

УДК 544.77.051

Изучение влияния наноносителей различной природы на иммунологические свойства иммобилизованных моноклональных аутоантител к тиреоглобулину

© 2020 А.М. СТОЙНОВА^{1*}, А.В. ЗУБКОВ², Я.М. СТАНИШЕВСКИЙ¹¹Российский университет дружбы народов, Москва, 117198²ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, 105064

*e-mail: stoinova17@mail.ru

Поступила в редакцию 24.03.2020 г.

После доработки 09.04.2020 г.

Принята к публикации 24.07.2020 г.

Исследовали иммунологические свойства моноклональных аутоантител к тиреоглобулину щитовидной железы при конструировании конъюгатов «носитель-биолиганд». Были получены наночастицы серебра, золота и полимерных микросфер с размерами в диапазоне 40–50 нм (наночастицы металлов) и 706 нм (полимерные частицы). Проведена иммобилизация аутоантител на поверхность синтезированных наночастиц различной природы и изучено влияния наноносителей на иммунологические свойства иммобилизованных моноклональных аутоантител к тиреоглобулину при помощи иммуноферментного анализа. Выявлено, что использование наночастиц серебра и золота позволяет регулировать чувствительность и специфичность иммуноферментного анализа с целью повышения или снижения предела обнаружения антигенов или антител для раннего выявления заболеваний в лабораторной диагностике и создания диагностических тест-систем нового поколения.

Ключевые слова: наночастицы, тиреоглобулин щитовидной железы человека, наноносители, серебро, золото, полистирол, иммунодиагностика

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-106-111

Изучение аутоиммунных заболеваний щитовидной железы является одной из актуальных задач современной эндокринологии [1]. Одним из основных патогенетически значимых аутоантигенов щитовидной железы является тиреоглобулин [2, 3]. Тиреоглобулин — антигенный фактор, к которому формируются аутоантитела при диффузном токсическом зобе и аутоиммунном тиреоидите, представляет собой гликозилированный белок с молекулярной массой 667 кДа, участвующий в биосинтезе тиреоидных гормонов щитовидной железы — тироксина и трийодтиронина [3]. Выявление аутоантител к тиреоглобулину может служить важным иммунологическим критерием диагностики аутоиммунных заболеваний щитовидной железы (тиреоидит Хашимото, Базедова болезнь и другие) [4].

Из литературы известно [5], что при иммобилизации биомолекул на частицах большого

диаметра (микро- и макроносители) возможна экранизация активных центров биомолекулы, а также изменение ее нативной конформации в результате прочной многоточечной адсорбции на поверхности носителя. Данное явление в дальнейшем может негативно сказываться на иммунологических свойствах биомолекулы при ее аффинном взаимодействии с детектируемой молекулой или рецептором клеточной мембраны. Использование частиц малого размера (наночастиц) в качестве носителей позволит сохранить нативную форму иммобилизованных биомолекул, тем самым обеспечит их высокую активность.

Целью работы являлось изучение влияния наноносителей различной природы на иммунологические свойства моноклональных аутоантител к тиреоглобулину щитовидной железы при конструировании конъюгатов «носитель-биолиганд».

Список сокращений: ТГ — тиреоглобулин, моноАТ — моноклональные антитела, ИФА — непрямой иммуноферментный анализ

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

Получение наночастиц различной природы в диапазоне 40–700 нм с узким распределением по размеру.

Получение тиреоглобулина (ТГ) и моноклональных антител (моноАТ) к разным эпитопам ТГ.

Иммобилизация моноАТ к ТГ на поверхности синтезированных наночастиц.

Изучение влияния наноносителей на иммунологические свойства иммобилизованных моноАТ к ТГ.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Металлические наноносители получали методом химического восстановления танином солей серебра (AgNO_3) и золота (HAuCl_4) [6]. Наночастицы полистирола получали методом гетерофазной полимеризации в отсутствие ПАВ и в присутствии его избыточного количества [7].

