определяли при $p \leq 0,05$ уровне значимости [5,234]. Цифровой материал представляется в единицах СИ, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения и стандартом СЭВ 1062-78.

3.2. Результаты исследований и их анализ

3.2.1. Выделение HSP из клеточной линии МН22а

Нами проводилась работа по выделению антигена из онкологической линии клеток МН22а следующим способом, после достижения роста клеток на поверхности культурального флакона более чем на 90% флаконы прогревали при 42°C в течение 1 часа и затем инкубировали в течение 2 часов при 37°C . После чего проводили лизирование клеток.

Лизис клеток и выделение белков теплового шока.

1. Аккуратно промывали флакон четыре раза 10 мл подогретого HBSS. Не полоскать.

2. После чего добавляем 15 мл / флакон DMEM с 4 мМ глутамина и 2 мМ PMSF и инкубируем 1 час при 37°C , вращая со скоростью 1 об / мин, чтобы истощить монослой адсорбированных белков сыворотки (объем 10 мл).

Затем проводили клеточный лизис:

После отмывки к монослою приливаем 10 мл цитомикса (120 мМ KCl, 0.15 мМ CaCl₂, 2 мМ EGTA (брали EDTA), 5 мМ MgCl₂, 10 мМ

K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 8.0, 25 mM HEPES pH 8.0) + 2 mM PMSF и замораживаем при -20 °C затем проводится оттаивание при 37 °C. Эту процедуру повторяют 3 раза. Затем надосажок переносится в центрифужную пробирку и откручивается при 10000 g 15 минут.

Полученный лизат клеток осаждали сульфатом аммония (AS) при 40% насыщения (24,2 г / 100 мл) в течение 1 ч при +4 ° C (вносится порошок сульфата аммония до 40% насыщения) при перемешивании с последующим центрифугированием при 20 000 g в течение 20 мин при 4 ° C. Отбирали супернатант и проводили дальнейшее высаживание, доводя концентрацию сульфата аммония до 80% насыщения.

Супернатант медленно доводили до 80% насыщения AS, используя твердый AS (28,1 г / 100 мл), и инкубировали в течение 1 ч при 4 ° C с последующим центрифугированием при 20 000 g в течение 20 мин при 4 ° C. Полученный осадок после этого, названный «осадком 40–80% AS†, диализовали против фосфатно-солевого буфера. В дальнейшем полученный препарат осветляли центрифугированием при 20 000 g в течение 20 мин. Проводили хроматографическую очистку (Рисунок 2) и замораживали при -70°C.

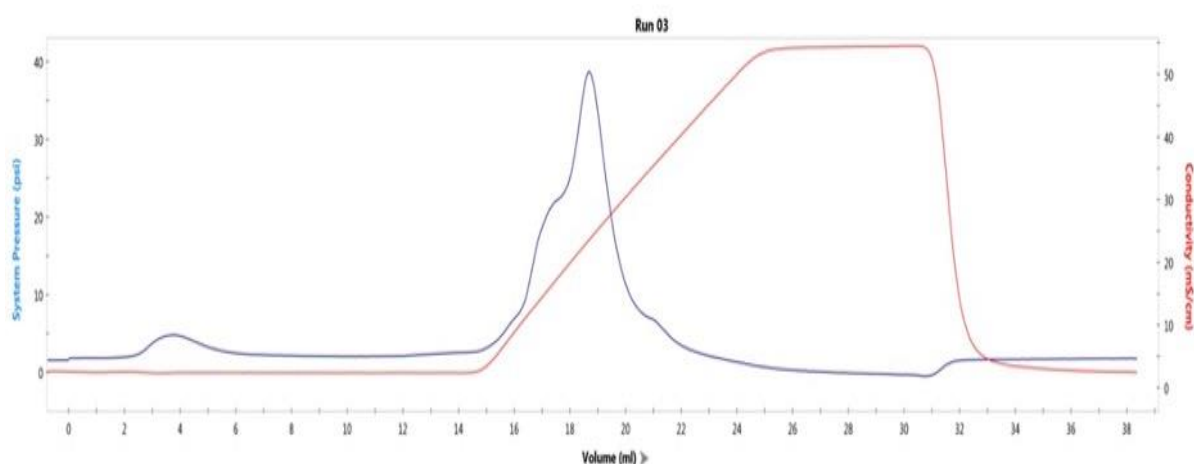


Рисунок 2 – Профиль элюции термостабильных белков, выделенных из культуры МН22а. Пик приходится на 19 мл

3.2.2. Получение конъюгатов золотых наночастиц с HSP и их характеристика

Идентификацию Ag, выделенного из клеток линии МН22а гепатомы мыши, проводили методом иммунодот-анализа с использованием кроличьих поликлональных Ат к HSPs (Рисунок 3). В результате проведенных исследований было установлено, что выделенные антигены несут в своем составе белки, которые реагируют с антителами против HSPs: GRP94Ab, HSP90aB1, HSPA1A, HSPA1B, HSP27.

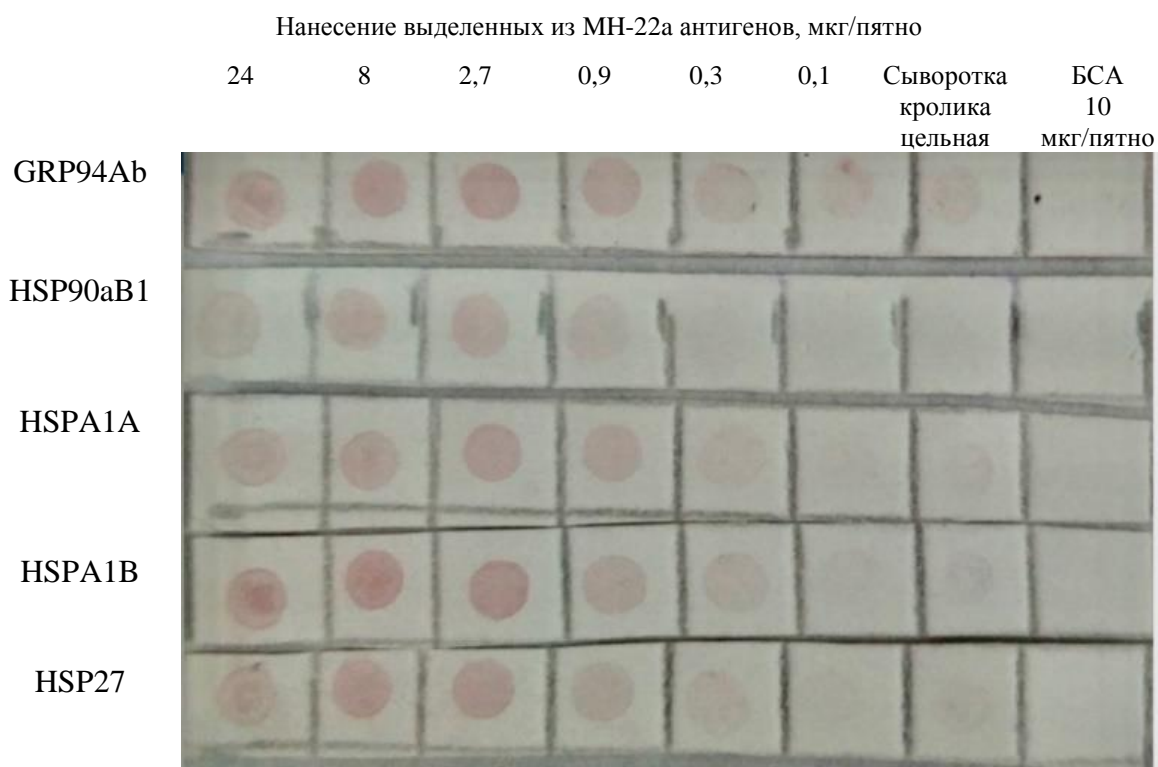


Рисунок 3 – GRP94Ab-применялись антитела против GRP94; HSP90aB1-применялись антитела против HSP90aB1; HSPA1A-применялись антитела против HSPA1A; HSPA1B-применялись антитела против HSPA1B; HSP27-применялись антитела против HSP27

После хроматографической очистки проводили иммунизацию кроликов полученным термостабильным Аг. Антиген вводили вместе с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ). Через 10 суток после последней иммунизации проводили забор крови. Специфическую активность (титр) антисывороток определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) по общепринятой схеме. Титр составил 1:131072. Оценку качества полученных кроличьих поликлональных сывороток проверяли с использованием Вестерн-блота.

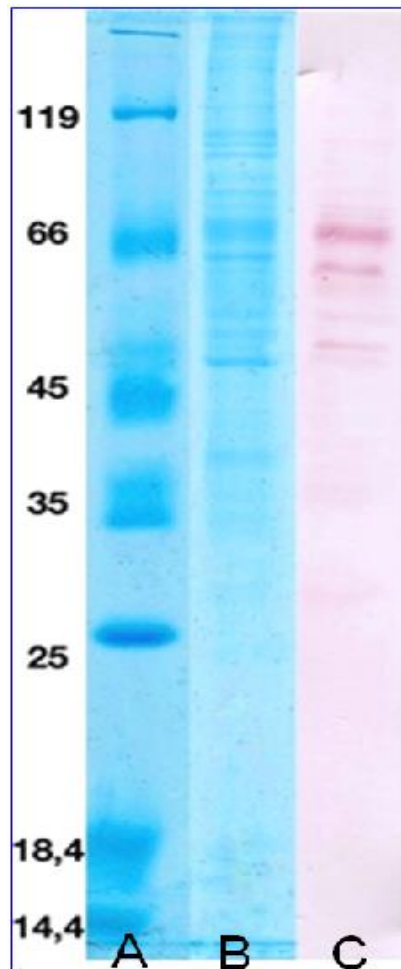


Рисунок 4 – Результаты SDS-ПААГ электрофореза (А – маркеры молекулярной массы; В – анализ) и блот-анализа (С) термостабильных белков, выделенных из культуры MN22a

На (Рисунок 4) приведены результаты SDS-ПААГ электрофореза и блот-анализа термостабильных белков, выделенных из культуры МН22а. Полученная антисыворотка специфически распознавала пептиды в области 45-66 кДа. Максимум спектра поглощения, полученного золя коллоидного золота составил $\lambda_{\max}=518$ нм, при этом оптическая плотность в 1 см кювете составила $A_{518}=1,1$. По данным ТЭМ, средний диаметр полученных наночастиц составил $15,2 \pm 1,2$ нм (Рисунок 5). Число частиц в 1 мл при $A_{520}=1$ составляло $1,6 \times 10^{12}$. По нашим данным, использование для иммунизации золотых наночастиц сферической формы со средним диаметром 15 нм является оптимальным [46].

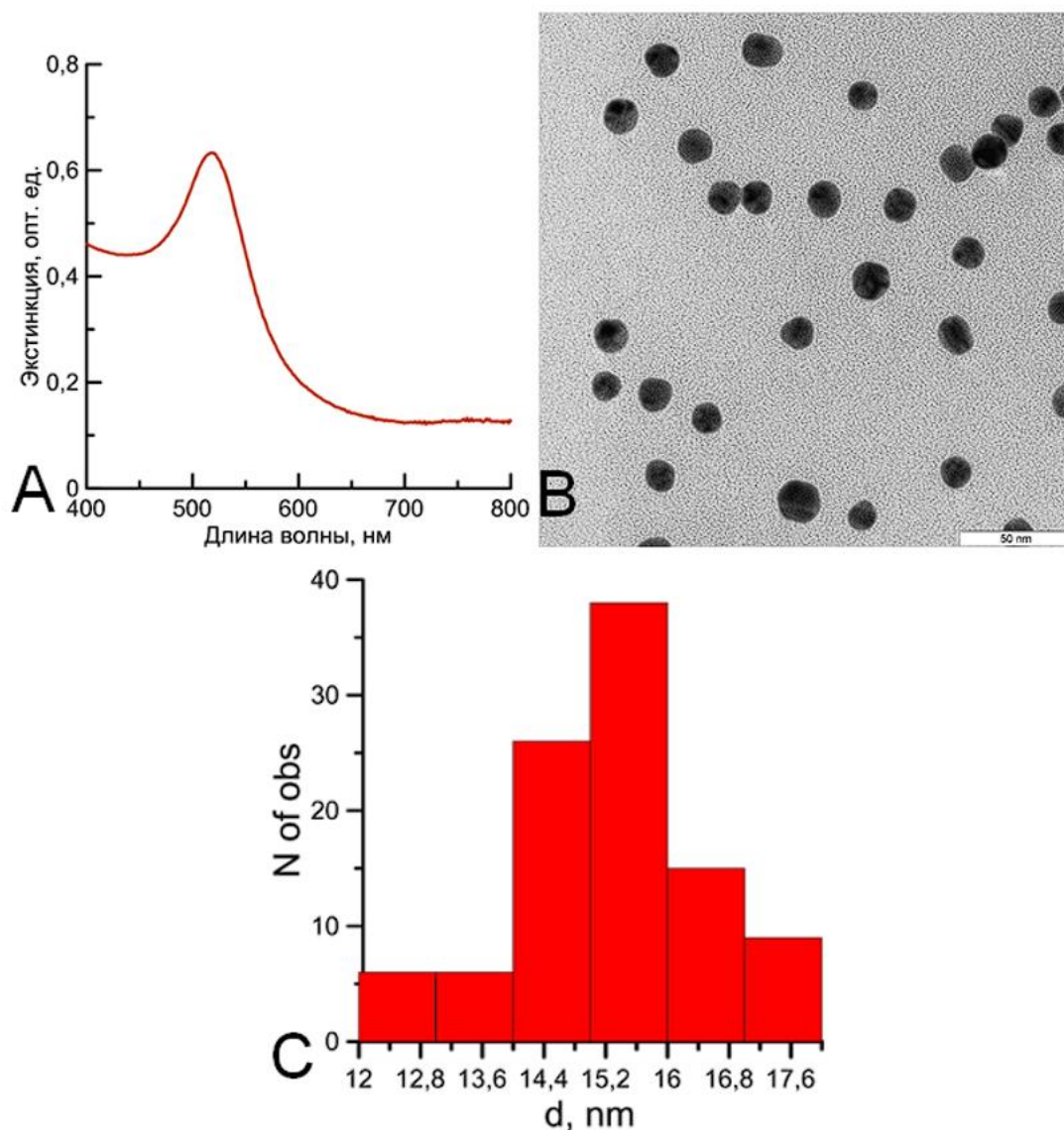


Рисунок 5 – Характеристика ЗНЧ: спектр поглощения (А), ТЭМ изображение (В) и распределение по размерам по данным ДРС (С)

3.2.3. Оценка иммунологических свойств конъюгатов наночастиц золота и НЧЗ на лабораторных животных

На следующем этапе проводили иммунизацию крыс выделенным Аг, конъюгированным с НЧЗ. Максимум спектра поглощения, полученного золя составил $\lambda_{\max}=518,1$ нм, при этом оптическая плотность была $A_{520}=1,09$. По данным ТЭМ и ДРС, средний диаметр полученных наночастиц составил 15,6 нм. Число частиц в 1 мл при $A_{520}=1$ составляло $1,6 \times 10^{12}$. По нашим данным, использование для иммунизации НЧЗ сферической формы со средним диаметром 15 нм является оптимальным.

Наиболее высоким титр Ат оказался у крыс, иммунизированных комплексом Аг+НЧЗ+ПАФ, он составил в среднем 1:136533 (при максимальном титре 1:163840). Иммунизация животных комплексом Аг+НЧЗ дало средний титр 1:61440 (при максимальном титре 1:81920). При иммунизации Аг средний титр Ат составил 1:27306 (при максимальном титре 1:40960). Наиболее высокая пролиферативная активность лимфоцитов крыс при их культивировании с ФГА отмечалась у крыс, иммунизированных конъюгатом Аг+НЧЗ (Рисунок 6). Она была выше в 1,8 раза относительно группы, которой вводили НЧЗ. В группе животных, иммунизированных Аг+НЧЗ+ПАФ, изменений пролиферативной активности в отношении ФГА не наблюдалось. При введении Аг мы наблюдали снижение пролиферативной активности в 1,5 раза.

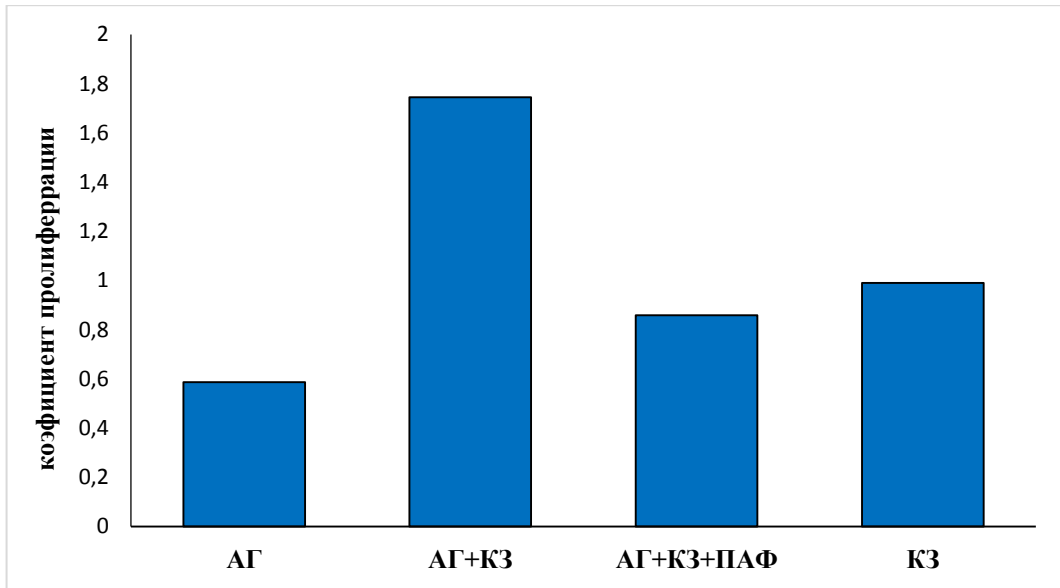


Рисунок 6 – Изменение дыхательной активности лимфоцитов при их культивировании с фитогемагглютинином

Наиболее высокая пролиферативная активность лимфоцитов крыс при их культивировании с ЛПС отмечалась при иммунизации Аг и Аг+НЧЗ+ПАФ. Она была выше в 1,4 и 1,7 раза относительно группы, которой вводили НЧЗ, соответственно. В группе, иммунизированной Аг+НЧЗ, наблюдали снижение пролиферативной активности в 1,6 раза (Рисунок 7).

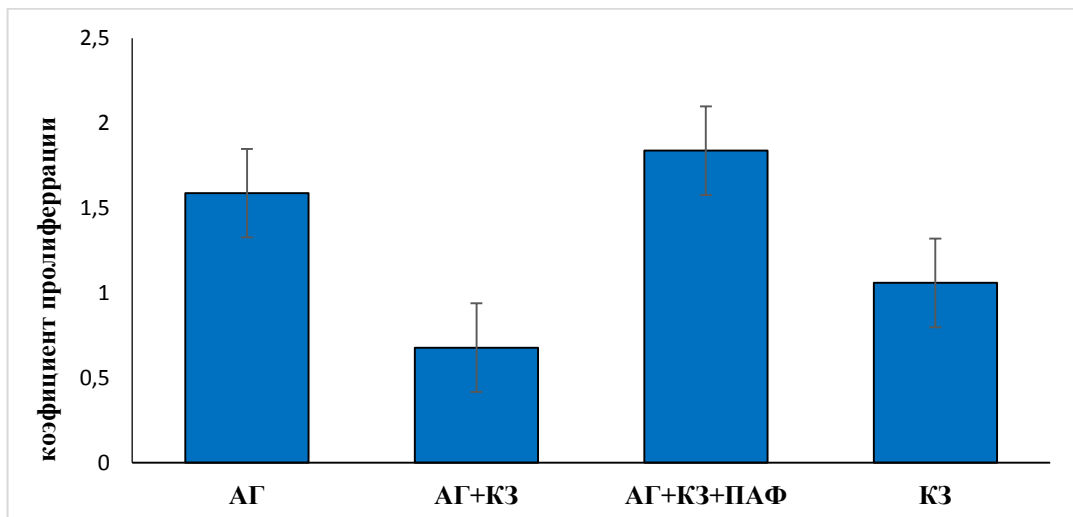


Рисунок 7 – Изменение дыхательной активности лимфоцитов при их культивировании с липополисахаридом

Повышение пролиферативной активности лимфоцитов крыс наблюдали при их культивировании с Аг в группах животных, иммунизированных Аг, Аг+НЧЗ+ПАФ и Аг+НЧЗ. Она была выше, соответственно, в 1,4; 1,6 и 1,8 раза относительно группы, которой вводили НЧЗ (Рисунок 8).

