

АНАЛИЗ ТРАНСФЕРРИНА В МОЧЕ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ С ПОМОЩЬЮ НАНОТЕЛ

© 2023 А.М. Сачко¹, О.С. Горяйнова¹, Т.И. Иванова^{1,2}, И.Ю. Николаева³,
М.Е. Тарнопольская³, А.Ю. Бычков³, М.Я. Гаас⁴, Н.В. Воробьев^{5,6},
А.Д. Каприн^{4,7}, П.В. Шегай^{4,7}, С.В. Тиллиб^{1*}

¹ Институт биологии гена РАН,
119334 Москва, Россия; электронная почта: tillib@genebiology.ru

² Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба –
филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 249036 Обнинск, Калужская обл., Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, геологический факультет,
119234 Москва, Россия

⁴ Российский университет дружбы народов, 117198 Москва, Россия

⁵ Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена –
филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 125284 Москва, Россия

⁶ Первый Московский государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова Минздрава России, 119991 Москва, Россия

⁷ Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Минздрава России,
125284 Москва, Россия

Поступила в редакцию 30.11.2022

После доработки 14.06.2023

Принята к публикации 03.07.2023

Известно, что коэффициент насыщения трансферрина (Tf) железом в крови человека является важным клиническим параметром. Для анализа тонких изменений в относительной представленности разных форм трансферрина, потенциально связанных с патологическим процессом, могут быть использованы специфические антитела. Недавно авторы данного исследования смогли получить и охарактеризовать высокоспецифические однодоменные антитела (нанотела), узнающие преимущественно железо-насыщенную (holo-Tf) или железо-ненасыщенную (apo-Tf) форму трансферрина. В данной работе в условиях более приближенных к физиологическим, чем в ранее проводимых экспериментах, мы дополнительно продемонстрировали, что эти уникальные нанотела обладают чрезвычайно высокой дифференциальной специфичностью связывания разных форм Tf в различных биологических жидкостях человека. Нам удалось с помощью этих нанотел впервые провести анализ относительной представленности форм Tf в образцах мочи больных раком мочевого пузыря (РМП). Было показано, что повышение концентрации общего Tf в образцах мочи, нормализованных по креатинину, ассоциировано со степенью прогресса и роста злокачественности РМП. В образцах здоровых доноров и на ранних стадиях РМП (G1) Tf детектируется в сильно меньших количествах (в сравнении с более поздними стадиями) и лишь при дополнительном концентрировании исследуемых проб. Для большинства исследованных образцов мочи больных РМП ожидаемо (как ранее показано в случае Tf в крови терминальных больных раком яичников) концентрация apo-Tf явно выше, чем holo-Tf, особенно в случае наиболее продвинутого мышечно-инвазивного РМП. Неожиданностью для нас стало обнаружение в образцах мочи некоторых больных РМП примерно равных количеств apo-Tf и «holo-Tf». Мы предположили, что фракция «holo-Tf» в данном случае в значительной степени может быть представлена «вторичными комплексами», образуемыми apo-Tf в соединении с ионами, отличными от Fe^{3+} , накапливающимися в моче некоторых раковых больных и способными связываться с apo-Tf, меняя его конформацию в направлении holo-Tf. Методом масс-спектропии с ионизацией в индуктивно-связанной плазме мы получили первые результаты, подтверждающие предположенную нами гипотезу. Препарат «holo-Tf» в этих образцах мочи оказался сильно обогащен цинком и никелем. Также в этом препарате наблюдается относительное обогащение кадмием, но он присутствует в сильно меньших концентрациях. Полученные данные указывают на то, что используемое нанотело,

Принятые сокращения: МС-ИСП – масс-спектропия с ионизацией в индуктивно-связанной плазме; РМП – рак мочевого пузыря; Tf – белок трансферрин; apo-Tf – не содержащая железо форма Tf; holo-Tf – насыщенная железом форма Tf; TfR – рецептор трансферрина.

* Адресат для корреспонденции.

узнающее преимущественно железо-насыщенную форму трансферрина (holo-Tf), способно также связывать Tf в ассоциации с иными ионами металлов, отличными от железа. Эта способность потенциально может открыть новые возможности в исследованиях относительной представленности разных ионов металлов в ассоциации с трансферрином в биологических жидкостях человека в норме и патологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: однодоменное антитело, нанотело, апо- и голо-трансферрин, аффинная хроматография, рак мочевого пузыря, МС-ИСП.

DOI: 10.31857/S0320972523080055, **EDN:** IJFNHI

ВВЕДЕНИЕ

Поддержание и регуляция гомеостаза железа, необходимого микроэлемента для ключевых физиологических процессов, осуществляется целым каскадом белков, в котором сбой одного из звеньев может приводить к тяжелым патологическим последствиям [1]. Транспорт железа и депонирование осуществляется в основном посредством комплексов железо/трансферрин и железо/ферритин. Высокая скорость пролиферации большинства опухолевых клеток, зависящая в том числе от поступления достаточного количества железа, часто ассоциирована с повышенной экспрессией рецепторов трансферрина [2]. Трансферрин (Tf) — это гликопротеин размером 80 кДа, состоящий из двух гомологичных частей, или долей (N- и C- по 40 кДа). Каждая доля способна связывать один ион свободного трехвалентного железа (Fe^{3+}), то есть к Tf можно присоединить до двух ионов железа. Насыщенную железом форму Tf обозначают как holo-Tf. Не содержащая железо форма Tf, называемая apo-Tf, способна с высокой эффективностью связывать Fe^{3+} в крови, превращаясь в holo-Tf, и транспортировать Fe^{3+} на поверхность клетки для интернализации посредством взаимодействия с рецептором трансферрина (TfR). Комплекс железосвязанного Tf с рецептором, образующийся на поверхности клетки, интернализуется посредством клатрин-зависимого эндоцитоза. Работа протонного насоса в эндосомальной мембране приводит к снижению pH до 5,5, что запускает конформационные изменения как в Tf, так и в TfR1, которые ведут к последующему высвобождению железа и превращению holo-Tf в apo-Tf. Трехвалентное железо (Fe^{3+}) превращается в двухвалентное железо (Fe^{2+}), комплекс рецептор/apo-Tf затем возвращается на поверхность клетки, где apo-Tf высвобождается из связи с рецептором при нейтральных значениях pH [3].

Если для ферритина было показано, что его уровень в сыворотке крови может являться биомаркером для выявления ряда опухо-

лей на продвинутых стадиях болезни [4], то до последнего времени мало внимания уделялось другому белку острой фазы — трансферрину. Уровень сывороточного Tf снижен при воспалениях, злокачественных процессах, в случае перегрузки железом и повышен при дефиците железа [5]. Совсем недавно авторы данной статьи с соавторами показали, что измерение уровня трансферрина и его насыщенности железом в крови имеет большой потенциал в оценке риска как рака яичников, так и функционального железодефицита у пациентов с диагнозом рак яичников [6].

Важным клиническим параметром является коэффициент насыщения трансферрина железом, который рассчитывается как отношение содержания железа в крови пациента к показателю общей железосвязывающей способности сыворотки крови [7]. Для более прямого анализа тонких изменений в относительной представленности разных форм Tf, потенциально связанных с патологическим процессом, могут быть использованы специфические антитела. Недавно авторы данного исследования смогли получить и охарактеризовать, по-видимому, первые такие высокоспецифические однодоменные антитела (нанотела), узнающие преимущественно holo-Tf (aTf1) или apo-Tf (aTf2) [8]. Было показано, что параллельное использование иммуносорбентов, создаваемых на основе этих нанотел, потенциально может выявлять изменения в относительной представленности apo- и holo-Tf в биологических жидкостях человека. Так, с помощью метода, основанного на иммуноаффинной хроматографии и последующего электрофоретического фракционирования специфически связавшихся и затем элюированных изоформ трансферрина, мы недавно продемонстрировали заметное уменьшение доли железонасыщенного трансферрина (holo-Tf) относительно свободного от железа трансферрина (apo-Tf) в плазме крови больных раком яичников женщин [6]. Если в норме отношение holo-Tf/apo-Tf определялось в диапазоне 30–55%/45–70%, то у больных раком яичников

это соотношение — 10–23%/77–95%. Полученные результаты наглядно демонстрируют эффективность данного метода анализа, и его применение может быть ценным дополнением при выборе тактики лечения онкологических больных с разными формами железодефицита, а также при формировании группы риска среди больных с новообразованиями яичников.