Размер наночастиц определяли методом просвечивающей электронной микроскопии на приборе JEM-2100 (JEOL, Япония), как описано в [8]. ξ — потенциал наночастиц измеряли методом электрофоретического рассеяния света на приборе Zetasizer (Malvern, Англия) [9].

Моноклональные антитела получали методом *in vivo*. Мышам вводили по 0,5 мл пристана, затем через 1–2 недели внутрибрюшинно инокулировали 1,0 мл суспензии гибридных клеток в дозе $(2-4) \cdot 10^6$ с последующим отбором асцитной жидкости. В качестве биологически активных молекул при конструировании конъюгатов «носитель-биолиганд» использовали аффинно-очищенные моноклональные аутоантитела к различным эпитопам тиреоглобулина щитовидной железы человека (МкАТ 1. и МкАТ 2.) [10,11]. Моноклональные антитела МкАТ 1. и МкАТ 2. (является конкретным названием моноклонального антитела) очищали, предварительным осаждением в присутствии раствора сульфата аммония при 50% насыщении, после диализа против 0,01 М раствора фосфатного буферного раствора pH 7,2. Полученные образцы моноАТ (МкАТ 1. и МкАТ 2.) наносили на аффинную колонку с сорбентом Сефароза 4 В, связанным с тиреоглобулином. После очистки моноАТ концентрировали с помощью системы «AMICON®» до концентрации 1,0 мг/мл. Исследование специфичности, эфektorных свойств МкАТ проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Синтез пероксидазных конъюгатов проводили периодатным методом по Nakane et al. [12].

Конъюгат стабилизировали внесением бычьего сывороточного альбумина (БСА) до концентрации БСА 10 мг/мл и хранили при минус 20 °С.

Тиреоглобулин выделяли из супернатанта, полученного в результате ультрацентрифугирования (при 105000 g в течение 60 мин при +4 °С) гомогената ткани щитовидной железы. Степень очистки ТГ контролировали методом электрофореза в 5% полиакриламидном геле [13,14]. Тиреоглобулин на электрофореграмме определялся как димер с молекулярной массой 660 кДа. Концентрацию белка определяли методом Лоури [15]. Степень очистки ТГ составила 98%.

Реакцию связывания наночастиц с моноАТ подтверждали электрофорезом белков в полиакриламидном геле [13].

Условия проведения электрофореза: постоянное напряжение 100 В, время 45 мин, температура 20 °С, буфер для электрофореза: 25 мМ трис, 192 мМ глицин, pH 8,3.

Исследование влияния иммобилизованных наночастиц на иммунологические свойства аутоантител проводили методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) [10].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наночастицы серебра (Ag) и золота (Au) были получены методом химического восстановления танином солей (AgNO_3) и (HAuCl_4) в присутствии буферного раствора тетрабората натрия с pH=9. Методом гетерофазной полимеризации в отсутствие ПАВ были синтезированы полистирольные микросферы с диаметром 40–700 нм (St1 и St2). Процесс проводили при 70 °С в течение 24 ч до полной конверсии мономера. В качестве инициатора использовали персульфат калия ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) в количестве 1% масс. в расчете на мономер, концентрация мономерной фазы составляла 10% масс. в расчете на систему.

Методом просвечивающей электронной микроскопии на приборе Jeol JEM -2100 (Япония) [8] установлено, что средний размер наночастиц составил для Ag — 40 нм, Au — 40 нм, St1 — 49 нм и St2 — 706 нм. Коэффициент вариации размера всех видов наночастиц находился в интервале от 4,8 до 5%.

Иммобилизацию моноклональных аутоантител на полученных наноносителях проводили методом физической адсорбции смешивая 1,0 мл раствора антител МкАТ 1. и МкАТ 2. с 1,0 мл раствора наночастиц, с концентрациями 2, 4, 8, 16, 32, 64 мг/мл. Инкубировали при температуре 37 °С, в течение 12 ч на орбитальном шейкере при 200–250 об/мин.

