

**ПЕРСПЕКТИВНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ
В РАЗРАБОТКЕ ИММУНОСЕНСОРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ CD5 РЕЦЕПТОРА
В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

А.В. Тамашевский¹, Ю.М. Гармаза¹, Е.И. Белевич²

¹*Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий,
Минск, tayzoe@gmail.com*

²*Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им.
Н.Н. Александрова, п. Лесной, Минский р-н, Беларусь*

Традиционные методы диагностики гематологических онкозаболеваний: иммуногистохимия, биопсия, цитофлуориметрия обладают высокой чувствительностью и специфичностью, но при этом требуют дорогостоящего оборудования высококвалифицированного персонала для работы на нем, что, в конечном итоге, повышает стоимость диагностики. В этой связи представляется актуальным разработка простой, доступной диагностической технологии, которая сможет расшириться за пределы традиционных клинических лабораторий до амбулаторных условий. В качестве одной из современных технологий, способных решить такую задачу, выступают биосенсоры. Эта нанотехнология основана на распознавании биологического сигнала и дальнейшей трансформации “биоответа” в физический сигнал. Схематически устройство биосенсора включает в себя: основу, биорецептор, трансдуктор и анализируемый ответ. В нашем исследовании в качестве основы для биосенсора будут использованы различные формы наноструктурированного оксида цинка, т.к. данный наноматериал химически стабилен, имеет большую площадь свободной поверхности, биосовместим и способен проявлять флуоресцентные свойства. Эти особенности оксида цинка помогают сохранить биологическую активность иммобилизованных биомолекул (клеток, белков) и помогают в достижении высокой чувствительности при создании оптического биосенсора, где фотолюминесценция (ФЛ) будет являться физическим сигналом. Более того, комбинация ZnO с металлическими частицами Au или Ag позволяет формировать наиболее эффективные биосенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса (ППР), что может также служить основой для разработки ППР-биосенсора.

Недавние исследования продемонстрировали ценность кластера дифференцировки 5 (CD5 – гликопротеин клеточной поверхности, обнаруженный на специфических иммунных клетках, в первую очередь Т-клетках и лимфоцитах В-1а) как диагностического и прогностического биомаркера при различных заболеваниях [1]. Например, при онкологических заболеваниях, таких как В-клеточный хронический лимфолейкоз [2] и мантийноклеточная лимфома [3]. Более того, в редких случаях лейкозов и лимфом В-типа также сообщается о слабой aberrантной экспрессии CD5 [4].

Помимо мембраносвязанного CD5, в сыворотке человека в пико/наномолярном диапазоне обнаружена циркулирующая растворимая форма CD5 (sCD5), возникающая в результате протеолитического расщепления после активации лимфоцитов [5]. Более того, повышенные уровни sCD5 были зарегистрированы в сыворотке пациентов с некоторыми аутоиммунными и воспалительными заболеваниями, такими как синдром Шегрена [6], ревматоидный артрит [7], синдром системно-

го воспалительного ответа [8] и системную красную волчанку [9], при которой происходит активация лимфоцитов.

Тот факт, что sCD5 лимфоидных рецепторов взаимодействует с различными эндогенными и экзогенными лигандами (некоторые из которых до сих пор не изучены), побудил к проведению доклинических исследований инфекционных, аутоиммунных и онкологических процессов [1, 10]. В связи с этим актуальной задачей представляется разработка иммуносенсора, способного обнаруживать белок CD5 с чувствительностью, превосходящей существующие лабораторные методы.

Цель работы – изучить механизмы взаимодействия между моноклональными антителами/антигенами/патологическими клетками крови человека и поверхностью 1D фотонных наноструктур на основе оксида цинка/золота для возможности разработки оптических и ППП-иммуносенсоров с последующим применением в ранней диагностике онкогематологических заболеваний.

Материалы и методы. В работе использована коммерческая Т-лимфобластоидная клеточная линия MOLT-4 (получена от пациента с острым Т-лимфобластным лейкозом), которая сверхэкспрессирует на своей поверхности CD5 рецептор (80-85% CD5-позитивных клеток в популяции по оценке методом проточной цитофлуориметрии, Guava easyCyte 8HT, Merck). В качестве антигена для изучения взаимодействия «антиген-антитело» использовали рекомбинантный человеческий белок CD5 (R&D), в качестве антител – моноклональные антитела против CD5: анти-CD5 (R&D) и анти-CD5-FITC (Beckman Coulter).

