

УДК 579.6

ИНДИКАЦИЯ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА В ПРОВОДЯЩИХ СУСПЕНЗИЯХ С ПОМОЩЬЮ ФАГОВЫХ АНТИТЕЛ И АКУСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА

© 2025 г. О. И. Гулий^{1,*}, Б. Д. Зайцев², И. А. Бородина², С. А. Староверов¹, Р. Д. Вырщик¹, К. К. Фурсова³, Ф. А. Бровко³, Л. А. Дыкман¹

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов — обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра “Саратовский научный центр Российской академии наук”
(ИБФРМ РАН), Саратов, 410049 Россия

²Саратовский филиал Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Саратов, 410019 Россия

³Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Пушино, Московская область, 142290 Россия

*e-mail: guliy_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 05.12.2024 г.

После доработки 16.12.2024 г.

Принята к печати 10.01.2025 г.

Многочисленные публикации свидетельствуют о повышении уровня экспрессии белков теплового шока (БТШ) при онкологических заболеваниях, поэтому перспективным является развитие методов индикации БТШ, как маркера онкологических заболеваний. В настоящей работе получены фаговые антитела, специфичные к БТШ клеточной линии мышинной миеломы. Впервые с помощью компактного акустического датчика исследовано влияние проводимости среды измерения на регистрацию аналитического сигнала при взаимодействии фаговых антител с БТШ. Экспериментально установлена возможность регистрации специфичного взаимодействия “БТШ-фаговые антитела” в суспензиях с проводимостью 50–1180 мкСм/см. Проведены контрольные эксперименты по оценке воздействия массовой нагрузки на датчик. Полученные результаты будут способствовать развитию акустических сенсорных систем для диагностики БТШ.

Ключевые слова: белки теплового шока, акустическая сенсорная система, фаговые антитела

DOI: 10.31857/S0555109925030074 **EDN:** DRUPXS

Постоянный рост численности онкологических заболеваний требует от ученого сообщества развития методов, направленных на их раннюю диагностику. Одна из стратегий направлена на определение специфических онкологических маркеров, свидетельствующих об онкологических процессах. Повышенные уровни соответствующих онкологических маркеров являются сигналом начала заболевания до проявления выраженной, типичной болезненной симптоматики. Особую ценность при развитии методов определения биомаркеров представляют биосенсорные системы. В классических биосенсорах используют метки (ферменты или флуорофоры), однако процесс маркирования требует длительного времени подготовки образца и дополнительных затрат на изготовление [1, 2]. Для устранения

этих проблем в последнее время активно используются сенсорные системы без соответствующих меток, особое внимание при этом уделяется акустическим сенсорам. Для создания сенсоров на основе акустических волн часто используют пьезоэлектрические резонаторы или линии задержки с распространяющейся поверхностной или пластинчатой акустической волной. Такие сенсоры чувствительны к изменению механических или электрических свойств биологического объекта, контактирующего с поверхностью звукопровода. Акустические волны, возбуждаемые в пьезоэлектрической среде, позволяют создать целое семейство датчиков, характеризующихся высокой чувствительностью, быстротой проведения анализа, дешевизной и небольшими размерами [3].

Акустические датчики рекомендованы для обнаружения различных целевых биоматериалов благодаря их высокой чувствительности и надежности [4, 5]. Особенность акустических сенсорных систем заключается в том, что они позволяют проводить анализ биологических объектов не только с использованием иммобилизации сенсорных компонентов на поверхности датчика, но и непосредственно в исследуемой суспензии без иммобилизации компонентов анализа. Использование датчика без иммобилизации компонентов анализа значительно сокращает расходы на подготовку сенсорной системы и время анализа [6].

В зависимости от используемого типа волн акустические датчики классифицируются на датчики на основе: объемных акустических волн (**ОАВ**), поверхностных акустических волн (**ПАВ**) и пластинчатых акустических волн (**ПЛАВ**) [3–4; 7–9].

В **ПАВ** датчиках поверхностная акустическая волна возбуждается с помощью излучающего встречно-штыревого преобразователя (**ВШП**), распространяется вдоль поверхности пьезоэлектрической пластины и преобразуется в электрический сигнал с помощью приемного **ВШП**. Такой датчик может работать на частотах в диапазоне от нескольких МГц до нескольких ГГц. К поверхностным волнам относятся волны Рэлея, волны с поперечно-горизонтальной поляризацией и волны Лява. Датчики на основе объемных акустических волн представляют собой резонаторы, в которых акустическая волна распространяется между двумя сторонами пьезоэлектрической пластины. Эти резонаторы можно разделить на две группы: резонаторы с продольным электрическим полем и резонаторы с поперечным электрическим полем.

Акустические датчики нашли применение для медицинской диагностики, обнаружения наркотиков, мониторинга окружающей среды, анализа пищевых продуктов и биохимического анализа для обнаружения биомаркеров (антигены, низкомолекулярные белки, раковые клетки, вирусы и летучие органические соединения) [10, 11].

Отдельное внимание заслуживает возможность использования акустических датчиков для определения онкологических маркеров, особенно, белков теплового шока. Известно, что воздействие на живые ткани кратковременного повышения температуры на 5–10°C выше их нормальной температуры, вызывает синтез определенной группы белков, называемых белками теплового шока (**БТШ**), которые обычно присутствуют в низких концентрациях в не подвергнутых температурному воздействию клетках [12, 13].

