

- (11) Patento numeris: **6762** (51) Int. Cl. (2020.01): **C12N 9/00**
C12Q 1/00
G01N 33/00
- (21) Paraiškos numeris: **2018 548**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2018-11-07**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2020-05-11**
- (45) Patento paskelbimo data: **2020-09-10**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
- (30) Prioritetas: —
- (72) Išradėjas:
Kęstutis STRUPAS, LT
Aistė GULLA, LT
- (73) Patento savininkas:
Vilniaus Universitetas, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, LT
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Jurga PETNIŪNAITĖ, AAA Law, A. Goštauto g. 40B, Verslo centras „Dvyniai“,
LT-03163 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Neinvazinis požiūris į ankstyvą ūmaus, sunkaus pankreatito diagnozę ir
prognozę, pagrįstas karščio šoko baltymų veikimo mechanizmu

- (57) Referatas:

Šis išradimas susijęs su sunkaus pankreatito ankstyvosios diagnostikos būdu, naudojant ląstelių membranos pažeidimų nustatymo mechanizmus. Šis būdas apima neinvazinį žmonių šlapimo ar kitų kūno skysčių mėginių tyrimą, kai įtariama, kad jie serga ūminiu pankreatitu. Išradimas yra pagrįstas karščio šoko baltymų HSP-70, 90, 60 ir 27 veikimo mechanizmu ligos eigoje.

Išradimo sritis

Ankstyvas, sunkaus pankreatito diagnostikos būdas, naudojant ląstelių membranos pažeidų nustatymo mechanizmus.

Techninis lygis

Ūminis pankreatitas (ŪP) yra viena iš dažniausiai pasitaikančių gastroenterologinių ligų, o apie 2% visų į ligoninę atvežtų pacientų yra diagnozuojama ši liga (Fagenholz, Castillo ir kt., 2007). 100 000 gyventojų tenka nuo 10 iki 46 ŪP atvejų per metus. Tačiau nei ligos etiologija, nei patofiziologija nėra visiškai suprantama, todėl gydymo galimybės, nukreiptos į konkrečią esminę priežastį lieka neatrastos (Lerch ir Gorelick 2013; Niederau, Ferrell ir Grendell 1985). Tai sukėlė susidomėjimą studijuoti pradinius ŪP įvykius, siekiant sukurti naujus klinikinėje praktikoje naudojamus gydymo būdus.

Ūminis pankreatitas daugeliu atvejų yra lengvas ir be sunkių komplikacijų. Nepaisant to, jis siejamas su iki 20 % pacientų sergamumu ir mirtimis (Lerch ir Gorelick 2013; Bhatia ir kt., 2005). Nors ŪP buvo intensyviai tiriamas dešimtmečius, tačiau pankreatito proceso patofiziologija nėra visiškai suprantama ir nebuvo sukurtas konkretus ar veiksmingas gydymas (Lerch ir Gorelick 2013; Sah ir Saluja 2011).

Pradinė diagnozė atliekama remiantis klinikiniais simptomais, kraujo tyrimų duomenimis (kasos amilazės arba lipazės koncentracija serume yra tris kartus didesnė už normalų kiekį) ir radiologiniais radiniais (pilvo ultragarsas); o liga ir jos eiga patvirtinama kompiuterine tomografija, kuri laikoma aukso standartu ir atliekama po 3-7 dienų nuo simptomų pradžios vėlyvose ūminio pankreatito stadijose. Vėlesnėse ligos stadijose atsiranda ne tik sudėtingų komplikacijų, bet ir mirtinų pasekmių. Tuo tarpu klinikinėje praktikoje taip pat naudojamos įvairios tarptautiniu mastu patvirtintos (pvz., Ransono kriterijai, modifikuotos Atlanta klasifikacijos) ligos sunkumo skalės, paprastai vertinamos praėjus 48 valandoms nuo priėmimo į ligoninę. Šiuo metu klinikinėje praktikoje nėra jokių neinvazinių tyrimų ankstyvai ŪP diagnozei ar prognozei.

Karščio šoko baltymai jau seniai žinomi. Molekuliniai šaperonai yra baltymų aparatai, kurie yra atsakingi už teisingą kitų baltymų sulankstymą, stabilizavimą ir funkciją. Ląstelės reaguodamos į aplinką, įskaitant šilumos šoką, alkoholius,

sunkiuosius metalus arba oksidacinį stresą, gamina šaperonus, paprastai vadinamus karščio šoko baltymais (Hsp). Karščio šoko baltymas 90 (Hsp90) sudaro apie 1-2 % visų ląstelinių baltymų ir paprastai yra ląstelėje kaip dimeras. Tai molekulinis šaperonas, atsakingas už nuo ATP priklausomą sulankstymą, stabilumą ir funkciją daugelio „kliento“ baltymų, susijusių su vėžio vystymusi ir progresavimu. Šie „kliento“ baltymai yra ErbB2, c-Raf, Cdk4, mutantinis p53, hTERT, Hif1- α ir estrogeno / androgeno receptoriai. Hsp90 slopinimas sukelia onkogeninių kliento baltymų vienalaikį, kombinatorinį destabilizavimą ir degradaciją, o tai veda prie ilgalaikės atakos prieš visus vėžio padarinius, įskaitant neribotą proliferaciją ir išgyvenimą, invazyvumą, metastazes ir angiogenezę. Manoma, kad vėžio ląstelės yra labiau jautrios Hsp90 slopinimui nei atitinkamos normalios ląstelės (Workman 2004). Kita vertus, Hsp90 inhibitorių terapinis selektyvumas yra įtempta vėžio ląstelių būklė, atsiradusi dėl onkogeninių mutacijų ir nereguliuojamų signalinių kelių, bei aplinkos veiksnių, tokių kaip hipoksija, acidozė ir maistinių medžiagų trūkumas. Be to, buvo publikuota, kad piktybinėse ląstelėse aptinkamas Hsp90 egzistuoja daugiausia supersšaperono komplekse, kuris Hsp90 inhibitorius prisijungia daug efektyviau nei nekompleksinė forma, kuri dažniausiai randama sveikose ląstelėse (Dymock ir kt., 2004).

