

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА  
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики  
доц., к.б.н. Олексій Нипорко

Протокол № \_\_\_\_\_ засідання кафедри

від « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2023 р.

**ВИКОРИСТАННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ  
ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ АНТИТІЛ ПРОТИ HSP60 З МЕТОЮ  
ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ ВАГІТНОСТІ ПАЦІЄНТОК З  
УСКЛАДНЕНИМ АНАМНЕЗОМ**

Дипломна робота  
студентки 4-го курсу  
спеціальності 091 Біологія  
ОП «Біологія (високі технології)»  
**Здановської Марти**

Науковий керівник від кафедри  
професор кафедри молекулярної  
біотехнології та біоінформатики  
д.б.н. **Солдаткін Олексій**

Робота виконана у лабораторії медично-дослідницького центру  
«Медлайф» під керівництвом с.н.с. к.б.н. **Погрібної Алли**

Київ – 2023 р.

## АНОТАЦІЯ

Здановська М.В. – Використання імуноферментної тест-системи для визначення рівня антитіл проти HSP60 з метою прогнозування перебігу вагітності пацієнток з ускладненим анамнезом. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

Ефективність високочутливої діагностичної імуноферментної тест-системи для виявлення антитіл людини класу G проти антигену HSP60 було доведено серологічними, біохімічними та статистичними методами. Застосування цього підходу може поліпшити своєчасну діагностику захворювань, що впливають на репродуктивну систему жінки. Тест-система сконструйована у форматі "непрямого" твердофазного імуноферментного аналізу, що ґрунтується на іммобілізації антигену на твердій фазі та його взаємодії з розчинними специфічними антитілами. Виявлення антитіл здійснюється за допомогою ферментативної реакції з використанням антивидових антитіл, кон'югованих з пероксидазою хрому.

В ході дослідження були зібрані дані щодо рівня антитіл проти HSP60 у вагітних пацієнток з ускладненим анамнезом. Зроблено висновок, що використання тест-системи дозволяє надійно аналізувати рівень антитіл до білку HSP60 та може бути використано як основний компонент для скринінгових тестів під час вагітності. Отримані результати мають велике практичне значення у розробці нових стратегій для прогнозування перебігу вагітності та визначення ризиків у жінок з ускладненим анамнезом.

**Ключові слова:** імуноглобуліни, HSP60, тест-система, вагітність, ІФА.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ .....	4
ВСТУП .....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1 Імуноферментний аналіз та його роль в науці та медицині .....	7
1.2 Імуноферментні тест-системи .....	9
1.3 Роль антитіл до HSP60 у діагностиці та прогнозуванні розвитку захворювань .....	11
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	16
2.1 Матеріали та реактиви.....	16
2.1.1 Реактиви, розчини та обладнання .....	16
2.1.2 Плазмідні вектори.....	17
2.2 Методи дослідження.....	18
2.2.1 Отримання рекомбінатного білку HSP60 та визначення його концентрації та чистоти за допомогою електрофорезу у ПААГ .....	18
2.2.2 Отримання сумарного препарату IgG з донорської сироватки крові людини .....	20
2.2.3 Зв'язування носія NHS-активованої сефарози Fast Flow з білком HSP60 для отримання поліклональних IgG специфічних до білку HSP60.	21
2.2.4 Визначення рівнів імуноглобулінів класу G до HSP60 людини у сироватках крові вагітних жінок .....	22
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ .....	24
ВИСНОВКИ .....	34
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	36

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- HSP – heat shock proteins – білки теплового шоку;
- IФА – імуноферментний аналіз;
- ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay – імуноферментний аналіз;
- LB – lysogeny broth – лізогенне середовище;
- PBS – phosphate buffered saline – фосфатно-сольовий буфер;
- BSA – bovine serum albumin – бичачий сироватковий альбумін;
- TEMED – tetramethylethylenediamine – тетраметилетилендіамін;
- PSA – ammonium persulfate – персульфат амонію;
- PVC – polyvinyl chloride – полівінілхлорид;
- PMSF – phenylmethanesulfonyl fluoride – фенілметилсульфонілфторид;
- IPTG – isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside – ізопропіл- $\beta$ -D-1-тіогалактопіранозид;
- ПААГ – поліакриламідний гель;
- SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis) – електрофорез білків у поліакриламідному гелі;
- ABTS A1888-5G – АБТС, 2,2'-азинобіс-3-етилбензтіазолін-6-сульфонова кислота.

## ВСТУП

Використання високоінформативних засобів серологічної діагностики є важливим біотехнологічним методом сучасної медицини. Одним з найбільш пріоритетних завдань є біоаналітична стандартизація цих засобів, для забезпечення точності та надійності. Це особливо важливо для надання правильної діагностики та лікування пацієнтів.

Відомо, що рівні HSP60, а також аутоантитіл до даного білку значно змінюються при різних патологіях [1]. В останнє десятиліття активно проводяться дослідження стосовно проблем імунopatології вагітності з використанням різних панелей природніх регуляторних аутоантитіл – імуноглобулінів класу G [2]. Аномальне підвищення або зниження сироваткового вмісту багатьох аутоантитіл може призводити до соматичних проблем, які лежать в основі різних патологій вагітності, включаючи постійне невиношування, зупинку розвитку вагітності, прееклампсії та вад розвитку плоду [3]. Підвищений рівень анти-HSP60 антитіл було виявлено при моніторингу пацієток з проблемами невиношуваності вагітності (повторна втрата вагітності) [4].

Саме тому, серологічний метод визначення титру антитіл в сироватці крові проти еукаріотичного білку HSP60 людини може бути високоефективним методом діагностики та прогнозування розвитку аутоімунних патологій в організмі людини.

Об'єктом дослідження є високочутлива діагностична імуноферментна тест-система для якісного та кількісного виявлення антитіл людини класу G проти антигену еукаріотичного білку HSP60 в біологічному матеріалі сироватки крові людини. Найближчою до запропонованої в цій роботі є тест-система для імуноферментної діагностики на основі визначення гамма-інтерферону [5]. Вона призначена для імуноферментної діагностики на основі визначення гамма-

інтерферону і не може бути застосована для виявлення антитіл класу G людини у біологічному матеріалі сироваток крові методом імуноферментного аналізу.

Методи, що були використані в роботі є хроматографія, гель-електрофорез, а також твердофазний імуноферментний аналіз, за допомогою якого можна провести аналіз білків, та який потребує високоспецифічних антитіл до досліджуваного антигену.

Метою роботи є визначення рівня аутоантитіл класу IgG до антигену HSP60 людини у біологічному матеріалі сироваток крові вагітних жінок для подальшого застосування аналізу як додаткового діагностичного тесту для прогнозування перебігу вагітності пацієнтів з ускладненим анамнезом.

Для досягнення означеної мети були поставлені такі завдання:

1. Отримати рекомбінатний білок HSP60.
2. Отримати поліклональні IgG специфічні до білку HSP60.
3. Визначити рівень аутоантитіл класу IgG до антигену HSP60 людини у біологічному матеріалі сироваток крові вагітних жінок з ускладненим анамнезом.
4. Оцінити перспективу застосування методу як додаткового тесту прогнозування перебігу вагітності.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Імуноферментний аналіз та його роль в науці та медицині

Імуноферментний аналіз – це лабораторний метод, який використовується для виявлення та вимірювання присутності специфічних речовин, таких як білки або гормони, у зразку. ІФА базується на принципі взаємодії між антигеном і відповідним антитілом, коли антитіло кон'югується з ферментом. Фермент каталізує хімічну реакцію, яка генерує вимірюваний сигнал, такий як зміна кольору або флуоресценція. Цей широко використовуваний аналітичний біохімічний аналіз, вперше описаний Євою Енгвалл і Пітером Перлманом у 1971 році [6].

Методи імуноферментного аналізу можуть бути класифіковані за різними ознаками, наприклад, за типом антитіл або антигенів, за способом маркування реагентів, за типом носія [7, 8, 9]. Одна з найбільш поширених класифікацій методів ІФА заснована на типі антитіл, що використовуються, і включає наступні види:

1. Прямий ELISA: у цьому методі антиген іммобілізується на твердій поверхні та виявляється за допомогою міченого первинного антитіла, яке безпосередньо зв'язується з антигеном [10].