С биохимической точки зрения **БТШ** делят на пять различных семейств в соответствии с их молекулярной массой, каждое из которых имеет определенную функцию [14–16]. Синтез **БТШ** сильно повышается под воздействием экологиче-

ского, физиологического и патофизиологического стресса. Воздействие на клетки физического или химического стресса приводит к увеличению синтеза **БТШ**, в частности, семейства белков теплового шока 70 (**БТШ70**). Семейство **БТШ70** функционирует как молекулярный шаперон и уменьшает вызванную стрессом денатурацию и агрегацию внутриклеточных белков [17]. **БТШ70** является наиболее изученной группой из-за важности выполняемых их членами функций, как шаперонов. Белки, принадлежащие к этой группе, участвуют в таких процессах, как предотвращение агрегации белков, рефолдинг денатурированных белков и транслокация белков через мембраны [18].

Имеются многочисленные публикации, свидетельствующие о повышении уровня **БТШ** при онкологических заболеваниях [19, 20]. Как внутриклеточный полипептид, белок **БТШ70** может быть экспонирован на плазматической мембране и/или высвободиться в кровотоке [21]. Клетки с такими белками быстрее размножаются, распространяются и проявляют устойчивость к противоопухолевым препаратам. Однако **БТШ** способны покидать раковые клетки в составе особых микроскопических пузырьков (экзосом) и попадать во внеклеточное пространство [22], что делает важным разработку методов индикации белков теплового шока не только для ранней диагностики рака, но и его терапии.

Одним из основных моментов при развитии сенсорных систем является подбор соответствующего компонента распознавания. Уникальную возможность при поиске сенсорного компонента датчика представляет технология наработки специфичных антител на основе технологии фагового дисплея. Фаговые антитела являются относительно дешевыми, могут конкурировать по селективности с антителами, полученными гибридомной технологией, а также при их наработке не требуется иммунизация животных. В основе технологии фагового дисплея лежит экспонирование чужеродных пептидов или белков на поверхности фаговых частиц в составе одного из химерных белков оболочки. Фаговые рекомбинантные антитела успешно зарекомендовали себя в качестве биорецепторов в биосенсорных системах для обнаружения онкологических маркеров [23–26].

Ранее была показана возможность индикации **БТШ** непосредственно в жидкости с помощью компактного акустического датчика на основе резонатора с поперечным возбуждающим электрическим полем и фаговых антител в качестве чувствительного компонента [27]. Одним из важных моментов при определении маркеров заболеваний является проведение исследований в жидкостях с повышенной проводимостью, поскольку, высокая проводимость среды характерна для реальных образцов и значительно затрудняет проведение анализа с помощью сенсорных систем.

Цель работы — показать возможности индикации белков теплового шока с помощью компактной акустической сенсорной системы и фаговых антител в условиях повышенной проводимости среды измерения.

МЕТОДИКА

Культивирование клеток. В работе использовали клеточные линии P3X63Ag8.653 и СНО, которые были получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН.

Пассаж клеток миеломы мыши (клеточная линия P3X63Ag8.653) производили в 4 флакона для культивирования. Для этого использовали среду RPMI-1640 + 20% фетальной бычьей сыворотки. В один флакон вносили 10 мл среды, 5 мл суспензии клеток, 100 мкл пенициллина, затем флаконы помещали в термостат при 37°C. Оставшуюся суспензионную культуру сливали в пробирки для центрифугирования, центрифугировали 10 мин при 3500 g. Надосадочную жидкость сливали, осадок ресуспендировали в среде вышеописанного состава и затем флаконы помещали в термостат. Через неделю содержимое 3 флаконов с наибольшим ростом центрифугировали, осадок ресуспендировали в среде с добавлением 10% ДМСО и замораживали. В остальных флаконах, проводили замену среды и оставляли культивироваться.

Клетки линии яичника китайского хомячка (клеточная линия СНО) культивировали на среде DMEM (“БиоЛот”, Россия) с 10% фетальной бычьей сыворотки (“БиоЛот”, Россия), пеницилином (100 ед./мл), стрептомицином, (100 мкг/мл) и L-глутамином (292 мкг/мл).

Получение фракции термостабильных антигенов из клеток линии P3X63Ag8.653. После достижения монослоя проводили выделение клеточных БТШ, для этого культуральный флакон с клеточным монослоем прогревали при 42°C в течение 1 ч, затем инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Далее проводили лизис клеток. Флакон аккуратно промывали 4 раза 10 мл подогретого раствора Хэнкса. Затем добавляли 15 мл культуральной среды DMEM, содержащей 4 мМ L-глутамин и 2 мМ фенилметилсульфонилфторида. Флакон инкубировали 1 ч при 37°C при покачивании на шейкере. После отмывки во флакон с клеточным монослоем добавляли 10 мл буфера Cytomix (120 мМ KCl, 0.15 мМ CaCl₂, 2 мМ EDTA, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ K₂HPO₄/KH₂PO₄, 25 мМ HEPES, pH 8.0; Bio-Rad, США) и замораживали флакон при –20°C. Затем проводили оттаивание при 37°C. Эту процедуру повторяли 3 раза. Затем суспензию переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 10000 g 15 мин.

Далее лизат клеток осаждали сульфатом аммония до 40% насыщения с последующим центрифугированием при 20000 g в течение 20 мин при 4°C. Полу-

ченный супернатант осаждали сульфатом аммония до конечного насыщения 80% с последующим центрифугированием при 20000 g в течение 20 мин при 4°C. Осадок, полученный после второго центрифугирования, растворяли в 4 мл дистиллированной воды и диализовали против 0.2 М фосфатно-солевой буфера (ФСБ), pH 7.2, при 4°C в течение 48 ч.

