

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный
исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской
академии наук»

На правах рукописи

Студенников Артем Евгеньевич

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

1.5.3 – «молекулярная биология»

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
к.б.н. В.А. Устинов

Кемерово – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Физико-химические характеристики полициклических ароматических углеводородов	10
1.2. Химический канцерогенез, вызываемый полициклическими ароматическими углеводородами.....	14
1.2.1. Инициация.....	15
1.2.2. Промоция.....	17
1.2.3. Прогрессия	19
1.3. Антитела к полициклическим ароматическим углеводородам.....	20
1.3.1. Модельные эксперименты на животных	20
1.3.2. Модельные эксперименты на клеточных культурах	23
1.3.3. Антитела к полициклическим ароматическим углеводородам у человека	25
1.4. Функция антиидиотипических антител	26
1.4.1. Теория антиидиотипических антител	26
1.4.2. Системы анализа на основе антиидиотипических антител	29
1.4.3. Антиидиотипические антитела в онкологии – иммунотерапия.....	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	34
2.1. МАТЕРИАЛЫ	34
2.1.1. Реактивы.....	34
2.1.2. Бактериальные штаммы <i>Escherichia coli</i>	35
2.1.3. Бактериальные среды.....	35
2.1.4. Ферменты	36
2.1.5. Буферные растворы.....	36
2.1.6. Олигонуклеотиды.....	36

2.2. Методы.....	37
2.2.1. Приготовление конъюгата бензо[а]пирен-БСА.....	37
2.2.2. Амплификация комбинаторной библиотеки одноцепочечных антител человека.....	38
2.2.3. Аффинная селекция бактериофагов.....	38
2.2.4. Отбор фаговых антител	39
2.2.5. Выделение плазмидной и фагмидной ДНК из <i>Escherichia coli</i>	40
2.2.6. ПЦР плазмидной и фагмидной ДНК.....	40
2.2.7. Секвенирование плазмидной и фагмидной ДНК.....	40
2.2.8. Анализ ДНК последовательностей антител	41
2.2.9. Ферментативный гидролиз ДНК	41
2.2.10. Встраивание фрагментов ДНК в векторную плазмиду.....	41
2.2.11. Электрофорез ДНК в агарозном геле.....	42
2.2.12. Экстракция фрагментов ДНК из агарозного геля.....	42
2.2.12. Приготовление электрокомпетентных бактериальных клеток	42
2.2.13. Электропорация бактериальных клеток	43
2.2.14. Приготовление аморфной целлюлозы	43
2.2.15. Выделение и очистка полученных антител, содержащих целлюлозосвязывающий домен, с помощью аффинной хроматографии на аморфной целлюлозе	44
2.2.16. Выделение и очистка полученных антител, содержащих 6xHis, с помощью аффинной хроматографии на Ni ²⁺ -NTA агарозе	45
2.2.17. Белковый электрофорез.....	45
2.2.18. Оценка аффинности одноцепочечных антител к полициклическим ароматическим углеводородам методом поверхностного плазмонного резонанса.....	46
2.2.19. Основная характеристика групп обследованных людей	47
2.2.20. Неконкурентный иммуноферментный анализ.....	47
2.2.21. Конкурентный иммуноферментный анализ.....	48

2.2.22. Неконкурентный иммуноферментный анализ с использованием сыворотки крови человека	49
2.2.23. Статистический анализ результатов иммуноферментного анализа	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	51
3.1. Скрининг фаговой библиотеки одноцепочечных антител человека.....	51
3.2. Анализ нуклеотидной и аминокислотной последовательностей отобранных антител.....	53
3.3. Получение бактериальных штаммов-продуцентов иАТ Т72 и аиАТ А4, выделение и очистка АТ.....	61
3.4. Иммунохимическая характеристика отобранных одноцепочечных антител: иАТ Т72 и аиАТ А4	65
3.5. Подбор условий для определения эндогенных иАТ и аиАТ к бензо[А]пирену в сыворотках крови человека методом иммуноферментного анализа	70
3.6. Сравнение связывания иАТ и аиАТ к полициклическим ароматическим углеводородам из сывороток крови человека с бензо[А]пиреном, А4, Т72 и рSh	71
3.7. Определение уровней эндогенных идиотипических и антиидиотипических АТ против бензо[А]пирен в крови больных раком легкого и условно здоровых доноров	73
3.8. Создание модели определения вероятности заболевания рак легкого у человека	76
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	77
ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	82
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	86
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	88

Введение

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 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]. Канцерогенными факторами считаются и некоторые промышленные

процессы, например: производство алюминия [Gibbs et al., 2014], газификация угля [Zhang et al., 2009], дистилляция угольной смолы при производстве кокса [Campo et al., 2012] и производство 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) и антиидиотипических (аиАТ) 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 к 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 мышинные одноцепочечные АТ к БП.

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

Для достижения поставленных целей 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 *E.coli*, продуцирующие различные варианты отобранных иАТ и аиАТ человека против БП, получить очищенные препараты отобранных иАТ и аиАТ и охарактеризовать их сродство и специфичность.

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

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

Научная новизна.

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 к БП и аиАТ. Эти АТ являются уникальными, их аминокислотные последовательности и характеристики не были опубликованы ранее.

Практическая значимость работы.

С помощью полученных человеческих 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 между пациентами с РЛ и условно здоровыми людьми, которую можно обнаружить с помощью полученных рекомбинантных иАТ и аиАТ.
4. Разработанная на основании разницы в иммунном ответе модель логистической регрессии распознает больных РЛ и условно здоровых людей с высокой специфичностью.

Апробация работы и публикации.

По результатам диссертационной работы было получено два патента и опубликовано пять статей в международных рецензируемых журналах, четыре из которых индексируются в базе Web of Science и один – в базе Scopus. Основные материалы диссертации были доложены на одной Российской и шестнадцати международных конференциях, материалы которых индексируются в Web of Science:

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);

VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Москва, Россия, 2017);

V съезд биохимического общества России, V съезд физиологов СНГ (Сочи-Дагомыс, Россия, 2016);

Experimental Biology (Бостон, США, 2015).

Индексируются в РИНЦ:

Объединенный иммунологический форум (Новосибирск, Россия, 2019);

Инновационный конвент "Кузбасс: образование, наука, инновации" (Кемерово, Россия, 2018);

IX Международный конгресс Биотехнология: состояние и перспективы развития (Москва, Россия, 2017)

Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых (Кемерово, Россия, 2013).

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов, их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 113 страницах, содержит 16 рисунков и 9 таблиц. Библиография включает 209 литературных источников

Вклад автора.

Скринирование наивной фаговой библиотеки одноцепочечных АТ человека было проведено совместно с лабораторией молекулярной микробиологии в Институте химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, заведующая лабораторией Тикунова Н.В., с любезным предоставлением самой библиотеки. Вся остальная часть работы проделана автором самостоятельно в лаборатории биотехнологии ИЭЧ ФИЦ УУХ СО РАН.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Физико-химические характеристики полициклических ароматических углеводородов

Самыми распространёнными химическими канцерогенами окружающей среды являются полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) – вещества, содержащие два и больше ароматических кольца (Рис. 1). ПАУ образуются в результате пиролиза ископаемого топлива и при неполном сгорании органических материалов. ПАУ образуют одну из наиболее важных групп веществ, загрязняющих окружающую среду. Шестнадцать из них включены в список приоритетных загрязнителей US EPA. ПАУ попадают в окружающую среду главным образом благодаря антропогенной деятельности, такой как сжигание топлива, приготовление пищи и отопление зданий, сжигание отходов и масла [Tiwari et al., 2017]. Природными источниками ПАУ являются лесные и луговые пожары, извержения вулканов. ПАУ встречаются в различных сферах окружающей среды, таких как воздух, вода, почва, донные отложения. ПАУ обогащены термически обработанные пищевые продукты (жарка, выпечка, гриль, копчение) и сигаретный дым [Ewa и Danuta, 2017]. На промышленных предприятиях, было обнаружено значительное увеличение раковых заболеваний у рабочих, чья деятельность была связана с высоким уровнем воздействия ПАУ. Например, предприятия по производству кокса, каменноугольной смолы, алюминия, чугунолитейные и сталелитейные заводы, компании по производству креозота, каучука, минерального масла, сажи и технического углерода. Также известны профессии, при которых работники подвержены высокому воздействию веществ группы ПАУ: трубочисты, работники дорожного хозяйства и кровельщики [Srogi, 2007].

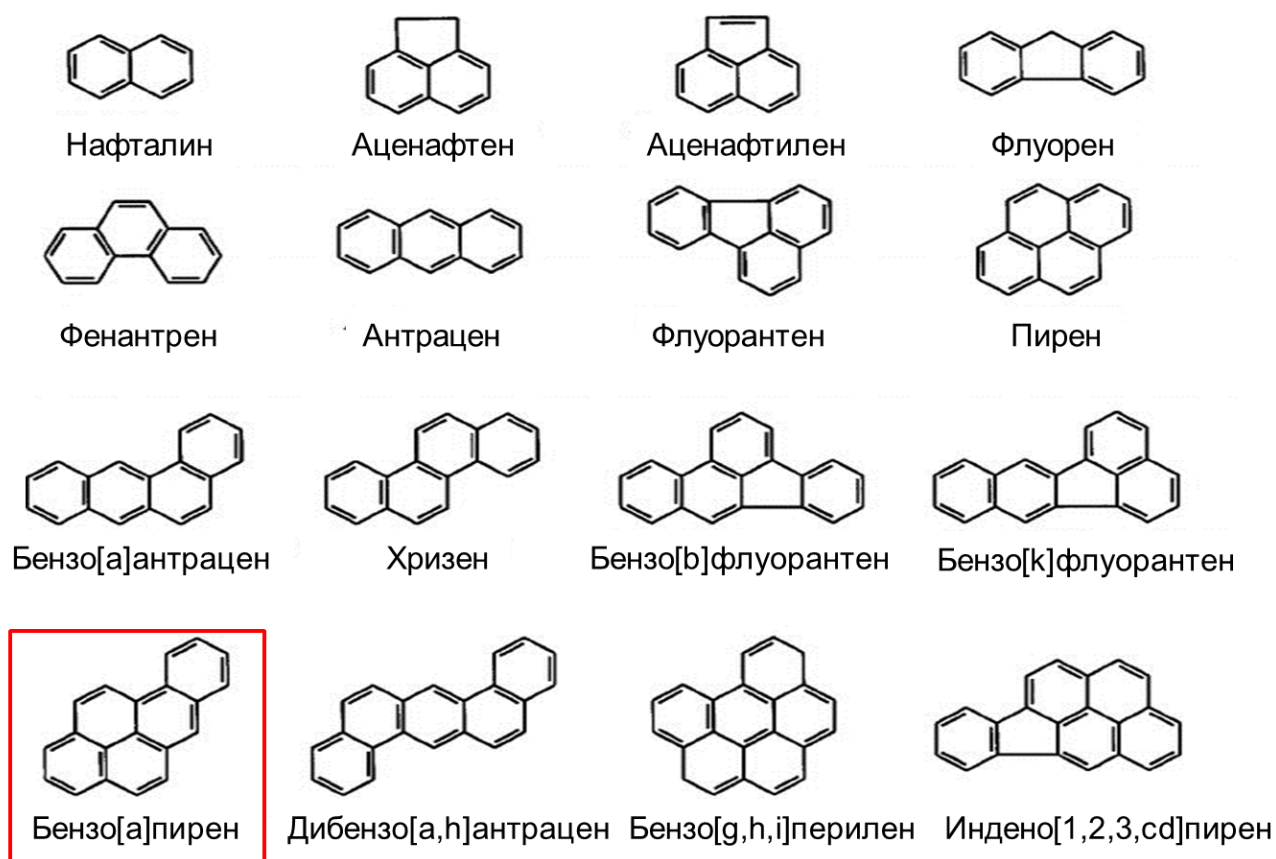


Рисунок 1 – Вещества из группы ПАУ [Rogers, 2002].

Вещества группы ПАУ обладают свойством создавать комплексы с частицами, находящимися в воздухе. Большинство ПАУ адсорбируются на мелких частицах, которые осаждаются медленно и, в зависимости от атмосферных условий и химической реактивности, могут переноситься на большие расстояния и загрязнять даже отдаленные районы [Srogi, 2007]. Воздушные твердые частицы внутри помещения были признаны значительной проблемой для здоровья человека, поскольку большинство людей проводят около 90% своего времени в помещении.

Индикатором группы ПАУ считается БП, который распространен убиквитарно, т.е. встречается практически во всех сферах деятельности человека и окружающей среде. Индикаторная роль БП обоснована следующими наблюдениями: БП всегда находят там, где присутствуют другие ПАУ; БП

обладает наибольшей стабильностью в объектах окружающей среды по сравнению с другими ПАУ [Худолей, 1999].

БП в нативном состоянии не является канцерогеном. Для проявления его канцерогенных свойств требуется его преобразование. Множественные ферментативные системы участвуют в метаболизме веществ группы ПАУ. Метаболические продукты БП, образующиеся в результате окислительных и восстановительных реакций биотрансформации исходного соединения, проявляют различную мутагенную и канцерогенную активность, что приводит к развитию опухоли [Miller и Ramos, 2001].

Процесс преобразования веществ группы ПАУ чаще всего происходит в бэй-областях. Бэй-область находится на угловых бензольных кольцах. Угловое кольцо образует зону, где окисление или образование радикалов происходит легче [Lehr et al., 1977].

ПАУ катаболизируются ферментами, метаболизирующими ксенобиотики, такими как цитохром P450 или CYP (играет ключевую роль на этапе окисления), эпоксидгидролаза (EH), глутатионтрансфераза (GST), UDP-глюкуронозилтрансфераза (UGT), сульфотрансфераза (SULT), NAD(P)H-хинон-оксидоредуктаза 1 (NQO1) и альдо-кеторедуктаза (AKR) [Shimada, 2006].

В процессе трансформации ПАУ проходят две фазы метаболизма (Рис. 2). В первой фазе к молекуле добавляется реакционноспособная группа, что делает ее подходящим субстратом для ферментов второй фазы. Реакции первой фазы включают в себя в основном микросомальные монооксигенации; цитозольное и митохондриальное окисление; окисление синтетазами простагландина; восстановление, гидролиз и гидратацию эпоксида. Во второй фазе можно выделить три основных пути катаболизма ПАУ:

(1) образование дигидродиолэпоксида, катализируемого цитохромом P450 и эпоксидгидролазой (путь CYP/EH);

(2) образование катион-радикала ПАУ в процессе окисления пероксидазой цитохрома P450;

(3) образование ортохинонов путем окисления катехолов дигидродиолдегидрогеназой, из семейства альдо-кеторедуктаз (путь AKR) [Guengerich, 2008; Shimada, 2006].

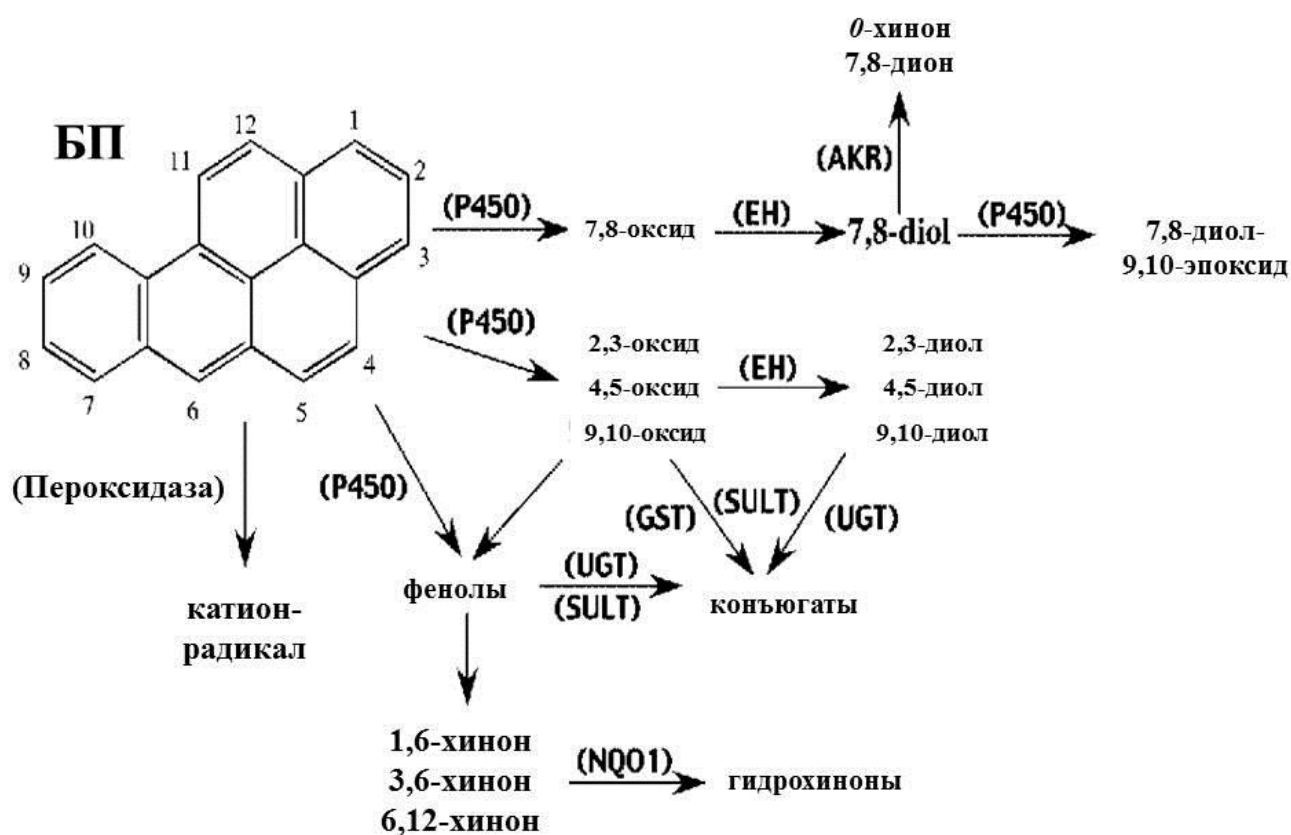


Рисунок 2 – Катаболизм БП при участии цитохрома P450 и других ферментов, метаболизирующих ксенобиотики [Shimada, 2006].

Таким образом, ПАУ катаболизируются в фенолы, катехины и хиноны [Liu Y et al., 2002]. Метаболиты ПАУ могут образовывать аддукты с ДНК, вызывая нарушения репликации ДНК, а также изменения метилирования промоторов и

связывание регуляторных белков с промоторами [Yang et al., 2012]. Также метаболиты ПАУ могут формировать комплексы с человеческим сывороточным альбумином (ЧСА) [Frank et al., 1998], гемоглобином [Ragin et al., 2008; Pastorelli et al., 2001] и липидами [Kwack и Lee, 2000]. Так, например, была обнаружена разница в концентрации аддуктов БП-ЧСА у людей, работающих с коксовыми печами на сталелитейном заводе в сравнении с работниками, работающими на том же заводе, но не с коксовыми печами: средняя концентрация аддукта БП-ЧСА была выше у работников коксовых печей по сравнению с контрольной группой [Wang et al., 2007].

1.2. Химический канцерогенез, вызываемый полициклическими ароматическими углеводородами

Канцерогенез – это сложный многостадийный процесс, при котором происходит несколько последовательных генетических событий. Злокачественная опухоль развивается в результате неконтролируемого деления клеток, которые приобретают селективное преимущество в росте, вследствие одного или нескольких изменений в геноме клетки. Канцерогеном называют фактор, воздействие которого достоверно увеличивает частоту возникновения опухолей у человека или животных [Kim et al., 2013].

Канцерогенные вещества принято делить на генотоксичные и негенотоксичные. Генотоксичные канцерогены ковалентно связываются с клеточными белками и ДНК, образуя аддукты. К негенотоксичным канцерогенам относятся вещества, неспособные ковалентно связываться с ДНК и образовывать аддукты. Например, пестициды, гормоны, волокнистые материалы и т.д. Эти вещества, как правило, неспособны сами трансформировать клетки, и их канцерогенность, скорее всего, связана с созданием условий для преимущественного деления раковых клеток [Заридзе и др., 2004].

Также факторы канцерогенеза можно разделить на экзогенные и эндогенные. К первой группе (экзогенные факторы) относятся: пищевые привычки, социально-экономический статус, образ жизни (чрезмерное употребление алкоголя, курение), физические воздействия (различные виды излучения), химические соединения (природные и синтетические), биологические агенты (*Helicobacter pylori*, вирус Эпштейн-Барр, человеческие Т-лимфотропные вирусы I и II, вирус папилломы человека, вирус гепатита В), паразиты (*Schistosoma haematobium*, *Clonorchis sinensis* и *Opisthorchis viverrini*). Ко второй группе (эндогенные факторы) относятся: повреждение иммунной системы, воспаление, генетические особенности, возраст, эндокринный баланс и физиологическое состояние [Oliveria et al., 2007].

Согласно современной теории химического канцерогенеза, различают три стадии развития опухоли: инициация, промоция и прогрессия.

1.2.1. Инициация

Первая стадия канцерогенеза была названа “инициацией” в 1947 году [Berenblum и Shubik, 1947]. Было показано, что инициация канцерогенеза вызвана генетическими изменениями в клетках. Основные характеристики инициации канцерогенеза можно свести к следующему:

1. качественный и необратимый процесс, в основе которого лежит изменение генотипа;
2. изменение генотипа происходит вследствие мутаций, индуцированных инициатором. Мутационные изменения могут быть вызваны только лишь реакционно-активной формой инициатора;
3. теоретически, единичное воздействие инициатора в любой дозе – достаточное условие для перехода нормальной клетки в инициированное состояние [Худолей, 1999].

Иницирующие агенты чаще всего являются мутагенами [McCann et al., 1975; Clive et al., 1979]. Инициаторами повреждения ДНК могут служить химические, физические воздействия и спонтанный мутагенез. Спонтанные мутации могут возникать как следствие ошибок в репликации, так и химического повреждения ДНК. Дезаминирование метилцитозина с образованием тимидина, вероятно, является наиболее частым спонтанным химическим событием, приводящим к мутациям в ДНК [Bertram, 2000].

Показано, что аддукты химических соединений с ДНК, могут нарушать комплементарные связи между цитозином и гуанином, что может приводить к образованию нетипичных пар тимина с гуанином [Lawley, 1980].

К физическим факторам инициации могут быть отнесены различные виды ионизирующего излучения (ультрафиолетовое излучение, рентгеновское излучение). Ионизирующее излучение может вызвать прямое повреждение ДНК, вызывая одно- или двухцепочечные разрывы в спирали ДНК, а также косвенное воздействие на ДНК в результате радиолиза воды [Bertram, 2000].

Инициатором может выступать и хроническое воспаление, которое приводит к развитию различных форм рака [Shacter и Weitzman, 2002]. Например, рак кожи у мышей введением канцерогенов, таких как диметилбензантрацен, с последующим повторным введением промоторов опухолей, таких как фторболмиристатацетат или бензоилпероксид, которые вызывают выработку различных медиаторов воспаления [Slaga et al., 1978]. Воспаление, вызванное внутрибрюшинным введением минеральных масел или пластиковых дисков мышам BALB/c, способствует образованию хронической гранулематозной ткани и развитию плазмоцитом [Potter et al., 1999].

Инициированные клетки могут оставаться в организме длительное время [Berenblum и Shubik, 1947; Stenbäck et al., 1981]. Инициированная клетка должна подвергнуться определенному классу мутаций, которые позволили бы ей пролиферировать и частично, но не окончательно, дифференцироваться. Т.е.

инициированная клетка должна иметь пролиферативный потенциал, но не может иметь нормального потенциала для окончательной дифференциации. Не все клетки в организме, подвергающиеся воздействию инициирующих агентов, будут инициированы, даже если у всех клеток будет повреждена ДНК [Trosko, 2001].

Инициированная клетка не является опухолевой клеткой, но находится на пути к этому состоянию, и ее фенотип, может измениться впоследствии. Процесс инициации также подавляет способность стволовых клеток-мишеней делиться асимметрично, допуская только симметричное деление клеток. Это означает, что каждый раз, когда инициируемая клетка стимулируется к делению, она может производить только две инициированные клетки одинакового типа, но не может делиться асимметрично. Если эта клетка подавляется окружающими клетками, опухоль не появится [Trosko, 2003].

Было установлено, что уровень комплексов химических канцерогенов с ДНК и количество точечных мутации имеет прямую зависимость с риском развития рака [Santella et al., 2005]. Развитие опухоли зависит от канцерогенной дозы: увеличение дозы увеличивает частоту и множественность результирующих новообразований и уменьшает латентный период его проявления [Mehta, 1995].

Однако спонтанно инициированные клетки существуют во всех живых организмах [Bertram, 2000; Trosko, 2001]. Не все клетки живого организма, подвергшиеся действию инициатора, будут инициированы, даже если они перенесли мутации [Yuspa и Poirier, 1988; Klaunig et al., 2000]. Повреждение ДНК может быть восстановлено ферментативными механизмами репарации [Bertram, 2000; Jeng et al., 2001].

1.2.2. Промоция

Концепция промоции появилась, когда были обнаружены химические вещества с низкой канцерогенной активностью, которые, однако, могли

стимулировать развитие рака в экспериментальных условиях [Berenblum и Shubik, 1947].

Промоторы не взаимодействуют напрямую с ДНК, и чаще всего имеют эпигенетическую природу. В данный момент точные механизмы действия промоторов на клетки для всех известных промоторов неизвестны. Наиболее вероятно, что промоторы должны вызывать избирательное клональное размножение инициированной клеточной популяции. Это приводит к увеличению числа клеток, подверженных риску дальнейших изменений, и к предраковому развитию [Yuspa et al., 1983; Weisburger, 1998; Mehta, 1995; Williams, 2001].

