

СТУДЕННИКОВ АРТЕМ ЕВГЕНЬЕВИЧ

**АНТИТЕЛА К ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИМ АРОМАТИЧЕСКИМ
УГЛЕВОДОРОДАМ И АНТИИДИОТИПИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К НИМ:
ПОЛУЧЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА, ПРИМЕНЕНИЕ.**

1.5.3 – молекулярная биология

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном исследовательском центре угля и углекислоты СО РАН, Институт экологии человека, г. Кемерово.

Научный руководитель:

Устинов Валентин Анатольевич к.б.н.

Федеральный исследовательский центр угля и углекислоты СО РАН, Институт экологии человека, заведующий лабораторией биотехнологии

Официальные оппоненты:

Невинский Георгий Александрович, д.х.н., профессор, заведующий лабораторией ферментов репарации, Институт Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН

Лавряшина Мария Борисовна, д.б.н., профессор кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет»

Аутеншлюс Александр Исаевич, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории метаболизма лекарств и фармакинетики научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Защита состоится «18» ноября 2022 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

С авторефератом можно ознакомиться на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан «__» ____ г.

Ученый секретарь диссертационного совета

к.х.н., доцент



Коваль В.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) – это вещества, содержащие два или более ароматических кольца. Они образуются в результате высокотемпературного пиролиза ископаемого топлива и неполного сгорания других органических материалов. ПАУ составляют одну из наиболее важных групп веществ, загрязняющих окружающую среду. Шестнадцать из них включены в список «Агентства по охране окружающей среды» (США), как приоритетные загрязнители [Tiwari et al., 2017]. ПАУ имеют относительно низкую растворимость в воде и очень липофильны, что позволяет им легко проникать через клеточные мембраны организма человека, посредством пассивной диффузии. Кроме того, растворимость ПАУ в воде уменьшается пропорционально увеличению количества ароматических колец в их составе [Srogi, 2007]. Индикатором группы ПАУ считается бензо[а]пирен (БП), который встречается практически во всех сферах окружающей среды. Индикаторная роль БП обусловлена следующими наблюдениями: БП всегда находят там, где присутствуют другие ПАУ, и он обладает наибольшей стабильностью в окружающей среде по сравнению с другими ПАУ [Kim et al., 2013; Du и Jing, 2018].

Пероральное попадание БП в организм человека может происходить с продуктами питания, приготовленными на открытом огне или выращенными в районах, загрязненных БП (из воздуха и почвы). Попадание БП через кожу может происходить при контакте с материалами, которые содержат сажу, смолу, нефтепродукты, или с использованием определенных фармацевтических препаратов, содержащих угольные смолы, используемых, например, для лечения экземы и псориаза. Патогенная сила воздействия БП на человека зависит от его срока воздействия [Carter-Harris et al., 2017] и таких факторов, как: образ жизни, диета, курение табака [Quaife et al., 2018]; проживание в загрязненных ПАУ районах; домашнее отопление и способы приготовления пищи [Mizwar и Trihadiningrum, 2015]. Серьезный вклад вносят и профессиональные риски, например: производство алюминия [Gibbs et al., 2014], газификация угля [Zhang et al., 2009], дистилляция угольной смолы при производстве кокса [Campo et al., 2012] и производстве железа и стали [Maitre et al., 2018].

При попадании в организм вещества из группы ПАУ вызывают выработку антител (АТ) [Schellenberger et al., 2009]. Показано, что эти АТ могут влиять на образование опухолей в организме за счет связывания с ПАУ и их аддуктами [De Buck et al., 2005]. В модельных экспериментах было продемонстрировано, что при иммунизации мышей конъюгатом БП-белок повышается уровень идиотипических (иАТ) против БП и антиидиотипических (аиАТ) АТ в сыворотке крови. [Ustinov et al., 2013]. Соотношение этих АТ у мышей после первой и второй иммунизации конъюгатом БП-белок совпадало с таковым у людей, больных раком легкого (РЛ). Полученные результаты можно объяснить

тем, что изменения иммунной системы организма при иммунизации мышей схожи с изменениями иммунной системы при развитии РЛ у человека. На основании этого в нашей лаборатории было предложено использовать анализ уровней иАТ против ПАУ и аиАТ в сыворотке крови человека и их соотношение (аиАТ/иАТ) в качестве иммунологических маркеров РЛ для выявления групп риска возникновения РЛ среди условно здоровых людей. Предварительные исследования в этом направлении были выполнены на гетерогенных системах: для анализа иАТ в сыворотке крови человека использовался конъюгат БП с бычьим сывороточным альбумином (БСА), а для анализа аиАТ – кроличьи поликлональные АТ против БП и мышьиные одноцепочечные АТ к БП.

Цель данной работы заключалась в получении человеческих одноцепочечных иАТ против ПАУ и аиАТ, и изучении с их помощью иммунного ответа у больных РЛ в сравнении со здоровыми людьми.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Отобрать из наивной фаговой библиотеки одноцепочечных АТ человека иАТ против БП и соответствующие аиАТ, затем проанализировать генные сегменты, кодирующие отобранные иАТ.

2. Создать штаммы *Escherichia coli*, продуцирующие различные варианты отобранных иАТ против БП и аиАТ человека, получить очищенные препараты отобранных иАТ и аиАТ и охарактеризовать их сродство и специфичность.

3. Исследовать с использованием полученных одноцепочечных АТ уровни эндогенных иАТ против БП и аиАТ в сыворотке крови пациентов с РЛ и условно здоровых доноров.

4. Разработать статистическую модель для оценки вероятности заболевания РЛ, включающую в качестве предикторов уровни эндогенных иАТ против ПАУ и аиАТ в сыворотке крови человека, оценить ее чувствительность и специфичность.

Научная новизна работы

Все результаты, представленные в данной работе, получены впервые и имеют фундаментальный характер, так как направлены на изучение малоисследованных особенностей образования АТ против ПАУ при онкологических заболеваниях. В данной работе предлагается использовать разработанный нами метод иммуноанализа АТ против БП в сыворотке крови человека для диагностики вероятности возникновения РЛ. В работе впервые получены и охарактеризованы человеческие одноцепочечные иАТ против БП и аиАТ. Эти АТ являются уникальными, их аминокислотные последовательности и характеристики не были опубликованы ранее.

Практическая значимость работы. С помощью полученных АТ разработан новый метод иммуноферментного анализа для определения эндогенных иАТ к ПАУ и аиАТ в сыворотке крови человека. С помощью этого метода проанализированы группы

больных РЛ и условно здоровых людей. На основе полученных данных впервые разработана модель логистической регрессии, определяющая РЛ с высокой вероятностью, что подтверждает возможность использования предлагаемых маркеров для диагностики ранних стадий заболевания (на этапе инициации канцерогенеза) и выявления групп риска среди условно здоровых людей.

Положения, выносимые на защиту:

1. Отобранные из наивной фаговой библиотеки человеческие одноцепочечные иАТ специфически связывают БП.
2. Отобранные из наивной фаговой библиотеки человеческие одноцепочечные аиАТ специфически связывают одноцепочечные иАТ против БП.
3. Существует разница в гуморальном иммунном ответе пациентов с РЛ и условно здоровых людей, которую можно обнаружить с помощью полученных иАТ и аиАТ.
4. Разработанная на основании выявленной разницы в иммунном ответе модель логистической регрессии позволяет отличить больных РЛ от условно здоровых людей.

Публикации и апробация работы.

По результатам диссертационной работы было получено два патента и опубликовано шесть статей в международных рецензируемых журналах, пять из которых индексируются в базе Web of Science и одна – в базе Scopus. Основные материалы диссертации были доложены на одной Российской и семнадцати международных конференциях, в том числе: International Conference on Immunology and Vaccines, Theme: Latest Technologies and Innovations in the field of Immunology and Vaccines (Вашингтон, США, 2021); II объединенный научный форум: VI съезд физиологов СНГ, VI съезд биохимиков России, IX российский симпозиум «Белки и пептиды» (Сочи-Дагомыс, Россия, 2019); Объединенный иммунологический форум (Новосибирск, Россия, 2019); Инновационный конвент «Кузбасс: образование, наука, инновации» (Кемерово, Россия, 2018); VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Москва, Россия, 2017); IX Международный конгресс Биотехнология: состояние и перспективы развития (Москва, Россия, 2017); V съезд биохимического общества России, V съезд физиологов СНГ (Сочи-Дагомыс, Россия, 2016); Experimental Biology (Бостон, США, 2015); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых (Кемерово, Россия, 2013).