Rakonczay ir kt. teigia, kad cerulino pankreatito atveju daugėja (Weber ir kt., 1995; Ethridge ir kt., 2000; Bhagat ir kt., 2002) arba mažėja (Strowski ir kt., 1997, 1997; ZJ Rakonczay, Mandi ir kt., 2002) kasos sintetinių HSP60 ir HSP72. Ethridge ir kt. (2000) nustatė, kad kasos HSF-1 prisijungimo aktyvumas buvo padidėjęs esant cerulino sukeltam ūminiam pankreatitui, bei taip pat buvo padidėję HSP70 ir HSP27 kiekiai, tuo tarpu HSP60 ir HSP90 kiekiai nebuvo pakitę. Panašiai, Weber ir kt. (1995) parodė, kad cerulinas sukėlė kasos HSP70 mRNR ir baltymų raišką. Vis dėlto, gydymas sekretagogais nepakeitė ubikvitino mRNR. Naudojant priešprasminius oligonukleotidus, Bhagat ir kt. (2002) parodė, kad cerulino sukelta HSP72 ekspresija apriboja ligos sunkumą žiurkėms. Strowski ir kt. (1997) pastebėjo, kad cerulino laiko ir dozės priklausomybė didina mRNR, bet, paradoksaliai, sumažina kasos HSP60 ir HSP70 baltymų kiekį žiurkėse. Remiantis jų tyrimu, parodėme, kad pakartotinės supramaksiminės 5 dienų cholecistokinino-oktapeptido (CCK) dozių injekcijos sumažina kasos HSP60 ir HSP72 lygį (Rakonczay ir kt., 2002d). Netoksiško BRX-220 vartojimas padidina kasos HSP60 ir HSP72 sintezę ligos eigoje

(Z.J. Rakonczay, Ivanyi ir kt., 2002).

Be to, kasos HSP32 mRNR raiška yra sparčiai reguliuojama, o baltymų lygis pelėse padidėjo tik šiek tiek esant cerulino sukeltam ūminiam pankreatitui (Fu ir kt., 1997). Mokslininkai nustatė, kad HSP32 buvo išreikštas labai nedideliu baziniu lygiu kasoje *in vitro* ir acinuso ląstelėse *in vitro* (Sato ir kt., 1997). Cerulino sukeltas ūminis pankreatitas buvo susijęs su reikšmingu kasos HSP32 raiškos padidėjimu 12-24 val. po pirmųjų intersticinės edemos požymių žiurkių kasose. Įdomu tai, kad cerulino pridėjimas į AR42J acinuso ląstelių kultūros terpę neturėjo įtakos HSP32 lygiui.

TABLE 3. Effects of acute pancreatitis on pancreatic HSP levels

Acute pancreatitis	Species	HSP levels	Reference
Cerulein	Mouse	↑HSP27, HSP72 → HSP60, HSP90	Ethridge et al., 2000
Cerulein	Mouse	↑HSP32	Fu et al., 1997
Cerulein	Rat	↑HSP70 → ubiquitin	Weber et al., 1995
Cerulein	Rat	↑HSP70	Bhagat et al., 2002
Cerulein	Rat	↓HSP60, HSC70 → HSP70	Strowski et al., 1997; Weber et al., 2000
CCK	Rat	↓HSP60, HSP72	Rakonczay et al., 2002d
Cerulein	Rat	↑HSP32	Sato et al., 1997
DBTC	Rat	↑HSP70, HSC70	Weber et al., 2000
Arg	Rat	↑HSP27, HSP72, HSP60, HSP90 → GRP78	Tashiro et al., 2001
CDE	Mouse	→ HSP70	Grise et al., 2000
CDE	Mouse	↓HSP27, HSP70	Delhay et al., 2000

↑, increased; ↓, decreased; →, no change; CCK, cholecystokinin-octapeptide; DBTC, dibutyltin dichloride; CDE, choline-deficient ethionine-supplemented diet; Arg, arginine.

Kaip neseniai publikavo Giri ir kt., viena iš konservatyviausių ir geriausiai ištirtų karščio šoko baltymų šeimų yra HSP70 superšeima. Autorių teigimu, tai yra nuo ATP priklausantys šaperonai, kurių dydis svyruoja nuo 66 iki 78 kDa, o juos žmonėse koduoja 11 genų rinkinys. Įdomu tai, kad šių baltymų kiekis transkripciškai reguliuojamas karščio šoko faktoriais (HSF), susidedančiais iš keturių narių: HSF1, HSF2, HSF3 ir HSF4, todėl jie turi unikalias ir persidengiančias funkcijas, bei pasižymi audiniams specifiniais raiškos modeliais (Giri ir kt., 2017).

Kaip aprašyta aukščiau minėtose nuorodose, daugelyje tyrimų buvo įvertintas karščio šoko baltymų apsauginis vaidmuo ūminio pankreatito atveju. Straipsnyje aprašomi įvairūs tyrimai, kuriuose buvo naudojami įvairūs HSP70 raiškos metodai, įskaitant šiluminį stresą. Wagner ir kt. nustatė, kad kai žiurkės kasos acinusas buvo veikiamas karščiui, pastebėta žymiai padidėjusi 72 kDa HSP-70 molekulės raiška. Įdomu tai, kad autoriai pastebėjo, kad hipertermijos sukelta padidėjusi HSP70 ekspresija, apsaugojo nuo organų pažeidimų, cerulino sukulto pankreatito modelyje. Panašūs rezultatai buvo pastebėti net ir modeliuose, kuriuose HSP70 buvo indukuotas ne termogeniniais metodais. Pavyzdžiui, per didelę HSP70 ekspresiją naudojant beta adrenerginę stimuliaciją apsaugojo peles nuo cerulino sukulto

pankreatito. Panašiai natrio arsenito sukelta HSP70 ekspresija suteikė apsaugą cerulino ir arginino sukulto ūminio pankreatito modeliuose (Bhagat ir kt., 2008).