2. Непрямий ELISA: у цьому методі антиген іммобілізується на твердій поверхні та виявляється за допомогою міченого вторинного антитіла, яке зв'язується з первинним антитілом, специфічним для антигену [11, 12, 13].

3. Сендвіч-ELISA: у цьому методі використовуються два антитіла – одне іммобілізоване на твердій поверхні, а інше, помічене, – для розміщення антигену між ними [14].

4. Конкурентний ELISA: у цьому методі відома кількість міченого антигену конкурує з неміченим антигеном у зразку за зв'язування з обмеженою кількістю іммобілізованого антитіла.

Метод відіграє значну роль як у науці, так і в практичній медицині. У науці він широко використовується в дослідженнях для ідентифікації та кількісного визначення білків та інших біомолекул у зразках. Наприклад, дослідники можуть використовувати його для вимірювання рівнів певного гормону в крові чи сечі, що може дати розуміння різноманітних фізіологічних процесів.

У медицині ІФА зазвичай використовується як діагностичний інструмент для виявлення присутності певних інфекційних агентів або інших біомолекул у зразках пацієнтів. Наприклад, ІФА можна використовувати для виявлення наявності антитіл до ВІЛ у зразках крові, що є важливим інструментом для діагностики ВІЛ-інфекції. А також IgM та IgG до вірусних гепатитів А, В, С, D і Е, цитомегаловірної інфекції, вірусу Епштейна-Барр, токсоплазмозу, інфекцій, що передаються статевим шляхом, корі, краснухи, сальмонельозу, дизентерії, кліщовому енцефаліту та хелікобактерної інфекції. За допомогою ІФА проводять оцінку наявності маркерів деяких аутоімунних захворювань та виявлення онкологічних маркерів (простатспецифічного антигену, раково-ембріонального антигену та інших) та визначення вмісту гормонів у сироватці крові (прогестерону, пролактину, тестостерону, тиреотропного гормону та інших) [15, 16, 17]. Саме тому, метод ІФА є ефективним інструментом у діагностиці різних захворювань завдяки своїй високій чутливості та специфічності.

Цей метод дозволяє визначати наявність речовин у зразку навіть за невисокої концентрації та гарантує точність діагностики, дозволяючи виявити саме ті антитіла чи антигени, які передбачалися.

Однією з головних переваг ІФА є можливість визначення захворювання на ранній стадії, що особливо важливо при діагностиці інфекційних захворювань. Раннє виявлення захворювання дозволяє швидше розпочати лікування та покращити прогноз результату хвороби. Також слід зазначити, що при проведенні ІФА ймовірність помилки мінімальна завдяки високій технологічності проведення аналізу та використанню тест-систем і реактивів, вироблених у промислових умовах.

Однак слід враховувати, що для проведення ІФА необхідно мати припущення про природу захворювання, тому дана методика не є універсальною і може бути неефективною у випадку, якщо лікар не знає, що саме шукати. Крім того, у разі діагностики інфекційних захворювань ІФА не може визначити специфічні властивості збудника, обмежуючись лише вказівкою на наявність антитіл у крові.

У цілому, ІФА є ефективним і точним методом діагностики, але його застосування має бути обґрунтованим та ґрунтуватися на знаннях про природу захворювання [18, 19].

Загалом імуноферментний аналіз є цінним лабораторним методом, який має численні приклади застосування. Його здатність виявляти та кількісно визначати конкретні біомолекули в зразку зробила його важливим інструментом для дослідження та діагностики.

## **1.2 Імуноферментні тест-системи**

Імуноферментний аналіз і імуноферментна тест-система – споріднені терміни, які стосуються методів, що використовуються в імунології для виявлення та кількісного визначення присутності специфічних молекул, таких як білки або антитіла, у біологічному зразку.

Імуноферментний аналіз – це широкий термін, який стосується будь-якої методики, що використовує зв'язане з ферментом антитіло або антиген для виявлення присутності цільової молекули. З іншого боку, імуноферментна тест-система – це специфічний тип імуноферментного аналізу, який містить повний набір або систему для проведення аналізу: усі необхідні реагенти, контролю та інструкції для проведення аналізу стандартизованим способом.

Тест-системи ІФА широко використовуються в медицині та науці для виявлення та вимірювання різних біомолекул, включаючи антитіла, антигени, гормони, ферменти та цитокіни.

Зазвичай використовуються для діагностики інфекційних захворювань, викликаних бактеріями, вірусами та іншими мікроорганізмами. Наприклад, тести ІФА використовуються для виявлення антитіл проти вірусу імунодефіциту людини, гепатиту В і С, хвороби Лайма та сифілісу.

Тест-системи можуть виявити наявність специфічних антитіл IgE в крові пацієнта, що може вказувати на алергічну реакцію на певний алерген. ІФА-тести зазвичай використовуються для тестування на харчову алергію, алергію на ліки та алергію на подразники з навколишнього середовища.

Вони використовуються в діагностиці раку для виявлення пухлинних маркерів, які є специфічними білками або іншими молекулами, що виробляються раковими клітинами. Тести можуть виявити онкомаркери в крові або інших рідинах організму, що може допомогти в ранньому діагностуванні та моніторингу раку.

Тест-системи можна використовувати для виявлення наркотиків або їх метаболітів у зразках сечі або крові. Наприклад, тести ELISA використовуються для тестування на наркотики в спорті та для моніторингу пацієнтів, які проходять медикаментозну терапію.

ELISA широко використовуються в наукових дослідженнях для виявлення та вимірювання рівнів різних біомолекул у біологічних зразках. Тести ELISA можна використовувати для вимірювання цитокінів, факторів росту, гормонів та інших молекул, які беруть участь у фізіологічних і патологічних процесах.

Загалом, тест-системи ІФА є універсальними інструментами, які мають широкий спектр застосування в медицині та науці. Ці методи дозволяють визначити різні імуноглобуліни в біологічних рідинах, таких як кров, слина, сеча та інші. Імуноферментна тест-система призначена для швидкого діагностування окремих імуноглобулінів та дозволяє виявити ознаки кількох захворювань та імунологічних відхилень.

### **1.3 Роль антитіл до HSP60 у діагностиці та прогнозуванні розвитку захворювань**

Білки теплового шоку виконують важливу функцію в запобіганні пошкодження білків, що відбувається внаслідок стресу. Залежно від їх молекулярної маси, ці білки можуть належати до одного з шести відомих сімейств: малих HSP, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 або HSP110 [20, 21]. Білки теплового шоку є консервативними та зазвичай розглядаються як внутрішньоклітинні білки з молекулярними шаперонними та цитопротекторними функціями [22].

У нормі, антитіла проти HSP60 можуть виявлятися у невеликій кількості в крові. Це свідчить про те, що в організмі відбувається нормальний процес синтезу білків HSP60, який забезпечує клітинний захист. Проте зазвичай в нормі це не викликає ніяких патологічних проявів.

Дослідження показали, що HSP60, який є мітохондріальним білком, пов'язаний зі стресовою реакцією. Система реакції на тепловий шок є гомеостатичною та захищає клітину від пошкоджень [23, 24]. Експерти обробляли різних мишей L-DOPA та виявили значне збільшення експресії HSP60 у мітохондріях та HSP70 у цитоплазмі. Вчені припускають, що сигнальний шлях теплового шоку є ключовим компонентом бар'єру проти нейротоксичності, що спричиняється вільними екстремальними формами кисню та азоту, що утворюються під час дозрівання та нейродегенеративних розладів [25]. Декілька наукових досліджень підтверджують, що HSP60 та інші білки теплового шоку є життєво важливими для витривалості клітин у шкідливих або стресових умовах [26].

