

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

к.б.н., доц. Нипорко Олексій Юрійович

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 2023 р.

**ІМУНОФЕРМЕНТНА ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ
ІМУНОГЛОБУЛІНІВ КЛАСУ G В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЛЮДИНИ ДО
АНТИГЕНІВ HSP60 ТА GROEL**

Випускна кваліфікаційна робота магістра

студента спеціальності

162 «Біотехнології та біоінженерія»

ОП «Високі технології(біотехнологія)»

Бортника Максима Івановича

Науковий керівник від кафедри

професор кафедри молекулярної

біотехнології та біоінформатики

д.б.н. **Солдаткін Олексій Петрович**

Робота виконана у лабораторії

медично-дослідницького центру «Медлайф Плюс»

Під керівництвом д.б.н. проф. **Погрібного Петра Васильовича**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

АНОТАЦІЯ

Бортник М.І. «Імуноферментна тест-система для визначення рівня імуноглобулінів класу G в сироватці крові людини до антигенів HSP60 та GroEL» . Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 162-Біотехнології та біоінженерія ОП «Високі технології(біотехнологія)».

У роботі проведено розрахунок рівнів антитіл класу G, до еукаріотичного білку HSP60 та прокаріотичного гомолога GroEL у сироватках крові. Створено референтну калібровку, порівняно стабільності партій рекомбінантних білків.

Описано схему та принцип роботи імуноферментної тест-системи. Додатково, отримана тест-система була використана у клінічних дослідженнях при лікуванні інфертильності жінок та відстеження маркерів стану прееклампсії.

Встановлено, що наявна відмінність між групами здорових та жінок з прееклампсією. Наявна динаміка зниження експресії антитіл на досліджувані білки у випадках лікування безпліддя у процесі імплантації ембріону, додатково створена математична модель прогнозування.

Отримані результати можуть бути використані для подальшого аналізу захворювань, які пов'язані з експресією антитіл до білків GroEL та HSP60, наприклад : запальними симптоми органів малого тазу, невиношування вагітності, аутоімунні захворюваннями.

Результати роботи є частиною корисних моделей №152536 та №152535.

Робота написана на 57 сторінках, включає 16 рисунків, 3 таблиці, 57 джерел літератури та 3 додатки.

Ключові слова: тест-система; HSP60; GroEL; імуноглобуліни, імуноферментний аналіз, шапероніни.

ABSTRACT

Bortnyk M.I. "Immunoenzyme test system for determining the level of immunoglobulins of class G in human blood serum to HSP60 and GroEL antigens". Master's final qualification work on the specialty 162-Biotechnology and bioengineering OP "High technologies (biotechnology)".

In the work, the levels of class G antibodies to the eukaryotic protein HSP60 and the prokaryotic homolog GroEL in blood sera were calculated. A reference calibration was created, the stability of batches of recombinant proteins was compared.

The scheme and principle of operation of the immunoenzymatic test system are described. In addition, the resulting test system was used in clinical studies in the treatment of female infertility and tracking markers of preeclampsia.

It was established that there is a difference between the groups of healthy women and women with preeclampsia. There are dynamics of reduction in the expression of antibodies to the investigated proteins in cases of infertility treatment in the process of embryo implantation, a mathematical forecasting model was additionally created.

The obtained results can be used for further analysis of diseases that are associated with the expression of antibodies to GroEL and HSP60 proteins, for example: inflammatory symptoms of the pelvic organs, miscarriage, autoimmune diseases.

The results of the work are part of utility model No. 152536 and No. 152535.

The thesis is written on 57 pages, includes 16 figures, 3 tables, 57 literature sources and 3 appendices.

Keywords: test system; HSP60; GroEL; immunoglobulins, enzyme immunoassay, chaperonins.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	9
1.1 Тест-системи імуноферментні та їх використання у діагностиці.....	9
1.2 Структура та функції білку HSP60.....	10
1.3 Структура та функції білку GroEL.....	14
1.4 Шапероніни як перспективні цілі діагностики	18
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	20
2.1.Матеріали та реактиви	20
2.1.1 Плазмідні вектори.....	20
2.1.2 Реактиви	21
2.1.3 Обладнання	23
2.1.4 Програмне забезпечення.....	23
2.2 Методи досліджень	23
2.2.1 Робота з культурами клітин	23
2.2.2 Очистка рекомбінантних білків	25
2.2.3 Рефолдинг HSP60	26
2.2.4 Електрофорез у градієнтному ПААГ	26
2.2.5 Забір крові	27

2.2.6 Отримання специфічних імуноглобулінів класу G.....	28
2.2.7 Аналіз отриманих білків та антитіл методом імуноферментного аналізу.....	28
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	31
3.1. Аналіз чистоти та концентрації отриманих білків за допомогою електрофорезу у ПААГ.....	31
3.2 Створення референтної калібровки.....	33
3.3 Перевірка різних партій досліджуваних білків.....	34
3.4 Розрахунок показників детекції.....	38
3.5. Використання імуноферментної тест системи в клінічних дослідженнях.....	38
ВИСНОВКИ.....	43
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	44
ДОДАТОК 1.....	49
ДОДАТОК 2.....	50
ДОДАТОК 3.....	53

Перелік умовних позначень

HSP – heat shock proteins – білки теплового шоку

ІФА – 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

PMSF – phenylmethanesulfonyl fluoride – фенілметилсульфонілфторид

IPTG – isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside – ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозид

ПААГ – поліакриламідний гель

ABTS A1888-5G – АБТС, 2,2'-азинобіс-3-етилбензтіазолін-6-сульфонова кислота

Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid) - нікель-нітрилотриоцтова кислота

Вступ

Білки HSP60 та GroEL є важливими, як для багатьох процесів у нашому організмі так і для діагностики захворювань, які пов'язані з надмірною експресією антитіл до відповідних протеїнів.

Встановлено, що антитіла до хламідійного Hsp60 чи бактеріального GroEL можуть перехресно реагувати з гомологічними епітопами Hsp60 людини, за рахунок гомології [1].

Ефективним засобом вивчення білкових молекул та їх концентрації у зразках є імуноферментний аналіз, який вимагає використання специфічних антитіл до досліджуваного антигену. Проведення таких аналізів дозволяє швидко та точно встановити наявність конкретного протеїну у біологічних рідинах, що сприяє виявленню різних захворювань на будь-якій стадії або здійсненню контролю за лікуванням пацієнта.

Метою даної роботи є створення тест-системи на дані білки, що спростить аналіз у майбутньому та дозволить використовувати його у моніторингу лікувань чи створенні математичних моделей.

Крім того, тест-система має включати в себе високоочищені поліклональні антитіла, отримані із сумарних сироваток донорської крові людини, високоспецифічних до антигену GroEL, що можуть бути використані в тест-системі для кількісного визначення досліджуваних анти-GroEL антитіл, аналогічно і до HSP60.

Дана тест-система була розроблена у ході виконання магістерської дипломної роботи.

У роботі були поставлені наступні завдання:

- 1) Отримання та очистка рекомбінантних протеїнів GroEL та HSP60.
- 2) Створення референтної калібровки
- 3) Отримати стабільні та повторювані результати з різних партій отриманих протеїнів
- 4) Описати принцип роботи тест-системи
- 5) Перевірити отриману тест-систему у клінічних дослідженнях
- 6) Оцінити перспективу застосування тест-системи у майбутніх клінічних та наукових дослідженнях

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Тест-системи імуноферментні та їх використання у діагностиці

Імуноферментні тести, відомі також як ензимно-іммунні тести (ELISA), є широко використовуваним методом діагностики в біологічних та медичних дослідженнях. Ці тести базуються на використанні антитіл та антигенів, які можуть розпізнавати специфічні біологічні молекули, такі як білки, бактерії, віруси та інші [2,3]. Основні типи включають прямий та зворотний(непрямий) імуноферментний аналіз (ELISA), радіоіммунний аналіз (RIA)[2,3,4].

Принцип дії імуноферментних тестів полягає у взаємодії антитіл та антигенів за допомогою ферментного каталізу.

У реакції використовуються два типи антитіл: антитіла, що визначають антиген, та антитіла, що містять ензимний мітки, який виявляється у результаті реакції.

Процес реакції складається з кількох етапів:

1. Фіксація антигену на поверхні твердої фази (пластинки, стріпсу тощо).
2. Додавання зразка, що містить антитіла, що визначають антиген. Якщо антитіло розпізнає антиген, воно зв'язується з ним.
3. Додавання до реакційної суміші антитіла, які містять ензимну мітку. Ці антитіла розпізнають ті ж антигени, що й перше антитіло.
4. Додавання субстрату, який може бути каталізований ензимом.
5. Визначення ступеня конверсії субстрату за допомогою спектрофотометра або флуориметра.

Існують різні види ІФА, в залежності від порядку додавання компонентів, основна ідея залишається незмінною та полягає в тому, що іммунні реакції

взаємодії антигенів з антитілами можуть бути використані для діагностики різних захворювань.

Продовжуючи, слід зазначити, що імуноферментні тести мають свої переваги та обмеження. До переваг можна віднести їх високу чутливість, специфічність та швидкість виконання. Також, вони можуть бути використані для визначення рівня окремих компонентів в сироватці крові, що дозволяє здійснювати ранню діагностику та моніторинг за станом пацієнта.

Однак, обмеженням використання імуноферментних тестів є можливість отримання хибно-позитивних та хибно-негативних результатів, зокрема у випадках, коли тест визначає не сам антиген, а його аналог або відсутність відповідного антитіла. Також, використання імуноферментних тестів може бути обмежене випадками, коли рівень аналізованих компонентів у крові є надто низьким або надто високим, що може призвести до неправильних результатів.

Загалом, створення тест системи є ефективними як при детекції рівнів IgG антитіл на екзогенні білки так і на ауто-антитіла проти протеїнів, що нативні для досліджуваного організму[5,6].

1.2 Структура та функції білку HSP60

Hsp60, також відомий як HSPD1 або Crp60 у людей, є представником шаперонів I групи і виступає в ролі молекулярного шаперона. Основною функцією Hsp60 є підтримка гомеостазу білка в мітохондріях, де він є мітохондріальним резидентом. HSP60 - білок масою 60 кДа, який зазвичай зібраний в олігомерну структуру з подвійним кільцем. Разом із кошапероном та АТФ він утворює макромолекулярний комплекс. Цей комплекс діє як справжня машини згортання, який розпізнає і взаємодіє з гідрофобними ділянками, відкритими, частково розгорнутими або

неправильно згорнутими білками, і використовують енергію, що підживлюється гідролізом АТФ, для стабілізації згорнутих конформацій [7].

Окрім своєї ролі у фолдингу протеїнів, HSP60 відіграють роль у внутрішньоклітинному обміні білків та пептидо-гормональному сигналінгу [8]. Більше того, цитозольна, а також мітохондріальна ізоформи Hsp60 відіграють важливу роль у активації апоптотичного каскаду та пролонгуючих життя процесах клітини [9].

Поza внутрішньоклітинного розташування, HSP60 також з'являються на клітинній поверхні здорових та злоякісних клітин, що впливає на його функції відповідно до контексту та взаємодіючих факторів у цих місцях. [10]. Однак цей шаперонін також виконує різноманітні інші ролі, включаючи патогенну участь у спадкових і набутих шаперонопатіях.

Шаперонопатії є групою рідкісних захворювань, пов'язаних з дефектами або мутаціями в генах, що кодують шаперони або інші компоненти шаперонних комплексів. У деяких випадках зміни в гені HSPD1, що кодує Hsp60, можуть призводити до розвитку шаперонопатій. Ці захворювання можуть бути спадковими або набутих характером і супроводжуються порушенням функціонування Hsp60. Наприклад, деякі мутації в гені HSPD1 можуть спричиняти зниження активності Hsp60 або зміну його структури, що впливає на правильне складання білків в мітохондріях. Це може призводити до накопичення неправильно зібраних білків, порушення мітохондріальної функції і розвитку шаперонопатій [11,12].

З цих причин в останні роки інтерес до Hsp60 безперервно зростає з різних причин. По-перше, Hsp60 виявляється перспективним об'єктом для розробки нових діагностичних методів. Оскільки Hsp60 відіграє різні ролі в розвитку різноманітних захворювань, його рівень в організмі може служити як потенційний біомаркер для діагностики і моніторингу цих захворювань.

Вивчення взаємозв'язку між рівнем Hsp60 і патологічними процесами може допомогти в ранньому виявленні захворювань і встановленні їх стадії.

По-друге, Можливість модулювання активності Hsp60 або його взаємодії з іншими молекулами може привести до розробки нових лікарських засобів, спрямованих на управління патологічними процесами, пов'язаними з шаперонопатіями і іншими захворюваннями. Загалом, розуміння ролі Hsp60 у розвитку захворювань відкриває нові можливості для розробки ефективних діагностичних і терапевтичних підходів[13].

Так, інгібітори та модулятори Hsp60 зараз є об'єктом активних досліджень як потенційні протиракові засоби. Оскільки Hsp60 відіграє важливу роль у регуляції клітинного стресу, апоптозу, запалення та імунної відповіді, його дисфункція або надмірна активація можуть сприяти розвитку ракових захворювань.

Модулятори Hsp60 можуть бути використані для регулювання його активності або експресії з метою впливу на клітинні процеси, пов'язані з раком. Ці засоби можуть змінювати взаємодію Hsp60 з іншими молекулами, включаючи підтримуючі його функціонування або відновлюючі його нормальну регуляцію. Це може призвести до зниження ракової активності, зменшення запалення та покращення ефективності імунної відповіді проти ракових клітин [14]

На противагу прокаріотичному гомологу, який існує лише як тетрадекамер, людський Hsp60, зазвичай перебуває у формі гомоолігомер із семи субодиниць[15]. Раніше проведені *in vitro* дослідження вказують на те, що деякі рекомбінантні HSP60 ссавців переважно утворюють гептамерні кільця, при цьому спостерігається невелика кількість мономерів та двокільцевих тетрадекамерів [16].