Kaip aprašė Giri ir kt., šie tyrimai iš esmės rodo, kad HSP70 apsaugo nuo acinuso ląstelių pažeidimo sergant pankreatitu, ir kad ši apsauga nepriklauso nuo HSP70 indukcijos būdo. Nors HSP70 buvo pagrindinis baltymas randamas po karščio streso bei farmakologinio manipuliavimo, tačiau šios intervencijos indukuoja daugybę HSP ir yra įmanoma, kad apsauginiai poveikiai, pastebėti naudojant šias intervencijas, atsiranda dėl kitų įvykių, o ne tik dėl per didelės HSP70 raiškos. Bhagat ir kt., naudodamas *in vitro* kasos lobulių kultūrą parodė, kad per didelė HSP70 raiška iš tikrųjų yra atsakinga už stebimą apsauginį vaidmenį po karščio streso.

Keli straipsniai aprašo, kad HSP yra skirtingai išreiškiamas žmonių ligose, pvz., kasos adenokarcinomoje, lėtiniame pankreatite ir normalioje kasoje. HSP90a mRNR buvo selektyviai pernelyg išreikšta sergant kasos karcinoma (Gress ir kt., 1994; Ogata ir kt., 2000). HSP70 mRNR kiekis buvo padidėjęs esant kasos adenokarcinomai ir lėtiniam pankreatitui (Gress et al. 1994).

Ūminis pankreatitas yra autodigestinis procesas, kurį sukelia kasos proteolitinių fermentų ekstravazacija, pereinanti į gretutinį audinių pažeidimą (Peery ir kt., 2012; Fagenholz, Fernándež-del Castillo ir kt., 2007). Sunkus pankreatitas gali sukelti sisteminį uždegiminio atsako sindromą ir daugelio organų pažeidimus (Fagenholz, Fernándež-del Castillo ir kt., 2007). Uždegiminis atsakas apima ir ląstelių, ir humoralinius faktorius, įskaitant citokinus, lipidų mediatorius ir reaktyviasias deguonies rūšis. Plaučiai dažnai yra uždegiminio sužalojimo, susijusio su sunkiu ūminiu pankreatitu, organas. Ūmus plaučių pažeidimas pasižymi padidėjusiu kraujagyslių pralaidumu ir neutrofilų (polimorfonukleinių leukocitų (PMN)) aktyvavimu, po kurio vyksta migracija (Fagenholz, Fernándež-del Castillo ir kt., 2007). Aktyvuoti neutrofilai išskiria fermentus, pavyzdžiui, matricos metaloproteinazės (MMP) fermentus, kad sunaikintų bakterijas ir pašalintų pažeistus audinius. Matricos metaloproteinazės veikia apdorojant matricos baltymus, citokinus, augimo faktorius ir adhezijos molekules (Z. Rakonczay ir kt., 2003). Be to, autoriai apibūdina karščio šoko baltymų vaidmenį uždegiminio proceso metu, kuris sukėlė didžiulį susidomėjimą, nes buvo parodyta, kad karščio šoko baltymai slopina uždegiminių genų ekspresiją ir turi citoprotekcinį poveikį eksperimentiniuose modeliuose (Whitcomb 2004). Išsamesnė informacija apie HSP70 apsauginį

vaidmenį aprašyta Dudeja ir kt. (Dudeja, Vickers ir Saluja 2009).

HSP vaidmuo apsaugant nuo pankreatito buvo ištirtas įvairiuose *in vitro* ir *in vivo* pankreatito modeliuose. Remiantis HSP apsauginiu vaidmeniu nuo pažaidų, buvo įrodyta, kad ankstesnė HSP60 indukcija, kurią sukelia stresas žiurkės panardinus į vandenį, apsaugo nuo pankreatito (Lee ir kt., 2000). Iš tiesų visi pankreatito sunkumo rodikliai – hiperamilazemija, kasos edema ir acinuso ląstelių nekrozė – sumažėjo po HSP60 indukcijos (Lee ir kt., 2000). Apsauginis HSP poveikis esant pankreatitui neapsiriboja HSP60, bet taip pat pastebimas ir HSP70 indukcijos metu. Kadangi ląstelių pažeidimas esant pankreatitui yra tarpininkaujamas nekrozės ir apoptozės keliais, ir kadangi HSP70 gali apsaugoti ląsteles nuo nekrozinės ir apoptozinės užprogramuotos ląstelių mirties, tikėtina, kad HSP70 apsaugo nuo nekrozinės ir apoptozinės ląstelių mirties pankreatito metu (Feng ir Li 2010). Tačiau tolimesni tyrimai yra būtini.

Atrodo, kad ši HSP70 indukcija kasoje dėl pankreatito streso yra apsauganti nuo pankreatito, nes panaudojus priešprasminį HSP70 siekiant sustabdyti HSP70 didėjimą, sustiprina pankreatito sunkumą (Bhagat ir kt., 2002). Specifinį HSP70 vaidmenį apsaugant nuo pankreatito dar kartą įrodo ir pelės neturinčios karščio šoko faktoriaus 1 (HSF-1) ir HSP70 transgeninės pelės (Dudeja, Vickers ir Saluja 2009). HSF-1 yra HSP70 transkripcijos faktorius. Taigi, HSF-1 neturintys gyvūnai nesugeba ekspresuoti HSP70. Dudeja ir kt., 2009 m. taip pat aprašo, kad HSP70 transgeninės pelės, turinčios ženkliai padidėjusią HSP70 raišką, pasižymi sumažėjusiu pankreatito sunkumu.

Tam tikra pažanga padaryta siekiant išsiaiškinti, kaip HSP apsaugo nuo pankreatito (Feng ir Li 2010). Pasak (Iovanna ir Ismailov 2009), buvo įrodyta, kad HSP70 indukcija neleidžia tripsinogenui aktyvuotis į tripsiną, kas yra būdingas pankreatito eigos įvykis. Rakonczay ir kt. parodė, kad HSP70 indukcija neapsaugo nuo pankreatito, kurį sukelia tripsino injekcija į kasą, ir tai dar kartą rodo, kad HSP70 padeda apsaugoti nuo pankreatito, darydamas įtaką įvykiams prieš tripsino aktyvavimą. Be to, tyrimai rodo, kad HSP70 daro įtaką tripsinogeno aktyvacijai ir kitiems vėlesniems įvykiams pankreatito metu, užkirsdamas kelią lizosominio fermento katepsino B ir virškinimo fermento zimogeno lokalizacijai (Bhagat ir kt., 2002). Ko-lokalizaciją reguliuojantys įvykiai yra mažiau aiškūs. Tačiau įrodyta, kad šiam procesui reikalingas citozolinis kalcis (Dudeja, Vickers ir Saluja 2009). Kasos

