

Солдатов Дмитрий Алексеевич

**БЕЛКИ ТЕПЛОВОГО ШОКА В ДИАГНОСТИКЕ И ПРОФИЛАКТИКЕ
ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

4.2.1 Патология животных, морфология, физиология, фармакология и
токсикология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата ветеринарных наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова»

Научный руководитель **Староверов Сергей Александрович,**
доктор биологических наук

Официальные оппоненты **Татарникова Наталья Александровна,** доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБОУ ВО «Пермский государственный аграрно-технологический университет имени Д.Н. Прянишникова», заведующая кафедрой «Инфекционные болезни», г. Пермь

Кудачева Наталья Александровна, кандидат ветеринарных наук, доцент, ФГБОУ ВО «Самарский государственный аграрный университет», доцент кафедры «Эпизоотология, патология и фармакология», г. Кинель

Ведущая организация ФГБОУ ВО «Бурятская государственная сельскохозяйственная академия», г. Улан-Удэ

Защита диссертации состоится 27 декабря 2023 года в 11⁰⁰ на заседании диссертационного совета 35.2.035.02 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335, УК № 3, диссертационный зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО Вавиловский университет и на сайте www.vavilovsar.ru

Отзывы направлять ученому секретарю диссертационного совета 35.2.035.02 по адресу: 410012, г. Саратов, пр-кт им. Петра Столыпина, зд. 4, стр. 3., ФГБОУ ВО Вавиловский университет; e-mail: vetdust@mail.ru

Автореферат разослан «_____» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

А.В. Егунова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследований. 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 (Reña et al., 2014).

Важным направлением в диагностике рака является неинвазивное исследование, основанное на онкомаркерах.

При диагностике особое внимание следует уделять использованию белков теплового шока (HSP), которые выполняют функцию молекулярных шаперонов. HSP - это высококонсервативные внутриклеточные белки, которые участвуют в формировании белковой структуры в ответ на стресс или высокую температуру. Именно белки теплового шока могут применяться в диагностике и в иммунотерапии (Azad et al., 2015).

Вакцины стимулируют противоопухолевый иммунитет. Основная идея таких вакцин заключается в том, что злокачественные клетки сверхэкспрессируют опухолевые антигены, на которые может быть установлен T-клеточный иммунный ответ (Finn et al., 2003).

Органические и неорганические наночастицы в опухолевых вакцинах значительно повышают стабильность антигена и его накопление в лимфатических узлах. Среди всех доступных наночастиц для этой цели одной из наиболее популярных являются наночастицы золота (ЗНЧ).

Степень разработанности темы исследований. 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; Vanstola A., 2020; Shi L., 2017).

На сегодняшний день имеются исследования об использовании наночастиц в биомедицинских целях: (Alkilany A. 2010) в своем исследовании получал золотой наноккомпозит – 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 и ценность полученных результатов. 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 мышинной, 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 исследования.

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

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. 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 29 рисунками. Список литературы включает 274 источников, в том числе 263 – иностранных авторов.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

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 СЦ РАН. Научно-производственные исследования проводились в условиях ветеринарных клиник для животных УНТЦ «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. Экспериментальная часть диссертационной работы делилась на шесть последовательных этапов, представленных на (Рисунке 1).

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. 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).

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 путем восстановления HAuCl_4 цитратом натрия. 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, Великобритани).

Перед конъюгацией мы оценили «золотое число». Все измерения проводились в Центре коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ИБФРМ РАН, Саратов.