В представленной работе с помощью специально разработанной аффинной хроматографии со стадией элюции при нейтральном значении pH мы показали, что полученные ранее два нанотела обладают альтернативной специфичностью и способны связывать в биологических жидкостях человека или только тот эпитоп Tf, который формируется в отсутствие связи Tf (доли Tf) с ионами металлов (эпитоп аро-Tf), или альтернативный эпитоп Tf (доли Tf), для формирования которого требуется связь Tf с ионами металлов (эпитоп holo-Tf). Иммуносорбенты на основе этих нанотел были затем использованы с целью анализа диагностического потенциала как уровня общего Tf, так и соотношения holo-Tf и аро-Tf в образцах мочи больных раком мочевого пузыря (РМП) на разных стадиях болезни. Нам удалось показать прямую количественную ассоциацию общего Tf с прогрессом РМП. Для большинства образцов мочи мы наблюдали ожидаемое заметное уменьшение доли holo-Tf относительно аро-Tf, как это ранее было показано для Tf в крови больных раком яичников женщин [6]. Вместе с тем в ряде проб мочи больных РМП мы обнаружили неожиданное (в сравнении с большинством других исследованных в этой работе проб) относительное увеличение доли Tf, выделяемого с помощью нанотел aTf1, связывающих holo-Tf. Известно, что раковые клетки, как правило, требуют повышенное количество ионов железа, что должно приводить к относительному уменьшению holo-Tf. Для объяснения наблюдаемых эпизодических случаев увеличения доли holo-Tf в моче некоторых больных РМП мы выдвинули гипотезу о том, что выявляемый «holo-Tf» может состоять в значительной мере из вторичных комплексов, образованных аро-Tf в соединении с ионами, отличными от Fe^{3+} и накапливающимися в моче ракового больного. Связывание аро-Tf с такими ионами предположительно меняет конформацию Tf, делая доступными эпитопы, характерные именно для holo-Tf, которые узнаются holo-Tf-специфическим нанотелом. Мы получили первые подтверждения данной гипотезы с помощью анализа ионов металлов в препарате «holo-Tf» в образцах мочи методом масс-спектрометрии

с ионизацией в индуктивно-связанной плазме (МС-ИСП). Препарат «holo-Tf» в образцах мочи, где не было явного преобладания аро-Tf, оказался сильно обогащен цинком и никелем. Полученные данные указывают на то, что используемое нанотело, узнающее преимущественно железо-насыщенную форму трансферрина (holo-Tf), способно также связывать трансферрин в ассоциации с иными ионами металлов, отличными от железа. Эта способность потенциально может открыть новые возможности в исследованиях относительной представленности разных ионов металлов в ассоциации с трансферрином в биологических жидкостях человека в норме и патологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы мочи и плазмы крови. В работе использовали образцы мочи 13 первичных больных, находящихся на лечении по поводу РМП в отделении онкоурологии Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена — филиала «НМИЦ радиологии» Минздрава России (таблица). У 12 больных диагностирована уротелиальная карцинома мочевого пузыря, представленная в большинстве случаев (8) немышечно-инвазивным РМП — № 2–9. Мышечно-инвазивный рак диагностирован у 4 пациентов — № 10–13. У одного пациента были обнаружены доброкачественные новообразования мочевого пузыря (№ 1). Постановку диагноза и классификацию заболеваний проводили в соответствии с клиническими рекомендациями Минздрава России (протокол от 20.12.2019 г. № 10/2-3-4). Образцы утренней мочи вскоре после получения транспортировали из Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена в Институт биологии гена РАН, где их сразу подвергали низкоскоростному центрифугированию (2000 g, 15 мин) при комнатной температуре. Аликвоты супернатантов помещали на хранение в морозильник на $-80^{\circ}C$. Образцы утренней мочи здоровых доноров брали у добровольцев разного пола, не отличающихся значимо по возрасту от больных РМП исследуемой группы.

Плазма крови здорового донора получена в Медицинском радиологическом научном центре им. А.Ф. Цыба — филиале «НМИРЦ» Минздрава России.

Работа с нанотелами, создание и использование иммуносорбентов. Мы использовали продуценты нанотел, а также протоколы наработки и очистки адаптированных нанотел, узнающих

Характеристика проб мочи больных РМП

№/Диагноз (а, б, в)	Пол	Возраст (годы)	Стадия (TNM)	Степень злокачественности*	Белок (Б) г/литр	Креатинин (Кр) г/литр	Б/Кр
1 ^а	Ж	74	—	—	0,079	1,513	0,052
2 ^б	М	54	pT1N0M0	G1	0,186	2,720	0,068
3 ^б	М	61	pT1N0M0	G1	0,139	5,328	0,026
4 ^б	М	31	cT1N0M0	G1	0,035	1,157	0,031
5 ^б	Ж	79	pT1N0M0	HG (G2)	0,371	3,589	0,103
6 ^б	М	71	pT1N0M0	HG (G2)	0,624	5,782	0,108
7 ^б	М	58	pT1N0M0	HG (G2)	0,373	2,300	0,162
8 ^б	Ж	44	pT1N0M0	HG (G2)	0,233	0,496	0,470
9 ^{б**}	Ж	83	pT1N0M0	—	1,345	1,522	0,884
10 ^в	М	81	pT2N0M0	HG (G3)	0,943	2,839	0,332
11 ^в	М	62	pT2N0M0	HG	1,865	1,755	1,063
12 ^{в**}	Ж	68	pT2N0M0	—	1,947	0,983	1,980
13 ^в	М	62	pT4aN1M0	HG (G4)	0,757	0,128	5,896

Примечание. Диагноз: ^а — доброкачественное новообразование (№ 1); ^б — немышечно-инвазивный РМП (№ 2–9); ^в — мышечно-инвазивный РМП (№ 10–13).

* Высокая степень злокачественности, низкодифференцированная опухоль — HG (high-grade), G2–G4; низкая степень злокачественности, высокодифференцированная опухоль — LG (low grade), G1.

** Установить степень злокачественности клеток не удалось для данного образца.

holo-Tf (aTf1) или apo-Tf (aTf2), которые совсем недавно были получены и описаны соавторами данной статьи [8]. Получаемые нанотела содержат на C-конце длинную линкерную последовательность (28 аминокислот длинного варианта шарнирного участка неканонического верблюжьего антитела), после которой идут два пептидных фрагмента: гемагглютинин (НА)-таг, позволяющий детектировать нанотело с помощью коммерческих антител к этому пептиду, и последовательность из 6 остатков гистидина (His-таг), позволяющая эффективно очищать содержащий ее белок с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии на Ni²⁺-NTA-агарозе, используя HIS-Select Nickel Affinity Gel («Sigma-Aldrich», США). Линкерный линейный участок содержит 4 удобно расположенных и хорошо доступных остатка лизина. По этим остаткам очень удобно проводить химические реакции пришивки других молекул, в том числе иммобилизовать нанотело на CNBr-сефарозе. Адаптированные нанотела пришивали к CNBr-активированной сефарозе 4В («GE Healthcare Life Sciences», США), согласно рекомендациям производителя, и как

описано ранее [8, 9]. Примерно 300 мкг нанотел брали для пришивки на каждые 100 мкл сефарозы. Таким образом получали иммуносорбенты (иммуоаффинные колонки), специфичность которых определялась свойствами иммобилизованного нанотела. Эти иммуносорбенты использовали, как описано ранее [8, 9]. Опыты с разными образцами мочи, нормализованными (выравненными) относительно концентрации креатинина и соответственно разбавленными не менее чем в 2 раза в 1× PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4), проводили параллельно на отдельных колонках. Промывку несвязавшегося материала проводили 1× PBS в три этапа 10-кратным объемом колонки, и затем связавшийся материал элюировали 0,1 M Glycine-HCl (pH 2,5) в три этапа 3-кратным объемом колонки с последующей нейтрализацией элюата до pH 7,0 добавлением 1 M Tris.