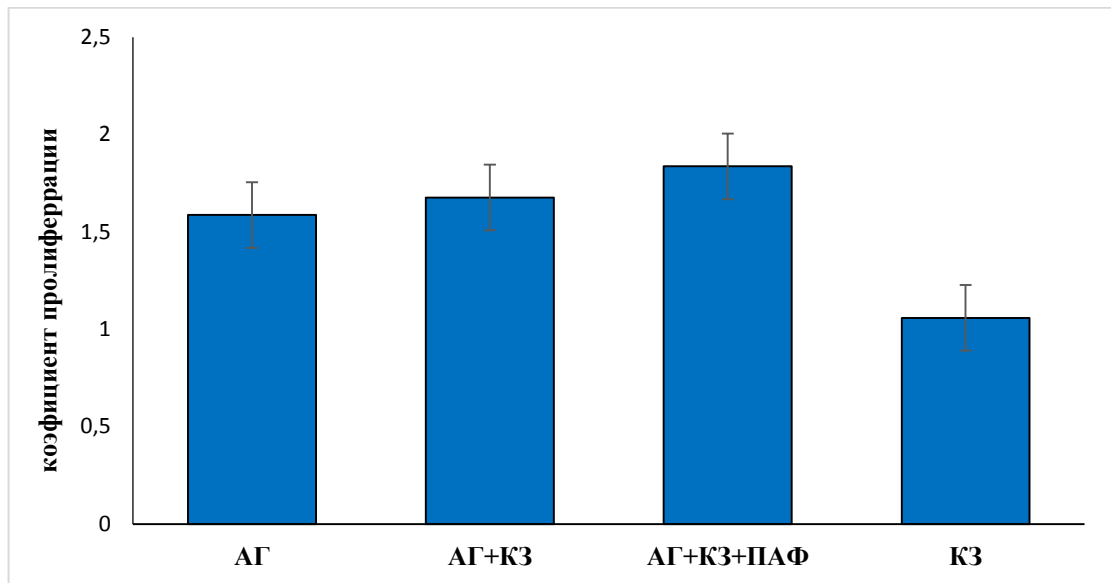


Рисунок 8 – Изменение дыхательной активности лимфоцитов при их культивировании с НСП

Методом ИФА был определен уровень выработки провоспалительных цитокинов при иммунизации крыс по различным схемам. Установлено, что уровень интерферона- γ в группе крыс, иммунизированной Аг+НЧЗ, был выше по сравнению с контролем (группа, которой вводили НЧЗ) в 2,3 раза. В остальных группах не выявлено статистически значимых изменений (Рисунок 9). При сравнении уровня интерлейкина 6 наблюдалось повышение уровня в первой и третьей группах, которую иммунизировали (Аг+НЧЗ+ПАФ и Аг), в остальных группах уровень интерлейкина 6 был ниже и оставался примерно на одном уровне (Рисунок 10). При сравнении уровня интерлейкина 1 мы наблюдали повышение уровня интерлейкина в группе, иммунизированной Аг+НЧЗ+ПАФ в 12 раз по сравнению с группой,

иммунизированной НЧЗ, в остальных группах уровень интерлейкина 1 был выше и оставался примерно на одном уровне (Рисунок 11).

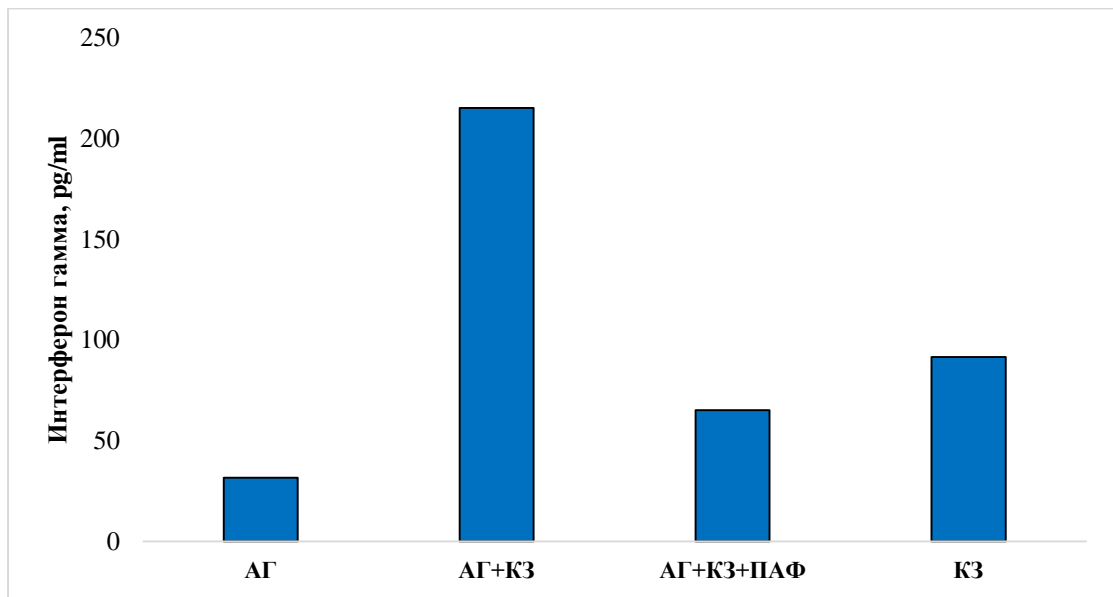


Рисунок 9 – Концентрация интерферона гамма в сыворотки крови, полученной при иммунизации крыс конъюгатами антигена и введение клеток МН22а

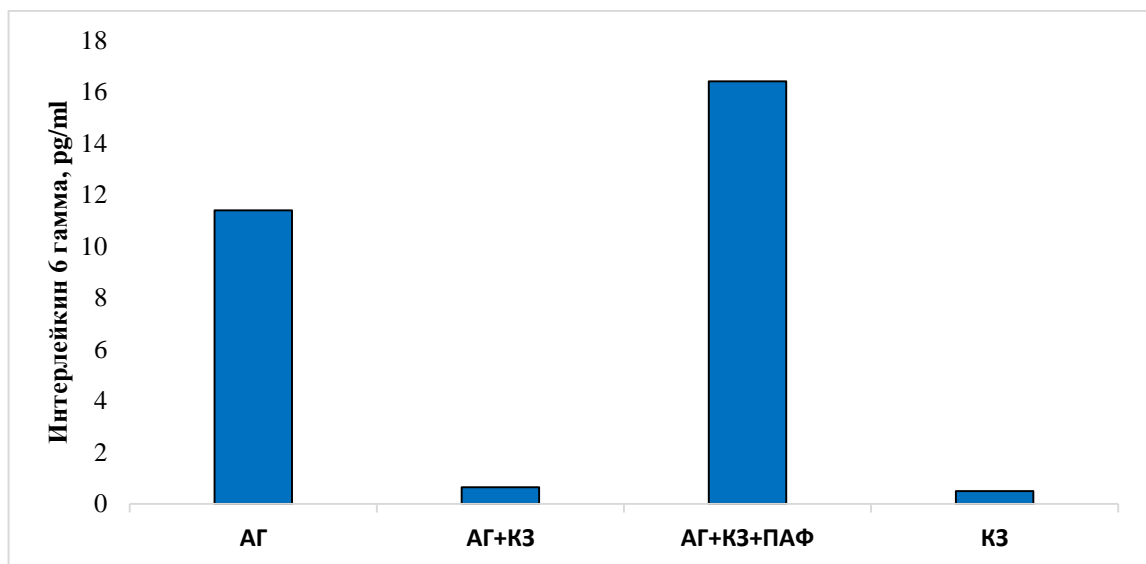


Рисунок 10 – Концентрация ИЛ6 гамма в сыворотки крови, полученной при иммунизации крыс конъюгатами антигена и введение клеток МН22а

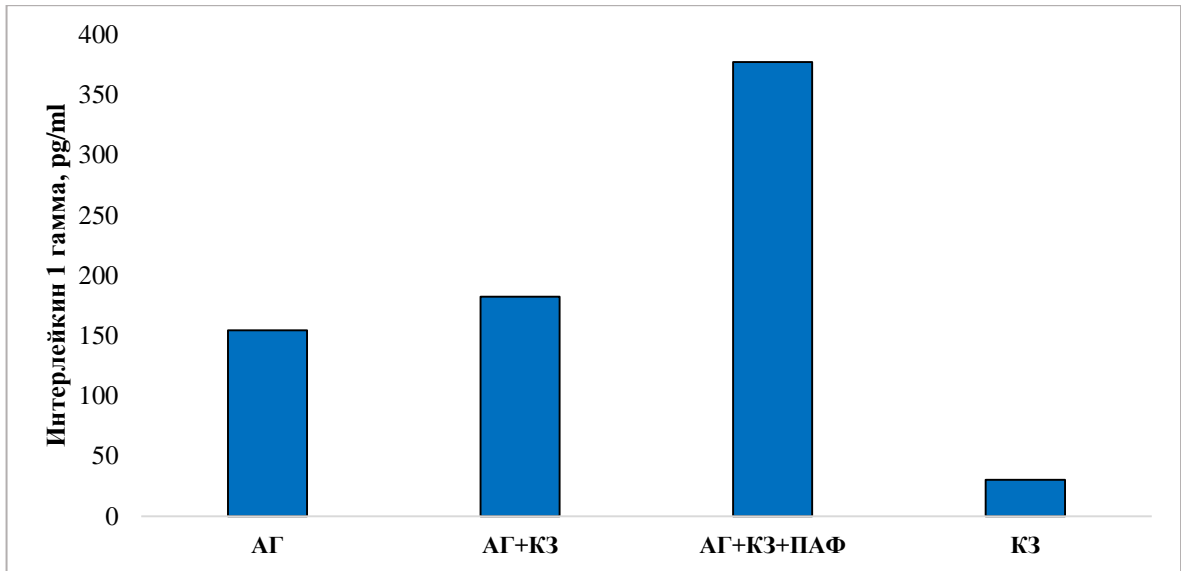


Рисунок 11 – Концентрация ИЛ1 гамма в сыворотки крови, полученной при иммунизации крыс конъюгатами антигена и введение клеток МН22а

3.2.4. Изучение онкопротекторных свойств конъюгата белков теплового шока с наночастицами золота

Целью следующего этапа исследований было изучение влияния конъюгатов наночастиц золота с белками теплового шока на рост и способность к перививаемости клеток линии МН22а. После проведения трансплантации первые признаки опухолей появлялись на 14 день после заражения, на 21 день опухоли были видны наиболее отчетливо (Рисунок 13).

Титры Ат, полученных при иммунизации по различным схемам, приведены в (Таблица 1). Наиболее высоким оказался титр Ат у мышей, иммунизированных комплексом Аг+НЧЗ+ПАФ он составил в среднем 1:10666 (при максимальном титре 1:12800). Иммунизация животных Аг и НЧЗ дала средний титр 1:1200 (при максимальном титре 1:1600) и 1:1066 (при максимальном титре 1:1600), соответственно. Средний титр Ат при иммунизации Аг+НЧЗ составил 1:366 (при максимальном титре 1:800).

Таблица 1 – Титры Ат, полученных при иммунизации мышей по различным схемам, после трансплантации клеток опухоли

Группы животных	Титры антител			t-тест Стьюдента относительно антигена, $p \leq 0,05$
	Средний титр	Максимальный титр	Средний титр, \log_2	
Аг	1:1200	1:1600	10,14±0,9	
Аг+НЧЗ	1:366	1:800	8,14±2,03	0,092
Аг+НЧЗ+ПАФ	1:10666	1:12800	13,31±0,8	0,00062
НЧЗ	1:1066	1:1600	9,997±0,8	0,074

Определение дыхательной активности проводили с помощью МТТ-теста по общепринятому методу [43]. Существенных различий по МТТ-тесту в 1-й, 2-й и 3-й группах мышей не обнаружено. Отметим снижение дыхательной активности в 4-й группе, иммунизированной НЧЗ (Рисунок 12).

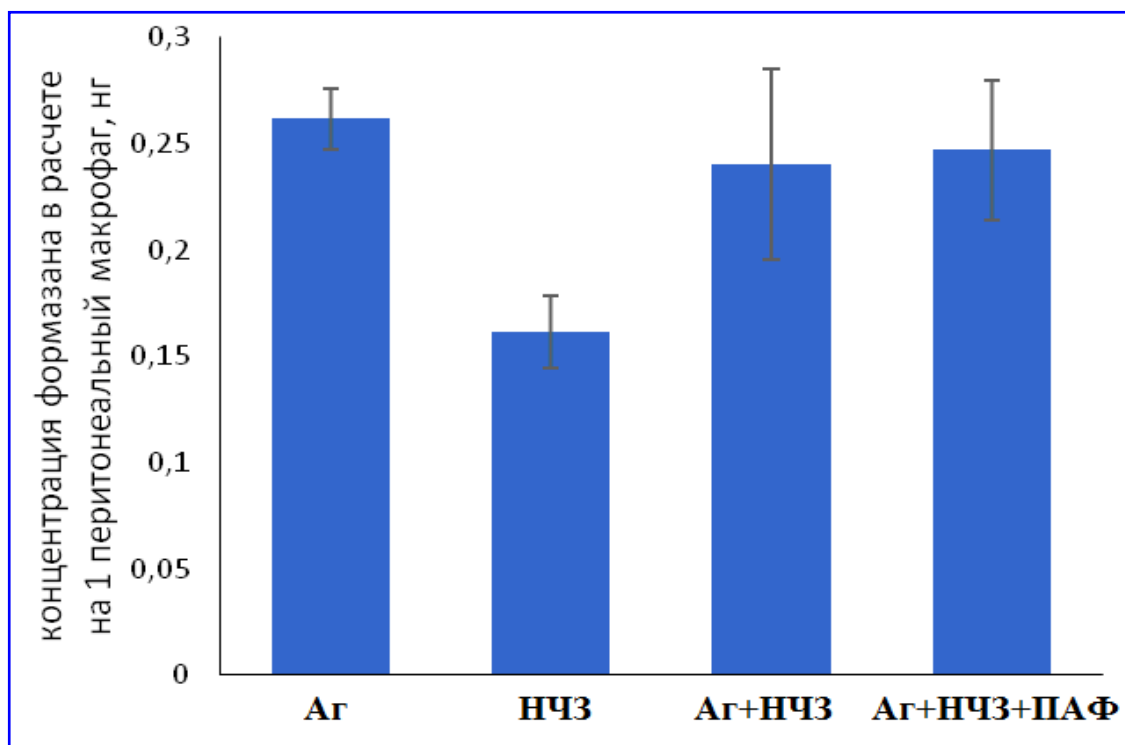


Рисунок 12 – Изменение дыхательной активности перитонеальных макрофагов мышей при иммунизации по различным схемам термостабильным Аг, выделенным из клеток МН22а

МТТ тест показал, что дыхательная активность макрофагов при взаимодействии с чистым антигеном $\approx 0,260$ нг, что примерно равно взаимодействию антиген+ наночастицы золота и антиген+ наночастицы золота+ полный адъювант Фрейнда. Данные показатели значительно отличаются от концентрации формазана в группе только с золотыми наночастицами, где показатель равен $0,16$ нг.

В результате трансплантации мышам опухолевых клеток были получены достаточно неожиданные результаты. У всех животных в 1-й, 3-й и 4-й группах были обнаружены опухоли различного размера (0,5-2,5 см; Рисунок 13). При гистологическом исследовании наблюдались гнездные скопления клеток, характерных для гепатомы (Рисунок 14). В то же время, ни у одной мыши из 2-й группы опухоли не было обнаружено. Лишь у одной мыши на 21 день было обнаружено небольшое уплотнение, однако на 24 день оно исчезло.



Рисунок 13 – Внешний вид мыши с трансплантированной опухолью на 24 день после трансплантации

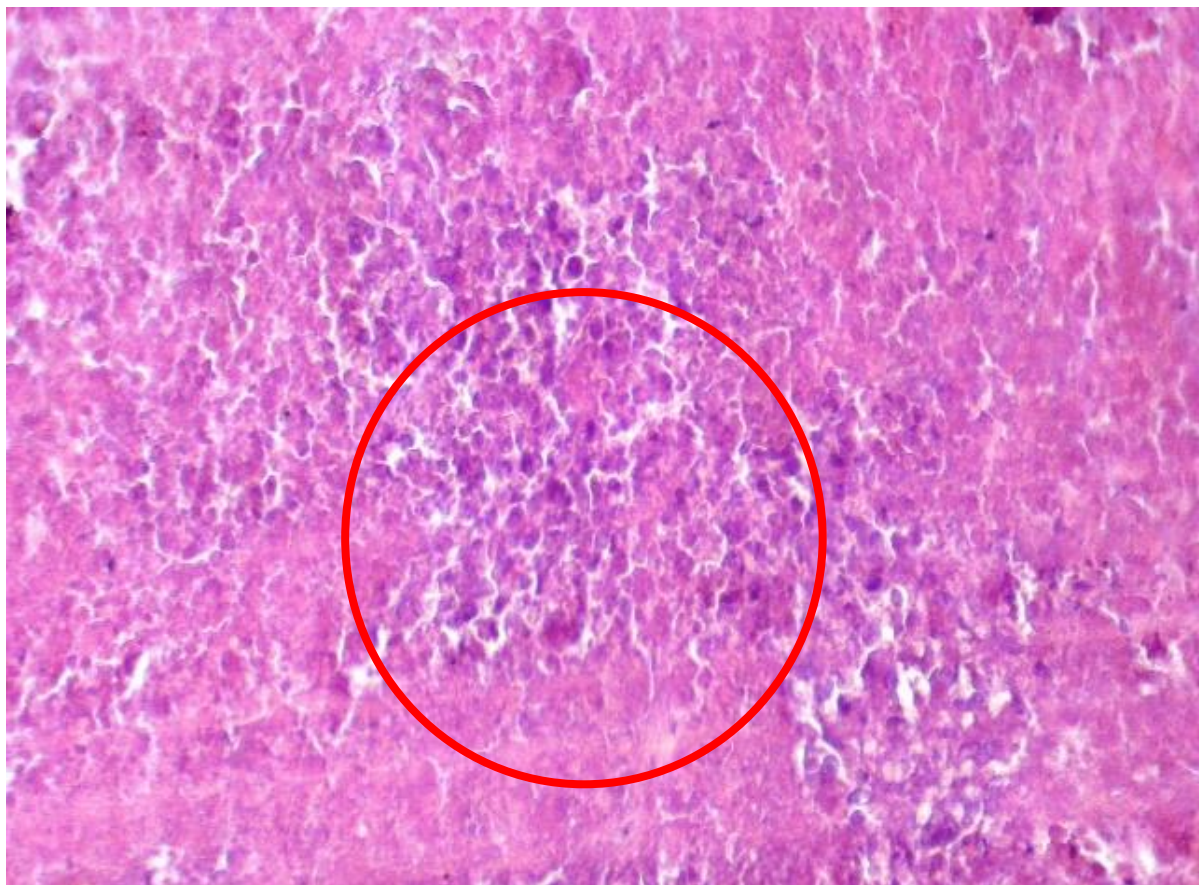


Рисунок 14 – Гистологический срез опухоли (МН-22а) на 24 день после трансплантации. На рисунке видны гнездные скопления клеток опухоли.

Окраска гематоксилин-эозин, $\times 300$

Нами были проведены исследования изучения концентрации некоторых цитокинов в сыворотке крови при данном исследовании. Во 2-й группе животных оказался достоверно сниженным уровень продукции провоспалительных цитокинов – интерферона- γ (Рисунок 15), интерлейкина 1 (Рисунок 16) и интерлейкина 6 (Рисунок 17).