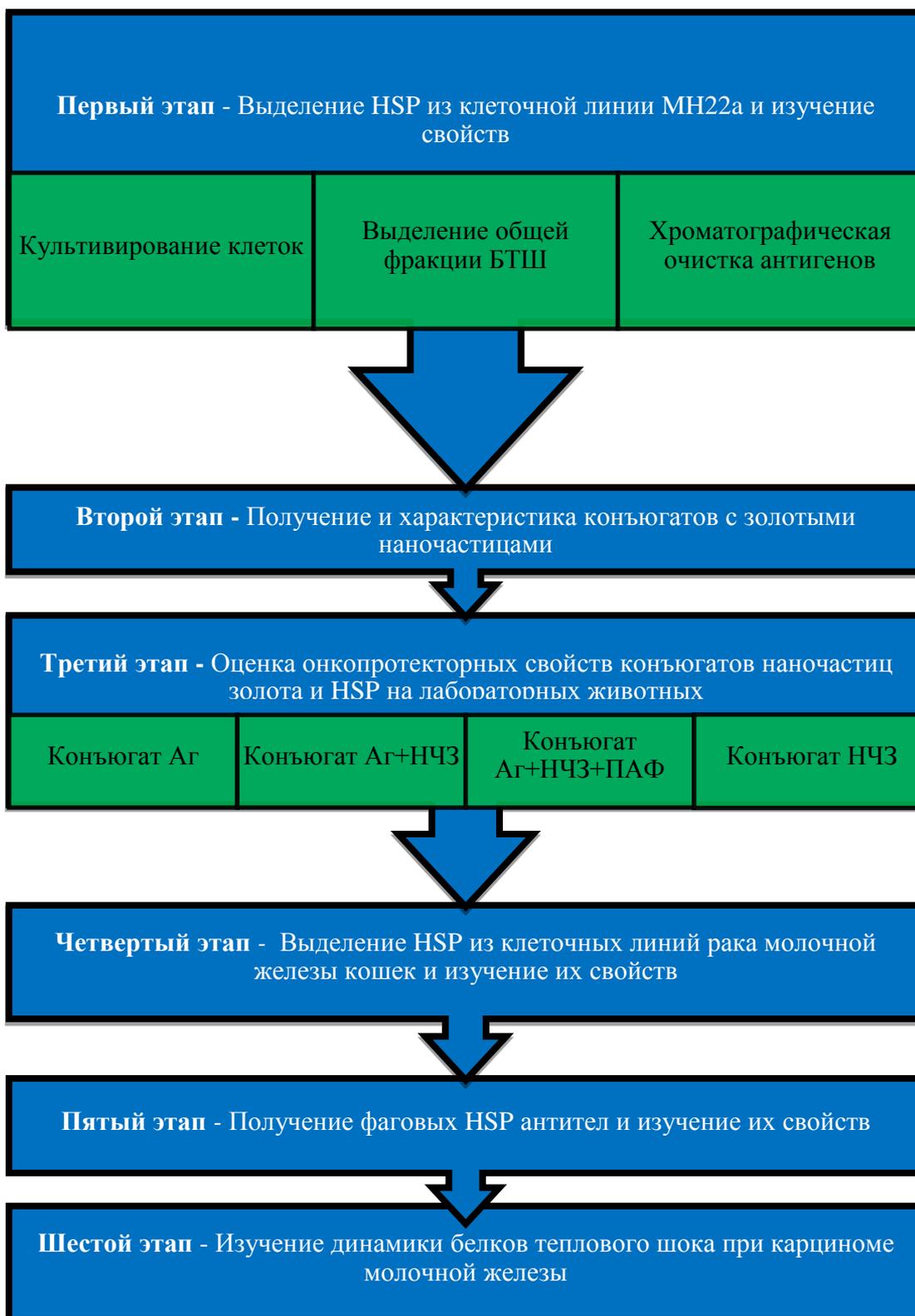


Рисунок 1 – Схема экспериментальных исследований

На третьем этапе были проведены исследования по изучению онкопротекторных свойств конъюгатов HSP/AuNp на лабораторной модели. ЗНЧ с антигеном ЗНЧ в комплексе с белками теплового шока, полученными из лизата цельных клеток MH22a, 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 адъювантом Фрейнда (СФА-ПАФ) (3 мкг; 500 мкл); группа 4 — раствор ЗНЧ (250 мкл). Животных иммунизировали внутривенно двумя инъекциями с интервалом 10 дней между ними. 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). Размер опухоли измеряли микрометром с ценой деления 0,1 мм.

Изучали изменение пролиферативной активности лимфоцитов с использованием фитогемагглютинаина (ФГА), липополисахарида (ЛПС) и антигена. При исследовании способности лимфоцитов отвечать пролиферацией на стимуляцию фитогемагглютинином (ФГА) можно судить о функциях Т-клеток, на стимуляцию липополисахаридом — о функциях В-клеток.

На четвертом этапе проводился отбор опухолей молочной железы у больных животных (кошки) и осуществлялось выделение клеточных линий из этих новообразований по методу Агилера с нашими модификациями. Для выделения HSP использовали трех стерилизованных кошек в возрасте 9 (К1), 12 (К2) и 13 (К3) 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 рака опухолевые клетки были выделены для дальнейшего культивирования. Клетки выращивали в культуральной чашке на шесть лунок, после чего их удаляли путем трипсинизации и выращивали в культуральных колбах. 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).

На пятом этапе нашей работы мы получали фаговые антитела, специфичных к белкам теплового шока, и занимались изучением их характеристик. В 1999 г. в ИБФРМ РАН в ходе выполнения совместного научного проекта с университетом г. Абердина (Великобритания) был передан фаговый дисплей, который применялся нами для получения необходимых антител. Для этого, после того, как был сформирован монослой, клеточную линию обрабатывали для получения HSP следующим образом: сначала культуральные колбы нагревали при 42 °С в течение 1 ч, а затем инкубировали при 37 °С в течение 2 ч. Затем клетки подвергали лизису путем повторного замораживания в жидком азоте и оттаивания, как описано ранее (Aguilera et al., 2011; Skarga et al., 2009). 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.

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.

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 Veatty et al. Сыворотки, отобранные у спонтанно заболевших кошек, были разведены 1:20 в 0,05 М карбонат-бикарбонатным буфером (pH 9,6), адсорбированы на дне чашки и инкубированы в течении ночи при 4⁰С. 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 µL 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 µL 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 опухоли MN22a – гепатома мышьяковая. 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, × 40) на базе ИБФРМ Обособленное структурное подразделение ФИЦ СИЦ РАН, г. Саратов.

Данные обрабатывались с помощью стандартных процедур, интегрированных в Excel Программное обеспечение 2007 (Microsoft Corp., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выделение HSP из клеточной линии МН22а

Нами проводилась работа по выделению антигена из онкологической линии клеток МН22а.

В дальнейшем полученный препарат осветляли центрифугированием при 20 000 g в течение 20 мин. Проводили хроматографическую очистку и замораживали при -70°C .