Сравнение оптических плотностей коллоидного раствора серебра до и после добавления в него аутоантител.

Comparison of the optical densities of a colloidal silver solution before and after the addition of autoantibodies to it.

| Концентрация наночастиц в растворе | Оптическая плотность раствора без аутоантител | Оптическая плотность раствора после добавления аутоантител |
|------------------------------------|---|--|
| 2 мкг/мл | 1,392 | 0,382 |
| 4 мкг/мл | 2,577 | 0,888 |
| 8 мкг/мл | 4,104 | 1,942 |
| 16 мкг/мл | 4,592 | 3,954 |

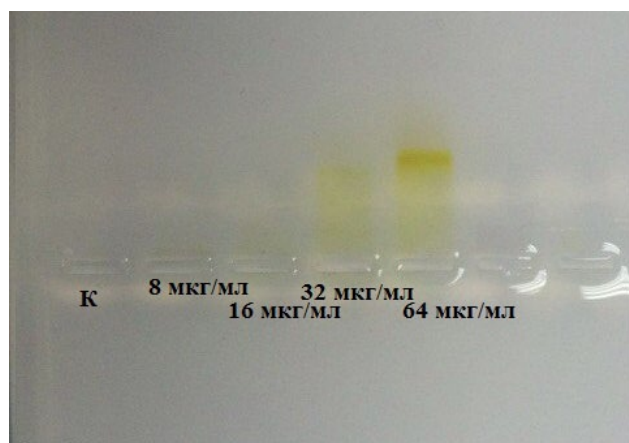


Рис. 1. Электрофорез конъюгатов «наночастицы серебра- аутоантитело».

Fig. 1. Electrophoresis of conjugates “silver nanoparticles-autoantibodies”.

Наличие связывания наночастиц с моноАТ подтверждали электрофорезом в агарозном геле. На рис.1 представлена фотография геля после проведения электрофореза иммобилизованных моноАТ с наночастицами серебра различной концентрации.

При электрофоретическом разделении белков после окрашивания геля золем с наночастицами серебра желтого цвета конъюгат «наночастицы серебра-аутоантитело» визуализируется при концентрации наночастиц 64 мкг/мл. Количество связавшихся наночастиц пропорционально интенсивности окрашенной полосы аутоантител, а несвязавшихся частиц — интенсивности фона трека. Количество связанных наночастиц составляет примерно 90% от общего количества.

При меньшей концентрации наночастиц серебра чувствительность метода определения белка в геле недостаточна для детекции в оптическом диапазоне. Концентрация серебра в окрашивающем растворе для определения белка в геле составляет 0,5% (масса/объем), концентрация наночастиц в растворе для синтеза

конъюгата с аутоантителами составляет 6,4%. Полученные результаты согласуются с известными сведениями о возможности определения белка в гелях с использованием растворов с серебром [ОФС.1.2.1.0023.15 Электрофорез в полиакриламидном геле, ГФ XIV]

Формирование конъюгатов «наночастица — аутоантитело», изучали при исследовании оптической плотности раствора наночастиц серебра до и после добавления в него моноАТ. В табл. 1 приведены данные исследования оптических плотностей исследуемых растворов.

Уменьшение оптической плотности коллоидного раствора при добавлении аутоантител можно объяснить электрокинетическим потенциалом участников реакции. Так, ζ -потенциал на поверхности коллоидного раствора серебра составил — 12,9мВ, а поскольку ζ - потенциал пропорционален заряду коллоидной частицы [13], то заряд наночастицы серебра отрицательный. В свою очередь аутоантитело, добавляемое в коллоидный раствор наночастиц обладает положительным зарядом [14]. В результате взаимодействия наночастиц серебра с аутоантителами происходит электризация, разноименные заряды притягиваются, образуя конъюгат «наночастица-аутоантитело». Такая иммобилизация позволяет уменьшить концентрацию несвязанных с белками наночастиц в растворе и, соответственно, уменьшить его оптическую плотность [15].