acinusų stimuliavimas su supramaksimaline cerulino doze stipriai padidina citozolinio kalcio kiekį, ko pasekoje ilgai išlieka pakilęs citozolinis kalcis, kurį palaiko kalcio infuzija į ląstelę. Pagal Dudeja et al. 2009 m., kai kurie kiti ne kasos acinuso ląstelių tyrimai parodė, kad HSP gali paveikti kalcio homeostazę ląstelėje. Taigi vienas iš mechanizmų, kuriais HSP gali paveikti ko-lokalizaciją, ir vėlesnius pankreatito įvykius yra citozolinio kalcio kiekio susilpninimas. Atsižvelgiant į kalcio svarbą reguliuojant ląstelių procesus, įskaitant ląstelių mirtį ir apoptozę, išvados, kad HSP gali turėti įtakos kalcio homeostazei, yra daug platesnės reikšmės nei tik pankreatito patofiziologijai (Dudeja, Vickers ir Saluja 2009).

Trumpas išradimo aprašymas

Ištyrėme ląstelių membranų sienelių pažaidų mechanizmus, kurie sukelia sisteminį atsaką į ūminį sunkų pankreatitą, kurdami neinvazinius ūminio pankreatito diagnostinius ir prognostinius metodus. Šiam metodui taikome prikabintas dvisluoksnes lipidines membranas (McGillivray ir kt., 2007; Budvytyte ir kt., 2013; Ragaliauskas ir kt., 2017). Be to, karščio šoko baltymų-27, 32, 60, 70, 90 identifikavimas, susijęs su sunkaus ūminio pankreatito mechanizmais, gali būti naudojamas kaip biomarkeris ir diagnostinis rinkinys, tuo pat metu nustatant neinvazinius diagnostinius būdus.

Mūsų eksperimentai buvo pagrįsti HSP-70 ir HSP-90 (Cikotiene ir kt., 2009; Budvytyte ir kt., 2013; Ragaliauskas ir kt., 2017). Čia mes pateikiame esamų karščio šoko baltymo-70 ir karščio šoko baltymo-90 matavimų ir tyrimų, pateiktų literatūroje, santrauką. Mūsų žiniomis HSP-70 ar HSP-90 nėra išmatuoti ūminio pankreatito atveju neinvazinėmis priemonėmis. Taip pat tiriamo ir kitus skirtingus HSP derinius, kurie apima, bet neapsiriboja: HSP27 ir HSP32, taip pat HSP32 ir HSP70, HSP70 ir HSP90, HSP60 ir HSP70, HSP60 ir HSP90, HSP27 ir HSP90.

Brėžinių aprašymas

1 paveikslas. HSP70 ir HSP90 sąveika su tBLM. A – EIS spektro fazinio kampo diagrama: tiesi linija – pradinis tBLM spektras, linija su apskritimais – 10 min. po HSP70, kai švirkščinama 0,2 μ M, linija su trikampaiais – po 24 valandų po HSP70 injekcijos. tBLM buvo sudarytas iš DOPC ir cholesterolio (% santykiu 60:40). B – EIS spektrų fazinio kampo diagrama: tiesi linija - pradinis tBLM spektras, linija su apskritimais – 10 min. po HSP90, kai injekuota 2 μ M, linija su trikampaiais – po 24

valandų po HSP90 injekcijos. tBLM buvo sudarytas iš DOPC ir cholesterolio (% santykiu 75:25).

2 pav. HSP70 ir HSP90 baltymų adsorbcijų SPR sensogramos lipidų membranose (DOPC:cholesterolis atitinkamai 60:40 ir 75:25). HSP70 ir HSP90 koncentracijos atitinkamai yra x ir y.

Išsamus išradimo aprašymas

Mūsų išradimas apima metodiką, aprašytą patente LT 6424 „Paviršiuje imobilizuotų fosfolipidinių bisluoksnių membranų (tBLM) gavimo būdas“, kurią mes pritaikėme ūminio pankreatito ankstyvos diagnostikos tyrimams.

Viename iš šio išradimo įgyvendinimo variantų, siekiant nustatyti ūminį pankreatitą, surenkami prognoziniai ir diagnostiniai biomarkeriai arba biomarkerių grupė (diagnostinis rinkinys), matuojant karščio šoko baltymus (HSP), kaip pagrindinius ūminio pankreatito mechanizmo dalyvius. Tyrimui naudojami mėginiai paimami iš paciento šlapimo, prakaito ar seilių, o kraujo serumas / plazma naudojami kaip kontrolė.

Kitame įgyvendinimo variante šis išradimas gali būti naudojamas kaip terapinis tikslas, siekiant nustatyti ankstyvą daugelio organų disfunkcijos sindromą sergant ūminiu pankreatitu.

Medžiagos ir metodai

HSP-70

Rekombinantinis baltymas HSP70 buvo įsigytas iš Sigma Aldrich (Vokietija), kurio grynumas yra ≥ 70 %. Rekombinantinį viso ilgio HSP90 padovanojo prof. D. Matulis iš VU Gamtos mokslų centro, Biotechnologijos instituto, HSP90 buvo klonuotas ir išgrynintas.

Serumo HSP70 buvo išanalizuotas naudojant žmogaus karščio šoko baltymą 70 (HSP70), (Kat. nr. 20,959), įsigytą iš Bio Medical Assay (BMASAY, Pekinas, Kinija), vadovaujantis gamintojo nurodymais. Jų kiekis buvo išreikštas ng/ml. HSP70 aptikimo ir kiekybinio nustatymo ribos buvo nustatytos $< 0,05$ ng/ml.

Serumo HSP70 baltymų kiekis buvo nustatytas naudojant komerciškai prieinamus ELISA rinkinius (StressGen Biotechnologies Corp). HSP70 baltymų koncentracijos buvo nustatytos palyginus su standartine kreive pagal gamintojo

nurodymus. Standartinė kreivė yra nuo 0,78 iki 50 ng/ml, o analizės jautrumas yra 0,2 ng/ml.