Структура и объем работы.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов, их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 112 страницах, содержит 16 рисунков и 9 таблиц. Библиография включает 214 литературных источников.

Вклад автора.

Скрининг наивной фаговой библиотеки одноцепочечных АТ человека был проведен совместно с лабораторией молекулярной микробиологии в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, (заведующая лабораторией Тикунова Н.В) с любезным предоставлением самой библиотеки. Вся остальная часть исследования проделана автором самостоятельно в лаборатории биотехнологии ФИЦ УУХ СО РАН, ИЭЧ.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Отбор одноцепочечных иАТ человека к БП и аиАТ из фаговой библиотеки одноцепочечных антител человека

Для отбора иАТ против БП и аиАТ использовали наивную комбинаторную библиотеку одноцепочечных АТ человека из крови условно здоровых мужчин, состоящую из популяции фаговых АТ – рекомбинантных бактериофагов М13, каждый из которых экспонирует на своей поверхности уникальное АТ человека [Batanova et al, 2006].

Для получения одноцепочечных иАТ человека к БП в качестве антигена использовали БП, конъюгированный с БСА (БП-БСА). Всего было проведено три раунда аффинной селекции по связыванию с БП-БСА. Каждый раунд состоял из следующих этапов: сорбция соответствующего антигена (АГ) на пластик иммунологического планшета, блокировка сайтов неспецифического связывания, инкубация с популяцией бактериофагов, отмывка неспецифически связавшихся фаговых антител и элюция связавшихся с АГ фаговых антител с помощью триэтиламина. После трех раундов селекции полученными бактериофагами заражали бактериальную культуру и высевали её на агаризированую среду с добавлением антибиотика для получения отдельных бактериальных колоний. Бактериофаги из отдельных бактериальных колоний проверяли на способность связываться с соответствующим АГ методом ИФА. Всего были проанализированы фаговые антитела из 96 случайно выбранных бактериальных колоний. Пример анализа представлен на Рис. 1А. По результатам анализа выявлено 26 бактериальных клонов, продуцирующих одноцепочечные иАТ против БП-БСА.

Отбор одноцепочечных аиАТ человека проводили аналогично, только в ходе аффинной селекции в качестве антигена использовали АТ рSh – одноцепочечное иАТ мыши против БП, полученное ранее гибридным методом [Ustinov et al., 2013]. Фаговые антитела из 48 случайно выбранных бактериальных колоний после трех раундов аффинной селекции были протестированы ИФА (Рис. 1Б), после этого были отобраны 24 клон, продуцирующие одноцепочечные аиАТ, которые показали эффективное связывание с АТ рSh.

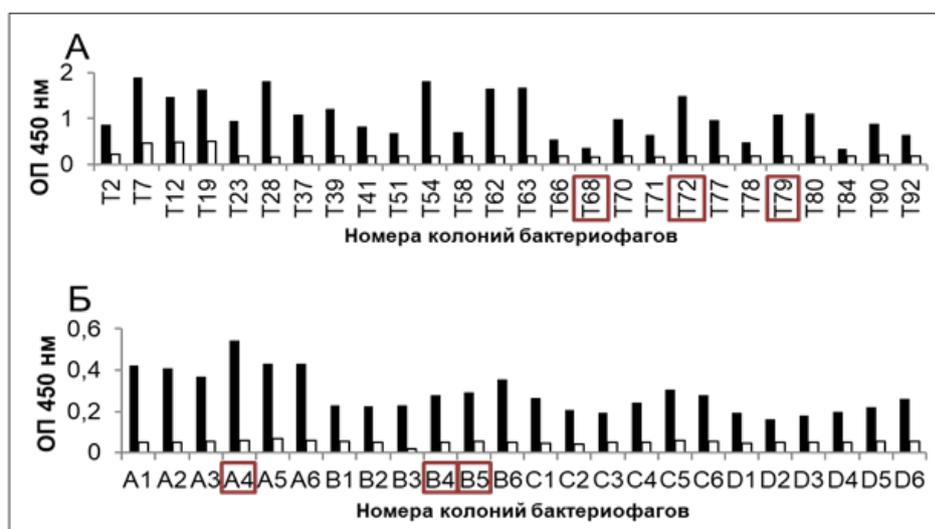


Рисунок 1. Иммуноферментный анализ связывания фаговых антител с БП-БСА (А) и с рSh (Б). На оси абсцисс приведены названия фаговых клонов, на оси ординат – значения оптической плотности (ОП). Черные столбцы – связывание фаговых антител с антигенами, сорбированными на пластик, белые – связывание антител с БСА (А) и целлюлососвязывающим доменом (ЦСД) (Б), в качестве отрицательных контролей.

Для 26 отобранных бактериальных клонов, продуцирующих одноцепочечные иАТ и 24 бактериальных клонов, продуцирующих одноцепочечные аиАТ, был проведен ПЦР-анализ на наличие генов, кодирующих одноцепочечные АТ. В 15 клонах, продуцирующих иАТ, и в 12 клонах, продуцирующих аиАТ, присутствовали ДНК-фрагменты нужной длины, около 750 п.н. (Рис. 2). В пяти и семи клонах, продуцирующих иАТ и аиАТ, соответственно, вставка отсутствовала, в шести клонах иАТ и пяти клонах аиАТ вставка не соответствовала ожидаемой длине.

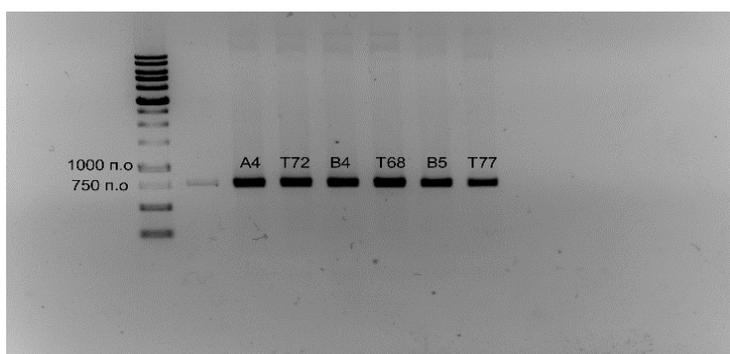


Рисунок 2. Результаты электрофоретического разделения продуктов ПЦР в 1% агарозном геле. Представлены результаты анализа ПЦР-фрагментов, кодирующих три иАТ (Т72, Т68 и Т77) против БП и три аиАТ (А4, В4 и В5). Слева приведен ДНК-маркер и указана длина в п.н.

Далее из 27 клонов, продуцирующих полноценные одноцепочечные АТ (15 иАТ и 12 аиАТ), были секвенированы соответствующие гены. В результате из 27 образцов ДНК только шесть кодировали уникальные одноцепочечные АТ: Т68, Т72, Т77 – иАТ; А4, В4, В5 – аиАТ.

Анализ нуклеотидных последовательностей отобранных генов с использованием базы данных IMGT (База данных генов зародышевых линий АТ) показал, что V сегменты тяжелых цепей шести уникальных АТ принадлежали к пяти различным группам внутри

двух семейств (Таблица 1) – IGHV1 и IGHV3; D-сегменты – к трем семействам (IGHD2, IGHD3 и IGHD4); J-сегменты – к четырем семействам (IGHJ1, IGHJ3, IGHJ4 и IGHJ6).

Легкие цепи всех уникальных АТ относились к классу каппа-цепей и распределялись по двум группам внутри семейств – IGKV1 и IGKV3, в то время как J-сегменты легких цепей также принадлежали к трем семействам: IGKJ1, IGKJ2 и IGKJ4.