Получение конъюгатов золотых наночастиц с HSP и их характеристика

Идентификацию Аг, выделенного из клеток линии МН22а гепатомы мыши, проводили методом иммунодот-анализа с использованием (коммерческих) кроличьих поликлональных Ат к HSPs (Рисунок 2). 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.

После хроматографической очистки проводили иммунизацию кроликов полученным термостабильным Аг. Специфическую активность (титр) антисывороток определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) по общепринятой схеме. Титр составил 1:131072. На (Рисунок 3) 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 $\lambda_{\text{max}}=518$ 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 4). 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.

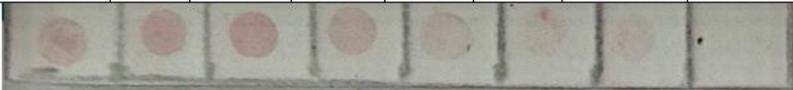
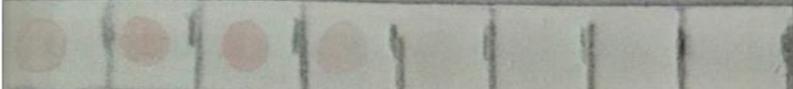
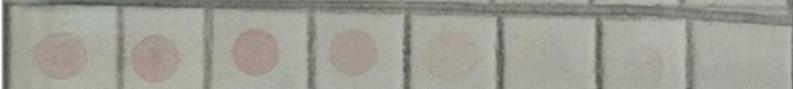
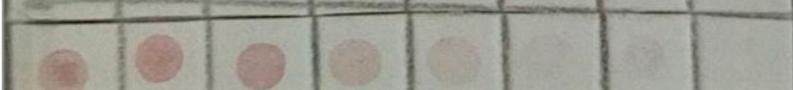
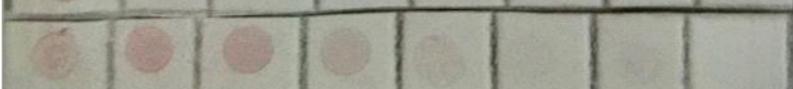
Нанесение выделенных из МН-22а антигенов, мкг/пятно								
	24	8	2,7	0,9	0,3	0,1	Сыворотка кролика цельная	БСА 10 мкг/пятно
GRP94Ab								
HSP90aB1								
HSPA1A								
HSPA1B								
HSP27								

Рисунок 2 – Идентификация антигена, выделенного из клеток линии МН22а – гепатомы мыши. Метод иммунодот-анализа с использованием (коммерческих) кроличьих поликлональных антител к белкам теплового шока

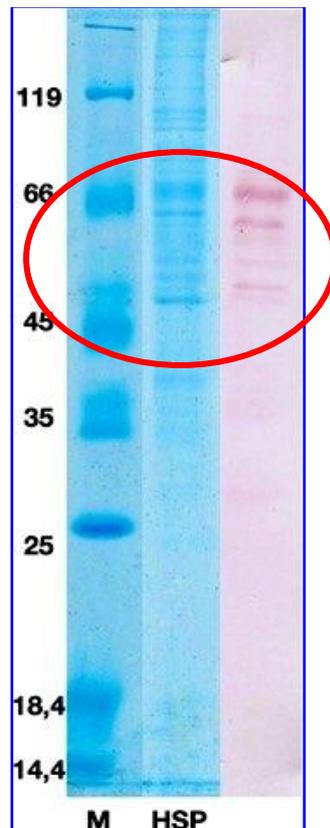


Рисунок 3 – Результаты SDS-ПААГ электрофореза

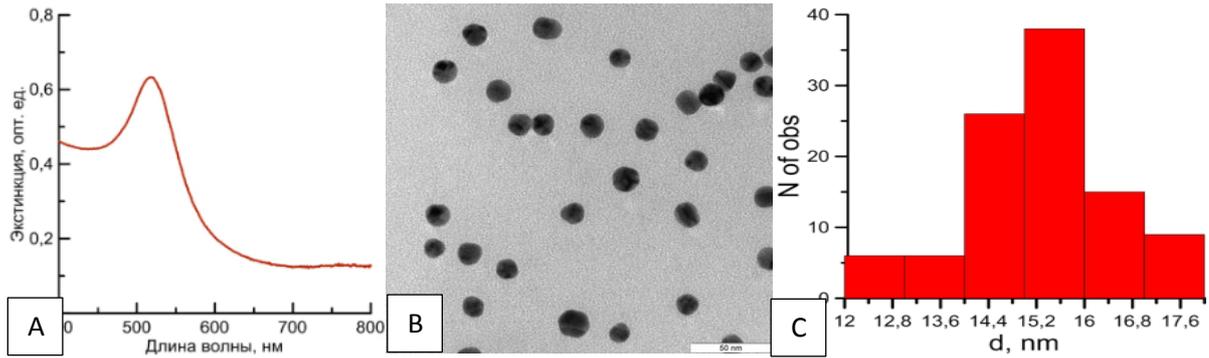


Рисунок 4 – Характеристика золотых наночастиц: спектр поглощения 518 нм (А), Трансмиссионная электронная микроскопия наночастиц золота диаметром 15 нм (В), число частиц в 1 мл $1,6 \times 10^{12}$ (данные методики динамического рассеивания света) (С)

Оценка иммунологических свойств конъюгатов наночастиц золота и HSP на лабораторных животных

Пролиферативный ответ лимфоцитов на антигены позволяет составить представление о выраженности специфической сенсибилизации организма.