Для приготовления биосенсорных платформ на основе 1D наноструктурированного оксида цинка (ZnO) использовали следующие подходы:

1) На кварцевые стекла (подложка) наносили стоковый раствор наностержней (НС) ZnO и высушивали при комнатной температуре (22°C, 12 ч) с последующим отжигом в муфельной печи (350°C, 2 ч).

2) На кварцевом стекле методом низкотемпературного водно-химического синтеза выращивали нанопроволоку (НП) оксида цинка. В качестве прекурсоров образования стержневидных наночастиц оксида цинка использовали нитрат цинка и гексаметиленetetрамин.

3) Тонкие слои ZnO наносили поверх нановолокон из полиакрилонитрила (PAN) с помощью метода атомно-слоевого осаждения при 100°C и последовательном воздействии диэтилцинка и деионизированной воды, разделенных продувкой сухим аргоном.

После этого платформа была готова для дальнейшей иммобилизации моноклональных антител (МкАт) – анти-CD5, которая проводилась, как методом физической абсорбции, так и путем ковалентного присоединения белка к поверхности оксида цинка.

Морфологию поверхности платформ на основе 1D наноструктурированного ZnO исследовали методами сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на оборудовании JEOL-JSM7001F или Hitachi S-4800 FE-SEM.

Оценку особенностей взаимодействия поверхностей ZnO с антителами/протеинами А/Г до и после функционализации проводили с помощью инфракрасного спектрометра с Фурье-преобразованием Jasco FTIR 4700.

Фотолюминесцентные измерения проводили с использованием лазера Heshingle bondCd (325 нм) и спектрометра Ocean Optics USB4000.

Двухфотонную лазерную флуоресцентную конфокальную микроскопию (Zeiss LSM 780, лазер Coherent Chameleon с длиной волны возбуждения 700 нм) использовали для оценки степени покрытия антителами поверхности ZnO.

Активированный сенсорный диск с золотым покрытием (SD AU, XanTec Bioanalytics) помещали на полуцилиндр, устанавливали в двухканальный ППП-анализатор Autolab SPR Esprit (Metrohm Autolab BV) и помещали в кювету (площадь поверхности 7,9 мм² в одном канале). Антитела против CD5 иммобилизовали в обоих каналах кюветы анализатора поверхностного плазмонного резонанса.

Микрофлюидные измерения проводили в кварцевой микрожидкостной ячейке (допустимый оптический диапазон: 170–2700 нм, v = 600 мкл, w = 8 мм, d = 2 мм, h = 40 мм, Starna Cells). Впускной и выпускной диаметр трубок составлял 0,9 мм (внутренний диаметр: 0,36 мм).

Результаты. На сегодняшний день одними из широко применяемых материалов для использования в биосенсорах являются наноструктуры одномерных оксидов металлов (в частности на основе оксида цинка, ZnO). Высокая изоэлектрическая точка (pH 9,5) дает возможность адсорбироваться на поверхности ZnO объектов с более низкой изоэлектрической точкой (например, белкам), а разнообразная структурная морфология таких наноматериалов расширяет возможности исполь-

зования ZnO для иммобилизации биологических молекул при создании иммуносенсоров. В данной работе мы провели тестирование различных форм наноструктурированного оксида цинка: стержней, проволоки и волокон.

Показано, что фотолюминесцентные спектры наностержней ZnO демонстрируют сильное излучение на краю ближней полосы излучения (380 нм). Мы использовали эту часть спектров ФЛ для оценки платформ на основе ZnO НС до и после иммобилизации антител и взаимодействия с лимфоцитами человека. Исследования на основе СЭМ и ФЛ показали, что МкАт в концентрации 6,25 мкг/мл оптимально модифицируют подложки на основе стекла/ZnO НС, обеспечивая монослойное покрытие и демонстрируя максимальный ФЛ сигнал. Более того, мы показали, что богатые электронами группы, такие как SH-, OH-, NH₂- МкАт, усиливают ФЛ ZnO НС [12]. Таким образом, взаимодействие ZnO с протеинами основано, помимо сил Ван-дер-Ваальса, на электростатических взаимодействиях. Показано, что Т-лимфобластоидные клетки, модифицированные анти-CD5-FITC, связываются с платформами ZnO НС с высокой селективностью. В ходе детекции клеточной популяции установлено, что сигнал ФЛ платформы «стекло/Zn НС/MOLT4+анти-CD5» увеличивается на 50-70%. При этом, увеличение интенсивности фотолюминесценции ZnO НС коррелировало с количеством CD5-позитивных клеток в исследованных популяциях. После расчета удельной чувствительности полученной платформы, было установлено, что показатели фотолюминесценции ZnO НС в ближней полосе излучения пригодны для создания иммуносенсоров для определения Т-лимфобластов человека при очень низких концентрациях – от 3 до 128 клеток на 1 мм² ZnO НС [13].