Таблица 1. Классификация генов, кодирующих вариабельные домены отобранных иАТ и аиАТ

Название АТ	Вариабельные домены тяжелых цепей			Вариабельные домены легких цепей	
	V-сегмент	D-сегмент	J-сегмент	V-сегмент	J-сегмент
	иАТ (специфичные к БП-БСА)				
T68	IGHV1-3	IGHD3-16	IGHJ3	IGKV1-27	IGKJ2
T72	IGHV3-21	IGHD3-16	IGHJ1	IGKV1-39	IGKJ4
T77	IGHV1-3	IGHD2-15	IGHJ4	IGKV3-20	IGKJ4
	аиАТ (специфичные к рSh)				
A4	IGHV1-69	IGHD2-2	IGHJ6	IGKV3-20	IGKJ2
B4	IGHV1-46	IGHD5-24	IGHJ4	IGKV1-39	IGKJ1
B5	IGHV3-23	IGHD5-12	IGHJ4	IGKV1-17	IGKJ4

Известно, что БП находится повсеместно в окружающей среде, и он постоянно воздействует на человека. Для оценки воздействия БП на созревание вариабельных доменов отобранных АТ, последние были проанализированы на потенциальное селективное давление антигена. В анализе рассматривали значащие мутации, приводящие к изменению аминокислотных остатков, и молчащие мутации, не приводящие к изменению аминокислотных остатков в гипервариабельных (CDR) и каркасных (FR) участках АТ. Для анализа использовали полиномиальную и фокусированную биномиальную модели. По результатам полиномиальной модели для тяжелых цепей в CDR участках только у B4 и T77 была выявлена позитивная селекция. В FR участках негативная селекция выявлена только у T68 (Табл. 1). Одновременных признаков позитивной селекции в CDR и отрицательной в FR не было выявлено ни в одной анализируемой последовательности ДНК, кодирующей полученные АТ.

В фокусированной биномиальной модели для всех тяжелых цепей АТ признаки селективного давления были только у T68. В полиномиальном тесте для легких цепей признаки селективного давления выявлены для АТ B5, T77, T68 и B4.

Таким образом, с помощью полиномиальной и фокусированной биномиальной моделей признаки селективного давления были выявлены для T68, T77, B4 и B5. По результатам анализа можно сделать вывод, что созревание вариабельных доменов этих АТ происходило под влиянием потенциального селективного давления БП.

Затем были проанализированы аминокислотные последовательности для иАТ – T72, T77, T68; аиАТ – A4, B4, B5 (Рис. 3). Анализ аминокислотных последовательностей

иАТ показал очень низкую гомологию между собой – от 64,46% до 78,98%. Для ииАТ идентичность была еще ниже и составляла от 56% до 58%. Из полученных данных можно сделать вывод, что все АТ, отобранные из фаговой библиотеки, являются уникальными с низкой гомологией между собой.

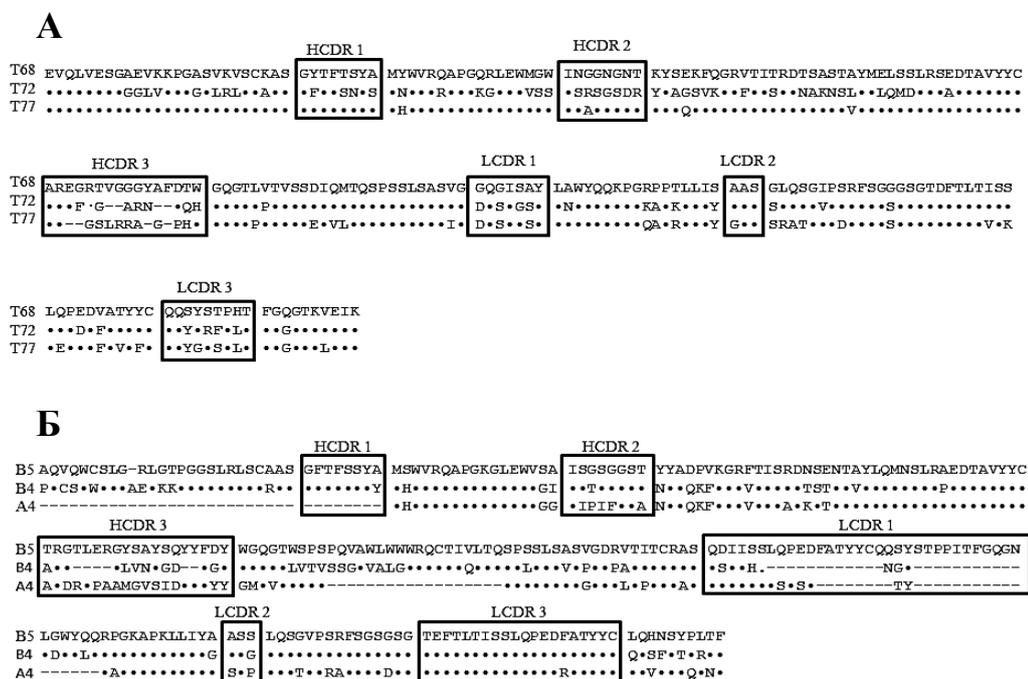


Рисунок 3 – Аминокислотные последовательности АТ с разделением на FR и CDR участки. А – иАТ, Б – ииАТ. Точками показаны совпадающие аминокислотные остатки

Так как CDR3 варибельного домена тяжелой цепи АТ принимает главное участие в узнавании АГ, на следующем этапе анализировали аминокислотные последовательности CDR3одноцепочечных АТ. В образовании CDR3 принимают участие V-, D- и J-сегменты зародышевых линий. В Таблице 2 представлен вклад различных сегментов в образование CDR3 для иАТ – Т68, Т72 и Т77 и ииАТ – А4, В4 и В5.

Таблица 2. Аминокислотный состав гиперварибельных участков CDR3 тяжелых и легких цепей иАТ – Т68, Т72, Т77 и ииАТ – А4, В4, В5 с указанием аминокислотных остатков в V-, D- и J-сегментах, принимающих участие в формировании CDR3

АТ	Варибельные домены тяжелых цепей			Варибельные домены легких цепей	
	V-сегмент	D-сегмент	J-сегмент	V-сегмент	J-сегмент
иАТ (специфичные к БП-БСА)					
T68	AR	EGRTVGGGYA	FDT	QQSYSTP	T
T72	AR	FGGARNFQH	FGH	QQYYRFP	LT
T77	AR	GSLRRAGPH	H	QQYGSSP	LT
ииАТ (специфичные к рSh)					

A4	AR	ARDRVPAAMGVSIDY	YYYYYGMDV	QQFNSY	YT
B4	AR	GGLVNYGD	FGY	QQSFTTP	RT
B5	TR	GTLEGGYSAYSQYYF	DY	LQHNSYP	LT

Как видно из Таблицы 2, вклад V-сегментов тяжелых цепей проанализированных АТ состоял только из двух консервативных аминокислотных остатков – А и R для пяти из шести случаев, что характерно как для иАТ, так и аиАТ. D-сегменты тяжелых цепей АТ содержали в основном по 8-10 аминокислотных остатков, за исключением аиАТ А4 и аиАТ В5, D-сегменты которых состояли из 15 аминокислотных остатков. По три аминокислотных остатка J-сегментов тяжелых цепей иАТ Т68 и Т72 и аиАТ В4 принимали участие в формировании CDR3. Для аиАТ А4 вклад J-сегмента в CDR3 составил 9 аминокислотных остатков, а для аиАТ В5 и иАТ Т77 – по два и одному аминокислотному остатку, соответственно (Табл. 2). Аминокислотные последовательности D-сегментов отличались между собой по длине и аминокислотному составу. То же самое наблюдалось для J-сегментов тяжелых цепей.

Для легких цепей V-сегмент проанализированных АТ состоял из 7 довольно консервативных аминокислотных остатков для всех АТ, за исключением аиАТ А4 – из 6 аминокислотных остатков. D-сегмент отсутствовал у всех АТ, за исключением иАТ Т68 (один аминокислотный остаток). J-сегмент у всех АТ состоял из 2 консервативных аминокислотных остатков, кроме иАТ Т68 – у него был 1 аминокислотный остаток (Табл. 2).

Для выявления закономерностей в аминокислотных последовательностях CDR участков иАТ и аиАТ был проведен анализ консервативности аминокислотных остатков во всех трех CDR для тяжелых и легких цепей (Рис.3). Частота встречаемости аминокислотных остатков показана величиной однобуквенного кода. Наблюдается закономерность расположения консервативных аминокислотных остатков ближе к границам CDR практически во всех случаях. Все проанализированные CDR участки различались, исключение составил CDR2 легких цепей (Рис. 4).



Рисунок 3. Анализ аминокислотных остатков в CDR. Каждый логотип состоит из колонок символов. Одна колонка для каждой позиции в последовательности. Высота символов соответствует частоте встречаемости аминокислотных остатков в данной позиции.