В основном промоторные воздействия на клетку связаны с метилированием ДНК и изменением гистоновых белков [Feinberg и Vogelstein, 1983; Rodriguez et al., 2006]. Показано, что фермент гистондеацетилаза 1, который осуществляет функцию ацетилирования и деацетилирования гистоновых белков, а также участвует в регуляции экспрессии генов, был наиболее активен за счет увеличения своей экспрессии при злокачественных поражениях у людей с раком простаты [Halkidou et al., 2004]. Также было показано, что при аденокарциноме желудка увеличивается уровень экспрессии гистондеацетилазы 2. Это фермент отвечает за деацетилирование лизина у коровых гистоновых белков. С помощью метода иммуногистохимии был проанализирован 71 человек с аденокарциномой желудка. Экспрессия от умеренной до сильной гистондеацетилазы 2 была обнаружена в 62% случаях [Song et al., 2005].

Промоция является обратимой стадией. После исчезновения промотора может произойти регрессия клеток путем апоптоза.

Некоторые агенты-промоторы влияют на разные типы клеток в определенных тканях, либо действуют одновременно на несколько тканей [Yuspa et al., 1983; Yuspa и Poirier, 1988]. В исследованиях химического канцерогенеза было показано, что длительное воздействие и использование высоких доз промоторных агентов приводит к возникновению опухолей. В таких случаях для

возникновения опухоли не требуется действия инициатора. Это связано с тем, что промоторы увеличивают скорость пролиферации клеток, тем самым увеличивая вероятность распространения спонтанных генетических мутаций [Pitot и Dragan, 1991; Melnick et al., 1996; Trosko, 2001].

1.2.3. Прогрессия

Эта стадия развития опухолей включает в себя генотоксические события, которые приводят к изменению от предопухолевого до неопластического состояния. Эта стадия необратима и включает в себя изменения в ploидности и целостности хромосом [Klaunig et al., 2000]. На основании анализа хромосомных изменений в опухолях было предположено, что прогрессирование опухоли происходит путем клональной эволюции, при которой происходит выживание инициированной клетки. Прогрессирование опухоли является результатом приобретенной генетической изменчивости в исходном клоне. Дальнейшие циклы деления приводят к закреплению и образованию новых изменений в ДНК и к прогрессированию опухоли [Nowell, 1976].

Одним из факторов прогрессии являются ошибки в репликации ДНК [Shacter и Weitzman, 2002]. Эта теория была основана в лабораторных экспериментах, которые показали, что ДНК-полимеразы могут включать некомплементарные нуклеотиды в ДНК. Мутации в ДНК-полимеразах могут привести к еще большему количеству ошибок. Мутантные ДНК-полимеразы могут быть источником случайных мутаций во всем геноме. Данная гипотеза была подтверждена множеством фенотипических изменений во время прогрессии опухоли, в частности, непрерывным развитием новых вариантов клеток; возрастающей способностью опухолевых клеток избегать регуляции клеточной пролиферации; накоплением хромосомных aberrаций; устойчивостью к химиотерапевтическим агентам. Показано, что ошибки в ДНК могут быть и результатом изменения в механизмах репарации ДНК [Loeb, 1998].

Прогрессия характеризуется необратимостью, генетической нестабильностью, более быстрым ростом клеток, метастазированием и изменениями в биохимических, метаболических и морфологических характеристиках клеток [Pitot и Dragan, 1991; Klaunig et al., 2000; Dixon и Kopras, 2004].

1.3. Антитела к полициклическим ароматическим углеводородам

1.3.1. Модельные эксперименты на животных

При попадании БП в организм на него, как и на другие АГ, вырабатываются АТ. Впервые выработка АТ к ПАУ была продемонстрирована в работе Franks и Creech, 1939. При предварительной иммунизации мышей конъюгатом дибензантранилкарбамида с казеином и дальнейшей индукции опухоли дибензантраценом количество образовавшихся опухолей было меньше. Это объяснялось выработкой АТ против ПАУ и их защитной функцией в организме.

Показано образование АТ на разные ПАУ в разных экспериментах на модельных животных [Schellenberger et al., 2009; Verdina et al., 1996a; Verdina et al., 1996b]. Например, предварительная внутрибрюшинная иммунизация крыс конъюгатом 2-антрилкарбамида с лошадиным сывороточным альбумином (ЛСА), с последующим кормлением животных 2-антрилкарбамидом, приводила к достоверному уменьшению количества опухолей по сравнению с контрольной группой [Pesk et al., 1971]. Это объяснялось защитной функцией АТ против веществ группы ПАУ в организме.

АТ к ПАУ могут быть разных классов. Показана выработка АТ класса А при иммунизации кроликов ацетиламинофлуореном [Silbart и Keren, 1989]. В статье Cernohorská et al., 2012 было продемонстрировано, что после подкожной иммунизации мышей конъюгатами ПАУ (БП, пирена, хризена и антрацена) с гемоцианином морского моллюска фиссуреллии и ИФА сывороток крови, на начальных стадиях иммунизации (первые 3 недели), преимущественно

вырабатывались специфические IgM, затем в большем количестве вырабатывались IgG. Стоит отметить, что АТ, полученные после иммунизации, были полиспецифичны к веществам группы ПАУ. Подобная полиспецифичность АТ к группе ПАУ также описана в статье Grova et al., 2009, где мыши были иммунизированы конъюгатами БП с овальбумином, дифтерийным и столбнячным анатоксинами. Сыворотки иммунизированных мышей анализировали на наличие и специфичность вырабатываемых АТ. Определение специфичности проводили с помощью конкурентного метода ИФА. В результате АТ были специфичны не только к БП, но и к бензо[а]пирен-7,8-дигидродиол-9,10-эпоксиду.

Все вышеупомянутые работы описывали получение АТ при иммунизации веществами группы ПАУ. Отдельно можно выделить публикации по получению АТ, специфичных к аддуктам ПАУ с ДНК. Так в работе Byung et al, 1993 мышей иммунизировали различными метаболитами ПАУ: 7,8-дигидрокси-9,10-эпокси-7,8,9,10-тетрагидробензо[а]пиреном, транс-8,9-дигидрокси-10,1-эпокси-8,9,10,11-тетрагидробензо[к]флуорантеном, транс-1,2-дигидрокси-анти-3,4-эпокси-1,2,3,4-тетрагидрохризенном, бенз[а]антрацен-транс-8,9-дигидродиол-10,1-эпоксидом, дибенз[а,h]антрацен-5,6-дигидроэпоксидом, индено[1,2,3-с,d]пирен-1,2-эпоксидом, транс-2,3-дигидрокси-1,2,1b-эпокси-1,2,3,10-тетрагидрофлуорантеном и 3-метилхолантрен-11,12-дигидроэпокс-118. После иммунизации сыворотки крови тестировали на связывание с аддуктами с ДНК и с немодифицированной ДНК без аддуктов. Результаты показали, что связывание АТ с аддуктами ПАУ-ДНК в сыворотках крови мышей после иммунизации было выше, чем с немодифицированной ДНК.

В статье Santella et al, 1986 были представлены моноклональные АТ к нескольким аддуктам ДНК с ПАУ: бензо[а]пирендиолэпоксидом, 1-аминопиреном и 8-метоксипсораленом. Связывание АТ со специфическими АГ оценивалось ИФА, в качестве АГ использовали конъюгаты ПАУ с БСА. Полученные АТ были высокоспецифичными к комплексам аддуктов ПАУ с ДНК и не связывали немодифицированную ДНК.

В следующей работе Santella et al, 1984 с помощью гибридной технологии были получены АТ к аддукту бензо[а]пирен-7,8-диол-9,10-эпоксид с ДНК и к конъюгату бензо[а]пирен-7,8-диол-9,10-эпоксид с БСА. Полученные АТ распознавали комплексы бензо[а]пирен-7,8-диол-9,10-эпоксид с ДНК и БСА, но не распознавали немодифицированную ДНК.

Также были получены поликлональные и моноклональные АТ, специфичные к аддуктам 7,8-дигидрокси-анти-9,10-эпокси-7,8,9,10-тетрагидробензо[а]пирен с ДНК. Полученные АТ были высокоспецифичными к аддуктам данного вещества с ДНК, а к 7,8-дигидрокси-анти-9,10-эпокси-7,8,9,10-тетрагидробензо[а]пирену специфичность была гораздо ниже [Van Schooten et al, 1987].

В работе Tierney et al, 1986 исследовались АТ, связывающие комплексы аддуктов БП с ДНК. Для получения АТ на поверхность кожи кроликов наносили адъювант с комплексами БП-ДНК. Анализ АТ проводили методом ИФА с иммобилизованными комплексами в лунках иммунологического планшета БП с ДНК. АТ определяли в сыворотке крови кроликов. Затем методом аффинной хроматографии с иммобилизованными иАТ кроликов определяли комплексы аддуктов БП с ДНК из кожи иммунизированных мышей.

Также было показано, что АТ против ПАУ могут участвовать в образовании опухолей [Curtis et al., 1978]. У мышей, предварительно иммунизированных конъюгатом БП-ЛСА с последующей индукцией опухолей БП, титр АТ был выше, чем в контрольной группе. Затем, для проверки, оказывают ли АТ воздействие на образование опухоли, мышам подкожно вводили БП-ЛСА, который прединкубировали с различными разведениями сыворотки крови кролика, иммунизированного БП-ЛСА. В результате в группе мышей, которым подкожно вводили БП-ЛСА с неразведенной сывороткой и сывороткой, разведенной 1:5, количество опухолей было достоверно ниже, чем в группах, которым вводили чистый БП-ЛСА или БП-ЛСА с сывороткой крови

иммунизированного кролика с большим разведением. Авторы делают вывод об участии эндогенных и экзогенных АТ против ПАУ в опухолеобразовании.

В работах Moolten et al., 1978 и 1981 было показано, что при иммунизации мышей 5-фтор-12-метилбензантрил-7-уксусной кислотой (не является канцерогеном, но схож по структуре с ПАУ) вырабатываются АТ, связывающие ПАУ. Предварительная внутрибрюшинная иммунизация уменьшает количество случаев возникновения папиллом на поверхности кожи у мышей при постоянном нанесении на поверхность кожи диметилбензантрацена. АТ, вырабатываемые после предварительной иммунизации, ингибировали образование опухоли за счет связывания ПАУ.

Было продемонстрировано влияние предварительной иммунизации антиидиотипические АТ к БП на скорость роста саркомы у крыс. Опухоль индуцировали подкожным введением БП в течение 115 дней. В результате показано, что предварительная иммунизация крыс антиидиотипические АТ замедляла рост опухолей, а также увеличивало время жизни исследуемых крыс [Chagnaud et al., 1994].

1.3.2. Модельные эксперименты на клеточных культурах

Свойства АТ к ПАУ были изучены и на клеточных линиях. Показано, что АТ к ПАУ могут уменьшать мутагенную активность ПАУ. Например, к культуре клеток фибробластов крысы добавляли АТ против БП, которые были получены иммунизацией кроликов конъюгатом БП-ЛСА [Tompa et al., 1979]. Для определения мутагенной активности БП, после инкубации клеток с комплексом БП и АТ, клетки пересевали на чашки Петри с селективной средой, содержащей уабаин, избирательно уничтожающий стареющие клетки. Оценку проводили по выросшим клеточным колониям. Выяснилось, что АТ против БП нейтрализуют его клеточную мутагенную активность.

Свойство АТ регулировать генотоксичное и канцерогенное действие БП показано в работе De Buck et al., 2005. На культурах клеток гепатобластомы человека было продемонстрировано, что специфические АТ к БП могут ингибировать генотоксическое и канцерогенное действие БП. С помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии обнаружено изменение уровней метаболитов БП, когда клетки инкубировали с АТ. Был сделан вывод, что АТ учувствуют в процессе канцерогенеза за счет связывания метаболитов БП, являющихся проканцерогенами. В дальнейшей работе De Buck et al., 2010 на культуре клеток Galu-3 (аденокарцинома легкого) было показано, что АТ к 4-метилнитрозамино-1-3-пиридил-1-бутанонолу, за счет образования комплексов со своим АГ, снижают трансэпителиальный транспорт 4-метилнитрозамино-1-3-пиридил-1-бутанонола. При этом сокращалось количество 4-метилнитрозамино-1-3-пиридил-1-бутанонола, попадающего в ткани. Также связывание АТ с 4-метилнитрозамино-1-3-пиридил-1-бутанонолом уменьшало образование его аддуктов с ДНК. Связывание 4-метилнитрозамино-1-3-пиридил-1-бутанонола с никотиновым рецептором альфа-7 стимулировало пролиферацию клеток мелкоклеточного рака легкого NCI-H82. В присутствии АТ к 4-метилнитрозамино-1-3-пиридил-1-бутанонолу пролиферация NCI-H82 снижалась дозозависимо.

ПАУ и их аддукты могут ингибировать иммунный ответ. В работе Kawabata и White Jr., 1987 показана способность производных БП влиять на гуморальный ответ на примере спленоцитов. В работе использовались производные БП: БП-7,8-диол, 3-гидрокси-БП, БП-4,5-эпоксида и БП-6,12-диона. Данные производные влияли на образование антителообразующих клеток. В результате было показано, что 3-гидрокси-БП приводил к значительному снижению образования антителообразующих клеток и снижению их жизнеспособности.

В следующей работе White Jr и Holsapple, 1984 показана способность БП, подавлять Т-зависимый и Т-независимый иммунные ответы на Т-независимый антиген – DNP^{Ficoll}, так и на Т-зависимый антиген – SRBC. Для эксперимента

использовали клетки селезенки мышей и метод ингибирования гемагглютинации эритроцитов крови овцы.

1.3.3. Антитела к полициклическим ароматическим углеводородам у человека

Наличие АТ к аддуктам БП с ДНК было обнаружено в сыворотках крови у разных групп людей. В работе Newman et al., 1988 анализировались АТ против аддуктов: БП-ДНК, БА-ДНК и хризен-ДНК. Анализ проводился методом ИФА. В группу входили люди с канцерогенной нагрузкой, типичной для городской среды. Было выявлено, что при высоких уровнях АТ к аддуктам БП-ДНК, многие сыворотки показывали высокий ответ к БА-ДНК и хризен-ДНК, из-за кросс-реактивности вырабатываемых АТ.

Анализ аддуктов БП-ДНК был проведен и для группы курящих и некурящих людей. Группа курящих людей была разделена: на бросивших курить и продолжающих курить, но в меньших количествах. Результаты ИФА показали, что наличие АТ у некурящих людей было меньше в сравнении с обеими группами курящих [Pulerà et al., 1997].

Повышенный уровень АТ к конъюгату бензо[а]пирен-7,8-диол-9,10-эпоксид с ДНК был обнаружен у работников алюминиевой промышленности и у полицейских [Galati et al., 2001]. Повышенный уровень АТ к БП выявляли в группе больных псориазом и проходящих лечение с помощью терапии Геккермана [Borský et al., 2017], операторов коксовых печей [Harris et al., 1985; Ovrebø et al., 1995], работников сталелитейного производства [Perera et al., 1988] и работников ГРЭС [Глушков и др., 2011]. При исследовании сывороток людей были обнаружены АТ к БП и БП-ДНК, принадлежащие к разным классам: IgA, IgM и IgG [Pauk et al., 2013; Borska et al., 2014].

В работе Petruzzelli et al., 1998 были определены АТ против БП-ДНК методом ИФА. Было исследовано 1345 сывороток крови условно здоровых людей. Помимо АТ, учитывалась информация о месте проживания, курении и

заболеваний органов дыхательных путей. АТ к БП-ДНК были обнаружены лишь у 21% людей. Также были обнаружены ассоциации между наличием АТ к БП-ДНК и местом проживания, курением и семейной историей рака легких.

У мужчин, больных раком легкого и у женщин больных раком молочной железы уровни сывороточных IgA, специфических к БП и эстрадиолу, были выше, чем у условно здоровых людей при одновременно низких уровнях IgA к прогестерону [Глушков и др., 2019a].

У больных раком яичника было обнаружено повышение уровня АТ класса IgA против БП в сравнении с условно здоровыми людьми [Pouns et al., 2009].

Стоит отдельно выделить исследование Chagnaud et al., 1992, в которой была разработана система ИФА для определения АТ класса IgA к БП у доноров крови с помощью моноклональных антиидиотипических АТ мыши. Обнаружено более сильное связывание сывороточных IgA с адсорбированным конъюгатом БП-БСА и с антиидиотипическими АТ к БП у больных раком молочной железы по сравнению с условно здоровыми женщинами.

1.4. Функция антиидиотипических антител

1.4.1. Теория антиидиотипических антител

На поверхности В-лимфоцитов присутствуют рецепторы, имеющие специфические сайты связывания, которые могут узнавать АГ. Связывание этих рецепторов с АГ стимулирует В-лимфоциты к пролиферации и дифференцировке в плазматические клетки. Те же самые комплементарные структуры могут быть расположены не только на АГ, но и на рецепторах других В-лимфоцитов комплементарного идиотипа. В таком случае данные рецепторы называют антиидиотипическими – аиАТ [Burnet, 1962; Behn, 2007].

Участки, имитирующие структуру АГ на поверхности АТ, называются идиотопы. Идиотопы находятся в вариабельном участке АГ связывающего центра

АТ [Pasquali et al., 1987; Parhami-Seren et al., 1990; Bentley et al., 1991]. Основная идея состоит в том, что АГ стимулирует выработку АТ первого класса, каждое из которых является АГ для второго класса АТ, они в свою очередь могут действовать как АГ для третьего класса АТ, и так далее. Таким образом, в организме образуется целая сеть взаимодействий между АТ, называемая идиотип-антиидиотипической [Jerne, 1974; Hoffmann, 1975; Jerne, 1984; Jerne, 1985] (Рис. 3).

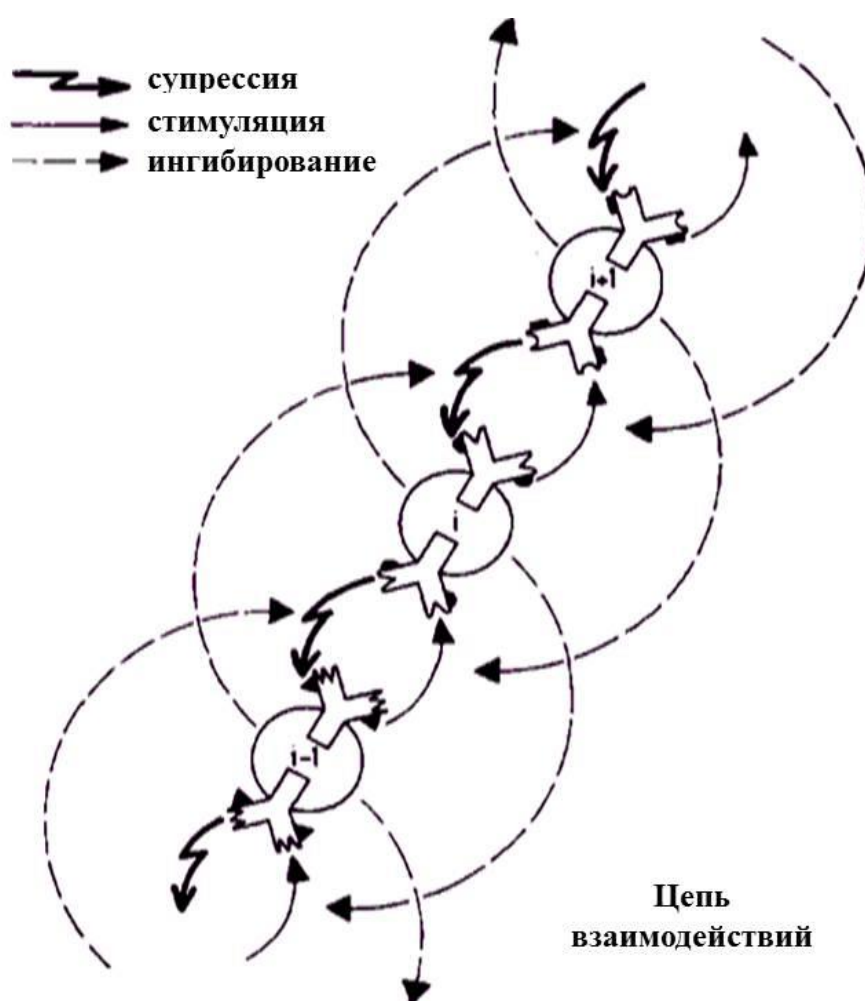


Рисунок 3 – Типы взаимодействия в идиотипической-антиидиотипической сети [Richter, 1975].

В идиотип-антиидиотипической сети может быть несколько видов взаимодействий: супрессия, стимуляция и ингибирование [Richter, 1975]. Наличие аиАТ в организме является частью нормального иммунного ответа, который состоит из сети взаимодействующих между собой АТ.

аиАТ можно разделить на группы:

Ab2 α представляют собой АТ, которые распознают идиотопы отличные от сайта связывания АГ на иАТ, но находящиеся в активном центре иАТ [Denisova et al., 1995; Denisova et al., 2000];

Ab2 β – распознают идиотопы в АГ связывающем сайте иАТ, и которые сами по структуре напоминают АГ (внутренний иммунологический образ) [Coelho et al., 2004; Souza et al., 2004; Lan et al., 2015a; Lan et al., 2017];

Ab2 γ – распознают идиотопы вне АГ связывающего сайта иАТ [Pan et al., 1995; Young et al., 1999; Zhao et al., 2014].

Также в статье Bona, 1996 выделили группу Ab2 ϵ , которые связываются с идиотопами иАТ и одновременно с АГ, взаимодействующим со связывающим сайтом иАТ. Данная группа аиАТ была описана для ацетилхолинового рецептора [Dwyer et al., 1986], для ДНК [Puccetti et al., 1990] и для аллотипов типа А1 у кроликов [Bona et al., 1984].

Экспериментально показана выработка аиАТ на разные типы АГ (белки, полисахариды и т.д.) у разных видов (мыши, куры), и также аиАТ были обнаружены в сыворотке крови у людей [Cosenza, 1976; Fernandez и Möller, 1979; Goidl et al., 1980; Geha, 1983; Arreaza et al., 1993].

В статье Menshikov et al., 2015 показана выработка аиАТ после иммунизации крыс денатурированным бычьим назальным коллагеном типа II. Детекцию проводили с помощью ИФА.

Показано, что аиАТ могут стимулировать иммунный ответ. В частности, это было продемонстрировано при иммунизации животных аиАТ к ИЛ-10 [Davtyan et al., 2013], аиАТ к полисахариду левана [Bona et al., 1984] и аиАТ к полисахариду менингококковой группы С [Westerink et al., 1998]. Иммунизация куриц аиАТ, имитирующих патологическую изоформу прионного белка (PrPSc), вызывала гуморальный иммунный ответ против первичного АГ [Colja Venturini et al., 2009].

1.4.2. Системы анализа на основе антиидиотипических антител

Из-за свойств аиАТ имитировать первичный АГ становится возможным их использование в системах иммуноанализа иАТ против различных АГ. Самым распространённым методом иммуноанализа является метод ИФА. аиАТ могут использоваться как в прямом, так и конкурентном ИФА.

В прямом ИФА аиАТ могут применяться для определения иАТ в биологических жидкостях или для определения первичного АГ (первичный АГ является АГ к иАТ, которое в свою очередь является АГ к аиАТ). Для определения иАТ используют систему, когда на иммунологический планшет сорбируют аиАТ и к нему подают исследуемые образцы. Такой метод применяют, если работа с первичным АГ может представлять опасность (вирусы, бактерии, канцерогены) [Lim et al., 2015; Maragos, 2014; Kiyohara et al., 2009; Bulashev et al., 2016; Lan et al., 2017; Raats et al., 2003; Young et al., 2015; Hong et al., 2004; Becker et al., 1996; Hu et al., 2017]. Для определения первичного АГ может использоваться следующая система: в лунки иммунологического планшета сорбируют иАТ и к нему подают исследуемые образцы. Затем добавляют аиАТ β для блокирования незанятых центров связывания. Затем подаётся меченное аиАТ α . Поскольку аиАТ β ингибирует связывание аиАТ α , то аиАТ α будет распознавать только комплекс иАТ с АГ. Такая система определения чаще всего используется при определении низкомолекулярных соединений [He et al., 2009]. Прямые методы в сыворотки крови определяли эстрадиол [Barnard и Kohen,

1990; Barnard et al., 1991], прогестерон [Barnard et al., 1995; Mares et al., 1995], метаболит желчной кислоты [Kobayashi et al., 2000; Kobayashi et al., 2003a] и деоксикортизол [Kobayashi et al., 2003b; Kobayashi et al., 2006].

Краткая характеристика конкурентного метода состоит в том, что в лунки иммунологического планшета наносят иАТ, а аиАТ подаётся в растворе вместе с сывороткой крови. аиАТ и АТ из исследуемых образцов сыворотки крови конкурируют за связывание с иммобилизованными иАТ [He et al., 2009]. Подобный метод был разработан для определения в сыворотке крови афлатоксина b1 [Hsu и Chu, 1995], фумонизина B-1 [Chu et al., 1995; Yu и Chu, 1999], микроцистина [Nagata et al., 1999] и гормона роста [Lan et al., 2015b].

Также аиАТ используют и в других методах иммуноанализа. Например, в работе Schulz et al., 2019 была использована система, использующая электрохимические биочипы, с иммобилизованными иАТ и аиАТ. С их помощью определяли сакситоксин и афлатоксин M1 *in silico*.

1.4.3. Антиидиотипические антитела в онкологии – иммунотерапия

аиАТ является очень привлекательным инструментом для иммунотерапии рака. Принципом использования аиАТ для этой цели является высокая специфичность АТ, которые вырабатываются при иммунизации аиАТ. Это позволяет выработать специфичный иммунный ответ на уникальные антигены раковых опухолей. В основном используются аиАТ β , так как они несут внутренний образ АГ. Иммунный ответ на такие АТ будет максимально напоминать ответ на первичный АГ [Herlyn и Koprowski, 1988; Herlyn et al., 1988; Herlyn et al., 1991].

Эффект аиАТ на рост опухолей был показан на животных [Raychaudhuri et al., 1987; Saeki et al., 1989; Wang et al., 2015]. Так, в модельных экспериментах на мышах линии BALB/c было показано, что после индукции опухоли и

последующем введении аиАТ к р53 со временем рост опухоли не увеличивался по сравнению с контролем [Ruiz et al., 1998].