При анализе полученных данных можно отметить, что наиболее высокая пролиферативная активность мононуклеарных клеток мышей при их культивировании с ФГА отмечалась при иммунизации конъюгатами АГ/КЗ - она повысилась в 1,8 раза относительно группы, которой вводили коллоидное золото, в группах, иммунизированных КЗ+АГ+ПАФ изменение пролиферативной активности в отношении ФГА не наблюдалось.

При введении АГ мы наблюдали снижение пролиферативной активности в 1,5 раза.

Наиболее высокая пролиферативная активность мононуклеарных клеток мышей при их культивировании с ЛПС отмечалась после иммунизации конъюгатами АГ и КЗ+АГ+ПАФ она повысилась в 1,4 и 1,7 раза относительно группы, которой вводили коллоидное золота соответственно. В группе, иммунизированной КЗ+АГ мы наблюдали снижение пролиферативной активности в 1,6 раза.

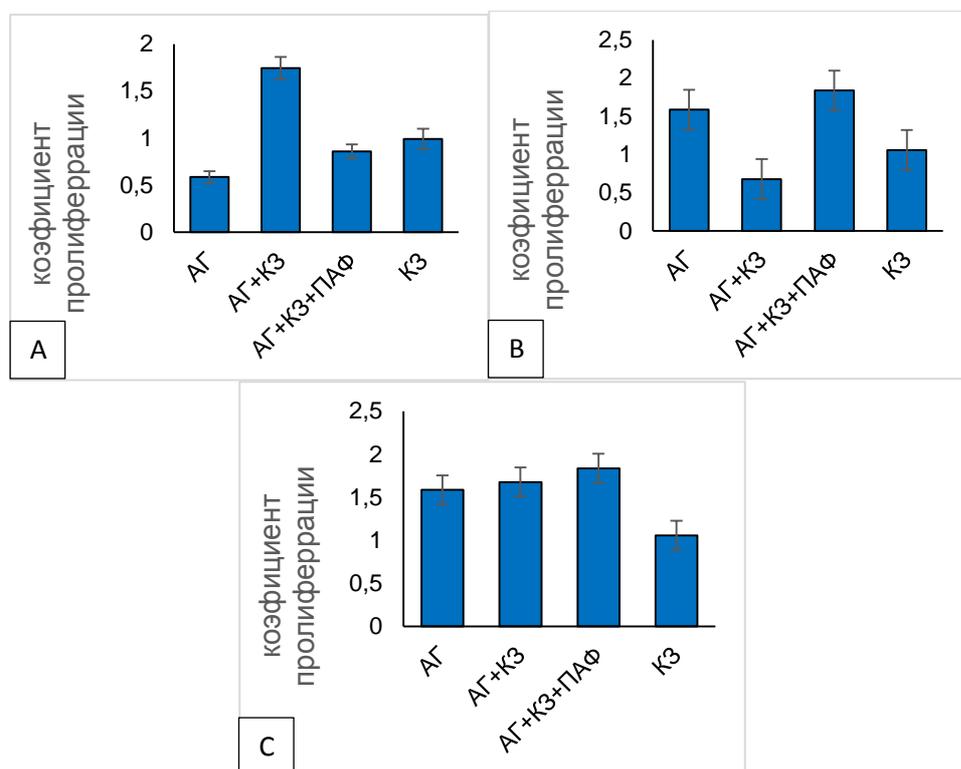


Рисунок 5 – (А) Изменение дыхательной активности лимфоцитов при их культивировании с фитогемагглютинином. (В) Изменение дыхательной активности лимфоцитов при их культивировании с липополисахаридом. (С) Изменение дыхательной активности лимфоцитов при их культивировании с HSP

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 отчётливо.

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.

Определение дыхательной активности проводили с помощью МТТ-теста по общепринятому методу. 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.

Таблица 1 – Титры Аг, 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

В результате трансплантации мышам опухолевых клеток были получены следующие результаты. У всех животных в 1-й, 3-й и 4-й группах были обнаружены опухоли различного размера (0,5-2,5 см). При гистологическом исследовании наблюдались гнездные скопления клеток, характерных для гепатомы. 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.

Нами были проведено изучение концентрации некоторых цитокинов в сыворотке крови при данном исследовании.

Концентрация интерферона - γ у группы мышей, которой вводили только антиген, была равна 1 пика грамм.

Во 2-й группе животных оказался достоверно сниженным уровень продукции провоспалительных цитокинов – интерферона - γ (Рисунок 7), интерлейкина 1 (Рисунок 8) и интерлейкина 6 (Рисунок 9).

При анализе иммуноблота нами наблюдалась общая для всех 4 групп полоса в области 25 кДа.

В группе 2 которую иммунизировали КЗ + АГ при иммуноблоте обнаруживаются 2 доминантные специфические полосы (в области, мембранных фракций) в области 50 кДа и 30 кДа. И три доминантные полосы в пределах от 35 до 25 кДа.