Иммунологические свойства моноклональных аутоантител иммобилизованных на наночастицах Ag, Au и полимерных частицах (St1, St2) изучали методом ИФА. Результаты определения ТГ при аффинном взаимодействии с моноАТ иммобилизованными на полученных наночастицах представлены на рис. 2 и 3.

В контрольных экспериментах интенсивность сигнала ИФА, пропорциональна степени связывания моноАТ с ТГ, стабильна и составляет 0,43 е.о.п., полимерные микросферы (St1) со средним диаметром 49 нм (близким к диаметру

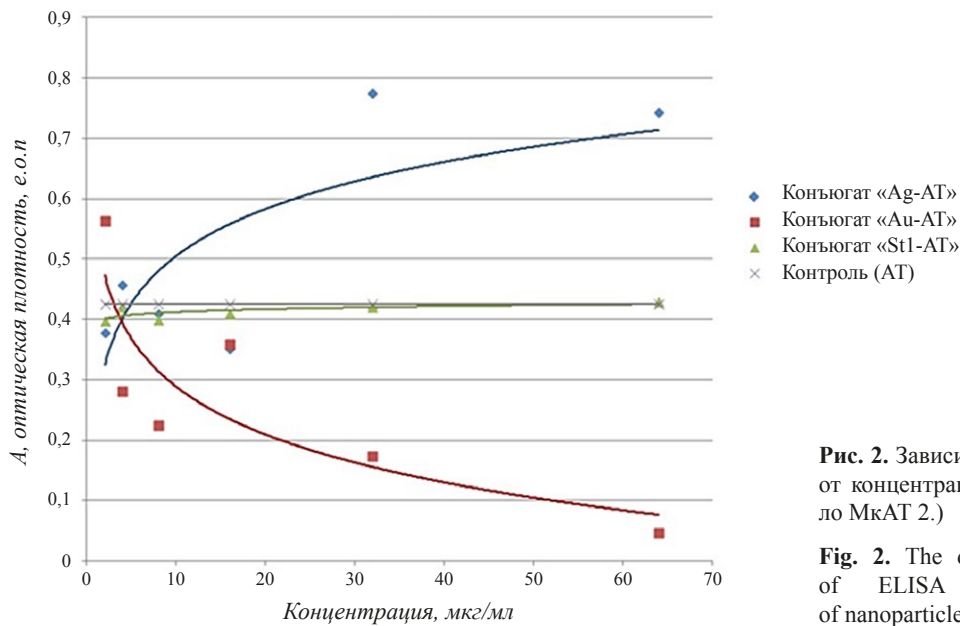


Рис. 2. Зависимость интенсивности ИФА от концентрации наночастиц (аутоантигена МкАТ 2.)

Fig. 2. The dependence of the intensity of ELISA on the concentration of nanoparticles (autoantigen MKAT 2.)