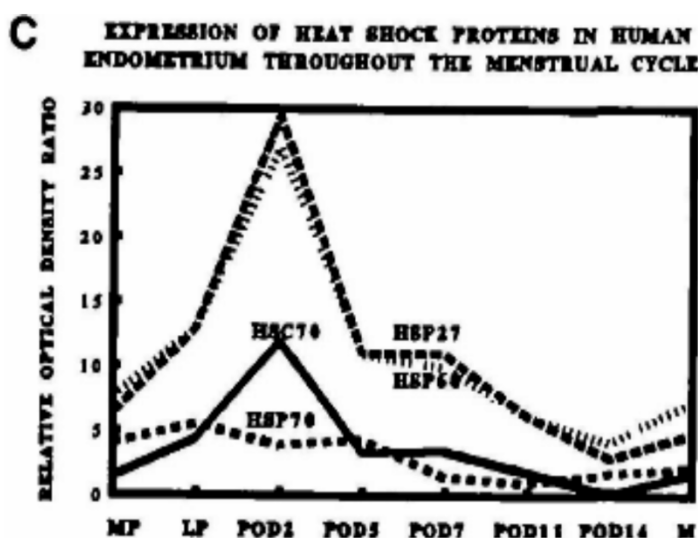
Передчасні пологи є серйозним ускладненням у галузі акушерства. Наукові дослідження підтверджують наявність зв'язку між підвищенням рівня HSP60 під час вагітності та передчасними пологами. У жінок, які стикаються з викиднем, вимірювання рівня HSP60 може слугувати прогностичним фактором для викидня, спричиненого хламідіями [27].

У ряді досліджень виявлено підвищення рівня анти-HSP60 антитіл до власного HSP60 людини при різних запальних та аутоімунних захворюваннях, а саме діабеті 1 типу, ревматоїдному артриті, множинному склерозі, системній червоній вовчанці, атеросклерозі, запальних захворюваннях кишечника та запальних захворювань шкіри [28–33]. У цих умовах HSP60 може діяти як аутоантиген, викликаючи імунну відповідь і призводячи до запалення та пошкодження тканин. Аутоімунні захворювання характеризуються втратою імунної толерантності до власних антигенів, що призводить до надмірної імунної відповіді та хронічного запалення. Білки теплового шоку розглядаються як потенційний спосіб профілактики та лікування аутоімунних захворювань. Білок HSP60 може активувати імунну відповідь. Активація такого типу

може призводити до вироблення антитіл проти HSP60 та/або індукції імунних регуляторних механізмів [34].

Наукові дослідження показують, що рівень антитіл класу G до білка теплового шоку *Chlamydia trachomatis* не має впливу на імунітет чоловіків, а отже на якість сперми та її функціональну здатність [35]. Проте, для з'ясування низького рівня утворення HSP60 в епітелії сім'яних виносів з втратами сперматогенезу потрібні подальші наукові дослідження. Вивчення цього питання може сприяти кращому розумінню чоловічої безплідності та захисних ефектів [36].

Людський ендометрій є важливою тканиною, яка реагує на стероїди, і дослідження підтверджують, що білки теплового шоку відіграють важливу роль у роботі стероїдів. Виявлено, що експресія HSP60 зростає в пізній проліферативній та ранній секреторній стадіях, але зменшується на середньо-пізній секреторній та менструальній стадіях.



**Рисунок 1.1** Експресія білків теплового шоку протягом усього менструального циклу.

Імуногістохімічне перекрашування дозволило аналізувати клітинні та субклітинні обмеження HSP в ендометрії людини. Дослідження показали, що імунореактивність щодо інших білків теплового шоку була

виявлена як у стромі, так і в епітелії. HSP60 також були виявлені в лімфоїдних сумах та ендотеліальних клітинах стромы ендометрію. Ці дослідження є важливим кроком для кращого розуміння взаємодії між HSP та стероїдами в ендометрії людини [37].

Недавні дослідження показали, що HSP60 може відігравати важливу роль у імунологічній відповіді на «сигнали небезпеки» [38]. Інфекції та хвороби порушують нормальне функціонування клітин. Коли клітина знаходиться в стресовому стані, вона зазвичай виробляє білки стресу, включаючи HSP60. Щоб HSP60 міг відігравати роль сигналу небезпеки, він повинен бути доступний поза клітинами. Недавні дослідження показали, що HSP60 може бути знайдений ззовні різних клітин, включаючи прокаріотичні та еукаріотичні клітини, і може виділятися з клітин [39]. Дослідники продемонстрували, що HSP60 може бути виділений з таких явних клітин, як периферійні мононуклеарні клітини крові (PBMC), коли є ліпополісахариди (LPS) або GroEL. Це свідчить про те, що клітини мають різні рецептори та реакції на людський і бактеріальний HSP60. Більше того, дослідження показали, що HSP60 може активувати моноцити, макрофаги та дендритні клітини, і ініціювати виділення широкого спектру цитокінів [40].

Відсутність або зміна якості HSP60 відповідає за спадкову спастичну параплегію [41].

HSP60 надмірно експресується при багатьох видах раку, включаючи рак молочної залози, легенів і простати. HSP60 може сприяти росту пухлини та метастазування шляхом підвищення виживання ракових клітин і пригнічення реакції імунної системи на пухлину. Виявилося, що HSP60 впливає на апоптоз у пухлинних клітинах, пов'язаний із коригуванням рівнів експресії. Було продемонстровано, що зміни рівня експресії HSP60 є корисними новими біомаркерами для аналітичних і прогностичних цілей [42, 43]. Усе це дослідження демонструє, що експресію HSP60 можна

використовувати для прогнозування стійкості до певних типів злоякісного розвитку, і в цьому плані може бути можливість розпізнавати пацієнтів, які можуть отримати користь від конкретного лікування [44].

Хламідійна інфекція є досить поширеним захворюванням, яке може спричинити ряд ускладнень, зокрема позаматкову вагітність. Однак, за деякими дослідженнями, серо-позитивні до людського HSP60 особи, тобто ті, в яких вже була попередня інфекція, мають менше шансів на розвиток позаматкової вагітності [45].

Підсумовуючи, можна відзначити, що хоча HSP60 необхідний для клітинної функції та гомеостазу, порушення регуляції експресії або функції HSP60 може сприяти виникненню запальних процесів в організмі. Розуміння механізмів, що лежать в основі участі HSP60 у цих станах, може призвести до нових діагностичних і терапевтичних стратегій.

Таким чином, HSP60 є предметом активних досліджень в останні роки, що може призвести до розробки нових методів діагностики та лікування різних захворювань.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1 Матеріали та реактиви

#### 2.1.1 Реактиви, розчини та обладнання

Tris-HCl pH 8,7, Gly-HCl pH 2,7 та KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma, США); акриламід (Bio-Rad, США); TEMED, Coomassie Brilliant Blue G-250; β-меркаптоетанол, гліцерин, NaCl (Merck, Німеччина); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Cepham Life Sciences, США); Tween-20 (Sigma-Aldrich, США); ABTS A1888-5G (Sigma, Canada); TRIS, HEPES, SDS (Helicon, Росія); PSA та BSA.

Для інкубації бактеріальних клітин використовувався LB-розчин, приготований згідно зі стандартним протоколом, додавши відповідний антибіотик, який забезпечує стійкість бактеріальної культури.

Буфер А для отримання лізату (8 М Urea, 10 мМ Tris-HCl pH 8.0, 10 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 мМ β-меркаптоетанол, 1 мМ PMSF, 1% Triton-X100). Буфер В (4 М Urea, 150 мМ NaCl, 50 мМ Tris pH 8.0). Буфер С для рефолдингу (0,75 М аргінін, 50 мМ Tris pH 7.5, 150 мМ NaCl, pH 7.5).

Для проведення Ni-NTA хроматографії використовувались буфери, приготовані згідно з протоколом Ni-NTA Purification System (For purification of polyhistidine-containing recombinant proteins) від компанії Thermo Fisher (США).

Буфери для зв'язування носія NHS-активованої сефарози 4 Fast Flow було приготовлено за стандартним протоколом Coupling Protocol for Primary Amine of a Ligand (NHS-ACTIVATED SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE, NHS-ACTIVATED SEPHAROSE 4 FAST FLOW).

Running Buffer (25 мМ трис, 200 мМ гліцин, 0.1% SDS).

SDS–PAGE Protein Sample Buffer (5x) (10% SDS, 500 мМ ДТТ, 50% Гліцерин, 250 мМ Tris-HCL та 0.5% бромфеноловий синій, рН 6.8).