2. Получение штаммов-продуцентов иАТ Т72 и аиАТ А4, их выделение и очистка

Следующим этапом работы было выделение и очистка отобранных иАТ и аиАТ. Для наработки АТ был использован штамм *E.coli* HB2151 и клоны, продуцирующие иАТ Т72 и аиАТ А4. Эти одноцепочечные АТ продемонстрировали наиболее высокие сигналы при взаимодействии с соответствующими АГ (БП-БСА и рSh) в ИФА.

Культуру клеток *E.coli* HB2151 трансформировали фагмидными ДНК. В результате были получены штаммы *E.coli* HB2151/Т72 и *E.coli* HB2151/А4, продуцирующие одноцепочечные иАТ Т72 и аиАТ А4, соответственно. Следует отметить, что на С-конце молекулы каждого одноцепочечного АТ находится гексамер гистидина (His-tag 6×His) и с-Мус эпитоп.

Культуру клеток полученных штаммов наращивали в LB бульоне. Синтез целевого белка индуцировали ИПТГ. Из клеток, осажденных центрифугированием, выделяли периплазматическую фракцию. Затем одноцепочечные АТ очищали с помощью аффинной хроматографии на Ni²⁺-агарозе. Чистоту белкового препарата проверяли гель-электрофорезом в ПААГ (Рис. 4), а концентрацию белка определяли набором ВСА (Micro ВСА Protein Assay Kit, Thermo scientific, США). Электрофоретическая подвижность соответствовала 32 кДа для иАТ Т72 и 28 кДа для аиАТ А4, что соответствовало теоретически предсказанным молекулярным весом.

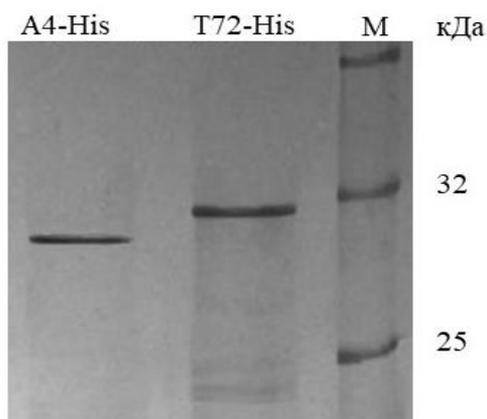


Рисунок 4. Результаты электрофоретического разделения иАТ Т72 и аиАТ А4 с 6×His в 12,5% ПААГ в денатурирующих условиях. М – маркер молекулярных весов. Справа приведены величины молекулярных весов в кДа.

Поскольку в дальнейшем планировалось использовать очищенные иАТ Т72 и аиАТ А4 в ИФА одновременно и в качестве АТ, и в качестве АГ, то было необходимо получить варианты иАТ Т72 и аиАТ А4 в виде конъюгатов с белком-носителем ЦСД (целлюлозосвязывающий домен), но не содержащие His-tag и С-тус эпитоп. При этом, в ИФА на пластик иммунологического планшета планировали сорбировать АТ с 6×His в качестве антигена, а конъюгат АТ с ЦСД добавлять в растворе. Такая схема ИФА обеспечивала высокую специфичность сигнала за счет выявления соответствующими моноклональными АТ против ЦСД только АТ, конъюгированные с ЦСД, но не АТ с His-tag, сорбированные в иммунологическом планшете.

Для получения иАТ Т72 и аиАТ А4 в виде конъюгата с ЦСД гены, кодирующие иАТ Т72 и аиАТ А4, были амплифицированы методом ПЦР и после электрофоретического разделения в агарозе выделены обработаны эндонуклеазами рестрикции и объединены с плазмидой рССО, несущей ген, кодирующий ЦСД.

Анализ полученных плазмидных конструкций проводили с помощью ПЦР. В результате длина вставки в плазмиде рССО составляла примерно 1000 п.о. (Рис. 5). Создание плазмидной конструкции рССО-А4 проводилась аналогично созданию рССО-Т72.

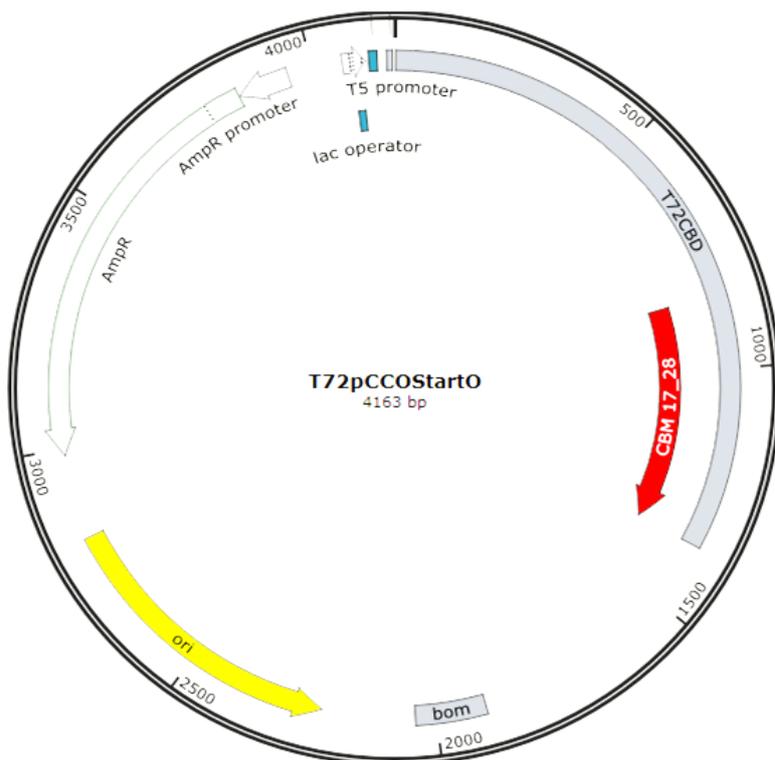
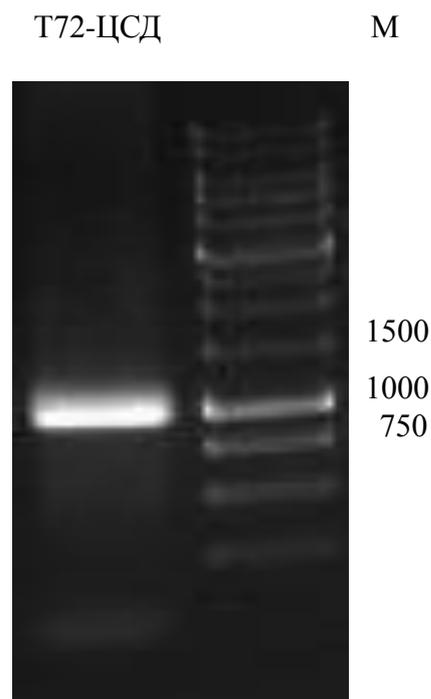
А**Б**

Рисунок 5. Схема плазмидной конструкции рССО-Т72 (А) и результат электрофоретического разделения в 1% агарозе фрагмента ПЦР, кодирующего слитый белок иАТ – Т72-ЦСД (Б). М – ДНК маркер. Справа приведены размеры в п.н.

Для наработки и выделения АТ, конъюгированных с ЦСД, плазмидными конструкциями рССО-Т72 и рССО-А4 трансформировали штамм *E.coli* M15. Выделение АТ, конъюгированных с ЦСД, проводили с помощью аффинной хроматографии на аморфной целлюлозе. Для этого клетки *E. coli* M15/рССО-Т72 или *E. coli* M15/рССО-А4 растили в LB бульоне. Затем синтез целевого белка индуцировали добавлением ИПТГ. Из осажденных бактериальных клеток выделяли тельца включения, растворяли их в мочеvine и добавляли к аморфной целлюлозе. Чистоту белкового препарата проверяли гель-электрофорезом в ПААГ (Рис. 6), а концентрацию белка определяли набором ВСА. Электрофоретическая подвижность иАТ Т72-ЦСД и аиАТ А4-ЦСД была около 45 кДа, что соответствовало теоретически предсказанным молекулярным весам.

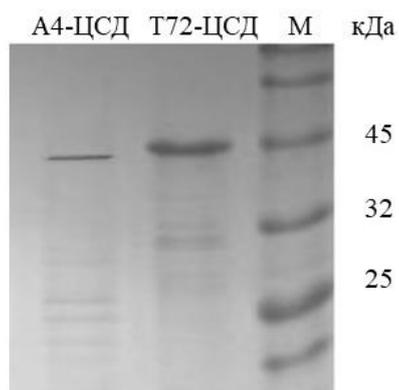


Рисунок 6. Электрофоретическое разделение в 12,5% ПААГ в денатурирующих условиях аиАТ А4-ЦСД и иАТ Т72-ЦСД. М – маркер молекулярных весов. Справа приведены величины молекулярных весов маркерных белков в кДа.