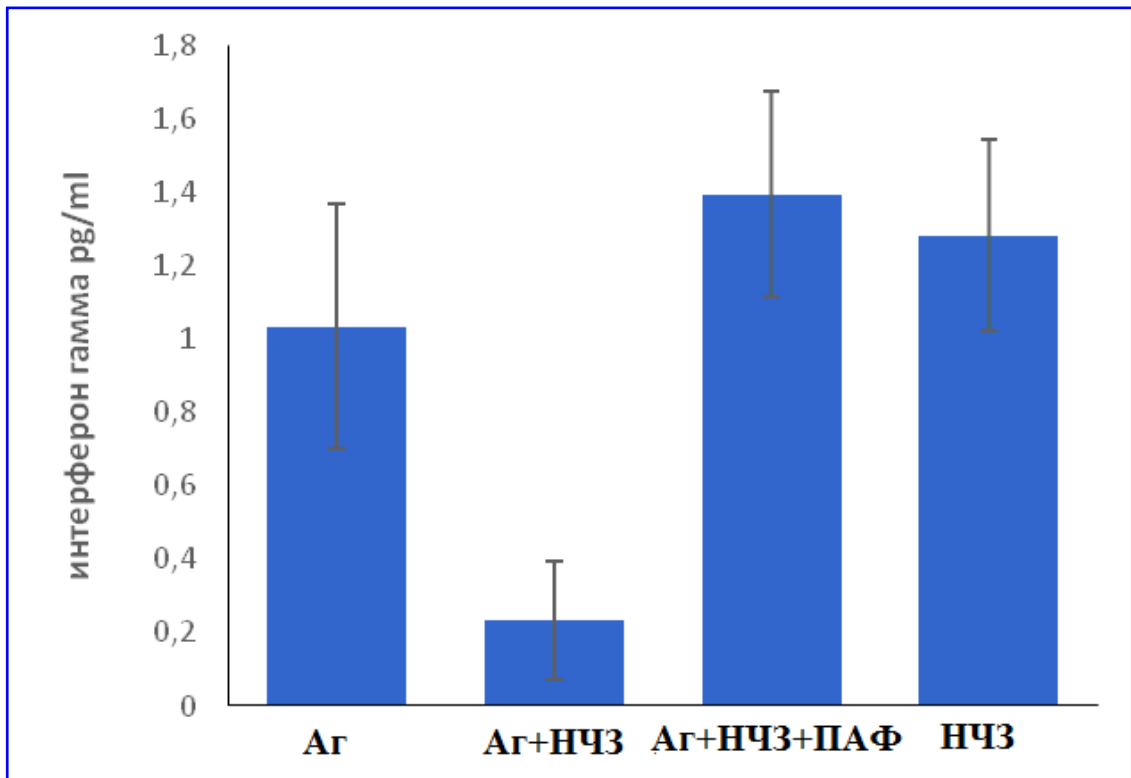


Рисунок 15 – Концентрация интерферона-γ в сыворотках крови, полученных при иммунизации по различным схемам термостабильным Аг мышей с трансплантированными опухолевыми клетками линии МН22а

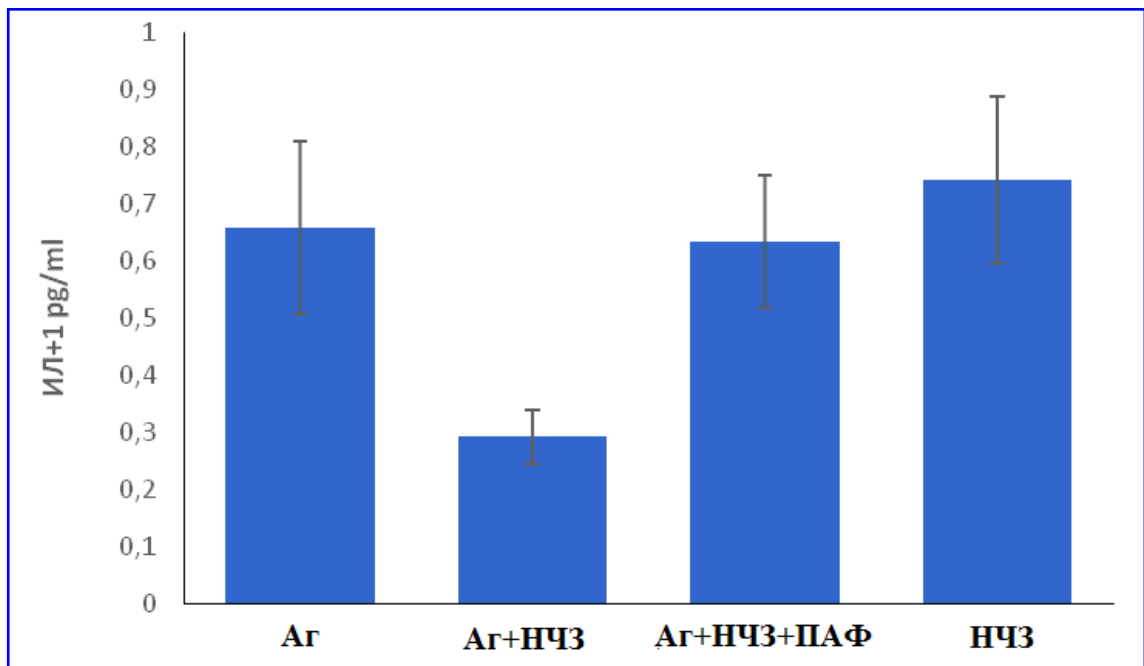


Рисунок 16 – Концентрация интерлейкина 1 в сыворотках крови, полученных при иммунизации по различным схемам термостабильным Аг мышей с трансплантированными опухолевыми клетками линии МН22а

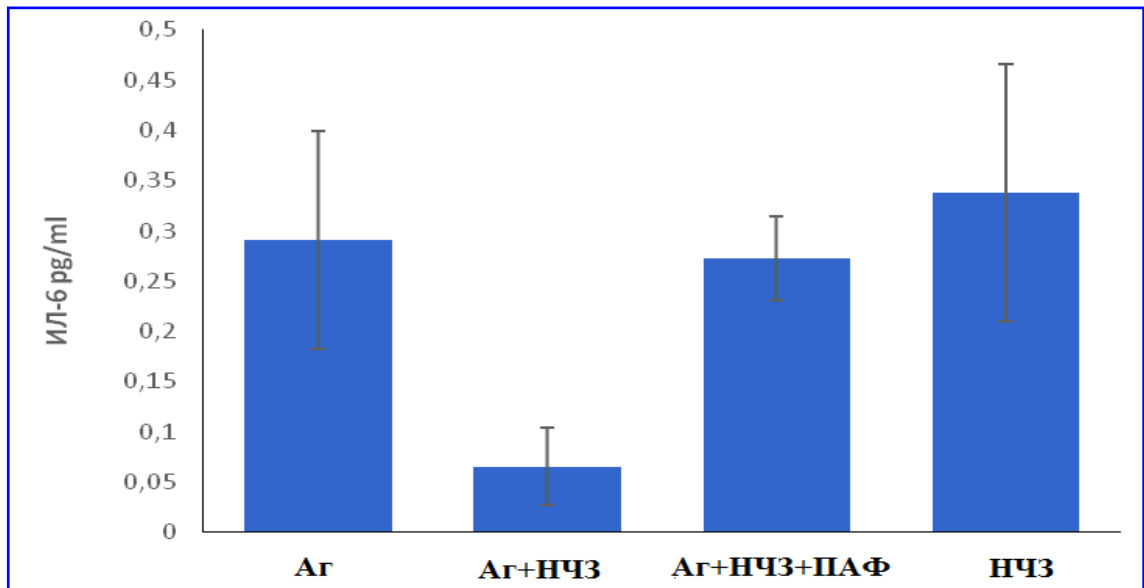


Рисунок 17 – Концентрация интерлейкина 6 в сыворотках крови, полученных при иммунизации по различным схемам термостабильным Аг мышей с трансплантированными опухолевыми клетками линии МН22а

Параллельно проверяли специфичность сыворотки в до-иммуноанализе. Из полученных результатов видно, что сыворотки в основном взаимодействуют с клетками МН22а, однако, сыворотки, полученные от групп В и С дают небольшой перекрест с клеточной линией HeLa (Рисунок 18).

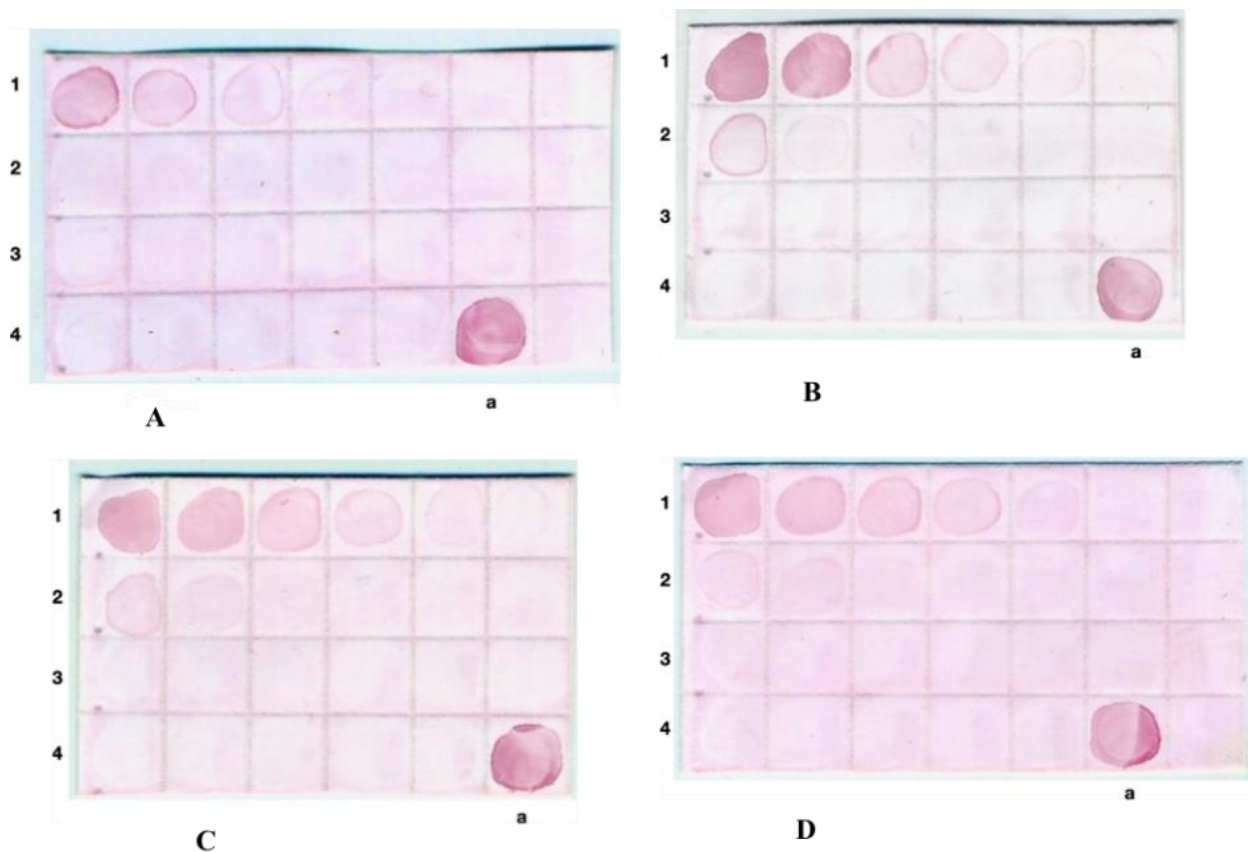


Рисунок 18 – Дот-иммуноанализ клеточных линий с сыворотками крови мышей, иммунизированных антигеном (А), антигеном + наночастицами золота (В), антигеном + наночастицами золота + полным адъювантом Фрейнда (С), НЧЗ (D). 1 – МН22а, 2 – HeLa, 3 – SPEVII, 4а – сыворотка контроль

Полученные сыворотки от от иммунизированных мышей различных групп в дальнейшем использовали в электрофорезе и иммуноблоте.

В группах 1 и 4 которые иммунизировали КЗ и АГ при иммуноблоте как в области мембранных фракций, так и в области цитоплазматических фракций обнаруживается группа полос в области от 25 кДа до 66 кДа.

Из 4х групп иммунизированных животных, коэффициент Стьюдента показал, что из выборки достоверной является только группа, иммунизированная НЧЗ+АГ+ПАФ, что говорит о повышенном продуцировании организмом антител. При исследовании уровня Ил 1 и Ил 6, которые отвечают за синтез Т и В лимфоцитов, участвующих в воспалительных реакциях, самый низкий уровень был у группы животных иммунизированной Аг+НЧЗ, в других

группах показатели были значительно выше и на примерно одинаковых уровнях. Выше сказанное, позволяет сделать вывод, что повышенное продуцирование интерлейкинов говорит о увеличенной воспалительной реакции, которая в случае с злокачественными новообразованиями, только увеличивает опухолевый рост.

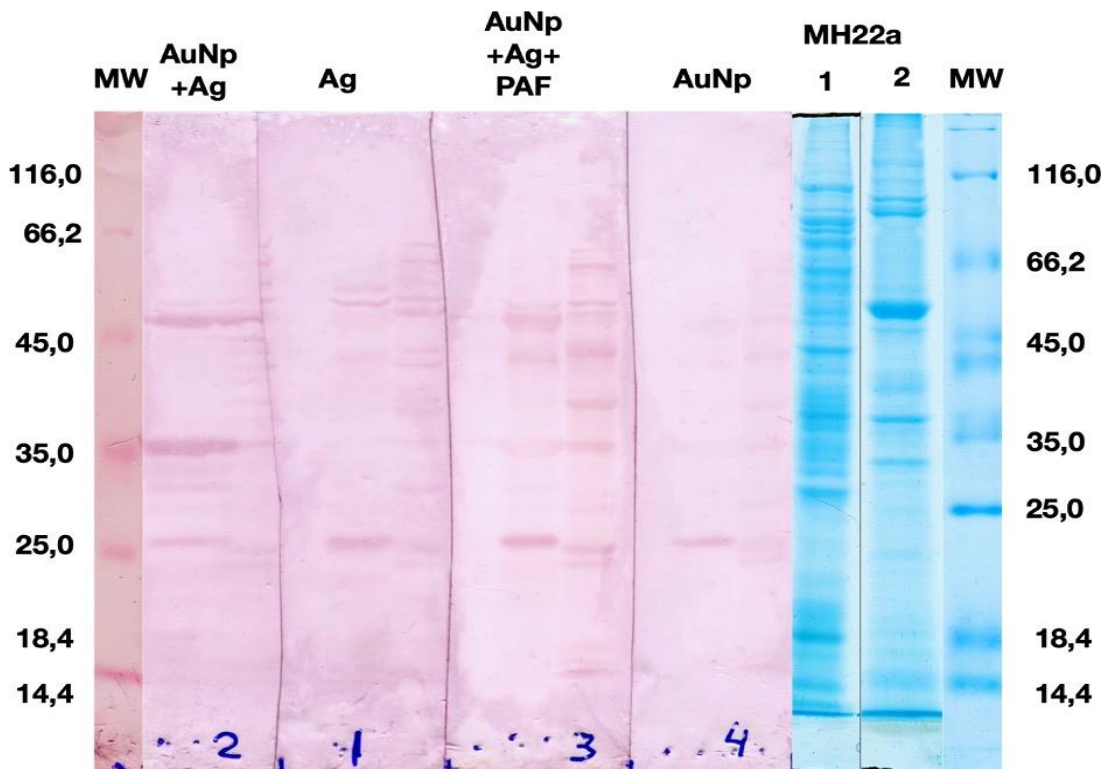


Рисунок 19 – Иммуноблот мембранных фракций и цитоплазматических фракций клеток MH22a в кДа. Разведение сывороток экспериментальных групп мышей при блотинге: «1» - 1/60; «2» - 1/43; «3» - 1/128; «4» - 1/160; окраска Протеин А – КЗ. MW – маркеры понсо и электрофорез

3.2.5. Выделение HSP из клеточных линий рака молочной железы кошек и их характеристика

В работе проводили исследования по отработке технологии получения фаговых мини-Ат, специфичных в отношении белков теплового шока, выделенных из клеточных линий, полученных от спонтанно заболевших животных. Предварительно был подтвержден онкологический диагноз

(аденокарцинома) 3х животных (кошек) разных возрастов на основании клинических проявлений и цитологического исследования (Рисунок 20,21,22).

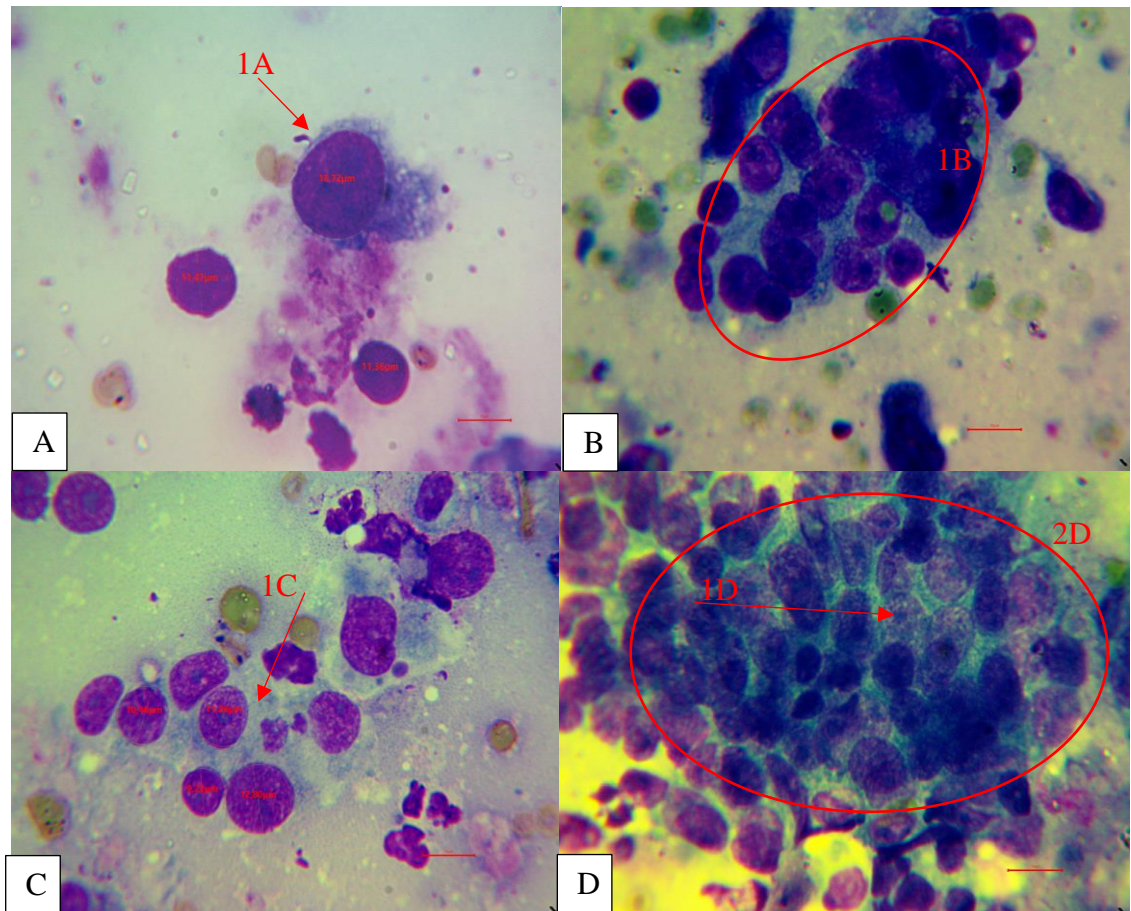


Рисунок 20 – Цитология опухоли окраска Лейкодиф 200 увеличение 100X. Кошка Кэти 13 лет.

(А) Клетки имеют вакуолизированную цитоплазму (1А) с базофильной зернистостью;

(В) В препарате обнаруживаются атипичные клетки, собранные в группы (листы) (1В) выявлены папиллярные и протоковые образования;

(С) Межклеточные границы выражены плохо;

(D) Ядра с крупнозернистым хроматином (1D), клетки собраны в группы (листы) (2D)

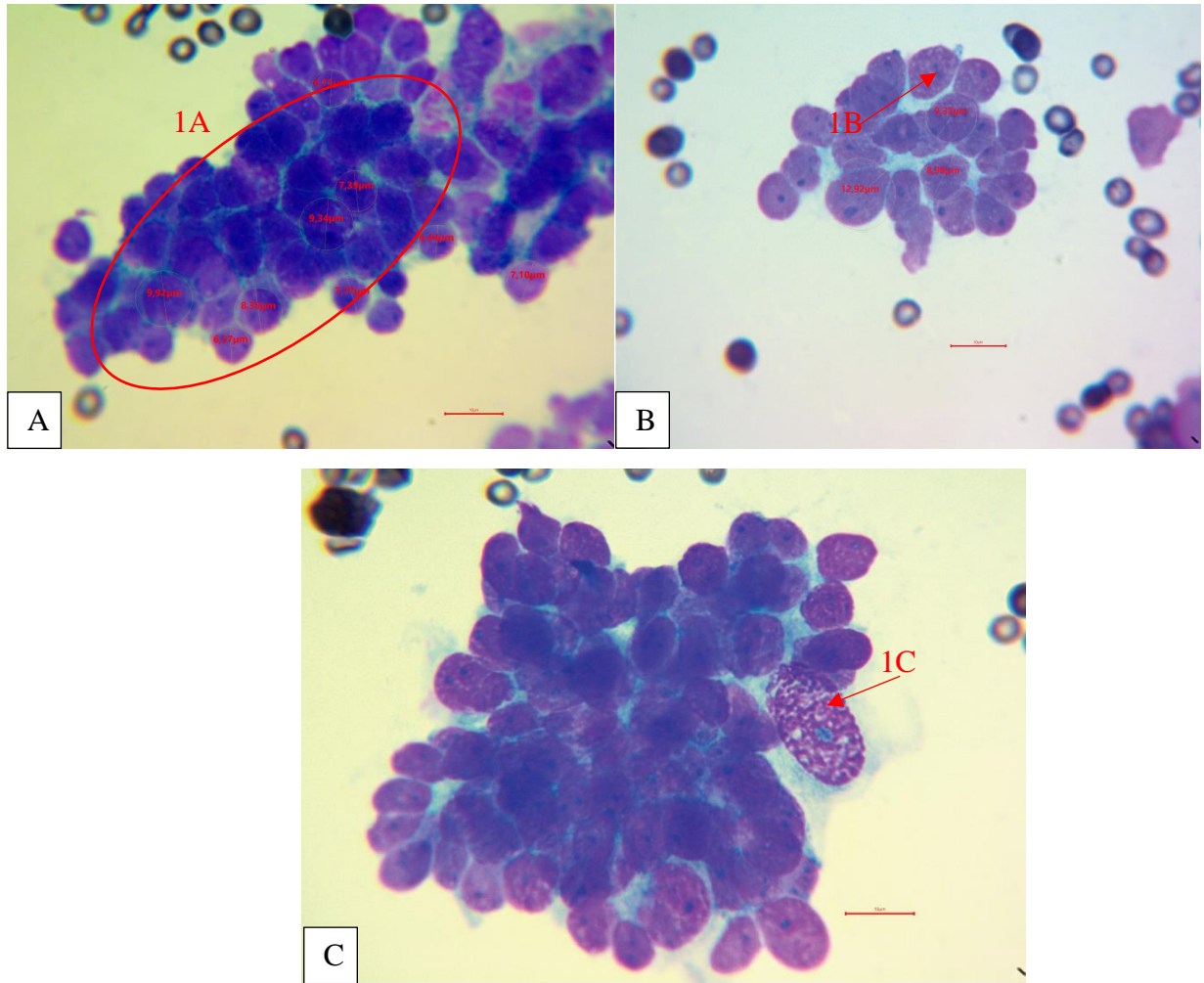


Рисунок 21 – Цитология опухоли (покраска Лейкодиф 200 увеличение 100X. Кошка Сима 9 лет.