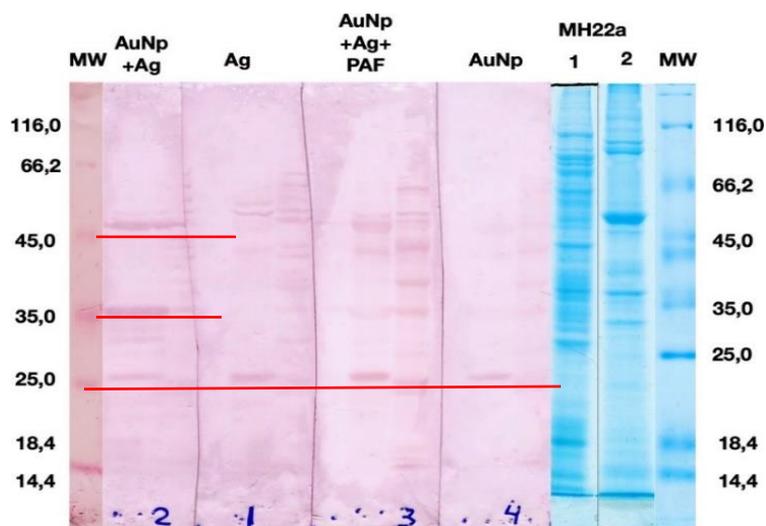


Рисунок 6 – Иммуноблот мембранных фракций и цитоплазматических фракций клеток MH22a в кДа

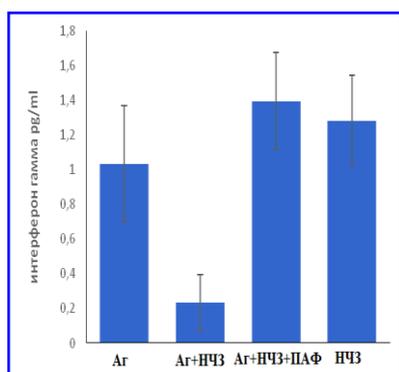


Рисунок 7 – Концентрация интерферона- γ в сыворотках крови

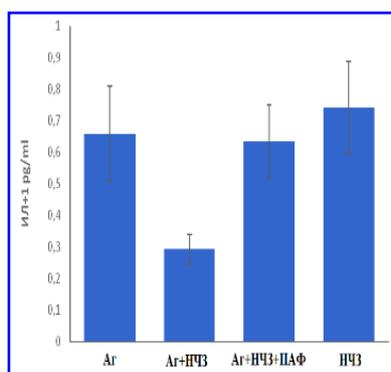


Рисунок 8 – Концентрация интерлейкина 1 в сыворотках крови

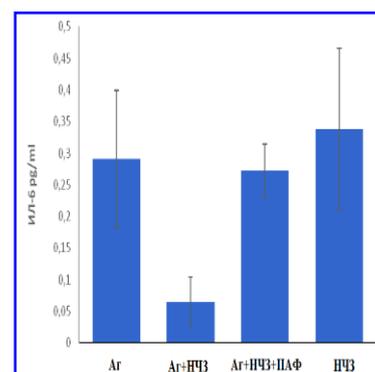


Рисунок 9 – Концентрация интерлейкина 6 в сыворотках крови

Из четырех групп иммунизированных животных, коэффициент Стьюдента показал, что из выборки достоверной является только группа, иммунизированная HЧЗ+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+HЧЗ. Выше сказанное, позволяет сделать вывод, что повышенное продуцирование интерлейкинов говорит об увеличенной воспалительной реакции, которая в случае с злокачественными новообразованиями, только увеличивает опухолевый рост.

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) у трёх животных (кошек) разных возрастов на основании клинических проявлений и цитологического исследования (Рисунок 10) (Рисунок 11).

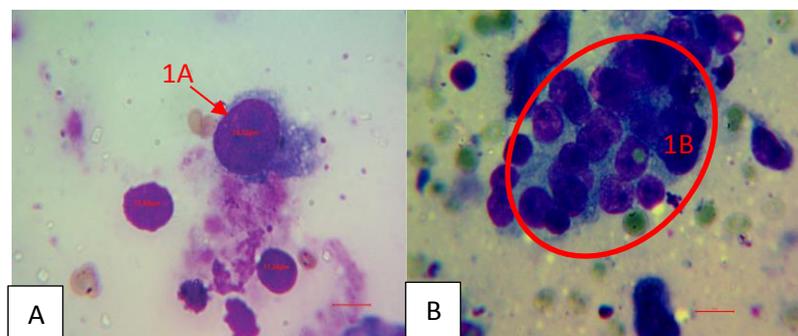


Рисунок 10 – Цитология опухоли окраска Лейкодиф 200 увеличение 100X. Кошка Кэти 13 лет. (1А) с базофильной зернистостью; (В) В препарате обнаруживаются атипичные клетки, собранные в группы (листы) (1В) выявлены папиллярные и протоковые образования