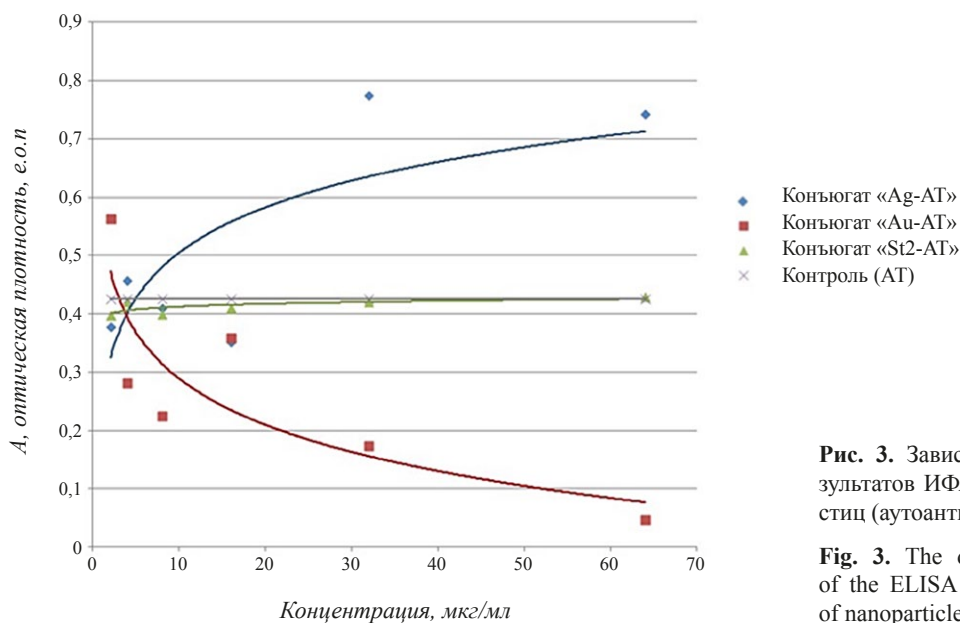


Рис. 3. Зависимость интенсивности результатов ИФА от концентрации наночастиц (аутоантитела МкАТ 1.)

Fig. 3. The dependence of the intensity of the ELISA results on the concentration of nanoparticles (autoantibody MKAT 1.)

наночастиц серебра и золота) не оказывают эффекта на связывание моноАТ с ТГ. При использовании наночастиц серебра наблюдается дозо-зависимый эффект усиления сигнала ИФА на 100% до 0,8 е.о.п. с максимумом при концентрации наночастиц 32 мкг/мл. Для наночастиц золота наблюдался обратный эффект — при концентрации наночастиц 32 мкг/мл наблюдалось снижение сигнала на 50%, а при концентрации 64 мкг/мл — полное подавление связывания моноАТ с ТГ.

В контрольных экспериментах исследовали взаимодействие наночастиц с изоферментом С пероксидазы из корней хрена. На рис. 4 представлен градуировочный график активности пероксидазы [16]. Для дальнейших экспериментов была выбрана концентрация изофермента С пероксидазы из корней хрена 300 мкМ, для которой

оптическая плотность фотометрического сигнала составляла примерно 1,0 е.о.п.

В лунки планшета вносили по 50 мкл раствора изофермента С пероксидазы из корней хрена в рабочем разведении и 50 мкл раствора наночастиц или буферного раствора для отрицательного контроля. Условия инкубации 37 °С в течение 1 ч на шейкере при 250 об/мин. Затем в каждую лунку планшета вносили 100 мкл субстратно-хромогенной смеси, содержащей 3,3',5,5' — тетра-метилбензидин. Результаты фотометрии учитывали при 450 нм.

Дозо-зависимый эффект подавления активности пероксидазы из корней хрена в присутствии наночастиц серебра и золота, проявлялся начиная с концентрации 16 мкг/мл, максимум наблюдался при 64 мкг/мл. В экспериментах

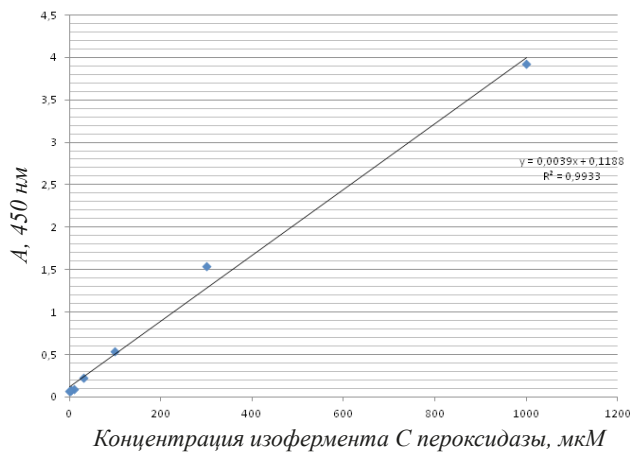


Рис. 4. Градуировочный график активности изофермента C пероксидазы из корня хрена