Загальна будова комплексу зберігає відомий домен, який включає субодиниці шапероніну (рис. 1.1). В цій структурі субодиниця Hsp60

складається з апікального, проміжного та екваторіального доменів. Крім того, основний домен структури ко-шапероніну Hsp10 залишається незмінним і складається з семи частин.

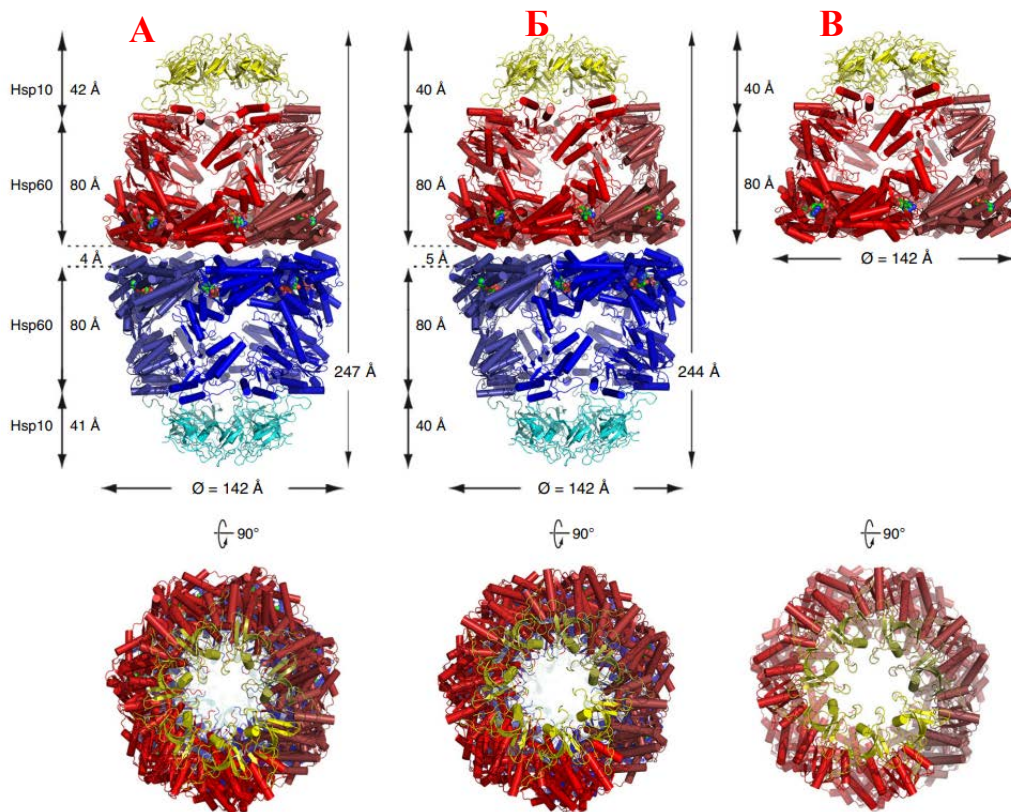


Рисунок 1.1. Структура комплексу mHsp60–mHsp10. (А)Зображення збірки «футбольний м'яч» ADP:BeF₃, пов'язаної mHsp60₁₄–(mHsp10₇)₂, отриманої з кристалічної структури з роздільною здатністю 3,7 Å, яка розглядається вниз по подвійній діаді, ортогональній молекулярній осі семи порядків. Нижче наведено вид зверху вниз по семикратній осі. Індивідуальні субодиниці

Олігомерні стани індивідуального Hsp60 (тетрадекамер) та молекули Hsp10 (гептамери) зберігаються (рис. 1.1). Примітно, що Hsp60 збирається у подвійно-кільцеву структуру, яка зв'язує дві молекули Hsp10, по одній на кожному кінці тетрадекамера, утворюючи симетричний комплекс шапероніну [Hsp60₁₄–(Hsp10₇)₂ комплекс], який називають «комплексом футбольного м'яча». Відомо, що цей конструктор виконує суттєву функцію в процесі згортання білків шапероніну [17,18].

mHsp60 забарвлені градуйованими відтінками відповідного кольору. Сфери зображують нуклеотид. (Б) Зображення пов'язаного з ADP mHsp60₁₄–(mHsp10₇)₂ збірного футболу, отриманого з кріо-ЕМ структури з роздільною здатністю 3,08 Å. (В) Зображення зв'язаного ADP mHsp60₇–mHsp10₇ напівфутбольного м'яча, отриманого з кріо-ЕМ структури з роздільною здатністю 3,83 Å. Розміри комплексів відповідно вказані з використанням симетричних атомів Са для визначення граничних площин[18].

1.3 Структура та функції білку HSP60

Структурно-функціональні дослідження, проведені на GroEL *E. coli*, демонструють, що він формує тетрадекамерну структуру, що складається з двох гептамерних кілець, які лежать одне на одному і створюють порожнину. Ця порожнина змінює свою характеристику з переважно гідрофобної на гідрофільну під час взаємодії з GroES. Згортання субстратного білка відбувається всередині цієї порожнини за допомогою ко-шапероніну GroES, який має форму кришки і складається з гептамерного комплексу[19,20,21]. Окремий мономер GroES має розмір та вагу у 10 кДа. Мономер GroEL розділений на три частини, а саме на апікальний, проміжний та екваторіальний домени [22].

Унікальний механізм, який використовується GroEL і GroES для згортання білка, вбудований у складну архітектуру подвійних кільцевих комплексів, утворюючи дві центральні камери, які зазнають конформаційних перебудов, що забезпечують згортання білка.

Верхній домен - забезпечує контакт з ненативними білками та кошапероном GroES, утворюють вхід у кільце порожнини. GroEL має верхівкову частину з достатньо великою кількістю гідрофобних ділянок(сайтів) зв'язування.

Екваторіальний домен – забезпечує більшість внутрішніх контактів у кільцевій структурі та з іншими частинами, а також має місце для зв'язування з АТФ та АДФ,

Проміжний домен – з'єднує екваторіальний та апікальний, а при взаємодії з лігандами забезпечує структурні зміни у шапероні GroEL.

Терміни GroEL і GroES спочатку застосовувалися виключно до двох білків, знайдених у *E. coli*, і були розширені, щоб включити гомологи з інших видів бактерій. Білок GroEL функціонує як типовий молекулярний шаперон, оскільки він зв'язує та згортає білки, тоді як GroES не виконує автономної ролі шаперона, але модулює активність GroEL і називається ко-шапероном.

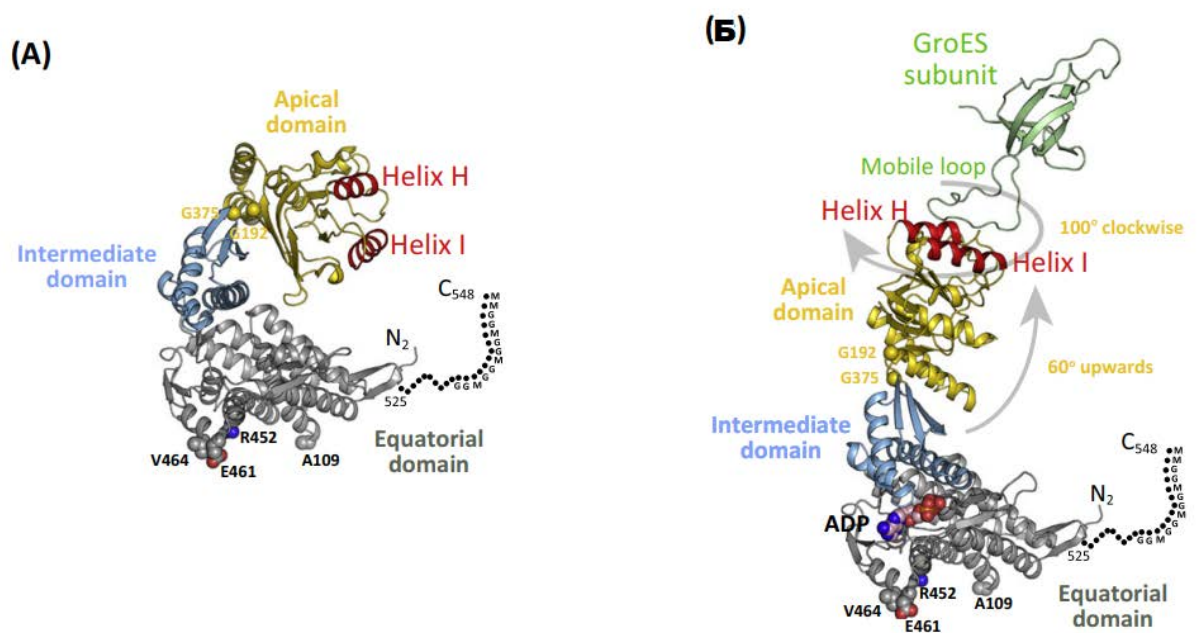


Рисунок 1.2 (А) Структура субодиниці GroEL з *Escherichia coli* (код PDB 1SS8). (Б) Еквівалентні види GroES (зелений) у присутності ADP (код PDB 1PF9) [22].

Термін шаперонін застосовується до бактеріальних білків, які є гомологічними *E. coli* GroEL і також називаються Crp60, тоді як ко-шапероніни стосуються гомологів *E. coli* GroES, також відомих як Crp10. У той час як мітохондріальні гомологи називаються Hsp60 і Hsp10, археальні шапероніни називаються термосомами.

Взаємодії GroEL із SP, нуклеотидом і GroES, які лежать в основі згортання білка за допомогою шапероніну, були широко досліджені, але деякі аспекти механізму ще не встановлені.

Система шапероніну GroEL/ES широко вивчалася як парадигма макромолекулярної машини протягом більше 25 років. Існує майже загальна згода, що найважливішою властивістю шапероніну є створення компартменту, в якому одна молекула білка тимчасово укладена та може згортатися ізольовано, таким чином уникаючи аномальних взаємодій, які інакше призвели б до агрегації.

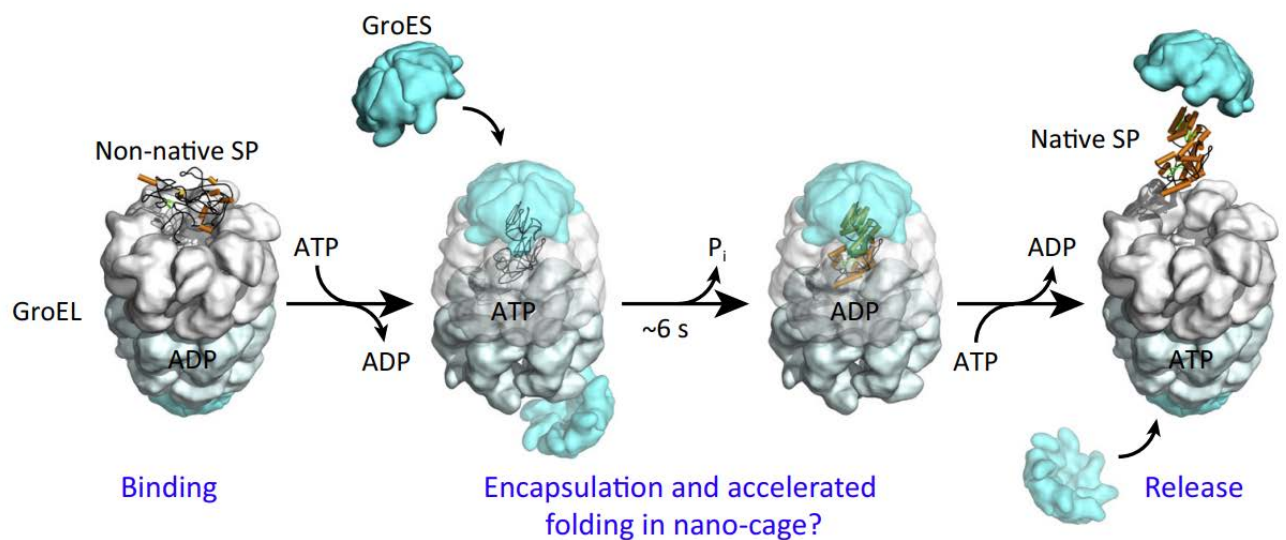


Рисунок 1.3. Субстратний білок (SP) зв'язується з відкритим кільцем GroEL. Зв'язування АТФ і GroES викликає конформаційні зміни, які призводять до вивільнення SP у клітковий відсік для згортання, яке відбувається в ізоляції. Протягом часу, необхідного для гідролізу АТФ, інкапсульований білок може спробувати згорнутися до нативного стану. Нарешті, зв'язування АТФ і GroES з протилежним кільцем відкриває клітку і дозволяє вивільнити SP. Ступінь, до якої наноклітка шаперонін активно сприяє процесу згортання, є предметом поточного дослідження. Структурна модель базується на коді PDB 1AON[22].

Система шапероніну GroEL/ES широко вивчалася як парадигма макромолекулярної машини протягом більше 25 років. Існує майже загальна згода, що найважливішою властивістю шапероніну є створення компартменту, в якому одна молекула білка тимчасово укладена та може згортатися ізольовано, таким чином уникаючи аномальних взаємодій, які інакше призвели б до агрегації. Чи діє цей відсік виключно як пасивна клітка для згортання чи активно сприяє процесу згортання для деяких білків – це питання, на якого на разі немає відповіді. Хоча є достатньо доказів того, що система GroEL/ES може прискорити швидкість згортання білка, основні механізми ще недостатньо вивчені.