(А) В препарате выявляются кластеры базальных клеток цилиндрической формы одинакового размера с четко определенными границами, круглыми ядрами и скудной цитоплазмой (1А);

(В) Имеют глыбчатый хроматин с одним, двумя базофильными ядрышками (1В);

(С) Клетки имеют вакуолизированную цитоплазму с крупными базофильными зернами (1С)

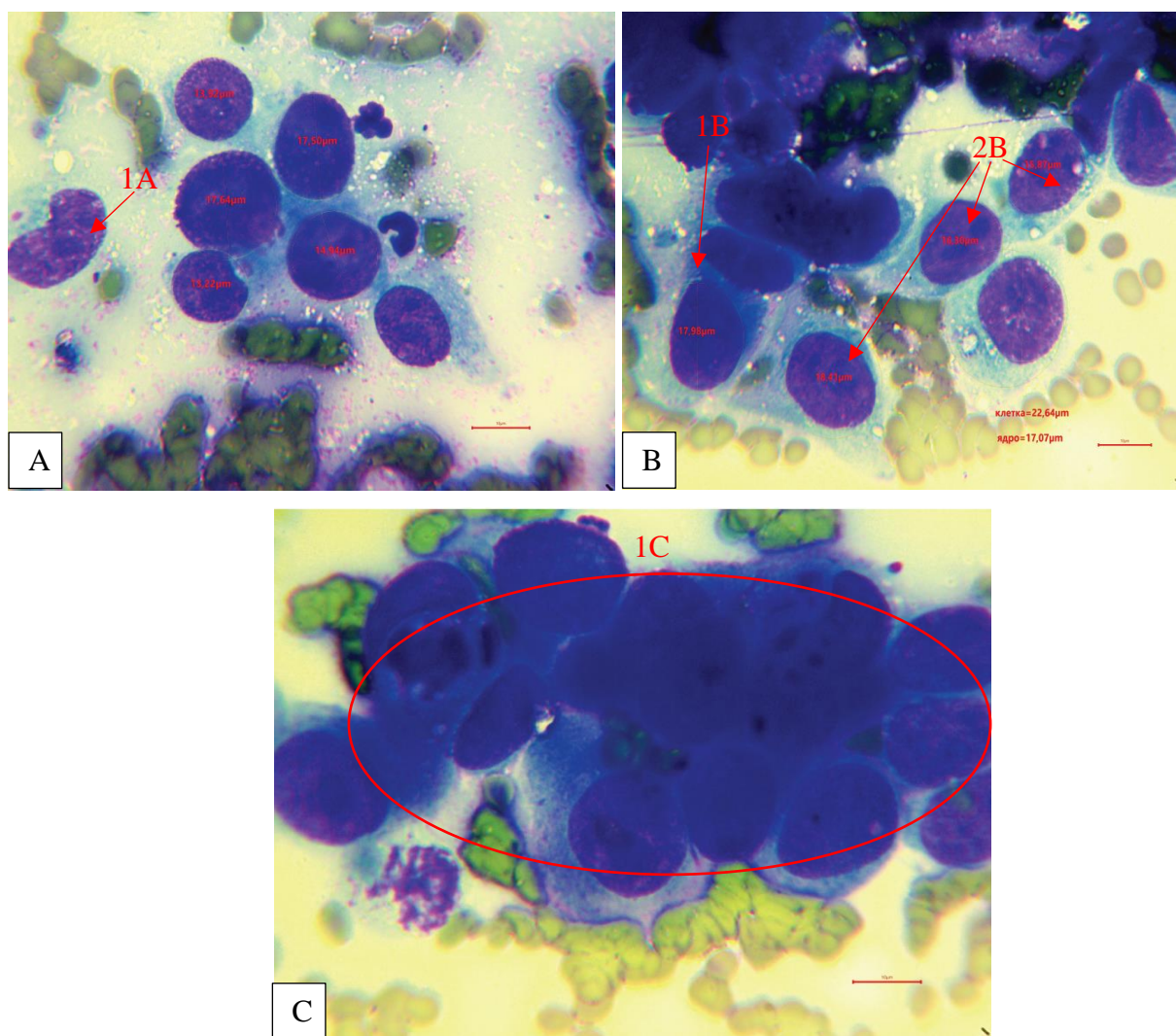


Рисунок 22 – Цитология опухоли (аденокарцинома) окраска Лейкодиф 200 увеличение 100X. Кошка Кузя 12 лет.

(А) Клетки имеют вакуолизированную цитоплазму с базофильными зернами (1А);

(В) Ядра круглые (от 13 до 17 мкм) (1В). Имеют глыбчатый хроматин с 1-2 мя крупными до 2 мкм базофильно окрашенными ядрышками (2В);

(С) Межклеточные границы выражены плохо (1С). Анизоцитоз и анизокариоз ярко выражен.

Как видно из представленных данных, фон препарата образован крупнозернистым эозинофильным секретом единичными эритроцитами, нитями хроматина, нитями колагена 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 ядер (хроматин крупнозернистый), ядрышки базофильные, хорошо заметны от 1 до 3. Цитоплазма зернистая базофильно окрашена. Анизоцитоз и анизокариоз слабый. Встречаются единичные митозы и многоядерные клетки.

Из опухоли выделяли клетки и выращивали их для дальнейшего получения белков теплового шока. На (Рисунке 21) представлены данные по контролю роста клеток, выделенных из опухоли животных, с помощью фазово-контрастной микроскопии.

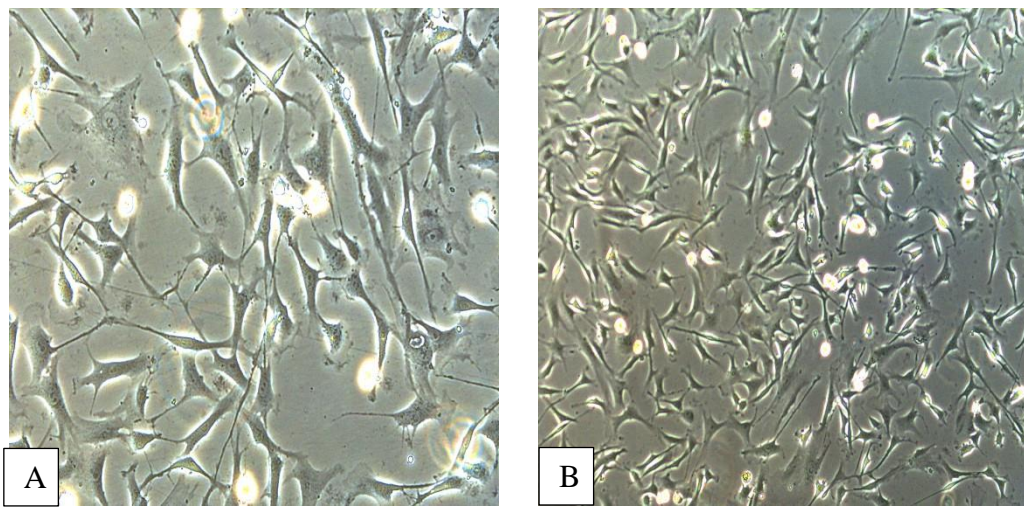


Рисунок 23 – Рост клеток, выделенных из опухоли фазовый контраст увеличение 40X.

Как видно из представленных данных, образец состоит из монодисперсных клеток. Далее из культуры клеток выделяли белки теплового шока. Хроматографическую очистку проводили на колонке 1×5 см с Toyopearl DEAE-650 (Sigma, США) на хроматографе NGC Quest 10 (Bio-Rad, США). Результат хроматографического анализа выделенного белка представлен на (Рисунок 24) видно, что пик приходится на 6,7 мл; что соответствует HSP-антигену [11].

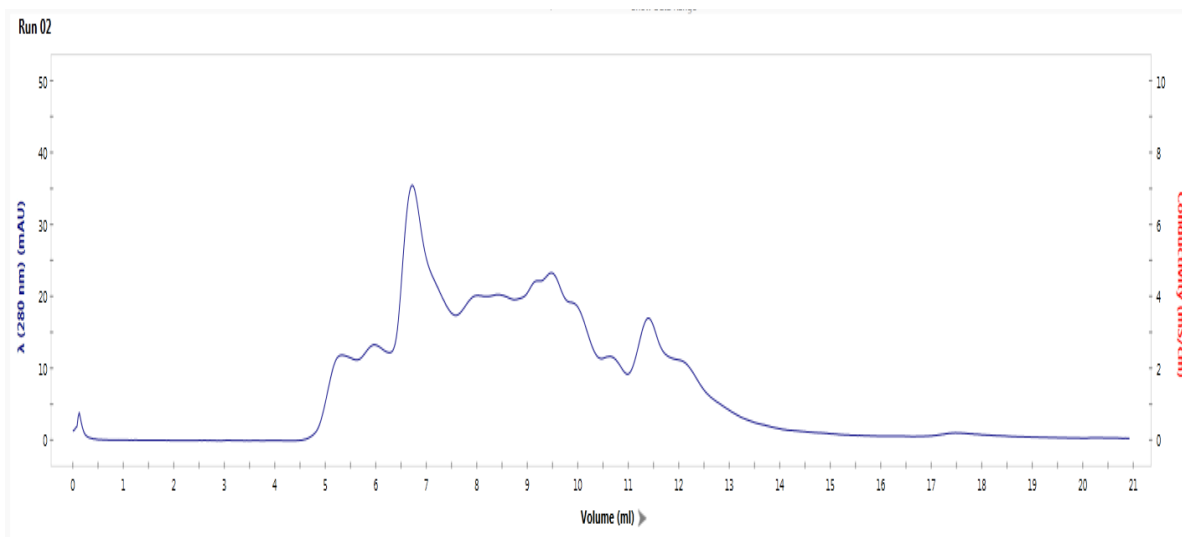


Рисунок 24 – Хроматограмма выделенного HSP-антигена от пациента

3.2.6. Изучение биодинамики HSP у кошек

На следующем этапе проводилась методика наработки фаговых антител, специфичных к белкам HSP. В 1999 г. в ИБФРМ РАН в ходе выполнения совместного научного проекта с Университетом г. Абердина (Великобритания) был передан фаговый дисплей Антител овцы, протоколы и методические рекомендации по применению данной технологии [Charlton et al., 2000]. Основой метода является создание комбинаторной библиотеки, в которой переменные участки легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов соединены случайным образом и представлены на поверхности нитевидного бактериофага (M13K07). Каждый бактериофаг, экспрессирует антитела единственной специфичности. Фаги, несущие антигенсвязывающие фрагменты антител (scFv, Fab) нужной специфичности, могут быть отобраны на иммобилизованном антигене [10].

Для получения фаговых антител, специфичных белкам 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-HCl (pH 7,4). Для повышения чувствительности фаговых антител рекомендовано проводить не

менее 4-х раундов селекции. Контроль специфичности антител рекомендовано проводить методом дот-иммуноанализа и титр антител определять методом ИФА. Измерение проводили на микропланшетном спектрофотометре АИФ-Ц-01С (ЗАО ИЛИП, РФ) при длине волны 490 нм. Титр полученных фаговых антител составил 1:2400 [10].

С использованием отработанной методики было проведено 4 раунда селекции фаговых антител к белкам HSP. Для увеличения их специфичности с каждым раундом вдвое уменьшалась концентрации антигена, как описано в [Grier et al., 1998]. Начальная концентрация антигена составляла 100 мг/мл. Концентрация фаговых частиц, определенная методом спектрофотометрии, с использованием формулы: $A_{269} - A_{320}$, составила $\sim 2 \times 10^{14}$ вирионов/мл [10].

Специфичность фаговых антител определяли методом дот-иммуноанализа. Метод дот-иммуноанализа довольно часто применяется для предварительного тестирования. Суть метода 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 [Staroverov et al., 2015], то есть сначала проводили биоспецифическую реакцию белок HSP/фаговые антитела, а затем визуализовали ее с помощью меченых наночастицами поликлональных кроличьих антифаговых антител [11]. 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 15 нм конъюгаты коллоидного золота с кроличьими антифаговыми антителами (200 мкл конъюгата на 1 мл фосфатного буферного раствора при визуальном контроле (около 20 минут) [10].

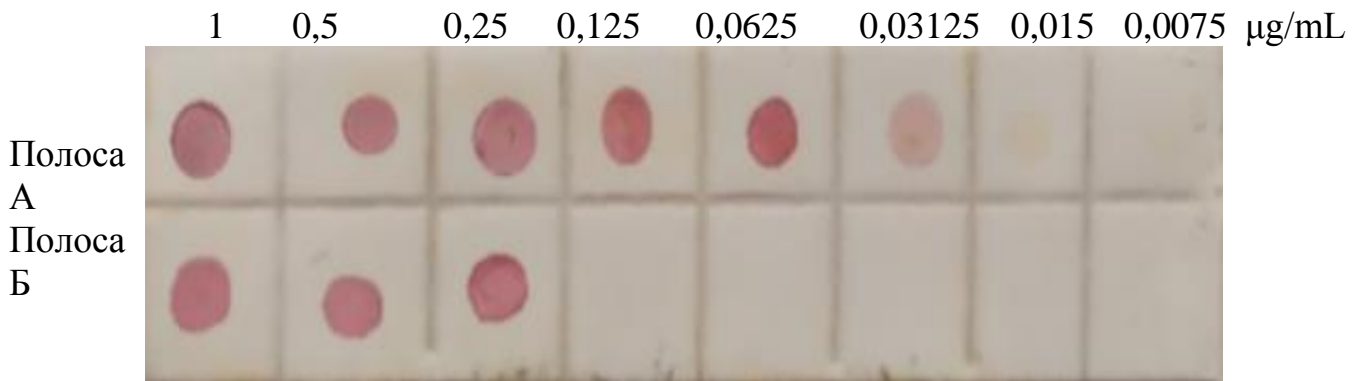


Рисунок 25 – Дот-иммуноанализ миниантител полученных на HSP-антиген, выделенными от опухолей спонтанно заражённых животных. Верхний ряд (Полоса А) раститровка антигена от концентрации 1 мкг/мл (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015, и 0,0075). Нижний ряд (Полоса Б) сыворотка, взятая от спонтанно заболевших животных слева на право, пациент №1; №2; №3

Мы изучили использование HSP-специфичных фаговых антител для определения HSP в сыворотках животных, у которых онкологический диагноз был подтвержден стандартным гистологическим анализом. При анализе антигена БШ в сыворотках больных животных (пациенты № 1, 2 и 3) можно видеть, что фаговые антитела связывались с антигеном в минимально обнаруживаемых концентрациях 0,25 мкг/мл (пациенты № 1 и 3) и 0,015 мкг/мл (пациент № 2). Следовательно, фаговые антитела, полученные в этой работе, могут обнаруживать HSP в точечном иммуноанализе, при этом минимальная обнаруживаемая концентрация составляет 0,015 мкг/мл (различимое связывание метки, отличное от фонового уровня). Кроме того, антитела не взаимодействовали с белками, выделенными из клеток МН-22а, HeLa и SPEV, и были специфичны только к HSP.

Для подтверждения полученных данных мы использовали иммуноферментный анализ для выявления антигенов БШ в сыворотках спонтанно заболевших животных (Рисунок 26). Следует отметить, что повышенное содержание HSP в сыворотках крови животные с аденомой молочной железы наблюдались во всех трех случаях. Увеличение HSP у пациентов №1 №2 и №3 составило в 8 раз, по сравнению с контролем.

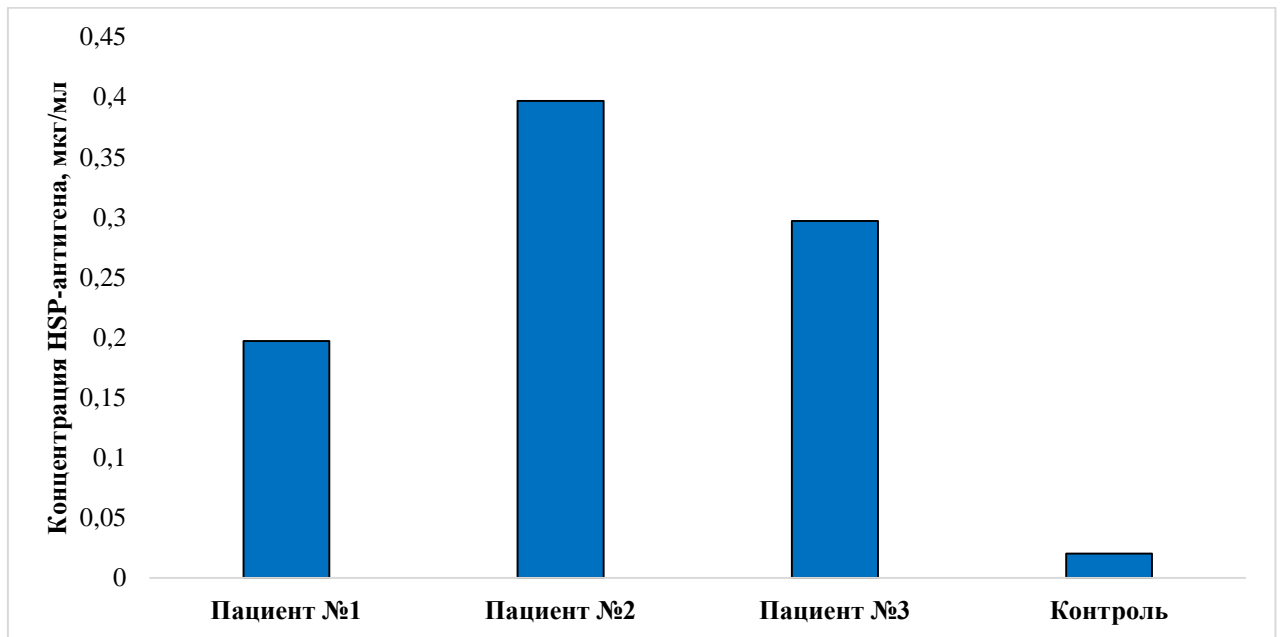


Рисунок 26 – Выявление HSP -антигена, в сыворотке крови спонтанно зараженных животных при использовании мини антител, полученных на HSP -антиген

Поскольку изменение содержания HSP в сыворотке крови является маркером не только для диагностики, но и для прогноза лечения после удаления раковой опухоли, мы проанализировали изменение содержания HSP у животных, у которых опухоли были удалены хирургическим путем (наблюдение проводилось в течение 7 дней). Контролем служила кровь клинически здорового животного. В течение первых 7 ч после удаления опухоли концентрация HSP в экспериментальных группах была выше, чем в контрольной. В течение первых 3 ч содержание HSP у больных животных было в 20 раз выше, чем в контрольной группе. Позже, однако, содержание HSP снизилось, и через 7 ч оно начало интенсивно снижаться во всех группах. В 3-й и 2-й группах он был в четыре раза выше, а в 1-й группе был

равен контрольному значению. (Рисунок 28) показано, что через 7 дней после удаления опухоли концентрация HSP уменьшилось: в 1,1 раза у пациента № 1, в 2,4 раза у пациента № 3 и в 3,2 раза у пациента № 2.