3. Иммунохимическая характеристика одноцепочечных антител: иАТ Т72 и аиАТ А4

Так как ранее описанное АТ рSh (мышинное одноцепочечное иАТ к БП) [Ustinov et al, 2014] и полученное в данной работе иАТ Т72 (человеческое одноцепочечное иАТ к БП) являются АТ с разной структурой и происхождением, мы провели сравнение их связывания с общим АГ – БП методом ИФА. Для этого на пластик иммунологического планшета сорбировали БП-БСА, а затем в лунки вносили иАТ Т72-ЦСД или рSh-ЦСД с пошаговым разведением. Как видно из графика на Рис. 7, связывание иАТ Т72 и рSh с БП-БСА происходило дозозависимо, и разница в связывании иАТ Т72 и рSh с БП-БСА по точке IC_{50} отличалось приблизительно в 2 раза. Таким образом, отобранное из наивной комбинаторной библиотеки генов АТ человека одноцепочечное иАТ Т72 связывает БП, и это связывание схоже со связыванием мышинного одноцепочечного иАТ рSh с БП, охарактеризованного ранее.

На следующем этапе проводили сравнение связывания аиАТ А4 (человеческого одноцепочечного аиАТ) с рекомбинантными одноцепочечными иАТ: (1) с человеческим иАТ Т72 против БП и (2) с мышинным иАТ рSh против БП, которое использовали для отбора аиАТ из фаговой библиотеки. Для этого в иммунологический планшет сорбировали аиАТ А4, далее в лунки вносили иАТ Т72-ЦСД или иАТ рSh-ЦСД с пошаговым разведением. Как видно из графика Рис. 8, аиАТ А4 дозозависимо связывался как с иАТ рSh, так и с иАТ Т72, несмотря на то что антиген-связывающие домены у этих АТ разные. Также стоит отметить, что связывание аиАТ А4 с иАТ рSh было меньше в 2 раза по сравнению со связыванием аиАТ А4 с иАТ Т72, что соответствовало результатам связывания рSh и иАТ Т72 с БП-БСА (Рис. 7).

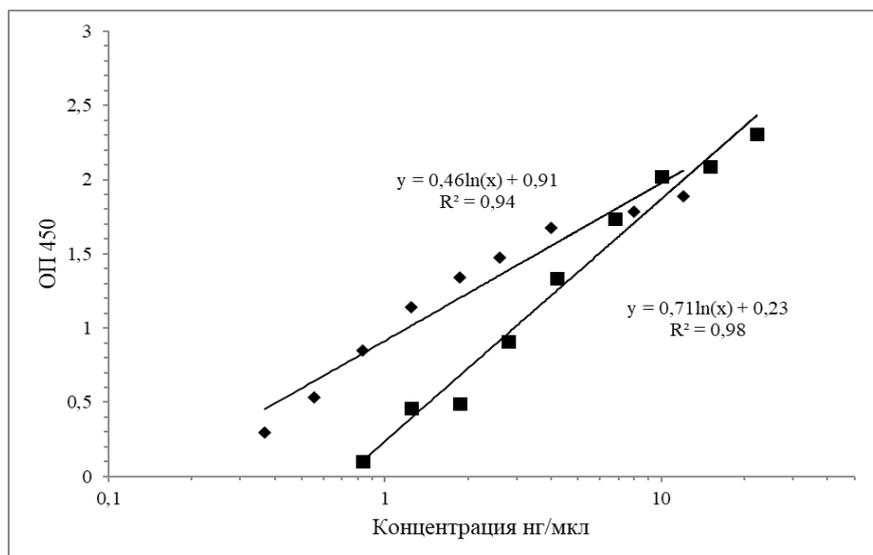


Рисунок 7. Результат ИФА. Взаимодействие иАТ рSh (квадраты) и иАТ Т72 (ромбы) с иммобилизованным БП-БСА.

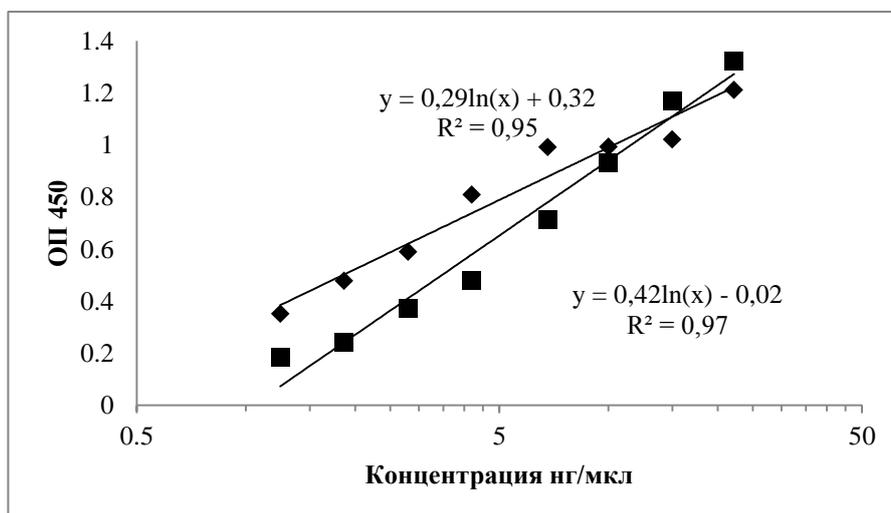


Рисунок 8. Результат ИФА. Взаимодействие аиАТ А4 с рSh (квадраты) и Т72 (ромбы). На оси ординат отложены ОП. На оси абсцисс отложена концентрация рSh и иАТ Т72.

Чтобы доказать, что аиАТ А4 является антиидиотипическим, т.е. имитирует эпитоп БП и связывает активные центры идиотипических АТ к БП, был проведен конкурентный ИФА. БП-БСА сорбировали в лунки иммунологического планшета. В растворе находились Т72 или рSh (в половинной концентрации от максимального насыщения связывания с БП – IC50) в присутствии конкурента – А4 с увеличивающейся концентрацией. А4 ингибировало в дозозависимой манере связывание как Т72, так и рSh с БП-БСА. Причем ингибирование А4 связывания Т72 с БП-БСА было сильнее почти в 3 раза, чем в случае ингибирования связывания рSh с БП-БСА. Таким образом, можно сделать вывод, что АТ А4 является аиАТ и взаимодействует с антиген-связывающим доменом как иАТ Т72, так и иАТ рSh (оба против БП). (Рис. 9).

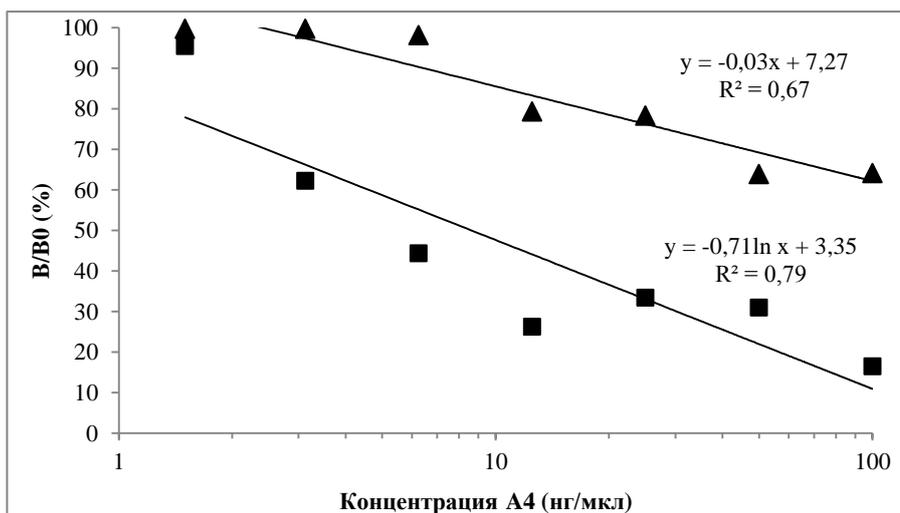
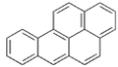
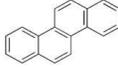
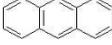
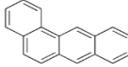
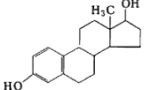


Рисунок 9. Результаты конкурентного ИФА. Связывание иАТ Т72 и АТ рSh с иммобилизованным БП-БСА в присутствии возрастающей концентрации конкурента аиАТ А4. Квадраты – иАТ Т72, треугольники – иАТ рSh.