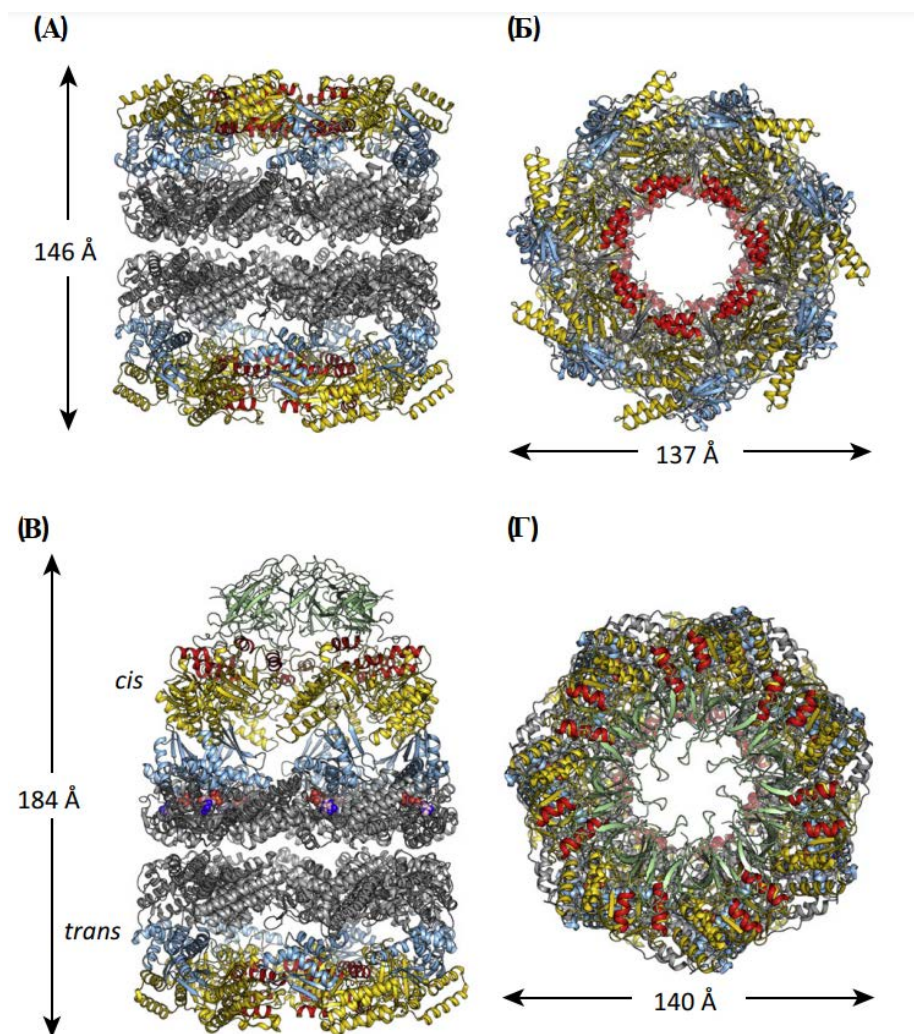


Рисунок 1.4. Кристалічні структури GroEL та комплексу GroEL–GroES. (A) Вид збоку тетрадекамери GroEL, на якому показано два гептамерних кільця, які розташовані один на одному (код PDB 1SS8) (Б) Вид зверху

циліндра GroEL, спіралі апікальних доменів GroEL напрямлені всередину. (В,Г) Еквівалентні види GroEL у комплексі з кофактором GroES (зелений) у присутності АТФ (код PDB 1PF9). Зв'язаний нуклеотид показаний у режимі заповнення простору. У цис-кільці спіралі апікальних доменів GroEL більше не піддаються впливу центральної порожнини і контактують з рухомими петлями GroES [22].

Зв'язування GroEL з АТФ і GroES викликає значні конформаційні зміни: об'єм внутрішньої порожнини збільшується приблизно вдвічі, розташування гідрофобних залишків в апікальному домені змінюється, внутрішня поверхня порожнини стає гідрофільною, що сприяє утворенню структури, відомої як "Клітка Анфінсена" [23,24].

Кожен мономер має розмір ~ 60 кДа. GroEL/GroES комплекс відповідальний за фолдинг до 25% усіх бактеріальних протеїнів та є потрібним для збірки вірусів бактерій T4 та T5. Як і еукаріотичний гомолог GroEL переважно рефолдує білки масою до 60 кДа, які можуть поміститися у порожнині комплексу. Фолдинг є АТФ-залежним, може бути прямим або опосередкованим та відбувається циклічно. Якщо одного циклу недостатньо для остаточного згортання білкової мішені, він повторюється, у тому самому комплексі чи в іншому.

1.4 Шапероніни як перспективні цілі діагностики

Окрім шаперенопатій, які напряму зв'язані з функціями білків шаперонів, HSP60 та GroE1 мають зв'язок і з іншими хворобами. А за рахунок їх гомології та кросс-реактивності і можливості до «protein moonlighting» (здатність протеїну виконувати непрямую функцію). Нові дослідження демонструють, що пріонні білки теж можуть зв'язуватись з HSP60 [25].

Серед широкого спектру хвороб варто виділити ті, де механізм впливу шаперонінів детально описаний, а самі протеїни потрапляють в кров під час

процесу. Яскравим прикладом є кардіоміопатії: де порушення згортання білків шаперонами у мітохондріях може призвести до апоптозу, який в свою чергу вивільнить HSP60 у кров, така позаклітинна локалізація дозволяє білку теплового шоку зв'язуватися з Toll-подібними рецепторами і індукувати фактор пухлинного некрозу(TNF α)[26] . У випадку ракових захворювань, підвищення як внутрішньоклітинних HSP так і позаклітинних свідчило про активний ріст раку та збільшення його резистивності до методів лікування, це характерно для раку яєчників[27], шийки матки[28], легень[29], прямої кишки[30,31], молочної залози[32]. Також HSP60 розглядається як один аутоантигенів під час розвитку атеросклерозу [33]. Наявний зв'язок підвищена відповідних антитіл та порушеннями репродуктивних функцій у жінок[34].

Також ряд запальних процесів, пов'язаних з бактеріями *Helicobacter pylori*[35], *Haemophilus ducreyi* [36], *Chlamydia trachomatis*[37].

У зв'язку з широким спектром функцій, та фактором того, що HSP60 є аутоантигеном, а GroEL кросс-реагує з ним, то можливий є сенс використання їх не лише у детекції захворювання а і як маркер моніторингу успішності лікування, подібно до CA15-3 [38].

HSP60(HSPD1) у поєднанні з T7 промотором, pBR322 репліконом і закодованою резистентністю до антибіотику ампіциліну; штам бактерії *E. coli* - BL21 (DE3). Створена за допомогою Vector Builder (en.vectorbuilder.com)

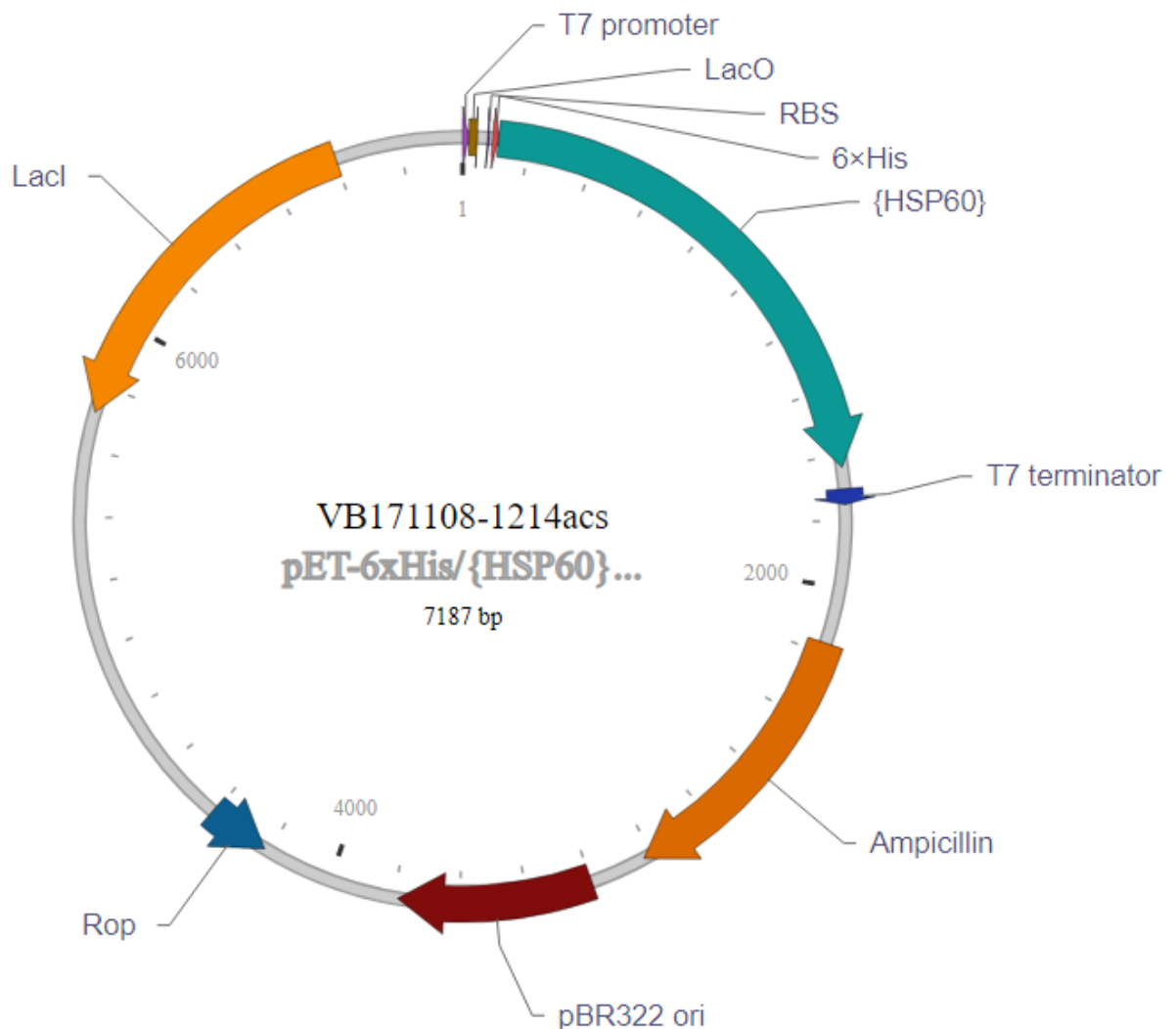


Рисунок 2.2. Структура плазмиди pET-6xHis/{HSP60}.

2.1.2 Реактиви та розчини

У ході виконання роботи було використано наступні реактиви: Trizma® base (Sigma-Aldrich, США), SDS (“Thermo Scientific”, США); акриламід (“Bio-Rad”, США); β-меркаптоетанол, гліцерин (“Merck”, Німеччина); TEMED (тетраметилетилендіамін), бромфеноловий синій, Кумасі

діамантовий блакитний G250;; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Cepham Life Sciences, США); NaCl (“Merck”, Німеччина); KH_2PO_4 , KCl, KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, США); Na_2HPO_4 (Cepham Life Sciences, США); ABTS (АБТС) A1888-5G (Sigma, Canada); Triton X-100 (“Merck”, Німеччина); 2-меркаптоетанол (Sigma-Aldrich, США); карбамід(Urea) (“Merck”, Німеччина); NiCl_2 ; EDTA(Sigma, Canada); PSA; BSA (Sigma, Canada); аргінін; Tween-20 (Sigma-Aldrich, США); PMSF; ампіцилін(Amp); хлорамфенікол; екстракт дріжджів; пептон.

Смоли для хроматографії: TOYOPEARL HW-55 (Sigma-Aldrich, США), Ni-NTA (“Thermo Scientific”, США), Protein A/G Agarose Resin 4 Rapid Run (pH Scientific, Нова Зеландія), NHS-Activated Sepharose 4 Fast Flow (Cytiva, США)

Розчини:

Розчин LB на 1 л (10 г пептон, 5 г екстракт дріжджів, 10 г NaCl).

PBS (№1) (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM)

PBST (№2) (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, 0.1% Tween-20)

Lysis buffer (8 M карбамід, 10 mM Trizma pH 8.0, 10 mM NaH_2PO_4 , 20 mM 2-меркаптоетанол, 1 mM PMSF, 1% Triton-X100).

Буфер білкового зразка для PAGE (10% SDS, 500 mM ДТТ, 50% Гліцерин, 250 mM Trizma, бромфеноловий синій, pH 6.8).

Розчин з хромогенним субстратом (АБТС 5 мг; Na-цитрат 2,5 мл, pH 4,8; H_2O_2 5 мкл; вода дистильована 7,5 мл)

Рефолдинг буфер (0,5-0,75 M arginine, 50 mM Trizma 7.5, 150 mM NaCl, pH 7.5).

Ni-NTA Binding (6 M Urea, 500 mM NaCl, 100mM Trizma, pH 7,8)

Ni-NTA Wash (6 M Urea, 500 mM NaCl, 50mM NaH₂PO₄, pH 5,8)

Ni-NTA Elution (8 M Urea, 500 mM NaCl, 50mM NaH₂PO₄, pH 3,8)

Розчини для хроматографій з Protein A/G Agarose Resin 4 Rapid Run (pH Scientific, Нова Зеландія) та NHS-Activated Sepharose 4 Fast Flow (Cytiva, США) робились за стандартним протоколом.

2.1.3 Обладнання

Для виконання роботи було використано таке обладнання: пластикові пробірки ("Eppendorf", Німеччина), пластикові пробірки типу «флакони», мірний циліндр, електрофоретичний прилад Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell ("Bio Rad", США), центрифуги 5414-R ("Eppendorf"), Uvicord SII 2238 ("LKB Bromma", Austria), LKB bromma Recorder 2211 ("LKB", Austria), 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), лунки ПВХ (полівінілхлоридного) фірми Nunc (Данія).