Эксперименты по иммобилизации адаптированных нанотел на Ni²⁺-NTA-агарозе и последующему иммуоаффинному фракционированию компонентов плазмы крови подробно описаны ниже.

Электрофорез белков. Электрофоретический анализ белков обычно проводили в градиентном (5–19%) SDS-ПААГ по Лэммли, как описано нами ранее [8, 9]. Использовали прибор MiniProtean 3 («Bio-Rad», США), источник питания — Эльф-4 («ДНКТехнология», Россия). В качестве белкового маркера использовали либо Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder («Thermo Fisher Scientific», США), либо Precision Plus Protein Standards Dual Color («Bio-Rad»). В качестве маркеров использовали также коммерческие препараты holo-Transferrin human (holo-Tf), apo-Transferrin human (apo-Tf) фирмы «Sigma-Aldrich» и препарат рекомбинантного растворимого рецептора трансферрина sTfR («HyTest», Россия).

Для разделения apo-Tf и holo-Tf использовали электрофорез в «неденатурирующем» ПААГ, разработанный Nowakowski et al. [10] (в модификации, представленной на интернет-странице BraunLab — https://braunlab.de/?page_id=176), который мы адаптировали для эффективного разделения holo-Tf и apo-Tf [8]. Использовали 8%-ный разделяющий и 4%-ный концентрирующий гели. По окончании электрофореза гель отмывали в дистиллированной воде (3 раза по 5 мин), затем окрашивали белки в Imperial™ Protein Stain («Thermo Fisher Scientific»). Подготовку проб для электрофоретического фракционирования белков в различных образцах проводили, как описано ранее [9, 10]. Объемы аликвот определяли в каждом конкретном случае. Объем наносимой на гель пробы уменьшали, концентрируя белки с помощью фильтрационно-центрифужных приспособлений Amicon («Millipore», США) с размером отсеивания 10 кДа, или осаждали, используя метод Wessel–Fluegge [11].

Измерение концентрации креатинина и общего белка в образцах мочи. Количественное содержание креатинина и общего белка определяли с помощью анализатора мочи URiSCAN-БК («Эйлитон», Россия) и наборов реагентов той же фирмы для количественного определения содержания креатинина (Креатинин-UTS) и белка (ПГК-UTS) в моче, согласно протоколу фирмы-изготовителя.

Масс-спектрометрия с ионизацией в индуктивно-связанной плазме. Препараты для анализа получали в результате иммуноаффинной хроматографии аликвот биологических жидкостей на колонках с иммобилизованным нанотелом (aTf1), узнающим holo-Tf. Препараты (элюаты с колонок) нормировали по количеству трансферрина (100 мкг) и передавали на анализ в одинаковых объемах (300 мкл). Для измерения раствор разбавляли в 10 раз

3%-ной азотной кислотой. Измерения проводились на квадрупольном масс-спектрометре SUPEC 7000 («Focused Photonics Inc», Китай) с ионизацией в индуктивно-связанной плазме. Детектирование ионов осуществлялось электронным умножителем, сохраняющим линейность в диапазоне 9–10 порядков величины, что достигается автоматическим переключением между режимами счета импульсов и аналоговым. Калибровку чувствительности прибора по всей шкале масс проводили по эталонным 68-элементным калибровочным растворам А и В (ICP-MS-68A; «HPS», США), включающим все анализируемые элементы в пробах. Для контроля качества измерений и учета дрейфа чувствительности прибора анализы образцов чередовали с анализами эталонного образца с периодичностью 1 : 10. В качестве внутреннего стандарта в пробы вводили индий в концентрации 10 нг. Относительная погрешность анализа составляла 0,5–2%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В непосредственно предшествующих данному исследованию экспериментах, которые были совсем недавно опубликованы [8], мы описали получение и продемонстрировали потенциал применения (в формате иммуносорбентов) высокоспецифических однодоменных антител (нанотел), узнающих преимущественно holo-Tf (aTf1) или apo-Tf (aTf2) человека. Нам удалось подобрать вариант «неденатурирующего» ПААГ-электрофореза, в котором, в отличие от более традиционного электрофореза в SDS-ПААГ, очень сильно различаются электрофоретические подвижности двух форм трансферрина, apo-Tf и holo-Tf, что позволяет их количественно оценивать в образце биологической жидкости человека.

В недавно опубликованной работе, посвященной анализу форм Tf в сыворотках крови больных раком яичников [6], мы с другими соавторами продемонстрировали, что с помощью полученных анти-Tf-нанотел, пришитых к сефарозе, удается с очень высокой специфичностью выделять трансферрин из сыворотки крови человека. При фракционировании в SDS-ПААГ связавшихся и затем элюированных белков мы детектировали практически только один белок — трансферрин. Используя эти же нанотела, а также разработанные методы фракционирования разных форм Tf, в данной статье мы сфокусировали внимание на исследовании Tf в моче больных раком мочевого пузыря.

В ранее проводимой работе [8] для исследования связываемых иммобилизованными на сефарозе нанотелами разных изоформ трансферрина, разделяя связавшиеся белки в «неденатурирующем» ПААГ, мы использовали коммерческие препараты Tf (holo-Tf и apo-Tf фирмы «Sigma-Aldrich»), которые содержали примеси друг друга. При иммуноаффинной хроматографии для элюции связавшихся белков использовали кислые значения pH, при которых могли разрушаться комплексы Tf с железом и holo-Tf мог превращаться в apo-Tf, как это происходит в эндосомах *in vivo*. Указанные факторы могли влиять на получаемый результат соотношения связываемых нанотелами разных изоформ трансферрина. В предварительных экспериментах в этой работе мы попытались исключить эти факторы, чтобы уточнить степень специфичности используемых нанотел для разных форм Tf в биологических жидкостях человека. В качестве источника Tf мы взяли сначала свежесывороточную плазму крови нашего коллеги-добровольца (взятую в медицинском учреждении в тот же день без заморозки), а адаптированные нанотела были иммобилизованы на Ni^{2+} -NTA-агарозе благодаря присутствию His-тага на их C-конце. Впоследствии иммобилизованное нанотело и связавшийся с ним белок могут быть аффинно проэлюированы раствором, содержащим высокую концентрацию имидазола, при нейтральном значении pH. В данном методе основным нежелательным фоновым эффектом является способность некоторых белков плазмы крови связываться напрямую с Ni^{2+} -NTA-агарозой. Мы попытались учесть этот факт и провели тщательный подбор условий фракционирования.

Плазму крови (250 мкл), разведенную в 3 раза $1 \times \text{PBS}$ (до 750 мкл), пропускали один раз через колонку с иммобилизованными нанотелами (использовали колонку объемом 500 мкл, на которой было иммобилизовано примерно 1,5 мг нанотел). Колонку промывали трижды тремя объемами $1 \times \text{PBS}$ с 10 мМ имидазола, затем проводили аффинную элюцию в том же растворе, увеличивая ступенчато концентрацию имидазола: 25, 50, 100 и 250 мМ. Каждый этап элюции включал добавление элюирующего раствора 3 раза по 500 мкл. Белки в полученных элюатах анализировали с помощью электрофореза в градиентном SDS-ПААГ в восстанавливающих условиях. Как видно на рис. 1, основная часть Tf в комплексе с нанотелом элюировалась в присутствии 50 мМ имидазола, меньшая часть — 100 мМ имидазола. При предваритель-

ной элюции 25 мМ имидазола белки в элюате не детектировали (не показано). Из предыдущих наших опытов с аналогично модифицированными нанотелами мы знаем, что они обычно элюируются при концентрации имидазола выше 75 мМ. Из совокупности данных мы предполагаем, что после связывания с Tf у данных нанотел немного уменьшается прочность связи с Ni^{2+} -NTA-агарозой, и комплексы нанотела с трансферрином элюируются при меньших концентрациях имидазола, чем свободное нанотело. При 250 мМ элюируется белок размером чуть меньше, чем Tf, без нанотел, по-видимому, связавшийся непосредственно с Ni^{2+} -NTA-агарозой. Из полученного результата мы заключили, что для данного метода фракционирования оптимальным для элюции комплексов трансферрина, связавшегося с нанотелом, будет использование 70 мМ имидазола, а Ni^{2+} -NTA-агарозу следует максимально загружать иммобилизуемыми нанотелами (по крайней мере 5 мг нанотел на 1 мл колонки), чтобы максимально насытить колонку нанотелом и таким образом, по возможности, максимально экранировать прямое связывание белков плазмы, включая Tf, с Ni^{2+} -NTA-агарозой.