Аффинная селекция антител из фаговой библиотеки. Для наращивания фаговой библиотеки использовали культуру *Escherichia coli* TG1, полученную из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibppm.ru>) и питательную среду 2YT. Подробно условия наращивания описаны в работе [23]. Фаговые антитела, специфичные к БТШ, получали с использованием неиммунной фаговой библиотеки одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv) человека (разнообразие 10⁹ независимых клонов) [28].

Мечение афинных фагов FITC. Полученные после диализа фаговые антитела метили красителем FITC (Fluorescein Isothiocyanate, “Sigma-Aldrich”, США) по следующей методике: перед маркировкой фаги диализовали против карбонат-бикарбонатного буфера (17.3 г гидрокарбоната натрия и 8.6 г карбоната натрия в 1000 мл воды) в течение ночи при 4°C. Далее растворяли 1 мг FITC в 2 мл 0.1 М ФСБ и по каплям добавляли в раствор фагов при постоянном помешивании. Конъюгирование продолжалось в течение 18 ч при 4°C в темном месте. После чего избыток красителя удаляли фильтрацией на колонке с сефадексом G-25: раствор, содержащий меченые фаги, наносили на колонку и промывали ее раствором ФСБ. Полученные таким образом бактериофаги концентрировали при помощи ультрафильтрации и замораживали.

Мечение клеток P3X63Ag8.653 фаговыми антителами. Суспензию клеток центрифугировали в течение 5 мин при 3000 g, затем ресуспендировали в 2 мл DMEM, добавляли 1 мл фаговых антител, меченных FITC, и оставляли в термостате на 40 мин. Далее клетки отмывали от несвязавшихся фаговых антител двукратно с помощью центрифугирования и добавляли 1 мкл красителя DAPI (в концентрации 1 : 1000), выдерживали в термостате 3–5 мин и отмывали центрифугированием. Полученную суспензию клеток хранили в темном месте при 4°C. Визуализация клеток проводилась с помощью флуоресцентного микроскопа DMLB (LEICA, Германия) в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии “Симбиоз” (ИБФРМ РАН, Саратов, Россия).

Используемые проводящие растворы. В работе использовали стандартный буферный раствор с величиной pH, равной 7.0. Были использованы образцы раствора с проводимостью 50, 90, 180, 350, 600, 1180 мкСм/см. Электропроводность определяли с помощью кондуктометра HANNA HI 8733 (HANNA Instruments, Румыния).

Описание датчика и методика экспериментов. Акустический биосенсор представляет собой аналитическую систему, состоящую из чувствительного биологического элемента (сенсорный элемент) и системы детекции, позволяющей регистрировать изменения параметров исследуемого образца. В настоящей работе использовали пьезоэлектрический резонатор с поперечным электрическим полем, совмещенный с компактным анализатором импеданса, созданным на базе электронного конструктора Arduino (Arduino Hardware, Китай). Он позволяет измерять зависимость модуля электрического импеданса резонатора от частоты и передавать данные на персональный компьютер. Резонатор с поперечным электрическим полем был выполнен из пьезоэлектрической пластины ниобата лития толщиной 500 мкм и поперечными размерами 20×30 мм. На нижнюю сторону пластины наносились два алюминиевых электрода с поперечными размерами 5×10 мм с зазором между ними 2 мм. На верхнюю сторону пьезопластины приклеивали контейнер для исследуемой жидкости из плексигласа объемом ~ 2 мл. Компактный анализатор импеданса состоял из генератора гармонического сигнала, измерителя высокочастотного напряжения на резонаторе с поперечным электрическим полем и измерителя тока, протекающего через этот резонатор. На рис. 1 представлена схема

жидкостного датчика на основе резонатора с поперечным электрическим полем и общая схема эксперимента.

Для проведения измерений суспензию клеток разводили в буферном растворе с различной проводимостью до конечной плотности клеток (10^4 кл./мл) и проводили измерение частотных зависимостей модуля электрического импеданса датчика. Выбор такой плотности клеток обусловлен предварительными исследованиями по оптимизации условий проведения анализа [27]. Аналитическим сигналом служило изменение модуля электрического импеданса датчика после добавления к суспензии с клеточными линиями фаговых антител. Объем ячейки, в которую вносили суспензию для измерений, был равен ~ 2 мл. Время регистрации аналитического сигнала составляло ~ 4 мин. Все эксперименты проводились не менее 5 раз. Относительная погрешность результатов измерений исследуемых образцов составляла $\pm 2\%$, то есть при проведении нескольких экспериментов с одним и тем же взаимодействием, суспензии клеток с фаговыми антителами значения модуля электрического импеданса имели разброс значений на любой частоте в пределах $\pm 2\%$. Данные были статистически обработаны с помощью стандартных процедур, интегрированных в программное обеспечение Excel 2007 (Microsoft Corp., США).