Для измерения аффинности выделенных человеческих иАТ к группе полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) использовали оптический биосенсор ProteOn XPR36 (Bio-Rad), работающий на основе эффекта поверхностного плазмонного резонанса. Конъюгаты ПАУ-БСА были иммобилизованы на поверхность чипа GLM. Тестируемые иАТ подавали в растворе с увеличением концентраций (31,25 нМ, 62,5 нМ, 125 нМ, 250 нМ и 500 нМ). В качестве отрицательного контроля использовали конъюгат эстрадиол-БСА (ЭС-БСА), иммобилизованный на чип. Для вычислений констант использовали простые модели односайтового связывания. В Таблице 3 представлены значения динамических констант ассоциации – k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$), диссоциации – k_{off} (s^{-1}) и равновесной константы диссоциации – K_D (М), рассчитанные по формуле $K_D = k_{off} / k_{on}$. Результаты анализа показали, что равновесная константа диссоциации иАТ Т72 с веществами группы ПАУ находилась в диапазоне от 10^{-5} до 10^{-8} М. K_D связывания иАТ Т72 с БП-БСА составила 10^{-6} М. Самое эффективное связывание иАТ Т72 наблюдалось с Ба-БСА – $K_D = 10^{-8}$ М, самое неэффективное – с ЭС-БСА ($K_D = 2,43 \times 10^{-5}$ М).

Таблица 3. Динамические константы ассоциации и диссоциации, равновесные константы диссоциации для человеческого одноцепочечного иАТ Т72 с БП-БСА, Хр-БСА, Пи-БСА, Ац-БСА, Ба-БСА и ЭС-БСА

	БП-БСА 	Хр-БСА 	Пи-БСА 	Ац-БСА 	Ба-БСА 	ЭС-БСА 
$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$1,77 \times 10^4$	$1,07 \times 10^5$	$3,54 \times 10^3$	$8,88 \times 10^3$	$4,77 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$
$k_{off} (s^{-1})$	$2,43 \times 10^{-2}$	$2,82 \times 10^{-2}$	$2,91 \times 10^{-2}$	$3,32 \times 10^{-2}$	$4,49 \times 10^{-2}$	$2,43 \times 10^{-2}$
$K_D (M)$	$1,37 \times 10^{-6}$	$2,63 \times 10^{-7}$	$8,22 \times 10^{-6}$	$3,74 \times 10^{-6}$	$9,42 \times 10^{-8}$	$2,43 \times 10^{-5}$

Обозначения конъюгатов с бычьим сывороточным альбумином (БСА): БП-БСА - бензо[а]пирена, Хр-БСА – хризена, Пи-БСА – пирена, Ац-БСА – антрацена, Ба-БСА – бензантрацена, ЭС-БСА – эстрадиола.

Также были определены константы связывания аиАТ А4 с рSh и иАТ Т72. аиАТ А4 было иммобилизовано на поверхность чипа GLM. рSh и иАТ Т72 в увеличивающихся концентрациях находились в подаваемом на чип растворе: 31,25 нМ, 62,5 нМ, 125 нМ, 250 нМ и 500 нМ. В качестве отрицательного контроля использовали БСА, иммобилизованный на чип. Для вычислений констант использовали простые модели односайтового связывания. В Таблице 4 представлены значения динамических констант ассоциации – $k_{on} (M^{-1}s^{-1})$, диссоциации – $k_{off} (s^{-1})$ и равновесной константы диссоциации – $K_D (M)$, рассчитанных по формуле $K_D = k_{off}/k_{on}$. Равновесные K_D для аиАТ А4 и рSh, аиАТ А4 и иАТ Т72 составили $0,77 \times 10^{-8} M$ и $5,71 \times 10^{-7} M$, соответственно. Интересно, что связывание между аиАТ А4 и рSh было немного выше за счет диссоциации белкового комплекса ($k_{off} = 1,20 \cdot 10^{-4} s^{-1}$ для А4 и рSh, по сравнению с $k_{off} = 2,55 \cdot 10^{-3} s^{-1}$ для А4 и Т72).

Таблица 4. Динамические константы ассоциации и диссоциации, равновесные константы диссоциации взаимодействия аиАТ А4 с иАТ Т72 и аиАТ А4 с рSh

АТ	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)	Chi2 (RU)
рSh	$1,56 \cdot 10^2$	$1,20 \cdot 10^{-4}$	$0,77 \cdot 10^{-8}$	23,83
Т72	$4,42 \cdot 10^3$	$2,52 \cdot 10^{-3}$	$5,71 \cdot 10^{-7}$	34,89

4. Подбор условий для определения эндогенных иАТ и аиАТ против БП в сыворотках крови человека методом ИФА

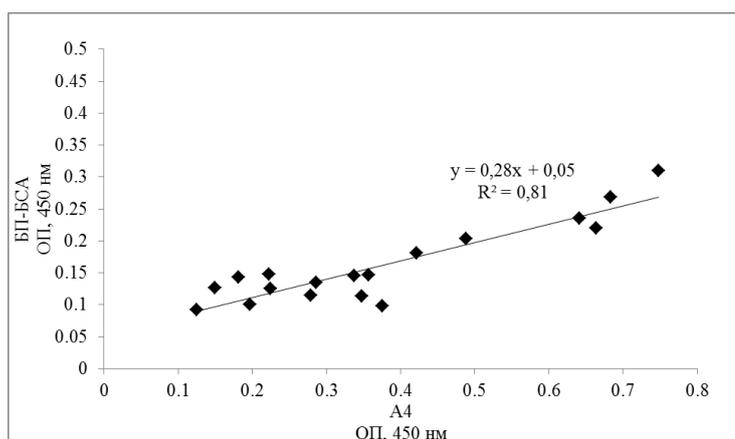
Для определения эндогенных иАТ и аиАТ в сыворотке крови человека с использованием рекомбинантных иАТ Т72 и аиАТ А4 сначала были оптимизированы условия ИФА. В результате были выбраны следующие концентрации для сорбции белков на пластик иммунологического планшета: АГ (белки) вносили в лунки плоскодонного 96-

луночного иммунологического планшета в объеме 50 мкл с дальнейшим двукратным шагом разведения, начиная с концентраций 10 нг/мкл в случае БП-БСА и 50 нг/мкл в случае ииАТ А4, иАТ Т72 и рSh. Затем планшет инкубировали в течение 1, 2, 4 и 12 часов при 37°C или при комнатной температуре. Выявление сорбированных на пластик планшета АТ производили с помощью кроличьих АТ против ЦСД и меченых пероксидазой хрена анти-кроличьих АТ. В случае БП-БСА, вначале в лунки добавляли иАТ Т72-ЦСД, а связавшиеся иАТ Т72-ЦСД выявляли кроличьими АТ против ЦСД с последующей визуализацией образовавшихся иммунных комплексов с помощью анти-кроличьих АТ, меченых пероксидазой хрена. Оптимальные условия сорбции оказались: для А4, Т72 и рSh - при 37°C в течение часа, для БП-БСА – 12 часов при комнатной температуре.

5. Сравнение связывания эндогенных иАТ против ПАУ и ииАТ из сывороток крови человека с БП и ииАТ А4, а также с иАТ Т72 и рSh

Так как АТ А4 является ииАТ, то пул АТ, который оно связывает из сыворотки крови человека, должен быть схож с пулом АТ из той же сыворотки, который связывает БП. Для этого было проведено сравнение связывания ииАТ из сывороток крови человека с БП-БСА и А4, сорбированными на иммунологический планшет. Для этого в лунки 96 луночного иммунологического планшета сорбировали БП-БСА и А4. После блокировки добавляли сыворотку крови человека, и связывание АТ из сыворотки крови проявляли с помощью АТ против IgG человека, меченных пероксидазой хрена. На Рисунке 10А изображен график, показывающий корреляцию ответа одной и той же сыворотки крови человека на разные АГ.