2.1.4 Програмне забезпечення

Для аналізу візуальних та числових даних було використано наступне забезпечення: MS Excel, IBM SPSS Statistics 26, MedStat v5.2, Image Studio Lite, EZR v 1.54, та відповідні програми до обладнання LLG-uniSPEC 2, Chromate Microplate Reader.

2.2 МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.2.1 Робота з культурами клітин

- Отримання лізату з рекомбінантним **HSP60**

У 50 мл пробірку(фалкон) додавали 20 мл LB, 25 мкл ампіциліну(Amp, 1000x), 500мкл замороженої бактеріальної культури.

Інкубували протягом ночі, при 37 С, на шейкері 250-300 об/хв. Після, нічна культура переносилась у більший об'єм LB з додатковим додаванням ампіциліну(зі збереженням концентрації). Інкубували додатково до OD_{600} (оптична густина) \square 0.8. Відбиралась аліквота. До суспензії вносили індукуючий агент IPTG(1 М) з розрахунку 1 мкл IPTG на 1 мл суспензії. Інкубували ще 4-5 годин. Відбиралась аліквота.

Пост-індукційна суспензія розподілялась по 50 мл у фалкони та центрифугувалася 30 хв при 2555 g, +4 °С. Отриманий супернатант зливали, осад використовували далі або при необхідності заморожували при -20 °С.

Осад бактерій розчиняли у Lysis buffer, з розрахунку 5 мл на 50 мл суспензії у попередньому етапі. PMSF у Lysis buffer додавався перед використанням. Проводили обробку ультразвуком трьома сетами за формулою 3 рази по 5х30''; 75w% (на льоді). Центрифугували при 3000 g, 35 хв, +4 °С. Відбирали надосад, осад утилізували. Відбирали аліквоту.

- Отримання лізату з рекомбінантним **GroEL**

У 50 мл пробірку(фалкон) додавали 20 мл LB, 25 мкл хлорамфеніколу (1000x), 500мкл замороженої бактеріальної культури.

Інкубували протягом ночі, при 37 С, на шейкері 250-300 об/хв. Після, нічна культура переносилась у більший об'єм LB з додатковим додаванням хлорамфеніколу(зі збереженням концентрації). Інкубували додатково до OD_{600} (оптична густина) \square 0.8. Відбиралась аліквота. До суспензії вносили індукуючий агент IPTG(1 М) з розрахунку 1 мкл IPTG на 1 мл суспензії. Інкубували протягом ночі. Відбиралась аліквота.

Пост-індукційна суспензія розподілялась по 50 мл у фалкони та центрифугувалася 30 хв при 2555 g, +4 °C. Отриманий супернатант зливали, осад використовували далі або при необхідності заморожували при -20 °C.

Осад бактерій розчиняли у (50 mM Trizma, 100 mM NaCl, pH 8.0) з розрахунку 5 мл на 50 мл суспензії у попередньому етапі. PMSF у Lysis buffer додавався перед використанням. Проводили обробку ультразвуком трьома сетами за формулою 3 рази по 5x30"; 75w% (на льоді). Центрифугували при 3000 g, 35 хв, +4 °C. Відбирали надосад, осад утилізували. Відбирали аліквоту.

За потреби нічну культуру у обох випадках можна було заморозити в рідкому азоті з додаванням 30% від фінального об'єму гліцерину.

2.2.2 Очистка рекомбінантних білків

▪ Очистка HSP60

Регеновану за стандартним протоколом, використовуючи NiCl₂, смолу, наносили на колонку у відношенні 1:5(смола:лізат). Після зливали рідину з колонки

Додавали в колонку дистильовану води у співвідношенні 1:4. Обережно ресуспендували смолу. Злили воду. Додавали Binding у відношенні 1:3 (смола:буфер). Обережно ресуспендували смолу. Злили буфер. Повторювали цикл з водою та Binding ще раз.

Додавали лізат клітин у співвідношенні 1:5(смола:лізат). Інкубували 60 хв. Незв'язану фракцію зливали, та відбирали аліквоту. Додавали Binding 1:3 (смола: буфер) та трясали колонку 2 хвилини. Зливали буфер. Повторювали. Відбирали зразок смоли.

Додавали Wash 1:3 (смола: буфер) та трясали колонку 2 хвилини. Зливали буфер. Повторювали. Відбирали зразок смоли.

Додавали Elution у співвідношенні 1:1 (смола: буфер), у два етапи.

Збирали елюції для подальшого рефолдингу . Відібрали зразок смоли.

Колонку регенерували за стандартним протоколом, консервували з додаванням 0,02 % розчин азиду натрію (NaN_3).

- Очистка GroEL

На урівноважену буфером (50 мМ Trizma, 100 мМ NaCl, pH 8.0) колонку TOYOPEARL HW-55, в залежності від об'єму та концентрації білків у лізаті, наносили лізат з GroEL, попередньо профільтрувавши через 0,45 мкм та відцентрифугувавши 5 хв на 10000 g. Збирали збагачені на GroEL фракції.

Концентрації та чистота отриманих білків аналізувались за допомогою електрофорезу у ПААГ та використання програми Image Studio Lite.

Для довгострокового зберігання до білків був доданий кріопротектор(гліцерин) та за потреби карбамід (до 2 М).

2.2.3 Рефолдинг HSP60

Отриманий після очистки рекомбінантний білок HSP60 рефолдували. Спершу, отримані елюції висаювались за допомогою додавання насиченого розчину сульфату амонія у відношеннях 1:1. Висолені білки розчиняли у невеликому об'ємі PBS та рефолдували за рахунок додавання рефолдинг буферу протягом ночі.

2.2.4 Електрофорез у градієнтному ПААГ

ПААГ заливався перистальтичним насосом, беручи загальний об'єм сумішей акриламід у з'єднаній посудині з двома резервуарами, спершу

поступав розчин з 22% вмістом акриламідом, а в кінці 7%. За рахунок наявності з'єднання з невеликим діаметром концентрація у крайньому резервуарі, з якого безпосередньо розчин подавався на насос, постійно знижувалась, так досягався ефект градієнту концентрації по всій площі ПААГ. Така методика дозволяє покращити розділення білків на наступних етапах.

Розмір скла з гелем є стандартним для використаної електрофорезної камери виробництва Bio-Rad. Кількість лунок для зразків могла варіювати в залежності від кількості досліджуваних зразків.

Як універсальний білок для визначення концентрацій брався BSA, фінальна концентрація якого перед нанесенням була 0,1 мг/мл, що підтверджувалось спектрофотометрично з використанням спектрофотометра LLG-uniSPEC 2. Аналізовані білки та антитіла наносили з додаванням «Буфер білкового зразка для PAGE» у різних пропорціях.

Вольт-амперна характеристика струму регулювалась прив'язкою до сили струму, для одного гелю в камері 0,03 А, для двох 0,04 А. Усі інші розчини використані у даному методі готувались за стандартним протоколом.

Фарбування гелю проводили за допомогою барвника «Кумасі діамантовий блакитний G250» протягом 3-5 хв на водяній бані з температурою близькою до кипіння. Прибирання зайвого барвника відбувалось за допомогою стандартного кислотно-спиртового розчину у декілька етапів, до можливості ефективно проаналізувати візуальну картину та сигнал зразків. Сканувались гелі за допомогою принтерів-сканерів виробництва Canon (Японія) з родільною здатністю 1200 точок/дюйм.

Аналіз концентрацій проходив у програмі Image Studio Lite, на одному з кольорових каналів. Концентрації порівнювались з відомими концентраціями BSA, калібровки яких показувала лінійну залежність.

2.2.5 Забір крові

У пацієнтів брали кров, отримували відповідно стандартного протоколу сироватку та стабілізували за допомогою 50 % розчину гліцерину.

Зразки сироваток для дослідження зберігали при - 20 °С та перевіряли ідентичність сигналу при взаємодії з антигеном, який отримували з декількох партій продуцента бактерій.

2.2.6 Отримання специфічних імуноглобулінів класу G

Імуноглобуліни класу G відбирались з сумарних фракцій сироваток крові людини за допомогою хроматографії на носії за стандартним протоколом Protein A/G Agarose Resin 4 Rapid Run (pH Scientific, Нова Зеландія).

Специфічні поліклональні антитіла були отримані за допомогою хроматографії з NHS-Activated Sepharose 4 Fast Flow (Cytiva, США), на яку за протоколом були прикріплені рекомбінантні білки HSP60 та GroEL.

Білки додавались у стандартних розчинах з додаванням 4М карбаміду, для запобігання агрегації.

Елюція проводилась за стандартним протоколом.

2.2.7 Аналіз отриманих білків та антитіл методом імуноферментного аналізу.

Для аналізу відповідних білків та антитіл класу G, а також розробки тест-системи був обраний непрямий твердофазний імуноферментний тип аналізу.

ПВХ плашка фірми Nunc має 96 лунок, що дозволяє проводити аналіз на два антигена, з урахуванням бланків, контролів, референтних концентрацій антитіл для 22 зразків, з розрахунку 3 лунки на зразок.

Антиген розчинявся у розчині №1 до концентрації 5 мкг/мл. Отриманий розчин розподіляли октоканальним саплером у завчасно розписані відповідні лунки по 100 мкл кожна, окрім «blank».

Інкубація відбувалась протягом 16-20 годин за температури 4 °С. Незв'язаний антиген у розчині PBS видаляли. Після, лунки промивались розчином №2 кожна по 300 мкл шестикратно, для блокування неспецифічних взаємодій. Інкубували з наявним у лунках розчином №2 протягом 16-20 годин за температури 4 °С. Після, видаляли розчин №2 з лунок і проводили аналогічну, з попередньою промивку.

На наступному етапі додавали сироватки крові людей, розведені у 50 разів, по 100 мкл у кожен лунку, окрім «blank». Інкубували 1 годину при 37 °С.

Незв'язані антитіла у розчині №2 видалялися. Додавали у кожен лунку, окрім «blank», по 100 мкл кон'югованих антитіл, розведених відповідно до рекомендацій виробника 1:20000 , Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-human IgG(H+L) Lot# (Jackson ImmunoResearch, США). Інкубували 1 годину при 37 °С.

Повторювали етап видалення та промивки. Відбирали рідину з лунок повністю. Вносили розчин субстрату по 100 мкл/лунка, окрім «blank».

Детекцію проводили на 5, 10, 15, 20 хвилинах експозиції, диференційний фільтр не використовується, довжина хвилі 405 нм. Сигнал «blank» аналізувався для показників LOD та LOQ

Загальна схему алгоритму імуноферментного аналізу тест-системи на білок HSP60 чи GroEL наведена на рисунку 2.3.

Схему функціонування тест-системи зображено у Додатку 1.

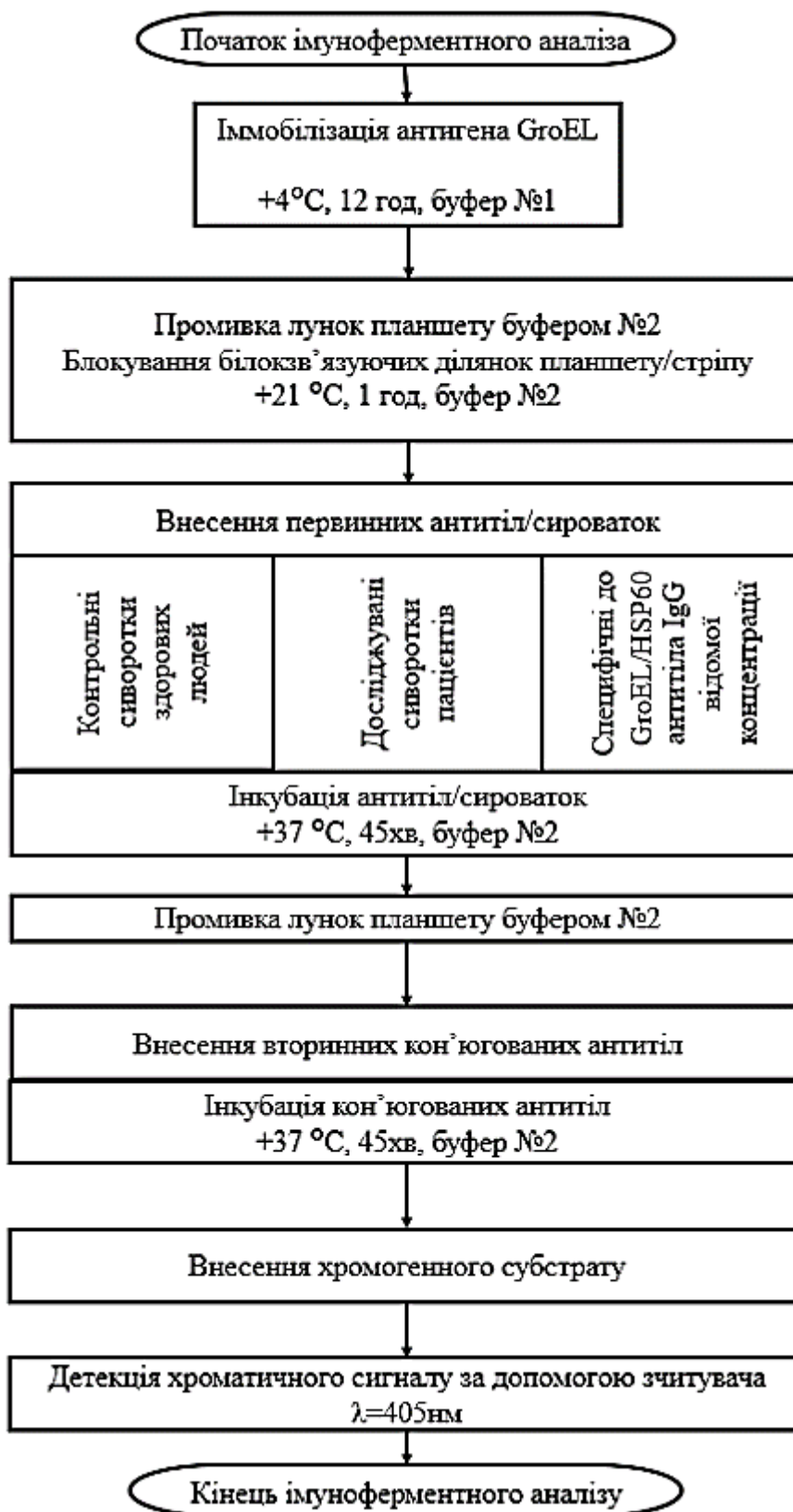


Рисунок. 2.3. Схема алгоритму імуноферментного аналізу тест-системи на визначення кількості антитіл в досліджуваних сироватках до білка GroEL