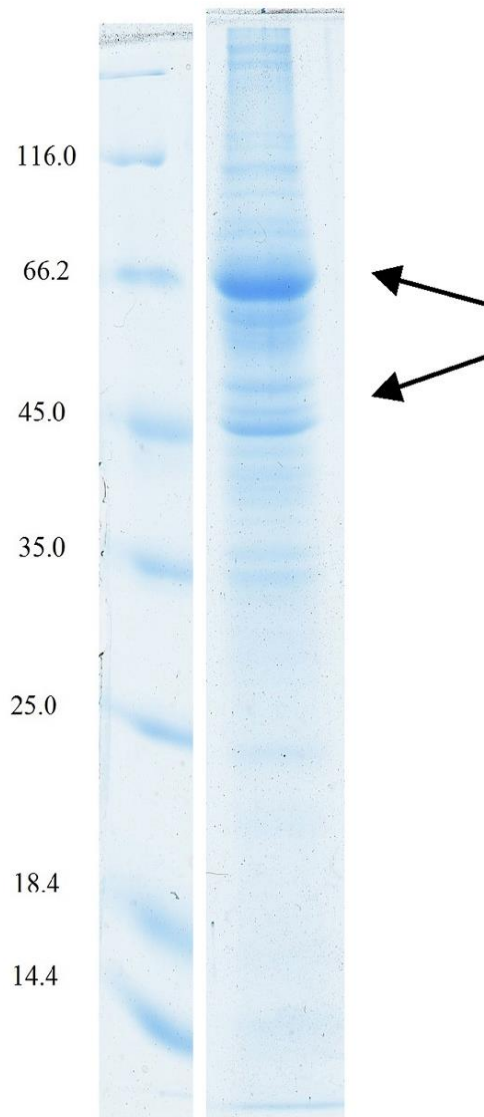


Рисунок 27 – Электрофорез HSP, выделенных из клеток рака молочной железы кошек

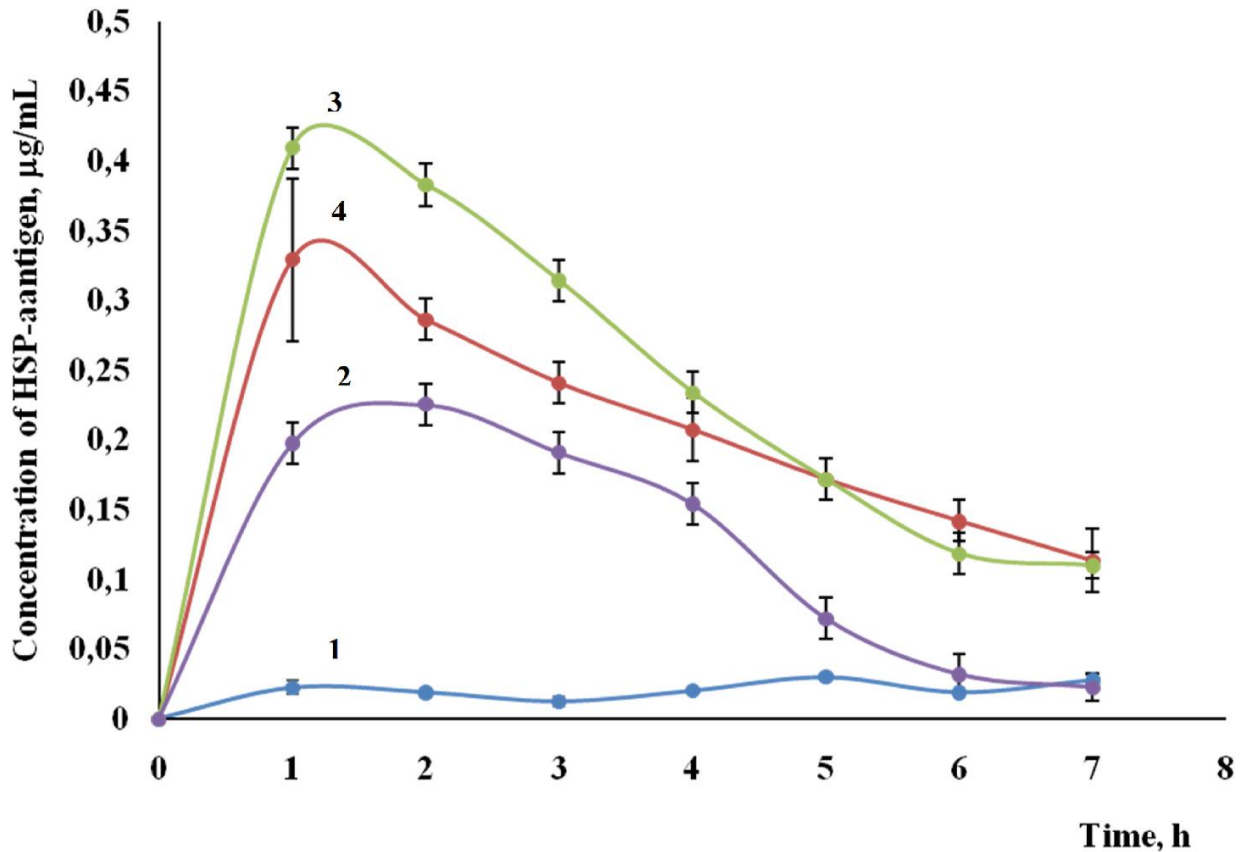


Рисунок 28 – Динамика изменения содержания HSP в сыворотке крови у спонтанно заболевших животных после хирургического удаления опухолей. Начальная концентрация HSP (мкг/мл): 0,197 (пациент №1), 0,397 (пациент №2) и 0,297 (пациент №3)

Это исследование показало, что фаговый дисплей является многообещающим инструментом для получения HSP-специфичных антител. Полученные антитела довольно высокоспецифичны к HSP и не взаимодействуют с другими белками клеточной линии (МН-22а, HeLa и SPEV). HSP-специфичные фаговые антитела могут быть использованы для выявления сывороточных антигенов HS с помощью точечного иммуноанализа и ИФА, при этом нижний предел обнаружения составляет 0,015 мкг/мл. Таким образом, HSP -специфичные фаговые антитела являются перспективными в качестве чувствительных маркеров при неинвазивной неоплазии для диагностики *in vitro*. Предлагаемый подход имеет несколько ограничений, связанных с техническими вопросами, касающимися выработки антител и пределов обнаружения. Тем не менее, дальнейшее усовершенствование метода может привести к увеличению нижнего предела

обнаружения HSP, особенно при использовании сенсорных диагностических систем. Таким образом, в дальнейшей работе антитела к фагу HSP будут использоваться в качестве чувствительных (распознающих) элементов сенсорных систем в неинвазивной онкодиагностике.

IV. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Стабильность конъюгированных наночастиц золота является решающим параметром для их применения в качестве носителей специфических молекул. Как правило, агрегация частиц приводит к заметному расширению плазмонного пика и его смещению в сторону более длинных волн [234]. (Рисунок 29 А) демонстрирует отсутствие каких-либо спектральных изменений после конъюгации стабилизированных цитратом готовых частиц с белками АГ. Дополнительное подтверждение стабильности конъюгата получено из измерений дзета-потенциала (Рисунок 29 В). При $\text{pH} = 7,5$ дзета-потенциал полученных наночастиц золота имеет типичное значение от -30 до -40 мВ (в нашем случае -38,4 мВ), что указывает на электростатическую природу коллоидной стабильности. После конъюгации с белками АГ дзета-потенциал немного снижается по абсолютной величине, оставаясь отрицательным (-32,5 мВ). Следовательно, стабильность конъюгированных частиц можно объяснить двумя факторами: электростатическим отталкиванием и стерическими факторами. Так же свойства наночастиц золота, которые используются для коррекции иммунной системы, может экстраполироваться и на другие наночастицы сферической формы, в том числе и на наночастицы селена, что мы продемонстрировали, проводя иммунизацию лабораторных животных конъюгатами наночастиц селена с высокомолекулярными белками (иммуноглобулинами) (Патент 1).

В последние годы наблюдается интенсивная разработка эффективных адъювантов для противоопухолевой иммунотерапии [171]. В частности, были предложены НСП [35] и ЗНЧ различных форм и размеров [58,116,234,250]. Здесь мы использовали оба этих адъюванта для изучения роли, которую они играют в индукции противоопухолевого иммунитета у лабораторных мышей.

Мы приготовили конъюгаты на основе 15-нм GNP и термостабильных антигенов, выделенных из клеток мышинной гепатомы МН22а. Мышей BALB/c иммунизировали по разным схемам, а затем получали

трансплантации клеток МН22а. У мышей, иммунизированных конъюгатом ЗНЧ–антиген, не было признаков роста опухоли в течение 24 дней. Ни у одной из мышей в этой группе не развилась опухоль, тогда как у мышей во всех других группах опухоли присутствовали. Мыши, иммунизированные наноконъюгатом, имели самый низкий титр антител. Они также показали значительно сниженную продукцию провоспалительных цитокинов $INF-\gamma$, IL-6 и IL-1 [234].

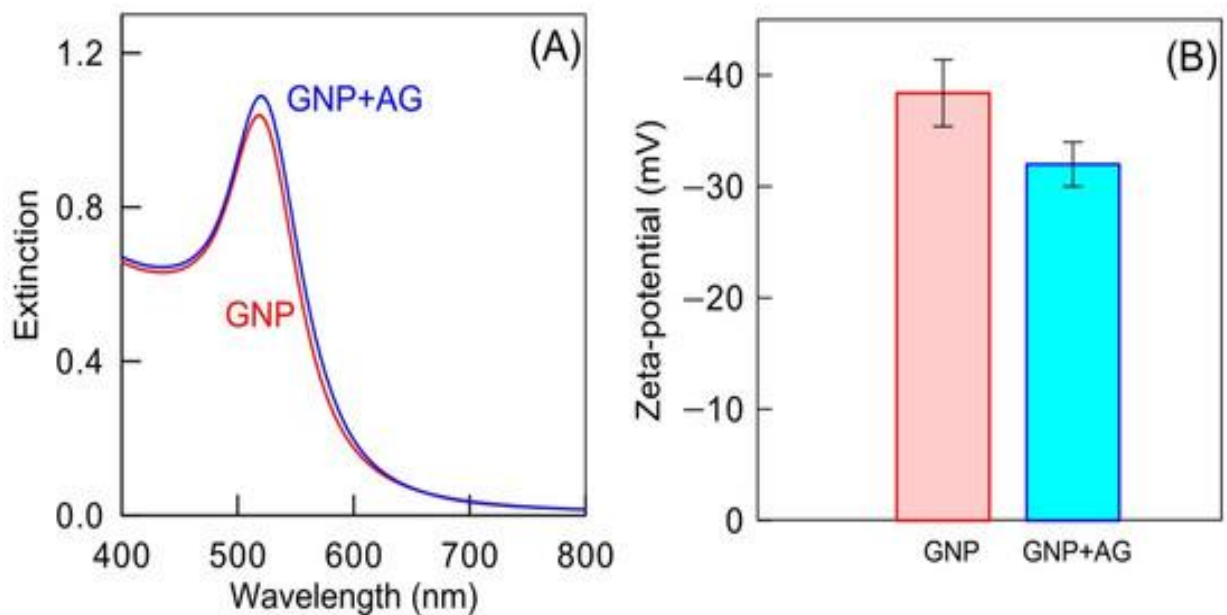


Рисунок 29 – Спектры экстинкции (А) и дзета-потенциалы (В) ЗНЧ до (красный) и после (синий) конъюгации с АГ

HSP играют важную роль в опухолевых процессах, поскольку они участвуют в различных связанных с раком активностях, таких как клеточная пролиферация, метастазирование и устойчивость к противоопухолевым препаратам [104]. Функции HSP связаны с возникновением, прогрессированием и метастазированием рака, а также с устойчивостью к терапии рака. Кроме того, изучается потенциальное использование HSP для усиления эффектов химио-, радио- и иммунотерапии. HSP имеют много клинических применений в качестве биомаркеров для диагностики и прогнозирования рака, а также в качестве потенциальных терапевтических

мишеней для противоопухолевого лечения [194,234]. Использование HSP в противоопухолевых вакцинах является очень многообещающим, используя их способность действовать в качестве иммунологических адъювантов.

Анализ результатов показывает, что иммунизация животных конъюгатом GNP–антиген предотвращает образование опухоли после трансплантации раковых клеток. Несмотря на то, что титр антител, полученных при конъюгатной иммунизации, был самым низким. Подобное может быть связано с тем, что в этом случае иммунизация вызывает Th1-зависимый иммунный ответ. Это сопровождается выработкой IFN- γ , IL-2 и TNF- α , которые влияют на выработку В-клетками опсонизирующих и комплементсвязывающих антител, активацию макрофагов, цитотоксичность и индукцию клеточного иммунитета. Иммунные ответы, в которых доминируют Th1-клетки, в основном вызывают фагоцитарно-зависимое воспаление [57,56,234]. Количество Т-клеток, особенно активированных CD8⁺ цитотоксических Т-клеток и Th1-клеток, коррелирует с лучшей выживаемостью при некоторых видах рака, включая инвазивный колоректальный рак, меланому, множественную миелому и рак поджелудочной железы [123,225].

У мышей, которым вводили комплекс ЗНЧ–антиген–CFA, индукция опухоли могла быть вызвана воспалительным процессом в микроокружении опухоли, который мог быть вызван иммунизацией CFA и повышенным содержанием IL-1 β , IL-6, IL-8 и белка-хемоаттрактанта моноцитов-1 (MCP-1), наблюдаемого у пациентов с раком молочной железы [121,114]. Было высказано предположение, что эти медиаторы могут непосредственно способствовать пролиферации и инвазии клеток рака молочной железы или могут участвовать в ангиогенезе, что важно для развития и прогрессирования рака молочной железы [189,234].

Kitamura et al. [143] сообщили, что IL-6 подавляет экспрессию основного комплекса гистосовместимости (MHC) класса II на клетках Th1, ингибируя секрецию IFN- γ и IL-2. Они отметили, что в этом случае раковые

клетки избегали противоопухолевых иммунологических эффектов за счет снижения активности цитотоксических Т-лимфоцитов. На это также указывали в исследованиях взаимосвязи между IL-6 и желудочно-кишечным и другими видами рака, и была обнаружена роль IL-6 в развитии и поддержании опухолевых клеток. Раковые клетки желудка секретируют IL-6, а повышенное количество IL-6 в сыворотке и опухолевой ткани, возможно, регулирует рост и развитие опухоли. Кроме того, в сыворотках пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой было обнаружено повышенное количество медиаторов воспаления, таких как TNF- α , С-реактивный белок и IL-6 [261, 225,203].

Наши основные рекомендации заключаются в возможности, использовать GNP в сочетании с HSP для противоопухолевой вакцинации. Результаты показывают, что противораковые вакцины могут быть в значительной степени улучшены путем включения GNP в качестве дополнительных адъювантов. В будущей работе мы планируем исследовать активность цитотоксических Т-клеток и уровень различных молекулярных маркеров, таких как PD-1, TIM-3, LAG-3, NKG2A и CTLA-4, в CD8 + Т-клетках иммунизированных и неиммунизированных мышей. Следующим этапом исследований может стать разработка и тестирование терапевтических вакцин на основе HSP и коллоидного золота [234].

В отношении разработки диагностической тест-системы важным элементом является выбор подходящего чувствительного элемента. На основе литературных данных, указывающих на то, что содержание HSP является биомаркером для ранней диагностики опухоли [33,64], мы предлагаем новый подход к неинвазивной онкодиагностике. Уникальность этого подхода заключается в том, что технология отображения фагов (неиммунная библиотека фагов scFv человека) позволяет получать специфические антитела к HSP-фагу, которые могут быть использованы для анализа содержания HSP в сыворотках больных животных методом точечного иммуноанализа и ИФА. Фаговый дисплей антител является

многообещающим методом получения стабильных чувствительных элементов для биосенсорных систем, применяемых для обнаружения опухолевых маркеров. Фаговые антитела обладают преимуществами перед природными иммуноглобулинами и, в некоторых случаях, перед их растворимыми фрагментами. Приготовление фаговых антител несложно и позволяет получить репертуар фрагментов антител посредством саморепликации фага за короткий период. Большинство сенсорных систем, используемых в онкологии, предназначены для определения активных форм кислорода [82,97] или для диагностики с помощью специфических антител [156], аптамеров [78], фаговых антител [69] и дуплекс-специфической нуклеазы [134]. Это исследование отличается от тех, о которых сообщалось ранее, поскольку оно основано на использовании фаговых антител против HSP в качестве инструментов диагностики рака. Многообещающее использование фаговых антител для определения биомаркеров рака было показано несколькими авторами [152,165], и методы, основанные на этих антителах, были предложены для выявления меланомы и рака молочной железы [195], гепатоцеллюлярной карциномы [139] и лимфолейкоза [30]. Фаговые антитела также использовались для количественной визуализации опухолевых клеток с помощью микроскопии в темном поле с использованием плазмонно-резонансных светорассеивающих наночастиц [210]. Однако нет данных об использовании фагового дисплея для получения анти-HSP-фаговых антител или об их использовании для определения HSP в сыворотках животных. Антитела к фагу HSP потенциально могут быть использованы не только в диагностике рака, но также и в мониторинге неинвазивного лечения. На этом этапе были получены HSP-специфичные фаговые антитела, и было показано их использование для неинвазивной иммунодетекции HSP и мониторинга лечения рака. В будущем антитела к фагу HSP могут быть использованы в качестве распознающих элементов сенсорных систем при обнаружении HSP в диагностике рака.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Выделены белки теплового шока из онкологической линии клеток МН22а, массой 45-66 кДА. Метод иммунодот-анализа показал, что выделенные антигены несут в своем составе белки, которые реагируют с антителами против HSPs: GRP94Ab, HSP90aB1, HSPA1A, HSPA1B, HSP27.

2. Полученный конъюгат содержит наночастицы золота со средним диаметром $15,2 \pm 1,2$ нм и концентрацией частиц $1,6 \times 10^{12}$ в 1 мл. Минимальная стабилизирующая концентрация составила 12 мкг антигена (белка) на 1 мл. Антитела после иммунизации полученным конъюгатом показывают высокую специфичность и чувствительность к белкам теплового шока в дот-иммуноанализе. При биоспецифическом взаимодействии (комплекс антиген-антитело) наблюдалась серия красных пятен.

3. Конъюгат белков теплового шока и наночастиц золота повышает пролиферативную активность лимфоцитов при их культивировании в 1,8 раз относительно контроля (Кз.); При культивировании с фитогемагглютинином – наблюдается повышение пролиферативной активности в 1,8 раза относительно контрольной группы; При культивировании с липополисахаридом – наблюдается снижение пролиферативной активности в 1,6 раза относительно контрольной группы. Уровень интерферона γ был выше по сравнению с контролем в 2,3 раза. Уровень интерлейкина 6 был на одном уровне с контрольной группой и не превышал 0,7 пг/мл. Концентрация интерлейкина 1 в сыворотке крови животных была выше в 6 раз по сравнению с контролем.

4. Иммунизация мышей конъюгатом антигена с коллоидным золотом препятствует развитию неоплазии. В результате трансплантации мышам опухолевых клеток у животных из всех групп, кроме группы, иммунизированной конъюгатами антигена и коллоидного золота, на 24 день после трансплантации, были обнаружены опухоли различного размера (0,5-2,5 см). Ни у одного животного из группы иммунизированной антигеном с

коллоидных золотых опухолей не наблюдалось. Иммунизация животных антигеном с золотыми наночастицами дала средний титр антител к HSP 1:1200 (при максимальном титре 1:1600). Концентрация интерферона - γ в сыворотках крови, у животных иммунизированных антигеном и коллоидным золотом составила 2,25 пг/мл, ИЛ1 – 0,275 и ИЛ6 – 0,08 и была самой низкой, что говорит о снижении воспалительной реакции в данной группе, по сравнению с контролем 1,31; 0,76; 0,33 пг/мл соответственно.

5. Выделенные HSP из клеточных линий неоплазий молочной железы от животных, спонтанно заболевших аденокарциномой, обладали молекулярным весом 45,0; 66,2 кДа. Полученные фаговые антитела способны детектировать белок HSP с помощью метода дот-иммуноанализа при минимальной определяемой концентрации 1 мкг/мл.

6. Выявлено взаимодействие, полученных фаговых антител с HSP-антигенами в сыворотке спонтанно заболевших животных с помощью ELISA, где рост HSP-антигена в сыворотке крови у животных с диагнозом аденома молочной железы наблюдался в 100% случаев. Концентрация белков теплового шока в сыворотке крови составляет от 0,197 до 0,397 мг/мл при 0,02 мг/мл у клинически здоровых животных. Явная динамика снижения белков теплового шока в сыворотки крови после удаления опухоли отмечается через 3 часа. Полученные фаговые антитела обладают высокой чувствительностью к HSP аденокарциноме молочной железы кошек в дот-иммуноанализе, при минимальной концентрации 0,015 мкг/мл. Доказана высокая специфичность фаговых антител к белкам теплового шока при отсутствии взаимодействия с белками, выделенными из клеток МН-22а, HeLa и SPEV.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Для профилактики онкологических заболеваний рекомендуется применение конъюгатов белков теплового шока аденокарциномы молочной железы кошек в минимальной концентрации 12 мкг/мл, с золотыми наночастицами размером $15,2 \pm 1,2$ нм.

2. Для ранней неинвазивной диагностики злокачественных новообразований молочной железы у кошек, рекомендуется применение фаговых антител к белкам теплового шока при их минимальной концентрации 0,015 мкг/мл.

3. Полученные результаты могут применяться в учебном процессе при обучении специалистов, магистров, аспирантов ветеринарного направления при написании научно-методических рекомендаций, в работе зооветеринарных специалистов и руководителей хозяйств.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В заключение проведенных исследований основной перспективой является возможность применять золотые наночастицы с белками теплового шока для лечения и профилактики неоплазий животных. Это исследование позволяет разработать вакцины на основе HSP и коллоидного золота.

Доказана возможность применения фагов для получения специфических антител к HSP, которые могут применяться для ранней диагностики HSP и прогнозирования развития онкологического процесса у животных, методом дот-иммуноанализа и ELISA.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горинский, В. И. Клинико-ультразвуковая диагностика и тактика иммунотерапии рака молочной железы у кошек: специальность 06.02.01: Диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология и морфология животных: диссертация на соискание учёной степени кандидата ветеринарных наук / Горинский Виталий Иванович. – Саратов, 2017. – 155 с.
2. Дыкман, Л. А. Наночастицы золота: получение, функционализация, использование в биохимии и иммунохимии / Л. А. Дыкман, В. А. Богатырев // Усп. хим. – 2007. – Т. 2, № 76. – С. 199–213.
3. Изучение потенциала использования наночастиц селена в качестве носителей для антигена вируса ящура / С. А. Староверов, А. А. Волков, В. Н. Ласкавый [и др.] // Ветеринарная патология. – 2016. – № 3(57). – С. 38-46.
4. Иммуногенность конъюгатов протективных антигенных комплексов туляремийного микроба с наночастицами золота / Л. А. Дыкман, О. А. Волох, Е. М. Кузнецова, А. К. Никифоров // Российские нанотехнологии. – 2018. – Т. 13, № 7-8. – С. 36-43.
5. Козлов, С. В. Новые методы фармакологической коррекции и профилактики заболеваний печени у сельскохозяйственных и мелких непродуктивных животных: специальность 06.02.01 Диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология и морфология животных: диссертация на соискание доктора ветеринарных наук / Козлов Сергей Васильевич. – Саратов, 2018. – 357 с.
6. Михеева, Н. А. Проницаемость биологических барьеров для золотых наночастиц и вызываемые ими морфофизиологические изменения: специальность 06.02.01: Диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология и морфология животных: диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Михеева Наталья Александровна. – Саранск, 2018. – 265 с.

7. Плахов Е. А., Летуновская А. В., Плахова А. И. Злокачественные и доброкачественные новообразования, выявленные у собак и кошек в 2014–2017 гг. // Ветеринарный Петербург. - 2021. - №3. - С. 1-2.

8. Пылаев, Т. Е. Исследование комплексов ДНК-золотые наночастицы методами спектроскопии поглощения и динамического рассеяния света: специальность 03.01.02: Биофизика: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Пылаев Тимофей Евгеньевич. – Воронеж, 2015. – 121 с.