Другим примером применения аиАТ является использование 1E10, полученного после иммунизации мышей конъюгатом РЗ с гемоцианином (РЗ – иАТ специфичного к NeuGc-содержащим ганглиозидам) [Perez et al., 2002; Fernandez et al., 2010]. Было показано, что 1E10 индуцировало анти-NeuGcGM3 иммунный ответ. АТ 1E10 распознавало и непосредственно убивало опухолевые клетки, экспрессирующие NeuGc-содержащие ганглиозиды, по механизму независимому от активации комплемента [Hernández et al., 2011].

Для клеток меланомы характерна повышенная экспрессия мембранного дисialogанглиозида GD2, поэтому было предложено использовать его в качестве мишени для лечения этого заболевания. В качестве препарата применяли аиАТ под названием TriGem, имитирующие дисialogанглиозид GD2. При введении он стимулировал специфический иммунный ответ против дисialogанглиозида GD2 [Foon et al., 2000; Lutzky et al., 2002]. По такому же принципу применяются аиАТ и к ганглиозиду GD3 [Chapman и Houghton, 1991; Ramos et al., 2011].

Другой пример, аиАТ 105AD7, которое имитирует эпитоп CD55, отвечающий за регуляцию системы комплемента [Austin et al., 1989; Spendlove et al., 2000]. 105AD7 использовали для иммунотерапии людей после операции при колоректальном раке. Было показано, что 105AD способно вызывать иммунный ответ против CD55 и у большинства пациентов увеличивал выживание [Durrant et al., 2000; Pritchard-Jones et al., 2005; Ullenhag et al., 2008].

Одной из перспективных мишеней при лечении меланомы является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). Так, например, была проведена иммунизация мышей с использованием аиАТ к VEGF. Результаты показали, что использование данных аиАТ вызывало у мышей выработку иАТ к VEGF, что приводило к некрозу опухолей [Sanches et al., 2016].

МК2-23 является аиАТ, имитирующее АГ человеческого протеогликана хондроитинсульфата – высокомолекулярного белка, являющегося маркером меланомы [Mittelman et al., 1992; Campoli et al., 2004; Chang et al., 2004]. МК2-23 использовалось для иммунотерапии пациентов с диагнозом меланома. В ходе лечения наблюдался регресс метастазов и увеличение общей выживаемости у пациентов [Mittelman et al., 1994; Mittelman et al., 1995].

Заключение

Из представленных в литературном обзоре данных следует, что в развитии РЛ участвуют многие факторы, и не последнюю роль в его образовании играют вещества группы ПАУ. Показано, что комплексы ПАУ с макромолекулярными носителями (ДНК и белки) приводят к синтезу специфических антител. Данные антитела могут быть различных классов. Торможение или развитие канцерогенеза, обнаруженные при иммунизации животных в зависимости от условий экспериментов позволяют предположить, что у человека АТ против БП могут выполнять разнонаправленные функции – ингибировать или способствовать возникновению рака. Одной из причин такого разнонаправленного действия АТ против БП может быть наличие аиАТ. Малоизученным остаётся их роль в химическом канцерогенезе. Известно, что аиАТ могут как супрессировать, так и стимулировать иммунный ответ. Также, аиАТ часто применяют в системах иммуноанализа. Это особенно актуально, когда работа с первичными антигенами представляет опасность. Такие системы позволяют точно выявлять иАТ. Изменения баланса в идиотип-антиидиотипической системе также может влиять на опухолеобразование. В свою очередь, измерение уровней иАТ и аиАТ может быть хорошим маркером для определения самых ранних стадий онкологических заболеваний. Данная работа посвящена получению иАТ и аиАТ – человеческих одноцепочечных антител к ПАУ, и изучению с их помощью иммунного ответа у больных РЛ в сравнении с условно здоровыми людьми.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Материалы

2.1.1. Реактивы

Агароза (Helicon, Россия); акриламид (Bio-Rad, США); Ni^{2+} -NTA агароза (Serva); агар (Difco, США); бактотриптон (Difco, США); белковый маркер молекулярного веса (New England Biolabs, США); бензо[а]пирен-6-карбоксальдегид (Реакор, Россия); бисакриламид (Bio-Rad, США); боргидрид натрия (Вектон, Россия); бромистый этидий (Bio-Rad, США); бром-феноловый синий (Диаэм, Россия); бычий сывороточный альбумин (Amresco, США); глицерин (MP Biomedical, США); глицин (Диаэм, Россия); глюкоза (Helicon, Россия); дезоксинуклеотид-5'-трифосфаты (СибЭнзим, Россия); дрожжевой экстракт (Helicon, Россия); додецилсульфат натрия (Helicon, Россия); изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (Helicon, Россия); имидазол (Sigma, США); ксиленцианол (Serva, США); β -меркаптоэтанол (Amresco, США); Кумасси бриллиантовый голубой G-250 (Helicon, Россия); N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (MP Biomedical, США); персульфат аммония (Helicon, США); целлюлоза (Biochem, США); твин-20 (Helicon, Россия); трис(гидроксиметил)аминометан (Amresco, США); Тритон-X100 (Panreac, США); триэтиламин (Вектон, Россия) полиэтиденгликоль-6000 (Panreac, США); ДНК-маркер молекулярного веса (СибЭнзим, Россия); 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (MP Biomedical, США); этилендиаминтетрауксусная кислота (MP Biomedical, США); гуанидин хлорид (Fluka, Швейцария); наивная комбинаторная библиотека генов scFv человека в бактериофаге M13 [Batanova et al, 2006]; pCCO [Гинцбург и др, 2006]; pHEN2 [Griffiths et al, 1994].

Наборы Plasmid Miniprep (Евроген, Россия); Cleanup Mini (Евроген, Россия); набор для определения концентрации белка Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific, США).

Одноцепочечное мышинное иАТ рSh-ЦСД специфичное к БП-БСА; кроличьи поликлональные АТ специфичные к ЦСД, полученные после иммунизации кроликов в Институте химической биологии и фундаментальной медицины г. Новосибирск; мышинные моноклональные АТ против IgG кролика меченные пероксидазой хрена (Abscam, США); мышинные моноклональные АТ против с-Мус, меченные пероксидазой хрена (Abscam, США); мышинные моноклональные АТ против IgG человека, меченные пероксидазой хрена (Abscam, США).

Антибиотики: ампициллина натриевая соль, канамицин сульфат, тетрациклина гидрохлорид (Gerbu, Германия).

Все остальные использованные реактивы отечественного производства имели квалификацию не ниже «ОСЧ» и «ХЧ».

2.1.2. Бактериальные штаммы *Escherichia coli*

TG1 (K12, D(lac-pro), supE, thi, hsdD5/F' traD36, proA⁺B⁺, lacI^q, lacZDM15) [Baer et al., 1984].

HB2151 (K12, ara, D(lac-pro), thi/ F' proA⁺B⁺, lacI^q, lacZDM15) [Carter et al., 1985].

M15 (K12, nals, strs, rifs, lac-, ara-, gal-, mtl-, F'-, recA⁺, uvr⁺, lon⁺) [Beckwith et al., 1964].

XL10-Gold (end, A1, glnV44, recA1, thi-1, gyrA96, relA1, lac, Hte, Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, tet^R, F'[proAB, lacI^qZΔM15, Tn10, (Tet^R Amy Cm^R)).

2.1.3. Бактериальные среды

LB на 1 л: 10 г бактотриптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl.

Агаризованная среда на 1 л: 10 г бактотриптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl, 15 г бактоагара, pH 7,2.

2YT на 1 л: 16 г бактотриптона, 10 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl.

SOC на 1 л: 20 г бактотриптона, 5,5 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl, 10 г KCl.

2.1.4. Ферменты

T4 ДНК-лигаза (СибЭнзим, Россия), Taq ДНК-полимераза (New England Biolabs, США), Pfu ДНК-полимераза (New England Biolabs, США), эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI, *Bsp*19I (СибЭнзим, Россия).

2.1.5. Буферные растворы

TE – 10 mM Трис-HCl, 1 mM ЭДТА, pH 7,4.

ТАЕ – 40 mM Трис-HCl, 20 mM ацетат натрия, 1 mM ЭДТА, pH 8,0.

Трис-глициновый буферный раствор – 25 mM Трис-HCl, 192 mM глицин, 0,1% ДСН, pH 8,3.

Буферный раствор для нанесения проб ДНК на агарозный гель – 0,25% бромфеноловый синий, 0,25% ксиленцианол, 30% глицерин.

ФСБР – на 1 л: 5,84 г NaCl, 4,72 г Na₂HPO₄, 2,64 г NaH₂PO₄ × 2H₂O, pH 7,2.

PEG/NaCl – 20% PEG, 2,5 M NaCl.

2.1.6. Олигонуклеотиды

Таблица 1 – Последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе

Название олигонуклеотидов	Нуклеотидная последовательность
---------------------------	---------------------------------

Start-M	5`-ccagccggccatggcagaagtgagcgggtggagtctgg-3`
Start-O	5`-ccagccggccatggcagaagtcagctggtggagtctgg-3`
Start-P	5`-ccagccggccatggcaggaagtcagctggtggagtctgg-3`
END	5`-cggccccgtgatgggatccatgatgtgcggcc-3`
pHEN_seq	5`-ctatgcggccccattca-3`
Fd_seq	5`-caggaaacagctatgac-3`

Сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции подчеркнуты. Все олигонуклеотиды были синтезированы в ООО «Биотех-Индустрия».

2.2. Методы

2.2.1. Приготовление конъюгата бензо[а]пирен-БСА

Конъюгат БП-БСА синтезировали путем ковалентного связывания альдегидной группы БП с аминогруппами БСА [Kostyanko и Glushkov, 1998]. 1,5 мл пиридина добавляли по каплям при перемешивании и охлаждении в 0,1 г БСА в 1 мл 0,1 н NaOH, с последующим добавлением 16 мг бензо[а]пирен-6-карбоксальдегида. После трех часов перемешивания при 25°C добавляли блокирующее соединение 50 мг акриламида и раствор 10 мг восстановителя боргидрида натрия в 1 мл воды. Через 30 минут добавляли 4 капли ледяной уксусной кислоты и конъюгат осаждали 8 мл ацетона. Через 15 минут инкубации при комнатной температуре осадок осаждали центрифугированием и 5 раз промывали 8 мл ацетона. После сушки в вакууме конъюгат растворяли в 10 мл 0,01 н NaOH. Конъюгат хранили в растворимой форме при pH 7,2-7,4. Нерастворимые полимерные продукты не образовывались при хранении раствора при температуре 5°C в течение не менее шести месяцев.

2.2.2. Амплификация комбинаторной библиотеки одноцепочечных антител человека

Из исходной фаговой библиотеки отбирали аликвоту и переносили в 200 мл среды 2YT, содержащей 1% глюкозу и 100 мкг/мл ампициллина, для определения количества независимых трансформантов, а оставшуюся часть инкубировали в течение ночи при 37°C на качалке. На следующий день отбирали аликвоту ночной культуры (2 мл) и инокулировали ее в 200 мл 2YT среды. Клетки выращивали до ОП = 0,5 при 600 нм, после этого 5 мл культуры переносили в колбу с 20 мл 2YT среды и добавляли фаг-помощник M13K07 и инкубировали 30 мин при 37°C без качания. Затем клетки осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин, осадки ресуспендировали в 3 мл среды 2YT, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл канамицина. Инкубацию проводили в течение ночи при интенсивной аэрации при 30°C. Культуру центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин, к полученному супернатанту, содержащему бактериофаги, добавляли 1/5 объема раствора PEG/NaCl и оставляли во льду на 2 часа. Фаговые частицы осаждали центрифугированием при 10000 g в течение 30 мин. Осажденный фаговый преципитат ресуспендировали в 40 мл воды и добавив 8 мл PEG/NaCl, инкубировали во льду не менее 20 мин, после чего вновь проводили осаждение фаговых частиц при 5000 g в течение 30 мин. Супернатант тщательно удаляли и осадок ресуспендировали в 2 мл ФСБР. Для удаления остатков бактериальных клеток полученный раствор еще раз центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин. Титр фаговых частиц составлял 10^{10} - 10^{11} БОЕ/мл.

2.2.3. Аффинная селекция бактериофагов

Селекцию проводили методом фагового дисплея. Обогащение фаговой библиотеки проводили с помощью конъюгата БП-БСА и одноцепочечного мышинового иАТ рSh-ЦСД. В качестве отрицательного контроля использовались БСА и ЦСД, соответственно. Первый раунд обогащения начинали с того, что в лунки иммунологического планшета сорбировали 50 мкл БП-БСА (2 нг/мкл при

25°C в течение ночи) или pSh-ЦСД (15 нг/мкл при 25°C в течение часа). Затем блокировали места неспецифического связывания 100 мкл раствора 2% БСА с 0,05% твин-20, инкубацией в течение часа при 37°C. Далее добавляли бактериофаг M13 и инкубировали планшет при 37°C с покачиванием в течение часа. Затем планшет 3 раза промывали раствором ФСБР с 0,05% твин-20. Для элюирования сорбированных бактериофагов в лунки планшета добавляли по 100 мкл 100 мМ триэтиламина с последующей инкубацией в течение 5-10 мин при комнатной температуре. Далее 0,75 мл полученных бактериофагов заражали 9,25 мл бактериальной культуры *E.coli* штамма TG1 ОП 0,6 при 600 нм и высевали на агаризованную среду с ампициллином 100 нг/мкл и инкубировали ночь при 37°C. На чашки с проросшими колониями добавляли 5-6 мл среды LB и собирали колонии шпателем. Второй и третий раунд проводили, как описано выше. Всего было сделано три раунда обогащения библиотеки.

2.2.4. Отбор фаговых антител

Полученные коллекции фагов, содержащие отобранные АТ против БП-БСА и pSh-ЦСД, тестировали ИФА на связывание с БП-БСА и pSh-ЦСД. В 96-луночные планшеты сорбировали БП-БСА (100 мкл с концентрацией 5 мкг/мл) при комнатной температуре в течение ночи и иАТ pSh (100 мкл с концентрацией 1 мкг/мл) в течение часа при 37°C. После удаления несвязавшиеся АГ лунки иммунологического планшета промывали три раза буферным раствором 0,05% твин-20 в ФСБР. Участки неспецифического связывания насыщали 0,5% БСА и 0,05% твин-20 в ФСБР при 37°C 1 час при постоянном перемешивании. Лунки иммунологического планшета снова промывали три раза 0,05% твин-20 в ФСБР, а затем инкубировали 1 час при 37°C с фаговыми АТ в объеме 100 мкл. Затем промывали трижды раствором 0,05% твин-20 в ФСБР. Образовавшиеся иммунные комплексы выявляли мышиными АТ к с-Мус инкубацией 1 час при 37°C. Промывали трижды раствором 0,05% твин-20 в ФСБР. Затем подавали анти-

мышинные АТ, меченные пероксидазой хрена, в разведении 1:10000. Лунки иммунологического планшета промывали 0,05% твин-20 в ФСБР, специфически связавшиеся АТ выявляли с помощью 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Развитие реакции наблюдали с помощью планшетного спектрофотометра iMark (Bio-Rad, США) на длине волны 405 нм.

2.2.5. Выделение плазмидной и фагмидной ДНК из *Escherichia coli*

Выделение плазмидной и фагмидной ДНК проводили с помощью набора реактивов Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) для выделения плазмидной ДНК, следуя рекомендациям производителя.

2.2.6. ПЦР плазмидной и фагмидной ДНК

Амплификацию ДНК, кодирующую scFv, проводили в 30-50 мкл реакционной смеси. В качестве матрицы использовалась фагмидная или плазмидная ДНК. Праймеры использованные в реакции: Fd_seq и pHEN_seq [Nissim et al., 1994] или праймеры: CBD-R и CBD-F. Реакционная смесь содержала: 60 mM Tris-HCl pH 8,5, 1,5 mM MgCl₂, 25 mM KCl; 10 mM 2-меркаптоэтанол, 0,1% Тритон X-100, Taq-полимераза 2 о.е., 0,25 мкМ dNTP, по 25 пкМ указанных выше праймеров и 50 нг ДНК матрицы.

В случае скрининга колоний *E.coli*, отдельную колонию бактерий петлей переносили в пробирки с 10 мкл деионизованной водой. Далее раствор клеток использовали как матрицу для ПЦР реакции, как описано выше.

2.2.7. Секвенирование плазмидной и фагмидной ДНК

Фагмидную ДНК секвенировали с использованием праймеров LMB3 и pHEN_seq [Griffiths et al, 1994], плазмидную ДНК pCCO – с помощью праймеров CBD-R и CBD-F. Для секвенирования использовали набор для секвенирования

BigDye® Terminator v3.1 Cycling Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Секвенирование ДНК проводили в Межинститутском центре секвенирования ДНК ИХБФМ СО РАН и во Всероссийском научно-исследовательском институте сельскохозяйственной микробиологии с использованием оборудования Центра «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология».

2.2.8. Анализ ДНК последовательностей антител

Последовательность ДНК, кодирующая scFv, была проанализирована с использованием программного обеспечения IgBLAST NCBI [Altschul et al., 1997], IMGT V-QUEST [Brochet et al., 2008], Multinomial Model и Focused binomial test [Lossos et al, 2000; Hershberg et al, 2008; Uduman et al, 2011; Yaari et al, 2012] и WebLogo [Crooks et al., 2004].

2.2.9. Ферментативный гидролиз ДНК

Рестрикцию ДНК проводили в соответствии с методиками производителей ферментов. Рестрикцию ПЦР продуктов вели 14-16 часов, плазмидной ДНК – 1-2 часа.

2.2.10. Встраивание фрагментов ДНК в векторную плазмиду

Для встраивания фрагментов ДНК в векторную плазмиду использовали ДНК-лигазу фага T4 и стандартный буферный раствор (СибЭнзим, Россия). Лигирование вели в объеме 10 или 20 мкл при молярном соотношении ДНК вектора и вставки – 1:3. Лигирование проводили в течение 8 часов при температуре 16°C.

2.2.11. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Для проведения электрофоретического фракционирования ДНК был использован 1-1,5% агарозный гель в однократном ТАЕ с добавлением бромистого этидия в концентрации 0,5 мкг/мл. Перед нанесением на гель ДНК смешивали с буферным раствором для нанесения проб. Визуализацию ДНК проводили в ультрафиолетовом свете, используя трансиллюминатор GelDock Universal Hood II (BioRad, США).

2.2.12. Экстракция фрагментов ДНК из агарозного геля

Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля проводили с использованием набора «Cleanup Mini» (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя.

2.2.12. Приготовление электрокомпетентных бактериальных клеток

Штамм *E.coli* (TG1, HB2151, M15, XL10-Gold) штрихом высевали на агаризованную среду LB. Отдельные бактериальные колонии петлей пересекали в 5 мл LB для получения ночной культуры. 250 мкл ночной культуры пересекали в 1 литровые колбы, содержащие 250 мл среды LB, и растили при 37°С с помешиванием до ОП 600 нм = 0,4. Затем клетки охлаждали во льду в течение 10 мин, стерильно переносили в охлажденные центрифужные стаканы на 250 мл, центрифугировали 10 минут 4000 об/мин (ротор S-4-104, Eppendorf 5810R, Германия) при 0°С. Клетки суспендировали в небольшом объеме ледяной стерильной деионизированной воды, переносили в стерильные охлажденные центрифужные стаканы на 35 мл, доливали водой доверху, центрифугировали в тех же условиях. Промывку водой повторяли еще 2 раза, затем промывали охлажденным 10% глицерином. Осадок суспендировали в 0,5-1 мл 10% глицерина, разносили по 40 мкл в стерильные охлажденные пробирки эппендорф,

после чего замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C . Компетентность клеток проверяли электропорацией плазмидной ДНК с известной концентрацией.

2.2.13. Электропорация бактериальных клеток

Трансформацию клеток *E.coli* проводили методом электропорации на приборе GenePulser Xcell (BioRad, США) в кюветах *E.coli* Pulser Cuvette с расстоянием между электродами в 0,1 см. Использовали программу с условиями: 1800 V, 25 μF , 200 Ω , 5-5,2 мс. В размороженную на льду аликвоту электрокомпетентных клеток (40 мкл) добавляли раствор с плазмидой ДНК или обессоленную лигазную смесь с помощью набора Cleanup Mini (Евроген, Россия), аккуратно перемешанные клетки переносили в охлажденную кювету между электродами. После электропорации клетки *E.coli* из кюветы помещали в пробирку с 1 мл среды SOC и инкубировали час при 37°C . 100 мкл клеток высевали на агаризированную среду LB с селективными антибиотиками и растили 10-14 часов при 37°C .

2.2.14. Приготовление аморфной целлюлозы

200 мг микрокристаллической целлюлозы растворяли в 0,6 мл дистиллированной воды. Затем с помешиванием добавляли 10 мл 86% ортофосфорной кислоты и инкубировали 1 час на льду. Потом добавляли 40 мл охлажденной дистиллированной воды порциями по 5 мл с постоянным перемешиванием. Центрифугировали в бакетном роторе при 3000 g 10 минут при 4°C . Далее осадок ресуспендировали в холодной воде и центрифугировали при 3000 g 10 минут при 4°C . Повторяли 5 раз. Затем целлюлозу растворяли в 500 мкл 2М Na_2CO_3 с последующим добавлением охлажденной дистиллированной воды до 45 мл. Целлюлозу осаждали при 3000 g 10 мин при 4°C . Затем осадок растворяли в воде и центрифугировали до тех пор, пока значение pH в растворе не

составил 5-7. Готовую аморфную целлюлозу хранили при 4°C в водном растворе из расчета концентрации 10 г/л.

2.2.15. Выделение и очистка полученных антител, содержащих целлюлозосвязывающий домен, с помощью аффинной хроматографии на аморфной целлюлозе

Колонию клеток *E.coli* штамма M15, трансформированную плазмидой с геном, кодирующим scFv, высевали на чашку с агарезированной средой LB с ампициллином (150 мкг/мл) и канамицином (50 мкг/мл). Колонии на чашке растили в течение ночи при 37°C. Затем колонии пересеивали в 2 мл LB с теми же антибиотиками и растили при 37°C в течение ночи при перемешивании 120 об/мин. Ночную бактериальную культуру пересеивали в колбы с LB с теми же антибиотиками и инкубировали при 37°C с перемешиванием 130 об/мин до ОП 600 нм = 0,4-0,6 и добавляли ИПТГ в конечной концентрации 1 мМ. Бактериальные клетки растили 4 часа при тех же условиях и осаждали центрифугированием при 1000 g 30 мин при 4°C. Клеточные осадки растворяли в 6 мл лизирующего буферного раствора (20 мМ Tris-HCl pH 8,8, 200 мМ NaCl, 0,1% Тритон-X100), затем на льду разрушали ультразвуком на приборе Sonics Vibracell (США). Полученный клеточный лизат осаждали центрифугированием при 14000 об/мин (ротатор 45 Ti, на центрифуге Optima L-90K, Beckman Coulter, США). Осадок с тельцами включения растворяли в буферном растворе: 50 мМ Tris-HCl pH 8,8, 750 мМ NaCl, 0,75% Тритон-X100, 14 мМ β-меркаптоэтанол, 8 М мочевины. Полученный раствор центрифугировали при тех же условиях, отбирали супернатант и разводили его буферным раствором (50 мМ Tris-HCl pH 8,8, 750 мМ NaCl, 0,75% Тритон-X100) до конечной концентрации мочевины 2 М, добавляли 1 мл раствора аморфной целлюлозы и инкубировали при 4°C в течение ночи при перемешивании. Промывку целлюлозы от неабсорбированного белка проводили буферным раствором ФСБР с 0,05% Тритон-X100. Абсорбированные scFv на целлюлозе элюировали 1 мл буферного раствора (20 мМ Tris pH 8,0, 10

мМ EDTA, 50 мМ NaCl, 4 М гуанидинхлорида) с последующим диализом против ФСБР.

2.2.16. Выделение и очистка полученных антител, содержащих 6xHis, с помощью аффинной хроматографии на Ni^{2+} -NTA агарозе

Для выделения одноцепочечных АТ с 6xHis использовалась Ni^{2+} -NTA агароза. Клетки *E.coli* HB2151, трансформированные плазмидой с геном, кодирующим scFv, высевали на чашку с агаризованным LB в присутствии 150 мкг/мл ампициллина. Далее отдельную колонию бактериальных клеток пересекали в 2 мл LB с теми же антибиотиками и инкубировали при 37°C в течение ночи с качанием 130 об/мин. Ночную культуру пересекали в колбы с 250 мл среды LB с ампициллином и выращивали бактерии до ОП 600 нм = 0,6. Затем добавляли ИПТГ с конечной концентрацией 1 мМ, и бактерии растили 4 часа при 37°C. Затем клетки осаждали центрифугированием при 1000 g 10 мин. Осадок бактериальных клеток растворяли в буферном растворе (50 мМ $\text{Na}_2\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 8,0, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол) и разрушали ультразвуком на приборе Sonics Vibracell. Полученный клеточный лизат осаждали центрифугированием при 14000 об/мин (ротор 45 Ti, на центрифуге Optima L-90K, Beckman Coulter, США). Супернатант наносили на колонку с Ni^{2+} -NTA агарозой. Смола промывали буферным раствором для удаления неспецифичной сорбции (50 мМ $\text{Na}_2\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 6,0, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, глицерин 10%). Элюцию абсорбированного белка проводили раствором: 50 мМ $\text{Na}_2\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 6,0, 300 мМ NaCl, 150 мМ имидазол, глицерин 10%. Фракцию с scFv диализовали против ФСБР в течение 4 часов при 4°C.

2.2.17. Белковый электрофорез

Электрофорез проводили по стандартной методике Леммли [Laemmly, 1970] в 5% концентрирующем (0,125 М трис-HCl, pH 6,8, 0,1% ДСН, 5% акриламид,

0,5% N',N-метиленбисакриламид) и 12,5% разделяющем (0,375 М трис-HCl, pH 8,8, 0,1% ДСН, 12,5% акриламид, 1% N',N-метиленбисакриламид) гелях. К образцу белка добавляли буферный раствор для нанесения образцов на гель (5х: 12,5% β-меркаптоэтанол, 10% ДСН, 0,25 М Трис-HCl, pH 6,8, 10% глицерина, 0,75 мг/мл бромфенолового синего), инкубировали 1-2 минуты при температуре 90-100°C и наносили на гель. Электрофорез проводили в Трис-глициновом электродном буферном растворе при напряжении 90 ВТ до вхождения белков в разделяющий гель, затем напряжение увеличивали до 120-140 ВТ. Гель окрашивали раствором Кумасси бриллиантовый голубой G-250 в 10% этаноле и 20% уксусной кислоте. Отмывку геля проводили кипячением в дистиллированной воде. Результаты фотографировались и документировались.