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Аналіз отриманих рекомбінантних білків за допомогою електрофорезу у ПААГ

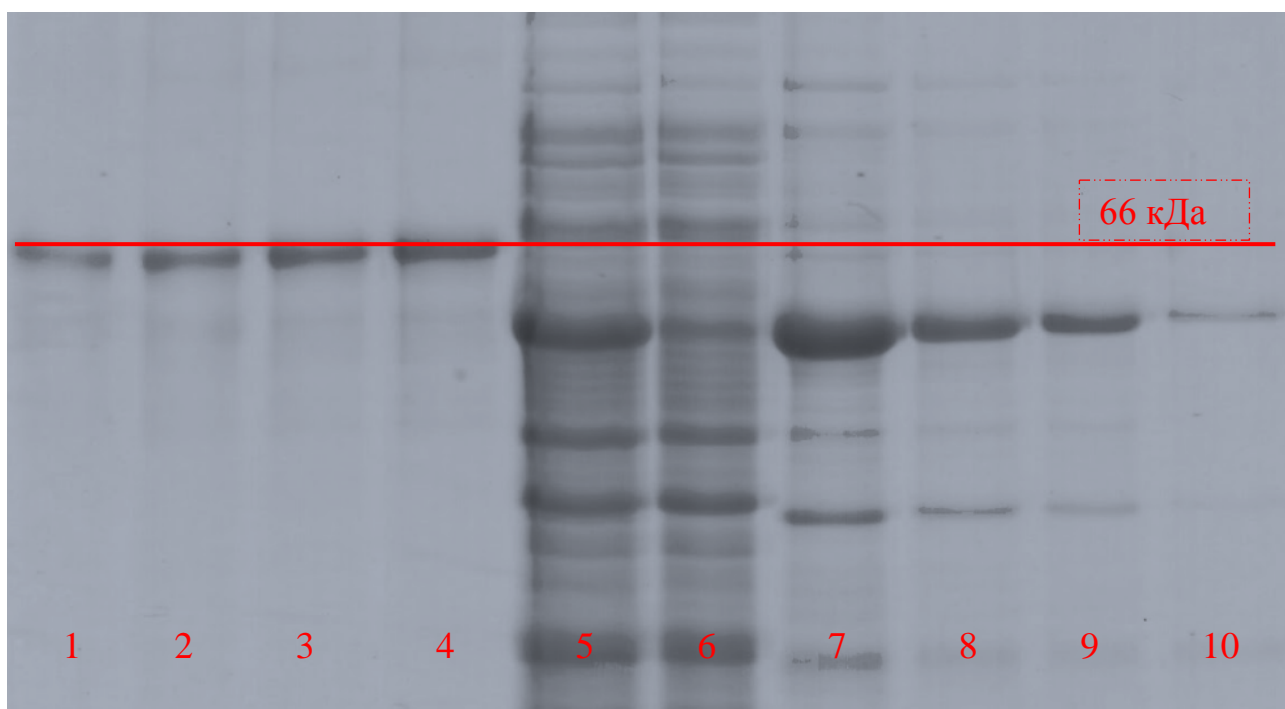


Рисунок 3.1. Електрофорез у ПААГ.

1,2,3,4 – BSA (0,4 мкг; 0,6 мкг; 0,8 мкг; 1 мкг)

5 – загальний лізат з рекомбінантним HSP60 до нанесення на Ni-NTA

6 – незв'язана фракція лізату з Ni-NTA

7 – смола Ni-NTA перед елюцією

8, 9 – перша та друга елюція

10 – носій Ni-NTA після елюції

Білок був виділений удосконаленим методом, отриманий рекомбінант має достатню чистоту, а концентрація була визначена.

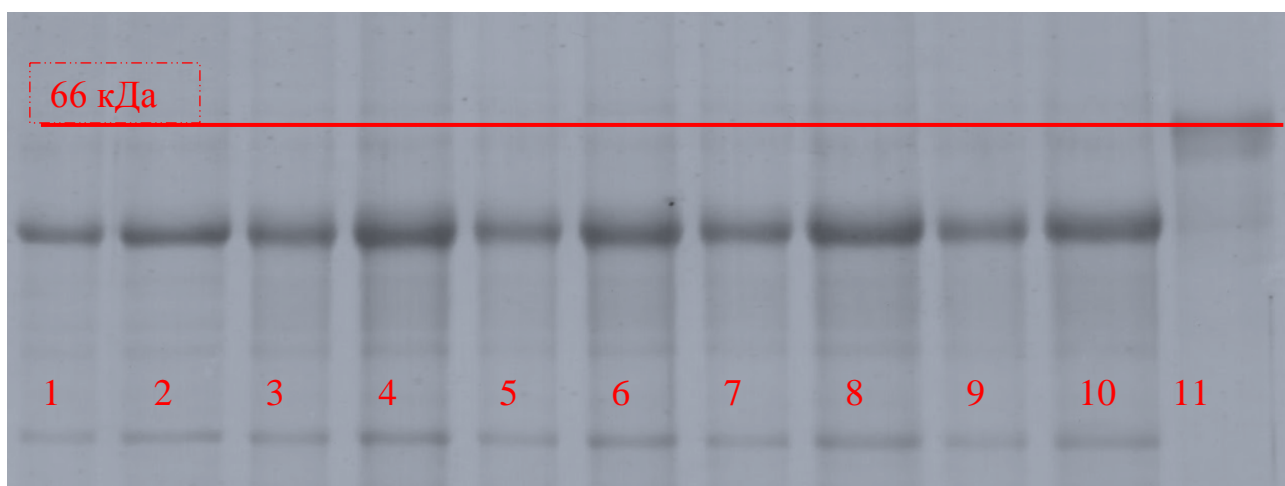


Рисунок 3.2. Електрофорез у ПААГ.

1-10 – HSP60 перевірка концентрацій у різних партіях, попарно 5 та 10 мкл.

11 – BSA 0,5 мкг

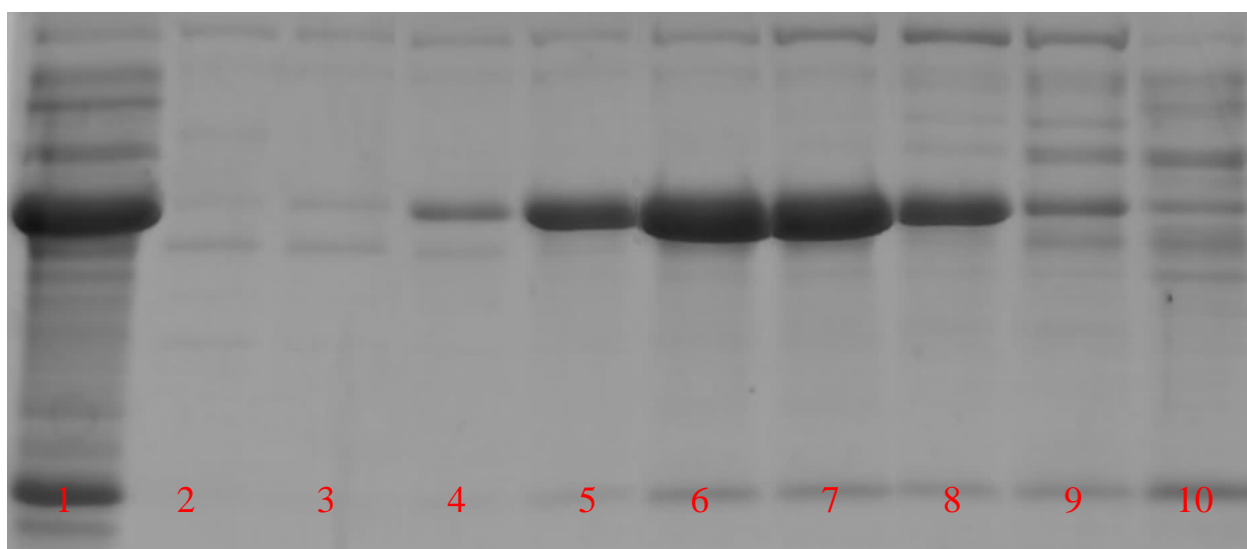


Рисунок 3.3. Електрофорез у ПААГ.

1 - загальний лізат з рекомбінантним GroEL

2,3,4,5,6,7,8,9,10 – фракції рекомбінантного GroEL

Для використання у подальших аналізах були відібрані 5, 6 та 7 фракції, які ті що мають високу концентрацію та чистоту досліджуваного шапероніну.

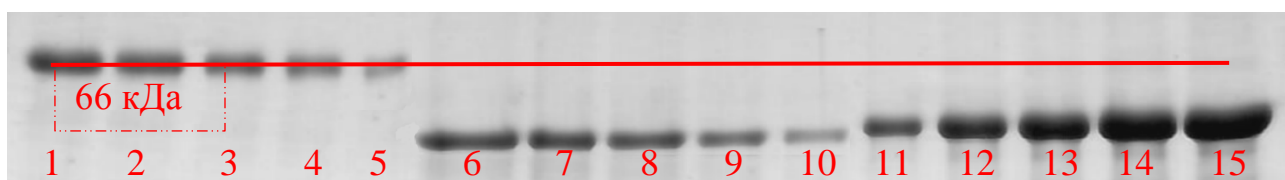


Рисунок 3.4. Електрофорез у ПААГ.

1,2,3,4,5 – BSA (1 мкг; 0,8 мкг; 0,6 мкг; 0,4 мкг; 0,2 мкг)

6,7,8,9,10 – HSP60 (10 мкл; 8 мкл; 6 мкл; 4 мкл; 2 мкл)

11,12,13,14,15 – GroEL (2 мкл; 4 мкл; 6 мкл; 8 мкл; 10 мкл)

Перевірка концентрацій отриманих білків перед нанесенням на ПВХ планшет.

3.2 Створення референтної калібровки

Були визначені рівні сигналу до відповідних білків за допомогою зміни оптичної густини, при різних кількостях специфічних імуноглобулінів отриманих на NHS-Activated Sepharose 4 Fast Flow.

Кожна кількість антитіл перевірялась 5 разів, у таблиці нижче наведено середній сигнал. В кожен лунку додавалось 0,5 μ відповідного білку.

Таблиця 3.1 Залежність сигналу ІФА від кількості імуноглобулінів. Час експозиції 15 хв.

Білок	Кількість антитіл	Оптичний сигнал		
		50 нг	100 нг	150 нг
GroEL		0,172	0,296	0,372
HSP60		0,083	0,159	0,248

За рахунок наявності калібровки, можлива кількісна оцінка даних антитіл у сироватках крові людей.

3.3 Перевірка різних партій досліджуваних білків

Для перевірки стабільності концентрації отриманих рекомбінантних білків, було проведено імуноферментний аналіз, де антигеном слугували різні партії HSP60 та GroEL отримані 1 місяці, 6 місяців та 12 місяців до відповідного аналізу.

Кожна партія і кожен зразок наносились в однакових умовах, з розрахунку 3 повтори на один зразок, у таблицях представлені середні значення для кожного зразку.

Результати тест-системи для сигналу визначеної кількості специфічних антитіл проти HSP60 з антигеном очищеним з різних партій продуцента наведено у Таблиці 3.2

Дисперсійний аналіз даних для відповідної кількості імуноглобулінів демонструє відсутність статистично значимої (HSP60: $p=0,152$;) відмінності результатів для різних партій. Для всіх випадків розподіл значень був нормальним (Shapiro-Wilk, $p>0,1$)

Результати тест-системи для сигналу визначеної кількості специфічних антитіл проти GroEL з антигеном очищеним з різних партій продуцента наведено у Таблиці 3.3.

Дисперсійний аналіз даних для відповідної кількості імуноглобулінів демонструє відсутність статистично значимої (GroEL: $p=0,4018$;) відмінності результатів для різних партій. Для всіх випадків розподіл значень був нормальним (Shapiro-Wilk, $p>0,1$)

З табличних значень та дисперсійного аналізу видно, що білки отримані у різні терміни та зберігалися на -20 показують однакові результати у імуноферментному аналізі за однакових умов.

Таблиця 3.2 Середні значення оптичних сигналів ІФА білку HSP60 проти 100ng специфічних антитіл. Час експозиції 10хв. 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	0,070	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	0,080	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
Середнє значення	0,0752	0,0782	0,0779

Таблиця 3.3 Середні значення оптичних сигналів ІФА білку GroEL проти 100ng специфічних антитіл. Час експозиції 15хв. Розміри усіх вибірок однакові (n=10).