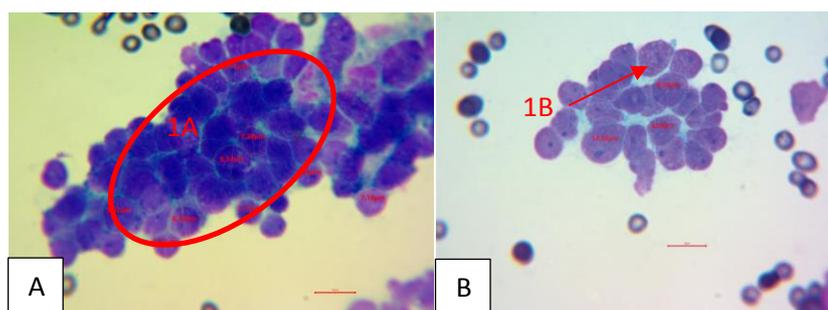


Рисунок 11 – Цитология опухоли (окраска Лейкодиф 200 увеличение 100X. Кошка Сима 9 лет. (А) В препарате выявляются кластеры базальных клеток цилиндрической формы одинакового размера с четко определенными границами, круглыми ядрами и скудной цитоплазмой (1А); (В) Имеют глыбчатый хроматин с одним, двумя базофильными ядрышками (1В)

Как видно из представленных данных, фон препарата образован крупнозернистым эозинофильным секретом единичными эритроцитами, нитями хроматина, нитями коллагена и обломками клеток. В препарате выявлены атипичные клетки, от овальной до веретенообразной формы, расположенные по одиночке и группами. Клетки с большими, от округлых до овальных 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.

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). Пик приходится на 6,7 мл; что соответствует HSP-антигену.

Изучение биодинамики HSP у кошек

На следующем этапе проводилась методика наработки фаговых антител, специфичных к белкам HSP. Установлено, что количество антигена, используемого для иммобилизации, должно быть не менее 5×10^{12} бактериофагов/мл;

Специфичность фаговых антител определяли методом дот-иммуноанализа. 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. Следовательно, полученные в работе фаговые антитела способны детектировать белок HSP с помощью метода дот-иммуноанализа при минимальной определяемой концентрации 0,0625 мкг/мл. 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).

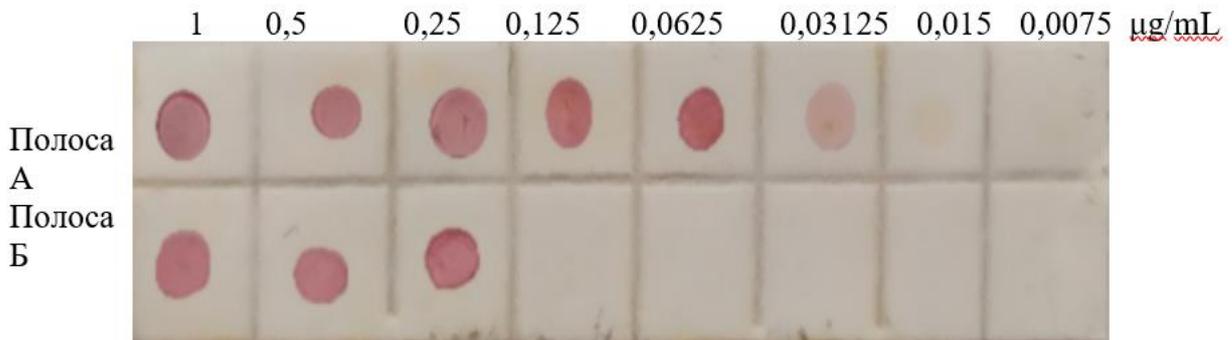


Рисунок 12 – Дот-иммуноанализ миниантител полученных на HSP-антиген

Верхний ряд 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 – сыворотка, взятая от спонтанно заболевших животных слева на право, пациент №1; №2; №3

При анализе антигена HS 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).

Для подтверждения полученных данных мы использовали иммуноферментный анализ для выявления антигенов HS в сыворотках спонтанно заболевших животных (Рисунок 13). Следует отметить повышенное содержание HSP в сыворотках крови животных с аденомой молочной железы, оно наблюдалось во всех трех случаях. Увеличение HSP у пациентов №1, №2 и №3 составило в 8 раз, по сравнению с контролем.