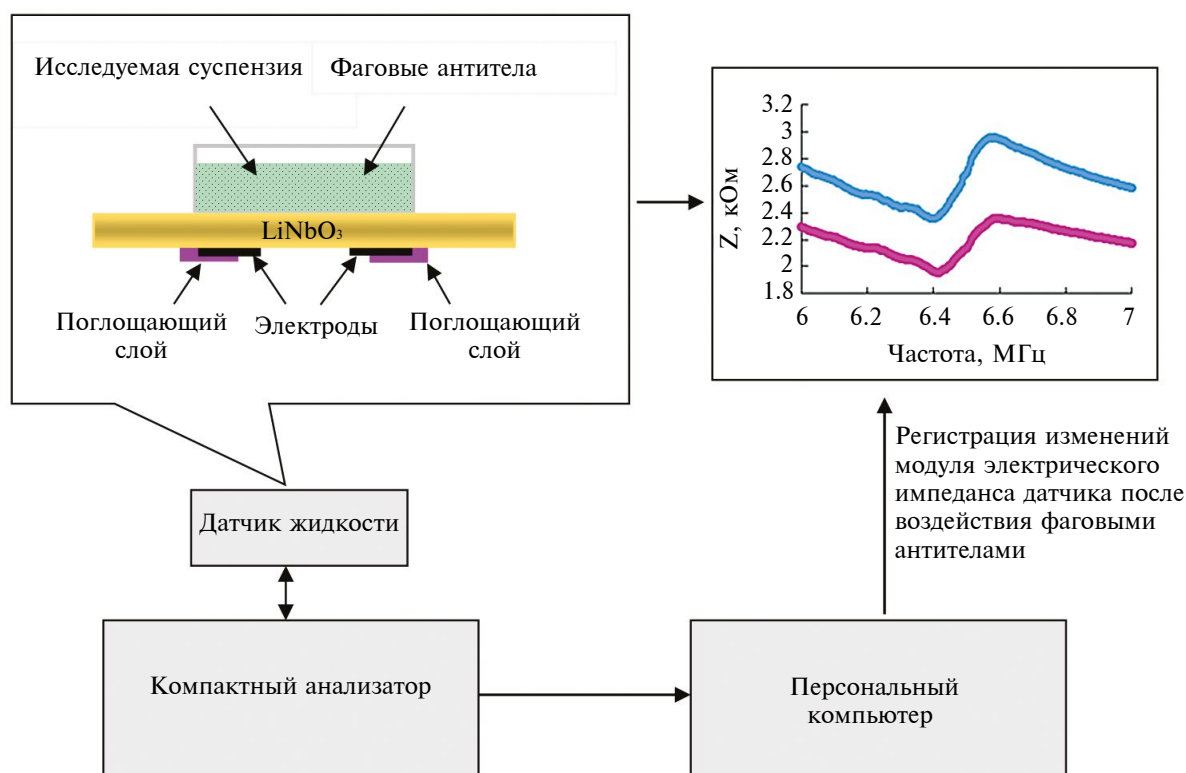


Рис. 1. Схема жидкостного датчика на основе резонатора с поперечным электрическим полем и общая схема эксперимента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Принцип взаимодействия антиген-антитело широко применяется в сенсорных технологиях. Ранее [27] была отработана технология получения фаговых антител, специфичных к БТШ, выделенных из клеточных линий миеломы мыши Р3Х63Аg8.653. В настоящем исследовании использовались такие же условия и такая же методика получения антител. Использовали антитела, полученные после 4 раундов селекции, так как ранее было показано, что чувствительность фаговых антител увеличивалась после 3 раунда селекции. Титр фаговых антител, определяемый методом иммуоферментного анализа, составил 1 : 2048. Концентрация фаговых частиц, определенная методом спектрофотометрии с использованием формулы: $(A_{269} - A_{320}) \times 10^{14} / 15$, составила $\sim 2 \times 10^{10}$ фагов/мл. Здесь A_{320} и A_{269} — оптические плотности суспензии фагов при длине волны электромагнитного излучения 320 нм и 269 нм.

При помощи компактного акустического датчика экспериментально исследовали взаимодействие “клетки—фаговые антитела” непосредственно в жидкости с различной проводимостью. В качестве проводящей жидкости использовали буферные растворы с проводимостью 50; 90; 180; 350; 600; 1180 мкСм/см.

Вначале были проведены эксперименты, подтверждающие отсутствие механической нагрузки на резонатор со стороны клеточных линий. Для этого в контейнер датчика вносили 1 мл буферного раствора с проводимостью 50 мкСм/см и измеряли модуль электрического импеданса датчика (рис. 2, кривая 1). Затем в контейнер вносили тот же буферный раствор с добавленными в него клеточными линиями Р3Х63Аg8.653 с плотностью 10^4 кл./мл и повторяли измерения. Было показано, что после добавления клеточных линий Р3Х63Аg8.653 в буферный раствор модуль электрического импеданса датчика изменялся незначительно ($\Delta Z = 0.08$ кОм) (рис. 2, кривая 2).

На следующем этапе исследовали взаимодействие БТШ со специфичными фаговыми антитела-

ми в буферных растворах с разной проводимостью. В анализируемый буферный раствор с клеточными линиями Р3Х63Аg8.653 с заданной проводимостью вносили специфичные к БТШ фаговые антитела с концентрацией 10^{10} фагов/мл и регистрировали параметры датчика до и после добавления антител. Выбор данной концентрации антител обусловлен ранее проведенными исследованиями. Аналитическим сигналом, свидетельствующим о специфической биологической реакции, являлось изменение модуля электрического импеданса датчика (ΔZ) на фиксированной частоте.

Результаты изменений частотных зависимостей модуля электрического импеданса датчика для буферных растворов с различной проводимостью с клеточными линиями Р3Х63Аg8.653 до (кривая 1) и после (кривая 2) воздействия фаговых антител, специфичных к БТШ, представлены на рис. 3 (а–е). Видно, что после добавления специфичных к БТШ фаговых антител к проводящим буферным растворам с клеточными линиями Р3Х63Аg8.653 происходило значительное изменение модуля электрического импеданса резонатора для всех значений проводимости буферных растворов.