2.2.18. Оценка аффинности одноцепочечных антител к полициклическим ароматическим углеводородам методом поверхностного плазмонного резонанса

Кинетику взаимодействия человеческих scFv с АГ проводили методом поверхностного плазмонного резонанса на приборе ProteOn XPR36 (BioRad, США) с использованием чипа GLM. Активация поверхности чипа проводилась смесью, состоящей из 50 мкл 40 мМ 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида и 50 мкл 10 мМ N-гидроксисульфосукцинимид со скоростью 30 мкл/мин в течение 1 мин. Затем ковалентно иммобилизовались конъюгаты ПАУ-БСА для связывания с иАТ, или одноцепочечное мышинное иАТ pSh, или человеческое иАТ T72 для связывания с аиАТ, предварительно разведенными в 10 мМ растворе ацетата натрия с pH 4,5 до концентрации 20 нг/мкл. Иммобилизация лиганда на поверхности чипа проводилась в вертикальном положении до достижения сигнала иммобилизации в 3000-3500 RU. В качестве отрицательного контроля использовался вертикальный канал L6 с иммобилизованными эстрадиол-БСА (в случае для иАТ) или БСА (в случае для аиАТ). Связывание с аналитом проводилось в буферном растворе ФСБР с добавлением 0,005% твин-20. В качестве аналита использовались одноцепочечные человеческие T72 (иАТ) и A4

(аиАТ) в концентрации от 31,25 нМ до 500 нМ. Аналит пропускался через вертикальные каналы со скоростью 30 мкл/мин в течение 3 мин. Поверхность чипов регенерировали между разными аналитами промывкой буферным раствором: 10 мМ глицин, рН 2,5. Для расчета констант аффинности проводился анализ данных в программе ProteOnManager v.3.1.0 (Bio-Rad, США). Диаграммы связывания лиганда с аналитом анализировались кинетической моделью односайтового связывания Langmuir.

2.2.19. Основная характеристика групп обследованных людей

Исследования проводили на сыворотках крови пациентов больных раком легкого, полученных из Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Кемеровской области «Областной клинический онкологический диспансер» (22 мужчины) и на сыворотках крови условно здоровых людей, полученных из Государственного казенного учреждения здравоохранения Кемеровской области «Кемеровский областной центр крови» (24 мужчины). Диагноз рак легкого был поставлен по результатам гистологического исследования. Для участия в исследовании у всех людей было получено информированное согласие.

2.2.20. Неконкурентный иммуноферментный анализ

Неконкурентный ИФА проводили согласно Glushkov et al., 1998, в собственной модификации. В лунки иммунологического полистирольного планшета наносили по 50 мкл (БП-БСА 5 нг/мкл, либо Т72-His 20 нг/мкл, либо А4-His 20 нг/мкл) при 25°C в течение часа. Свободные места на пластике блокировали путем внесения во все лунки по 250 мкл блокирующего раствора ФСБР, содержащего 0,5% БСА и 0,05% твин-20, и планшет инкубировали в течение часа при 37°C при покачивании. Затем в лунки с сорбированным белком вносили по 50 мкл АГ (Т72-ЦСД 20 нг/мкл, либо А4-ЦСД 20 нг/мкл). Планшет

инкубировали в течение часа при 37°C на шейкере. После каждого этапа инкубации планшет промывали 3 раза ФСБР с 0,05% твин-20. Для дальнейшей регистрации в лунки с сорбированными белками добавляли кроличьи анти-ЦСД АТ (10,8 нг/мкл) и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Далее вносили анти-кроличьи АТ, меченные пероксидазой хрена, и инкубировали при 37°C в течение часа с помешиванием 300 об/мин. Для регистрации сигнала в лунки вносили 50 мкл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Реакцию окрашивания останавливали с помощью 50 мкл 2 н соляной кислоты. Регистрацию сигнала проводили в планшетном ридере iMark (Bio-Rad, США) при длине волны 450 нм.

2.2.21. Конкурентный иммуноферментный анализ

В лунки иммунологического планшета сорбировали по 50 мкл конъюгата БП-БСА (2 мкг/мл) в течение часа при 37°C. Далее вносили по 100 мкл блокирующего раствора ФСБР содержащего 0,5% БСА и 0,05% твин-20 и инкубировали при 37°C в течение часа. В лунки с БП-БСА вносили по 50 мкл иАТ к БП (рSh-ЦСД 4 нг/мкл или Т72-ЦСД 15 нг/мкл), что соответствует половинной концентрации от максимального насыщения – IC_{50} , в присутствии конкурента аиАТА4-His с концентрацией от 0,001 до 0,1 мкг/мкл. Планшет инкубировали в течение часа при 37°C. Затем для детекции вносили кроличьи анти-ЦСД (10,8 нг/мкл) и анти-кроличий конъюгат, меченный пероксидазой хрена в разведении 1:5000 (1 нг/мкл), как описано в разделе «Неконкурентный иммуноферментный анализ». Для регистрации сигнала в лунки вносили 50 мкл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Реакцию окрашивания останавливали с помощью 50 мкл 2 н соляной кислоты. Регистрацию сигнала проводили в планшетном ридере iMark (Bio-Rad, США) при длине волны 450 нм.

2.2.22. Неконкурентный иммуноферментный анализ с использованием сыворотки крови человека

В лунки иммунологического планшета вносили одноцепочечные АТ (А4-ЦСД 20 нг/мкл или Т72-ЦСД 20 нг/мкл), планшет инкубировали в течение часа при 37°C с покачиванием. В качестве отрицательного контроля использовали сорбированный на планшет ЦСД 20 нг/мкл. Затем вносили раствор 1% БСА с 0,05% твин-20, с последующей инкубацией 1 час при 37°C с покачиванием. Далее наносили сыворотку крови человека с разведением 1:100 и инкубировали иммунологические планшеты 1 час при 37°C с покачиванием. Промывали планшеты 3 раза буферным раствором ФСБР с 0,05% твин-20, затем вносили раствор античеловеческих IgG, меченых пероксидазой хрена, с разведением 1:5000 и инкубировали планшеты 1 час при 37°C. Для регистрации сигнала в лунки вносили 50 мкл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Реакцию окрашивания останавливали с 50 мкл 2 н соляной кислоты. Регистрацию сигнала проводили в планшетном ридере iMark (Bio-Rad, США) при длине волны 450 нм. Полученные результаты преобразовали по формуле для расчета уровней, связавшихся АТ из сывороток крови: (оптическая плотность ответа на АТ – оптическая плотность ответа на ЦСД) / оптическая плотность ответа на ЦСД.

2.2.23. Статистический анализ результатов иммуноферментного анализа

Для статистической обработки данных ИФА использовали программы Statistica 10.0 и Excel (Microsoft Office, США). Проверка данных на нормальность распределения проводили с помощью модифицированного критерия Шапиро-Уилка. Удаляли точки выброса, составляющие больше трех стандартных отклонений. Выборку нормализовывали методом Бокса-Кокса. Для определения различий между разделенными на группы данными использовали Т-критерий Стьюдента, а корреляционный анализ – методом Спирмена. Для выявления заболевания рака легкого, прогностическую значимость уровней иАТ и аиАТ в сыворотке крови, возраста и курения проверяли методом логистической

регрессии. Определения пороговых значений рассчитывали с помощью ROC-анализа.

Глава 3. Результаты

3.1. Скрининг фаговой библиотеки одноцепочечных антител человека

Для отбора иАТ к БП и аиАТ использовали наивную комбинаторную библиотеку одноцепочечных антител (scFv) человека, представляющую популяцию фаговых антител – рекомбинантных бактериофагов M13, каждый из которых экспонирует на своей поверхности уникальное scFv человека [Batanova et al, 2006].

Для получения одноцепочечных иАТ человека к БП в качестве АГ 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 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 агаризированную 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. 4А). По результатам анализа выявлено 26 бактериальных клонов, продуцирующих одноцепочечные иАТ против БП-БСА.

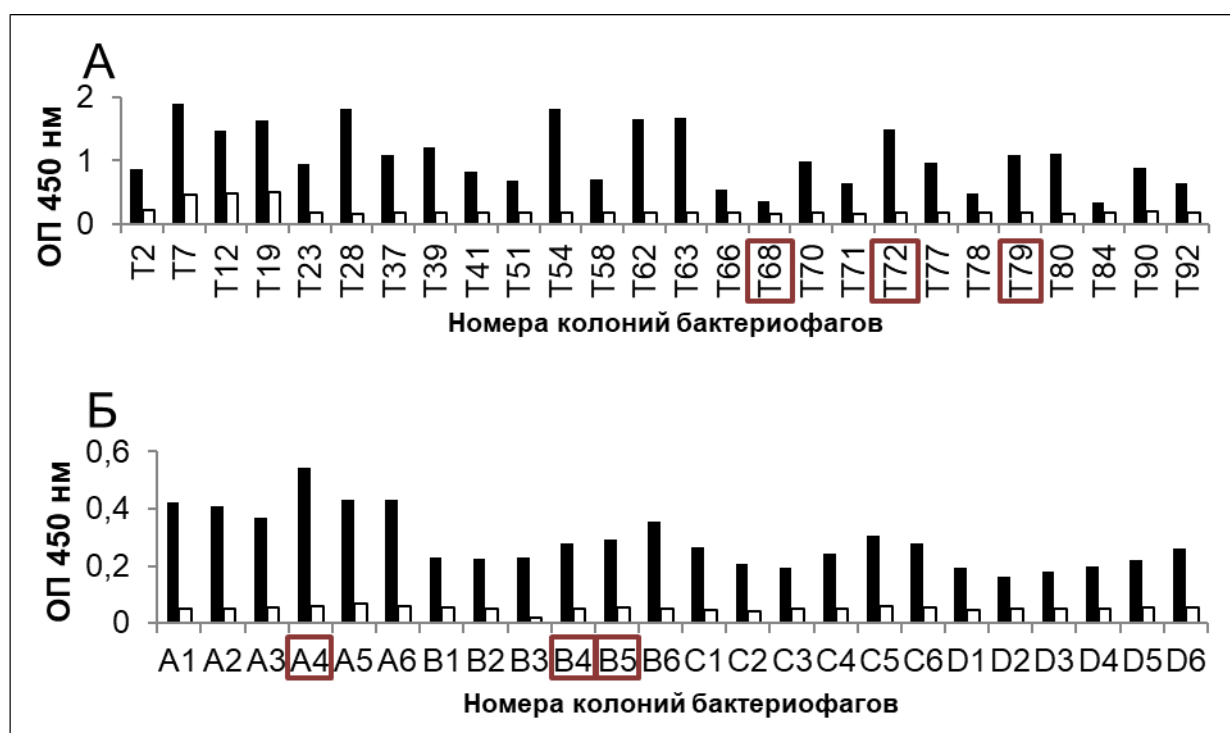


Рисунок 4 – Иммуноферментный анализ связывания фаговых антител с БП-БСА (А) и с рSh (Б). На оси абсцисс приведены названия фаговых клонов, на оси ординат – значения оптической плотности (ОП). Черные столбцы – связывание фаговых антител с антигенами, сорбированными на пластик, белые – связывание антител с БСА (А) и целлюлозосвязывающим доменом (ЦСД) (Б), в качестве отрицательных контролей.

Отбор одноцепочечных аиАТ человека к БП проводили аналогично, только в ходе аффинной селекции в качестве антигена использовали иАТ 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. 4Б), после этого были отобраны 24 клон, продуцирующие одноцепочечные аиАТ, которые показали эффективное связывание с АТ рSh.

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 клонх, продуцирующих иАТ, и в 12 клонх, продуцирующих аиАТ, присутствовали ДНК-фрагменты нужной длины, около 750 п.о. (Рис. 5). В пяти и семи клонх, продуцирующих иАТ и аиАТ, соответственно, вставка отсутствовала, в шести клонх иАТ и пяти клонх аиАТ вставка не соответствовала ожидаемой длине.

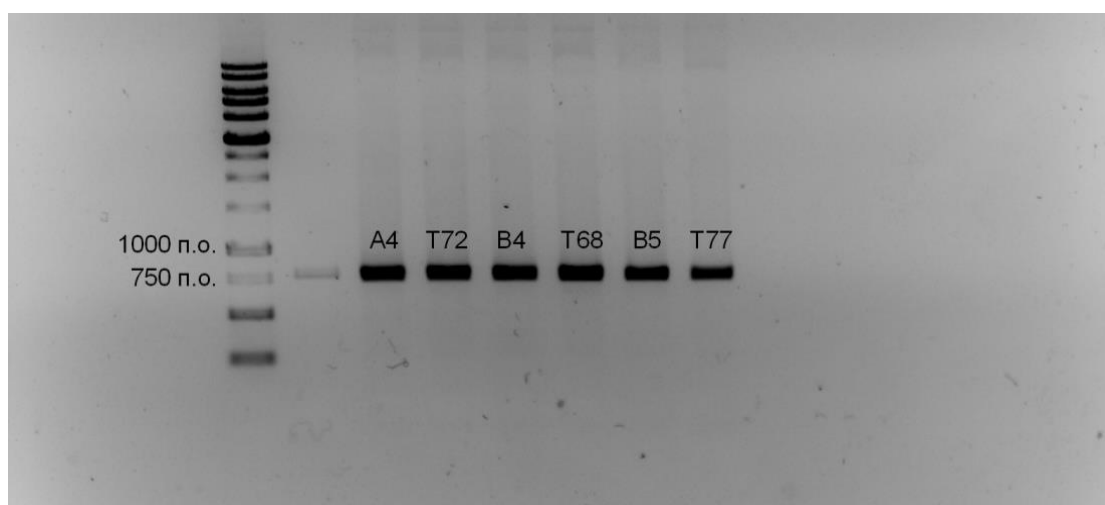


Рисунок 5 – Результаты электрофоретического разделения продуктов ПЦР в 1% агарозном геле. Представлены результаты анализа ПЦР-фрагментов, кодирующих три иАТ (Т72, Т68 и Т77) и против БП три аиАТ (А4, В4 и В5). Слева приведен ДНК-маркер и указана длина в п.о.

3.2. Анализ нуклеотидной и аминокислотной последовательностей отобранных антител

Далее из 27 бактериальных 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 (Табл. 2) – 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 2 – Классификация генов, кодирующих переменные домены отобранных иАТ и аиАТ

А

АТ	Зародышевый сегмент	% гомологии	FR и CDR	Количество мутаций	
				Значащие	Незначащие
T68	IGHV1-3	96,88%	FR	5	2
			CDR	1	1
	IGHJ3	83,67%			
	IGHD3-16				
T72	IGHV3-21	94,79%	FR	3	6
			CDR	6	0
	IGHJ1	86,27%			
	IGHD3-16				
T77	IGHV1-3	97,57%	FR	4	3
			CDR	0	1

	IGHJ4	70,21%			
	IGHD2-15				
A4	IGHV1-69*06	98,41%	FR	3	0
			CDR	0	0
	IGHJ6*02	93.10%			
	IGHD2-2*01				
B4	IGHV1-46*01	89,93%	FR	3	0
			CDR	0	1
	IGHJ4*02	89,58%			
	IGHD5-24*01				
B5	IGHV3-23*01	88,54%	FR	23	2
			CDR	3	1
	IGHJ4*02	70,83%			

Б

АТ	Зародышевый сегмент	%	гомологии	FR и CDR	Количество мутаций	
					Значащие	Незначащие
T68	IGKV1-27*01	88,89%		FR	11	12
				CDR	7	3
	IGKJ2*01	88,89%				
T72	IGKV1-39*01	96,77%		FR	2	3
				CDR	5	1
	IGKJ4*01	97,22%				
T77	IGKV3-20*01	92,11%		FR	16	4
				CDR	1	2
	IGKJ4*01	97,37%				

A4	IGKV3-20*01	95.04%	FR	3	1
			CDR	13	2
	IGKJ2*01	89.74%			
B4	IGKV1-39*01	84,42%	FR	8	8
			CDR	12	1
	IGKJ1*01	87,50%			
B5	IGKV1-17*01	95,70%	FR	28	7
			CDR	8	1
	IGKJ4*01	97,22%			

Известно, что БП находится повсеместно в окружающей среде, и он постоянно воздействует на человека. Для оценки воздействия БП на созревание переменных 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 В4 и Т77 была выявлена позитивная селекция. В FR участках негативная селекция выявлена только у Т68 (Табл. 3). 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 Т68. В полиномиальном тесте для легких цепей признаки селективного давления выявлены для АТ В5, Т77, Т68 и В4.

Таблица 3 – Оценка потенциального селективного давления АГ на V домены одноцепочечных АТ к БП: А – V_H и Б – V_L. R – значащие мутации, приводящие к изменению аминокислотных остатков и S – молчащие мутации, не меняющие аминокислотные остатки

А

АТ	Количество мутаций				Фокусированный биномиальный тест		Полиномиальный тест	
	CDR		FR		Выбранные значения (Σ)		Выбранные значения (Σ)	
	R	S	R	S	CDR	FWR	CDR	FWR
A4	27	7	129	40	-0,207	0,18	-0,106	0,167
B4	30	8	127	40	-0,134	0,11	0,129	0,0311
B5	30	11	112	40	-0,305	0,0416	-0,306	0,0293
T68	3	2	4	2	-0,0354	-0,885	-0,969	-0,622
T77	30	7	128	36	-0,127	0,0697	0,0683	0,0101
T72	26	5	129	43	-0,706	0,293	-0,0271	0,15

Б

АТ	Количество мутаций				Фокусированный биномиальный тест		Полиномиальный тест	
	CDR		FR		Выбранные значения (Σ)		Выбранные значения (Σ)	
	R	S	R	S	CDR	FWR	CDR	FWR
A4	31	10	133	36	-0,182	0,36	-0,0942	0,319
B4	13	5	127	43	-0,671	-0,0345	-0,62	-0,114
B5	23	2	84	28	-0,0382	0,104	0,768	-0,0297
T68	22	9	129	47	-0,757	-0,0656	-0,761	-0,0753
T77	20	4	100	30	-0,313	0,374	0,328	0,214
T72	27	10	132	40	-0,371	-0,0364	-0,562	-0,00411

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

Затем были проанализированы аминокислотные последовательности для АТ Т72, Т77, Т68, А4, В4, В5 (Рис. 6). Анализ аминокислотных последовательностей и АТ показал очень низкую гомологию между собой – от 64,46% до 78,98%. Для аиАТ 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.

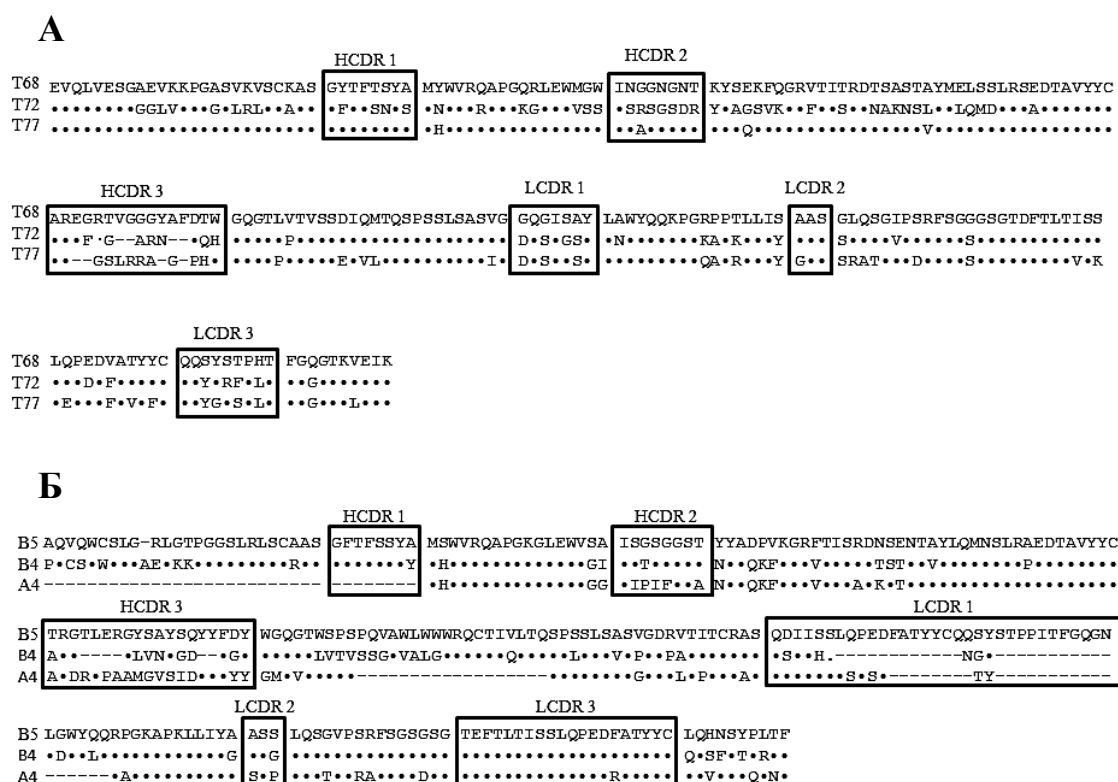


Рисунок 6 – Аминокислотные последовательности АТ с разделением на FR и CDR участки. А – иАТ, Б – аиАТ. Точками показаны совпадающие аминокислотные остатки.

Так как CDR3 варибельного домена тяжелой цепи АТ принимает главное участие в узнавании АГ, на следующем этапе анализировали аминокислотные последовательности CDR3 одноцепочечных АТ. В образовании CDR3 принимают участие V-, D- и J-сегменты зародышевых линий. В Таблице 4 представлен вклад различных сегментов в образование CDR3 для иАТ – Т68, Т72 и Т77 и аиАТ – А4, В4 и В5.

Таблица 4 – Аминокислотный состав гиперварибельных участков CDR3 тяжелых и легких цепей иАТ – Т68, Т72, Т77 и аиАТ – 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)					
Т68	AR	EGRTVGGGYA	FDT	QQSYSTP	T
Т72	AR	FGGARNFQH	FGH	QQYYRFP	LT
Т77	AR	GSLRRAGPH	H	QQYGSSP	LT
аиАТ (специфичные к рSh)					
А4	AR	ARDRVPAAMGVSIDY	YYYYYGMDV	QQFNSY	YT
В4	AR	GGLVNYGD	FGY	QQSFTTP	RT
В5	TR	GTLERGYSAYSQYYF	DY	LQHNSYP	LT

Как видно из Таблицы 4 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. 4А). 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. 4Б).

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. Наблюдалась закономерность расположения консервативных аминокислотных остатков ближе к границам CDR практически во всех случаях. Все проанализированные CDR участки различались, исключение составил CDR2 легких цепей (Рис. 7)

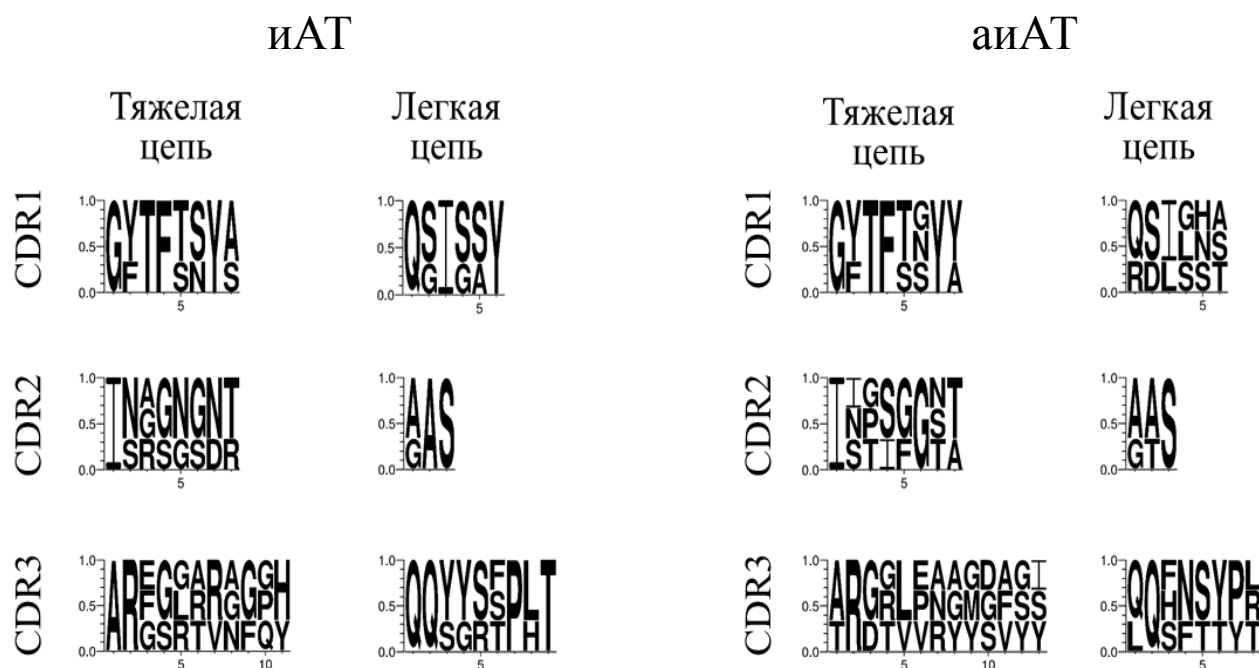


Рисунок 7 – Анализ аминокислотных остатков в CDR. Каждый логотип состоит из колонок символов. Одна колонка для каждой позиции в последовательности. Высота символов соответствует частоте встречаемости аминокислотных остатков в данной позиции.

3.3. Получение бактериальных штаммов-продуцентов иАТ Т72 и аиАТ А4, выделение и очистка АТ

Следующим этапом работы было выделение и очистка отобранных иАТ и аиАТ. Для наработки АТ был использован штамм *E.coli* HB2151 и клоны, бактериофагов 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/T72 и *E.coli* HB2151/A4, продуцирующие одноцепочечные иАТ Т72 и аиАТ А4, соответственно. Следует отметить, что на С-конце молекулы каждого одноцепочечного АТ находится гексамер гистидина (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 Ni^{2+} -агарозе. Чистоту белкового препарата проверяли гель-электрофорезом в ПААГ (Рис. 8), а концентрацию белка определяли набором BCA (Micro BCA 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 весам.