В таких предположительно оптимизированных условиях мы провели иммуноаффинную

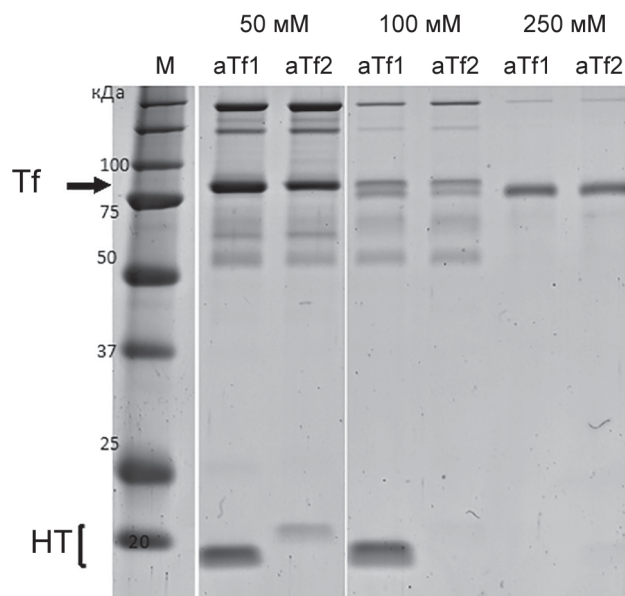


Рис. 1. Подбор условий элюции разными концентрациями имидазола (50 мМ, 100 мМ и 250 мМ) белков плазмы крови, связавшихся иммуносорбентами, приготовленными на основе нанотел (НТ: aTf1 или aTf2), иммобилизованных на Ni^{2+} -NTA-агарозе. Представлена электрофореграмма белков, фракционированных в градиентном (5–19%) SDS-ПААГ. Стрелкой показано положение трансферрина (Tf). В крайней левой дорожке нанесен маркер (M) и указаны размеры (кДа) маркерных полос

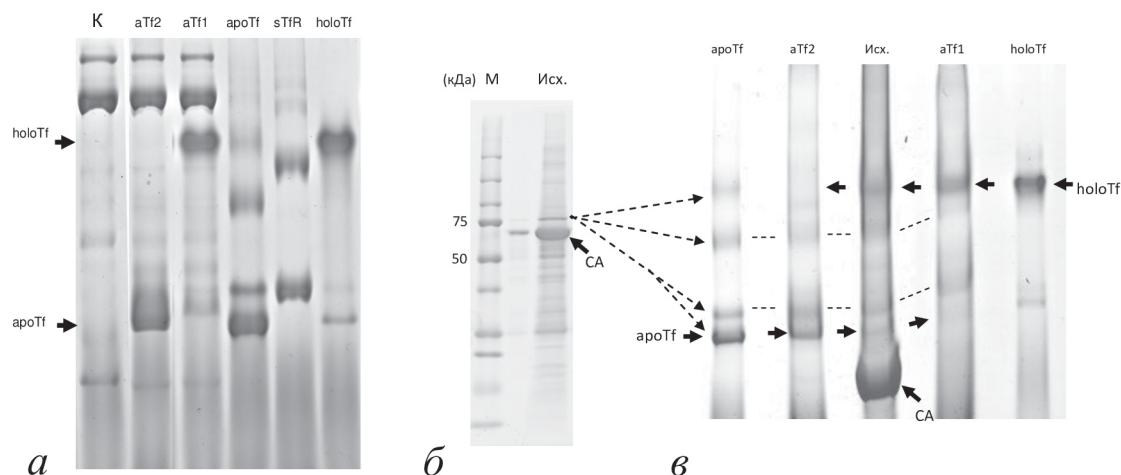


Рис. 2. Электрофоретический анализ в «неденатурирующем» 8%-ном BisTris-ПААГ (*а* и *в*) связавшихся белков и трансферрина (Tf) плазмы крови здорового донора (*а*) или мочи больного РМП (*в*) с нанотелами (aTf1, aTf2 и К — контрольными нанотелами, не связывающими Tf), содержащими His-таг и иммобилизованными на Ni^{2+} -NTA-агарозе. Маркерные белки: апо-Tf, holo-Tf и sTfR. *б* — Электрофорез в градиентном (5–19%) SDS-ПААГ исходного образца белков мочи (Исх.) того же больного. Стрелками обозначены места локализации на геле апо-Tf и holo-Tf; пунктиром обозначены потенциальные формы Tf; М — маркер; СА — сывороточный альбумин

хроматографию с тремя подготовленными колонками, две из которых содержали иммобилизованные нанотела aTf1 и aTf2, а третья, контрольная (К), была насыщена ранее нами полученными нанотелами, которые не узнают мажорные белки человека. Плазму крови (500 мкл) пропускали один раз через колонку с иммобилизованными на Ni^{2+} -NTA-агарозе нанотелами (на колонке объемом 500 мкл было иммобилизовано примерно 3 мг нанотел). Колонку промывали трижды тремя объемами $1 \times \text{PBS}$ с 10 мМ имидазола, затем проводили аффинную элюцию тремя объемами элюирующего раствора с 70 мМ имидазола. Белки в полученных элюатах анализировали с помощью электрофореза в «неденатурирующем» геле. На рис. 2, *а* представлены полученные результаты электрофореза в «неденатурирующем» 8%-ном BisTris-ПААГ связавшихся белков и трансферрина (Tf) плазмы крови с нанотелами, иммобилизованными на Ni^{2+} -NTA-агарозе.

Можно наглядно видеть полосы, соответствующие белкам плазмы крови, специфически (в отношении используемых нанотел) или неспецифически (как фон с Ni^{2+} -NTA-агарозой, аналогичный фону в случае колонки с неспецифическим нанотелом, К) связывающиеся с используемыми иммуносорбентами. В качестве маркерных белков были использованы коммерческие препараты апо-Tf, holo-Tf и sTfR1 (растворимый рецептор трансферрина 1). Данные результаты нужно рассматривать как дополнительные к полученным нами же ранее [6, 9], в которых уже была показана высокая специфичность к трансферрину используемых нанотел. В данном случае нам удалось

продемонстрировать в условиях более приближенных к физиологическим, чем в предыдущих экспериментах, что нанотела aTf1 и aTf2 действительно обладают чрезвычайно высокой специфичностью связывания разных форм Tf из плазмы крови человека и являются на сегодняшний день уникальными инструментами для исследований соотношения разных форм Tf в биологических жидкостях. Можно видеть, что апо-Tf-специфическое нанотело aTf2 вообще не связывает железо-насыщенный holo-Tf и при этом связывает мажорный белок, аналогичный по подвижности основной полосе маркерного препарата апо-Tf. В то же время нанотело aTf1 эффективно связывает именно holo-Tf. Мы предполагаем, что каждое из используемых нанотел потенциально способно связывать также формы Tf, в которых только одна из двух долей (N- или C-) связана с ионом железа (металла). Эти промежуточные формы, скорее всего, должны разделяться при используемом электрофорезе, и, возможно, их (и их посттрансляционно модифицированные формы) мы видим как специфические минорные полосы (в элюатах каждого из двух иммуносорбентов с анти-Tf-нанотелами) в дополнение к неспецифическим фоновым белкам, сорбирующимся непосредственно на Ni^{2+} -NTA-агарозе [12] и выявляемых также и в контрольной дорожке на рис. 2, *а*.