Bendras sHsp70 kiekis žmogaus serumo mėginiuose buvo išmatuotas naudojant modifikuotą Hsp70 imunologinį tyrimą (Duoset, DYC1663, R&D Systems, Mineapolis, MN, JAV). ELISA yra skirta aptikti žmogaus Hsp70 buferyje.

HSP-90

HSP90 ELISA (SUNRED Biotechnology Company, Shanghai, Kinijos Liaudies Respublika) naudojamas Sandwich dvigubo antikūno ir su fermentu susieto imunosorbento tyrimas, nustatant žmogaus HSP90 kiekį mėginiuose.

Serumo HSP90a kiekis buvo nustatytas dviem egzemplioriais, naudojant kietosios fazės ELISA metodą (Assay Designs, Stressgen, MI, USA).

Sandwich ELISA tyrimai buvo atlikti 96 šulinėlių lėkštėse, naudojant 100 µl periferinio kraujo plazmos per šulinėlį. Kai reikia, plazma buvo atskiesta blokuojančiu buferiu, tokiu atveju iš standartinės kreivės nuskaityta koncentracija buvo padauginta iš praskiedimo koeficiento. Toliau nurodyti ELISA tyrimai buvo atlikti pagal gamintojo rekomendacijas: Hsp90α (žmogaus) ELISA rinkinys (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY), žmogaus beta 2-mikroglobulino kvantikino IVD ELISA rinkinys (R&D Systems Inc., Mineapolis, MN) ir žmogaus IGFBP-2 DuoSet (R&D Systems Inc.).

Lipidai: 1,2-dioleoil-sn-glikero-3-fosfocholinai (DOPC) ir cholesterolis buvo įsigyti iš Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, JAV) ir panaudoti, kaip gauti. Visi kiti tirpikliai (AR klasė) buvo naudojami be gryninimo, ir visos reakcijos buvo atliktos azote.

Paviršiuje imobilizuotos fosfolipidų dvisluoksnės membranos sudarymas

Aukso substratai elektrocheminės varžos spektroskopijos (EIS) matavimams buvo parengti ant 25x75 mm stiklo plokštelių (ThermoFischer Scientific, UK). Auksiniai SPR substratai buvo paruošti ant BK7 stiklinių plokštelių (25 mm skersmens, 1 mm storio), gautų iš AutoLab (Methorm, Nyderlandai). Aukso sluoksniai buvo nusodinti magnetroniniu purškimu naudojant PVD75 (Kurt J. Lesker Co., JAV) sistemą. Šiame darbe naudotų savarankiškai susirenkančių monosluoksnių sintezės ir savybių detalės buvo aprašytos anksčiau.

Prikabintos lipidų membranos (tBLM) buvo paruoštos naudojant daugiasluoksnį vezikulinį suliejimo būdą, aprašytą ankstesniuose dokumentuose. Vezikulių tirpalas paruoštas iš 1,2-dioleoil-sn-glicerio-3-fosfocholino (DOPC) ir cholesterolio (Avanti Polar Lipids, JAV) 6:4 ir 7,5:2,5 moliniu santykiu fosfatiniame buferiniame tirpale (PBS), turinčiame yra 0,1 M NaCl (Roth, Danija), 0,01 M NaH₂PO₄ (Roth, Danija), pH 4,5.

Elektrocheminės varžos spektroskopija

EIS matavimai buvo registruojami naudojant „Zennium“ elektrocheminį prietaisą („Zahner GmbH“, Vokietija), tarp 0,1 ir 100 kHz, su 10 logaritmiškai paskirstytų matavimo taškų į dešimtį. Duomenys buvo sugrupuoti naudojant „ZView“ programinę įrangą („Scribner Associates“, „Southern Pines“, NC). Visi matavimai atlikti natrio fosfato buferiniame tirpale (PBS), 0,1 M NaCl, 0,01 M NaH₂PO₄, pH 7,2. Naudota trijų elektrodų celių konfigūracija. Etaloninis elektrodas buvo Ag/AgCl, NaCl (sat.) elektrodas. Platinos viela (Aldrich, 99,99% grynumas) buvo naudojama, kaip pagalbinis elektrodas. Darbinis elektrodas buvo auksu dengta stiklinė plokštelė. Šiame darbe panaudota 12-os buteliukų elektrocheminė celė. Darbinio elektrodo paviršius, veikiamas tirpalo celėje, buvo 0,25 cm². Visi matavimai atlikti kambario temperatūroje (21±2 °C).

Paviršiaus plazmono rezonansas (SPR)

SPR matavimai atlikti su Autolab Twingle sistema (Eco Chemie B.V., Nyderlandai), turinčia srauto celę (tūris - 175 µl). Įrenginys atlieka SPR spektrų įrašymą fiksuotu 670 nm bangos ilgiu. Jis automatiškai seka su mililaipsnio raiška, pasipriešinimo kampo padėtį (nuo 62 iki 78°), kur stebimas minimalus atspindys dėl paviršinio plazmono rezonanso sužadavimo. Temperatūrai stabilizuoti ties 21±0,1 °C buvo naudojamas F34 šaldymo / šildymo cirkulatorius (Julabo, DEU). Prieš kiekvieną eksperimentą užfiksuotas buferinio tirpalo pradinis lygis. Visi matavimai buvo atlikti esant sustabdyto srauto sąlygoms. Pagal gamintojo nurodymus, minimalus perjungimas 122 mililaipsniais (m°) atitinka 100 ng/cm² paviršiaus padengimą adsorbuotu baltymu. Taigi šiame darbe panaudojome santykį 1,22 m°=1 ng/cm², kad perskaičiuotume adsorbuoto baltymo kiekį pagal paviršiaus plotą iš SPR duomenų.

Rezultatai

HSP sąveika su fosfolipidų modelio membranomis pagal EIS ir SPR

HSP padidėjimas serume ir šlapale yra svarbus žingsnis ūminio pankreatito patogenezėje. Tačiau mechanizmas, kuriuo HSP70 ir HSP90 veikia ŪP metu, iš esmės nežinomas. Ankstesniame skyriuje pateikti duomenys rodo stiprią HSP70 ir HSP90 preparatų sąveiką su fosfolipidų membranomis.