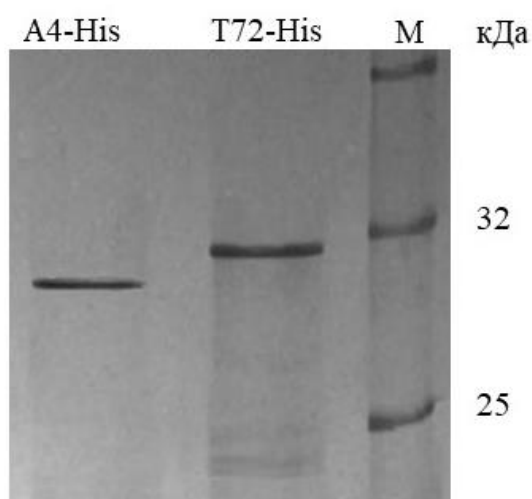


Рисунок 8 – Результат электрофоретического разделения иАТ Т72 и аиАТ А4 с 6×His в 12,5% ПААГ в денатурирующих условиях. М – маркер молекулярных весов. Справа приведены величины молекулярных весов в кДа.

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 6×His 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 6×His, 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, очищены электрофорезом в агарозном геле, обработаны эндонуклеазами рестрикции и объединены с плазмидой рССО содержащей ЦСД.

Анализ полученных плазмидных конструкций проводили с помощью ПЦР. В результате длина вставки в плазмиде рССО составляла примерно 1000 п.о. (Рис. 9). Создание плазмидной конструкции рССО-А4 проводилась аналогично созданию рССО-Т72.

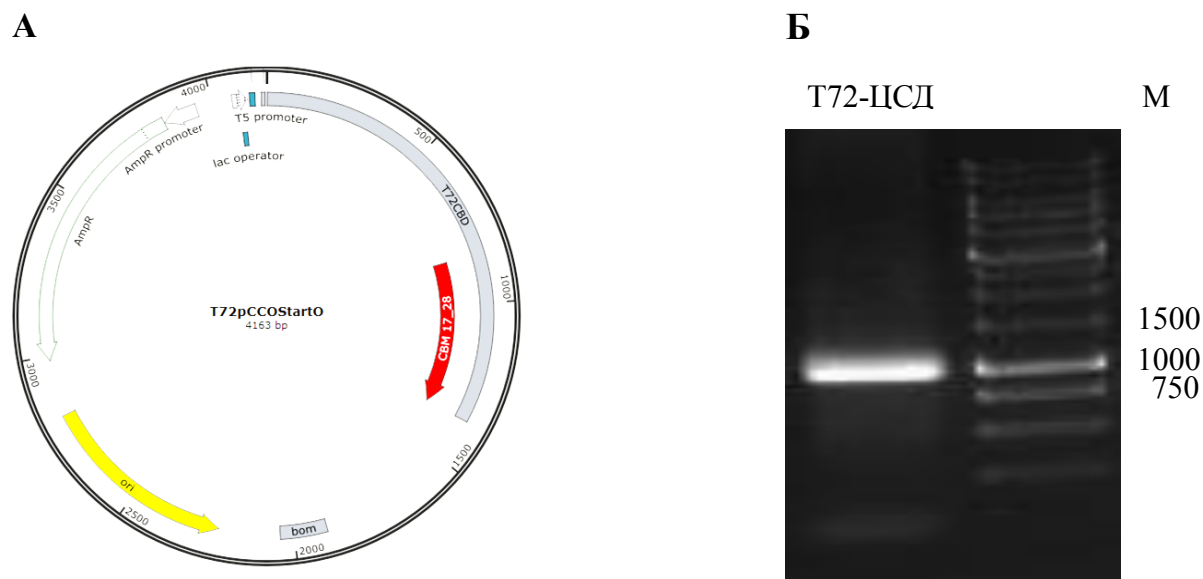


Рисунок 9 – Схема плазмидной конструкции рССО-Т72 (А) и результат электрофоретического разделения в 1% агарозе фрагмента ПЦР, кодирующего

слитый белок иАТ – Т72-ЦСД (Б). М – ДНК маркер. Справа приведены размеры в п.О.

Для наработки и выделения АТ, конъюгированных с ЦСД, плазмидными конструкциями рССО-Т72 и рССО-А4 трансформировали штамм *E.coli* М15. Выделение АТ, конъюгированных с ЦСД, проводили с помощью аффинной хроматографии на аморфной целлюлозе. Для этого клетки *E. coli* М15/рССО-Т72 или *E. coli* М15/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. 10), 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.

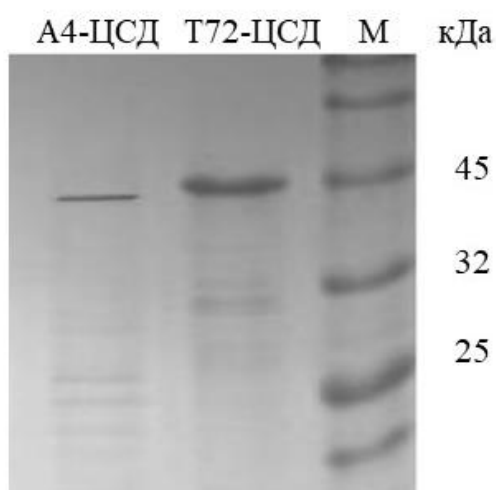


Рисунок 10 – Электрофоретическое разделение в 12,5% ПААГ в денатурирующих условиях аиАТ А4-ЦСД и иАТ Т72-ЦСД. М – маркер молекулярных весов. Справа приведены величины молекулярных весов маркерных белков в кДа.

3.4. Иммунохимическая характеристика отобранных 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 методом ИФА с общим АГ – БП. 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 (Рис. 11) 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} отличалась приблизительно в 2 раза. Таким образом, отобранное из наивной комбинаторной библиотеки генов одноцепочечное иАТ Т72 связывает БП, и это связывание схоже со связыванием мышинного одноцепочечного иАТ рSh с БП, охарактеризованного ранее.

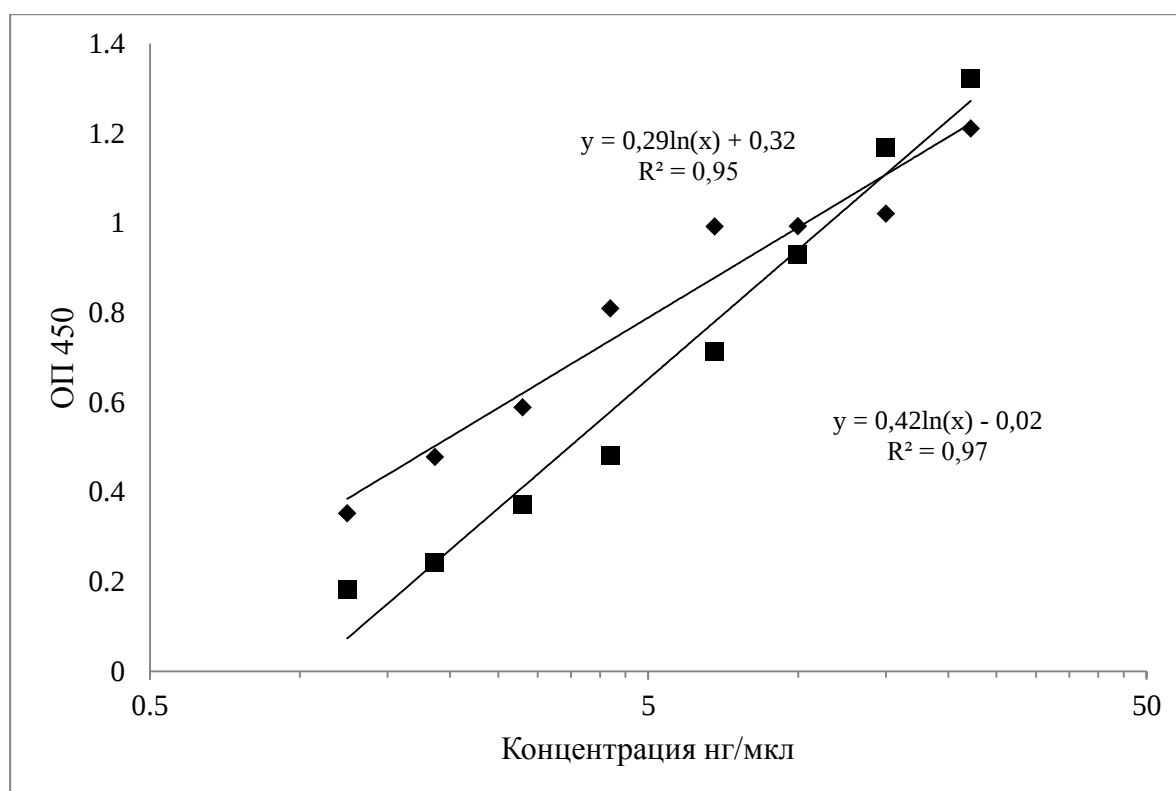


Рисунок 11 – Результат ИФА. Взаимодействие иАТ рSh (квадраты) и иАТ Т72 (ромбы) с иммобилизованным БП-БСА.

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. 12), аиАТ А4 дозозависимо связывался как с иАТ рSh, так и с иАТ Т72, несмотря на то что антигенсвязывающие 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. 11).

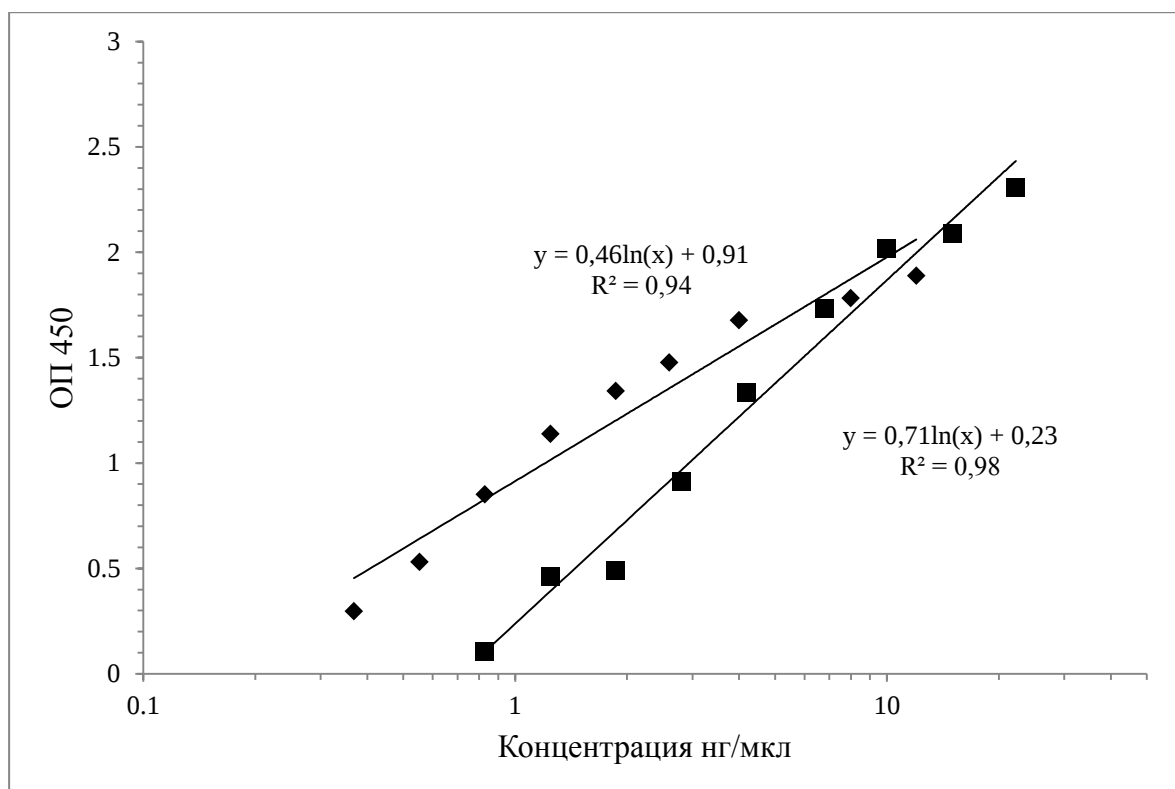


Рисунок 12 – Результат ИФА. Взаимодействие аиАТ А4 с рSh (квадраты) и Т72 (ромбы). На оси ординат отложены ОП. На оси абсцисс отложена концентрация рSh и иАТ Т72.

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 – IC_{50}) 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. 13).

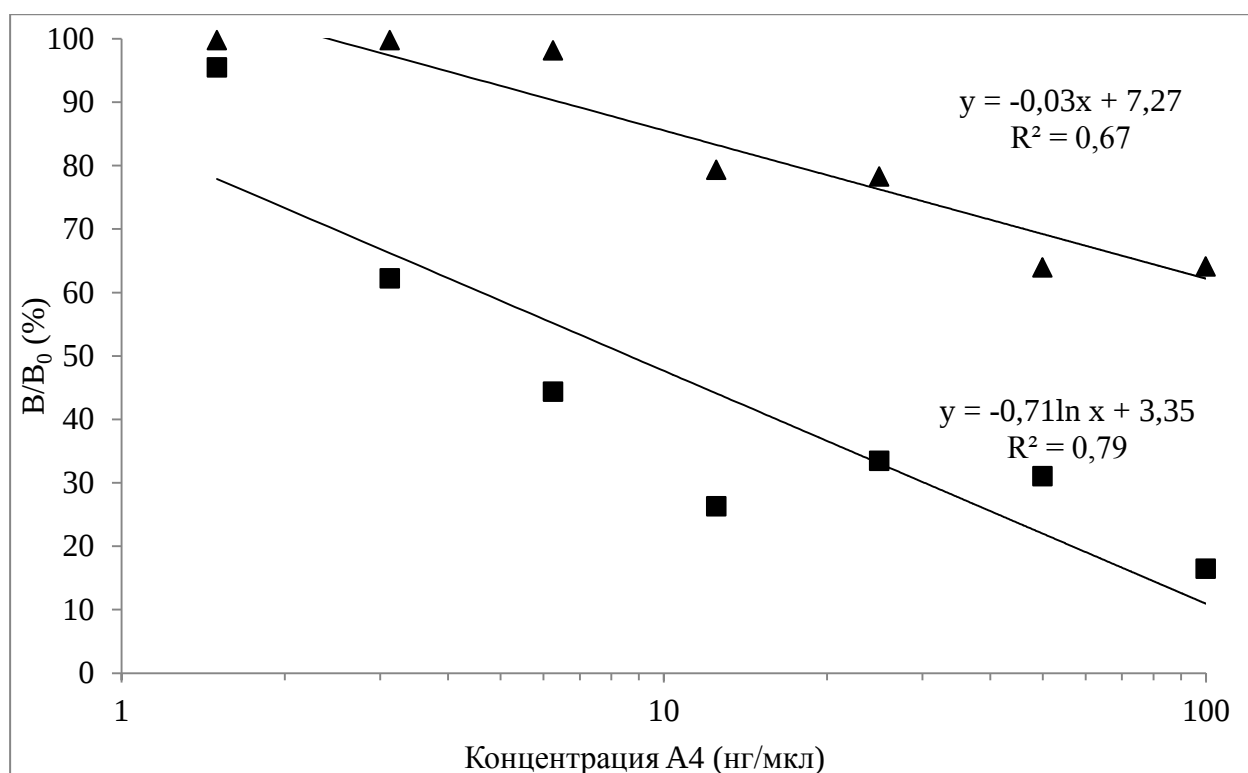
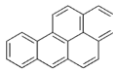
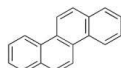
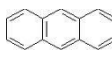
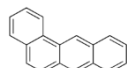
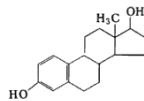


Рисунок 13 – Результаты конкурентного ИФА. Связывание иАТ Т72 и иАТ pSh с иммобилизованным БП-БСА в присутствии возрастающей концентрации конкурента иАТ А4. Квадраты – иАТ Т72, треугольники – иАТ pSh.

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 5 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 5 – 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 
Т72						
$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$1,77 \cdot 10^4$	$1,07 \cdot 10^5$	$3,54 \cdot 10^3$	$8,88 \cdot 10^3$	$4,77 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^3$
$k_{off} (s^{-1})$	$2,43 \cdot 10^{-2}$	$2,82 \cdot 10^{-2}$	$2,91 \cdot 10^{-2}$	$3,32 \cdot 10^{-2}$	$4,49 \cdot 10^{-2}$	$2,43 \cdot 10^{-2}$
KD (M)	$1,37 \cdot 10^{-6}$	$2,63 \cdot 10^{-7}$	$8,22 \cdot 10^{-6}$	$3,74 \cdot 10^{-6}$	$9,42 \cdot 10^{-8}$	$2,43 \cdot 10^{-5}$

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 иАТ рSh и иАТ Т72. аиАТ А4 было иммобилизовано на поверхность чипа GLM. иАТ 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 ЦСД, иммобилизованный на чип. Для вычислений констант использовали простые модели односайтового связывания. В Таблице 6 представлены значения динамических констант ассоциации – $k_{on} (M^{-1}s^{-1})$

¹), диссоциации – k_{off} (s^{-1}) и равновесной константы диссоциации – K_D (М), рассчитанных по формуле $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$. Равновесные K_D для аиАТ А4 и иАТ рSh, аиАТ А4 и иАТ Т72 составили $0,77 \times 10^{-8}$ М и $5,71 \times 10^{-7}$ М, соответственно. Интересно, что связывание между аиАТ А4 и иАТ рSh было немного выше за счет диссоциации белкового комплекса ($k_{\text{off}} = 1,20 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ для А4 и рSh, по сравнению с $k_{\text{off}} = 2,55 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ для А4 и Т72).

Таблица 6 – Динамические константы ассоциации и диссоциации, равновесные константы диссоциации для взаимодействия человеческого одноцепочечного аиАТ А4 с иАТ Т72 и иАТ рSh

	k_{on} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (М)	Chi2 (RU)
pSh	$1,56 \cdot 10^2$	$1,20 \cdot 10^{-4}$	$0,77 \cdot 10^{-8}$	23,83
T72	$4,42 \cdot 10^3$	$2,52 \cdot 10^{-3}$	$5,71 \cdot 10^{-7}$	34,89

3.5. Подбор условий для определения эндогенных иАТ и аиАТ к бензо[а]пирену в сыворотках крови человека методом иммуноферментного анализа

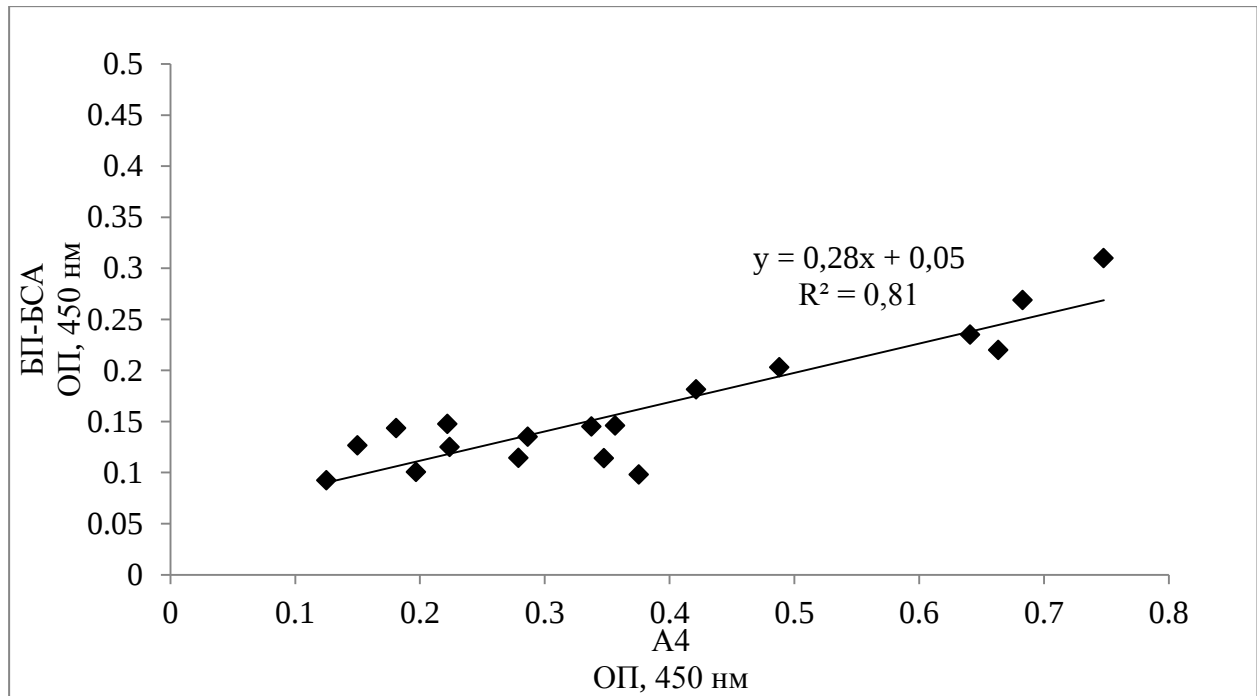
Для определения эндогенных иАТ и аиАТ в сыворотке крови человека с использованием рекомбинантных иАТ Т72 и аиАТ А4 сначала были оптимизированы условия ИФА. В результате были выбраны следующие концентрации для сорбции белков на пластик иммунологического планшета: АГ (белки) вносили в лунки плоскодонного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

T72-ЦСД, а связавшиеся иАТ T72-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, T72 и pSh – при 37°C в течение часа, для БП-БСА – 12 часов при комнатной температуре.

3.6. Сравнение связывания иАТ и аиАТ к полициклическим ароматическим углеводородам из сывороток крови человека с бензо[а]пиреном, А4, T72 и pSh

Так как АТ А4 является аиАТ, 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 аиАТ 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. По аналогии с аиАТ А4 и БП было сравнено связывание АТ из сыворотки крови человека с иАТ T72 против БП и с иАТ pSh (мышинное одноцепочечное иАТ против БП) (Рис. 14Б).

А



Б

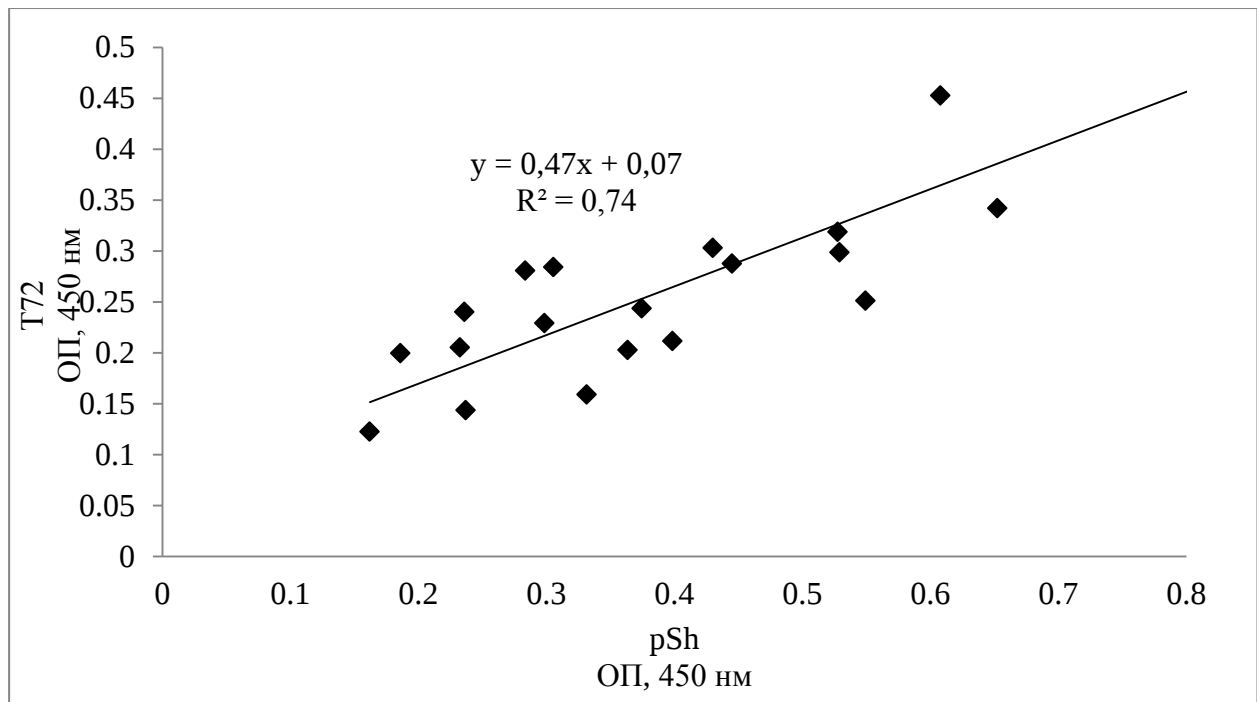


Рисунок 14 – Результат ИФА взаимодействия сывороток крови человека с иммобилизованными АГ: А – БП-БСА и аиАТ А4; Б – иАТ Т72 и иАТ pSh. На осях абсцисс и ординат приведены величины оптической плотности ответа для иммобилизованных пар АГ.

Как видно из графика на Рисунке 14А, ответ сывороток на БП и А4 имеет линейную зависимость, т.е. при высоком ответе на сорбированный БП у сыворотки также высокий ответ на сорбированный А4. Аналогичная зависимость наблюдается и для пары Т72-рSh (Рис. 14Б).

3.7. Определение уровней эндогенных идиотипических и антиидиотипических АТ против бензо[а]пирен в крови больных раком легкого 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. 15) и анализировали на нормальность распределения помощью критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка.