Применение Ni^{2+} -NTA-агарозы для связывания трансферрина хоть и позволяет на «неденатурирующем» геле детектировать формы трансферрина, движущиеся в этом случае с существенно различающейся подвижностью, не подвергая их воздействию кислых условий

элюирования с CNBr-сефарозы, но и приводит к визуализации прочих связывающихся непосредственно с Ni^{2+} -NTA-агарозой белков (представлены в контрольной пробе, К, на рис. 2, а). На более традиционном SDS-ПААГ, в отличие от «неденатурирующего» геля, все формы Tf движутся с одинаковой подвижностью, что было показано нами ранее [6, 9].

Аналогично описанному выше эксперименту с плазмой крови здорового донора мы провели иммуноаффинную хроматографию и последующее фракционирование связавшихся белков в «неденатурирующем» ПААГ для образца мочи больного РМП (на рис. 2, в представлен результат для образца № 8 из таблицы, в котором выявляются как ароTf, так и holoTf). Аликвота мочи (2500 мкл) была сконцентрирована в 10 раз (до 250 мкл) и один раз пропущена через колонку с иммобилизованными на Ni^{2+} -NTA-агарозе нанотелами (использовали колонку объемом 100 мкл, на которой было иммобилизовано примерно 600 мкг нанотел). Колонку промывали трижды тремя объемами $1 \times \text{PBS}$ с 10 мМ имидазола, затем проводили аффинную элюцию тремя объемами элюирующего раствора с 70 мМ имидазола. Белки в полученных элюатах анализировали с помощью электрофореза в градиентном «неденатурирующем» (6–10%) BisTris-ПААГ. На рис. 2, б представлено фракционирование в SDS-ПААГ исходного образца белков мочи. Из нашей предыдущей работы с этим образцом [9] мы знаем, что самым мажорным белком в нем является сывороточный альбумин (СА, он полностью уходит в проскок), а Tf присутствует в существенно увеличенном по сравнению с нормой количестве (от соответствующей ему полосы на рис. 2, в отходят стрелки). Из представленного результата можно видеть, что и здесь, как в случае плазмы крови, аро-Tf-специфическое нанотело aTf2 вообще не связывает железо-насыщенный holo-Tf и при этом связывает мажорный белок, аналогичный по подвижности основной полосе маркерного препарата аро-Tf. В то же время нанотело aTf1 эффективно связывает именно holo-Tf. Пунктирными линиями на рис. 2, в обозначены положения других минорных предполагаемых форм трансферрина, в которых только одна из двух долей (N- или C-) связана с ионом железа (металла). Такие формы, как можно предположить, особенно хорошо видны в коммерческом маркерном препарате аро-Tf.

Убедившись дополнительно в высокой специфичности связывания Tf из биологической жидкости с помощью иммобилизованных нанотел aTf1 и aTf2 и описанного выше метода,

мы для последующих параллельных анализов форм трансферрина в образцах мочи больных раком мочевого пузыря решили использовать иммуносорбенты с нанотелами, пришитыми к сефарозе, и проводить фракционирование связавшихся, а затем элюированных белков в SDS-ПААГ.

В последующей работе были использованы аннотированные образцы мочи 13 первичных больных с диагнозом рак мочевого пузыря (таблица). Во всех образцах мы определили концентрации креатинина (Кр) и общего белка (Б). Полученные данные приведены в таблице. Из представленных данных можно видеть, что отношение концентрации белка к концентрации креатинина в моче прямо коррелирует со степенью прогресса РМП от немышечно-инвазивных к мышечно-инвазивным и более злокачественным стадиям болезни.

Далее, мы провели сравнительный количественный анализ общего Tf в образцах мочи указанных в таблице больных, нормализованных (выравненных) относительно концентрации креатинина в этих образцах. Для фракционирования брали алиquotы (500 мкл) исходных образцов мочи больных и разводили их в 2 раза в $1 \times \text{PBS}$. Контрольные образцы мочи здоровых доноров (3К1, 3К2) брали по 14 мл и концентрировали в 14 раз. Все пробы параллельно были пропущены через индивидуальные 100 мкл колонки с предварительно иммобилизованными на CNBr-сефарозе нанотелами (300 мкг на 100 мкл колонки). Элюаты осаждали по Wessel–Fluegge, растворили в буфере для нанесения на гель (для электрофорезов по Лэммли) и наносили на гель алиquotы, соответствующие относительным объемам исходных образцов, выравненных по креатинину. Белки в полученных элюатах анализировали с помощью электрофореза в градиентном (5–19%) SDS-ПААГ в восстанавливающих условиях. На рис. 3 представлен результат электрофореза объединенных элюатов (общего Tf) из нормализованных образцов мочи. Видно, что повышение концентрации общего Tf в образцах мочи ассоциировано со степенью прогресса и роста злокачественности РМП. В образцах здоровых доноров и на ранних стадиях РМП (G1) Tf присутствует в сильно меньших количествах (его можно увидеть при концентрировании и нанесении соответствующих образцов в 10-кратных количествах), кроме того, использовался высокочувствительный метод окрашивания серебром [13] для детекции малопредставленного в исследуемых препаратах мочи трансферрина. Данный метод окрашивания используется для более чувствительной

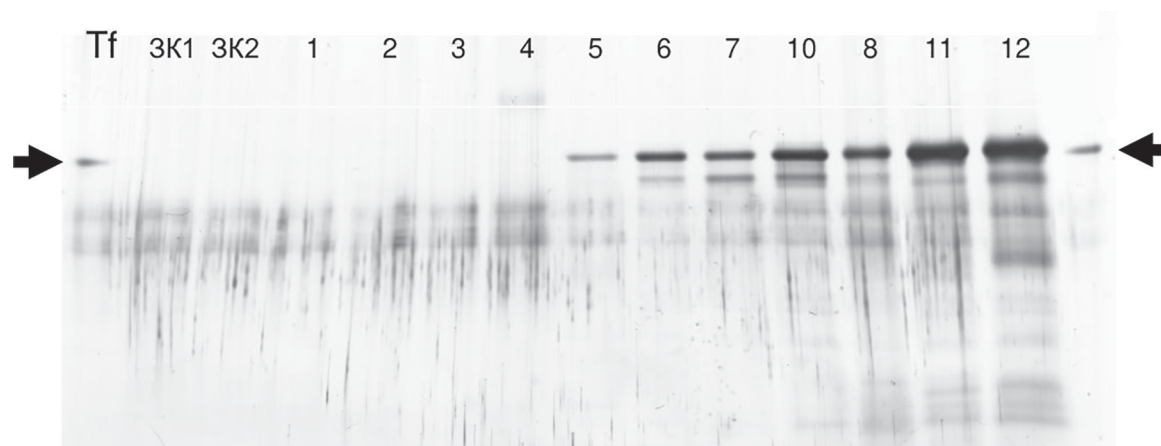


Рис. 3. Детекция трансферрина в образцах мочи больных РМП, нормализованных по креатинину, в градиентном (5–19%) SDS-ПААГ. Указаны номера образцов из таблицы. В двух крайних лунках (по бокам) нанесен коммерческий препарат Tf как маркер; 3K1 и 3K2 – образцы мочи здоровых доноров