Буферний розчин PBS (NaCl 137 мМ, KCl 2,7 мМ, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 мМ, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 мМ, рН 7,4). 0,1% PBS-T (500мл PBS(1x) + 640мкл 1% TWEEN 20).

Розчин хромогенного субстрату (ABTS A1888-5G 5 мг; цитратний буфер 2,5 мл, рН 4,8; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 60% 5 мкл; дистильована вода 7,5 мл).

Під час виконання експерименту знадобилося наступне обладнання: пластикові пробірки (Eppendorf, Німеччина), мірні циліндри та стакани, спектрофотометр UV-2100 (UNICLO, США), центрифуга 5414R (Eppendorf, Німеччина), Uvicord SII 2238 (LKB Bromma, Австрія), LKB bromma Recorder 2211 (LKB, Австрія), StatFax 2600 (Awareness Technology, США), Dry Block TDB-120 (BioSan, Англія), Chromate Microplate Reader (Awareness Technology, США), спектрофотометр LLG-uniSPEC 2 (Lab Logistics Group GmbH, Німеччина), Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Німеччина), електрофоретичний прилад (Bio-Rad, USA).

### 2.1.2 Плазмідні вектори

У дослідженні було застосовано рекомбінантну плазмиду рЕТ-6xHis/{HSP60}, сконструйовану на основі вектору VB171108-1214acs з кодуючою послідовністю гена HSP60 під T7 промотором, маркер стійкості до ампіциліну; штамм клітин E. coli BL21(DE3).

## 2.2 Методи дослідження

### 2.2.1 Отримання рекомбінатного білку HSP60 та визначення його концентрації та чистоти за допомогою електрофорезу у ПААГ

Для отримання культури клітин з надекспресією рекомбінатного білку HSP60, клітини *E. coli* BL21 (DE3), що містить рекомбінантну плазмиду рЕТ- 6xHis/{HSP60} висівали на чашці Петрі з додаванням ампіциліну (3–5 мкл, до 50–100 мкл бактеріальної культури). Вирощування культури проводили протягом нічного інкубування на шейкері (300–350 об/хв.) при температурі +37°C. Далі культуру клітин інкубували на шейкері (300–350 об/хв.) у LB (у колбу додали LB 60% від загального об'єму колби та ампіцилін (1 мкл на 1 мл LB)), перевіряючи спектрофотометрично оптичну густину суспензії клітин та беручи до уваги, що оптична густина має бути в межах  $OD_{600} = 0.8-1$ . Відбирали аліквоту до індукції з IPTG для аналізу. Потім, додаючи IPTG (1mM) інкубували протягом 3–4 годин (300–350 об/хв.). На наступний день відбирали суспензію бактерій у фалькони об'ємом 50 мл, центрифугували протягом 30 хв при 3000g за температури +4°C. Отриманий осад зберігали за температури –20°C для подальшої роботи.

Для отримання рекомбінатного білку HSP60, отриманий осад розчиняли в буфері А для отримання лізату. PMSF додали безпосередньо перед використанням. Для руйнування клітинних компонентів проводили сонікацію 3 рази по 5 хв на льоду (30 с – обробка / 30 с перерва, А (амплітуда) дорівнює 75% / 15–20 мл лізату). Сонікований лізат центрифугували при 3000g за температури +4°C 20 хв. Відбирали супернатант, осад утилізували. До супернатанта додавали сульфат амонія у пропорції 1:1.

Очистку проводили за допомогою Ni-NTA хроматографії за стандартним протоколом NTA Purification System (Purification Procedure – Denaturing Conditions) [46].

До елюцій з білком додавали сульфат амонія у пропорції 1:1. Розчин зберігали за температури +4°C до появи в ньому осаду. Розчин висолених білків центрифугували за температури +4°C 13400g 15хв. Отриманий осад розчиняли у буфері В. Визначення концентрації білку в розчині проводили за допомогою електрофорезу в ПААГ (орієнтовна концентрація 1мг/мл). Концентрацію білку розраховували за допомогою програми Image Studio Lite, використовуючи калібрування з білком сироваткового альбуміну бика.

Регенерацію носія для подальшого використання проводили за стандартним протоколом.

Після елюювання денатурований білок рефолдували на льоду при постійному перемішуванні в охолоджену буфері С. На 1 мл денатурованого білку взяли 8–10 мл буфера. До розчину додавали розчин насиченого сульфату амонію у пропорції 1:1. Висолений ренатурований білок центрифугували за температури +4°C 13400g 15хв та розчиняли осад у PBS рН 7,4. Визначення концентрації білку в розчині проводили за допомогою електрофорезу в ПААГ. Орієнтовна концентрація мала не перевищувати 0,5 мг/мл. Розносили розчин білку з розрахунку на 50 $\mu$  в лунку планшета для імуноферментного аналізу.

Концентрацію та чистоту виділеного білку перевіряли, аналізуючи зразки за допомогою електрофорезу у градієнтному ПААГ 7–22% за Лемлі [69]. Для приготування зразків використовували SDS–PAGE Protein Sample Buffer (5x). Електрофорез проводили зі струмом 3 мА.

### **2.2.2 Отримання сумарного препарату IgG з донорської сироватки крові людини**

Для отримання сироватки крові для очистки імуноглобулінів було взято кров з вени у здорових жінок-донорів. Процедура була виконана за стандартним протоколом взяття крові без антикоагулянта для біохімічного дослідження.

Після інкубування крові у термостаті протягом 1 години за температурі  $+37^{\circ}\text{C}$ , за допомогою скляної палички відгортали край для утворення згустку крові та залишали на ніч для утворення еритроцитного стовпчика. По завершенню інкубування видаляли згусток та отриману суспензію центрифугували при  $2000g$  протягом 10 хв за температурі  $+4^{\circ}\text{C}$ . Отриманий супернатант відбирали та зберігали за температурі  $+4^{\circ}\text{C}$  в 50% розчині амонію сульфату.

Для отримання сумарного препарату IgG з донорської сироватки крові людини, далі сироватку центрифугували протягом 25 хв при  $13400g$  за температурі  $+4^{\circ}\text{C}$  для отримання осаду, що містив в тому числі сумарні імуноглобуліни G. Осад розчиняли PBS рН 7,4. Врівноваження носія для подальшої роботи проводили в хроматографічній колонці шляхом промивання буфером PBS рН 7,4. Наносили сироватку, після чого промивали колонку PBS рН 7,4. Перед збором фракцій у пробірку об'ємом 5 мл додали 90мкл розчину 2М Tris-HCl рН 8,7. Процес елюювання проводили за допомогою 0,1М розчину Gly-HCl рН 2,7. Після проведення процедури зв'язування та елюції антитіл для усунення неспецифічного зв'язування з компонентами робочої суміші білків сироватки з носієм останній промивали 0,1М розчином лимонної кислоти. Після чого врівноважували носій за допомогою буферу PBS, рН 7,4 та

використовували в подальшій роботі. Для довготривалого зберігання носій в колонці залишали у розчині PBS pH 7,4 з додаванням 0,02 % NaN<sub>3</sub>.

### **2.2.3 Зв'язування носія NHS-активованої сефарози Fast Flow з білком HSP60 для отримання поліклональних IgG специфічних до білку HSP60**

NHS-активована сефароза, призначена для ковалентного з'єднання лігандів білкової природи, що містять первинні аміногрупи (найпоширеніша форма приєднання). Матриця сефарози 4 Fast Flow, активована NHS, заснована на міцно зшитих кульках агарози з 14-атомними спейсерними рукавами. Неспецифічна адсорбція білків до сефарози, активованої NHS, є незначною через гідрофільні властивості базової матриці. Матрикс стабільний при високому pH, що дозволяє проводити суворі процедури промивання (за умови стабільності pH зв'язаного ліганду).

Усі розчини та дії для зв'язування носія NHS-активованої сефарози Fast Flow з білком HSP60 були виконані за стандартним протоколом [47].