9. Синтез, оптические свойства и биомедицинские применения металлических и композитных многофункциональных наночастиц с контролируемыми параметрами плазмонного резонанса и поверхностной функционализации молекулами-зондами / Н. Г. Хлебцов, Л. А. Дыкман, Б. Н. Хлебцов [и др.] // Вестник Российского фонда фундаментальных исследований. – 2014. – № 4(84). – С. 18-33.

10. Фаговые антитела как биорецепторы для определения ампициллина / О. И. Гулий, А. К. М. Алсовэйди, А. С. Фомин [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2022. – Т. 58, № 5. – С. 513-519.

11. Шардин, В. В. Иммунодиагностика белков теплового шока: специальность 06.03.01 Биология: автореферат диссертации на соискание Бакалаврская работа / Шардин Виталий Владимирович. – Саратов, 2022. – 11 с.

12. 70-kDa heat shock protein coated magnetic nanocarriers as a nanovaccine for induction of anti-tumor immune response in experimental glioma. / M.A. Shevtsov, B.P. Nikolaev, L.Y Yakovleva [et al.] // J. Control. – 2016. – № 220. – С. 329–340.

13. A chaperone network controls the heat shock response in E. Coli / E. Guisbert, C. Herman, C. Z. Lu, C. A. Gross // Genes & Development. – 2004. – Т. 22, № 18. – С. 2812–2821.

14. A new mouse model for the study of human breast cancer metastasis / E. Iorns, K. Drews-Elger, T.M. Ward [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – T. 10, № 7. – C. e47995.
15. A novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues / A. Gama, A. Alves, F. Gartner [et al.] // *Vet Pathol*. – 2003. – № 40. – C. 412–420.
16. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases / V. Joukov, K. Pajusola, A. Kaipainen [et al.] // *EMBO*. – 1996. – T. 7, № 15. – C. 1751.
17. A one-step homogeneous immunoassay for cancer biomarker detection using gold nanoparticle probes coupled with dynamic light scattering / X. Liu, Q. Dai, L. Austin [et al.] // *Am. Chem. Soc.* – 2008. – № 130. – C. 2780–2782.
18. A retrospective study of those histopathologic parameters predictive of invasion of the lymphatic system by canine mammary carcinomas / R. Rasotto, V. Zappulli, M. Castagnaro [et al.] // *Vet Pathol*. – 2012. – № 49. – C. 330–340.
19. A Review on Metal Nanostructures: Preparation Methods and Their Potential Applications / M. E. Stewart, C. R. Anderton, L. B. Thompson [et al.] // *Chem. Rev.* – 2008. – № 108. – C. 494–521.
20. A STING-activating nanovaccine for cancer immunotherapy / M. Luo, H. Wang, Z. Wang [et al.] // *Nat. Nanotechnol.* – 2017. – № 12. – C. 648–654.
21. Abe, M. Plasma levels of heat shock protein 70 in patients with prostate cancer: a potential biomarker for prostate cancer. / M Abe, JB Manola, WK Oh // *Clin. Prostate Cancer*. – 2004. – T. 3, № 1. – C. 49–53.
22. Abraham, G. E. Misrepresentation of Iodine / G. E. Abraham // *Original Internist*. – 2008. – № 15. – C. 132–158.
23. Achen, MG. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4) / MG. Achen, M Jeltsch, E Kukk // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1998. – T. 2, № 95. – C. 548–553.

24. Advances in PSMA-targeted therapy for prostate cancer / F. Wang, Z. Li, X. Feng [et al.] // *Prostate Cancer Prostatic Dis.* – 2022. – № 25(1). – C. 11-26.
25. Ahner Brodsky, A. Checkpoints in ER-associated degradation: excuse me, which way to the proteasome? / A. Ahner Brodsky, J.L. Brodsky // *Trends Cell Biol.* – 2004. – T. 14, № 474. – C. 8.
26. Akerfelt, M. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan / M. Akerfelt, R.I. Morimoto, L. Sistonen // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2010. – № 11. – C. 55–545.
27. Alitalo, K. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease / K. Alitalo, P. Carmeliet // *Cancer Cell.* – 2002. – T. 1, № 3. – C. 219–227.
28. Alkilany, A. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: What we have learned so far? / A. Alkilany, C.J. Murphy // *Nanopart. Res.* – 2010. – № 12. – C. 2313-2333.
29. Amatschek, S. Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes / S. Amatschek, U. Koenig, H. Auer // *Cancer Res.* – 2004. – T. 64, № 3. – C. 844–856.
30. Antibodies selected from combinatorial libraries block a tumor antigen that plays a key role in immunomodulation / J.R. McWhirter, A. Kretz-Rommel, A. Saven [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2006. – № 103. – C. 1041–1046.
31. Anti-Hsp20 antibody concentrations inversely correlated with tumor progression in ovarian cancer / Y. Zhu, Q. Tian, N. Qiao [et al.] // *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* – 2014. – № 36(4). – C. 394–396.
32. Apostolopoulos, V. Cancer vaccines: Research and applications / V. Apostolopoulos // *Cancers.* – 2019. – № 11. – C. 10-41.
33. Autoantibodies against heat shock proteins as biomarkers for the diagnosis and prognosis of cancer / L. Shi, Y. Chevlot, E. Souteyrand, E. Souteyrand // *Cancer Biomarkers.* – 2017. – № 18. – C. 105–116.

34. Azad, AA. Targeting heat shock proteins in metastatic castration-resistant prostate cancer / AA. Azad, A. Zoubeidi, ME. Gleave // *Nat. Rev. Urol.* – 2015. – № 12. – C.26–36.
35. Banstola, A. Immunoadjuvants for cancer immunotherapy: A review of recent developments / A. Banstola, J-H. Jeong, S. Yook // *Acta Biomater.* – 2020. – № 114. – C. 16–30.
36. Banstola, A. Immunoadjuvants for cancer immunotherapy: A review of recent developments / A. Banstola, J-H. Jeong, S. Yook // *Acta Biomaterialia.* – 2020. – № 114. – C.16-30.
37. Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases / T.A. Guise, K.S. Mohammad, G. Clines [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 2006. – T. 20, № 12. – C. 6213s–6216s.
38. Bayer, C. Validation of heat shock protein 70 as a tumor specific biomarker for monitoring the outcome of radiation therapy in tumor mouse models. / C. Bayer, ME. Liebhardt, TE. Schmid // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2014. – № 83. – C. 694–700.
39. Bayer, C. Validation of heat shock protein 70 as a tumor-specific biomarker for monitoring the outcome of radiation therapy in tumor mouse models / C. Bayer, ME. Liebhardt, TE. Schmid // *Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2014. – T. 3, № 88. – C. 694–700.
40. Beatty, J.D. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay / J.D. Beatty, B.G. Beatty, W.G. Vlahos // *Immunol. Methods.* – 1987. – № 100. – C. 173–179.
41. Beha, G. Morphology of the myoepithelial cell: immunohistochemical characterization from resting to motile phase / G. Beha, G. Sarli, B. Brunetti // *Sci World J.* – 2012. – № 2012. – C. 252034.
42. Bergkvist, GT. Studies on the inhibition of feline EGFR in squamous cell carcinoma: enhancement of radiosensitivity and rescue of resistance to small molecule inhibitors / GT. Bergkvist, DJ. Argyle, LY. Pang // *Cancer Biol Ther.* – 2011. – T. 11, № 11. – C. 927–937.

43. Bernas, T. The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC / T. Bernas, J.W. Dobrucki // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2000. – № 380. – C. 108–116.
44. Bhattacharya, R. Biological properties of «naked» metal nanoparticles / R. Bhattacharya, P. Mukherjee // *Drug Delivery Rev.* – 2008. – № 60. – C. 1289–1306.
45. Boisselier, E. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity / E. Boisselier, D. Astruc // *Chem. Soc. Rev.* – 2009. – № 38. – C. 1759–1782.
46. Boonstra, M.C. Preclinical evaluation of a novel CEA-targeting near-infrared fluorescent tracer delineating colorectal and pancreatic tumors / M.C. Boonstra, B. Tolner, B.E. Schaafsma // *Int J Cancer.* – 2015. – T. 8, № 137. – C. 1910–1920.
47. Boyde, A. Scanning electron microscopy in bone pathology: review of methods, potential and applications / A. Boyde, E. Maconnachie, SA. Reid // *Scan Electron Microsc.* – 1986. – № 4. – C. 1537–1554.
48. Breuninger, S. Quantitative analysis of liposomal heat shock protein 70(Hsp70)inthebloodoftumorpatients using a novel lipHsp70 ELISA / S. Breuninger, ErlJ, C. Knape // *Clin. Cell Immunol.* – 2014. – T. 5, № 5. – C. 264.
49. Brown, C. L. Colloidal metallic gold is not bio-inert / C. L. Brown, M. W. Whitehouse, E. R. T. Tiekink // *Inflammopharmacology.* – 2008. – T. 3, № 16. – C. 133–137.
50. Bukau, B. Molecular chaperones and protein quality control / B. Bukau, J. Weissman, A. Horwich // *Cell.* – 2006. – № 125. – C. 443–51.
51. Calderwood, SK. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis / SK. Calderwood, MA. Khaleque, DB. Sawyer // *Trends Biochem Sci.* – 2006. – № 31. – C. 164–72.
52. Cancer diagnosis: from tumor to liquid biopsy and beyond / R. Vaidyanathan, R.H. Soon, P. Zhang [et al.] // *Lab Chip.* – 2019. – № 19. – C. 11–34.

53. Cancer statistics / A. Jemal, T. Murray, A. Samuels [et al.] // *CA Cancer J Clin.* – 2003. – T. 1, № 53. – C. 5–26.
54. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry / L. Peña, A. Gama, M.H. Goldschmidt [et al.] // *Vet Pathol.* – 2014. – T. 1, № 51. – C. 127-45.
55. Cao, Y. Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. / Y. Cao // *Nat Rev Cancer.* – 2005. – T. 9, № 5. – C. 735–743.
56. CD3+ cells at the invasive margin of deeply invading (pT3-T4) colorectal cancer and risk of post-surgical metastasis: A longitudinal study / L. Laghi, P. Bianchi, E. Miranda [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2009. – № 10. – C. 877–884.
57. CD4+ T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages / D.G. DeNardo, J.B. Barreto, P. Andreu [et al.] // *Cancer Cell.* – 2009. – № 16. – C. 91–102.
58. Chauhan, A. Design and encapsulation of immunomodulators onto gold nanoparticles in cancer immunotherapy / A. Chauhan, T. Khan, A. Omri // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – T. 15, № 22. – C. 8037.
59. Chauhan, A. Design and Encapsulation of Immunomodulators onto Gold Nanoparticles in Cancer Immunotherapy / A. Chauhan, T. Khan, A. Omri // *IJMS.* – 2021. – T. 15, № 22. – C. 8037.
60. Chen, P.C. Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing / P.C. Chen, S.C. Mwakwari, A.K. Oyelere // *Nanotechnol Sci Appl.* – 2008. – № 1. – C. 45-65.
61. Chen, X. Introducing Theranostics journal - from the Editor-in-Chief / X. Chen // *Theranostics.* – 2011. – № 1. – C. 1-2.
62. Chitosan films doped with gold nanorods as laser-activatable hybrid bioadhesives / P. Matteini, F. Ratto, F. Rossi [et al.] // *Adv Mater.* – 2010. – № 22. – C. 4213-16.

63. Chow, P. E. Gold Nanoparticles: Properties, Characterization and Fabrication / P. E. Chow. – New York: Nova Science Publishers, 2010. – 343 c.
64. Ciocca, D.R. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications / D.R. Ciocca, S.K. Calderwood // Cell Stress Chaperones. – 2005. – № 10. – C. 86–103.
65. Classification and grading of canine mammary tumors / M. Goldschmidt, L. Pena, R. Rasotto [et al.] // Vet Pathol. – 2011. – № 48. – C. 117–131.
66. Clinical significance of heat shock protein-70 expression in bladder cancer / K.N. Syrigos, K.J. Harrington, A.J. Karayiannakis [et al.] // J.Urol. – 2003. – T. 3, № 61. – C. 677–680.
67. Coleman, R.E. The clinical course of bone metastases from breast cancer / R.E. Coleman, R.D. Rubens // Br J. Cancer. – 1987. – T. 1, № 55. – C. 61–66.
68. Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery / G. F. Paciotti, L. Myer, D. Weinreich [et al.] // Drug Delivery. – 2004. – № 11. – C. 169–183.
69. Combinatorial Avidity Selection of Mosaic Landscape Phages Targeted at Breast Cancer Cells—An Alternative Mechanism of Directed Molecular Evolution / V.A. Petrenko, J.W. Gillespie, H. Xu [et al.] // Viruses. – 2019. – № 11. – C. 785.
70. CrAgDb - a database of annotated chaperone repertoire in archaeal genomes / S. Rani, A. Srivastava, M. Kumar, M. Goel // FEMS Microbiology Letters. – 2016. – T. 6, № 363. – C. 1–6.
71. Craig, E. Molecular Chaperones and Folding Catalysts / E. Craig, W. Yan, P. James. – Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1999. – 690 c.
72. Dabbs, D. Diagnostic immunohistochemistry / D. Dabbs. – New York: Churchill Livingstone, 2002. – 704 c.

73. Davis, S. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning / S. Davis, T.H. Aldrich, P.F. Jones // *Cell*. – 1996. – T. 7, № 87. – C. 1161–1169.
74. De Maria, R. Feline STK gene expression in mammary carcinomas / R. De Maria, P. Maggiora, B. Biolatti // *Oncogene*. – 2002. – T. 11, № 21. – C. 1785–1790.
75. De Maria, R. Spontaneous feline mammary carcinoma is a model of HER2 overexpressing poor prognosis human breast cancer / R. De Maria, M. Olivero, S. Iussich // *Cancer Res*. – 2005. – T. 5, № 63. – C. 907–912.
76. DeRose, Y.S. Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes / Y.S. DeRose, G. Wang, Y.C. Lin // *Nat Med*. – 2011. – T. 11, № 17. – C. 1514–1520.
77. Destexhe, E. Immunohistochemical identification of myoepithelial, epithelial, and connective-tissue cells in canine mammary-tumors / E. Destexhe, L. Lespagnard, M. Degeyter // *Vet Pathol*. – 1993. – № 30. – C. 146–154.
78. Development of a lateral flow aptamer assay strip for facile identification of theranostic exosomes isolated from human lung carcinoma cells / Q. Yu, Q. Zhao, S. Wang [et al.] // *Anal. Biochem*. – 2020. – № 594. – C. 113591.
79. Dewar, R. Best practices in diagnostic immunohistochemistry: myoepithelial markers in breast pathology / R. Dewar, O. Fadare, H. Gilmore // *Arch Pathol Lab Med*. – 2011. – № 135. – C. 422–429.
80. Diel, I.J. Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment / I.J. Diel, E.F. Solomayer, S.D. Costa // *N Engl J Med*. – 1998. – T. 6, № 339. – C. 357–363.
81. Differential in vivo and in vitro expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in tumors and its relationship to lymphatic metastasis in immunocompetent rats / J. Krishnan, V. Kirkin, A. Steffen [et al.] // *Cancer Res*. – 2003. – T. 3, № 63. – C. 713–722.

82. Direct Electrochemical Measurements of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Nontransformed and Metastatic Human Breast Cells / Y. Li, K. Hu, Y. Yu [et al.] // *Am. Chem. Soc.* – 2017. – T. 37, № 139. – C. 13055–62.
83. DNA measurement and immunohistochemical characterization of epithelial and mesenchymal cells in canine mixed mammary tumours: putative evidence for a common histogenesis / F. Gartner, M. Geraldès, G. Cassali [et al.] // *Vet J.* – 1999. – № 158. – C. 39–47.
84. Dobrovolskaia, M. A. Immunological properties of engineered nanomaterials / M. A. Dobrovolskaia, S. E. McNeil // *Nat. Nanotechnol.* – 2007. – № 2. – C. 469–478.
85. Donnell, J. J. DNA Vaccines: Progress and Challenges / J. J. Donnell, B. Wahren, M. A. Liu // *Immunol.* – 2005. – № 175. – C. 633–639.
86. Dudeja, V. The role of heat shock proteins in gastrointestinal diseases / V. Dudeja, S.M. Vickers, A.K. Saluja // *Gut.* – 2009. – № 58. – C. 1000–9.
87. Duffy, M.J. Tumor Markers in Clinical Practice: A Review Focusing on Common Solid Cancers / M.J. Duffy // *Med. Princ. Pract.* – 2012. – T. 1, № 22. – C. 4-11.
88. Dykman, L.A. Colloidal gold in solid-phase assays / L.A. Dykman, V.A. Bogatyrev // *Biochemistry.* – 1997. – № 62. – C. 350–356.
89. Dykman, L.A. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives / L.A. Dykman, N.G. Khlebtsov // *Chem Soc Rev.* – 2012. – № 41. – C. 2256-82.
90. Dykman, L.A. Immunological properties of gold nanoparticles / L.A. Dykman, N.G. Khlebtsov // *Chem. Sci.* – 2017. – № 8. – C. 1719–1735.
91. Dykman, L.A. Methods for chemical synthesis of colloidal gold / L.A. Dykman, N.G. Khlebtsov // *Rus. Chem. Rev.* – 2019. – № 88. – C. 229–247.
92. Edgar, J. A. Gold: Science and Applications / J. A. Edgar, M. B. Cortie. – Boca Raton: CRC Press, 2010. – 369–397 c.

93. Efficacy and toxicity of doxorubicin and cyclophosphamide used in the treatment of selected malignant tumors in 23 cats / G.N. Mauldin, R.E. Matus, A.K. Patnaik [et al.] // *Vet Intern Med.* – 1988. – T. 2, № 2. – C. 60–65.
94. Efficacy of pamidronate in reducing skeletal complications in patients with breast cancer and lytic bone metastases. Protocol 19 Aredia Breast Cancer Study Group / G.N. Hortobagyi, R.L. Theriault, L. Porter [et al.] // *N Engl J Med.* – 1996. – T. 25, № 335. – C. 1785–1791.
95. Egenvall, A. Morbidity of insured Swedish cats during 1999–2006 by age, breed, sex, and diagnosis / A. Egenvall, B.N. Bonnett, J. Haäggstroöm // *Feline Med Surg.* – 2010. – T. 12, № 12. – C. 948–959.
96. Egenvall, A. Mortality of life-insured Swedish cats during 1999–2006: age, breed, sex, and diagnosis / A. Egenvall, A. Nødtvedt, J. Haäggstroöm // *Vet Intern Med.* – 2009. – T. 6, № 23. – C. 1175–1183.
97. Electrochemical detection and imaging of reactive oxygen species in single living cells / A.N. Vaneev, P.V. Gorelkin, A.S. Garanina [et al.] // *Anal. Chem.* – 2020. – № 92. – C. 8010–8014.
98. Ellis, R.J. Protein aggregation in crowded environments / R.J. Ellis, A.P. Minton // *Biol. Chem.* – 2006. – № 387. – C. 485–97.
99. Ellis, R.J. Proteins as molecular chaperones / R.J. Ellis // *Nature.* – 1987. – № 328. – C. 378–379.
100. Elston, C.W. Pathological prognostic factors in breast cancer, I: the value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up / C.W. Elston, I.O. Ellis // *Histopathology.* – 1991. – T. 5, № 19. – C. 403–410.
101. Engineering polymeric prodrug nanoplatfrom for vaccination immunotherapy of cancer / L. Zhou, B. Hou, D. Wang [et al.] // *Nano Lett.* – 2020. – № 20. – C. 393–4402.
102. Expression of different phenotypes spindle-cell tumours and osteosarcomas indicating a pluripotent mammary stem cell origin / E. Hellmen, M.

Moller, M.A. Blankenstein [et al.] // *Breast Cancer Res Treat.* – 2000. – № 61. – C. 197–210.

103. Expression of epidermal growth factor receptor and c-ERBB2 during the development of tamoxifen resistance in human breast cancer / J.C. Newby, S.R. Johnston, I.E. Smith [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 1997. – T. 9, № 3. – C. 1643–1651.

104. Extracellular heat shock proteins and cancer: New perspectives / Z. Albakova, M.K.S. Siam, P.K. Sacitharan [et al.] // *Trans Oncol.* – 2021. – T. 14, № 2. – C. 100995.

105. Eyzaguirre, E. Application of immunohistochemistry to infections / E. Eyzaguirre, A.K. Haque // *Arch Pathol Lab Med.* – 2008. – № 132. – C. 424–431.

106. Ferrara, N. Angiogenesis as a therapeutic target / N. Ferrara, R.S. Kerbel // *Nature.* – 2005. – T. 7070, № 438. – C. 967–974.

107. Finn, O.J. Cancer vaccines: Between the idea and the reality / O.J. Finn // *Nat. Rev. Immunol.* – 2003. – № 3. – C. 630–641.

108. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications / J. Folkman // *N Engl J Med.* – 1971. – T. 21, № 285. – C. 1182–1186.

109. Frens, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions / G. Frens // *Nat. Phys. Sci.* – 1973. – № 241. – C. 20–22.

110. Funkhouser, J. Reinventing pharma: the theranostic revolution / J. Funkhouser // *Curr Drug Discov.* – 2002. – № 2. – C. 17-9.

111. Gama, A. A novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissue / A. Gama // *Vet J.* – 2011. – № 190. – C. 303–304.

112. Gama, A. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification / A. Gama, A. Alves, F. Schmitt // *Virchows Arch.* – 2008. – № 453. – C. 123–132.

113. Gething, M. J. Protein folding in the cell / M. J. Gething, J. F. Sambrook // *Nature.* – 1992. – № 335. – C. 33 - 45.