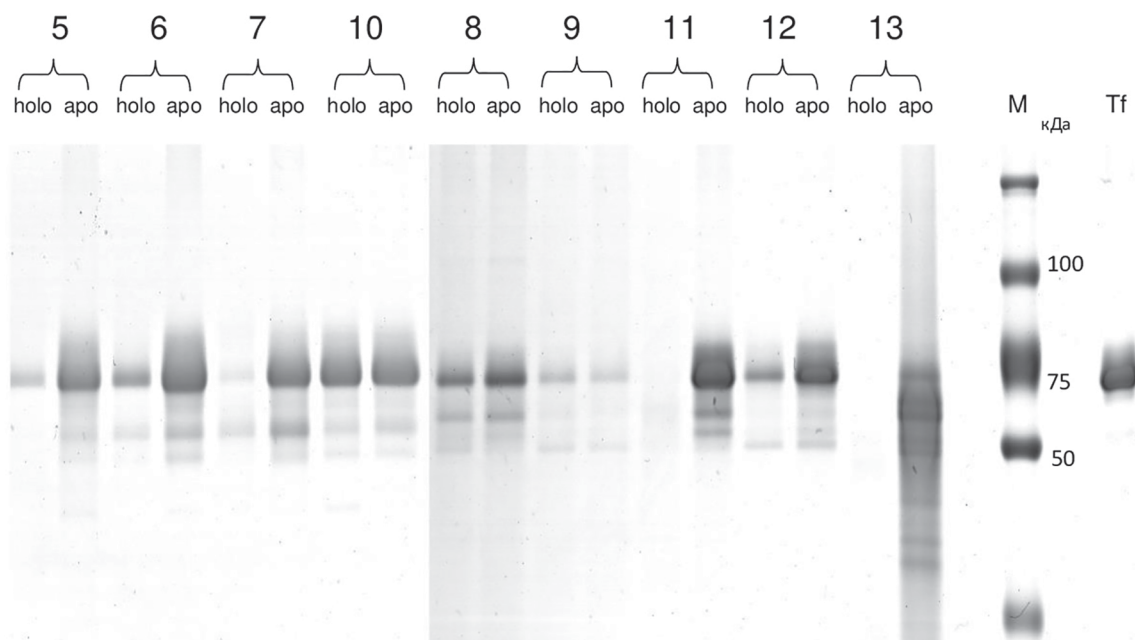


Рис. 4. Детекция разных форм трансферрина (holo-Tf и apo-Tf) в образцах мочи больных РМП (указаны номера образцов из таблицы), нормализованных по креатинину. Элюаты белков, полученные в результате проведения иммуноаффинных хроматографий на колонках с нанотелами aTf1 (holo-Tf+) или aTf2 (apo-Tf+), фракционированы в градиентном (5–19%) SDS-ПААГ в восстанавливающих условиях. Справа нанесены маркер (M) и коммерческий препарат трансферрина (Tf)

детекции белков на электрофореграмме, что, в свою очередь, приводит к усилению сигнала не только целевых белков, но и фоновых, что видно на данном изображении. Известно, что в раковых клетках активируются различные клеточные стрессы, такие как репликативный, протеотоксический, окислительный [14], которые могут приводить к деградации белков, и на продвинутых стадиях развития РМП часто выявляют деградацию белков. В наших экспериментах мы, предположительно, видим такую частичную деградацию трансферрина (в образцах с 6 по 12 на рис. 3).

В образцах мочи, где детектировали Tf, провели исследование относительной представленности разных форм Tf с помощью иммуносорбентов на основе нанотел aTf1 и aTf2. Колонки с иммобилизованными нанотелами были взяты с большим запасом по емкости (600 мкг нанотела на 100 мкл объема колонки), чтобы надежно связать весь соответствующий компонент из образца мочи. На рис. 4 представлены полученные результаты.

Для большинства исследованных образцов ожидаемо (как в случае Tf в крови больных раком яичников поздних стадий) концентрация

аро-Tf выше, чем holo-Tf, особенно в случае наиболее продвинутого мышечно-инвазивного РМП (образцы № 11, 12 и 13). В образце № 13 наблюдается деградация в элюате аро-Tf и полное отсутствие белка в элюате holo-Tf. Подобная экстремальная картина в случае образца № 11, где практически нет holo-Tf и очень много аро-Tf. Отметим, что в элюатах выявляются белковые продукты, движущиеся при электрофорезе быстрее Tf. Помимо потенциально возможной деградации Tf, эти продукты могут соответствовать и другим белкам, ассоциированным с Tf. Например, это могут быть мажорные белки экстраклеточных везикул, на поверхности которых находится Tf. Это, конечно же, только наше предположение и вопрос будущего специального изучения. В приведенных на рис. 4 результатах вызывает особые вопросы детекция почти одинаковых количеств обеих форм Tf в образцах № 8–10. Этот результат для нас оказался неожиданным. Для его объяснения мы выдвинули гипотезу: наблюдаемый «holo-Tf» может быть результатом формирования вторичных комплексов, образуемых аро-Tf в соединении с ионами, отличными от Fe^{3+} , но накапливающимися в моче ракового больного и способными при недостатке ионов Fe^{3+} связываться с аро-Tf, меняя его конформацию и делая доступными эпитопы, характерные именно для holo-Tf, которые узнаются holo-Tf-специфическим нанотелом aTf1.

Для проверки предположенной гипотезы мы провели масс-спектрометрический анализ с ионизацией в индуктивно-связанной плазме препаратов «holo-Tf», выделенных из мочи больных РМП (№ 8 и № 10), в которых

были выявлены сопоставимые количества аро- и holo-Tf. Метод МС-ИСП отличается очень высокой чувствительностью и способностью определять в одном образце сразу многие металлы. Препараты для анализа получали в результате иммуноаффинной хроматографии аликвот биологических жидкостей на колонках с иммобилизованным нанотелом (aTf1), узнающим holo-Tf. Препараты (элюаты с колонок) нормировали по количеству трансферрина (100 мкг) и передавали на анализ в одинаковых объемах (300 мкл). Для измерения раствор разбавляли в 10 раз 3%-ной азотной кислотой. В качестве контроля брали аналогично приготовленный и нормированный препарат «holo-Tf» из плазмы крови здорового донора. Первые полученные результаты МС-ИСП количественного определения ряда выбранных ионов металлов (Al, V, Cr, Fe^* , Co, Ni, Cu, Zn, Y, Cd), ассоциированных с Tf в моче указанных больных и в крови здорового донора, представлены на рис. 5 (указаны данные для выявляемых металлов с учетом вычитаемого фона используемых буферных растворов). Cr, Co, Cu, Y не были детектированы во всех пробах «holo-Tf». Представленные результаты о детектированных металлах подтверждают предположенную нами гипотезу. Препараты «holo-Tf» в этих образцах мочи оказались сильно обогащены цинком и никелем, по сравнению с препаратом «holo-Tf» из крови здорового донора, тогда как ионы алюминия (Al) и ванадия (V) определялись в примерно одинаковых концентрациях. Также в этих препаратах наблюдается относительное обогащение кадмием, но он присутствует в сильно меньших концентрациях (в правой части рис. 5).

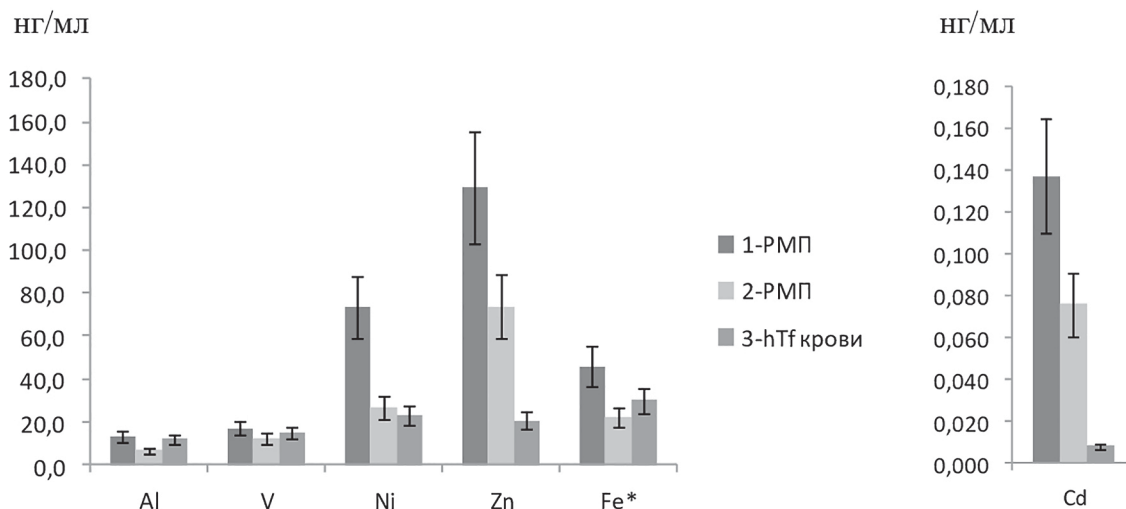


Рис. 5. Результаты определения методом МС-ИСП концентраций металлов (в нг/мл), присутствующих в наибольших количествах в образцах мочи № 10 (1-РМП) и № 8 (2-РМП) и крови (hTf крови), нормированных на 100 мкг «holo-Tf». Представлены средние данные двух измерений с указанием доверительного интервала

Полученные данные указывают на то, что используемое нанотело aTf1, узнающее преимущественно железо-насыщенную форму трансферрина (holo-Tf), способно также связывать трансферрин в ассоциации с иными ионами металлов, отличными от железа. Эта способность потенциально может открыть новые возможности в исследованиях относительной представленности разных ионов металлов в ассоциации с трансферрином в биологических жидкостях человека в норме и патологии.