Специфічні до антигену HSP60 антитіла отримували з високоочищених сумарних IgG людини з сироватки донорської венозної крові. Суміш сумарних імуноглобулінів класу G людини центрифугували протягом 25 хв 13400g за температури +4°C. Отриманий осад розчиняли у буфері PBS-T. Розчинену суміш антитіл наносили на колонку з NHS-активованою сефарозою, попередньо кон'югованою з білком HSP60. Процес елюювання антитіл проводили за допомогою 0,1М розчину Gly-HCl pH 2,7 з миттєвою нейтралізацією pH розчину за допомогою буферного розчину Tris-HCl. Для довготривалого зберігання носія в

колонці його залишили у розчині PBS pH 7,4 з додаванням 0,002 % NaN<sub>3</sub> та залишали за температурою +4°C.

#### **2.2.4 Визначення рівнів імуноглобулінів класу G до HSP60 людини у сироватках крові вагітних жінок**

Визначення проводили за методикою твердофазного імуноферментного аналізу.

Першим кроком було прикріплення антигена до плоскої поверхні планшету. Для цього 100 мкл розчину антигена, розведеного в PBS з концентрацією 5 мкг/мл, наносили в кожну лунку планшету PVC фірми Nunc (Данія). Після цього антиген інкубували протягом 12 годин при температурі +4°C. Нев'язаний антиген видаляли шляхом подвійного промивання лунок за допомогою системи StatFax 2600 (Awareness Technology, США) з використанням буферу PBS-T.

Другим кроком було блокування вільних місць зв'язування. Для цього мікротитрувальний планшет заповнювали розчином PBS-T і інкубували його протягом близько 1 години при температурі +37°C. Після цього розчин видаляли з лунок і проводили промивання лунок за допомогою буферу PBS-T об'ємом 300 мкл в кожній лунці (промивання повторювали 4 рази).

На наступному етапі до кожної лунки додавали по 100 мкл досліджуваних сироваток людини в PBS-T. Аналогічно готували контрольні зразки сироваток людини (2 позитивних і 2 негативних), а також калібрувальні розчини високоочищених імуноглобулінів G людини до антигену HSP60 для кількісного визначення специфічних антитіл у досліджуваних сироватках. Лунки інкубували протягом 1 години при температурі +37°C, після чого видаляли розчин PBS-T з незв'язаними

антитілами і промивали лунки розчином PBS-T. Після промивання лунок вносили по 100 мкл розчину кон'югата - антивидових антитіл проти важкого ланцюгу IgG, зв'язаних з пероксидазою хрому, і інкубували за температури +37°C протягом 45 хвилин.

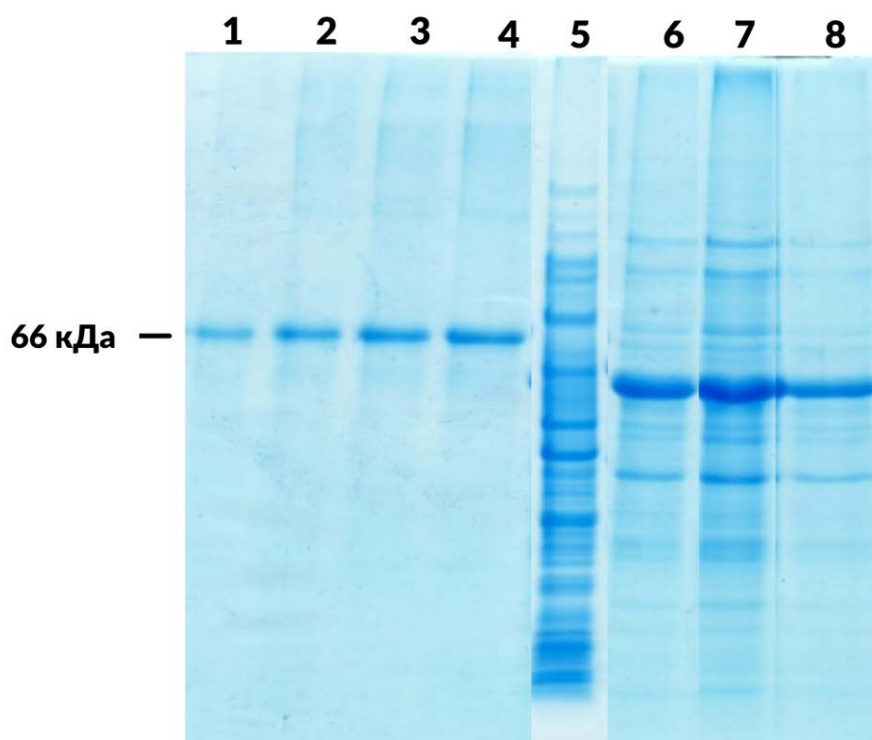
На наступному етапі планшет з лунками промивали розчином PBS-T, після чого вносили в кожну лунку по 100 мкл розчину хромогенного субстрату і інкубували його при температурі 18–25°C з постійним перемішуванням за допомогою ротаційного шейкера.

На останньому етапі проводили вимірювання оптичної щільності в лунках в однохвильовому режимі при довжині хвилі 405 нм.

### РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Запропонована робота була присвячена оптимізації високочутливої діагностичної імуноферментної тест-системи для якісного та кількісного виявлення антитіл людини класу G проти антигену HSP60 з метою оцінки перспективи застосування її як додаткового тесту прогнозування перебігу вагітності пацієнток з ускладненим анамнезом.

Для виконання означених завдань було використано бактеріальну культуру з надекспресією рекомбінантного білку HSP60. Хроматографічну очистку білку HSP60 із сонікованого лізату клітин *E.coli* проводили за допомогою Ni-NTA хроматографії.

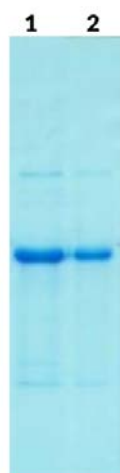


**Рисунок 3.1** Електрофореграма етапів очистки білку HSP60 (7–22% ПААГ). 1-4 – BSA (0,25мкг; 0,5мкг; 0,75мкг; 1мкг відповідно); 5 – розчин незв’язаних з Ni-NTA білків; 6 – смола зі зв’язаним білком HSP60; 7-8 – елюція №1 та №2

Для визначення частоти та концентрації білків у поліакриламідному гель-електрофорезі (ПААГ) використовувалося програмне забезпечення Image Studio Lite. Загальна кількість білку HSP60, одержаного з 1 літра індукованої бактеріальної культури з оптичною щільністю 0,8–1, складала близько 3,5 мг. Всі зібрані фракції елюції були піддані процесу рефолдації, фільтрації та вирівнювання до оптимальної концентрації для зберігання та подальшого використання в імунодіагностиці (ІФА).

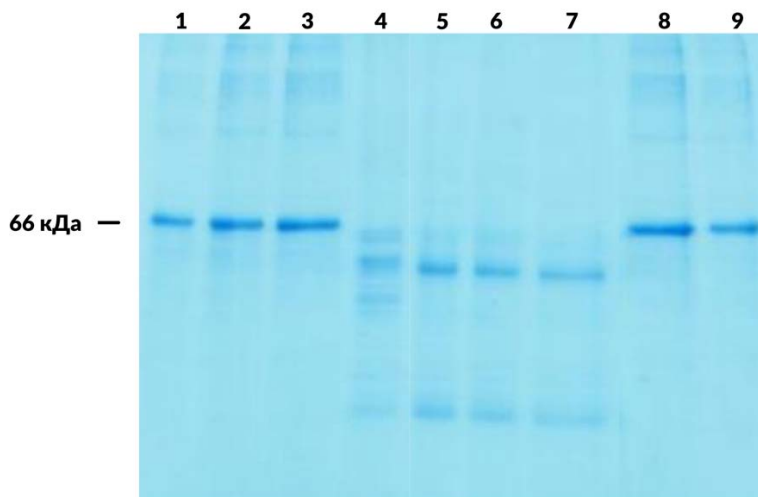
Сумарні імуноглобуліни G з сироватки донорської крові отримували за допомогою застосування афінної хроматографії на носії Protein G Agarose Resin 4 RAPID RUN™. У результаті було одержано сумарні IgG людини, які були в подальшому використанні для очищення високоспецифічних антитіл до білку HSP60.

Для отримання поліклональних IgG з донорської сироватки специфічних до білку HSP60 необхідним кроком було провести кон'югацію рекомбінантного білку HSP60 до носія NHS-активованої сефарози, після чого суміш сумарних імуноглобулінів класу G людини наносили на колонку з NHS-активованою сефарозою, попередньо кон'югованою з білком HSP60 (рисунок 3.2).