Номер ІФА\Номер партії	Значення оптичного сигналу ІФА		
	1	2	3
1	0,304	0,287	0,288
2	0,305	0,294	0,307
3	0,285	0,304	0,298
4	0,289	0,309	0,297
5	0,301	0,289	0,300
6	0,296	0,299	0,303
7	0,294	0,308	0,290
8	0,295	0,303	0,291
9	0,295	0,300	0,297
10	0,286	0,299	0,309
Середнє значення	0,295	0,299	0,298

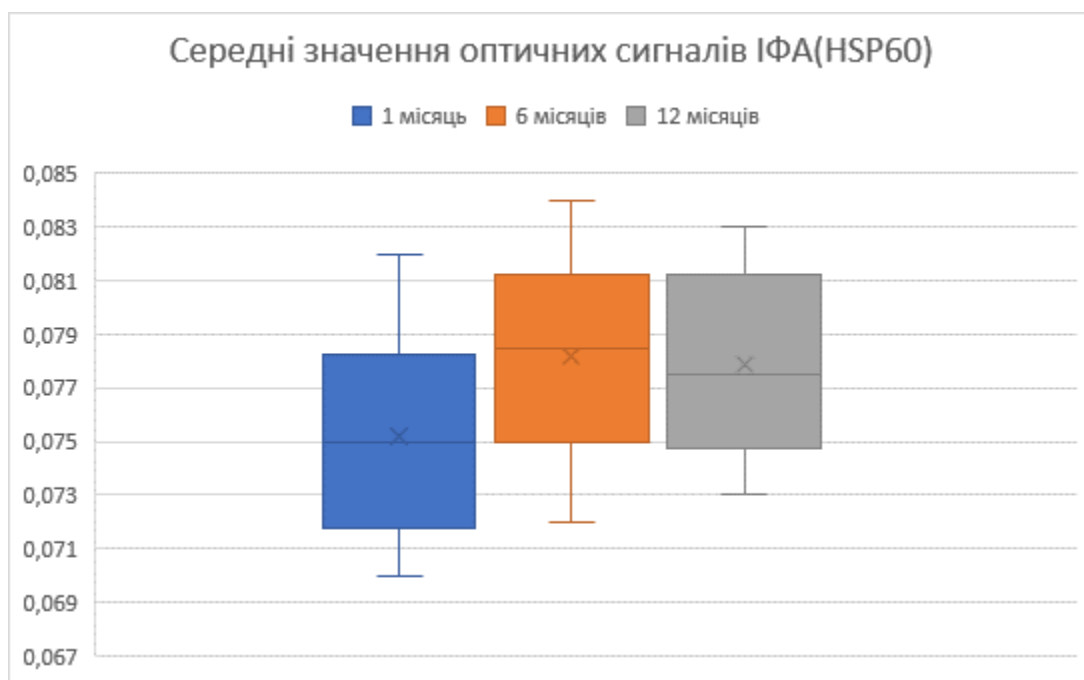


Рисунок 3.3. Значення оптичних сигналів ІФА білку HSP60 проти 100ng специфічних антитіл

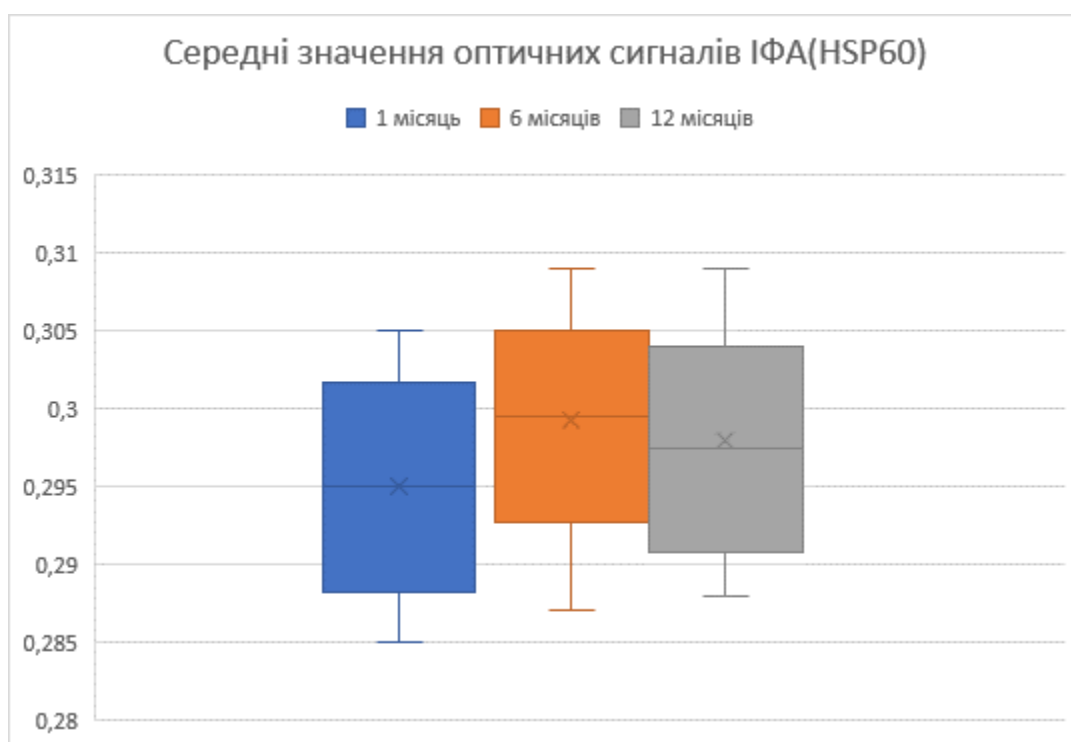


Рисунок 3.4. Значення оптичних сигналів ІФА білку HSP60 проти 100ng специфічних антитіл

3.4 Розрахунок показників детекції

Під час імуноферментних аналізів, записувалось число сигналу «blank» (сигнал шуму). Були отримані 10 відповідних значень для часу експозиції в 15 хв : 0,331; 0,323; 0,326; 0,322; 0,332; 0,328; 0,316; 0,335; 0,333; 0,331;

Стандартне відхилення (S) : 0,0059

k – коефіцієнт нахилу референтної калібровки, для отриманих значень близький до одиниці.

LOD (нижній ліміт детекції) = 0,0177; що відповідає для GroEl = 6,5 нг у зразку, а для HSP60 = 16 нг.

LOQ (нижній ліміт детекції) = 0,059; що відповідає для GroEl = 22 нг у зразку, а для HSP60 = 37 нг

$$LOD = \frac{3 \times S}{k}$$

$$LOQ = \frac{10 \times S}{k}$$

Попри високий нижній рівень LOQ для HSP60, у реальних дослідженнях сигнал оптичної густини у досліджуваних зразках не був нижчий за 0,110, що приблизно відповідає 70 нг у зразку.

3.5 Використання імуноферментної тест системи в клінічних дослідженнях.

- Аналіз рівнів HSP60 та GroEL у процесі імплантації ембріону.

У додатку 3 представлені значення рівнів антитіл, до відповідних білків, до лікування (1), перед ембріотрансфером (2), після вдалої/невдалої імплантації (3) в двох групах пацієнток, що проходили лікування різними методиками.

Таблиця 3.4 Значення рівнів антитіл (IgG) до HSP60 та GroEL в обстежених пацієнток. Середнє значення (ВІ 95%)

Показник	Група 1, n=54	Група 2, n=52
HSP60-1, оптична густина	0,403 (0,325-0,526)	0,397 (0,313-0,523)
HSP60-2, оптична густина	0,385 (0,295-0,486)	0,374 (0,296-0,488)
HSP60-3, оптична густина	0,367 (0,295-0,469)	0,357 (0,289-0,482)
GroEL-1, оптична густина	0,414 (0,358-0,485)	0,340 (0,27-0,502)
GroEL-2, оптична густина	0,386 (0,342-0,485)	0,331 (0,25-0,466)
GroEL-3, оптична густина	0,382 (0,338-0,485)	0,322 (0,212-0,447)

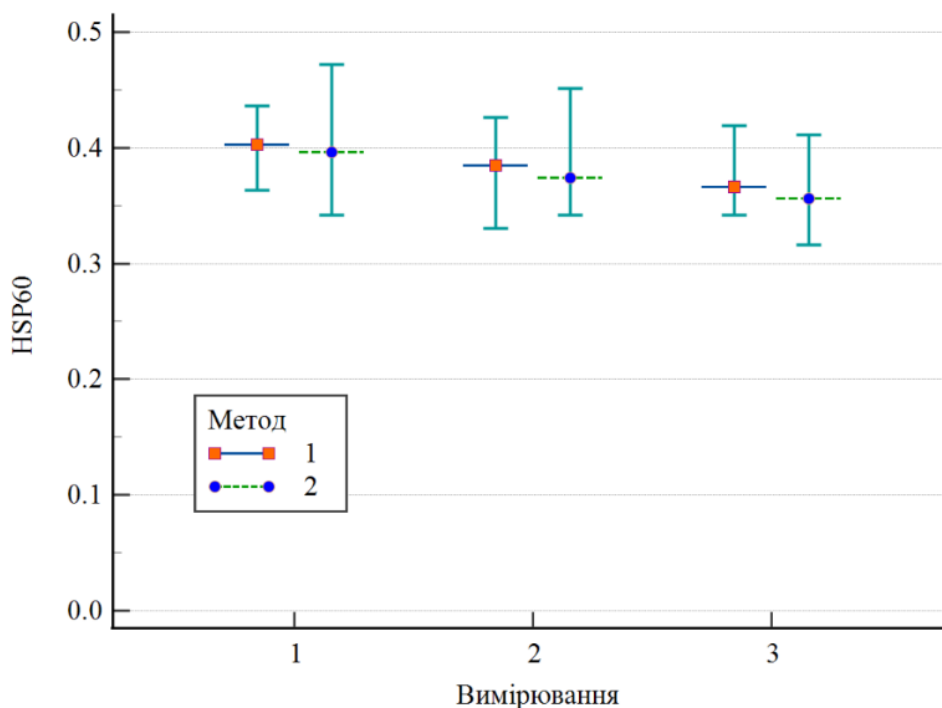


Рисунок. 3.5. Динаміка змін рівня антитіл IgG до HSP60 у обстежених пацієнток, значення в одиницях оптичної густини.

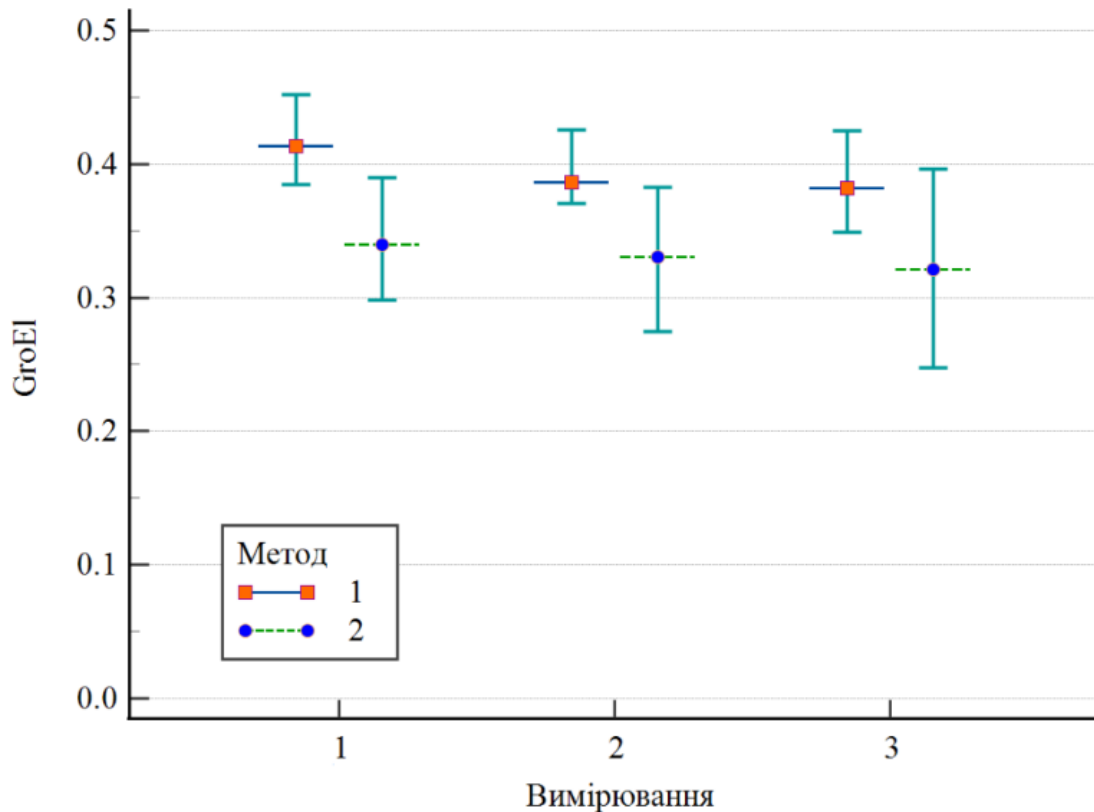


Рисунок. 3.6. Динаміка змін рівня антитіл IgG до GroEL у обстежених пацієнток, значення в одиницях оптичної густини.

Згідно отриманих даних, лікування безпліддя у пацієнтів двох груп призводить до зниження рівнів антитіл до GroEL та HSP60.

Аналіз зв'язку між рівнями антитіл класу G та ризиком невдалої імплантації був проведений за допомогою кривих операційних характеристик.

Для антигену HSP60 та відповідних антитіл в даному випадку чутливість була оцінена як 62% а специфічність 87,5%.

Для антигену GroEL та відповідних антитіл в даному випадку чутливість була оцінена як 64% а специфічність 85,7%.

Показники AUC ($p < 0,001$) становив 0,805 та 0,821 відповідно,

Є зв'язок між успішністю імплантації та рівнями антитіл до GroEL. При виборі оптимального порогу (Youden index), було визначено, що рівень антитіл (за оптичною густиною) більше 0,411 прогнозує невдалу імплантацію

з чутливістю 64%, на друге вимірювання. У випадку вагітності рівень 0,354, що дає інформацію про те, що 76% пацієток з рівнем нижчим за наведений завагітніли.