114. Gilbert, C.A. Cytokines, obesity, and cancer: New insights on mechanisms linking obesity to cancer risk and progression / C.A. Gilbert, J.M. Slingerland // *Annu. Rev. Med.* – 2013. – № 64. – C. 45–57.
115. Global analysis of protein expression in yeast / S. Ghaemmaghami, W.K. Huh, K. Bower [et al.] // *Nature*. – 2003. – № 425. – C. 737–41.
116. Gold compounds and the anticancer immune response / L. Zhou, H. Liu, K. Liu, S. Wei // *Front. Pharmacol.* – 2021. – № 12. – C. 739481.
117. Gold Nanoparticle Mediated Multi-Modal CT Imaging of Hsp70 Membrane-Positive Tumors / A. Melanie, M. Shevtsov, C. Werner [et al.] // *Cancers*. – 2020. – № 12. – C. 1331.doi:10.3390/cancers12051331
118. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods / P. Baptista, E. Pereira, P. Eaton [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2008. – № 391. – C. 943–950.
119. Gold nanoparticles in delivery applications / P. Ghosh, G. Han, M. De [et al.] // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2008. – T. 11, № 60. – C. 1307-1315.
120. Gold nanoparticles: Synthesis, properties, biomedical application / L. A. Dykman, V. A. Bogatyrev, S. Y. Shchyogolev, N. G. Khlebtsov. – Moscow: Nauka, 2008. – 319 c. – ISBN 978-5-317-04921-8.
121. Goldberg, J.E. Proinflammatory cytokines in breast cancer: Mechanisms of action and potential targets for therapeutics / J.E. Goldberg, K.L. Schwertfeger, Proinflammatory // *Curr. Drug Targets*. – 2010. – № 11. – C. 1133–1146.
122. Goldstein, R.H. Of mice and (wo)men: mouse models of breast cancer metastasis to bone / R.H. Goldstein, R.A. Weinberg, M. Rosenblatt // *Bone Miner Res.* – 2010. – T. 3, № 25. – C. 431–436.
123. Grivennikov, S.I. Immunity, inflammation, and cancer / S.I. Grivennikov, F.R. Greten, M. Karin // *Cell*. – 2010. – № 140. – C. 883–899.
124. Grobmyer, S. R. Cancer Nanotechnology: Methods and Protocols / S. R. Grobmyer, B. M. Moudgil. – New York: Springer, 2010. – 624 c.

125. Gross, C. A. Function and regulation of the heat shock proteins in *Escherichia coli* and *Salmonella* cellular and molecular biology / C. A. Gross // American Society for Microbiology. – 1996. – № 19. – C. 1382–1399.
126. Hahn, K.A. Feline breast carcinoma as a pathologic and therapeutic model for human breast cancer / K.A. Hahn, L. Bravo, J.S. Avenell // *In Vivo*. – 1994. – T. 5, № 8. – C. 825–828.
127. Hayes, H.M. Epidemiological features of feline mammary carcinoma / H.M. Hayes, K.L. Milne, C.P. Mandell // *Vet Rec*. – 1981. – T. 22, № 108. – C. 476–479.
128. Heat-Shock Induction of Tumor-Derived Danger Signals Mediates Rapid Monocyte Differentiation into Clinically Effective Dendritic Cells / R. Aguilera, C. Saffie, A. Tittarelli [et al.] // *Clin. Cancer Res*. – 2011. – T. 17, № 8. – C. 2474–2483.
129. Heat-shock protein 27: a potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome analysis / J.T. Feng, Y.K. Liu, H.Y. Song [et al.] // *Proteomics*. – 2005. – T. 17, № 5. – C. 4581–4588.
130. HER-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression and interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma / M.P. Hoang, A.A. Sahin, N.G. Ordonez [et al.] // *Am J Clin Pathol*. – 2000. – № 113. – C. 852–859.
131. Herman, C. Encyclopedia of microbiology / C. Herman, C. A. Gross. – Lederberg: Academic Press, 2000. – 598–606 c. .
132. Hicks, D.G. Immunohistochemistry in the diagnostic evaluation of breast lesions / D.G. Hicks // *Appl. Immunohistochem Mol. Morphol.* – 2011. – № 19. – C. 501–505.
133. HighHsp90 expression is associated with decreased survival in breast cancer / E. Pick, Y. Kluger, J.M. Giltane [et al.] // *Cancer Res*. – 2007. – T. 7, № 67. – C. 2932–2937.
134. Highly sensitive fluorescence multiplexed miRNAs biosensors for accurate clinically diagnosis lung cancer disease using LNA-modified DNA probe

and DSN enzyme / K. Djebbi, J. Xing, T. Weng [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 2022. – № 1208. – C. 339778.

135. Higy, M Topogenesis of membrane proteins at the endoplasmic reticulum / M Higy, T. Junne, M. Spiess // *Biochemistry.* – 2004. – № 43. – C. 12716–22.

136. Hilt, W. The ubiquitin–proteasome system: past, present and future / W. Hilt, DH. Wolf // *Cell Mol Life Sci.* – 2004. – № 61. – C. 1545.

137. Hristozova, N. A novel method for assessing the chaperone activity of proteins / N. Hristozova, P. Tompa, D. Kovacs // *PLoS ONE.* – 2016. – T. 8, № 11. – C. e0161970.

138. Hsp70 in Liquid Biopsies—A Tumor-Specific Biomarker for Detection and Response Monitoring in Cancer / W. Caroline, S. Stefan, S. Lukas [et al.] // *Cancers.* – 2021. – T. 15, № 13. – C. 3706.

139. Human scFv antibody fragments specific for hepatocellular carcinoma selected from a phage display library / B. Yu, M. Ni, W.-H. Li [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2005. – № 11. – C. 3985–3989.

140. Immunogenic properties of the colloidal gold / L. A. Dykman, M. V. Sumaroka, S. A. Staroverov [et al.] // *Biology Bulletin.* – 2004. – № 31. – C. 75–79.

141. Immunohistochemical reactivity of basal and luminal epithelium-specific cytokeratin antibodies within normal and neoplastic canine mammary-glands / S.M. Griffey, B.R. Madewell, S.H. Dairkee [et al.] // *Vet Pathol.* – 1993. – № 30. – C. 155–161.

142. Immunolocalization of the smooth muscle-specific protein calponin in complex and mixed tumors of the mammary gland of the dog: assessment of the morphogenetic role of the myoepithelium / A. Espinosa Los de Monteros, M.Y. Millan, J. Ordas [et al.] // *Vet Pathol.* – 2002. – № 39. – C. 247–256.

143. Interleukin-6/STAT3 signaling as a promising target to improve the efficacy of cancer immunotherapy / H. Kitamura, Y. Ohno, Y. Toyoshima [et al.] // *Cancer Sci.* – 2017. – № 108. – C. 1947–1952.

144. Ischia, J. The role of heat shock proteins in bladder cancer / J. Ischia, A.I. So // *Nat Rev Urol.* – 2013. – № 10. – C. 386–95.
145. Jaenicke, R. Protein misassembly in vitro / R. Jaenicke, R. Seckler // *Adv. Protein Chem.* – 1997. – № 50. – C. 1 - 59.
146. Jeltsch, M. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice / M. Jeltsch, A. Kaipainen, V. Joukov // *Science.* – 1997. – T. 5317, № 276. – C. 1423–1425.
147. Jugueira, L.C. Basic histology / L.C. Jugueira, J. Carneiro, R.O. Kelley. – Norwalk : Appleton & Lange, 1995. – 518 c.
148. Kelkar, S.S. Theranostics: combining imaging and therapy / S.S. Kelkar, T.M. Reineke // *Bioconjug Chem.* – 2011. – № 22. – C. 1879-903.
149. Khlebtsov, N.G. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies / N.G. Khlebtsov, L.A. Dykman // *Chem Soc Rev.* – 2011. – № 40. – C. 1647-71.
150. Khlebtsov, N.G. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles / N.G. Khlebtsov, L.A. Dykman, J. Quant // *Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer.* – 2010. – № 111. – C. 1–35.
151. Khlebtsov, N.G. Optics and biophotonics of nanoparticles with a plasmon resonance / N.G. Khlebtsov // *Quantum Electron.* – 2008. – № 38. – C. 504-29.
152. Kierny, M.R. Detection of biomarkers using recombinant antibodies coupled to nanostructured platforms / M.R. Kierny, T.D. Cunningham, B.K. Kay // *Nano Rev.* – 2012. – № 3. – C. 17240.
153. Kim, J.B. Models of breast cancer: is merging human and animal models the future? / J.B. Kim, M.J. O'Hare, R. Stein // *Breast Cancer Res.* – 2004. – T. 1, № 6. – C. 22–30.
154. Kreplak, L. From the polymorphism of amyloid fibrils to their assembly mechanism and cytotoxicity / L. Kreplak, U. Aebi // *Adv Protein Chem.* – 2006. – № 73. – C. 217–33.

155. Kumar, P. Advances in Cancer Diagnostics / P. Kumar, R.V.S. Pawaiya // *Braz. J. Vet. Parasitol.* – 2010. – T. 2, № 3. – C. 142–153.
156. Label-Free Surface Protein Profiling of Extracellular Vesicles by an Electrokinetic Sensor / S. Cavallaro, J. Horak, P. Hååg [et al.] // *ACS Sens.* – 2019. – T. 4, № 5. – C. 1399–1408.
157. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – № 227. – C. 680–685.
158. Lal, S. Nanoshell-enabled photothermal cancer therapy: impending clinical impact / S. Lal, S.E. Clare, N.J. Halas // *Acc. Chem. Res.* – 2008. – № 41. – C. 1842-1851.
159. Lantcet: elimination of solid tumor cells with photo-thermal bubbles generated around clusters of gold nanoparticles / Y. Hleb, J.H. Hafner, J.N. Myers [et al.] // *Nanomedicine.* – 2008. – № 3. – C. 647-67.
160. Lapotko, D. Selective laser nano-thermolysis of human leukemia cells with microbubbles generated around clusters of gold Nanoparticles / D. Lapotko, E. Lukianova, A. Oraevsky // *Lasers Surg Med.* – 2006. – № 38. – C. 631-42.
161. Lee, J. Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4 / J. Lee, A. Gray, J. Yuan // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1996. – T. 5, № 93. – C. 1988–1992.
162. Lei, Y. Application of built-in adjuvants for epitope-based vaccines / Y. Lei, F. Zhao, J. Shao // *Peer J.* – 2019. – № 6. – C. e6185.
163. Leiter, E.H. The NOD mouse: A model for insulin dependent diabetes mellitus / E.H. Leiter // *Curr. Protoc. Immunol.* – 1997. – № 24. – C. 15–19.
164. Leong, T.Y. Immunohistology—past, present, and future / T.Y. Leong, K. Cooper, A.S. Leong // *Adv Anat Pathol.* – 2010. – № 17. – C. 404–418.
165. Ligand-targeted theranostic nanomedicines against cancer / V.J. Yao, S. D'Angelo, K.S. Butler [et al.] // *J. Control. Release.* – 2016. – № 240. – C. 267–286.

166. Loss of myoferlin redirects breast cancer cell motility towards collective migration / L.I. Volakis, R. Li, W.E. Ackerman [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – T. 2, № 9. – C. 86110.

167. Lou, J. Advancing cancer immunotherapies with nanotechnology / J. Lou, L. Zhang, G. Zheng // *Adv. Ther.* – 2019. – № 2. – C. 1800128.

168. Luo, P. G. Nanotechnology in the detection and control of microorganisms / P. G. Luo, F. J. Stutzenberger // *Adv Appl Microbiol.* – 2008. – № 63. – C. 145–181.

169. MacEwen, E.G. Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment / E.G. MacEwen // *Cancer Metastasis Rev.* – 1990. – T. 2, № 9. – C. 125–136.

170. Madu, C.O. Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer / C.O. Madu, Y. Lu // *J. Cancer*. – 2010. – № 1. – C. 150–177.

171. Maeng, H.M. Strategies for developing and optimizing cancer vaccines / H.M. Maeng, J.A. Berzofsky // *F1000Research*. – 2019. – № 8. – C. 654.

172. Maisonpierre, P.C. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis / P.C. Maisonpierre, C. Suri, P.F. Jones // *Science*. – 1997. – T. 5322, № 277. – C. 55–60.

173. Margel, D. Stress proteins and cytokines are urinary biomarkers for diagnosis and staging of bladder cancer / D. Margel, M. Pevsner-Fischer, J. Baniel // *Eur. Urol.* – 2011. – T. 1, № 59. – C. 113–119.

174. Martin de las Mulas, J. Calponin expression and myoepithelial cell differentiation in canine, feline and human mammary simple carcinomas / J. Martin de las Mulas, C. Reymundo, A. Espinosa de los Monteros // *Vet Comp Oncol.* – 2004. – № 2. – C. 24–35.

175. Mathew, A. Role of the heat-shock response in the life and death of proteins / A. Mathew, R.I. Morimoto // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1998. – № 851. – C. 99.

176. Matsumoto, M. Signaling for lymphangiogenesis via VEGFR-3 is required for the early events of metastasis / M. Matsumoto, S. Roufail, R. Inder // *Clin Exp Metastasis*. – 2013. – T. 6, № 30. – C. 819–832.

177. McCracken, A.A. Evolving questions and paradigm shifts in endoplasmic-reticulum-associated degradation (ERAD) / A.A. McCracken, J.L. Brodsky // *Bioessays*. – 2003. – № 25. – C. 868–77.

178. Misdorp, W. Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat. 2nd series / W. Misdorp, R.W. Else, T.P. Hellme'nLipscomb. – Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1999. – 59 c.

179. Misdorp, W. Tumors of the mammary gland / W. Misdorp. – Ames: Tumors in Domestic Animals, 2002. – 575–606 c.

180. Molecular cloning and characterization of Hsp27.6: the first reported small heat shock protein from *Apis cerana cerana* / Z. Liu, D. Xi, M. Kang [et al.] // *Cell Stress Chaperones*. – 2012. – № 17. – C. 539–551

181. Morimoto, R. I. Progress and perspectives on the biology of heat shock proteins and molecular chaperones. / R. I. Morimoto, A. Tissieres, C. Georgopoulos. – Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1994. – 610 c.

182. Moulton, J.E. Tumors in Domestic Animals / J.E. Moulton. – Berkeley, CA: University of California Press, 1990. – 672 c.

183. Muchowski, P.J. Protein misfolding, amyloid formation and neurodegeneration: a critical role for molecular chaperones? / P.J. Muchowski // *Neuron*. – 2002. – T. 1, № 35. – C. 9–12.

184. Nanocomposites containing silica-coated gold-silver nanocages and Yb-2,4-dimethoxyhematoporphyrin: Multifunctional capability of IR-luminescence detection, photosensitization, and photo-thermolysis / B. Khlebtsov, E. Panfilova, V. Khanadeev [et al.] // *ACS Nano*. – 2011. – № 5. – C. 7077-89.

185. Nanogold-pharmaceutics: (i) The use of colloidal gold to treat experimentally-induced arthritis in rat models; (ii) Characterization of the gold in Swarna bhasma, a microparticulate used in traditional Indian medicine / C. L.

Brown, G. Bushell, M. W. Whitehouse [et al.] // *Gold Bulletin*. – 2007. – T. 3, № 40. – C. 245–250.

186. Nanoshell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer / C. Loo, A. Lin, L. Hirsch [et al.] // *Technol Cancer Res Treat*. – 2004. – № 3. – C. 33–40.

187. Near-infrared resonant nanoshells for combined optical imaging and photothermal cancer therapy / M. Gobin, M.H. Lee, N.J. Halas [et al.] // *Nano Lett*. – 2007. – № 7. – C. 1929–1934.

188. New Frontiers in Diagnosis and Therapy of Circulating Tumor Markers in Cerebrospinal Fluid In Vitro and In Vivo / J.W. Kim, E.I. Galanzha, E.V. Shashkov [et al.] // *Nat. Nanotechnol*. – 2009. – № 4. – C. 688–694.

189. Nicolini, A. Cytokines in breast cancer / A. Nicolini, A. Carpi, G. Rossi // *Cytokine Growth Factor Rev*. – 2006. – № 17. – C. 325–337.

190. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA / R.A. Laskey, B.M. Honda, A.D. Mills, J.T. Finch // *Nature*. – 1978. – № 275. – C. 416–420.

191. Odom, T.W How gold nanoparticles have stayed in the light: The 3M's principle / T.W Odom, C.L. Nehl // *ACS Nano*. – 2008. – № 2. – C. 612–616.

192. Pathology and clinical relevance of radial scars: a review / M. Kennedy, A.V. Masterson, M. Kerin [et al.] // *Clin Pathol*. – 2003. – № 56. – C. 721–724.

193. Pavlidis, N. Diagnostic and therapeutic management of cancer of an unknown primary / N. Pavlidis, E. Briasoulis, J. Hainsworth // *Eur J Cancer*. – 2003. – № 39. – C. 1990–2005.

194. Phage antibodies against heat shock proteins as tools for in vitro cancer diagnosis / S.A. Staroverov, S.V. Kozlov, F.A. Brovko [et al.] // *Biosens. Bioelectron*. – 2022. – № 11. – C. 100211.

195. Phage-Display Selection of a Human Single-Chain Fv Antibody Highly Specific for Melanoma and Breast Cancer Cells Using a

Chemoenzymatically Synthesized GM3–Carbohydrate Antigen / K.J. Lee, S. Mao, C. Sun [et al.] // *Am. Chem. Soc.* – 2002. – № 124. – C. 12439–12446.

196. Photothermal bubbles as optical scattering probes for imaging living cells / E.Y. Hleb, Y. Hu, R.A. Drezek [et al.] // *Nanomedicine.* – 2008. – № 3. – C. 797-812.

197. Picard, F.J. Rapid molecular theranostics in infectious diseases / F.J. Picard, M.G. Bergeron // *Drug Discov Today.* – 2002. – № 7. – C. 1092-101.

198. Pissuwan, D. The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems / D. Pissuwan, T. Niidome, M. B. Cortie // *Controlled Release.* – 2011. – № 149. – C. 65–71.

199. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles / X. Huang, P.K. Jain, I.H. El-Sayed, M.A. El-Sayed // *Lasers Med. Sci.* – 2008. – № 23. – C. 217–228.

200. Polarization microscopy with stellated gold nanoparticles for robust, in-situ monitoring of biomolecules / J. Aaron, E. de la Rosa, K. Travis [et al.] // *Opt. Express.* – 2008. – № 16. – C. 2153–2167.

201. Poste, G. The pathogenesis of cancer metastasis / G. Poste, I.J. Fidler // *Nature.* – 1980. – T. 5743, № 283. – C. 139–146.

202. Predictive markers in breast cancer—the present / S.J. Payne, R.L. Bowen, J.L. Jones [et al.] // *Histopathology.* – 2008. – № 52. – C. 82–90.

203. Prognostic and therapeutic values of tumor necrosis factor-alpha in hepatocellular carcinoma / H. Wang, J. Liu, X. Hu [et al.] // *Med. Sci. Monit.* – 2016. – № 22. – C. 3694–3704.

204. Prognostic role of HSPs in human gastrointestinal cancer: a systematic review and meta-analysis / H. Ge, Y. Yan, L. Guo [et al.] // *Onco. Targets Ther.* – 2018. – № 11. – C. 351.

205. Prognostic value of histologic grading for feline mammary carcinoma: a retrospective survival analysis / S.W. Mills, K.M. Musil, J.L. Davies [et al.] // *Vet Pathol.* – 2015. – T. 2, № 52. – C. 238–249.

206. Properties of the heat shock proteins of *Escherichia coli* and the autoregulation of the heat shock response / C. Georgopoulos, K. Liberek, M. Zylicz, D. Ang // *Biol Heat Shock Prot Mol Chaperones*. – 1994. – № 26. – C. 209–249.

207. Proteomic profiling of heat shock protein 70 family members as biomarkers for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma / M. Takashima, Y. Kuramitsu, Y. Yokoyama [et al.] // *Proteomics*. – 2003. – T. 12, № 3. – C. 2487–2493.

208. Proteomics-based identification of autoantibody against heat shock protein 70 as a diagnostic marker in esophageal squamous cell carcinoma / Y. Fujita, T. Nakanishi, Y. Miyamoto [et al.] // *Cancer Lett*. – 2008. – T. 2, № 263. – C. 280–290.

209. Purification of the 90 kDa heat shock protein (hsp90) and simultaneous purification of hsp70/hsc70, hsp90 and hsp96 from mammalian tissues and cells using thiophilic interaction chromatography / Y. Skarga, V. Vrublevskaya, Y. Evdokimovskaya, O. Morenkov // *Biomed. Chromatogr.* – 2009. – № 23. – C. 1208–1216.

210. Quantitative cell bioimaging using gold-nanoshell conjugates and phage antibodies / V.A. Khanadeev, B.N. Khlebtsov, S.A. Staroverov [et al.] // *J. Biophotonics*. – 2010. – № 4. – C. 74–83.

211. Quinten, M. Optical properties of nanoparticle systems / M. Quinten. – Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2011. – 488.

212. Radiation therapy induces circulating serum Hsp72 in patients with prostate cancer / M.D. Hurwitz, M.A. Benedict, L. Ding, G. Nuñez // *Radiother. Oncol.* – 2010. – T. 3, № 95. – C. 350–358.

213. Rakha, E.A. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation / E.A. Rakha, T.C. Putti, D.M. Abd El-Rehim // *Pathol.* – 2006. – № 208. – C. 495–506.

214. Rappa, F. Quantitative patterns of Hsps in tubular adenoma compared with normal and tumor tissues reveal the value of Hsp10 and Hsp60 in early

diagnosis of large bowel cancer / F. Rappa, A. Pitruzzella, A. Marino Gammazza // Cell Stress Chaperones. – 2016. – T. 5, № 21. – C. 927–933.