В проведенных измерениях для всех ионов металлов, кроме ионов железа, были получены надежные результаты с хорошим совпадением соответствующих данных калибровки. В случае ионов железа (Fe^{3+}) было выявлено неполное совпадение измеряемого значения в образце с соответствующей калибровочной полосой, что могло немного исказить результат определения. Одним из объяснений этого может быть известный факт, что гидроксид железа $\text{Fe}(\text{OH})_3$, который может образовываться при высвобождении ионов железа от Tf при элюции в кислых условиях holo-Tf, связавшегося с иммобилизованным на сефарозе нанотелом, плохо растворим и, в отличие от гидроксидов других металлов, выпадает в осадок при значениях pH от 2 до 8 [15].

Полученные результаты вполне согласуются с данными других исследований. Так, известно, что железо-ненасыщенный apo-Tf, мажорный вариант трансферрина в крови (примерно 2 мг/мл), способен связывать, помимо ионов железа, и многие другие поступающие в кровь ионы металлов [16], такие, как Co^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} . Трансферрин является важным сывороточным транспортным агентом для большинства ионов двух- и трехвалентных металлов. Предполагается, что трансферрин играет важную роль в транспорте Ti^{4+} , VO^{2+} (V^{4+}), Cr^{3+} , Ru^{3+} и Bi^{3+} — всех ионов металлов, имеющих потенциальное терапевтическое значение. Трансферрин может играть физиологическую роль в транспорте марганца в виде трехвалентного иона. Однако этот белок может также играть роль в переносе в ткани потенциально токсичных ионов Al^{3+} и актинидов, включая Pu^{4+} [16].

Известно, что в норме в крови человека только примерно 30% сайтов потенциально-го связывания Fe^{3+} в Tf уже задействовано, и остается много сайтов в N-доле, C-доле или обеих долях молекул Tf, которые потенциально могут связать многие другие ионы металлов при дефиците ионов железа [17, 18]. Показаны разные возможные механизмы связывания других ионов с Tf: посредством тех же, что и

для Fe^{3+} металлсвязывающих сайтов; с помощью смешанного связывания, когда один из сайтов уже связан с Fe^{3+} ; путем образования связи с белковой поверхностью Tf, в котором обе доли уже связаны с ионом железа. Tf потенциально с разной эффективностью может доставлять связанные с ним ионы металлов, отличные от канонического Fe^{3+} , в клетки посредством эндоцитоза, опосредованного рецептором трансферрина [19].

С другой стороны, была выявлена явная ассоциация между уровнями тяжелых металлов в моче с повышенным риском уротелиальной карциномы (самого частотного варианта РМП) [20]. Chang et al. [20] измеряли мышьяк, кадмий, хром, содержание никеля и свинца в моче 205 человек с РМП (уротелиальной карциномой) и 406 здоровых людей. Используя масс-спектрометрию с индуктивно-связанной плазмой, они обнаружили, что в образцах мочи пациентов с РМП были значительно повышены концентрации кадмия, хрома и никеля по сравнению с образцами от здоровых людей. Повышенное количество определенных металлов в моче (таких, как цинк) может быть следствием приема определенных витаминов или особой диеты.

Доставка особых ионов металлов в клетки организма может иметь как токсический эффект для клетки, так и потенциально может быть использована для разработки новых терапевтических подходов лечения рака. Охарактеризованные нами нанотела могут быть полезным инструментом в этих исследованиях и разработках.

В качестве заключения отметим, что в данной работе с помощью уникальных инструментов, какими являются ранее нами полученные и дополнительно охарактеризованные в этой работе нанотела, специфически связывающие строго определенную форму трансферрина (или holo-Tf, или apo-Tf), нам впервые удалось провести анализ представленности этих форм трансферрина в образцах мочи больных раком мочевого пузыря и получить принципиально новые результаты. Мы показали, что повышение концентрации общего Tf в образцах мочи ассоциировано со степенью прогресса и роста злокачественности РМП. В образцах здоровых доноров и на ранних стадиях РМП (G1) Tf детектируется в сильно меньших количествах лишь при дополнительном концентрировании. Для большинства исследованных образцов мочи больных РМП ожидаемо (как в случае Tf в крови больных раком яичников поздних стадий) концентрация apo-Tf выше, чем holo-Tf,

особенно в случае наиболее продвинутого мышечно-инвазивного РМП. Неожиданностью стало обнаружение почти одинаковых количеств обеих форм Tf в ряде образцов мочи больных РМП. Это, по-видимому, объясняется тем, что фракция «holo-Tf» в данном случае в значительной степени представлена «вторичными комплексами», образуемыми apo-Tf в соединении с ионами, отличными от Fe^{3+} , накапливающимися в моче некоторых раковых больных и способными связываться с apo-Tf, меняя его конформацию в направлении holo-Tf. Методом масс-спектрометрии с ионизацией в индуктивно-связанной плазме мы получили этому подтверждение. Препарат «holo-Tf» в этих образцах мочи оказался сильно обогащен цинком и никелем. Полученные данные указывают на то, что используемое нанотело, узнающее преимущественно железо-насыщенную форму трансферрина (holo-Tf), способно также связывать трансферрин в ассоциации с иными ионами металлов, отличными от железа. Эта способность потенциально может открыть новые возможности в исследованиях относительной представленности разных ионов металлов в ассоциации с трансферрином в биологических жидкостях человека в норме и патологии.

Вклад авторов. С.В. Тиллиб — концепция и руководство работой; А.М. Сачко, О.С. Горай-

нова, Т.И. Иванова, С.В. Тиллиб — наработка нанотел, создание иммуноаффинных сорбентов, проведение экспериментов по выделению разных форм трансферрина; И.Ю. Николаева, М.Е. Тарнопольская, А.Ю. Бычков — проведение анализов методом масс-спектрометрии с ионизацией в индуктивно-связанной плазме; М.Я. Гаас, Н.В. Воробьев, А.Д. Каприн, П.В. Шегай — поставка образцов мочи от охарактеризованных больных; С.В. Тиллиб — написание статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00305).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные с участием биологических жидкостей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике, Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого участника, включенного в исследование, получено информированное добровольное согласие. Работа одобрена Этическими комитетами ИБГ РАН (разрешение от 18.01.2021) и Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Torti, S. V., and Torti, F. M. (2020) Iron: the cancer connection, *Mol. Aspects Med.*, **75**, 100860, doi: 10.1016/j.mam.2020.100860.
2. Candelaria, P. V., Leoh, L. S., Penichet, M. L., and Daniels-Wells, T. R. (2021) Antibodies targeting the transferrin receptor 1 (TfR1) as direct anti-cancer agents, *Front. Immunol.*, **12**, 607692, doi: 10.3389/fimmu.2021.607692.
3. Yiannikourides, A., and Latunde-Dada, G. O. (2019) A short review of iron metabolism and pathophysiology of iron disorders, *Medicines (Basel)*, **6**, 85, doi: 10.3390/medicines6030085.
4. Ramírez-Carmona, W., Díaz-Fabregat, B., Yuri Yoshigae, A., Musa de Aquino, A., Scarano, W. R., de Souza Castilho, A. C., Avansini Marsicano, J., Leal do Prado, R., Pessan, J. P., and de Oliveira Mendes, L. (2022) Are serum ferritin levels a reliable cancer biomarker? A systematic review and meta-analysis, *Nutr. Cancer*, **74**, 1917-1926, doi: 10.1080/01635581.2021.1982996.
5. Szőke, D., and Panteghini, M. (2012) Diagnostic value of transferrin, *Clin. Chim. Acta*, **413**, 1184-1189, doi: 10.1016/j.cca.2012.04.021.
6. Ivanova, T. I., Klabukov, I. D., Krikunova, L. I., Poluektova, M. V., Sychenkova, N. I., Khorokhorina, V. A., Vorobyev, N. V., Gaas, M. Ya., Baranovskii, D. S., Goryainova, O. S., Sachko, A. M., Shegay, P. V., Kaprin, A. D., and Tillib, S. V. (2022) Prognostic value of serum transferrin analysis in patients with ovarian cancer and cancer-related functional iron deficiency: a Retrospective case—control study, *J. Clin. Med.*, **11**, 7377, doi: 10.3390/jcm11247377.
7. Elsayed, M. E., Sharif, M. U., and Stack, A. G. (2016) Transferrin saturation: a body iron biomarker, *Adv. Clin. Chem.*, **75**, 71-97, doi: 10.1016/bs.acc.2016.03.002.
8. Tillib, S. V., Goryainova, O. S., Sachko, A. M., and Ivanova, T. I. (2022) High-affinity single-domain antibodies for analyzing human apo- and holo-transferrin, *Acta Naturae*, **14**, 98-102, doi: 10.32607/actanaturae.11663.
9. Тиллиб С. В., Горайнова О. С., Сачко А. М., Иванова Т. И., Гаас М. Я., Воробьев Н. В., Каприн А. Д., Шегай П. В. (2022) Однодоменные антитела для предобработки протеома мочи человека с целью анализа онкобиомаркеров, *Молекулярная биология*, **56**, 671-684.