Тем не менее, изготовление чувствительных биосенсоров на основе ZnO, остается до сих пор большой проблемой. Для прочного взаимодействия биомолекул с поверхностью наноматериала необходимо использовать различные органические и функциональные группы, чтобы сформировать ковалентное взаимодействие. Такие функционализированные наноструктуры (нанокomпозиты) и иммобилизованные на их поверхность биорецепторы (элементы распознавания аналита, напр. белки), составляют в итоге биоселективный слой, который служит основой для “захвата” анализируемого биообъекта (в нашем случае – клеток).

Поэтому, на следующем этапе работы, с использованием наноструктурированного ZnO и платформ на его основе – нанопроволоки ZnO и нановолокон ZnO-полиакрилонитрила, которые характеризуются большей свободной площадью поверхности по сравнению с наностержнями, было изучено влияние различных видов функционализации на эффективность и стабильность биосенсорных платформ. Нами подробно описаны оптические и структурные свойства ZnO НП и ZnO-PAN после их функционализации 3-аминопропилтриэтоксисиланом/глутаровым альдегидом [14] и иммобилизации моноклональных антител с использованием различных подходов – с добавлением и без протеинов A/G для улучшения степени ориентации антител [15]. Нами также была продемонстрирована возможность флуоресцентного обнаружения Т-лимфобластных клеток человека с использованием ковалентного покрытия биомолекулами поверхности нанопроволоки и нановолокон ZnO-полиакрилонитрила. Показано, что Т-лимфобласты связываются с МкАт-мишенями ZnO НП и ZnO-PAN с высокой селективностью и значительно увеличивают фотолюминесцентный сигнал в микрофлюидной системе. При этом, увеличение интенсивности фотолюминесценции ZnO НП и ZnO-PAN также коррелировало с количеством CD5-позитивных клеток в исследованных популяциях. С помощью СЭМ были исследованы структурные свойства сформированных платформ до и после иммобилизации лимфобластов и обнаружено появление ламеллоподий. Таким образом, одномерные ZnO НП и ZnO-PAN обладают оптическими свойствами, подходящими для эффективного мониторинга флуоресцентного сигнала от биологической системы «ZnO НП (ZnO-PAN) /МкАт/клетки» в жидкой ячейке. Данные условия максимально приближены к тем, которые используются в биосенсорных чипах или тест-системах.

Важным преимуществом иммуносенсоров на основе технологии поверхностно-плазмонного резонанса по сравнению с традиционными методами анализа взаимодействия «антиген-антитело» является то, что они способны обеспечить обнаружение аналитов в режиме реального времени без каких-либо меток. ППП-иммуносенсоры обладают высокой чувствительностью, что позволяет обнаруживать чрезвычайно низкие концентрации белка в относительно небольшом объеме образца. Кроме того, они способны обнаруживать и количественно определять аналиты в растворах с высоким содержанием посторонних веществ, что устраняет необходимость в трудоемкой процедуре пробоподготовки.

В данной работе мы представляем результаты по разработке ППП-иммуносенсора на основе функционализированных антителами против CD5 белка человека (анти-CD5) золотой поверхности

для количественного определения CD5 рецептора. Захватывающие антитела анти-CD5 были иммобилизованы на золотой поверхности сенсорного диска ППР. Чтобы определить оптимальные условия для обнаружения CD5, сначала выявили оптимальную концентрацию раствора захватывающего анти-CD5-антитела, используемого для иммобилизации, и продолжительность процесса иммобилизации. Чувствительность оптимизированного ППР-иммуносенсора исследовали путем анализа растворов различных концентраций CD5 в 10 mM PBS (pH 7,4). Сенсограммы ППР, зарегистрированные для растворов с концентрациями CD5 от 10 до 100 нг/мл, находились в диапазоне от 42 до 125 пг/мм² активной поверхности золотого диска [16]. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования метода ППР для создания иммуносенсоров с целью выявления маркеров онкогематологических заболеваний в сыворотке или плазме крови человека.

Заключение. Синтезированы и охарактеризованы различные типы платформ на основе 1D наноструктурированного ZnO с целью их использования для создания иммуносенсоров. С помощью микрофлюидной системы исследована способность наноплатформ ZnO узнавать T-лимфобластные клетки по их связыванию с CD5 антителом. Такая биосенсорная система с использованием наноструктур ZnO и анализа сигнала фотолуминесценции была предложена впервые. Продемонстрирована возможность разработки быстрого иммуносенсорного анализа без меток с использованием метода ППР на примере обнаружения белка CD5.