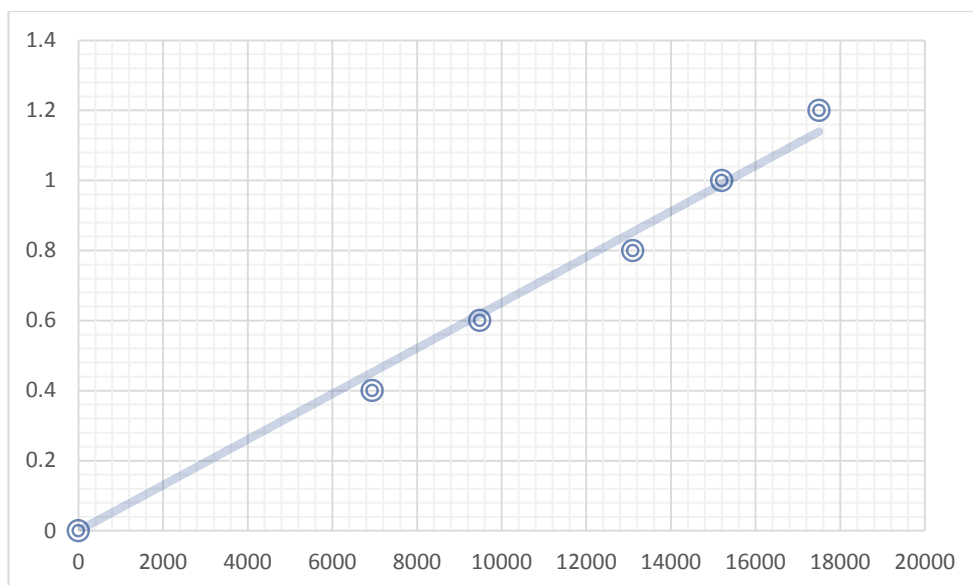
**Рисунок 3.2** Електрофореграма (7–22% ПААГ) порівняння концентрацій рекомбінантного білку HSP60 в реакційній суміші до зв'язування з носієм NHS-активованої сефарози (1) та після (2)

Для визначення найоптимальнішої концентрації специфічних поліклональних антитіл класу G людини їх перевірку провели електрофоретичним методом.



**Рисунок 3.3** Електрофореграма (7–22% ПААГ) Концентрація антитіл специфічних до білку HSP60. 1-3 – BSA (0,4γ/0,8γ/1γ); 4-5 – специфічні до HSP60 антитіла; 8-9 – BSA (1,2γ/0,6γ)

Алгоритм обчислення концентрації антитіл проводили за допомогою аналітичної програми Image Studio Lite. Як стандарт для визначення невідомої кількості імуноглобулінів класу G людини задля створення калібрувальної кривої використовували бичачий сироватковий альбумін.



**Графік 3.1** Калібрувальна крива з визначеними концентраціями стандартизованого білку (BSA)

Для проведення твердофазного імуноферментного аналізу, в якості антигену використовували білок HSP60, а в якості первинних антитіл – отримані специфічні антитіла до HSP60.

Було підготовлено 3 зразки первинних антитіл та 2 зразки для контролю:

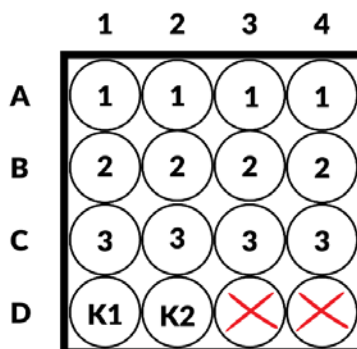
Зразок №1. Специфічні антитіла проти білку HSP60 (50 нг/лунка)

Зразок №2. Специфічні антитіла проти білку HSP60 (150 нг/лунка)

Зразок №3. Специфічні антитіла проти білку HSP60 (250 нг/лунка)

Контроль 1. Негативний контроль для перевірки взаємодії з кон'югантом

Контроль 2. Позитивний контроль для перевірки роботи системи

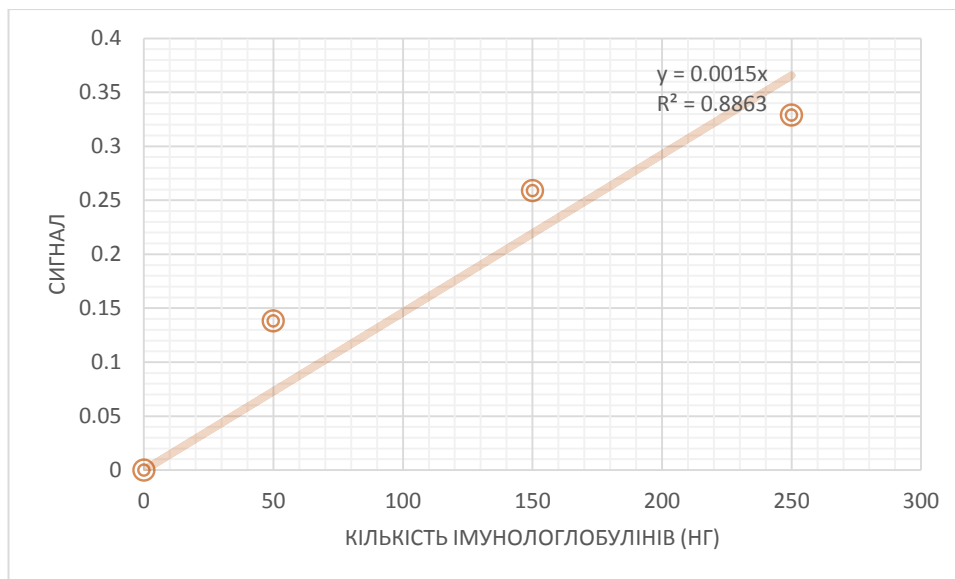


**Рисунок 3.4** Схема нанесення зразків на планшет для ІФА

За допомогою постановки непрямого твердофазного імуноферментного аналізу були визначені рівні сигналу до білку HSP60. Сигнал був детектований за допомогою мікропланшетного зчитувача ChroMate ELISA Reader при довжині хвилі 405 нм. Як хромогенний субстрат для пероксидази хрому використовували ABTS. Час експозиції 20 хв.

**Таблиця 3.1** Результати експозиції зразків антитіл

<b>20 хвилин</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
A	0,149	0,135	0,132	0,136
B	0,281	0,275	0,229	0,249
C	0,352	0,339	0,307	0,320
D	0,258	0,258	–	–



**Графік 3.2** Залежність сигналу ІФА від кількості імуноглобулінів. Час експозиції 20 хв

Проаналізувавши отримані сигнали, можна зробити висновок, що зі збільшенням концентрації специфічних до HSP60 антитіл відбувається зростання сигналу, що підтверджує активність отриманих антитіл. Вони є високоспецифічними, зберігають свої властивості та за таких умов можуть бути використані як калібрувальні антитіла в якості стандарту в імуноферментній тест-системі для дослідження антитіл проти еукаріотичного білку HSP60.

Ці факти можуть бути підставою для використання білку HSP60 як антигену при дослідженні вмісту анти-HSP60 антитіл в сироватках крові людини за різних патологічних станів. Доцільним є використання таких антитіл проти ендogenous HSP60 у сироватці крові людини при дослідженні та діагностиці різних запальних процесів в організмі людини, аутоімунних, серцево-судинних захворювань, проблем невиношуваності плоду в період вагітності, канцерогенезу тощо.

Після чого було обстежено 170 пацієнток, серед них 20 клінічно здорових вагітних (контрольна група) та 150 вагітних з ускладненим

анамнезом (основна група). Рівень імуноглобулінів класу G проти білку HSP60 у сироватці визначали за допомогою імуноферментного аналізу.

Як негативний контроль використовували низькорективну сироватку клінічно здорових жінок-донорів. Як кількісний контроль рівня антитіл проти білку HSP60 використовували специфічні до HSP60 людини антитіла, отримані із сумарних сироваток донорської крові з визначеною за допомогою електрофорезу достовірною концентрацією таких антитіл.