А



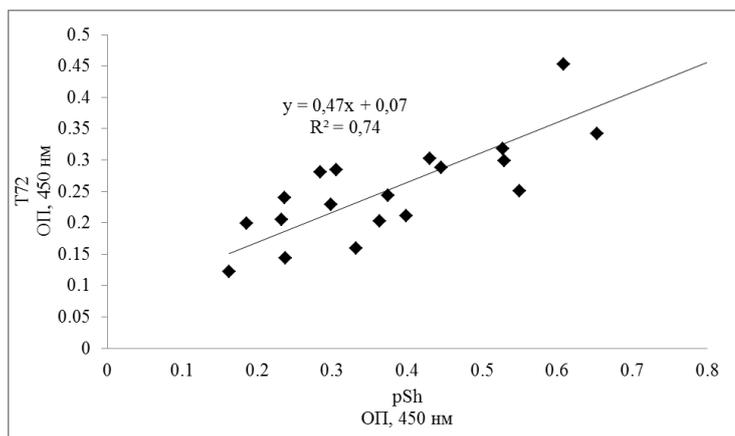
Б

Рисунок 10. Результат ИФА взаимодействия сывороток крови человека с иммобилизованными АГ: А – БП и аиАТ А4; Б – иАТ Т72 и рSh. На осях абсцисс и ординат приведены величины оптической плотности ответа для иммобилизованных пар АГ.

По аналогии с аиАТ А4 и БП провели сравнение связывание эндогенных АТ из сыворотки крови человека с иммобилизованными иАТ Т72 против БП и с АТ рSh (мышинное одноцепочечное иАТ против БП), так как они оба являются иАТ к БП (Рис. 10Б).

Как видно из графика на Рис. 10А, ответ сывороток на БП и А4 имеют линейную зависимость, т.е. при высоком ответе сывороток на сорбированный БП также наблюдается высокий ответ сывороток на сорбированный А4. Аналогичная линейная зависимость наблюдается и для пары Т72-рSh (Рис. 10Б).

6. Изучение уровней эндогенных идиотипических и антиидиотипических АТ против БП в крови больных РЛ и условно здоровых доноров

В работе были использованы сыворотки крови больных РЛ (22 человека) и условно здоровых доноров со станции переливания крови (24 человека). Группа исследуемых состояла из курящих и некурящих мужчин, возраст которых варьировал от 27 до 70 лет. В лунки иммунологического планшета сорбировали иАТ Т72 и аиАТ А4. Затем добавляли сыворотки крови людей. Следующим этапом проводили детекцию связавшихся эндогенных АТ с помощью АТ кролика против IgG человека, меченных пероксидазой хрена.

Затем, для групп исследованных людей рассчитывали средние арифметические значения уровней сигнала, полученных в ИФА для эндогенных иАТ и аиАТ (Рис. 11) и анализировали на нормальность распределения

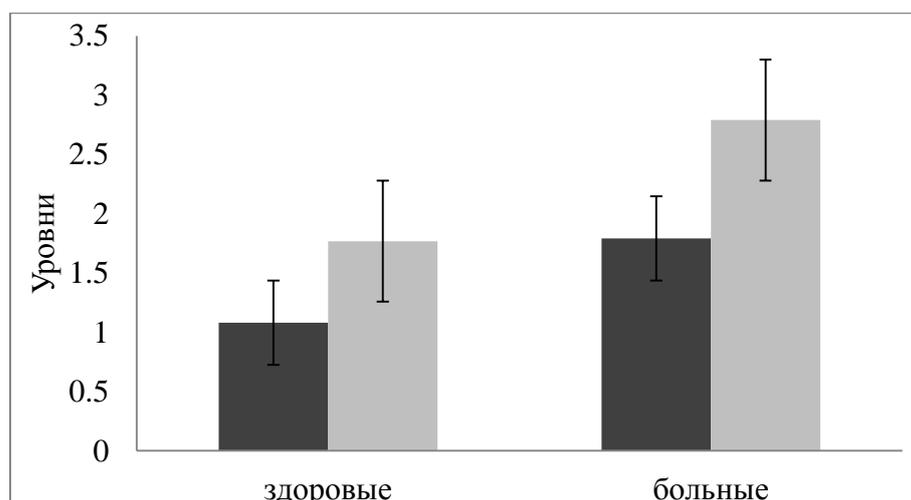


Рисунок 11. Средние арифметические значения уровней эндогенных иАТ и аиАТ в сыворотке крови для групп условно здоровых доноров и больных РЛ. Черные столбцы – уровень иАТ, серые – уровень аиАТ. Указаны среднеквадратические отклонения.

с помощью критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Анализ показал, что данные для группы условно здоровых людей не имели нормальное распределение, а для группы больных РЛ людей распределение было нормальным. Поэтому данные ИФА для обеих групп нормализовали с помощью метода Бокс-Кокса, и отличие между группами больных и условно здоровых людей рассчитывали методом Стьюдента для независимых выборок. Результат анализа представлен в Таблице 5.

Таблица 5. Средние арифметические значения уровней иАТ и аиАТ для группы больных РЛ и условно здоровых людей, рассчитанные до преобразования Бокса-Кокса. В последнем столбце указаны значения Т-критерия Стьюдента при сравнении групп больных и условно здоровых людей по иАТ и аиАТ после нормализации выборок методом Бокса-Кокса

Тип определяемых АТ из сыворотки крови	Средние арифметические значения уровней АТ для условно здоровых доноров	Средние арифметические значения уровней АТ для больных РЛ	Т-критерий Стьюдента $p < 0,05$
иАТ	2,68±0,33	3,09±0,33	0,042
аиАТ	5,09±0,64	6,72±0,6	0,000

Анализ методом Стьюдента для независимых выборок показал, что уровни иАТ и аиАТ достоверно отличаются между группами условно здоровых и больных РЛ. Для того, чтобы ввести в расчеты фактор курения, исследуемую популяцию людей проанализировали методом Хи квадрат Пирсона в зависимости от наличия или отсутствия болезни и фактора курения. Связь между факторным и результативным признаками была статистически значима и составляла $p < 0,001$.

На следующем этапе, методом Спирмена рассчитывали корреляции между факторами: возраст, курение, заболевание, уровни иАТ и аиАТ. Проверка корреляций в исследуемой популяции людей показала, что уровень аиАТ коррелирует с возрастом ($KK = 0,34$) и с наличием заболевания ($0,44$). Корреляций между иАТ и другими факторами обнаружено не было.

7. Создание модели определения вероятности заболевания РЛ у человека

Для создания модели определения вероятности заболевания РЛ был использован метод логистической регрессии. Для расчётов использовалось 4 предиктора: уровни иАТ и аиАТ, курение и возраст. Точность определения условно здоровых людей данной моделью составила 75%, а людей больных РЛ – 86,3%. Чувствительность и специфичность логистической модели составляла 86% и 95%, соответственно, а площадь под ROC-кривой составляла $AUC = 0,89$ (Рис. 12). Данная модель логистической регрессии имеет хорошие показатели для предсказания заболевания РЛ,

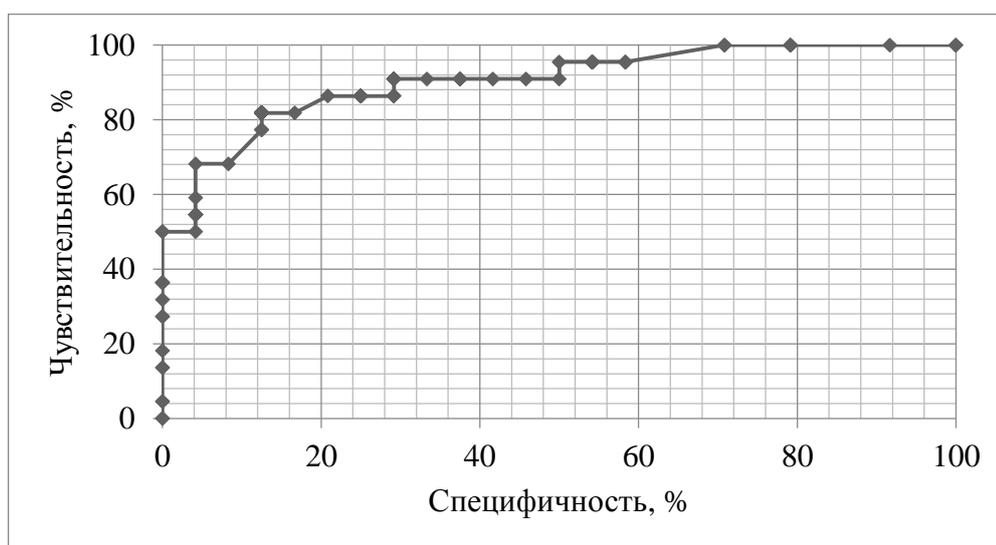


Рисунок 12. ROC-кривая модели логистической регрессии для предсказания вероятности заболевания РЛ.