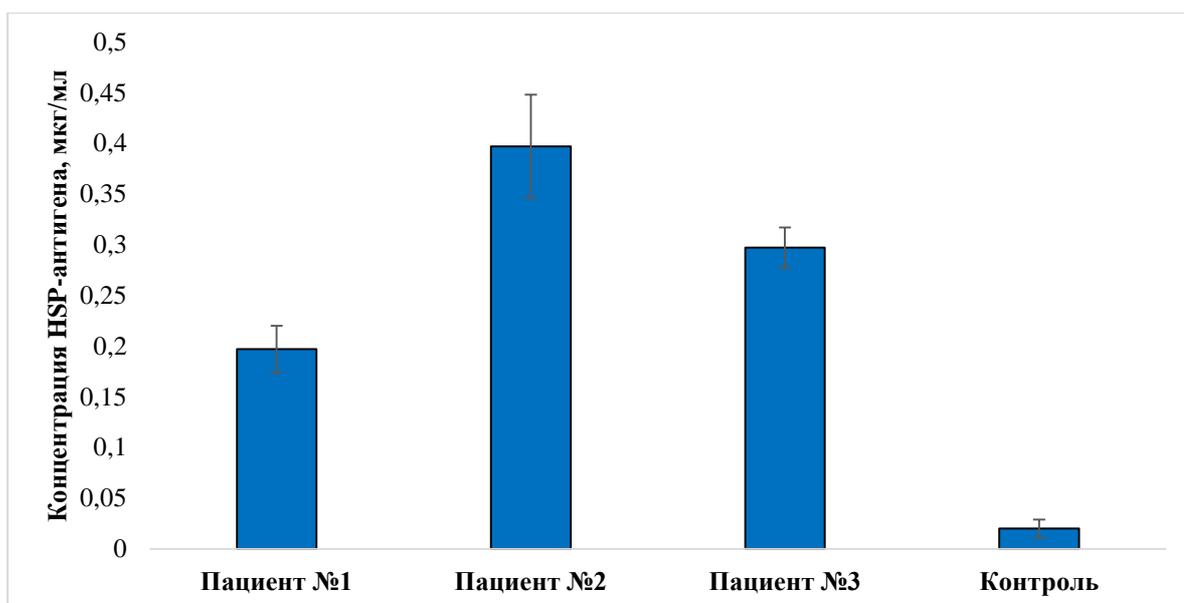


Рисунок 13 – Выявление HSP -антигена, в сыворотке крови спонтанно зараженных животных при использовании мини антител, полученных на HSP –антиген

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. На (Рисунок 15) 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.

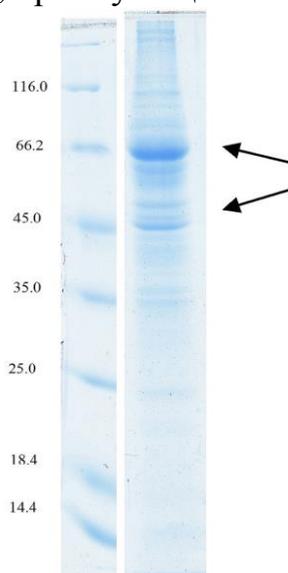


Рисунок 14 – Электрофорез HSP, выделенных из клеток рака молочной железы кошек

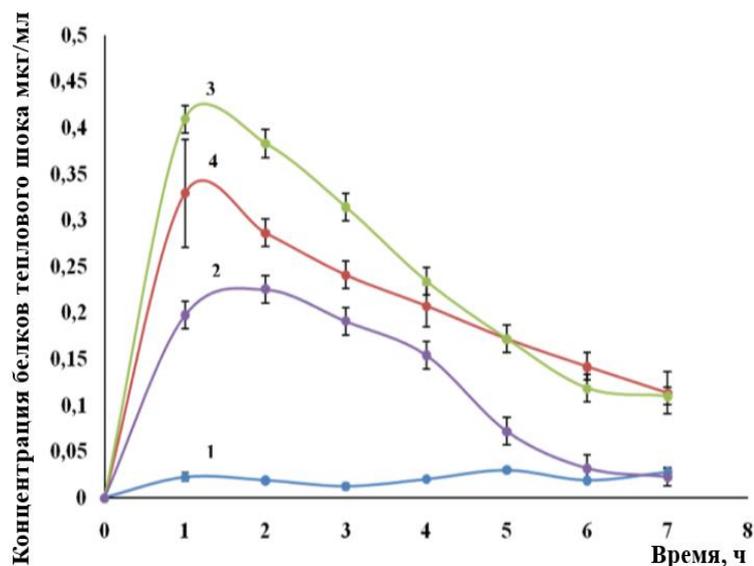


Рисунок 15 – динамика изменений содержания HSP в сыворотке крови у спонтанно заболевших животных после хирургического удаления опухолей.

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.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

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 $IFN-\gamma$, $IL-2$ и $TNF-\alpha$, 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 (Laghi et al., 2009; DeNardo et al., 2009). У мышей, которым вводили комплекс ЗНЧ–антиген–ПАФ, индукция опухоли могла быть вызвана воспалительным процессом в микроокружении опухоли, который мог быть вызван иммунизацией ПАФ и повышенным содержанием $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-8$ и белка-хемоаттрактанта моноцитов-1 (MCP-1), наблюдаемого у пациентов с раком молочной железы (Goldberg et al., 2010; Gilbert et al., 2013). 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 (Nicolini et al., 2006).

В отношении разработки диагностической тест-системы важным элементом является выбор подходящего чувствительного элемента. Наше исследование отличается от тех, о которых сообщалось ранее, поскольку оно

основано на использовании фаговых антител против HSP в качестве инструментов диагностики рака. 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.

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 (белок выявляется в концентрации 0,1 мкг/мл) к белкам теплового шока в дот-иммуноанализе.

3. Конъюгат белков теплового шока и наночастиц золота повышает пролиферативную активность лимфоцитов 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 коллоидным золотом, 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 пг/мл и ИЛ6 – 0,08 пг/мл 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 сыворотке 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.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДСТВУ

1. Наше исследование позволяет сделать вывод, о возможности использования золотых наночастиц в сочетании с белками теплового шока для противоопухолевой вакцинации. Результаты показывают, что противораковые вакцины могут быть в значительной степени улучшены путем включения ЗНЧ в качестве дополнительных адъювантов. Следующим этапом исследований может стать разработка и тестирование терапевтических вакцин на основе HSP и коллоидного золота.

2. Фаговый дисплей антител является многообещающим методом получения стабильных чувствительных элементов для биосенсорных систем, применяемых для обнаружения опухолевых маркеров.