Методом ІФА анти-HSP60-позитивну сироватку було виявлено у 7,7% вагітних контрольної групи та 14,0% вагітних з ускладненим анамнезом. Частота виявлення патологій у вагітних, сироватка яких була анти-HSP60-позитивною, порівняно з вагітними, сироватка яких була анти-HSP60-негативною, представлена в Таблиці 1.

**Таблиця 3.2** Частота виявлення патологій у вагітних, сироватка яких була анти-HSP60-позитивною, порівняно з вагітними, сироватка яких була анти-HSP60-негативною.

Показник	Вагітні з високими рівнями анти-Hsp60-аутоантитіл у сироватці (%)	Вагітні з низькими рівнями анти-Hsp60-аутоантитіл у сироватці (%)
Мимовільні викидні, завмерла вагітність	31,8	21,7
Тонзилектомія	14,3	2,3
Апендоктомія	23,8	13,28

Таблиця 3.2 Продовження

Запальні захворювання органів малого тазу	66,67	53,9
Перенесені запальні захворювання травного тракту	33,3	25,78
Перенесені запальні захворювання сечостатевої системи	19	17,97
Хвороби щитоподібної залози	12,5	4,46
Варикозне розширення вен	4,76	3,12

Як висновок до таблиці 3.2., частота виявлення патологій у вагітних, сироватка яких була анти-HSP60-позитивною, вища порівняно з вагітними, сироватка яких була анти-HSP60-негативною.

Для оцінки чутливості та специфічності запропонованої тест-системи було проведено дослідження діагностичних характеристик, яке включало визначення рівня антитіл проти антигену HSP60 людини в біологічному матеріалі сироваток досліджуваної крові. Це дослідження було здійснено шляхом повторної перевірки ідентичних сироваток пацієнтів з ендометріозом в анамнезі, використовуючи антиген, який був отриманий за допомогою очищення вищезазначеного шапероніну з різних партій продуцентів (проводили очищення антигену з різних партій продуцента).

Як калібрувальний стандарт використовували специфічні до білку HSP60 антитіла, отримані із сумарних сироваток донорської крові з

визначеною за допомогою електрофорезу достовірною концентрацією таких антитіл.

У пацієнтів проводили забір крові, отримували відповідно стандартного протоколу сироватку та стабілізували її за допомогою 50% розчину гліцерину. Зразки для дослідження зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$  та перевіряли ідентичність сигналу при взаємодії з антигеном, який отримували з різних партій продуцента.

Результати тест-системи для сигналу визначеної кількості специфічних антитіл проти HSP60 з антигеном очищеним з різних партій продуцента наведено у Таблиці 3.3. Час експозиції 10 хв.

**Таблиця 3.3** Середні значення оптичних сигналів ІФА білку HSP60 проти 100 нг специфічних антитіл. Розміри усіх вибірок однакові (n=10)

Номер ІФА\Номер партії	Значення оптичного сигналу ІФА		
	1	2	3
1	0,079	0,084	0,074
2	0,07	0,081	0,08
3	0,082	0,075	0,083
4	0,072	0,072	0,078
5	0,078	0,078	0,076
6	0,077	0,08	0,081
7	0,073	0,076	0,073
8	0,075	0,082	0,082
9	0,071	0,075	0,077
10	0,075	0,079	0,075
<b>Середнє значення</b>	<b>0,0752</b>	<b>0,0782</b>	<b>0,0779</b>

Отже, використання тест-системи дозволяє стабільно аналізувати рівень антитіл до білку HSP60 і може бути клінічно залученим як основний елемент для скринінгових тестів під час вагітності.

## ВИСНОВКИ

У результаті дослідження були отримані:

1. Високоочищений білок HSP60.
2. Сумарний препарат IgG з донорської сироватки крові людини.
3. Високоспецифічні антитіла класу G до досліджуваного білку.

Проведений аналіз отриманих антитіл методом ІФА та визначення рівня аутоантитіл класу IgG до антигену HSP60 людини у сироватках крові вагітних жінок з ускладненим анамнезом дає підстави вважати, що використання тест-системи дозволяє стабільно аналізувати рівень антитіл до білку HSP60 і може бути клінічно залученим як основний елемент для скринінгових тестів під час вагітності.

Використання тест-системи дозволяє досліджувати значну кількість зразків одночасно, що принципово важливо для виявлення певних аутоімунних патологій, моніторингу протікання запальних процесів в організмі, прогнозування ефективності лікування певних патологій (проблеми безпліддя, серцево-судинні захворювання тощо).

Виявлення підвищених титрів антитіл проти антигену HSP60 в досліджуваному матеріалі можуть бути прогностичним індикатором несприятливого стану організму, наявності хронічних захворювань, аутоімунних процесів, ознакою наявності серцево-судинних захворювань, фактором ризику атеросклерозу, маркером канцерогенезу, індикатором формування порушень репродуктивної функції (трубна безплідність, невиношування вагітності) тощо.

Тест-система може з високим ступенем ймовірності ідентифікувати пацієнтів з вищезазначеними патологіями, а отже, може стати важливим інструментом в стратегії масового тестування, прогнозування ефективності лікування задля запобігання розвитку патологічних для організму людини станів та ускладнень. Формула такої тест-системи

проста і дешевша у використанні, ніж дороговартісні методи діагностики при лікуванні безпліддя, такі як, лапароскопія, гістеросальпінографія.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Cappello, F.; Gammazza, A.; Piccionello, A., et al. Hsp60 Chaperonopathies and Chaperonotherapy: Targets and Agents. *Expert Opin. Ther. Targets* 2014, 18 (2), 185–208.
2. Poletaev, A. B. *Immunofiziologiya i Immunopatologiya*; MIA: Moscow, 2008; 208 p. (In Russ.).
3. Poletaev, A. B.; Morozov, S. G. Changes of Maternal Serum Natural Antibodies of IgG Class to Proteins MBP, S100, ACBP14/18 and MP65 and Embryonic Misdevelopments in Humans. *Hum. Antibody* 2000, 9, 216–222.
4. Matsuda, M.; Sasaki, A.; Shimizu, K., et al. Increased Anti-HSP60 and Anti-HSP70 Antibodies in Women with Unexplained Recurrent Pregnancy Loss. *Acta Med. Okayama* 2017, 71 (3), 201–208.
5. Замай, А.С., Замай, Т.Н., Березовский, М.В. (2012). Диагностическая тест-система на основе аптамеров [Patent]. Patent No. 2011146565/10.
6. Engvall, E. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Elisa. *J. Immunol.* 1972, 109 (1), 129–135.
7. Crowther, J. R. *ELISA: Theory and Practice*; Humana Press: Totowa, N.J., 1995; Vol. 42, pp 1–218.
8. Hnasko, R. (Ed.). (2015). *ELISA - Methods and Protocols*. Humana Press. ISBN: 978-1-4939-2742-5.
9. R&D Systems. What is an ELISA? 2020. Retrieved from <https://www.rndsystems.com/resources/articles/what-is-an-elisa>
10. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Biochemistry*, 8th ed.; W. H. Freeman: New York, 2015; p 83.

11. Charbonnet, D. Apparatus and Method for Single-Step Immunosorbent Assay for Single and Multiple Analytes. U.S. Patent 7,767,404, August 3, 2010.
12. Charbonnet, D.; Evans, N. S. Systems and Methods for Immunosorbent Assays for Single and Multiple Analytes. U.S. Patent 8,735,142, May 27, 2014.
13. Mahmoudi Gomari, M.; Saraygord-Afshari, N.; Farsimadan, M., et al. Opportunities and Challenges of the Tag-Assisted Protein Purification Techniques: Applications in the Pharmaceutical Industry. *Biotechnol. Adv.* 2020, 45, 107653.
14. Schmidt, S.D.; Mazzella, M.J.; Nixon, R.A.; Mathews, P.M.  $A_{450}$  measurement by enzyme-linked immunosorbent assay. *Methods Mol. Biol.* 2012, 849, 507-527.
15. Nabieva, F.S.; Dushanova, G.A.; Bobokulov, O.O. Significance of enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of infectious diseases. *Vestnik Nauki i Obrazovaniya*, 2021.
16. Antsilevich, L.M.; Yagudina, L.A. Practical application of enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of diseases. *Prakticheskaya Meditsina*, 2014.
17. Matveeva, L.V. Features of changes in tumor markers in stomach cancer. *Meditinskiy Al'manakh*, 2012.
18. Diaproph. Immunoferment analysis. Available online: [https://diaproph.com.ua/pdf/metodichky/rus/1\\_rus\\_immunoferment\\_analiz.pdf](https://diaproph.com.ua/pdf/metodichky/rus/1_rus_immunoferment_analiz.pdf) (accessed on Apr 4, 2023).
19. Arutyunov, A.O. Enzyme-linked immunosorbent assay: diagnosis in the «cito!» conditions. *Bulleten' Meditsinskikh Internet-Konferentsiy*, 2015. Available online: <https://cyberleninka.ru/article/n/immunofermentnyy-analiz-diaagnostika-v-usloviyah-cito> (accessed on Apr 4, 2023).