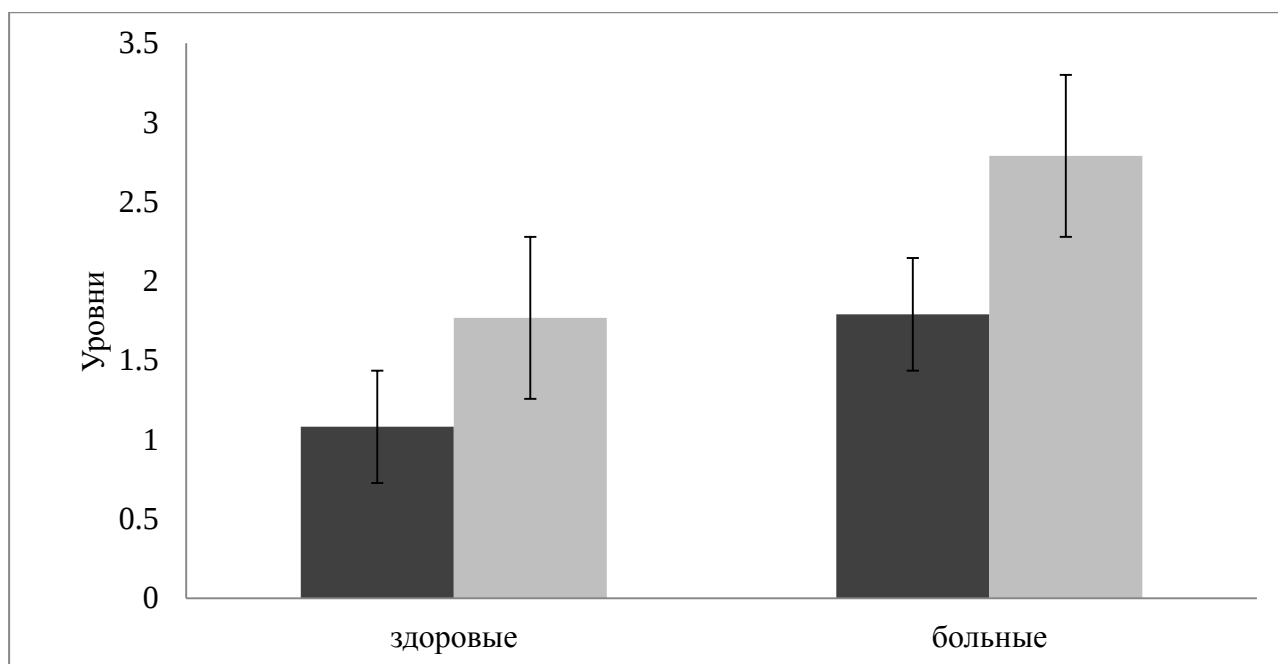


Рисунок 15 – Средние арифметические значения уровней эндогенных иАТ и аиАТ в сыворотке крови для групп условно здоровых доноров и больных РЛ. Черные столбцы – уровень иАТ, серые – уровень аиАТ. Указаны среднеквадратические отклонения

Анализ показал, что данные ИФА 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 7.

Таблица 7 – 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

Определяемые АТ из сыворотки крови	Среднее арифметическое уровней АТ для условно здоровых доноров	Среднее арифметическое уровней АТ для больных раком легкого	Т- критерий Стьюдента, р <0,05
иАТ	2,68±0,33	3,09±0,33	0,042
аиАТ	5,09±0,64	6,72±0,6	<0,001

Анализ методом Стьюдента для независимых выборок показал, что уровни иАТ и аиАТ в сыворотке крови достоверно отличаются между группами условно здоровых и больных РЛ. Для того, чтобы ввести в расчеты фактор курения, результаты ИФА исследуемых групп 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 исследуемых группах людей показала, что уровень аиАТ коррелирует с возрастом ($\rho = 0,34$) и с наличием заболевания ($\rho = 0,44$). Корреляций между иАТ и другими факторами обнаружено не было (Табл. 8).

Таблица 8 – Коэффициент корреляции между факторами в группах исследуемых людей рассчитанный методом Спирмена (ρ). Расчет проведен с учетом уровней иАТ и аиАТ, курением, возрастом и состоянием здоровья

	иАТ	аиАТ	Курение	Возраст	Состояние здоровья
иАТ	1,00	–	–	–	–
аиАТ	–	1,00	–	0,34	0,44
Курение	–	–	1,00	-0,34	-0,53
Возраст	–	0,34	-0,34	1,00	0,59
Болезнь	–	0,44	-0,53	0,59	1,00

3.8. Создание модели определения вероятности заболевания рак легкого у человека

Для создания модели определения вероятности заболевания рака легкого был использован метод логистической регрессии. Для расчётов использовали 4 предиктора: уровни иАТ и аиАТ, курение и возраст. Коэффициенты для предикторов, полученные в результате регрессионной модели, представлены в Таблице 9.

Таблица 9 – Коэффициенты логистической регрессии

иАТ	аиАТ	Курение	Возраст
0,29	0,87	-3,09	0,04

Среди предикторов логистической регрессии самый высокий коэффициент был у предиктора курения. Он составил -3,09. Далее, после него в порядке убывания, шли коэффициенты предикторов: аиАТ (0,87), иАТ (0,29) и возраст

(0,04). Точность определения условно здоровых людей данной моделью составила 75%, а для людей с раком легкого – 86,3%.

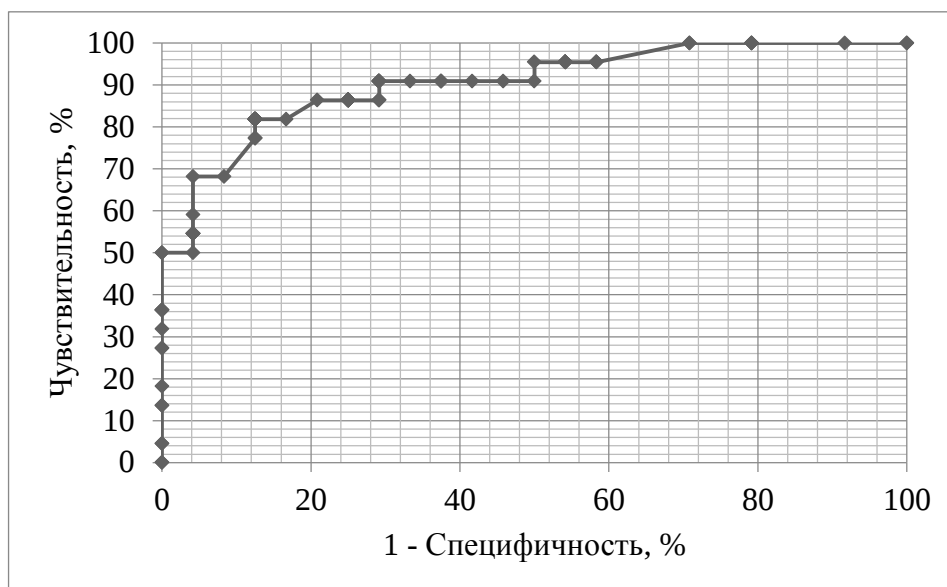


Рисунок 16 – ROC-кривая модели логистической регрессии для предсказания вероятности заболевания РЛ.

Чувствительность и специфичность логистической модели составляла 86% и 95%, соответственно, а площадь под ROC-кривой составляла $AUC = 0,89$ (Рис. 16). Данная модель логистической регрессии имеет хорошие показатели для предсказания заболевания РЛ. Так как показатели чувствительности и специфичности соответствуют другим системам определения РЛ.

Глава 4. Обсуждение результатов

При скринировании наивной комбинаторной библиотеки одноцепочечных АТ человека на БП-БСА и иАТ pSh было получено три идиотипических – Т68, Т72 и Т77 и три антиидиотипических – А4, В4 и В5 АТ против БП.

Анализ последовательностей, кодирующих V сегменты полученных белков показал, что АТ принадлежали к шести уникальным семействам. При анализе селективного давления было выявлено АТ, с признаками влияния АГ на образование V сегмента. Несмотря на то, что АТ получены из рекомбинантной библиотеки здоровых людей можно предположить, что АГ влиял на созревание Т68, Т77, В4, В5.

Все полученные АТ были уникальными и отличались друг от друга по аминокислотной последовательности. По результатам поиска в базе BLAST (по совокупности Max Score и Percent Identity) были найдены наиболее похожие АТ. По нуклеотидным последовательностям:

для иАТ Т68 – AF453076.1 против ротавируса [Weitkamp, 2003];

для иАТ Т72 – KJ590438.1 против TNF [сообщение в базе данных Tyumentseva и Tikunova];

для иАТ Т77 – KJ590452.1 против TNF [сообщение в базе данных Tyumentseva и Tikunova].

Для иАТ А4 наиболее похожим было KC793326.1 против интерферона гамма [сообщение в базе данных Tyumentseva, Babkin, Morozova и Tikunova];

для В4 – HM587255.1 против ортопоксвируса [сообщение в базе данных Dubrovskaya, Khlusevich, Morozova и Tikunova];

для В5 – KC793330.1 против интерферона гамма [Tyumentseva et al., 2013].

При сравнении аминокислотных последовательностей наиболее близкие гомологи:

для иАТ Т68 и Т77 – AAS77223.1 против каррагинана [Liners et al., 2005];

для иАТ Т72 и В5 – ANM25310.1 [Tyumentseva et al., 2013];

для иАТ В4 – ANM25305.1 [Tyumentseva et al., 2013];

для иАТ А4 – 4KV5_E [Moulin et al., 2014].

Гомологию полученных АТ к БП с АТ против TNF и интерферона гамма можно объяснить высокой консервативностью к общему зародышевому сегменту для V домена. Подобные V домены характерны для первичных аутоАТ.

Для дальнейшей работы были выделены и очищены белки иАТ Т72 и аиАТ А4, с наилучшим ответом в ИФА. Оба АТ получали и с 6xHis хвостом, и с ЦСД. Способность выявлять полученными scFv различные АГ было исследовано с помощью ИФА. В результате было показано, что иАТ Т72 связывалось с конъюгатом БП-БСА и аиАТ А4. Также, как и аиАТ А4 связывалось с иАТ Т72 и иАТ рSh. Методом конкурентного ИФА показано, что аиАТ А4 конкурировало с конъюгатом БП-БСА за связывание с иАТ Т72 и иАТ рSh, что говорит о схожих центрах связывания на поверхности иАТ Т72 и иАТ рSh для узнавания аиАТ А4 и БП-БСА. Либо схожести центров связывания аиАТ А4 и БП-БСА для узнавания иАТ Т72 и иАТ рSh. По результатам конкурентного ИФА можно сказать, что аиАТ А4 принадлежит классу β , т.е. распознает эпитоп в АГ связывающем сайте.

Было оценено сродство полученных АТ с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса. Результаты показали, что равновесная константа диссоциации для пары иАТ Т72 и БП-БСА составляла $1,37 \times 10^{-6}$ М. Полученное иАТ Т72 узнает не только БП, но и другие соединения из группы ПАУ, что подтверждается опубликованными ранее данными о полиспецифичности АТ против ПАУ [Grova et al., 2009; Moolten et al., 1978]. Для пары иАТ Т72 и аиАТ А4 равновесная константа диссоциации составляла $5,71 \times 10^{-7}$ М. А для иАТ рSh и аиАТ А4 – $0,77 \times 10^{-8}$ М. Как видно из данных, сила связывания иАТ Т72 с аиАТ А4 на порядок сильнее, чем с БП-БСА. Это можно объяснить тем, что БП инертная и гидрофобная молекула, состоящая из пяти бензольных колец, и взаимодействия с ней происходят в основном за счет π -связей [Eichinger et al, 2017]. В свою очередь, взаимодействие между Т72 и А4 возможно происходит за счет заряженных аминокислотных остатков, что приводит к более высокой константе связывания.

В работе было показано, что результаты определения эндогенных иАТ и аиАТ к БП в сыворотке крови человека с помощью человеческих одноцепочечных АТ коррелируют с результатами определения тех же АТ, но с помощью конъюгата БП-БСА и мышинового одноцепочечного иАТ рSh. Из этого можно предположить, что оба метода ИФА определяют схожий пул АТ в сыворотке крови человека.

Полученные в данной работе рекомбинантные АТ использовались для определения уровней иАТ к ПАУ и аиАТ в сыворотках крови людей больных раком легкого (22 мужчины) и условно здоровых людей (24 мужчины) с помощью метода ИФА. Данные ИФА группы условно здоровых людей имели нормальное распределение, в отличии от пациентов с заболеванием рака легкого, которые имели ненормальное распределение. Для дальнейшего расчета данные ИФА обеих групп были нормализованы с помощью метода Бокс-Кокса. Отличие между группами больных и условно здоровых людей рассчитывали методом Стьюдента для независимых выборок. Результаты анализа показали, что группы условно здоровых людей и больных РЛ достоверно отличались друг от друга по уровням иАТ (2,68 для здоровых людей и 5,09 для больных РЛ) и по уровням аиАТ (3,09 для условно здоровых людей и 6,72 для больных РЛ). Хотя стоит отметить, что данные расчета иАТ для условно здоровых людей и пациентов с РЛ находились на границе достоверности ($p = 0,042$). В работе использовались одновременное измерение Эндогенных иАТ и аиАТ в сыворотке крови человека для получения более точной картины иммунного ответа при канцерогенезе, что можно использовать для диагностики РЛ. В работе было показано, что уровни иАТ к ПАУ и аиАТ у условно здоровых людей ниже, чем у больных РЛ.

Были рассчитаны коэффициенты корреляции Спирмена факторами в группах исследуемых людей: уровни иАТ и аиАТ, наличие заболевания, возраст, Курение и состояние здоровья. В результате была выявлена достоверная зависимость уровней аиАТ и возрастом людей и заболеванием ($p = 0,34$ для возраста и $p = 0,44$ для заболевания) несмотря на то, что обе найденные

корреляции являются слабыми. Затем была построена модель логистической регрессии для определения наличия или отсутствия РЛ. Для расчетов использовались предикторы: уровни иАТ и аиАТ, курение и возраст исследуемых людей. Коэффициенты предикторов были следующие: для уровня иАТ – 0,29, аиАТ – 0,87, курение – -3,09, возраст – 0,04. Чувствительность и специфичностью логистической модели составила 86% и 95%, соответственно, и $AUC = 0,89$. Данные показатели сопоставимы с другими системами определения рака легкого. Например, система мультиплексного анализа, использующая панель из 6 аутоАТ против: p53, NY-ESO-1, CAGE, GBU4-5, Annexin 1 и SOX2. Чувствительность и специфичность данного метода составляла 38% и 89%, соответственно. Либо система, использующая панель из 7 аутоАТ против: p53, CAGE, NY-ESO-1, GBU4-5, SOX2, MAGE A4 and Hu-D, в которой показатели чувствительности были 47%, а специфичности – 90%, и $AUC = 0,90$ [Tang et al, 2017].

Построенная модель логистической регрессии подтверждает разницу в средних арифметических уровнях иАТ к БП и аиАТ в сыворотках крови у больных раком легкого и условно здоровых людей. Подобные методы логистической регрессии часто используют для определения заболевания рака легкого, с использованием различных маркёров заболевания [Park et al, 2017; Zhang et al, 2018]. Поскольку построенная в данной работе модель логистической регрессии имела высокие характеристические показатели, то найденное различие в уровнях иАТ и аиАТ в сыворотке крови людей в сочетании с факторами курения и возраста с высокой вероятностью в будущем можно использовать для определения риска заболевания РЛ, а также выявления групп риска среди условно здоровых людей.

Глава 5. 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 иАТ 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 гистида 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 (отрицательный контроль). Установлено, что аиАТ А4 связывалось с иАТ Т72 и с мышинным одноцепочечным иАТ pSh против ПАУ, полученным ранее. Конкурентный метод ИФА показал, что аиАТ А4, как и БП, взаимодействует с антигенсвязывающими доменами человеческого иАТ Т72 и мышинного иАТ pSh.

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 мышинного одноцепочечного иАТ pSh.

иАТ Т72 и аиАТ А4 использовали в качестве антигенов для определения уровней эндогенных иАТ к ПАУ 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 с условно здоровыми донорами крови, и эта разница статистически достоверна. Была построена модель логистической регрессии, с использованием предикторов: 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, показали, 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 к ПАУ и аиАТ у больных РЛ. Система иммуноанализа с использованием полученных одноцепочечных антител позволяет рассматривать иАТ к ПАУ и аиАТ в сыворотке крови в качестве маркеров РЛ.

Глава 6. 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 вариабельных доменов иАТ Т68, Т77 и аиАТ В4, В5 происходит под влиянием потенциального селективного давления БП.
2. Созданы штаммы *E.coli* HB2151/Т72 и *E.coli* HB2151/А4, 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* М15/рССО-Т72 и *E.coli* М15/рССО-А4, 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 сыворотках 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 сокращений

А4 – антиидиотипическое человеческое одноцепочечное антитело
АГ – антиген
аиАТ – антиидиотипические антитела
АТ – антитела
Ац-БСА – конъюгат антрацена с бычьим сывороточным альбумином
Ба-БСА – конъюгат бензантрацена с бычьим сывороточным альбумином
БП – бензо[а]пирен
БП-БСА – конъюгат бензо[а]пирен с БСА
БСА – бычий сывороточный альбумин
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ДСН – додецилсульфат натрия
иАТ – идиотипические антитела
ИЛ-10 – интерлейкин 10
ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
ИФА – иммуноферментный анализ
кДа – килодальтон
ЛСА – лошадиный сывороточный альбумин
ОП – оптическая плотность
п.о. – пар оснований
ПААГ – полиакриламидный гель
ПАУ – полициклические ароматические углеводороды
Пи-БСА – конъюгат пирена с бычьим сывороточным альбумином
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РЛ – рак легкого
Т72 – идиотипическое человеческое одноцепочечное антитело
Трис – трис(гидроксиметил)аминометана
ФСБР – фосфатно-солевой буферный раствор
Хр-БСА – конъюгат хризена с бычьим сывороточным альбумином
ЦСД – целлюлозосвязывающий домен

ЧСА – человеческий сывороточный альбумин

ЭДТА – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин

ЭС-БСА – конъюгат эстрадиола с бычьим сывороточным альбумином

CDR – гипервариабельный участок вариабельного домена антитела

(Complementarity Determining Regions)

dNTP – дезоксинуклеотид 5'-трифосфат

FR – каркасный участок вариабельного домена антитела (Framework Region)

IC₅₀ – точка половинного насыщения от максимального связывания

IgG – иммуноглобулин класса G

IgA – иммуноглобулин класса A

LB – лизогенная среда

pSh – идиотипическое мышинное одноцепочечное антитело

scFv – одноцепочечные антитела

ТАЕ – трисс-ацетатный буфер

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

Список литературы

1. Батанова, Т.А. Создание и характеристика наивной комбинаторной библиотеки одноцепочечных антител человека / Т.А. Батанова, А.Б. Улитин, Е.В. Жираковская, А.Г. Ламан, Ф.А. Бровко, В.В. Воронина, Н.В. Тикунова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология – 2006. – Т.3. – С.35- 41.
2. Глушков, А.Н. Краткая характеристика факторов, безусловно канцерогенных для человека / А.Н. Глушков // Медицина в Кузбассе. – 2003. – Т.4. – С.13-18.
3. Глушков, А.Н. Сывороточные антитела к бензо[а]пирену и хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови у рабочих углеперерабатывающего предприятия / А.Н. Глушков, Е.Г. Поленок, Т.П. Аносова, Я.А. Савченко, М.Л. Баканова, В.И. Минина, С.А. Мун, С.А. Ларин, М.В. Костянко // Российский иммунологический журнал. – 2011. – Т.5(14). – С.39-44.
4. Глушков, А.Н. Иммунные реакции на химические канцерогены и стероидные гормоны у больных с доброкачественными и злокачественными опухолями молочной железы / А.Н. Глушков, Е.Г. Поленок, С.А. Мун, Л.А. Гордеева, М.В. Костянко, Г.И. Колпинский, А.В Антонов, Н.Е. Вержбицкая, И.А. Вафин // Российский иммунологический журнал. – 2021. – Т.24. – С.101-108.
5. Глушков, А.Н. Влияние анти-антител к эстрадиолу и прогестерону на содержание гормонов в сыворотке крови здоровых женщин и больных раком молочной железы / А.Н. Глушков, Е.Г. Поленок, С.А. Мун, Л.А. Гордеева, М.В. Костянко, А.В Антонов, Ю.А Магарил, В.А Луценко, Г.И Колпинский, Н.Е. Вержбицкая, И.А Вафин // Сибирский онкологический журнал. – 2020. – Т.19. – С.62-69.
6. Заридзе Д.Г. Канцерогенез / Под ред. Д.Г. Заридзе // М. – Медицина. – 2004. – С.576.

7. Патент RF 2141114 [Синтезирование гаптен-белкового конъюгата]: пат. RF 2141114 Рос.Федерация / Костянко М.В, Глушков А.Н. // Заявитель и патентообладатель Федеральное государственное унитарное учреждение науки Институт экологии человека СО РАН. – RF 2141114. – опубл. 1998.
8. Патент РФ 2270249 [Рекомбинантная плазмидная ДНК, кодирующая синтез рекомбинантного белка tul4spcbd, штамм *Escherichia coli* m15 [prrp4, ptul4spcbd] - продуцент рекомбинантного белка tul4spcbd, рекомбинантный белок tul4spcbd и способ его получения, способ получения специфических антител к белку tul4spcbd] / Гинцбург А.Л, Карягина-Жулина А.С, Кормилицына М.И, Лаврова Н.В, Лунин В.Г, Лящук А.М, Мещерякова И.С, Народицкий Б.С, Родионова И.В, Сергиенко О.В, Шмаров М.М. // Заявитель и патентообладатель Государственное учреждение Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. Н.Ф. Гамалеи Российской академии медицинских наук – РФ 2270249. – опубл. 2006.
9. Поленок, Е.Г. Анализ иммунного ответа на бензо[а]пирен у больных раком легкого / Е.Г. Поленок, Т.П. Аносова, М.П. Аносов, К.С. Красильникова, Е.А. Гуров, М.В. Костянко, В.А.Титов, Н.Е. Вержбицкая, И.А. Вафин, С.Е. Рагожина, С.Ф. Зинчук, А.Н. Глушков // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2011. – Т.2-1(35). – С.190-191.
10. Поленок, Е.Г. Антитела к бензо[а]пирену в сыворотке крови больных немелкоклеточным раком лёгкого / Е.Г. Поленок, Т.П. Аносова, К.С. Красильникова, Е.А. Гуров, В.А. Титов, Н.Е. Вержбицкая, И.А. Вафин, С.Е. Рагожина, А.Н. Глушков // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – Т.3(85). – С.151-154.
- 11.Худолей, В.В. Канцерогены: характеристики, закономерности, механизмы действия / В.В Худолей // Исследования по генетике. – 1999. – Т.12. – С.67-85.
12. Altschul, S.F. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs / S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang,

- Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman // *Nucleic Acids Res.* – 1997. – V.25. – P.3389-3402.
13. Arreaza, E.E. Lower antibody response to tetanus toxoid associated with higher auto-anti-idiotypic antibody in old compared with young humans / E.E. Arreaza, J.J. Gibbons Jr, G.W. Siskind, M.E. Weksler // *Clin Exp Immunol.* – 1993. – V.92(1). – P.169-173.
 14. Austin, E.B. Human monoclonal anti-idiotypic antibody to the tumour-associated antibody 791T/36 / E.B. Austin, R.A. Robins, L.G. Durrant, M.R. Price, R.W. Baldwin // *Immunology.* – 1989. – V.67(4). – P.525-530.
 15. Baer, R. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome / R. Baer, A.T. Bankier, M.D. Biggin, P.L. Deininger, P.J. Farrell, T.J. Gibson, G. Hatfull, G.S. Hudson, S.C. Satchwell, C. Seguin // *Nature.* – 1984. – V.310. – P.207-211.
 16. Barnard, G. Idiometric assay: noncompetitive immunoassay for small molecules typified by the measurement of estradiol in serum / G. Barnard, F. Kohen // *Clin Chem.* – 1990. – V.36(11). – P.1945-1950.
 17. Barnard, G. Idiometric assay, the third way: a noncompetitive immunoassay for small molecules / G. Barnard, H. Karsiliyan, F. Kohen // *Am J Obstet Gynecol.* – 1991. – 165(6 Pt 2). – P.1997-2000.
 18. Barnard, G. The measurement of progesterone in serum by a non-competitive idiometric assay / G. Barnard, J. Osher, S. Lichter, B. Gayer, J. De Boever, R. Limor, D. Ayalon, F. Kohen // *Steroids.* – 1995. – V.60(12). –P.824-829.
 19. Batanova, T.A. Construction and characterization of combinatorial naive phage library of human scFvs / T.A. Batanova, A.B. Ulitin, V.V. Morozova, A.G. Laman, E.V. Zhirakovskaia, V.V. Dubrovskaja, F.A. Brovko and N.V. Tikunova // *Mol Gen Mikrobiol Virusol* – 2006 – V.3 – P.35–41
 20. Becker, M. An alternative ELISA for T4 determination based on idiotype anti-idiotypic interaction and a latex method for anti-idiotypic monoclonal antibody selection / M.I. Becker, J.E. Aguayo, A. Jamett, F. Juica, A. Yudelevich, A.