3. Антитела к HSP потенциально могут быть использованы не только в диагностике рака, но также и в мониторинге неинвазивного лечения. Таким образом, в будущем антитела к HSP могут быть использованы в качестве распознающих элементов сенсорных систем при обнаружении HSP в диагностике рака.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В заключении 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК РФ:

1. Солдатов Д.А. Конструирование и изучение свойств ветеринарного лечебного препарата на основе силимарина и наночастиц золота / Д.А. Солдатов, С.В. Козлов, С.А. Староверов [и др.] // Известия международной академии аграрного образования. – 2023. – № 66. – С. 10–13.

2. Солдатов Д.А. Разработка иммуномодулирующего ветеринарного препарата и его доклинические исследования / Д.А. Солдатов, С.В. Козлов, С.А. Староверов [и др.] // Известия международной академии аграрного образования. – 2023. – № 66. – С. 5–9.

3. Солдатов Д.А. Получение фаговых антител на белки теплового шока, динамика накопления у мышей с ксенотрансплантированными опухолями / Д. А. Солдатов, Л. А. Дыкман, С. А. Староверов [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2023. – Т. 59, № 4. – С. 410–417.

Статьи, индексируемые в Scopus / Web of Science:

4. Soldatov D. A., Staroverov S. A., Kozlov S. V., Fomin A. S., Chumakov D.S., Gabalov K. P., Kozlov Y. S., Dykman. L. A. Immunization of mice with gold nanoparticles conjugated to thermostable tumor anti-gens prevents tumor development during transplantation // International Journal of Molecular Sciences. – 2022–11–18. – №23 (22). – С. 14313;

5. Soldatov D. A., Staroverov S. A., Kozlov S. V., Fomin A. S., Gabalov K. P., Dykman. L. A., Guliy O. I. Phage antibodies against heat shock proteins as tools for in vitro cancer diagnosis // Biosensors and Bioelectronics: X. - September 2022. – №Volume 11. – С. 100211.;

6. Soldatov D. A., Staroverov S. A., Kozlov S.V., Fomin A. S., Gabalov K. P., Khanadeev V.A., Domnitsky I.Yu., Dykman L.A., Akchurin S. V., Guliy O. I. Synthesis of silymarin–selenium nanoparticle conjugate and examination of its biological activity in vitro // ADMET & DMPK. – 2021. – №9 (4). – С. 255–266.;

Патенты:

7. Способ получения ветеринарного препарата на основе неспецифических иммуноглобулинов и коллоидных частиц селена для коррекции иммунной системы/ Козлов С. В. , Староверов С. А., Скворцова Н. И., Солдатов Д. А., Чекунов М. А., Силина Е. В., Козлов Е. С., Артемьев Д. А. //Патент№ 2798268: заявл. 21.04.2022: опубл. 20.06.2023. Бюл. № 17 – 10 с.

Статьи в других изданиях:

8. Солдатов Д.А. Получение конъюгатов наночастиц селена с силимарином и изучение их цитотоксических свойств / Д.А.Солдатов, И.Ю. Домницкий, С.А. Староверов, С.В. Козлов, А.С. Фомин, К.П. Габалов, А.А. Волков, Л.А. Дыкман// Материалы национальной научно-практической конференции посвященной памяти д.м.н., профессора Л.Ф. Зыкина / под редакцией О.С. Ларионовой, И.А. Сазоновой. – Саратов: 2020. – С. 158–164.

9. Солдатов Д.А. Конструирование и изучение свойств ветеринарного лечебного препарата на основе силимарина и наночастиц золота / Д.А.

Солдатов, А.Д. Клюкина, М.А. Чекунов, Е.Д. Быкова, Н.И. Скворцова, Д.Д. Лешошкина, С.В. Козлов, С.А. Староверов // Проблемы и пути развития ветеринарной и зоотехнической наук. Международная научно-практическая конференция обучающихся, аспирантов и молодых ученых, посвященная памяти заслуженного деятеля науки, доктора ветеринарных наук, профессора кафедры «Болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза» Колесова Александра Михайловича. – Саратов: 2022. – С. 343–350.

10. Солдатов Д.А. Конструирование гепатопротекторного препарата на основе силимарина с наночастицами селена и изучением его терапевтических свойств/ Д.А. Солдатов, М.А. Чекунов, А.Н. Косокина, Д.А. Артемьев, С.В. Козлов, С.А. Староверов, А.А. Волков // Проблемы и пути развития ветеринарной и зоотехнической наук. Материалы Международной научно-практической конференции обучающихся, аспирантов и молодых ученых, посвященной памяти заслуженного деятеля науки, доктора ветеринарных наук, профессора кафедры «Болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза» Колесова Александра Михайловича. – Саратов: 2021. – С. 120 – 127.

11. Солдатов Д.А. Конструирование гепатопротекторного препарата на основе силимарина с наночастицами селена и изучением его терапевтических свойств при нарушении функций печени у овец/ Д.А. Солдатов, В.А. Паськова, Е.А. Лаврентьева, А.Д. Клюкина, Е.В. Силина, М.А. Чекунов, Е.Д. Быкова, Н.И. Скворцова, С.В. Козлов // Проблемы и пути развития ветеринарной и зоотехнической наук. Материалы Международной научно-практической конференции обучающихся, аспирантов и молодых ученых, посвященной памяти заслуженного деятеля науки, доктора ветеринарных наук, профессора кафедры «Болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза» Колесова Александра Михайловича. – Саратов: 2022. – С. 399 – 407.