Fig. 4. The calibration graph of the activity of isoenzyme C peroxidase from horseradish root

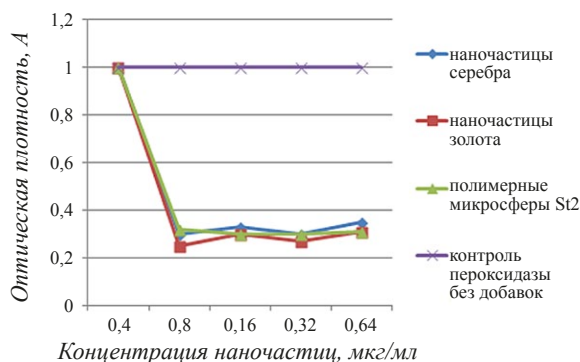


Рис. 5. Зависимость активности пероксидазы от концентрации наночастиц

Fig. 5. The dependence of peroxidase activity on the concentration of nanoparticles

с использованием полимерных микросфер St2, диаметром 49 нм, активность фермента резко снижалась начиная с концентрации 4 мкг/мл, при этом максимум подавления активности достигался уже при 8 мкг/мл (рис. 5).

Полученные результаты модулирования активности изофермента C пероксидазы из корней хрена и иммунологические реакции взаимодействия между моноклональными антителами к разным эпитомам тиреоглобулина подтверждают возможность создания биосенсоров нового поколения для улучшения аналитических характеристик иммуноферментных тест-систем, используемых в клинической лабораторной практике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучено модулирующее влияние наночастиц различной природы (золота, серебра, полимерных микросфер) в концентрациях 1–64 мкг/

мл на иммунологические свойства моноАТ к основному белку щитовидной железы — тиреоглобулину в сконструированной системе конъюгатов «наночастица-аутоантитело». Было выявлено, что использование наночастиц серебра и золота позволяет регулировать чувствительность ИФА с целью повышения или снижения предела обнаружения аутоантител к ТГ для раннего выявления заболеваний щитовидной железы в лабораторной диагностике и создания диагностических тест-систем нового поколения. При использовании наночастиц серебра наблюдается дозо-зависимый эффект усиления сигнала ИФА на 100%, с максимумом при концентрации наночастиц 32 мкг/мл. Для наночастиц золота наблюдался обратный эффект — при концентрации наночастиц 32 мкг/мл наблюдалось снижение сигнала на 50%, а при концентрации 64 мкг/мл — полное подавление связывания моноклональных аутоантител с тиреоглобулином. Полимерные микросферы с диаметром близким к диаметру наночастиц серебра и золота не оказывали эффекта на связывание моноклональных аутоантител с тиреоглобулином.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ajjan R.A., Weetman A.P. The Pathogenesis of Hashimoto's Thyroiditis: Further Developments in our Understanding. *Horm Metab Res.* 2015, 47 (10), 702–710. doi: 10.1055/s-0035-1548832
2. Naicker M., Naidoo S. Expression of thyroid-stimulating hormone receptors and thyroglobulin in limbic regions in the adult human brain. *Metab Brain Dis.* 2018, 33 (2), 481–489. doi: 10.1007/s11011-017-0076-3
3. Gentile F., Conte M., Formisano S. Thyroglobulin as an autoantigen: what can we learn about immunopathogenicity from the correlation of antigenic properties with protein structure? *Immunology.* 2004, 112 (1), 13–25. doi: 10.1111/j.1365-2567.2004.01861.x
4. De Remigs A., D de Gruijl T., Uram N J., et al. Development of thyroglobulin antibodies after GVAX immunotherapy is associated with prolonged survival. *Int J Cancer.* 2015, 136 (1), 127–37. doi: 10.1002/ijc.28973
5. Zakomirnyi V.I., Rasskazov I.L., Gerasimova V.S., et al. Titanium nitride nanoparticles as an alternative platform for plasmonic waveguides in the visible and telecommunication wavelength ranges. *Photonics and Nanostructures — Fundamentals and Applications.* July 2018, 30, 50–56. doi: 10.1016/j.photonics.2018.04.005
6. Поджарая К.С. Анализ методов получения наноразмерных частиц серебра. *Успехи в химии и химической технологии.* 2012, 136 (7), 85–87
7. Севастьянов А.В., Гарипов Р.М., Муратов И.И. Получение полистирол-полиольной суспензии в присутствии наночастиц на основе оксида кремния. *Вестник*