Измеренные частотные зависимости модуля электрического импеданса позволили определить его изменение (ΔZ), как функцию от проводимости буферного раствора, которая представлена на рис. 3ж. Результаты на рисунке приведены для значений, полученных на частоте 6.6 МГц. Следует заметить, что в данном случае выбор частоты не принципиален, поскольку можно использовать любую частоту вблизи резонанса. Как можно увидеть на рис. 3ж, аналитический сигнал (ΔZ) при неизменной концентрации клеток в исследуемой суспензии и при одинаковом количестве фаговых антител уменьшается с ростом проводимости буферного раствора с клеточными линиями Р3Х63Аg8.653. Наибольшее изменение модуля электрического импеданса ΔZ (0.65117 кОм) наблюдалось для проводимости буферного раствора 50 мкСм/см, наименьшее значение ΔZ (0.109654 к) соответствовало буферному раствору с проводимостью 1180 мкСм/см. Для лучшего восприятия полученных данных в табл. 1 представлены значения аналитического сигнала для различных значений проводимости буферного раствора. Из представленных данных видно, что величина ΔZ уменьшалась с увеличением проводимости буферных растворов, следовательно, с увеличением проводимости буферного раствора от 50 до 1180 мкСм/см чувствительность датчика уменьшалась почти в 6 раз. Тем не менее, регистрируемая величина ΔZ при проводимости среды измерений до 1180 мкСм/см, была вполне достаточной для регистрации аналитического сигнала при специфичном взаимодействии фаговых антител с БТШ на поверхности клеток. Таким образом, помощью данной сенсорной системы

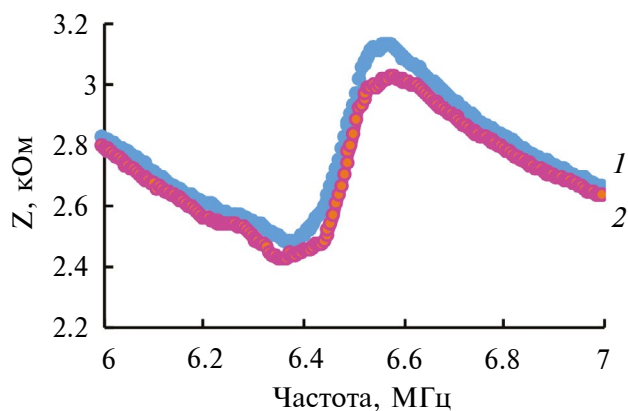


Рис. 2. Частотные зависимости модуля электрического импеданса датчика для буферного раствора с проводимостью 50 мкСм/см до (1) и после (2) добавления клеточных линий Р3Х63Аg8.653.