10. Nowakowski, A. B., Wobig, W. J., and Petering, D. H. (2014) Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions, *Metallomics*, **6**, 1068–1078, doi: 10.1039/c4mt00033a.
11. Wessel, D., and Fluegge, U. I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids, *Anal. Biochem.*, **138**, 141–143, doi: 10.1016/0003-2697(84)90782-6.
12. Wang, F., Chmil, C., Pierce, F., Ganapathy, K., Gump, B. B., MacKenzie, J. A., Metchref, Y., and Bendinskas, K. (2013) Immobilized metal affinity chromatography and human serum proteomics, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **934**, 26–33, doi: 10.1016/j.jchromb.2013.06.032.
13. Hochstrasser, D. F., Patchornik, A., and Merrill, C. R. (1988) Development of polyacrylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silver staining, *Anal. Biochem.*, **173**, 412–423, doi: 10.1016/0003-2697(88)90208-4.
14. Luo, J., Solimini, N. L., and Elledge, S. J. (2009) Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction, *Cell*, **136**, 823–837, doi: 10.1016/j.cell.2009.02.024.
15. Zapién Serrano, L. Z., Ortiz Lara, N. O., Ríos Vera, R. R., and Cholico-González, D. (2021) Removal of Fe(III), Cd(II), and Zn(II) as hydroxides by precipitation–flotation system, *Sustainability*, **13**, 11913, doi: 10.3390/su132111913.
16. Vincent, J. B., and Love, S. (2012) The binding and transport of alternative metals by transferrin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1820**, 362–378, doi: 10.1016/j.bbagen.2011.07.003.
17. Williams, J., and Moreton, K. (1980) The distribution of iron between the metal-binding sites of transferrin human serum, *Biochem. J.*, **185**, 483–488, doi: 10.1042/bj1850483.
18. Sun, H., Li, H., and Sadler, P. J. (1999) Transferrin as a metal ion mediator, *Chem. Rev.*, **99**, 2817–2842, doi: 10.1021/cr980430w.
19. Benjamín-Rivera, J. A., Cardona-Rivera, A. E., Vázquez-Maldonado, Á. L., Dones-Lassalle, C. Y., Pabón-Colon, H. L., Rodríguez-Rivera, H. M., Rodríguez, I., González-Espiet, J. C., Pazol, J., Pérez-Ríos, J. D., Catala-Torres, J. F., Carrasquillo Rivera, M., De Jesus-Soto, M. D., Cordero-Virella, N. A., Cruz-Maldonado, P. M., González-Pagan, P., Hernández-Ríos, R., Gaur, K., Loza-Rosas, S. A., and Tinoco, A. D. (2020) Exploring serum transferrin regulation of nonferric metal therapeutic function and toxicity, *Inorganics*, **8**, 48, doi: 10.3390/inorganics8090048.
20. Chang, C. H., Liu, C. S., Liu, H. J., Huang, C. P., Huang, C. Y., Hsu, H. T., Liou, S. H., and Chung, C. J. (2016) Association between levels of urinary heavy metals and increased risk of urothelial carcinoma, *Int. J. Urol.*, **23**, 233–239, doi: 10.1111/iju.13024.

ANALYSIS OF TRANSFERRIN IN URINE IN PATIENTS WITH BLADDER CANCER USING NANOBODIES

A. M. Sachko¹, O. S. Goryainova¹, T. I. Ivanova^{1,2}, I. Yu. Nikolaeva³,
M. E. Tarnopolskaia³, A. Yu. Bychkov³, M. Ya. Gaas⁴, N. V. Vorob'ev^{5,6},
A. D. Kaprin^{4,7}, P. V. Shegay^{4,7}, and S. V. Tillib^{1*}

¹ *Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences,
119334 Moscow, Russia; e-mail: tillib@genebiology.ru*

² *Tsyb Medical Radiological Research Centre — Branch of the National Medical Research Radiological Centre
of the Ministry of Health of the Russian Federation, 249036 Obninsk, Russia*

³ *Faculty of Geology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

⁴ *Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), 117198 Moscow, Russia*

⁵ *Hertsen Moscow Oncology Research Institute — Branch of the National Medical Research Radiological Centre
of the Ministry of Health of the Russian Federation, 125284 Moscow, Russia*

⁶ *Sechenov First Moscow State Medical University
of the Ministry of Health of the Russian Federation, 119991 Moscow, Russia*

⁷ *National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation,
125284 Moscow, Russia*

It is known that the saturation ratio of transferrin (Tf) with iron in human blood is an important clinical parameter. Specific antibodies can be used to analyze subtle changes in the relative abundance of different forms of transferrin potentially associated with a pathological process. Recently, the authors of this study were able to obtain and characterize highly specific single-domain antibodies (nanobodies) that predominantly recognize the iron-saturated (holo-Tf) or iron-unsaturated (apo-Tf) form of transferrin.

In this work, under conditions closer to physiological than in previous experiments, we further demonstrated that these unique nanobodies have extremely high differential binding specificity for different forms of Tf in different human biological fluids. Using these nanobodies, we were able to analyze for the first time the relative abundance of transferrin forms in urine samples from patients with bladder cancer (BC). We have shown that an increase in the concentration of total Tf in urine samples normalized for creatinine is associated with the degree of progress and growth of malignancy of BC. In the samples of healthy donors and in the early stages of BC (G1), Tf is detected in much smaller amounts (compared to later stages) and only with additional concentration of the studied samples. For most of the studied urine samples from BC patients, it is expected (as previously shown in the case of Tf in the blood of terminal ovarian cancer patients) that the concentration of apo-Tf is clearly higher than holo-Tf, especially in the case of the most advanced muscle-invasive BC. It was a surprise for us that approximately equal amounts of apo-Tf and “holo-Tf” were found in the urine samples of some patients with BC. We hypothesized that the “holo-Tf” fraction in this case can be largely represented by “secondary complexes” formed by apo-Tf in combination with ions other than Fe^{3+} , which accumulate in the urine of some cancer patients and are able to bind to apo-Tf, changing its conformation towards holo-Tf. Using inductively coupled plasma ionization mass spectroscopy (ICP-MS), we obtained the first results confirming our hypothesis. The “holo-Tf” preparation in these urine samples was found to be highly enriched in zinc and nickel. Also in this preparation, a relative enrichment in cadmium is observed, but it is present in much lower concentrations. The data obtained indicate that the nanobody used, recognizing predominantly the iron-saturated form of transferrin (holo-Tf), is also capable of binding transferrin in association with other metal ions that are different from iron. This ability could potentially open up new possibilities in studies of the relative abundance of various metal ions in association with transferrin in human biological fluids in normal and pathological conditions.

Keywords: single-domain antibody, nanobody, apo- and holo-transferrin, affinity chromatography, bladder cancer, ICP-MS