- Аналіз рівнів HSP60 та GroEL у жінок з преєклампсією

У додатку 4 представлені рівні антитіл IgG до HSP60 та GroEL, у групі здорових жінок (n=13) та у стані преєклампсії(ПА) (n=12). Кожна група була відібрана з більших вибірок, враховуючи анамнез, з фінальних вибірок були прибрані пацієтки з наявними іншими запальними процесами які могли дати хибний результат під час аналізу.

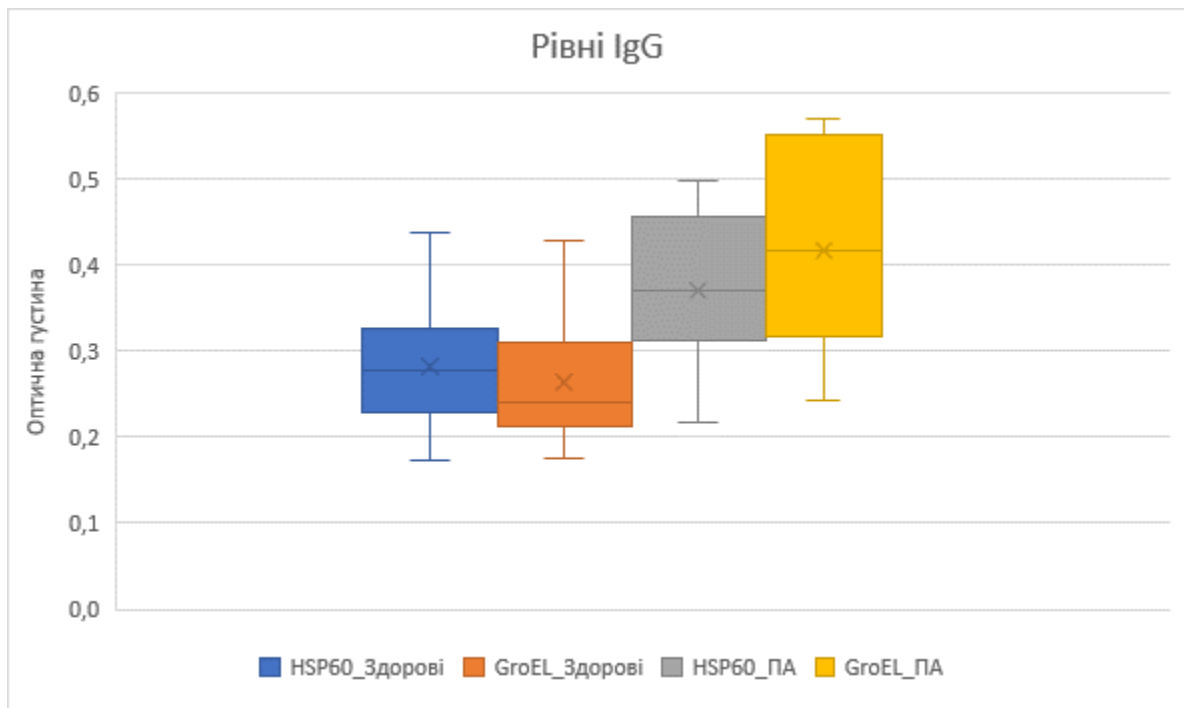


Рисунок. 3.6. Рівні антитіл IgG до GroEL у обстежених пацієток з преєклампсією.(Коробковий графік)

Усі вибірки не відрізняються від нормального розподілу.

Порівняння двох вибірок за рівнями антитіл до HSP60, за критерієм Стьюдента ($T=2,60$, число ступенів вільності $k=23$.), виявило статистично значиму різницю, $p<0,05$.

Порівняння двох вибірок за рівнями антитіл до GroEL, за критерієм Стьюдента ($T=3,85$, число ступенів вільності $k=18$.), виявило статистично значиму різницю, $p<0,05$.

Для побудови математичної моделі потрібно поєднати дослідження з аналізом на загальноприйнятні маркери, та, за можливості збільшити вибірку та відслідкувати динаміку при лікуванні.

ВИСНОВКИ

- 1) Розроблена тест-система є стабільною, отримані антигени є чистими та стабільними
- 2) Наявна можливість отримати інформацію про кількість антитіл у досліджуваних зразках сироватки крові людини за рахунок наявної референтної калібровки
- 3) Робота імуноферментної тест-системи перевірена в клінічних дослідженнях, антигени HSP60 та GroEL є ефективними маркерами преекламписії та безпліддя
- 4) Описана тест-система до білків HSP60 та GroEL , може бути важливим кроком у подальшому удосконаленні та розробці нових діагностичних методів і моніторингу захворювань.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Linhares, I. M., & Witkin, S. S. (2010). Immunopathogenic consequences of *Chlamydia trachomatis* 60 kDa heat shock protein expression in the female reproductive tract. *Cell Stress and Chaperones*, 15(5), 467–473. doi:10.1007/s12192-010-0171-4
2. Crowther, J. R. (1995). ELISA. doi:10.1385/0896032795
3. Hnasko, R. (Ed.). (2015). ELISA. *Methods in Molecular Biology*. doi:10.1007/978-1-4939-2742-5
4. Alhabbab, R. Y. (2018). Radioimmunoassay (RIA). *Basic Serological Testing*, 77–81. doi:10.1007/978-3-319-77694-1_11
5. Langkamp, M., Hörnig, S. C., Hörnig, J. B., Kirschner, M., Pridzun, L., & Kornhuber, M. E. (2009). Detection of myelin autoantibodies: evaluation of an assay system for diagnosis of multiple sclerosis in differentiation from other central nervous system diseases. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 47(11). doi:10.1515/cclm.2009.313
6. Dähnrich, C., Komorowski, L., Probst, C., Seitz-Polski, B., Esnault, V., Wetzels, J. F., ... Schlumberger, W. (2013). Development of a standardized ELISA for the determination of autoantibodies against human M-type phospholipase A2 receptor in primary membranous nephropathy. *Clinica Chimica Acta*, 421, 213–218. doi:10.1016/j.cca.2013.03.015
7. Caruso Bavisotto C, Provenzano A, Passantino R, Marino Gammazza A, Cappello F, San Biagio PL, Bulone D. Oligomeric State and Holding Activity of Hsp60. *Int J Mol Sci*. 2023 Apr 25;24(9):7847. doi: 10.3390/ijms24097847. PMID: 37175554; PMCID: PMC10177986
8. Deocaris, C. C., Kaul, S. C., & Wadhwa, R. On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60. *Cell Stress Chaperones* 11, 116-128 (2006).

9. Zhou, C., Sun, H., Zheng, C., Gao, J., Fu, Q., Hu, N., ... Lyu, J. (2018). Oncogenic HSP60 regulates mitochondrial oxidative phosphorylation to support Erk1/2 activation during pancreatic cancer cell growth. *Cell Death & Disease*, 9(2). doi:10.1038/s41419-017-0196-z
10. Alard, J.-E., Dueymes, M., Youinou, P., & Jamin, C. (2007). Modulation of endothelial cell damages by anti-Hsp60 autoantibodies in systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 6(7), 438–443. doi:10.1016/j.autrev.2007.01.012
11. Macario, A. J. L., Conway de Macario, E., & Cappello, F. (2013). The Chaperonopathies. *SpringerBriefs in Biochemistry and Molecular Biology*. doi:10.1007/978-94-007-4667-1
12. Van Eden, W., Jansen, M. A. A., Ludwig, I. S., Leufkens, P., van der Goes, M. C., van Laar, J. M., & Broere, F. (2019). Heat Shock Proteins Can Be Surrogate Autoantigens for Induction of Antigen Specific Therapeutic Tolerance in Rheumatoid Arthritis. *Frontiers in Immunology*, 10. doi:10.3389/fimmu.2019.00279
13. Hoter, Rizk, & Naim. (2019). The Multiple Roles and Therapeutic Potential of Molecular Chaperones in Prostate Cancer. *Cancers*, 11(8), 1194. <https://doi.org/10.3390/cancers11081194>
14. Stevens, M., Abdeen, S., Salim, N., Ray, A.-M., Washburn, A., Chitre, S., ... Johnson, S. M. (2019). HSP60/10 chaperonin systems are inhibited by a variety of approved drugs, natural products, and known bioactive molecules. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. doi:10.1016/j.bmcl.2019.02.028
15. Vilasi, S., Bulone, D., Caruso Bavisotto, C., Campanella, C., Marino Gammazza, A., San Biagio, P. L., ... Macario, A. J. L. (2018). Chaperonin of Group I: Oligomeric Spectrum and Biochemical and Biological Implications. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 4. doi:10.3389/fmolb.2017.00099
16. Parnas, A., Nadler, M., Nisemblat, S., Horovitz, A., Mandel, H., & Azem, A. (2009). The MitCHAP-60 Disease Is Due to Entropic Destabilization of

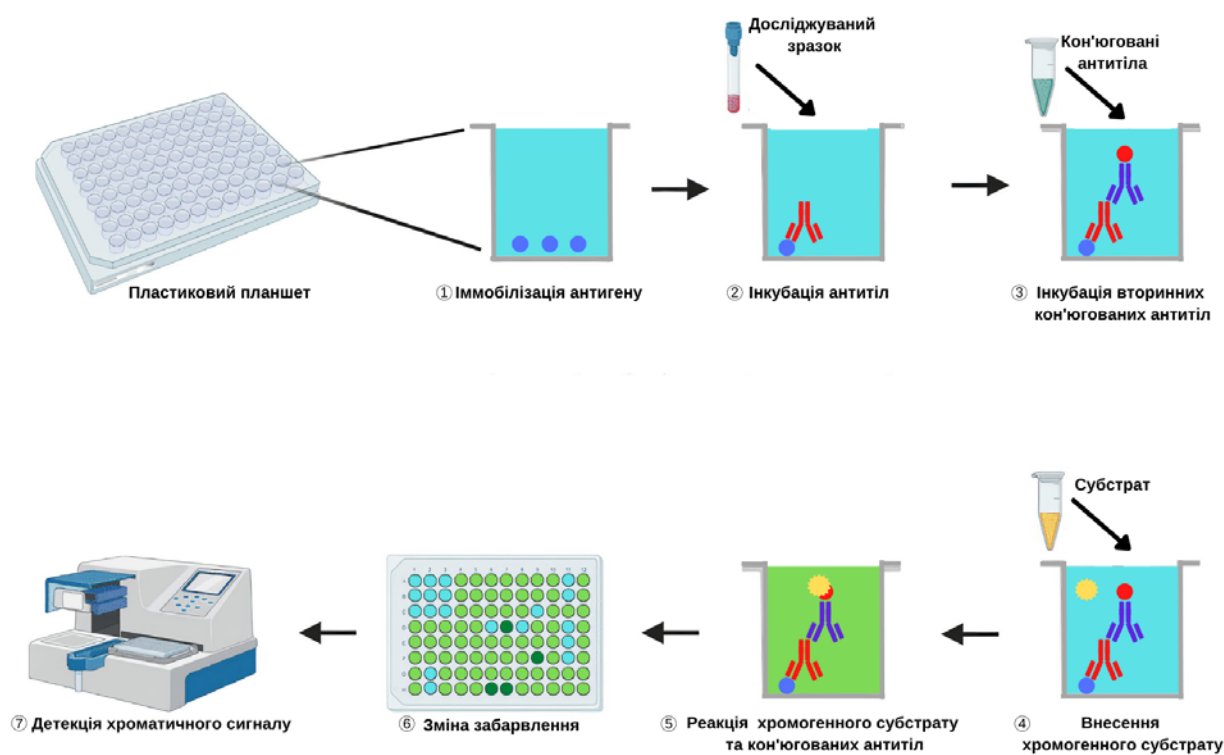
- the Human Mitochondrial Hsp60 Oligomer. *Journal of Biological Chemistry*, 284(41), 28198–28203. doi:10.1074/jbc.m109.031997
17. Nisemblat, S., Yaniv, O., Parnas, A., Frolov, F., & Azem, A. (2015). Crystal structure of the human mitochondrial chaperonin symmetrical football complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(19), 6044–6049. doi:10.1073/pnas.1411718112
18. Gomez-Llorente, Y., Jebara, F., Patra, M., Malik, R., Nisemblat, S., Chomsky-Hecht, O., ... Ubarretxena-Belandia, I. (2020). Structural basis for active single and double ring complexes in human mitochondrial Hsp60-Hsp10 chaperonin. *Nature Communications*, 11(1). doi:10.1038/s41467-020-15698-8
19. Mande, S. C., Mehra, V., Bloom, B. R., & Hol, W. G. J. (1996). Structure of the Heat Shock Protein Chaperonin-10 of *Mycobacterium leprae*. *Science*, 271(5246), 203–207. doi:10.1126/science.271.5246.203 (<https://doi.org/10.1126/science.271.5246.203>)
20. Hayer-Hartl, M., Bracher, A., & Hartl, F. U. (2016). The GroEL–GroES Chaperonin Machine: A Nano-Cage for Protein Folding. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(1), 62–76. doi:10.1016/j.tibs.2015.07.009
21. Kumar, C. M. S., Mande, S. C., & Mahajan, G. (2015). Multiple chaperonins in bacteria—novel functions and non-canonical behaviors. *Cell Stress and Chaperones*, 20(4), 555–574. doi:10.1007/s12192-015-0598-8 (<https://doi.org/10.1007/s12192-015-0598-8>)
22. Hayer-Hartl, M., Bracher, A., & Hartl, F. U. (2016). The GroEL–GroES Chaperonin Machine: A Nano-Cage for Protein Folding. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(1), 62–76. doi:10.1016/j.tibs.2015.07.009
23. Harris, J. R., & Marles-Wright, J. (Eds.). (2017). *Macromolecular Protein Complexes. Subcellular Biochemistry*. doi:10.1007/978-3-319-46503-6
24. Boshoff, A. (2014). Chaperonin—Co-chaperonin Interactions. *The Networking of Chaperones by Co-Chaperones*, 153–178. doi:10.1007/978-3-319-11731-7_8