- Foradori, A.E. De Ioannes // J Immunol Methods. – 1996. – V.192(1-2). – P.73-85.
21. Beckwith, J.R. A deletion analysis of the lac operator region in *Escherichia coli* / J.R Beckwith // J Mol Biol. – 1964. – V.8. – P.427.
 22. Behn, U. Idiotypic networks: toward a renaissance / U. Behn // Immunol Rev. – 2007. – V.216. – P.142-152.
 23. Bentley, G.A. Three-dimensional structure of an idiotope-anti-idiotope complex / G.A. Bentley, G. Boulot, M.M. Riottot, R.J. Poljak // Nature. – 1990. – V.348(6298). – P.254-257.
 24. Berenblum, I. The role of croton oil applications, associated with a single painting of a carcinogen, in tumour induction of the mouse's skin / I. Berenblum, P. Shubik // Br J Cancer. – 1947. – V.1(4). – P.379-382.
 25. Bertram, J.S. The molecular biology of cancer / J.S. Bertram // Mol Aspects Med. – 2000. – V.21(6). – P.167-223.
 26. Bona, C.A. Anti-immunoglobulin antibodies IV. Cross-reaction of anti-idiotypic antibodies specific for rabbit and murine anti-a1 allotype antibodies with Fc fragment of human immunoglobulins / C.A. Bona, B. Goldberg, D. Metzger, J. Urbain, H.G. Kunkel // Eur J Immunol. – 1984. – V.14(6). – P.548-52.
 27. Bona, C.A. Regulatory idiotopes, parallel sets and internal image of the antigen within the polyfructosan-A48 idiotypic network / C.A. Bona, B. Goldberg, L.J. Rubinstein // Ann Immunol (Paris). – 1984. – V.135C(1). – P.107-115.
 28. Bona, C.A. Internal image concept revisited / C.A Bona // Proc Soc Exp Biol Med. – 1996. – V.213(1). – P.32-42.
 29. Borska, L. Serum level of antibody against benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-DNA adducts in people dermally exposed to PAHs / L. Borska, C. Andrys, J. Krejsek, V. Palicka, M. Chmelarova, K. Hamakova, J. Kremlacek, P. Borsky, Z. Fiala // J Immunol Res. – 2014. – V.2014. –P.834389.
 30. Borský, P. Serum Level of Antibodies (IgG, IgM) Against Benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-DNA Adducts in Children Dermatologically Exposed to Coal Tar / P. Borský, C. Andrys, J. Krejsek, K. Hamáková, J. Kremláček, A. Málková,

- L. Bartošová, Z. Fiala, V. Palička, L. Borská // *Acta Medica (Hradec Kralove)*. – 2017. – V.60(1). – P.27-31.
31. Brochet, X. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis / X. Brochet, M.P. Lefranc, V. Giudicelli // *Nucleic Acids Res.* – 2008. – V.36. – P.503-508.
 32. Bulashev, A.K. Development of an ELISA using anti-idiotypic antibody for diagnosis of opisthorchiasis / A.K. Bulashev, S.N. Borovikov, S.S. Serikova, Z.A. Suranshiev, V.S. Kiyan, S.Z. Eskendirova // *Folia Parasitol (Praha)*. – 2016. – V.63. – P.1-8.
 33. Burnet, F.M. The immunological significance of the thymus: an extension of the clonal selection theory of immunity / F.M Burnet // *Australas Ann Med.* – 1962. – V.11. – P.79-91.
 34. Byung, M. Antibodies to carcinogen-DNA adducts in mice chronically exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons / M. Byung, B.M. Lee, P.T. Strickland // *Immunol Lett.* – 1993. – V.36(2). – P.117-123.
 35. Campo, L. Environmental and biological monitoring of PAHs exposure in coke-oven workers at the Taranto plant compared to two groups from the general population of Apulia, Italy / L. Campo, L. Vimercati, A. Carrus, L. Bisceglia, A.C. Pesatori, P.A. Bertazzi, G. Assennato, S. Fustinoni // *Med Lav.* – 2012. – V.103(5). – P.347-360.
 36. Campoli, M.R. Human high molecular weight-melanoma-associated antigen (HMW-MAA): a melanoma cell surface chondroitin sulfate proteoglycan (MSCP) with biological and clinical significance / M.R. Campoli, C.C. Chang, T. Kageshita, X. Wang, J.B. McCarthy, S. Ferrone // *Crit Rev Immunol.* – 2004. – V.24(4). – P.267-296.
 37. Carter, P. Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors / P. Carter, H. Bedouelle, G. Winter // *Nucleic Acids Res.* – 1985. – V.13. – P.4431 - 4443.

38. Carter-Harris, L. A qualitative study exploring why individuals opt out of lung cancer screening / L. Carter-Harris, S. Brandzel, K.J. Wernli, J.A. Roth, D.S.M. Buist // *Fam Pract.* – 2017. – V.34(2). – P.239-244.
39. Cernohorská, H. Influence of immunization with non-genotoxic PAH-KLH conjugates on the resistance of organisms exposed to benzo(a)pyrene / H. Cernohorská, S. Klimešová, L. Lepša, P. Jinoch, A. Milcová, J. Schmuczerová, J. Topinka, J. Lábaj // *Mutat Res.* – 2012. – V.742(1-2). – P.2-10.
40. Chagnaud, J.L. Identification and immunochemical characterization of IgA in sera of patients with mammary tumors / J.L. Chagnaud, S. Faiderbe, M. Geffard // *Int J Cancer.* – 1992. – V.50(3). – P.395-401.
41. Chagnaud, J.L. Curative effects on rat sarcomas obtained after a treatment combining two monoclonal antibodies / J.L. Chagnaud, S. Faiderbe, M. Geffard // *Anticancer Drugs.* – 1994. – V.5(3). – P.361-366.
42. Chang, C.C. Immunotherapy of melanoma targeting human high molecular weight melanoma-associated antigen: potential role of nonimmunological mechanisms / C.C. Chang, M. Campoli, W. Luo, W. Zhao, K.S. Zaenker, S. Ferrone // *Ann N Y Acad Sci.* – 2004. – V.1028. – P.340-350.
43. Chapman, P.B. Induction of IgG antibodies against GD3 ganglioside in rabbits by an anti-idiotypic monoclonal antibody / P.B. Chapman, A.N. Houghton // *J Clin Invest.* – 1991. – V.88(1). – P.186-192.
44. Chu, F.S. Production and characterization of anti-idiotypic and anti-anti-idiotypic antibodies against fumonisin B1 / F.S. Chu, X. Huang, C.M. Maragos // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* – 1995. – V.43(1). – P.261-267.
45. Clive, D. Validation and characterization of the L5178Y/TK[±] mouse lymphoma mutagen assay system / D. Clive, K.O. Johnson, J.F. Spector, A.G. Batson, M.M. Brown // *Mutat Res.* – 1979. – V.59(1). – P.61-108.
46. Coelho, M. Isolation and characterisation of a human anti-idiotypic scFv used as a surrogate tumour antigen to elicit an anti-HER-2/neu humoral response in mice / M. Coelho, P. Gauthier, M. Pugnière, F. Roquet, A. Pèleguin, I. Navarro-Teulon // *Br J Cancer.* – 2004. – V.90(10). – P.2032-2041.

47. Colja Venturini A. Anti-idiotypic antibodies: a new approach in prion research / A. Colja Venturini, M. Bresjanac, T. Vranac, S. Koren, M. Narat, M. Popović, V. Curin Serbec // BMC Immunol. – 2009. – V.10(16). – P.1-14.
48. Cosenza, H. Detection of anti-idiotypic reactive cells in the response to phosphorylcholine / H. Cosenza // Eur J Immunol. – 1976. – V.6(2). – P.114-116.
49. Crooks, G.E. WebLogo: a sequence logo generator / G.E. Crooks, G. Hon, J.M. Chandonia, S.E. Brenner // Genome Res. – 2004. – V. 14. – P. 1188-1190.
50. Curtis, G.L. Antibody stimulation of benzo(a)pyrene carcinogenesis / G.L. Curtis, W.L. Ryan, F. Stenbäck // Cancer Lett. – 1978. – V.4(4). – P.223-228.
51. Davtyan, T.K. The anti-idiotypic antibody 1F7 stimulates monocyte interleukin-10 production and induces endotoxin tolerance / T.K. Davtyan, D.A. Poghosyan, A.G. Sukiasyan, M.D. Grant // J Inflamm (Lond). – 2013. – V.10(1). – P.1-9.
52. De Buck, S.S. Modulation of the metabolism and adverse effects of benzo[a]pyrene by a specific antibody: a novel host factor in environmental carcinogenesis / S.S. De Buck, F.B. Bouche, A. Brandenburger, C.P. Muller // Carcinogenesis. – 2005. – V.26(4). – P.835-844.
53. De Buck, S.S. Effects of antibodies induced by a conjugate vaccine on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone absorptive transport, metabolism, and proliferation of human lung cells / S.S. De Buck, M.T. Schellenberger, C. Enschede, C.P. Muller // Int J Cancer. – 2010. – V.127(3). – P.513-520.
54. Denisova, G. Binding of HIV-1 gp120 to an anti-V3 loop antibody reveals novel antigen-induced epitopes / G. Denisova, J. Zwickel, J.M. Gershoni // FASEB J. – 1995. – V.9(1). – P.127-132.
55. Denisova, G.F. Expansion of epitope cross-reactivity by anti-idiotypic modulation of the primary humoral response / G.F. Denisova, M. Zerwanitzer, D.A. Denisov, E. Spectorman, I. Mondor, Q. Sattentau, J.M. Gershoni // Mol Immunol. – 2000. – V.37(1-2). – P.53-58.
56. Dixon, K. Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis / K. Dixon, E. Koprass // Semin Cancer Biol. – 2004. – V.14(6). – P.441-448.

57. Dotto, G.P. The functional origin of bacteriophage f1 DNA replication. Its signals and domains / G.P. Dotto, K. Horiuchi, N.D. Zinder // *J. Mol. Biol.* – 1984. – V.172. – P.507- 521.
58. Du, J. Anthropogenic PAHs in lake sediments: a literature review (2002-2018) / J. Du, C Jing // *Environ Sci Process Impacts.* – 2018. – V.20(12). – P.1649-1666.
59. Durrant, L.G. 105Ad7 cancer vaccine stimulates anti-tumour helper and cytotoxic T-cell responses in colorectal cancer patients but repeated immunisations are required to maintain these responses / L.G. Durrant, D.J. Buckley, R.A. Robins, I. Spendlove // *Int J Cancer.* – 2000. – V.85(1). – P.87-92.
60. Dwyer, D.S. Idiotypic network connectivity and a possible cause of myasthenia gravis / D.S. Dwyer, M. Vakil, J.F. Kearney // *J Exp Med.* – 1986. – V.164(4). – P.1310-1318.
61. Eichinger, A. Tight Molecular Recognition of Benzo[a]pyrene by a High-Affinity Antibody / A. Eichinger, I. Neumaier, M. Pschenitza, R. Niessner, D. Knopp, A. Skerra // *Angew Chem Int Ed Engl.* – 2017. – V.56(35). – P.10592-10597.
62. Ewa, B. Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts / B. Ewa, M. Danuta // *J Appl Genet.* – 2017. – V.58(3). – P.321-330.
63. Feinberg, A.P. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts / A.P. Feinberg, B. Vogelstein // *Nature.* – 1983. – V.301(5895). – P.89-92.
64. Fernandez, C. Antigen-induced strain-specific autoantiidiotypic antibodies modulate the immune response to dextran B 512 / C. Fernandez, G. Möller // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1979. – V.76(11). – P.5944-5947.
65. Fernandez, L.E. NGcGM3 ganglioside: a privileged target for cancer vaccines / L.E. Fernandez, M.R. Gabri, M.D. Guthmann, R.E. Gomez, S. Gold, L. Fainboim, D.E. Gomez, D.F. Alonso // *Clin Dev Immunol.* – 2010. – V.2010. – P.1-14.
66. Foon, K.A. Clinical and immune responses in advanced melanoma patients immunized with an anti-idiotype antibody mimicking disialoganglioside GD2 / K.A. Foon, J. Lutzky, R.N. Baral, J.R. Yannelli, L. Hutchins, A. Teitelbaum, O.L.

- Kashala, R. Das, J. Garrison, R.A. Reisfeld, M. Bhattacharya-Chatterjee // *J Clin Oncol.* – 2000. – V.18(2). – P.376-384.
67. Frank, S. Determination of albumin adducts of (+)-anti-benzo[a]pyrene-diol-epoxide using an high-performance liquid chromatographic column switching technique for sample preparation and gas chromatography-mass spectrometry for the final detection / S. Frank, T. Renner, T. Ruppert, G. Scherer // *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* – 1998. – V.713(2). – P.331-337.
 68. Franks, W.R. Chemoantigens and Carcinogenesis / W.R. Franks, H.J. Creech // *The American Journal of Cancer.* – 1939. – V.35(2). – P.203-212.
 69. Galati, R. Detection of antibodies to the benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in sera from individuals exposed to low doses of polycyclic aromatic hydrocarbons / R. Galati, A. Zijno, R. Crebelli, G. Falasca, F. Tomei, F. Iecher, P. Carta, A. Verdina // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2001. – V.20(3). – P.359-264.
 70. Geha, R.S. Presence of circulating anti-idiotypic-bearing cells after booster immunization with tetanus toxoid (TT) and inhibition of anti-TT antibody synthesis by auto-anti-idiotypic antibody / R.S. Geha // *J Immunol.* – 1983. – V.130(4). – P.1634-1639.
 71. Gibbs, G.W. Mortality and cancer incidence in aluminum smelter workers: a 5-year update / G.W. Gibbs, F. Labrèche, M.A. Busque, P. Duguay // *J Occup Environ Med.* – 2014. – V.56(7). – P.739-764.
 72. Glushkov AN, Kostyanko MV, Chernov SV. Immunoassay of antibodies to benz[a]pyrene/ A.N. Glushkov, M.V Kostyanko, S.V. Chernov // *Exp Oncol.* – 1998. – V.20. – P.74-76.
 73. Goidl, E.A. Production of auto-anti-idiotypic antibody during the normal immune response. IV. Studies of the primary and secondary responses to thymus-dependent and -independent antigens / E.A. Goidl, A.F. Schrater, G.H. Thorbecke, G.W. Siskind // *Eur J Immunol.* – 1980. – V.10(11). – P.810-814.
 74. Grebenshchikov, I.S. Idiotypic and anti-idiotypic antibodies against polycyclic aromatic hydrocarbon in human blood serum are new biomarkers of lung cancer / I.S. Grebenshchikov, A.E. Studennikov, V.I. Ivanov, N.V. Ivanova, V.A. Titov,

- N.E. Vergbickaya, V.A. Ustinov // *Oncotarget*. – 2019. – V.10(49). – P.5070-5081.
75. Griffiths, A.D. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires / A.D. Griffiths, S.C. Williams, O. Hartley, I.M. Tomlinson, P. Waterhouse, W.L. Crosby, R.E. Kontermann, P.T. Jones, N.M. Low, T.J. Allison // *EMBO J*. – 1994. – V.13. – P.3245-3260.
 76. Grova, N. Modulation of carcinogen bioavailability by immunisation with benzo[a]pyrene-conjugate vaccines / N. Grova, E.J. Prodhomme, M.T. Schellenberger, S. Farinelle, C.P. Muller // *Vaccine*. – 2009. – V.27(31). – P.4142-4151.
 77. Guengerich, F.P. Cytochrome p450 and chemical toxicology / F.P. Guengerich // *Chem Res Toxicol*. – 2008. – V.21(1). – P.70-83.
 78. Halkidou, K. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer / K. Halkidou, L. Gaughan, S. Cook, H.Y. Leung, D.E. Neal, C.N. Robson // *Prostate*. – 2004. – V.59(2). – P.177-189.
 79. Harris, C.C. Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in peripheral blood lymphocytes and antibodies to the adducts in serum from coke oven workers / C.C. Harris, K. Vahakangas, M.J. Newman, G.E. Trivers, A. Shamsuddin, N. Sinopoli, D.L. Mann, W.E Wright // *Cancer Res*. – 1986. – V.46(8). – P.4178-4183.
 80. He, J. Application of Anti-idiotypic Antibody in Small Molecules Immunoassay / J. He, M.-T. Fan, Y. Liang, X.-J. Liu // *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. – 2010. – V.38(9). – P.1366-1370.
 81. Herlyn, D. Functional mimicry of tumor-associated antigens by antiidiotypic antibodies / D. Herlyn, M. Wettendorff, D. Iliopoulos, H. Koprowski // *Exp Clin Immunogenet*. – 1988. – V.5(4). – P.165-175.
 82. Herlyn, D. Anti-idiotypic cancer vaccines: pre-clinical and clinical studies / D. Herlyn, A. Benden, M. Kane, R. Somasundaram, J. Zaloudik, M. Sperlagh, G. Marks, E. Hart, C. Ralph, M. Wettendorff // *In Vivo*. – 1991. – V.5(6). – P.615-623.

83. Herlyn, M. Melanoma antigens: immunological and biological characterization and clinical significance / M. Herlyn, H. Koprowski // *Annu Rev Immunol.* – 1988. – V.6. – P.283-308.
84. Hernández, A.M. Anti-NeuGcGM3 antibodies, actively elicited by idiotypic vaccination in nonsmall cell lung cancer patients, induce tumor cell death by an oncosis-like mechanism / A.M. Hernández, N. Rodríguez, J.E. González, E. Reyes, T. Rondón, T. Griñán, A. Macías, S. Alfonso, A.M. Vázquez, R. Pérez // *J Immunol.* – 2011. – V.186(6). – P.3735-3744.
85. Hershberg, U. Improved methods for detecting selection by mutation analysis of Ig V region sequences / U. Hershberg, M. Uduman, M.J. Shlomchik, S.H. Kleinstein // *Int. Immunol.* – 2008. – V.20. – P.683-694.
86. Hoffmann, G.W. A theory of regulation and self-nonsel discrimination in an immune network / G.W. Hoffmann // *Eur J Immunol.* – 1975. – V.5(9). – P.638-647.
87. Hong, K. Simple quantitative live cell and anti-idiotypic antibody based ELISA for humanized antibody directed to cell surface protein CD20 / K Hong, L.G. Presta, Y. Lu, A. Penn, C. Adams, A. Chuntharapai, J. Yang, W.L. Wong, Y.G. Meng // *J Immunol Methods.* – 2004. – V.294(1-2). – P.189-197.
88. Hsu, K.H. Anti-idiotypic and anti-anti-idiotypic antibodies generated from polyclonal antibodies against aflatoxin b1 / K.H. Hsu, F.S. Chu // *Food and Agricultural Immunology.* – 1995. – V.7(2). – P.139-151.
89. Hu, L. A non-toxic enzyme-linked immunosorbent assay for aflatoxin B1 using anti-idiotypic antibodies as substitutes / L. Hu, A. Liu, W. Chen, H. Yang, X. Wang, F. Chen // *J Sci Food Agric.* – 2017. – V.97(5). – P.1640-1645.
90. Iwamoto, T. In situ detection of acetylaminofluorene-DNA adducts in human cells using monoclonal antibodies / T.A. Iwamoto, N. Kobayashi, K. Imoto, A. Yamamoto, Y. Nakamura, Y. Yamauchi, H. Okumura, A. Tanaka, F. Hanaoka, S. Shibutani, S. Miyagawa, T. Mori // *DNA Repair (Amst).* – 2004. – V.3(11). – P.1475-1482.

91. Jeng, J.H. Role of areca nut in betel quid-associated chemical carcinogenesis: current awareness and future perspectives / J.H. Jeng, M.C. Chang, L.J. Hahn // *Oral Oncol.* – 2001. – V.37(6). – P.477-492.
92. Jerne, N.K. Towards a network theory of the immune system / N.K. Jerne // *Ann Immunol (Paris)*. – 1974. – V.125C(1-2). – P.373-89.
93. Jerne, N.K. Idiotypic networks and other preconceived ideas / N.K. Jerne // *Immunol Rev.* – 1984. – V.79. – P.5-24.
94. Jerne, N.K. The generative grammar of the immune system / N.K. Jerne // *Science.* – 1985. – V.229(4718). – P.1057-1059.
95. Kawabata, T.T. Suppression of the vitro humoral immune response of mouse splenocytes by benzo(a)pyrene metabolites and inhibition of benzo(a)pyrene-induced immunosuppression by alpha-naphthoflavone / T.T. Kawabata, K.L. White Jr // *Cancer Res.* – 1987. – V.47(9). – P.2317-2322.
96. Kim, K.H. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects / K.H. Kim, S.A. Jahan, E. Kabir, R.J. Brown // *Environ Int.* – 2013. – V.60. – P.71-80.
97. Kiyohara, T. Characterization of anti-idiotypic antibodies mimicking antibody- and receptor-binding sites on hepatitis A virus / T. Kiyohara, A. Totsuka, T. Yoneyama, K. Ishii, T. Ito, T. Wakita // *Arch Virol.* – 2009. – V.154(8). – P.1263-1269.
98. Klaunig, J.E. Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis / J.E. Klaunig, L.M. Kamendulis, Y. Xu // *Hum Exp Toxicol.* – 2000. – V.19(10). – P.543-555.
99. Kobayashi, N. Monoclonal antibodies generated against an affinity-labeled immune complex of an anti-bile acid metabolite antibody: an approach to noncompetitive hapten immunoassays based on anti-idiotypic or anti-metatype antibodies / N. Kobayashi, H. Oiwa, K. Kubota, S. Sakoda, J. Goto // *J Immunol Methods.* – 2000. – V.245(1-2). – P.95-108.
100. Kobayashi, N. Idiotypic-anti-idiotypic-based noncompetitive enzyme-linked immunosorbent assay of ursodeoxycholic acid 7-N-acetylglucosaminides in human urine with subfemtomole range sensitivity / N. Kobayashi, K. Kubota, H.

- Oiwa, J. Goto, T. Niwa, K. Kobayashi // *J Immunol Methods*. – 2003a. – V.272(1-2). – P.1-10.
101. Kobayashi, N. Monoclonal anti-idiotypic antibodies recognizing the variable region of a high-affinity antibody against 11-deoxycortisol. Production, characterization and application to a sensitive noncompetitive immunoassay / N. Kobayashi, K. Shibusawa, K. Kubota, N. Hasegawa, P. Sun, T. Niwa, J. Goto // *J Immunol Methods*. – 2003b. – V.274(1-2). – P.63-75.
 102. Kobayashi, N. Immunoenzymometric assay for a small molecule, 11-deoxycortisol, with attomole-range sensitivity employing an scFv-enzyme fusion protein and anti-idiotypic antibodies / N. Kobayashi, K. Iwakami, S. Kotoshiba, T. Niwa, Y. Kato, N. Mano, J. Goto // *Anal Chem*. – 2006. – V.78(7). – P.2244-2253.
 103. Kwack, S.J. Correlation between DNA or protein adducts and benzo[a]pyrene diol epoxide I-triglyceride adduct detected in vitro and in vivo / S.J. Kwack, B.M. Lee // *Carcinogenesis*. – 2000. – V.21(4). – P.629-632.
 104. Laemmly U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmly // *Nature*. – 1970. – V.227. – P. 680-685.
 105. Lan, H. Anti-idiotypic antibody: A new strategy for the development of a growth hormone receptor antagonist / H. Lan, X. Zheng, M.A. Khan, S. Li // *Int J Biochem Cell Biol*. – 2015a. – V.68. – P.101-108.
 106. Lan, H.N. Development and Characterization of a Novel Anti-idiotypic Monoclonal Antibody to Growth Hormone, Which Can Mimic Physiological Functions of Growth Hormone in Primary Porcine Hepatocytes / H.N. Lan, H.L. Jiang, W. Li, T.C. Wu, P. Hong, Y.M. Li, H. Zhang, H.Z. Cui, X. Zheng // *Asian-Australas J Anim Sci*. – 2015b. – V.28(4). – P.573-583.
 107. Lan, H. Internal image anti-idiotypic antibody: A new strategy for the development a new category of prolactin receptor (PRLR) antagonist / H. Lan, P. Hong, R. Li, S. L, S. Anshan, S. Li, X. Zheng // *Mol Immunol*. – 2017. – V.87. – P.86-93.

108. Lawley, P.D. DNA as a target of alkylating carcinogens / P.D. Lawley // *Br Med Bull.* – 1980. – V.36(1). – P.19-24.
109. Lehr, R.E. Relationships of Quantum Mechanical Calculations, Relative Mutagenicity of Benzo[a]anthracene Diol Epoxides, and “Bay Region” Concept of Aromatic Hydrocarbon Carcinogenicity / R.E. Lehr, D.M. Jerina // *J. Toxicol. Environ. Health.* – 1977. – V.2. – P.1259–1265.
110. Lim, S.Y. The Molecular Engineering of an Anti-Idiotypic Antibody for Pharmacokinetic Analysis of a Fully Human Anti-Infective / S.Y. Lim, C.E. Chan, M.M. Lisowska, B.J. Hanson, P.A. MacAry // *PLoS One.* – 2015. – V.10(12). – P.1-15.
111. Liners, F. Production and characterization of a phage-display recombinant antibody against carrageenans: evidence for the recognition of a secondary structure of carrageenan chains present in red algae tissues / F. Liners, W. Helbert, P. Van Cutsem // *Glycobiology.* – 2005. – V.15(9). – P.849-860.
112. Liu, Y. Formation of adenine-N3/guanine-N7 cross-link in the reaction of trans-oriented platinum substrates with dinucleotides / Y. Liu, J. Vinje, C. Pacifico, G. Natile, E. Sletten // *J Am Chem Soc.* – 2002. – V.124(43). – P.12854-12862.
113. Loeb, L.A. Cancer cells exhibit a mutator phenotype / L.A. Loeb // *Adv Cancer Res.* – 1998. – V.72 – P.25-56.
114. Lossos, I.S. The inference of antigen selection on Ig genes / I.S. Lossos, R. Tibshirani, B. Narasimhan, R. Levy // *J. Immunol.* – 2000. – V.165. – P.5122-5126.
115. Lutzky, J. Antibody-based vaccines for the treatment of melanoma / J. Lutzky, A.M. Gonzalez-Angulo, J.A. Orzano // *Semin Oncol.* – 2002. – V.29(5). – P.462-470.
116. Maitre, A. Exporisq-HAP database: 20 years of monitoring French occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures and identification of exposure determinants / A. Maitre, P. Petit, M. Marques, C. Hervé, S. Montlevier, R. Persoons, D.J. Bicout // *Int J Hyg Environ Health.* – 2018. – V.221(2). – P.334-346.