Благодарности. Данная работа поддержана грантами EU Horizon 2020 research and innovation programme H2020-MSCA-RISE № 778157 (2018–2023) и БРФФИ № Б20МС-029 (2020).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Velasco-de Andrés M., Casadó-Llobart S., Català Cr., Leyton-Pereira A., Lozano F. and Aranda F. Soluble CD5 and CD6: Lymphocytic Class I Scavenger Receptors as Immunotherapeutic Agents // Cells – 2020, Vol.9, P. 2589.
2. Herishanu Y., Pérez-Galán P., Liu D., Biancotto A., Pittaluga S., et al. 2011. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-κB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia // Blood – 2011, Vol. 117, P. 563–574
3. A Pileri St., Falini B. Mantle cell lymphoma // Haematologica – 2009, Vol. 94, No. 11, P. 1488–1492.
4. Jaseb K., Purrahman D., Shahrabi S., Ghanavat M., Rezaeean H., Saki N. Prognostic significance of aberrant CD5 expression in B-cell leukemia // Oncology Reviews – 2019, Vol. 13:400, P. 77–82.
5. Calvo J., Places L., Espinosa G., Padilla O., Vilà J.M., et al. Identification of a natural soluble form of human CD5. Tissue Antigens – 1999: Vol.54, Iss.2, P.128–137
6. Ramos-Casals M., Font J., García-Carrasco M., Calvo, J., Places, L., et al. High circulating levels of soluble scavenger receptors (sCD5 and sCD6) in patients with primary Sjögren's syndrome // Rheumatology – 2001, Vol. 40, Iss. 9, P. 1056–1059.
7. Wu, F., Gao, J., Kang, J., Wang, X., Niu, Q., Liu, J., Zhang, L. B Cells in Rheumatoid Arthritis: Pathogenic Mechanisms and Treatment Prospects // Front. Immunol. – 2021, Vol. 12, P.1–14.
8. Aibar J., Martínez-Florensa M., Castro P., Carrasco E., Escoda-Ferran Cr., et al. Pattern of soluble CD5 and CD6 lymphocyte receptors in critically ill patients with septic syndromes // Journal of Critical Care – 2015, Vol. 30, Iss. 5, P. 914–919.
9. Hagn M., Ebel V., Sontheimer K., Schwesinger E., Lunov O., et al. CD5+ B cells from individuals with systemic lupus erythematosus express granzyme B // Eur. J. Immunol. – 2010, Vol. 40, P. 2060–2069.
10. Burgueño-Bucio E., Mier-Aguilar C. A., Soldevila G. The multiple faces of CD5 // J. Leukoc. Biol. – 2019, Vol.105, Iss. 5, P. 891–904.
11. Harmaza Y., Tamashevski A., Viter R., Slobozhanina E. Photoluminescent zinc oxide nanorods – a new tool for detection of human leukemic cells // HemaSphere – 2018, Vol. 2, S1., P. 738.
12. Tamashevski A., Harmaza Y., Viter R., Jevdokimovs D., Poplausks R., et al. Zinc oxide nanorod based immunosensing platform for the determination of human leukemic cells // Talanta – 2019, Vol. 200, P. 378–386.
13. Tamashevski A., Harmaza Y., Slobozhanina E., Viter R., Iatsunskyi I. Photoluminescent Detection of Human T-Lymphoblastic Cells by ZnO Nanorods // Molecules – 2020, Vol. 25(14), P.3168.
14. Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В. Синтез, биофункционализация и тестирование 1D платформ на основе нанопроволоки оксида цинка с целью создания иммуносенсора // Фуллерены и наноструктуры в конденсированных средах – 2022, С. 47–52

15. Tamashevski A., Harmaza Y., Iatsunskyi I. Surface functionalization strategy for the development of cancer cell immunosensors based on 1D ZnO nanostructures // Book of Abstracts of the International Conference & Exhibition NanoTech Poland 2019 & Nanotechnology and Innovation in the Baltic Sea Region (5th–8th June 2019, Poznań, Poland) – 2019, P. 167.

16. Kanash J., Bialevich K., Tamashevski A. Evaluation of the interaction between human cluster of differentiation 5 protein and monoclonal antibodies against it by surface plasmon resonance analysis // Book of abstracts of the International scientific conference "Nanomaterials for biosensors and biomedical applications" (Jurmala, Latvia, 2–4 July 2019) – 2019, P. 57.