25. Le-Dao HA, Dinh TT, Tran TL, Lee VS, Tran-Van H. Molecular Dynamics Simulations Reveal Novel Interacting Regions of Human Prion Protein to *Brucella abortus* Hsp60 Protein. *Mol Biotechnol.* 2023 Jan 12:1–9. doi: 10.1007/s12033-023-00655-9. Epub ahead of print. PMID: 36633832; PMCID: PMC9838441.
26. Duan Y, Tang H, Mitchell-Silbaugh K, Fang X, Han Z, Ouyang K. Heat Shock Protein 60 in Cardiovascular Physiology and Diseases. *Front Mol Biosci.* 2020 Apr 30;7:73. doi: 10.3389/fmolb.2020.00073. PMID: 32426370; PMCID: PMC7203681.
27. Hjerpe, E., Egyhazi, S., Carlson, J., Stolt, M. F., Schedvins, K., Johansson, H., ... Åvall-Lundqvist, E. (2013). HSP60 Predicts Survival in Advanced Serous Ovarian Cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 23(3), 448–455. doi:10.1097/igc.0b013e318284308b
28. Hwang, Y. J., Lee, S. P., Kim, S. Y., Choi, Y. H., Kim, M. J., Lee, C. H., et al. (2009) Expression of heat shock protein 60 kDa is upregulated in cervical cancer. *Yonsei Med. J.* 50, 399–406. doi: 10.3349/ymj.2009.50.3.399
29. Xu, X., Wang, W., Shao, W., Yin, W., Chen, H., Qiu, Y., ... He, J. (2011). Heat shock protein-60 expression was significantly correlated with the prognosis of lung adenocarcinoma. *Journal of Surgical Oncology*, 104(6), 598–603. doi:10.1002/jso.21992
30. He, Y., Wu, Y., Mou, Z., Li, W., Zou, L., Fu, T., ... Wang, X. (2007). Proteomics-based identification of HSP60 as a tumor-associated antigen in colorectal cancer. *PROTEOMICS – Clinical Applications*, 1(3), 336–342. doi:10.1002/prca.200600718
31. Hamelin, C., Cornut, E., Poirier, F., Pons, S., Beaulieu, C., Charrier, J.-P., ... Choquet-Kastylevsky, G. (2011). Identification and verification of heat shock protein 60 as a potential serum marker for colorectal cancer. *FEBS Journal*, 278(24), 4845–4859. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08385.x
32. Desmetz, C., Bibeau, F., Boissière, F., Bellet, V., Rouanet, P., Maudelonde, T., ... Solassol, J. (2008). Proteomics-Based Identification of HSP60 as a

- Tumor-Associated Antigen in Early Stage Breast Cancer and Ductal Carcinomain situ. *Journal of Proteome Research*, 7(9), 3830–3837. doi:10.1021/pr800130d
33. Toh, B.-H., Kyaw, T., Tipping, P., & Bobik, A. (2014). Atherosclerosis. *The Autoimmune Diseases*, 1049–1066. doi:10.1016/b978-0-12-384929-8.00071-x
34. Яковенко, Л. Ф., Ромащенко, О. В. and Крупська, І. В. (2018) ‘Білки теплового шоку у діагностиці та прогнозуванні порушень репродуктивної функції у жінок’, 7(133), pp. 77–83
35. Takenaka, R. (2004). *Helicobacter pylori* heat-shock protein 60 induces inflammatory responses through the Toll-like receptor-triggered pathway in cultured human gastric epithelial cells. *Microbiology*, 150(12), 3913–3922. doi:10.1099/mic.0.27527-0
36. Frisk, A., Ison, C. A. and Lagergård, T. (1998) ‘GroEL heat shock protein of *Haemophilus ducreyi*: Association with cell surface and capacity to bind to eukaryotic cells’, *Infection and Immunity*, 66(3), pp. 1252–1257. doi: 10.1128/iai.66.3.1252-1257.1998.
37. Wilson AC, Wu CC, Yates JR 3rd, Tan M. Chlamydial GroEL autoregulates its own expression through direct interactions with the HrcA repressor protein. *J Bacteriol.* 2005 Nov;187(21):7535-42. doi: 10.1128/JB.187.21.7535-7542.2005. PMID: 16237037; PMCID: PMC1272993.
38. Chu WG, Ryu DW. Clinical significance of serum CA15-3 as a prognostic parameter during follow-up periods in patients with breast cancer. *Ann Surg Treat Res.* 2016 Feb;90(2):57-63. doi: 10.4174/astr.2016.90.2.57. Epub 2015 Jan 28. PMID: 26878012; PMCID: PMC4751146.

Додаток 1

Схему функціонування тест-системи



Додаток 2

Значення рівнів антитіл IgG пацієнток до HSP60 та GroEL при імплантації

№	Group	HSP60_1	HSP60_2	HSP60_3	GroEL_1	GroEL_2	GroEL_3	Result
1	2	0,386	0,342	0,302	0,342	0,32	0,263	0
2	2	0,623	0,616	0,582	0,412	0,36	0,42	0
3	2	0,535	0,47	0,41	0,546	0,504	0,43	0
4	2	0,244	0,219	0,195	0,179	0,163	0,141	0
5	2	0,593	0,47	0,41	0,435	0,257	0,24	0
6	2	0,525	0,48	0,43	0,265	0,23	0,201	0
7	2	0,218	0,194	0,178	0,181	0,173	0,16	0
8	2	0,625	0,359	0,312	0,292	0,206	0,178	0
9	2	0,456	0,42	0,38	0,39	0,321	0,3	0
10	2	0,377	0,353	0,311	0,162	0,164	0,154	0
11	2	0,315	0,287	0,276	0,25	0,21	0,19	0
12	2	0,292	0,225	0,236	0,546	0,411	0,446	0
13	2	0,367	0,31	0,29	0,29	0,25	0,29	0
14	2	0,434	0,459	0,467	0,312	0,34	0,343	0
15	2	0,625	0,54	0,51	0,292	0,25	0,19	0
16	2	0,521	0,48	0,43	0,342	0,31	0,274	0
17	2	0,495	0,43	0,412	0,298	0,275	0,251	0
18	2	0,198	0,178	0,154	0,21	0,195	0,187	0
19	2	0,12	0,11	0,098	0,15	0,13	0,125	0
20	2	0,237	0,206	0,194	0,321	0,294	0,28	0
21	2	0,67	0,649	0,61	0,389	0,376	0,35	0
22	2	0,564	0,49	0,451	0,495	0,451	0,43	0
23	2	0,411	0,38	0,354	0,388	0,359	0,3	0
24	2	0,421	0,382	0,364	0,231	0,21	0,19	0
25	2	0,37	0,342	0,305	0,311	0,28	0,234	0
26	2	0,31	0,28	0,241	0,512	0,475	0,41	0
27	2	0,407	0,367	0,324	0,247	0,21	0,17	0
28	2	0,368	0,316	0,287	0,3	0,274	0,245	0
29	2	0,181	0,16	0,152	0,102	0,98	0,88	0
30	2	0,276	0,254	0,22	0,274	0,245	0,212	0
31	2	0,258	0,198	0,178	0,274	0,25	0,212	0
32	2	0,496	0,489	0,501	0,509	0,491	0,496	1
33	2	0,509	0,541	0,537	0,638	0,67	0,657	1
34	2	0,342	0,361	0,359	0,606	0,631	0,597	1
35	2	0,327	0,368	0,346	0,337	0,356	0,381	1
36	2	0,431	0,429	0,398	0,365	0,388	0,343	1
37	2	0,478	0,536	0,616	0,529	0,516	0,569	1
38	2	0,315	0,304	0,327	0,334	0,341	0,356	1
39	2	0,495	0,521	0,59	0,607	0,621	0,639	1
40	2	0,531	0,54	0,65	0,38	0,398	0,41	1

№	Group	HSP60_1	HSP60_2	HSP60_3	GroEl_1	GroEl_2	GroEl_3	Result
41	2	0,323	0,443	0,497	0,299	0,307	0,37	1
42	2	0,31	0,396	0,354	0,457	0,412	0,48	1
43	2	0,264	0,234	0,291	0,247	0,264	0,226	1
44	2	0,342	0,354	0,341	0,606	0,58	0,617	1
45	2	0,322	0,337	0,321	0,245	0,257	0,231	1
46	2	0,348	0,317	0,368	0,431	0,457	0,448	1
47	2	0,466	0,487	0,458	0,352	0,342	0,349	1
48	2	0,575	0,565	0,561	0,741	0,69	0,71	1
49	2	0,643	0,67	0,68	0,524	0,534	0,54	1
50	2	0,63	0,598	0,642	0,574	0,594	0,568	1
51	2	0,584	0,56	0,59	0,59	0,58	0,585	1
52	2	0,208	0,241	0,269	0,138	0,15	0,152	1
1	1	0,237	0,215	0,198	0,198	0,21	0,178	0
2	1	0,388	0,365	0,345	0,295	0,284	0,259	0
3	1	0,458	0,423	0,394	0,398	0,378	0,354	0
4	1	0,454	0,412	0,385	0,385	0,352	0,338	0
5	1	0,396	0,371	0,351	0,412	0,393	0,382	0
6	1	0,437	0,401	0,386	0,415	0,382	0,368	0
7	1	0,428	0,421	0,384	0,381	0,362	0,342	0
8	1	0,187	0,162	0,142	0,213	0,193	0,172	0
9	1	0,194	0,182	0,163	0,145	0,138	0,132	0
10	1	0,385	0,356	0,332	0,412	0,41	0,382	0
11	1	0,564	0,498	0,475	0,452	0,415	0,402	0
12	1	0,632	0,584	0,532	0,521	0,485	0,425	0
13	1	0,162	0,145	0,121	0,145	0,132	0,124	0
14	1	0,595	0,534	0,505	0,457	0,421	0,382	0
15	1	0,535	0,485	0,435	0,421	0,382	0,341	0
16	1	0,256	0,212	0,182	0,218	0,241	0,211	0
17	1	0,283	0,275	0,215	0,415	0,387	0,345	0
18	1	0,183	0,142	0,135	0,354	0,312	0,287	0
19	1	0,337	0,295	0,254	0,293	0,263	0,213	0
20	1	0,351	0,318	0,287	0,217	0,192	0,175	0
21	1	0,374	0,327	0,295	0,452	0,385	0,342	0
22	1	0,315	0,275	0,231	0,263	0,232	0,203	0
23	1	0,623	0,585	0,512	0,422	0,381	0,326	0
24	1	0,274	0,235	0,191	0,195	0,161	0,127	0
25	1	0,389	0,336	0,311	0,531	0,485	0,432	0
26	1	0,546	0,521	0,531	0,535	0,521	0,498	1
27	1	0,628	0,582	0,615	0,573	0,558	0,549	1
28	1	0,545	0,495	0,462	0,485	0,481	0,512	1
29	1	0,537	0,523	0,531	0,652	0,648	0,635	1
30	1	0,593	0,575	0,563	0,495	0,532	0,529	1
31	1	0,398	0,403	0,412	0,452	0,435	0,449	1
32	1	0,489	0,475	0,469	0,458	0,495	0,485	1
33	1	0,528	0,495	0,485	0,351	0,368	0,395	1

№	Group	HSP60_1	HSP60_2	HSP60_3	GroEl_1	GroEl_2	GroEl_3	Result
34	1	0,434	0,452	0,432	0,532	0,512	0,518	1
35	1	0,325	0,315	0,358	0,458	0,485	0,465	1
36	1	0,411	0,384	0,365	0,385	0,485	0,432	1
37	1	0,419	0,386	0,389	0,542	0,523	0,529	1
38	1	0,415	0,443	0,423	0,385	0,376	0,365	1
39	1	0,505	0,481	0,475	0,378	0,435	0,412	1
40	1	0,356	0,328	0,342	0,528	0,489	0,497	1
41	1	0,325	0,289	0,295	0,538	0,529	0,519	1
42	1	0,295	0,324	0,312	0,458	0,428	0,432	1
43	1	0,408	0,428	0,457	0,385	0,378	0,368	1
44	1	0,358	0,368	0,342	0,428	0,413	0,425	1
45	1	0,526	0,495	0,501	0,425	0,413	0,401	1
46	1	0,245	0,215	0,198	0,512	0,495	0,532	1
47	1	0,265	0,285	0,248	0,385	0,285	0,368	1
48	1	0,633	0,592	0,605	0,358	0,348	0,339	1
49	1	0,325	0,348	0,315	0,555	0,501	0,485	1
50	1	0,422	0,385	0,357	0,356	0,325	0,285	1
51	1	0,308	0,324	0,358	0,367	0,342	329	1
52	1	0,528	0,489	0,468	0,379	0,342	0,368	1
53	1	0,374	0,285	0,368	0,538	0,568	0,512	1
54	1	0,447	0,486	0,469	0,367	0,368	0,347	1

Result=0, пацієнтка завагітніла.

Додаток 3.

Значення рівнів антитіл IgG пацієнток до HSP60 та GroEL при прееклампсії, значення наведені у оптичній густині.

Здорові		Прееклампсія	
HSP60	GroEL	HSP60	GroEL
0,217	0,220	0,368	0,531
0,305	0,211	0,488	0,441
0,337	0,241	0,456	0,434
0,277	0,297	0,216	0,326
0,197	0,213	0,321	0,399
0,438	0,358	0,371	0,569
0,288	0,258	0,372	0,242
0,255	0,266	0,347	0,258
0,314	0,240	0,499	0,556
0,239	0,206	0,456	0,565
0,173	0,176	0,227	0,365
0,243	0,427	0,308	0,313
0,380	0,321		