HSP70 ir HSP90 patekimo į fosfolipidų membraną poveikis parodytas 1 paveiksle, baltymų poveikis yra lengvai matomas iš EIS pokyčių, visų pirma, inkubuojant tBLM su HSP70 (1A pav.). Be to, fazės minimumas pasirodo ir juda link aukštesnių dažnių, kai HSP70 inkubacinis laikas didėja (1A pav.). tBLM laidumas (Y) yra HSP70 sukeltas laidumas fazinio minimumo metu (apskaičiuotas kaip $Y = 1/Z_{\text{fazės min.}}$). Fazės poslinkis po sąveikos su HSP70 rodo membranos pažeidimus ir keičia jonų judėjimą per membraną (1A pav.).

Hsp90 sąveika su fosfolipidų modelių membranomis parodyta 1B paveiksle. Nustatytas priešingas rezultatas, lyginant su HSP70 sąveika. Fazės minimumas pasirodo ir juda link mažesnių dažnių, kai HSP90 inkubacinis laikas didėja (1B pav.). Toks fazės poslinkis po sąveikos su HSP90 rodo, kad baltymas prijungia membraną ir izoliuoja bet kokį jonų judėjimą per membraną (1B pav.).

2 pav. pavaizduoti tipiniai SPR pėdsakai, gauti naudojant tBLM paveiktą su HSP70 (punktyrinė linija) ir HSP90 (tiesi linija) monomerų tirpalais. HSP70 atveju SPR signalas po plovimo (po 900 sekundžių) nukrito žemiau matavimo pradžios. Šie pokyčiai rodo lipidų sumažėjimą jutiklio paviršiuje. Tai yra neįprastai netikėtas rezultatas, nes nebuvo žinoma, kad baltymai sutrikdytų lipidų membraną ir šis elgesys gali būti susijęs tik su specifinėmis baltymų savybėmis. Kitas HSP90 baltymas sukelia SPR signalo padidėjimą. Šie pakeitimai susiję su lipidų membranos adsorbcijomis.

Literatūra

1. Bhagat, Lakshmi, Vijay P. Singh, Rajinder K. Dawra, and Ashok K. Saluja. 2008. 'Sodium Arsenite Induces Heat Shock Protein 70 Expression and Protects against Secretagogue-Induced Trypsinogen and NF-KappaB Activation.' *Journal of Cellular Physiology* 215 (1): 37–46. <https://doi.org/10.1002/jcp.21286>.
2. Bhagat, Lakshmi, Vijay P. Singh, Albert M. Song, Gijs J. D. van Acker, Sudhir Agrawal, Michael L. Steer, and Ashok K. Saluja. 2002. 'Thermal Stress-Induced HSP70 Mediates Protection against Intrapancreatic Trypsinogen Activation and Acute Pancreatitis in Rats.' *Gastroenterology* 122 (1): 156–65.
3. Bhatia, Madhav, Fei Ling Wong, Yang Cao, Hon Yen Lau, Jiali Huang, Padmam Puneet, and Lakshmi Chevali. 2005. 'Pathophysiology of Acute Pancreatitis.' *Pancreatology: Official Journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et Al.]* 5 (2–3): 132–44. <https://doi.org/10.1159/000085265>.
4. Budvytyte, Rima, Gintaras Valincius, Gediminas Niaura, Vladislava Voiciuk, Mindaugas Mickevicius, Hilary Chapman, Haw-Zan Goh, et al. 2013. 'Structure and Properties of Tethered Bilayer Lipid Membranes with Unsaturated Anchor Molecules'. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 29 (27): 8645–8656. <https://doi.org/10.1021/la401132c>.
5. Cikotiene, Inga, Egidijus Kazlauskas, Jurgita Matuliene, Vilma Michailoviene, Jolanta Torresan, Jelena Jachno, and Daumantas Matulis. 2009. 'ChemInform Abstract: 5-Aryl-4-(5-Substituted-2,4-Dihydroxyphenyl)-1,2,3-Thiadiazoles as Inhibitors of Hsp90 Chaperone.' *ChemInform* 40 (28). <https://doi.org/10.1002/chin.200928122>.
6. Dudeja, V., S. M. Vickers, and A. K. Saluja. 2009. 'The Role of Heat Shock Proteins in Gastrointestinal Diseases.' *Gut* 58 (7): 1000–1009. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.140194>.
7. Dymock, Brian W, Martin J Drysdale, Edward McDonald, and Paul Workman. 2004. 'Inhibitors of HSP90 and Other Chaperones for the Treatment of Cancer'. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 14 (6): 837–47. <https://doi.org/10.1517/13543776.14.6.837>.
8. Ethridge, R. T., R. A. Ehlers, M. R. Hellmich, S. Rajaraman, and B. M. Evers. 2000. 'Acute Pancreatitis Results in Induction of Heat Shock Proteins 70 and 27 and Heat Shock Factor-1.' *Pancreas* 21 (3): 248–56.
9. Fagenholz, Peter J., Carlos Fernández-Del Castillo, N. Stuart Harris, Andrea J.

Pelletier, and Carlos A. Camargo. 2007. 'Increasing United States Hospital Admissions for Acute Pancreatitis, 1988–2003'. *Annals of Epidemiology* 17 (7): 491.e1–491.e8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2007.02.002>.

10. Fagenholz, Peter J., Carlos Ferna'ndez-del Castillo, N. Stuart Harris, Andrea J. Pelletier, and Carlos A. Jr Camargo. 2007. 'Direct Medical Costs of Acute Pancreatitis Hospitalizations in the United States'. *Pancreas* 35 (4). https://journals.lww.com/pancreasjournal/Fulltext/2007/11000/Direct_Medical_Costs_of_Acute_Pancreatitis.2.aspx.

11. Feng, Jia Yan, and Yong Yu Li. 2010. 'Alteration and Role of Heat Shock Proteins in Acute Pancreatitis'. *Journal of Digestive Diseases* 11 (5): 277–83. <https://doi.org/10.1111/j.1751-2980.2010.00450.x>.

12. Fu, K., M. P. Jr Sarras, R. C. De Lisle, and G. K. Andrews. 1997. 'Expression of Oxidative Stress-Responsive Genes and Cytokine Genes during Caerulein-Induced Acute Pancreatitis.' *The American Journal of Physiology* 273 (3 Pt 1): G696–705. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1997.273.3.G696>.