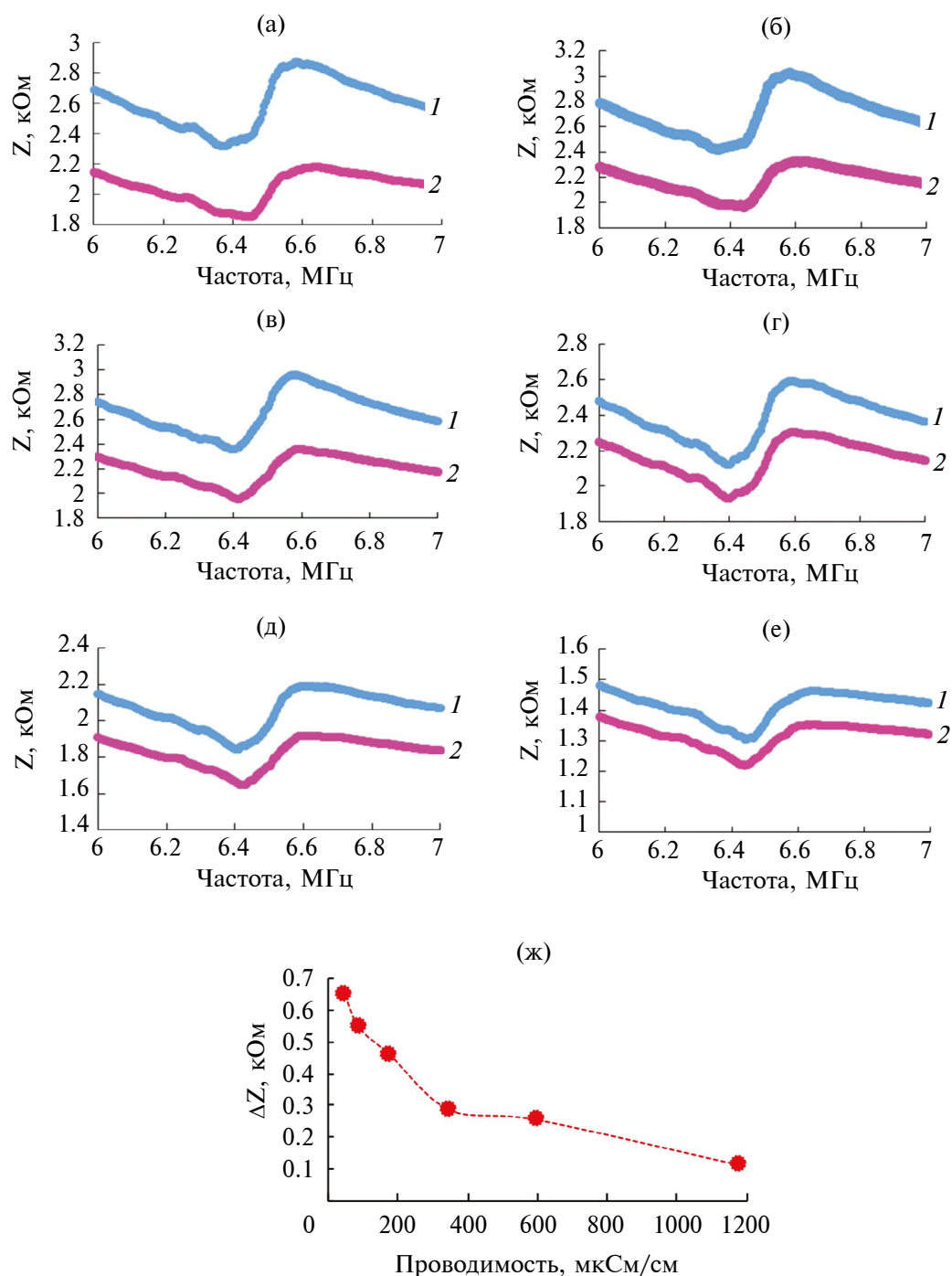


Рис. 3. Частотные зависимости модуля электрического импеданса компактного датчика для контейнера с буферными растворами с разной проводимостью и клеточными линиями РЗХ63Ag8.653 до (1) и после (2) добавления фаговых антител, специфичных к БТШ-антигену. Проводимость растворов: а – 50; б – 90; в – 180; г – 350; д – 600; е – 1180 мкСм/см ; ж – зависимость изменения модуля электрического импеданса от проводимости буферного раствора на частоте 6.6 МГц.

можно проводить индикацию БТШ в буферных растворах с проводимостью до 1180 мкСм/см . Полученные результаты являются важными для адаптации сенсорного метода при проведении исследований в условиях повышенной проводимости среды измерения. Известно, что

наибольшей проводимостью обладают биологические жидкости и ткани небольшой плотности, содержащие воду с высокоподвижными ионами. К ним относятся кровь, лимфа, желудочный сок, моча, спинномозговая жидкость, мышцы, подкожная клетчатка и т.п. Разрабатываемый

Таблица 1. Зависимость изменения модуля электрического импеданса от проводимости среды измерения на частоте 6.6 МГц

Проводимость буферного раствора, мкСм/см	ΔZ , кОм
50	0.65117
90	0.548537
180	0.45912
350	0.284969
600	0.253631
1180	0.109654

метод направлен на раннюю диагностику рака и в дальнейшем планируется проведение исследований в реальных образцах сыворотки крови, мочи. На данном этапе адаптации метода индикации БТШ можно заключить, что сенсорная система позволяет регистрировать специфичное взаимодействие фаговых антител с БТШ, локализованными на поверхности клеток, при проводимости среды измерения до 1180 мкСм/см.

Для контроля взаимодействия фаговых антител с БТШ поверхности клеток проводили оценку их взаимодействия с клеточной поверхностью с помощью флуоресцентной микроскопии. Как видно из полученных данных (рис. 4), фаговые антитела, специфичные к БТШ клеточной линии мышинной миеломы Р3Х63Аg8.653, конъюгированные с FITC, активно прикрепляются к молекулам мишеням на клеточной поверхности.

При проведении сенсорного анализа с использованием клеточных линий существует ряд неспецифических факторов, которые могут приводить к из-

менению регистрируемого сигнала датчика. К ним, например, относится неспецифичное связывание антител на клеточной поверхности. Основная сложность при проведении иммунологических анализов связана с возможным присутствием структурно сходных соединений, которые могут взаимодействовать с фаговыми антителами. Поэтому были проведены исследования, исключающие перекрестное взаимодействие полученных фаговых антител с иными клеточными линиями. Для этого использовали антиген (БТШ), выделенный из клеточных линий СНО, и фаговые антитела, специфичные к БТШ из клеточной линии мышинной миеломы Р3Х63Аg8.653. Предварительно с помощью метода дот-иммуноанализа было показано, что фаговые антитела, специфичные к БТШ клеточной линии мышинной миеломы Р3Х63Аg8.653 не взаимодействуют с БТШ, выделенным из клеточных линий СНО. Затем проводили исследования на акустическом датчике. Методика проведения данного цикла экспериментов была аналогична предыдущим экспериментам. На рис. 5 представлены частотные зависимости модуля электрического импеданса компактного анализатора до (кривая 1) и после (кривая 2) добавления фаговых антител, специфичных к БТШ клеточной линии мышинной миеломы Р3Х63Аg8.653, в буферном растворе с проводимостью 50 мкСм/см с клеточными линиями СНО. Видно, что в этом случае модуль электрического импеданса датчика практически не изменяется. Следовательно, фаговые антитела, специфичные к БТШ, выделенные из клеточных линий Р3Х63Аg8.65, не взаимодействуют с БТШ, локализованным на поверхности клеточных линий СНО.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой специфичности и чувствительности метода к рассматриваемой биологической реакции — взаимодействию фаговых антител с БТШ, локализованных на поверхности клеток. Проведенные