20. King, A.M.; MacRae, T.H. Insect heat shock proteins during stress and diapause. *Annu. Rev. Entomol.* 2015, 60, 59–75.
21. Ozyurek, E.S.; Ozkaya, E.; Ikiz, S.; Uyar, Y.; Atabekoglu, C.S.; Aydin, H.H. Seropositivity for the human heat shock protein (Hsp)60 accompanying seropositivity for *Chlamydia trachomatis* is less prevalent among tubal ectopic pregnancy cases than individuals with normal reproductive history. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2018, 223, 119–122.
22. Mogk, A.; Ruger-Herreros, C.; Bukau, B. Cellular Functions and Mechanisms of Action of Small Heat Shock Proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 2019, 73, 89-110.
23. Dangi, S. S.; Gupta, M.; Maurya, V. P.; Kumar, P.; Sarkar, M.; Bag, S.; Bag, S. K.; Singh, G. Expression of HSPs: An Adaptive Mechanism during Long-Term Heat Stress in Goats (*Capra hircus*). *Int. J. Biometeorol.* 2015, 59, 1095–1106.
24. Pockley, A. G.; Henderson, B. Extracellular Cell Stress (Heat Shock) Proteins-Immune Responses and Disease: An Overview.
25. Calabrese, V.; Ravagna, A.; Colombrita, C.; Scapagnini, G.; Guagliano, E.; Calvani, M.; Butterfield, D. A.; Stella, A. M. G. In Vivo Induction of Heat Shock Proteins in the Substantia Nigra Following L-DOPA Administration Is Associated with Increased Activity of Mitochondrial Complex I and Nitrosative Stress in Rats: Regulation by Glutathione Redox State. *J. Neurochem.* 2007, 101, 709–717.
26. Shi, J.; Fu, M.; Zhao, C.; Zhou, F.; Yang, Q.; Qiu, L. Characterization and Function Analysis of Hsp60 and Hsp10 under Different Acute Stresses in Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*. *Cell Stress Chaperones* 2016, 21, 295–312.
27. Spencer, T.; Yahaya, U.; Mohammed, K.; Argbonlahor, D.; Okwori, A.; Garba, M.; Nwobodo, E. Chlamydiasis and Human Heat Shock

Protein 60-kDa Expression among Women with Miscarriages in Sokoto Metropolis, Northwestern Nigeria. *Microbiol. Res. J. Int.* 2017, 18 (4), 1–12.

28. Elias, D.; Cohen, I. R. Treatment of Autoimmune Diabetes and Insulinitis in NOD Mice with Heat Shock Protein 60. *Diabetes* 1995, 44, 1132–1138.

29. Quintana, F. J.; Farez, M. F.; Viglietta, V.; Iglesias, A. H.; Merbl, Y.; Izquierdo, G.; Lucas, M.; Basso, A. S.; Khoury, S. J.; Lucchinetti, C. F.; Cohen, I. R. Antigen Microarrays Identify Unique Serum Autoantibody Signatures in Clinical and Pathologic Subtypes of Multiple Sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 18889–18894.

30. Dieude, M.; Senécal, J. L.; Raymond, Y. Induction of endothelial cell apoptosis by heatshock protein 60-reactive antibodies from anti-endothelial cell autoantibodypositive systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum.* [Online] 2004, 50, 3221–3231 (accessed May 10, 2022).

31. Xu, Q.; Willeit, J.; Marosi, M.; Kleindienst, R.; Oberhollenzer, F.; Kiechl, S.; Stulnig, T.; Luef, G.; Wick, G. (1993). Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet.* [Online] 1993, 341, 255–259 (accessed May 18, 2022).

32. Stevens, T. R.; Winrow, V. R.; Blake, D. R.; Rampton, D. S. Circulating antibodies to heat-shock protein 60 in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clin. Exp. Immunol.* [Online] 1992, 90, 271–274 (accessed May 10, 2022).

33. Bayramgurler, D.; Ozkara, S. K.; Apaydin, R.; Ercin, C.; Bilen, N. (2004). Heat shock proteins 60 and 70 expression of cutaneous lichen planus: comparison with normal skin and psoriasis vulgaris. *J. Cutan. Pathol.* [Online] 2004, 31, 586–594 (accessed May 10, 2022).

34. Macario A. J. L. Sick chaperones, cellular stress, and disease. Alberto J L Macario 1, Everly Conway de Macario. *N Engl J Med.* [Online] 2005 6, 353(14),1489–1501 (accessed May 02, 2022).

35. Eggert B, APK, Kruse W, Batschulat K, Demirakca T, Strowitzki T. Male immunity to the chlamydial 60 k D a heat shock protein (HSP 60) - associated with semen quality? *Andrologia*. 2015;47(1):66-76
36. Wu T, Tanguay RM. Antibodies against heat shock proteins in environmental stresses and diseases: friend or foe? *Cell stress & chaperones*. 2006;11(1):1.
37. Tabibzadeh S, Kong Q, Satyaswaroop P, Babaknia A. Heat shock proteins in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod*. 1996;11(3):633–40.
38. Hafner LM. Pathogenesis of fallopian tube damage caused by *Chlamydia trachomatis* infections. *Contraception*. 2015;92(2):108–15.
39. Ranford JC, Coates AR, Henderson B. Chaperonins are cell-signalling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones. *Expert Rev Mol Med*. 2000;2(8):1–17.
40. Hansen JJ, Bross P, Westergaard M, Nielsen M, Eiberg H, Børgerlum AD, et al. Genomic structure of the human mitochondrial chaperonin genes: HSP60 and HSP10 are localised head to head on chromosome 2 separated by a bidirectional promoter. *Hum Genet*. 2003;112(1):71–7.
41. Levy-Rimler G, Bell RE, Ben-Tal N, Azem A. Type I chaperonins: not all are created equal. *FEBS Lett*. 2002;529(1):1–5.
42. Lianos GD, Alexiou GA, Mangano A, Mangano A, Rausei S, Boni L, et al. The role of heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett*. 2015;360(2):114–8.
43. Cappello F, Di Stefano A, David S, Rappa F, Anzalone R, La Rocca G, et al. Hsp60 and Hsp10 down-regulation predicts bronchial epithelial carcinogenesis in smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Cancer*. 2006;107(10):2417–24.

44. Urushibara M, Kageyama Y, Akashi T, Otsuka Y, Takizawa T, Koike M, et al. HSP60 may predict good pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in bladder cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2006;37(1):56–61.

45. Ozyurek ES, Karacan T, Ozdalgicoglu C, Yilmaz S, Isik S, San M, et al. Seropositivity for the human heat shock protein (Hsp)60 accompanying seropositivity for *Chlamydia trachomatis* is less prevalent among tubal ectopic pregnancy cases than individuals with normal reproductive history. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2018;223:119–22.

46. Ni-NTA Purification System For purification of polyhistidine-containing recombinant proteins. ThermoFisher Scientific. [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/ninta\\_system\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/ninta_system_man.pdf) (accessed May 18, 2022).

47. Coupling Protocol for Primary Amine of a Ligand. NHS-activated sepharose high performance, NHS-activated sepharose 4 fast flow. Merck. <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/technical-documents/protocol/protein-biology/protein-labeling-and-modification/coupling-through-the-primary-amine-of-a-ligand> (accessed May 18, 2022).