13. Giri, Bhuwan, Vrishketan Sethi, Shrey Modi, Bharti Garg, Sulagna Banerjee, Ashok Saluja, and Vikas Dudeja. 2017. "Heat Shock Protein 70 in Pancreatic Diseases: Friend or Foe". *Journal of Surgical Oncology* 116 (1): 114–22. <https://doi.org/10.1002/jso.24653>.

14. Gress, T. M., F. Muller-Pillasch, C. Weber, M. M. Lerch, H. Friess, M. Buchler, H. G. Beger, and G. Adler. 1994. 'Differential Expression of Heat Shock Proteins in Pancreatic Carcinoma.' *Cancer Research* 54 (2): 547–51.

15. Iovanna, Juan, and U Ismailov. 2009. *Pancreatology: From Bench to Bedside*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-00152-9>.

16. Lee, Hong Sik, Lakshmi Bhagat, Jean-Louis Frossard, Antti Hietaranta, Vijay P. Singh, Michael L. Steer, and Ashok K. Saluja. 2000. 'Water Immersion Stress Induces Heat Shock Protein 60 Expression and Protects against Pancreatitis in Rats'. *Gastroenterology* 119 (1): 220–29. <https://doi.org/https://doi.org/10.1053/gast.2000.8551>.

17. Lerch, Markus M., and Fred S. Gorelick. 2013. 'Models of Acute and Chronic Pancreatitis.' *Gastroenterology* 144 (6): 1180–93. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.12.043>.

18. McGillivray, Duncan J., Gintaras Valincius, David J. Vanderah, Wilma Febo-Ayala, John T. Woodward, Frank Heinrich, John J. Kasianowicz, and Mathias Lösche. 2007. 'Molecular-Scale Structural and Functional Characterization of Sparsely Tethered Bilayer

Lipid Membranes'. *Biointerphases* 2 (1): 21–33. <https://doi.org/10.1116/1.2709308>.

19. Niederau, C., L. D. Ferrell, and J. H. Grendell. 1985. 'Caerulein-Induced Acute Necrotizing Pancreatitis in Mice: Protective Effects of Proglumide, Benzotript, and Secretin.' *Gastroenterology* 88 (5 Pt 1): 1192–1204.

20. Ogata, M., Z. Naito, S. Tanaka, Y. Moriyama, and G. Asano. 2000. 'Overexpression and Localization of Heat Shock Proteins MRNA in Pancreatic Carcinoma.' *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku Zasshi* 67 (3): 177–85.

21. Peery, Anne F., Evan S. Dellon, Jennifer Lund, Seth D. Crockett, Christopher E. McGowan, William J. Bulsiewicz, Lisa M. Gangarosa, et al. 2012. 'Burden of Gastrointestinal Disease in the United States: 2012 Update.' *Gastroenterology* 143 (5): 1179–1187.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.08.002>.

22. Ragaliauskas, Tadas, Mindaugas Mickevicius, Bozena Rakovska, Tadas Penkauskas, David J. Vanderah, Frank Heinrich, and Gintaras Valincius. 2017. 'Fast Formation of Low-Defect-Density Tethered Bilayers by Fusion of Multilamellar Vesicles'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1859 (5): 669–78. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.01.015>.

23. Rakonczay, Zoltan Jr, Bela Ivanyi, Ilona Varga, Imre Boros, Andrea Jednakovits, Ilona Nemeth, Janos Lonovics, and Tamas Takacs. 2002. 'Nontoxic Heat Shock Protein Coinducer BRX-220 Protects against Acute Pancreatitis in Rats.' *Free Radical Biology & Medicine* 32 (12): 1283–92.

24. Rakonczay, Zoltan Jr, Yvette Mandi, Jozsef Kaszaki, Bela Ivanyi, Imre Boros, Janos Lonovics, and Tamas Takacs. 2002. 'Induction of HSP72 by Sodium Arsenite Fails to Protect against Cholecystokinin-Octapeptide-Induced Acute Pancreatitis in Rats.' *Digestive Diseases and Sciences* 47 (7): 1594–1603.

25. Rakonczay, Zoltán, Tamás Takács, Imre Boros, and János Lonovics. 2003. 'Heat Shock Proteins and the Pancreas'. *Journal of Cellular Physiology* 195 (3): 383–91. <https://doi.org/10.1002/jcp.10268>.

26. Sah, Raghuwansh P., and Ashok Saluja. 2011. 'Molecular Mechanisms of Pancreatic Injury.' *Current Opinion in Gastroenterology* 27 (5): 444–51. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e328349e346>.

27. Sato, H., R. C. Siow, S. Bartlett, S. Taketani, T. Ishii, S. Bannai, and G. E. Mann. 1997. 'Expression of Stress Proteins Heme Oxygenase-1 and -2 in Acute Pancreatitis and Pancreatic Islet BetaTC3 and Acinar AR42J Cells.' *FEBS Letters* 405 (2): 219–23.

28. Strowski, M. Z., G. Sparmann, H. Weber, F. Fiedler, H. Printz, L. Jonas, B.

Goke, and A. C. Wagner. 1997. 'Caerulein Pancreatitis Increases MRNA but Reduces Protein Levels of Rat Pancreatic Heat Shock Proteins.' *The American Journal of Physiology* 273 (4 Pt 1): G937-945.

29. Weber, C. K., T. Gress, F. Muller-Pillasch, M. M. Lerch, H. Weidenbach, and G. Adler. 1995. 'Supramaximal Secretagogue Stimulation Enhances Heat Shock Protein Expression in the Rat Pancreas.' *Pancreas* 10 (4): 360-67.

30. Whitcomb, D. C. 2004. 'Value of Genetic Testing in the Management of Pancreatitis.' *Gut* 53 (11): 1710-17. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.015511>.

31. Workman, Paul. 2004. 'Altered States: Selectively Drugging the Hsp90 Cancer Chaperone.' *Trends in Molecular Medicine* 10 (2): 47-51.