117. Maragos, C.M. Production of anti-idiotypic antibodies for deoxynivalenol and their evaluation with three immunoassay platforms / C.M. Maragos // *Mycotoxin Res.* – 2014. – V.30(2). – P.103-111.
118. Mares, A. A direct non-competitive idiometric enzyme immunoassay for serum oestradiol / A. Mares, J. De Boever, J. Osher, S. Quiroga, G. Barnard, F. Kohen // *J Immunol Methods.* – 1995. – V.181(1). – P.83-90.
119. McCann, J. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals / J. McCann, E. Choi, E. Yamasaki, B.N. Ames // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1975. – V.72(12). – P.5135-5139.
120. Mehta, R. The potential for the use of cell proliferation and oncogene expression as intermediate markers during liver carcinogenesis / R. Mehta // *Cancer Lett.* – 1995. – V.93(1). – P.85-102.
121. Melnick, R.L. Implications for risk assessment of suggested nongenotoxic mechanisms of chemical carcinogenesis / R.L. Melnick, M.C. Kohn, C.J. Portier // *Environ Health Perspect.* – 1996. – V.104(1). – P.123-134.
122. Menshikov I. The idiotypic network in the regulation of autoimmunity: Theoretical and experimental studies / I. Menshikov, L. Beduleva, M. Frolov, N. Abisheva, T. Khramova, E. Stolyarova, K Fomina // *J Theor Biol.* – 2015. – V.375. – P.32-39.
123. Miller, K.P. Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons / K.P. Miller, K.S. Ramos // *Drug Metab Rev.* – 2001. – V.33(1). – P.1-35.
124. Mittelman, A. Human high molecular weight melanoma-associated antigen (HMW-MAA) mimicry by mouse anti-idiotypic monoclonal antibody MK2-23: induction of humoral anti-HMW-MAA immunity and prolongation of survival in patients with stage IV melanoma / A. Mittelman, Z.J. Chen, H. Yang, G.Y. Wong, S. Ferrone // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1992. – V.89(2). – P.466-470.
125. Mittelman, A. Kinetics of the immune response and regression of metastatic lesions following development of humoral anti-high molecular weight-melanoma associated antigen immunity in three patients with advanced malignant melanoma

- immunized with mouse antiidiotypic monoclonal antibody MK2-23 / A. Mittelman, Z.J. Chen, C.C. Liu, S. Hirai, S. Ferrone // *Cancer Res.* – 1994. – V.54(2). – P.415-421.
126. Mittelman, A. Human high molecular weight-melanoma associated antigen mimicry by mouse anti-idiotypic monoclonal antibody MK2-23: modulation of the immunogenicity in patients with malignant melanoma / A. Mittelman, G.Z. Chen, G.Y. Wong, C. Liu, S. Hirai, S. Ferrone // *Clin Cancer Res.* – 1995. – V.1(7). – P.705-713.
 127. Mizwar, A. PAH contamination in soils adjacent to a coal-transporting facility in Tapin district, south Kalimantan, Indonesia / A. Mizwar, Y. Trihadiningrum // *Arch Environ Contam Toxicol.* – 2015. – V.69(1). – P.62-68.
 128. Moolten, F.L. Reduction of respiratory tract binding of benzo[a]pyrene in mice by immunization / F. Moolten, N. Capparell, E. Boger // *J Natl Cancer Inst.* – 1978. – V.61(5). – P.1347-1349.
 129. Moolten, F.L. Protection of mice against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced skin tumors by immunization with a fluorinated analog of the carcinogen / F.L. Moolten, B. Schreiber, A. Rizzone, A.J. Weiss, E. Boger // *Cancer Res.* – 1981. – V.41(2). – P.425-429.
 130. Moulin, A. Structures of a pan-specific antagonist antibody complexed to different isoforms of TGF β reveal structural plasticity of antibody-antigen interactions / A. Moulin, M. Mathieu, C. Lawrence, R. Bigelow, M. Levine, C. Hamel, J.P. Marquette, J. Le Parc, C. Loux, P. Ferrari, C. Capdevila, J. Dumas, B. Dumas, A. Rak, J. Bird, H. Qiu, C.Q. Pan, T. Edmunds, R.R. Wei // *Protein Sci.* – 2014. – V.23(12). – P.1698-1707.
 131. Nagata, S. A new type sandwich immunoassay for microcystin: production of monoclonal antibodies specific to the immune complex formed by microcystin and an anti-microcystin monoclonal antibody / S. Nagata, T. Tsutsumi, F. Yoshida, Y. Ueno // *Nat Toxins.* – 1999. – V.7(2). – P.49-55.
 132. Newman, M.J. Detection and characterization of human serum antibodies to polycyclic aromatic hydrocarbon diol-epoxide DNA adducts / M.J. Newman,

- B.A. Light, A. Weston, D. Tollurud, J.L. Clark, D.L. Mann, J.P. Blackmon, C.C. Harris // *J Clin Invest.* – 1988. – V.82(1). – P.145-153.
133. Nissim, A. Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents / A. Nissim, H.R. Hoogenboom, I.M. Tomlinson, G. Flynn, C. Midgley, D. Lane, G. Winter // *EMBO J.* – 1994. – V.13. – P.692-698.
 134. Nowell, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations / P.C. Nowell // *Science.* – 1976. – V.194. – P.23-28.
 135. Oliveria, P.A. Chemical carcinogenesis / P.A. Oliveira, A. Colaço, R. Chaves, H. Guedes-Pinto, L.F. De-La-Cruz P, C. Lopes // *An Acad Bras Cienc.* – 2007. – V.79(4). – P.593-616.
 136. Ovrebo, S. Evaluation of biomarkers in plasma, blood, and urine samples from coke oven workers: significance of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons / S. Ovrebo, A. Haugen, P.B. Farmer, D. Anderson // *Occup Environ Med.* – 1995. – V.52(11). – P.750-756.
 137. Pan, Y. Anti-idiotypic antibodies: biological function and structural studies / Y. Pan, S.C. Yuhasz, L.M. Amzel // *FASEB J.* – 1995. – V.9(1). – P.43-49.
 138. Parhami-Seren, B. Structural characterization of H chain-associated idiotypes of anti-p-azophenylarsonate monoclonal antibodies / B. Parhami-Seren, J. Sharon, M.N. Margolies // *J Immunol.* – 1990. – V.144(11). – P.4426-4433.
 139. Park, H. A Novel Adaptive Penalized Logistic Regression for Uncovering Biomarker Associated with Anti-Cancer Drug Sensitivity / H. Park, Y. Shiraishi, S. Imoto, S. Miyano // *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform.* – 2017. – V.14(4). – P.771-782.
 140. Pasquali, J.L. Mapping of four light chain-associated idiotypes of a human monoclonal rheumatoid factor / J.L. Pasquali, A.M. Knapp, A. Farradji, A. Weryha // *J Immunol.* – 1987. – V.139(3). – P.818-823.
 141. Pastorelli, R. Benzo(a)pyrene diolepoxide adducts to albumin in workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons: association with specific CYP1A1, GSTM1, GSTP1 and EHPX genotypes / R. Pastorelli, A. Cerri, M. Rozio, M.

- Dell'Omo, G. Muzi, G. Abbritti, R. Fanelli, L. Airoidi // *Biomarkers*. – 2001. – V.6(5). – P.357-374.
142. Pauk, N. The relevance of monitoring of antibodies against the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and PAH-DNA adducts in serum in relation to lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) / N. Pauk, S. Klimesova, J. Kara, J. Topinka, J. Labaj // *Neoplasma*. – 2013. – V.60(2). – P.182-187.
 143. Peck, R.M. Inhibition of chemically induced neoplasia by immunization with antigenic carcinogen-protein conjugate / R.M. Peck, E.B. Peck // *Cancer Res*. – 1971. – V.31(11). – P.1550-1554.
 144. Perera, F.P. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in white blood cells of foundry workers / F.P. Perera, K. Hemminki, T.L. Young, D. Brenner, G. Kelly, R.M. Santella // *Cancer Res*. – 1988. – V.48(8). – P.2288-2291.
 145. Perez, A. A monoclonal antibody against NeuGc-containing gangliosides contains a regulatory idiotope involved in the interaction with B and T cells / A. Perez, E.S. Mier, N.S. Vispo, A.M. Vazquez, R. Perez Rodríguez // *Mol Immunol*. – 2002. – V.39(1-2). – P.103-112.
 146. Petruzzelli, S. Serum antibodies to benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in the general population: effects of air pollution, tobacco smoking, and family history of lung diseases / S. Petruzzelli, A. Celi, N. Pulerà, F. Baliva, G. Viegì, L. Carrozzi, G. Ciacchini, M. Bottai, F. Di Pede, P. Paoletti, C. Giuntini // *Cancer Res*. – 1998. – V.58(18). – P.4122-4126.
 147. Pitot, H.C. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis / H.C. Pitot, Y.P. Dragan // *FASEB J*. – 1991. – V.5(9). – P.2280-2286.
 148. Potter, M. Indomethacin inhibition of pristane plasmacytomagenesis in genetically susceptible inbred mice / M. Potter // *Adv Exp Med Biol*. – 1999. – V.469. – P.151-156.

149. Pouns, O. Circulating antibodies directed against "polycyclic aromatic hydrocarbon-like" structures in the sera of cancer patients / O. Pouns, A. Mangas, R. Coveñas, M. Geffard // *Cancer Epidemiol.* – 2009. – V.33(1). – P.3-8.
150. Pritchard-Jones, K. Immune responses to the 105AD7 human anti-idiotypic vaccine after intensive chemotherapy, for osteosarcoma / K. Pritchard-Jones, I. Spendlove, C. Wilton, J. Whelan, S. Weeden, I. Lewis, J. Hale, C. Douglas, C. Pagonis, B. Campbell, P. Alvarez, G. Halbert, L.G. Durrant // *Br J Cancer.* – 2005. – V.92(8). – P.1358-1365.
151. Puccetti, A. Human and murine anti-DNA antibodies induce the production of anti-idiotypic antibodies with autoantigen-binding properties (epibodies) through immune-network interactions / A. Puccetti, P. Migliorini, J. Sabbaga, M.P. Madaio // *J Immunol.* – 1990. – V.145(12). – P.4229-4237.
152. Pulerà, N. Presence and persistence of serum anti-benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct antibodies in smokers: effects of smoking reduction and cessation / N. Pulerà, S. Petruzzelli, A. Celi, R. Puntoni, E. Fornai, U. Säwe, P. Paoletti, C. Giuntini // *Int J Cancer.* – 1997. – V.70(2). – P.145-149.
153. Quaife, S.L. Smokers' interest in a lung cancer screening programme: a national survey in England / S.L. Quaife, C. Vrinten, M. Ruparel, S.M. Janes, R.J. Beeken, J. Waller, A. McEwen // *BMC Cancer.* – 2018. – V.18(1). – P.497.
154. Raats, J. Generating recombinant anti-idiotypic antibodies for the detection of haptens in solution / J. Raats, N. van Bree, J. van Woezik, G. Pruijn // *J Immunoassay Immunochem.* – 2003. – V.24(2). – P.115-146.
155. Ragin, A.D. A gas chromatography-isotope dilution high-resolution mass spectrometry method for quantification of isomeric benzo[a]pyrene diol epoxide hemoglobin adducts in humans / A.D. Ragin, K.E. Crawford, A.A. Etheredge, J. Grainger, D.G. Patterson Jr // *J Anal Toxicol.* – 2008. – V.32(9). – P.728-736.
156. Ramos, A.S. The idotype (Id) cascade in mice elicited the production of anti-R24 Id and anti-anti-Id monoclonal antibodies with antitumor and protective activity against human melanoma / A.S. Ramos, C.B. Parise, L.R. Travassos, S.W. Han,

- P.O. de Campos-Lima, J.Z. de Moraes // *Cancer Sci.* – 2011. – V.102(1). – P.64-70.
157. Raychaudhuri, S. Tumor-specific idiotypic vaccines. II. Analysis of the tumor-related network response induced by the tumor and by internal image antigens (Ab2 beta) / S. Raychaudhuri, Y. Saeki, J.J. Chen, H. Iribe, H. Fuji, H. Kohler // *J Immunol.* – 1987. – V.139(1). – P.271-278.
 158. Richter, P.H. A network theory of the immune system / P.H. Richter // *Eur J Immunol.* – 1975. – V.5(5). – P.350-354.
 159. Rodriguez, J. Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers / J. Rodriguez, J. Frigola, E. Vendrell, R.A. Risques, M.F. Fraga, C. Morales, V. Moreno, M. Esteller, G. Capellà, M. Ribas, M.A. Peinado // *Cancer Res.* – 2006. – V.66(17). – P.8462-9468.
 160. Rogers, S.W. Natural Attenuation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Contaminated Sites: Review / S.W. Rogers, S.K. Ong, B.H. Kjartanson, J. Golchin, G. Stenback // *Practice Periodical of Hazardous Toxic and Radioactive Waste Management.* – 2002. – V.6(3). – P.141-155.
 161. Ruiz, P.J. Idiotypic immunization induces immunity to mutated p53 and tumor rejection / P.J. Ruiz, R. Wolkowicz, A. Waisman, D.L. Hirschberg, P. Carmi, N. Erez, H. Garren, J. Herkel, M. Karpuj, L. Steinman, V. Rotter, I.R. Cohen // *Nat Med.* – 1998. – V.4(6) – P.710-712.
 162. Saeki, Y. Idiotypic intramolecular help. Induction of tumor-specific antibodies by monoclonal anti-idiotypic antibody with the help of Fc-specific T helper clones / Y. Saeki, J.J. Chen, L.F. Shi, H. Kohler // *J Immunol.* – 1989. – V.142(8). – P.2629-2634.
 163. Sanches, Jde.S. Anti-bevacizumab idiotypic antibody vaccination is effective in inducing vascular endothelial growth factor-binding response, impairing tumor outgrowth / J.S. de Sanches, R.B. de Aguiar, C.B. Parise, J.M. Suzuki, R. Chammas, J.Z. de Moraes // *Cancer Sci.* – 2016. – V.107(4). – P.551-555.

164. Santella, R.M. Monoclonal antibodies to DNA modified by a benzo[a]pyrene diol epoxide / R.M. Santella, C.D. Lin, W.L. Cleveland, I.B. Weinstein // *Carcinogenesis*. – 1984. – V.5(3). – P.373-377.
165. Santella, R.M. Immunologic quantification of carcinogen-DNA adducts / R.M. Santella, L.L. Hsieh, F. Perera // *Basic Life Sci.* – 1986. – V.38. – P.509-517.
166. Santella, R.M. DNA adducts, DNA repair genotype/phenotype and cancer risk / R.M. Santella, M. Gammon, M. Terry, R. Senie, J. Shen, D. Kennedy, M. Agrawal, B. Faraglia, F. Zhang // *Mutat Res.* – 2005. – V.592(1-2). – P.29-35.
167. Schellenberger, M.T. Modulation of benzo[a]pyrene induced immunotoxicity in mice actively immunized with a B[a]P-diphtheria toxoid conjugate / M.T. Schellenberger, N. Grova, S. Willième, S. Farinelle, E.J. Prodhomme, C.P. Muller // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2009. – V.240(1). – P.37-45.
168. Schellenberger, M.T. Evaluation of adjuvants for a candidate conjugate vaccine against benzo[a]pyrene / M.T. Schellenberger, S. Farinelle, S. Willième, C.P. Muller // *Hum Vaccin.* – 2011. – V.7. – P.166-173.
169. Schulz, K. Electrochemical Biochip Assays Based on Anti-idiotypic Antibodies for Rapid and Automated On-Site Detection of Low Molecular Weight Toxins / K. Schulz, C. Pöhlmann, R. Dietrich, E. Märklbauer, T. Elßner // *Front Chem.* – 2019. – V.7(31). – P.1-12.
170. Shacter, E. Chronic inflammation and cancer / E. Shacter, S.A. Weitzman // *Oncology (Williston Park)*. – 2002. – V.16(2). – P.217-226.
171. Shimada, T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons / T. Shimada // *Drug Metab Pharmacokinet.* – 2006. – V.21(4). – P.257-276.
172. Silbart, L.K. Reduction of intestinal carcinogen absorption by carcinogen-specific secretory immunity / L.K. Silbart, D.F. Keren // *Science*. – 1989. – V.243(4897). – P.1462-1464.
173. Slaga, T.J. Effects of tumor promoters and steroidal anti-inflammatory agents on skin of newborn mice in vivo and in vitro / T.J. Slaga, U. Lichti, H. Hennings, K. Elgjo, S.H. Yuspa // *J Natl Cancer Inst.* – 1978. – V.60(2). – P.425-431.

174. Song, J. Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer / J. Song, J.H. Noh, J.H. Lee, J.W. Eun, Y.M. Ahn, S.Y. Kim, S.H. Lee, W.S. Park, N.J. Yoo, J.Y. Lee, S.W. Nam // *APMIS*. – 2005. – V.113(4). – P.264-268.
175. Souza, E.B. B and T cell responses elicited by monoclonal anti-idiotypic antibody (Ab2beta) mimicking gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* / E.B. Souza, J.D. Lopes, S.R. Almeida // *Clin Exp Immunol*. – 2004. – V.137(1). – P.123-128.
176. Spendlove, L. A therapeutic human anti-idiotypic antibody mimics CD55 in three distinct regions / L. Spendlove, L. Li, V. Potter, D. Christiansen, B.E. Loveland, L.G. Durrant // *Eur J Immunol*. – 2000. – V.30(10). – P.2944-2953.
177. Srogi, K. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review / K. Srogi // *Environ Chem Lett*. – 2007. – V.5(4). – P.169-195.
178. Stenbäck, F. Initiation and promotion at different ages and doses in 2200 mice. I. Methods, and the apparent persistence of initiated cells / F. Stenbäck, R. Peto, P. Shubik // *Br J Cancer*. – 1981. – V.44(1). – P.1-14.
179. Tang, Z.M. Serum tumor-associated autoantibodies as diagnostic biomarkers for lung cancer: A systematic review and meta-analysis / Z.M. Tang, Z.G. Ling, C.M. Wang, Y.B. Wu, J.L. Kong // *PLoS One* – 2017 – V.12(7). – P.1-21.
180. Tierney, B. Immunoaffinity chromatography of carcinogen DNA adducts with polyclonal antibodies directed against benzo[a]pyrene diol-epoxide-DNA / B. Tierney, A. Benson, R.C. Garner // *J Natl Cancer Inst*. – 1986. – V.77(1). – P.261-267.
181. Tiwari, M. Distribution of PAHs in different compartment of creek ecosystem: Ecotoxicological concern and human health risk / M. Tiwari, S.K. Sahu, G.G. Pandit // *Environ Toxicol Pharmacol*. – 2017. – V.50. – P.58-66.
182. Tompa, A. Benzo[alpha]pyrene antibody inhibition of benzo[alpha]pyrene-induced mutagenesis / A. Tompa, G. Curtis, W. Ryan, C. Kuszynski, R. Langenbach // *Cancer Lett*. – 1979. – V.7(2-3). – P.163-169.

183. Trosko, J.E. Commentary: is the concept of "tumor promotion" a useful paradigm? / J.E. Trosko // *Mol Carcinog.* – 2001. – V.30(3). – P.131-137.
184. Trosko, J.E. The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis / J.E. Trosko // *J Biochem Mol Biol.* – 2003. – P.36(1). – P.43-48.
185. Tyumentseva, M.A. Presence of aberrant VH6 domains in anti-interferon- γ autoantibodies in multiple sclerosis / M.A. Tyumentseva, V.V. Morozova, L.R. Lebedev, I.V. Babkin, N.V. Tikunova // *Hum Antibodies.* – 2013. – V.22(1-2). – P.31-49.
186. Uduman, M. Detecting selection in immunoglobulin sequences / M. Uduman, G. Yaari, U. Hershberg, J.A. Stern, M.J. Shlomchik, S.H. Kleinstein // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – V.39. – P.499-504.
187. Ullenhag, G.J. T-cell responses in osteosarcoma patients vaccinated with an anti-idiotypic antibody, 105AD7, mimicking CD55 / G.J. Ullenhag, I. Spendlove, N.F. Watson, C. Kallmeyer, K. Pritchard-Jones, L.G. Durrant // *Clin Immunol.* – 2008. – V.128(2). – P.148-154.
188. Ustinov, V.A. Antibodies against benzo[a]pyrene in immunized mouse and in lung cancer patients / V.A. Ustinov, V.A. Matveeva, M.A. Kostyanko, A.N. Glushkov // *Exp Oncol.* – 2013. – V.35(3). – P.207-210.
189. Ustinov, V.A. Purification and Characterization of Mouse Single-Chain Antibody Against Polycyclic Aromatic Hydrocarbons / V.A. Ustinov, A.V. Averjanov, A.N. Glushkov // *J Immunoassay Immunochem.* – 2014. – V.35(4). – P.428-441.
190. Van Schooten, F.J. The binding efficiency of polyclonal and monoclonal antibodies to DNA modified with benzo[a]pyrene diol epoxide is dependent on the level of modification. Implications for quantitation of benzo[a]pyrene-DNA adducts in vivo / F.J. Van Schooten, E. Kriek, M.J. Steenwinkel, H.P. Noteborn, M.J. Hillebrand, F.E. Van Leeuwen // *Carcinogenesis.* – 1987. – V.8(9). – P.263-269.
191. Verdina, A. Induction of humoral immunity toward 2-acetylaminofluorene in mice: modulation of DNA binding after 4 weeks dietary exposure to the

- carcinogen / A. Verdina, R. Zito, G. Cortese, P. Leopardi, F. Marcon, A. Zijno, R. Crebelli // *Carcinogenesis*. – 1996a. – V.17(8). – P.1705-1709.
192. Verdina, Modulation of DNA binding in vivo by specific humoral immunological response: a novel host factor in environmental carcinogenesis / A. Verdina, R. Zito, G. Cortese, A. Zijno, R. Crebelli. // *Environ Health Perspect.* – 1996b. – V.104(3). – P.679-82.
 193. Wang, H. Association between plasma BPDE-Alb adduct concentrations and DNA damage of peripheral blood lymphocytes among coke oven workers / H. Wang, W. Chen, H. Zheng, L. Guo, H. Liang, X. Yang, Y. Bai, J. Sun, Y. Su, Y. Chen, J. Yuan, Y. Bi, Q. Wei, T. Wu // *Occup Environ Med.* – 2007. – V.64(11). – P.753-758.
 194. Wang, J.J. Induction of protective and therapeutic anti-cancer immunity by using bispecific anti-idiotypic antibody G22-I50 for nasopharyngeal carcinoma / J.J. Wang, Y.H. Liu, G.C. Li // *Int Immunopharmacol.* – 2015. – V.28(2). – P.1026-1033.
 195. Weisburger, J.H. Worldwide prevention of cancer and other chronic diseases based on knowledge of mechanisms / J.H. Weisburger // *Mutat Res.* – 1998. – V.402(1-2). – P.331-337.
 196. Weitkamp, J.H. Infant and adult human B cell responses to rotavirus share common immunodominant variable gene repertoires / J.H. Weitkamp, N. Kallewaard, K. Kusuhara, E. Bures, J.V. Williams, B. LaFleur, H.B. Greenberg, J.E. Jr Crowe // *J Immunol.* – 2003. – V.171(9). – P.4680-4688.
 197. Westerink, M.A. Development and characterization of an anti-idiotypic antibody to the capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C / M.A. Westerink, A.A. Campagnari, M.A. Wirth, M.A. Apicella // *Infect Immun.* – 1988. – V.56(5). – P.1120-1127.
 198. White Jr, K.L. Direct suppression of in vitro antibody production by mouse spleen cells by the carcinogen benzo(a)pyrene but not by the noncarcinogenic congener benzo(e)pyrene / K.L. Jr White, M.P. Holsapple // *Cancer Res.* – 1984. – V.44(8). – P.3388-3393.

199. Williams, G.M. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment / G.M. Williams // *Toxicology*. – 2001. – V.166(1-2). – P.3-10.
200. Yaari, G. Quantifying selection in high-throughput Immunoglobulin sequencing data sets / G. Yaari, M. Uduman, S.H. Kleinstein // *Nucleic Acids Res.* – 2012 – V.40(17). – P.1-10.
201. Yang, P. CpG site-specific hypermethylation of p16INK4 α in peripheral blood lymphocytes of PAH-exposed workers / P. Yang, J. Ma, B. Zhang, H. Duan, Z. He, J. Zeng, X. Zeng, D. Li, Q. Wang, Y. Xiao, C. Liu, Q. Xiao, L. Chen, X. Zhu, X. Xing, Z. Li, S. Zhang, Z. Zhang, L. Ma, E. Wang, Z. Zhuang, Y. Zheng, W. Chen // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2012. – V.21(1). – P.182-190.
202. Young, J. A novel immunoassay to measure total serum lymphotoxin- α levels in the presence of an anti-LT α therapeutic antibody / J. Young, A. Nguyen, Z.J. Qiu, Y. Ying, X. Gao, C. Reed, A. Chuntharapai, R. Deng, J. Lutman, J. Grogan, W.L. Wong, L. DeForge // *J Immunol Methods*. – 2015. – V.424. – P.91-99.
203. Young, N.M. Molecular basis for the lack of mimicry of Brucella polysaccharide antigens by Ab2gamma antibodies / N.M. Young, M.A. Gidney, B.M. Gudmundsson, C.R. MacKenzie, R. To, D.C. Watson, D.R. Bundle // *Mol Immunol*. – 1999. – V.36(6). – P.339-347.
204. Yu, F.Y. Production and Characterization of a Monoclonal Anti-anti-idiotypic Antibody against Fumonisin B1 / F.Y. Yu, F.S. Chu // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1999. – V.47(11). – P.4815-4820.
205. Yuspa, S.H. Organ specificity and tumor promotion / S.H. Yuspa, H. Hennings, U. Lichti, M. Kulesz-Martin // *Basic Life Sci.* – 1983. – V.24. – P.157-171.
206. Yuspa, S.H. Chemical carcinogenesis: from animal models to molecular models in one decade / S.H. Yuspa, M.C. Poirier // *Adv Cancer Res.* – 1988. – V.50. – P.25-70.
207. Zhang, C. Urine Proteome Profiling Predicts Lung Cancer from Control Cases and Other Tumors / C. Zhang, W. Leng, C. Sun, T. Lu, Z. Chen, X. Men, Y. Wang, G. Wang, B. Zhen, J. Qin // *EBioMedicine*. – 2018. – V.30. – P.120-128.

208. Zhang, S. Concentration, distribution and source apportionment of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in the southeast suburb of Beijing, China / S. Zhang, W. Zhang, K. Wang, Y. Shen, L. Hu, X. Wang // *Environ Monit Assess.* – 2009. – V.151(1-4). – P.197-207.
209. Zhao, Q. Generation of anti-idiotypic scFv for pharmacokinetic measurement in lymphoma patients treated with chimera anti-CD22 antibody SM03 / Q. Zhao, P.F. Wong, S.S. Lee, S.O. Leung, W.T. Cheung, J.Z. Wang // *PLoS One.* – 2014. – V.9(5):e96697. – P.1-13.