так как показатели чувствительности и специфичности соответствуют другим системам определения РЛ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной диссертационной работы из наивной комбинаторной фаговой библиотеки одноцепочечных антител человека были отобраны человеческие одноцепочечные иАТ, специфически связывающие БП, и аиАТ, связывающие ранее полученное мышинное АТ pSh, специфичное к БП. На основе генов, кодирующих АТ, наиболее эффективно узнающих АГ (иАТ Т72 и аиАТ А4), были сконструированы штаммы *E.coli*, продуцирующие различные варианты этих АТ (содержащих гексомер

гистидина и ЦСД). Очищенные варианты иАТ Т72 и аиАТ А4 были охарактеризованы различными методами. Показано, что иАТ Т72 связывало не только БП, но и другие вещества группы ПАУ. Однако, оно гораздо хуже связывало эстрадиол. Установлено, что аиАТ А4 связывалось с иАТ Т72 и с мышинным одноцепочечным АТ рSh против ПАУ, полученным ранее. Конкурентный метод ИФА показал, что аиАТ А4, как и БП, взаимодействует с антиген-связывающими доменами человеческого иАТ Т72 и мышинового иАТ рSh.

С использованием полученных иАТ Т72 и аиАТ А4 был разработана технология на основе метода ИФА для определения эндогенных антител к ПАУ в сыворотке крови человека. Данные, полученные этим методом, коррелировали с данными ИФА с использованием БП-БСА и мышинового одноцепочечного АТ.

иАТ Т72 и аиАТ А4 использовали в качестве антигенов для определения уровней эндогенных иАТ и аиАТ в сыворотках крови пациентов с РЛ и условно здоровых доноров методом ИФА. Показано, что у больных РЛ уровни эндогенных антител против ПАУ в сыворотке крови выше по сравнению со здоровыми донорами, и эта разница статистически достоверна. Была построена модель логистической регрессии, с предикторами: уровень иАТ, уровень аиАТ, курение и возраст. Чувствительность и специфичность модели составила 86% и 95%, соответственно, а площадь под ROC-кривой – $AUC = 0,89$.

Результаты, полученные в данной работе, показывали, что иАТ и аиАТ, реагирующие с ПАУ и друг с другом, отражают изменения в иммунной системе человека, которые происходят при РЛ. Выявлены особенности образования иАТ и аиАТ против ПАУ у больных РЛ. Система иммуноанализа с использованием полученных одноцепочечных антител позволяет рассматривать иАТ и аиАТ против ПАУ в сыворотке крови в качестве маркеров РЛ.

ВЫВОДЫ

1. Из комбинаторной фаговой библиотеки одноцепочечных АТ человека отобраны идиотипические антитела (иАТ: Т68, Т72, Т77), специфически связывающие бензо[а]пирен (БП), и антиидиотипические антитела (аиАТ: А4, В4, В5), специфически связывающие моноклональное мышинное АТ рSh против БП. Показано, что V-, D-, J-сегменты тяжелых цепей иАТ Т68, Т72 и Т77 кодируются генными сегментами V1-3/D3-16/J4, V3-21/D3-16/J1 и V1-3/D2-15/J4, соответственно. В кодировании V-, D-, J-сегментов тяжелых цепей аиАТ А4, В4, В5 принимают участие генные сегменты V1-69/D2-2/J6, V1-46/D5-24/J4 и V3-23/D5-12/J4, соответственно. Легкие цепи отобранных иАТ и аиАТ кодируются генными сегментами, принадлежащими к классу, каппа. Созревание переменных доменов иАТ Т68, Т77 и аиАТ В4, В5 происходит под влиянием потенциального селективного давления БП.

2. Созданы штаммы *E.coli* HB2151/T72 и *E.coli* HB2151/A4, продуцирующие соответственно одноцепочечные иАТ Т72 и аиАТ А4, содержащие 6×His и с-Мус эпитоп на С-концах этих АТ, а также штаммы *E.coli* M15/pССО-T72 и *E.coli* M15/pССО-A4, продуцирующие иАТ Т72 и аиАТ А4 в виде слитых белков с ЦСД (целлюлозо-связывающий домен). Показано, что сродство очищенного иАТ Т72 к БП характеризуется величиной $K_D = 1,37 \times 10^{-6}$ М, тогда как более высокое сродство иАТ Т72 демонстрировало к бензантрацену $K_D = 9,4 \times 10^{-8}$ М. иАТ Т72 взаимодействует с аиАТ А4 и БП, при этом аиАТ А4 и БП конкурируют за связывание с иАТ Т72. Величина K_D , характеризующая сродство иАТ Т72 к аиАТ А4, оценена равной $5,71 \times 10^{-7}$ М.
3. Используя отобранные иАТ Т72 и аиАТ А4 разработана технология на основе метода иммуноферментного анализа определения эндогенных иАТ и аиАТ к полициклическим ароматическим углеводородам (ПАУ) в сыворотке крови человека и показано, что уровни эндогенных иАТ и аиАТ к ПАУ достоверно различались в крови условно здоровых людей и пациентов с раком легких.
4. Полученные результаты могут предсказывать риск заболевания раком легкого у человека, и метод можно использовать для диагностики этого заболевания. Для подтверждения этого была разработана модель логистической регрессии для оценки вероятности развития рака легкого, включающая в качестве предикторов уровни эндогенных иАТ и аиАТ к ПАУ в сыворотке крови человека; чувствительность и специфичность модели составили 86% и 95%, соответственно.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах

1. **Studennikov A.E.**, Glushkov A.N., Ustinov V.A. Detection of antibodies against benzo[a]pyrene in blood sera of lung cancer patients by ELISA using human recombinant idiotypic and anti-idiotypic antibodies. // *Exp Oncol.* – 2021. – 43(4). – P. 322-327.
2. Ustinov V.A., Nekrash M.S., **Studennikov A.E.**, Glushkov A.N. New immunological markers for the identification of lung cancer risk groups among workers in hazardous industries in Kuzbass region. // *Journal of Physics: Conference Series.* – 2021. – 1749. – P. 012039.
3. Grebenschikov I.S., **Studennikov A.E.**, Ivanov V.I., Ivanova N.V., Titov V.A., Vergbickaya N.E., Ustinov V.A. Idiotypic and anti-idiotypic antibodies against polycyclic aromatic hydrocarbon in human blood serum are new biomarkers of lung cancer. // *Oncotarget.* – 2019. – 10(49). – P. 5070-5081.
4. **Studennikov A.E.**, Ustinov V.A., Morozova V.V., Tikunova N.V., Glushkov A.N. New human single chain anti-idiotypic antibody against benzo[a]pyrene. // *Cent Eur J Immunol.* – 2017. – 42(2). – P. 123-130.

5 Arnst K.V., **Studennikov A.E.**, Ustinov V.A., Glushkov A.N. Isolation, production, and characterization of a new single chain anti-idiotypic antibody against benzo[a]pyrene. // J Immunoassay Immunochem. – 2017. – 38(6). – P. 652-662.

6. Ustinov V.A., **Studennikov A.E.**, Vavilov V.A., Tyumentseva M.A., Morozova V.V., Tikunova N.V., Glushkov A.N. Generation and Characterization of Human Single-Chain Antibodies Against Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. // Immunol Invest. – 2015. – 44(6). – P. 536-552.

Патенты

1. Патент РФ 2741382 [Способ иммуноферментного анализа идиотипических и антиидиотипических антител к бензо[а]пирену в биологических жидкостях человека] / **Студенников А.Е.**, Устинов В.А., Гребенщиков И.С., Глушков А.Н. // Заявитель и патентообладатель Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН. – РФ 2741382. – опубл. 2021.

2. Патент РФ 2702900 [Способ количественного определения антител к бензо[а]пирену в биологических жидкостях человека] / Гребенщиков И.С., Устинов В.А., **Студенников А.Е.**, Глушков А.Н. // Заявитель и патентообладатель Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН. – РФ 2702900. – опубл. 2019.