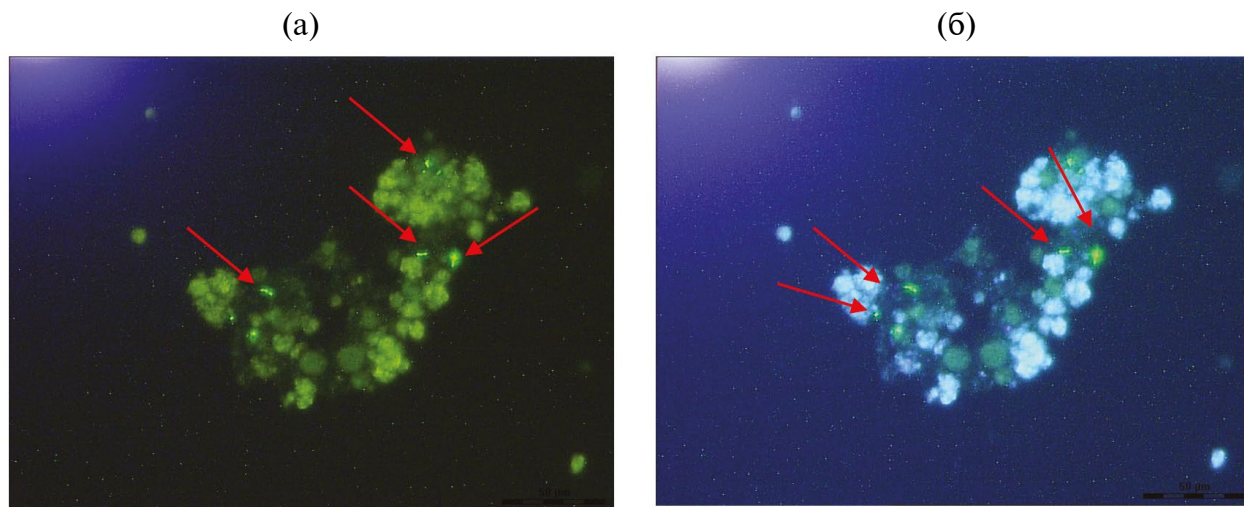


Рис. 4. Результаты микроскопии клеток линии мышинной миеломы Р3Х63Аg8.653 с нанесенными фаговыми антителами, специфичными к БТШ клеточной линии Р3Х63Аg8.653: а — флуоресценция FITCх40, б — флуоресценция красителя DAPIх40. Стрелками отмечены фаговые антитела.

эксперименты показали возможность индикации БТШ в проводящих суспензиях путем регистрации специфического взаимодействия с фаговыми антителами. Установлено, что изменение аналитического сигнала датчика при прочих равных условиях наблюдалось при проводимости среды измерения 1180 мкСм/см.

Известно, что электропроводность жидкостей зависит не только от концентрации растворенного вещества, но и от наличия примесей (солевой фон) и температуры. Солевой фон и колебания температуры оказывали значительное влияние на результат измерения. Увеличение температуры повышало удельную электрическую проводимость, так как возрастали подвижность ионов и степень электролитической диссоциации слабого электролита. Во избежание двоякого толкования полученных результатов, в экспериментах использовался один и тот же буферный раствор одного состава (изменялась только электропроводность). Температура оставалась одинаковой при проведении измерений 25–26°C.

Высокая экспрессия БТШ в различных типах раковых клеток связана с прогрессированием опухоли и устойчивостью к противораковой терапии (включая радио-/химиотерапию) [16, 29]. Поэтому индикация БТШ является важным моментом при проведении скрининговых исследований при раковых заболеваниях. Полученные результаты могут быть основой расширения возможностей данной акустической платформы для обнаружения не только БТШ, но и других маркеров заболеваний, присутствующих в жидкостях организма.

Разрабатываемый метод индикации БТШ при их взаимодействии с фаговыми антителами с помощью компактного акустического датчика непосредственно в суспензиях с различной начальной электрической проводимостью может рассматриваться как дополнение к существующим и широко применяемым методам анализа БТШ.

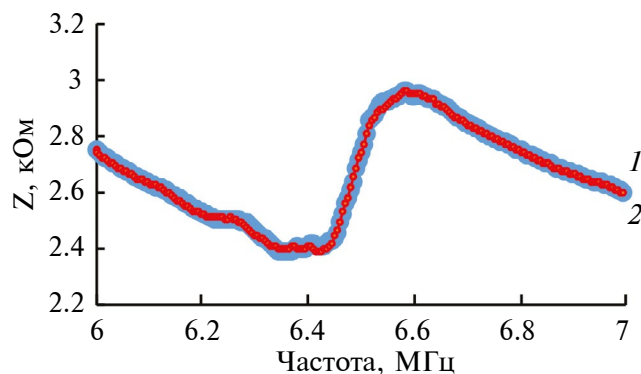


Рис. 5. Частотные зависимости модуля электрического импеданса компактного датчика для контейнера с клеточными линиями СНО до (1) и после (2) добавления фаговых антител, специфичных к БТШ, выделенных из клеточных линий РЗХ63Ag8.65.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 24-29-00463.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе не содержится никаких исследований с участием людей или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Poghossian A., Schoning M.J. // *Electroanalysis* 2014. V. 26. P. 1197–1213. <https://doi.org/10.1002/elan.201400073>
2. Marvi F., Jafari K. // *IEEE Trans. Instrum. Meas.* 2021. V. 70. P. 7501. <https://doi.org/10.1109/TIM.2021.3052001>
3. Durmuş N.G., Lin R.L., Kozberg M., Dermici D., Khademhosseini A., Demirci U. // *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*. Living Reference Work. / Ed. D. Li. New York: Springer Science+Business Media, 2014. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27758-0_10-2
4. Lange K., Rapp B.E., Rapp M. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. V. 391. P. 1509–1519. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1911-5>
5. Guliy O.I., Zaitsev B.D., Borodina I.A. // *Nanobioanalytical Approaches to Medical Diagnostics*. / Eds P.K. Maurya, P. Chandra. Elsevier Ltd. Woodhead Publishing, 2022. Chapter 5. pp. 143–177. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85147-3.00004-9>
6. Guliy O.I., Zaitsev B.D., Borodina I.A. // *Sensors*. 2023. V. 23. P. 6292. <https://doi.org/10.3390/s23146292>
7. Rocha-Gaso M.I., March-Iborra C., Montoya-Baides A., Arnau-Vives A. // *Sensors*. 2009. V. 9. P. 5740–5769. <https://doi.org/10.3390/s90705740>
8. Lee J., Choi Y.-S., Lee Y., Lee H.J., Lee J.N., Kim S.K. et al. // *Anal. Chem.* 2011. V. 83. P. 8629–8635. <https://doi.org/10.1021/ac2020849>
9. Han S.B., Lee S.S. // *Micromachines* 2024. V. 15. P. 249. <https://doi.org/10.3390/mi15020249>
10. Zhang J., Zhang X., Wei X., Xue Y., Wan H., Wang P. // *Anal. Chim. Acta.* 2021. V. 1164. P. 338321. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338321>
11. Mascini M., Del Carlo M., Compagnone D., Cozzani I., Tiscar P.G., Mpamhanga C.P. et al. // *Anal. Lett.* 2006. V. 39. № 8. P. 1627–1642. <https://doi.org/10.1080/00032710600713529>
12. Luengwilai K., Beckles D.M., Saltveit M.E. // *Postharvest Biol. Technol.* 2012. V. 63. № 1. P. 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.06.017>