- Казанского Технологического Университета. 2014, 17 (10), 86–89
8. Vanifatova N.G., Spivakov B.Ya., Belogorokhov A.I. Study of properties of silicone-silica crystalline nanospheres in aqueous solutions by capillary zone electrophoresis. *Int. J. Nanoparticles*. 2010, 3 (1), 65–76
 9. Гервальд А.Ю. Синтез магнитсодержащих полистирольных микросфер. *Авторефераты диссертаций кандидата химических наук*. Москва, 2008
 10. Кузьмина Н.С., Яковлева И.В., Свиридов В.В., Зубков А.В. Моноклональные антитела к человеческой пероксидазе щитовидной железы. *Биотехнология*. 2005, 1, 51–57
 11. Vdovenko M.M., Zubkov A.V., Kuznetsova G.I., Kuzmina N.S., Sakcharov I.Yu. Development of ultra-sensitive soybean peroxidase-based CL-ELISA for the determination of human thyroglobulin. *J. Immunol. Methods*. 2010, 362 (1), 127–130. doi: 10.1016/j.jim.2010.09.016
 12. Nakane P.K. Recent progress in the peroxidase-labeled antibody method. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1975, 30 (254), 203–211. doi: 10.1111/j.1749-6632.1975.tb29170.x
 13. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970, 227, 680–685. doi: 10.1038/227680a0
 14. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979, 76 (9), 4350–4354. doi: 10.1073/pnas.76.9.4350
 15. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951, 193 (1), 265–275
 16. Зубков А.В., Свиридов В.В., Кириллова Г.А., Гаврилова Н.Ф., Кузнецова Г.И., Яковлева И.В., Шамкина Е.В., Кузьмина Н.С. Изучение эпитопной специфичности аутоантител к тиреоидной пероксидазе при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы. *Клиническая и экспериментальная тиреоидология*. 2011, 7 (2), 43–48

Effect of Nanocarriers of Different Nature on the Immunological Characteristics of Immobilized Monoclonal Autoantibodies to Thyroglobulin

A.M. STOINOVA^{1*}, A.V. ZUBKOV², and Ya. M. STANISHEVSKIY¹

¹ Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 117198, Moscow Russia

² Research Institute of Vaccines and Serums named after I.I. Mechnikov, 105064, Moscow Russia

*e-mail: stoinova17@mail.ru

Received March 23, 2020

Revised April 9, 2020

Accepted July 24, 2020

Abstract—The immunological properties of monoclonal autoantibodies to thyroid thyroglobulin in the construction of carrier-bioligand conjugates have been studied. Silver and gold nanoparticles 40–50 nm in size of and polymer microspheres (706 nm) were obtained. Autoantibodies were immobilized on the surface of the synthesized nanoparticles and the effect of nanocarriers on the immunological properties of immobilized monoclonal autoantibodies to thyroglobulin was studied by ELISA. It was found that the use of silver and gold nanoparticles allows you to adjust the sensitivity and specificity of the enzyme-linked immunosorbent assay in order to increase or decrease the detection limit of antigens or antibodies for early laboratory diagnostics of diseases and the creation of new-generation diagnostic test systems.

Key words: nanoparticles, human thyroid gland thyroglobulin, nanocarriers, silver, gold, polystyrene, immunodiagnosics

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-106-111