215. Rashid, O.M. Is tail vein injection a relevant breast cancer lung metastasis model? / O.M. Rashid, M. Nagahashi, S. Ramachandran // Thorac Dis. – 2013. – T. 4, № 5. – C. 385–392.

216. Robert, C. A. Decade of immune-checkpoint inhibitors in cancer therapy / C. Robert // Nat. Commun. – 2020. – № 11. – C. 3801.

217. Rohaan, M.W. Adoptive cellular therapies: The current landscape / M.W. Rohaan, S. Wilgenhof, J.B.A.G. Haanen // Virchows Arch. – 2019. – № 474. – C. 449-461.

218. Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases / JM. Barral, SA. Broadley, G. Schaffar, FU. Hartl // Semin Cell Dev. Biol. – 2004. – T. 1, № 15. – C. 17–29.

219. Roodman, G.D. Mechanisms of bone metastasis / G.D. Roodman // N Engl J Med.. – 2004. – № 350(16). – C. 1655-1664.

220. Roodman, G.D. Mechanisms of bone metastasis / G.D. Roodman // N Engl J Med. – 2004. – № 350(16). – C. 1655-1664.

221. Rosol, T.J. Animal models of bone metastasis / T.J. Rosol, S.H. Tannehill-Gregg, B.E. LeRoy // Cancer. – 2003. – № 97(3). – C. 748-757.

222. Salazar-González, J.A. Gold nanoparticles and vaccine development / J.A. Salazar-González, O. González-Ortega, S. Rosales-Mendoza // Expert Rev. Vaccines. – 2015. – № 14. – C. 1197–1211.

223. Salomon, D.S. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies / D.S. Salomon, R. Brandt, F. Ciardiello // Crit Rev Oncol Hematol. – 1995. – № 19(3). – C. 183–232.

224. Santiago-O’Farrill, J.M. Phosphorylated heat shock protein 27 as a potential biomarker to predict the role of chemotherapy-induced autophagy in osteosarcoma response to therapy / J.M. Santiago-O’Farrill, E.S. Kleinerman, M.G. Hollomon // Oncotarget. – 2018. – № 9(2). – C. 1602.

225. Sasaki, A. Bisphosphonate risedronate reduces metastatic human breast cancer burden in bone in nude mice / A. Sasaki, B.F. Boyce, B. Story // *Cancer Res.* – 1995. – № 55(16). – C. 3551–3557.

226. Sayeed, A. Search and destroy: ER quality control and ER-associated protein degradation / A. Sayeed, D.T. Ng // *Crit Rev Biochem Mol Biol.* – 2005. – № 40. – C. 75–91.

227. Sfiligoi, C. Angiopoietin-2 expression in breast cancer correlates with lymph node invasion and short survival / C. Sfiligoi, A. de Luca, I. Cascone // *Int J Cancer.* – 2003. – № 103(4). – C. 466–474.

228. Shah, K. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): The basics / K. Shah, P. Maghsoudlou // *Br. J. Hosp. Med.* – 2016. – № 77. – C. 98–101.

229. Siegel, R. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths / R. Siegel, E. Ward, O. Brawley // *CA Cancer J Clin.* – 2011. – № 61(4). – C. 212–236.

230. Simmons, J.K. Animal models of bone metastasis / J.K. Simmons, B.E. Hildreth, W. Supsavhad // *Vet Pathol.* – 2015. – № 52(5). – C. 827–841.

231. Singh, P. Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer / P. Singh, S. Pandit, V. Mokkapati // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2018. – T. 7, № 19. – C. 1979.

232. Skobe, M. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis / M. Skobe, T. Hawighorst, D.G. Jackson // *Nat Med.* – 2001. – № 7(2). – C. 192–198.

233. Sleenckx, N. Canine mammary tumours, an overview / N. Sleenckx, H. de Rooster, E.J. Veldhuis Kroeze // *Reprod Domest Anim.* – 2011. – № 46. – C. 1112–1131.

234. Soldatov, D. A. Immunization of mice with gold nanoparticles conjugated to thermostable tumor anti-gens prevents tumor development during transplantation / D. A. Soldatov, S. A. Staroverov, S. V. Kozlov // *International Journal of Molecular Sciences.* - 2022-11-18. - №23(22). – C. 14313;

235. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins / M. Haslbeck, T. Franzmann, D. Weinfurtner, J. Buchner // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2005. – T. 10, № 12. – C. 842–846.

236. Sorenmo, K. Canine mammary gland tumors / K. Sorenmo // *Vet Clinics North Am Small Anim Practice.* – 2003. – № 33. – C. 573–596.

237. Sorenmo, K.U. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms / K.U. Sorenmo, R. Rasotto, V. Zappulli // *Vet Pathol.* – 2011. – № 48. – C. 85–97.

238. Stimulation of in vivo antitumor immunity with hollow mesoporous silica nanospheres / X. Wang, X. Li, A. Ito [et al.] // *Angew. Chem.* – 2016. – № 55. – C. 1899–1903.

239. Stockman, M.I. Nanoplasmonics: past, present, and glimpse into future / M.I. Stockman // *Opt Express.* – 2011. – № 19. – C. 22029-106.

240. Suri, C. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis / C. Suri, P.F. Jones, S. Patan // *Cell.* – 1996. – № 87(7). – C. 1171–1180.

241. Tannehill-Gregg, S.H. The effect of zoledronic acid and osteoprotegerin on growth of human lung cancer in the tibias of nude mice / S.H. Tannehill-Gregg, A.L. Levine, M.V. Nadella // *Clin Exp Metastasis.* – 2006. – № 23(1). – C. 19–31.

242. Tao, W. M2e-immobilized gold nanoparticles as influenza A vaccine: Role of soluble M2e and longevity of protection / W. Tao, H.S. Gill // *Vaccine.* – 2015. – № 33. – C. 2307–2315.

243. Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment / N. Normanno, C. Bianco, A. De Luca [et al.] // *Endocr Relat Cancer.* – 2003. – T. 1, № 10. – C. 1–21.

244. Tateyama, S. Expression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in myoepithelial cells in canine mammary gland tumors / S. Tateyama, K. Uchida, T. Hidaka // *Vet Pathol.* – 2001. – № 38. – C. 703–709.

245. Tavassoli, F.A. World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs / F.A. Tavassoli, P. Devilee. – Lyon, France: IARC, 2003. – 131 c.

246. The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview / N. Normanno, C. Bianco, L. Strizzi [et al.] // *Curr Drug Targets*. – 2005. – T. 3, № 6. – C. 243–257.

247. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine / EC. Dreaden, A.M. Alkilany, X. Huang [et al.] // *Chem Soc Rev*. – 2012. – № 41. – C. 2740-79.

248. The in vivo performance of plasmonic nanobubbles as cell theranostic agents in zebrafish hosting prostate cancer xenografts / D.S. Wagner, N.A. Delk, E.Y. Lukianova-Hleb [et al.] // *Biomaterials*. – 2010. – № 31. – C. 7567-7574.

249. Theranostic nanomedicine / T. Lammers, S. Aime, W.E. Hennink [et al.] // *Acc Chem Res*. – 2011. – № 44. – C. 1029-38.

250. Toraskar, S. The shape of nanostructures encodes immunomodulation of carbohydrate antigen and vaccine development / S. Toraskar, P.M. Chaudhary, R. Kikkeri // *ACS Chem. Biol*. – 2022. – № 17. – C. 1122–1130.

251. Tri-functionalization of mesoporous silica nanoparticles for comprehensive cancer theranostics – the trio of imaging, targeting and therapy / S-H. Cheng, C-H. Lee, M-C. Chen [et al.] // *Mater Chem*. – 2010. – № 20. – C. 6149-57.

252. Tsai, B. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol / B. Tsai, Y. Ye, T.A. Rapoport // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. – 2002. – № 3. – C. 246–55.

253. Tsuda, H. Large, central acellular zones indicating myoepithelial tumor differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas as markers of predisposition to lung and brain metastases / H. Tsuda, T. Takarabe, F. Hasegawa // *Am J Surg Pathol*. – 2000. – № 24. – C. 197–202.

254. Tumor-derived extracellular vesicles: Potential tool for cancer diagnosis, prognosis, and therapy / T. Saleem, A. Sumrin, M. Bilal [et al.] // *Biol. Sci*. – 2022. – № 29(4). – C. 2063–2071.

255. Tunable plasmonic nanobubbles for cell theranostics / E.Y. Lukianova-Hleb, E.Y. Hanna, J.H. Hafner, D.O. Lapotko // *Nanotechnology*. – 2010. – № 21. – C. 85102.

256. Tunable plasmonic nanoprobe for theranostics of prostate cancer / E.Y. Lukianova-Hleb, A.O. Oginsky, A.P. Samaniego [et al.] // *Theranostics*. – 2011. – № 1. – C. 3-17.

257. Two-photon-induced photoluminescence imaging of tumors using near-infrared excited gold nanoshells / J. Park, A. Estrada, K. Sharp [et al.] // *Opt. Express*. – 2008. – № 16. – C. 1590–1599.

258. UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20–69 years / R. Peto, J. Boreham, M. Clarke [et al.] // *Lancet*. – 2000. – T. 9217, № 355. – C. 1822.

259. Use of a novel marker, calponin, for myoepithelial cells in fine-needle aspirates of papillary breast lesions / M.B. Mosunjac, M.M. Lewis, D. Lawson [et al.] // *Diagn Cytopathol*. – 2000. – № 23. – C. 151–155.

260. Uyama, R. Establishment and characterization of eight feline mammary adenocarcinoma cell lines / R. Uyama, S.H. Hong, T. Nakagawa // *Establishment and characterization of eight feline mammary adenocarcinoma cell lines*. – 2005. – № 67(12). – C. 1273–1276.

261. Vainer, N. Systematic literature review of IL-6 as a biomarker or treatment target in patients with gastric, bile duct, pancreatic and colorectal cancer. / N. Vainer, C. Dehlendorff, J.S. Johansen // *Oncotarget*. – 2018. – № 9. – C. 29820–29841.

262. Valenzuela, D.M. Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans / D.M. Valenzuela, J.A. Griffiths, J. Rojas // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 1999. – № 96(5). – C. 1904–1909.

263. VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors / M.M. Mattila, J.K. Ruohola, T. Karpanen [et al.] // *Int J Cancer*. – 2002. – T. 6, № 98. – C. 946–951.

264. Waldmann, T.A. Cytokines in cancer immunotherapy / T.A. Waldmann // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2018. – T. 12, № 10. – C. 28472.
265. Walter, S. Molecular Chaperones—Cellular Machines for Protein Folding / S. Walter, J. Buchner // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2002. – № 41. – C. 1098-1113.
266. Warner, S. Diagnostics + therapy = theranostics / S. Warner // *Scientist.* – 2004. – № 18. – C. 38-9.
267. Weigelt, B. Histological types of breast cancer: how special are they? / B. Weigelt, F.C. Geyer, J.S. Reis-Filho // *Mol. Oncol.* – 2010. – № 4. – C. 192–208.
268. Weijer, K. Feline malignant mammary tumors, I: morphology and biology: some comparisons with human and canine mammary carcinomas / K. Weijer, K.W. Head, W. Misdorp // *J Natl. Cancer Inst.* – 1972. – № 49(6). – C. 1697–1704.
269. Werbeck, J.L. Tumor microenvironment regulates metastasis and metastasis genes of mouse MMTV-PyMT mammary cancer cells in vivo / J.L. Werbeck, N.K. Thudi, C.K. Martin // *Vet Pathol.* – 2014. – № 51(4). – C. 868–881.
270. Yancopoulos, G.D. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation / G.D. Yancopoulos, S. Davis, N.W. Gale // *Nature.* – 2000. – № 407(6801). – C. 242–248.
271. Yu, M.K. Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging and therapy. / M.K. Yu, J. Park, S. Jon // *Theranostics.* – 2012. – № 2. – C. 3-34.
272. Zappulli, V. Feline mammary tumours in comparative oncology / V. Zappulli, G. De Zan, B. Cardazzo // *J Dairy Res.* – 2005. – № 72(1). – C. 98–106.
273. Zappulli, V. Prognostic evaluation of feline mammary carcinomas: a review of the literature / V. Zappulli, R. Rasotto, D. Caliani // *Vet Pathol.* – 2015. – № 51(1). – C. 46–60.
274. Zhang, L. Heat shock proteins in multiple myeloma / L. Zhang, J.H. Fok, F.E. Davies // *Oncotarget.* – 2015. – № 5. – C. 1132–1148.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- Au – золото
- BSA – Bovine Serum albumin
- CMT – Canine mammary tumor
- DLS – динамическое рассеяние света
- ER – Endoplasmic reticulum
- GAPI – индекс зеленой аналитической процедуры
- HSP – heat shock protein
- HSR – Heat shock reaction
- Ig – иммуноглобулин
- NEMI – национальный индекс экологических методов
- NPs – наночастицы
- PBS – фосфатно-буферный солевой раствор
- PVDF – Polyvinylidene fluoride
- SDS – Sodium Dodecyl Sulfate
- Se/Sil – SeNPs, связанные с кремнием
- SeNPs – наночастицы селена
- Sil – силимарин
- ТЕМ – просвечивающая электронная микроскопия
- UV – ультрафиолет
- Ag – антиген
- BCA – бычий сывороточный альбумин
- Ил – интерлейкин
- ИФА – Иммуно ферментный анализ
- Кз – Коллоидное золото
- НЧЗ – наночастицы золота
- ПАФ – полным адьювантом Фрейнда
- ПВДФ – поливинилидендифториде
- ПФЕ – бляшкообразующие единицы
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- Эр – Эндоплазматический ретикулум

ПРИЛОЖЕНИЕ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2798268

**Способ получения ветеринарного препарата на основе
неспецифических иммуноглобулинов и коллоидных частиц
селена для коррекции иммунной системы**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова" (RU)*

Авторы: *Козлов Сергей Васильевич (RU), Староверов Сергей Александрович (RU), Скворцова Наталия Игоревна (RU), Солдатов Дмитрий Алексеевич (RU), Чекунов Михаил Андреевич (RU), Силина Евгения Викторовна (RU), Козлов Евгений Сергеевич (RU), Артемьев Дмитрий Алексеевич (RU)*

Заявка № **2022110790**

Приоритет изобретения **21 апреля 2022 г.**

Дата государственной регистрации

в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации **20 июня 2023 г.**

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **21 апреля 2042 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат 429b6a0fe3863164ba9f6f83b73b4aa7
Владелец: **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 10.05.2023 по 02.08.2024

Ю.С. Зубов



АКТ**клинического испытания прототипа диагностической тест-системы на основе белков теплового шока**

30 марта 2023 года

Мы, нижеподписавшиеся, ИП Солдатова Лариса Васильевна, ветеринарный врач Солдатов Алексей Викторович, составили настоящий акт в том, что в период 2019-2023 гг. в результате проведения научно-исследовательских работ по теме: «Белки теплового шока в диагностике и профилактике онкологических заболеваний», аспирантом кафедры «Болезни животных и ВСЭ» Солдатовым Дмитрием Алексеевичем, на базе ветеринарного кабинета ИП Солдатова Л.В. г. Саратов, проводился отбор сыворотки крови у онкологически больных животных для испытания прототипа диагностической тест-системы на основе белков теплового шока. Что позволяет поставить верный диагноз на ранних этапах развития новообразований молочной железы у кошек.

В исследование были включены 13 кошек с диагнозом аденома (2 самца и 11 самок в возрасте от 8 лет., до 19 лет разных пород, живой массой от 1,5 до 6,3 кг) пришедшие на прием в ветеринарный кабинет ИП Солдатова Л.В.

Критерием отбора в группу для исследований являлось наличие симптомов неопластических изменений в области молочной железы на основании клинико-лабораторных исследований.

У животных отбиралась сыворотка крови по следующей схеме:

Забор крови у кошек осуществлялся из малой подкожной вены предплечья. Предварительно по ходу вен выстригали волос, дезинфицировали кожу. После этого накладывали на конечность жгут, сдавливающий вену (не снимают до тех пор, пока не закончат взятие крови).

Пальцами руки определяли наполнение и место положения вены. Одноразовой иглой прокалывали вену и постепенно продвигали иглу вглубь тканей. Собирали кровь непосредственно в пробирку из пластмассы, которые покрыты слоем антикоагулянта этилендиаминтетрауксусной кислотой.

Пробирки с антикоагулянтом сразу же после наполнения закрывали крышкой и несколько раз переворачивали для перемешивания крови с антикоагулянтом. Перед извлечением иглы из вены резиновый жгут снимали, пережимали вену пальцем выше места укола, иглу извлекали, место укола некоторое время сдавливали тампоном для предотвращения образования гематомы.

Проводился ИФА по следующей методике. Сыворотки, отобранные у спонтанно заболевших кошек, были разведены 1:20 в 0,05 М карбонат-бикарбонатным буфером (рН 9,6), адсорбированы на дне чашки и инкубированы в течении ночи при 4°C. Сыворотки от здоровых кошек использовались в качестве отрицательного контроля. Связывание HSP кошек проявляли с помощью кроличьих антител, комплекс HSP-антитело выявлялся козьими анти-кроличьими антителами к IgG кролика.

При анализе крови больных животных установлено, что реакция антиген-антитело фиксируется у всех животных, кроме контроля.

Повышенное содержание HSP в сыворотках крови животных с аденомой молочной железы наблюдались во всех трех случаях. Увеличение HSP у пациентов №1, №2 и №3 составило в 8 раз, по сравнению с контролем.

Заключение

Применение сыворотки, отобранной от онкологически больных животных, позволяет определить у них наличие циркулирующих белков теплового шока в крови. Выявлено взаимодействие полученных фаговых антител с HSP-антигенами в сыворотке спонтанно заболевших животных с помощью ELISA, где рост HSP-антигена в сыворотке крови у животных с диагнозом аденома молочной железы наблюдался в 100% случаев. Концентрация белков теплового шока в сыворотке крови составляет от 0,197 до 0,397 мг/мл при 0,02 мг/мл у клинически здоровых животных. Явная динамика снижения белков теплового шока в сыворотке крови после удаления опухоли отмечается через 3 часа.

Индивидуальный предприниматель
Солдатова Лариса Васильевна



Главный ветеринарный врач
Солдатов Алексей Викторович

АКТ
клинического испытания прототипа диагностической тест-системы на
основе белков теплового шока

2 апреля 2023 года

Я, нижеподписавшаяся, Ольга Александровна Василенко, составила настоящий акт в том, что в период 2019-2023 гг. в результате проведения научно-исследовательских работ по теме: «Белки теплового шока в диагностике и профилактике онкологических заболеваний» на базе ветеринарной клиники «Пингвин» г. Саратов, аспирантом кафедры «Болезни животных и ВСЭ» Солдатовым Дмитрием Алексеевичем проводился отбор сыворотки крови у онкологически больных животных для испытания прототипа диагностической тест-системы на основе белков теплового шока. Данный прототип позволяет поставить правильный диагноз на ранних стадиях развития неоплазии молочной железы у кошек.

В исследование принимало участие 9 кошек с диагнозом аденома молочной железы (1 самец и 8 самок в возрасте от 6 лет., до 14 лет разных пород, живой массой от 1,5 до 5,4 кг) пришедшие на прием в ветеринарную клинику «Пингвин».

Главным критерием, по которым отбирались животные для дальнейшего исследования, было наличие симптомов новообразования молочной железы. Постановка диагноза осуществлялась на основании клинико-лабораторных исследований.

Для дальнейших исследований проводился забор крови:

Взятие крови осуществляли из малой подкожной вены предплечья. Волос на конечности выстригался, на конечность накладывался жгут для сдавливания вены. После определения наполнения и локализации вены ее прокалывали одноразовой иглой. Кровь собиралась в стеклянную пробирку, покрытую слоем антикоагулянта этилендиаминтетрауксусной кислотой. Пробирка закрывалась и переворачивалась несколько раз для предотвращения коагуляции крови. Резиновый жгут снимался для дальнейшего извлечения иглы.

Дальнейшее исследование заключалось в проведении иммуноферментного анализа. Сыворотки от исследуемых кошек разводились в соотношении 1:20 в 0,05 М карбонат-бикарбонатным буфером (pH 9,6), адсорбированы на дне чашки и инкубированы в течении ночи при 4°C. В качестве отрицательного контроля использовались сыворотки от здоровых кошек. Связывание HSP кошек проявляли с помощью кроличьих антител, комплекс HSP-антитело выявлялся козьими анти-кроличьими антителами к IgG кролика.

При анализе крови больных животных установлено, что реакция антиген-антитело фиксируется у всех животных, кроме контроля.

Повышенное содержание HSP в сыворотках крови животные с аденомой молочной железы наблюдались во всех трех случаях. Увеличение HSP у пациентов №1 №2 и №3 составило в 8 раз, по сравнению с контролем.

Заключение

Сыворотки от больных кошек, с диагнозом аденокарцинома молочной железы, позволяют определять наличие белков теплового шока, которые циркулируют в кровяном русле у животных. При проведении анализа, нами было выявлено взаимодействие, полученных фаговых антител с HSP-антигенами в сыворотке спонтанно заболевших животных с помощью ELISA, где рост HSP-антигена в сыворотке крови у животных с диагнозом аденома молочной железы наблюдался в 100% случаев. В результате исследований концентрации белков теплового шока в сыворотке крови у кошек нами были получены следующие результаты: у больных животных концентрация была от 0,197 до 0,397 мг/м, в то время как у клинически здоровых животных концентрация была равна 0,02 мг/мл.

Руководитель
ветеринарной клиники
«Пингвин»



Ольга Александровна Василенко