13. Polenta G.A., Guidi S.M., Ambrosi V., Denoya G.I. // *Curr. Res. Food Sci.* 2020. V. 3. P. 329–338.
<https://doi.org/10.1016/j.crfs.2020.09.002>
14. Kampinga H.H., Hageman J., Vos M.J., Kubota H., Tanguay R.M., Bruford E.A. et al. // *Cell Stress Chaperones*. 2009. V. 14. № 1. P. 105–111.
<https://doi.org/10.1007/s12192-008-0068-7>
15. Maksimovich N.Y., Bon L.I. // *J. Biomed.* 2020. V. 16. № 2. P. 60–67.
<https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-2-60-67>
16. Shevtsov M., Balogi Z., Khachatryan W., Gao H., Vigh L., Multho G. // *Cells*. 2020. V. 9. P. 1263.
<https://doi.org/10.3390/cells9051263>
17. Rokutan K. // *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2000. 15(Suppl):D. P. 12–19.
<https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2000.02144.x>
18. Waters E.R. // *J. Exp. Bot.* 2013. V. 64. № 2. P. 391–403.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ers355>
19. Guliy O.I., Staroverov S.A., and Dykman L.A. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2023. V. 59. № 4. P. 395–407.
<https://doi.org/10.1134/S0003683823040063>
20. Bayer C., Liebhardt M.E., Schmid T.E., Trajkovic-Arsic M., Hube K., Specht H.M. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2014. V. 88. № 3. P. 694–700.
<https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2013.11.008>
21. Qu B., Jia Y., Liu Y., Wang H., Ren G., Wang H. // *Cell Stress and Chaperones*. 2015. V. 20. P. 885–892.
<https://doi.org/10.1007/s12192-015-0618-8>
22. Komarova E.Y., Suezov R.V., Nikotina A.D., Aksenov N.D., Garaeva L.A., Shtam T.A. et al. // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. P. 21314.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-00734-4>
23. Staroverov S.A., Kozlov S.V., Brovko F.A., Fursova K.K., Shardin V.V., Fomin A.S. et al. // *Biosens. Bioelectron. X*. 2022. V. 11. P. 100211.
<https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100211>
24. Dykman L.A., Staroverov S.A., Vyrshchikov R.D., Fursova K.K., Brovko F.A., Soldatov D.A., Guliy O.I. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2023. V. 59. № 4. P. 539–545.
<https://doi.org/10.1134/S0003683823040051>
25. Guliy O.I., Khanadeev V.A., Dykman L.A. // *Front. Biosci. (Elite Ed.)* 2024. V. 16. № 3. P. 24.
<https://doi.org/10.31083/j.fbe1603024>
26. Petrenko V.A. // *Viruses* 2024. V. 16. P. 968.
<https://doi.org/10.3390/v16060968>
27. Guliy O.I., Zaitsev B.D., Borodina I.A., Staroverov S.A., Vyrshchikov R.D., Fursova K.K. et al. // *Microchem. J.* 2024. V. 207. 111661.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.111661>
28. Ulitin A.B., Kapralova M.V., Laman A.G., Shepelyakovskaya A.O., Bulgakova E.V., Fursova K.K. et al. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2005. V. 405. P. 437–440.
<https://doi.org/10.1007/s10628-005-0134-3>
29. Calderwood S.K., Khaleque M.A., Sawyer D.B., Ciocca D.R. // *Trends Biochem. Sci.* 2006. V. 31. P. 164–172.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.01.006>

Indication of Heat Shock Proteins in Conducting Suspensions Using Phage Antibodies and an Acoustic Analyzer

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

^a*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms — Subdivision of the Federal State Budgetary Research Institution Saratov Federal Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS), Saratov, 410049 Russia*

^b*Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics, Russian Academy of Sciences, Saratov Branch, Saratov, 410019 Russia*

^c*Branch of Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino, 142290 Russia*

*e-mail: guliy_olga@mail.ru

There are numerous publications indicating an increase in the expression level of heat shock proteins (HSP) in oncological diseases. Therefore, the development of methods for indicating HSP as a marker of oncological diseases is promising. In this work, phage antibodies specific to HSP of a mouse myeloma cell line were obtained. For the first time, using a compact acoustic sensor, the effect of the conductivity of the measurement medium on the registration of an analytical signal during the interaction of phage antibodies with HSP was studied. The possibility of registering a specific interaction “HSP-phage antibodies” in suspensions with a conductivity of 50–1180 μS/cm was experimentally established. Control experiments were conducted to assess of mass load on the sensor. The results obtained are promising for the development of acoustic sensor systems in the HSP indication.

Keywords: heat shock proteins, acoustic sensory system, phage antibodies