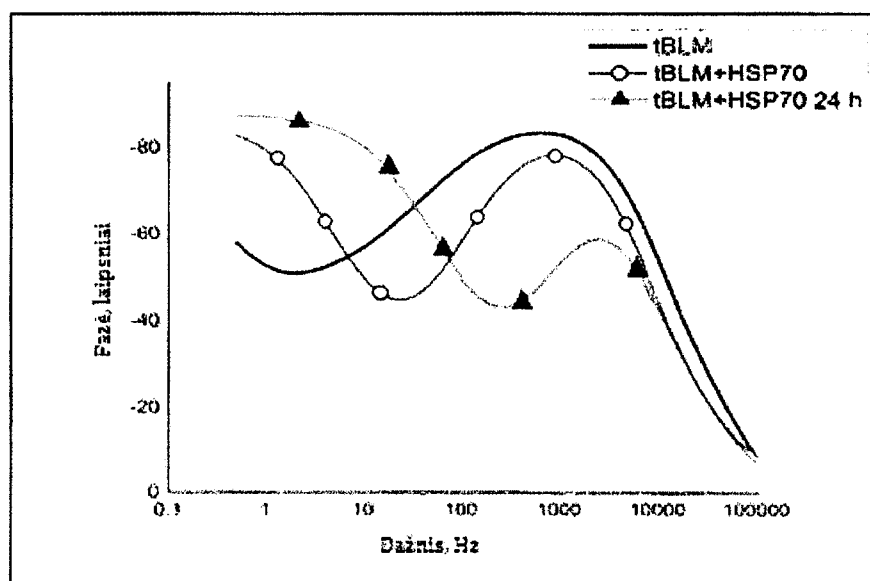
32. Yadav, Dhiraj, and Albert B. Lowenfels. 2006. 'Trends in the Epidemiology of the First Attack of Acute Pancreatitis: A Systematic Review.' *Pancreas* 33 (4): 323-30. <https://doi.org/10.1097/01.mpa.0000236733.31617.52>.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

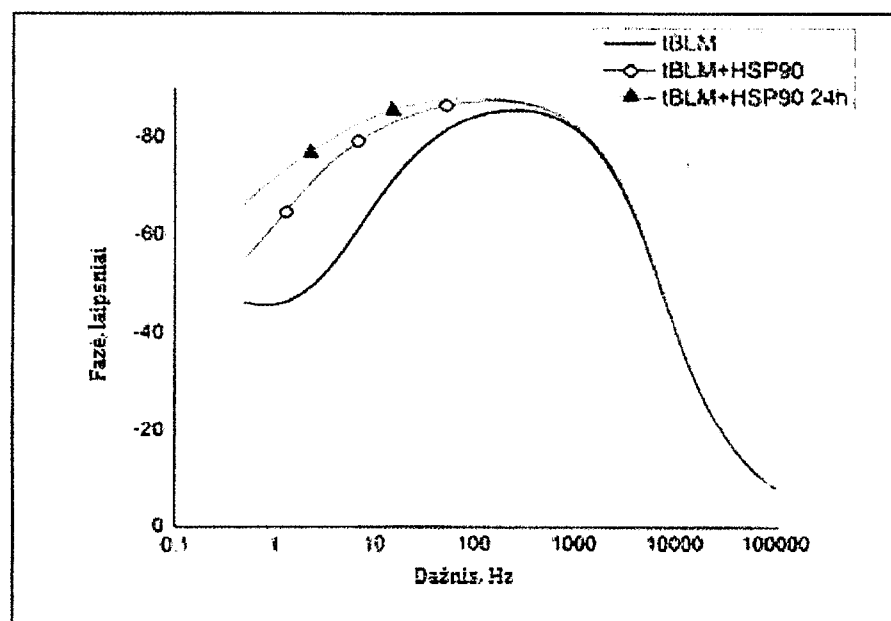
1. Ūminio pankreatito ligos pradžios nustatymo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad būdas apima šiuos žingsnius: karščio šoko baltymų HSP-70, 90, 60, 27 lygio matavimą žmogaus šlapimo ar kitų kūno skysčių mėginiuose per 72 valandas nuo ūminio pankreatito simptomų atsiradimo pacientams, kurie buvo atvežti į greitosios pagalbos skyrių, duomenų analizę pagal protokolą ir duomenų derinimą su įprastiniais cheminiais tyrimais, siekiant gauti klinikinę diagnozę.

2. Ūminio pankreatito viso gyvenimo rizikos nustatymo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad pacientui, kuriam gresia ūminis pankreatitas, atliekamas HSP-70, 90, 60 ir 27 genetinis tyrimas.

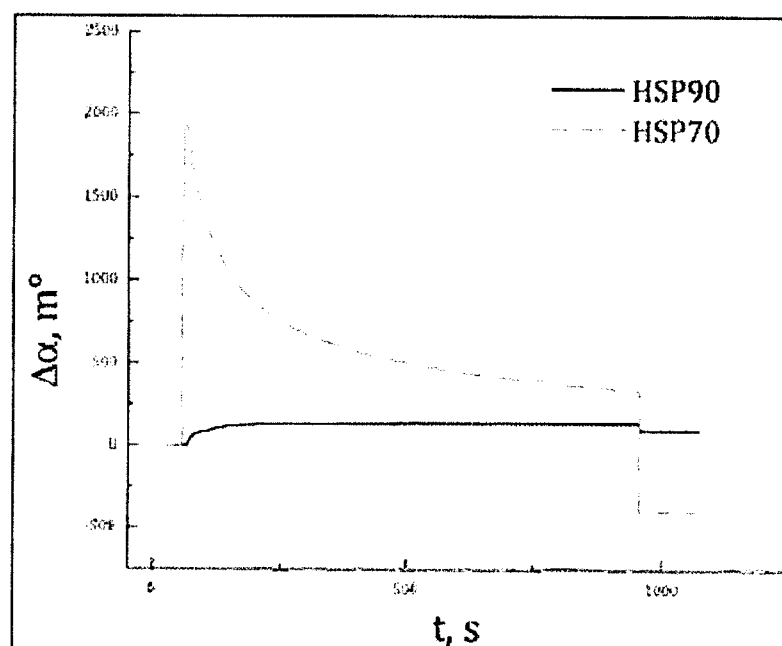
3. Būdas pagal 1 punktą, papildomai apimantis neinvazinį radiologinį tyrimą, siekiant nustatyti chirurginės intervencijos poreikį.



1A Pav.



1B Pav.



2 Pav.