

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

КОМПАНЕЕЦ ИВАН ЮРЬЕВИЧ

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы

Гидролитические активности иммуноглобулинов классов G и A
молока человека

Направление подготовки 06.06.01 Биологические науки
Направленность 03.01.04 Биохимия

Аспирант _____ И.Ю. Компанец
Научный руководитель _____ д.х.н. проф. Г.А. Невинский

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в лаборатории ферментов репарации ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия.

Научный руководитель: **Невинский Георгий Александрович**, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией ферментов репарации Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Иммуноглобулины (антитела) – это гликопротеины, специфически узнающие и связывающие антигены. Они содержатся в плазме крови, молоке и тканевой жидкости у всех позвоночных. Иммуноглобулины способны эффективно связывать практически любые природные и искусственно синтезированные молекулы (антигены) [1]. Для обеспечения защитной функции распознавания чужеродных молекул, иммуноглобулины одного и того же организма обладают большой вариабельностью (10^8 – 10^{10} различных вариантов антигенсвязывающих центров). Подобное структурное разнообразие обеспечивается многочисленными рекомбинациями генов, кодирующих легкие и тяжелые цепи [2].

В молоке человека присутствуют иммуноглобулины 5 классов: А, G, M, E, D, секретируемые плазматическими клетками. Основную часть антител молока человека составляют sIgA (90–95% от общего количества иммуноглобулинов молока). Содержание IgM в молоке составляет 2–5%, IgG около 1% [3, 4].

Иммуноглобулины разных классов в молоке обладают различными функциями. IgG активно транспортируются от матери к плоду через плаценту, а также способны проникать из молока в кровь через гастроэнтерологический тракт. IgG обладают антиоксидескими и опсонизирующими свойствами. sIgA не способны проникать через кишечник в кровь и обеспечивают местную защиту слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта младенца [1]. Иммуноглобулины данного класса способны агглютинировать патогены и ингибировать проникновение чужеродного антигена сквозь слизистую оболочку. sIgA содержат секреторный компонент, который защищает эти иммуноглобулины от действия протеаз, вследствие чего они могут находиться в кишечнике значительное время неповрежденными. IgM отводится основная роль в иммунорегуляторных процессах. В первые месяцы жизни новорожденного иммунная система развита недостаточно, поэтому защиту младенца от различных инфекционных агентов во многом обеспечивают иммуноглобулины материнского молока [2, 5].

Кроме классических (канонических) функций, таких как связывание антигена и активация комплемента, иммуноглобулины молока обладают также неканоническими свойствами. Наиболее важным и изученным из них является способность иммуноглобулинов катализировать различные химические реакции. Каталитически активные иммуноглобулины принято называть абзимами (abzyme от AntiBody и enZYME) [6, 7].

Принципиальную возможность существования абзимов впервые обосновал в 1948 году Л. Полинг, который обнаружил общие механизмы образования переходного состояния ферментативной реакции и узнавания антигена антителом [8]. Первые каталитически активные антитела против стабильных аналогов переходных состояний были получены в 1986 году А. Трамонтано и С. Поллаком [9, 10]. К настоящему времени с использованием указанного подхода получены искусственные абзимы, способные катализировать большое количество химических реакций [11, 12, 13].

Первые природные абзимы открыл С. Пол в 1989 году [14]. Это были IgG, гидролизующие вазоактивный нейропептид (VIP). Затем были открыты антитела с ДНКазной и РНКазной активностями у больных системной красной волчанкой. В настоящее время антитела с различными активностями (нуклеазными, протеолитическими, оксидоредуктазными) найдены в крови пациентов с аутоиммунными и вирусными заболеваниями: системной красной волчанкой, рассеянным склерозом, бронхиальной астмой, тиреоидитом Хашимото, полиартритом, сахарным диабетом 1 типа, вирусным гепатитом, ВИЧ-инфекцией, клещевым энцефалитом СПИДом, а также некоторыми инфекционными заболеваниями [5, 12, 15].

Эти результаты позволяют прийти к заключению, что наличие в крови иммуноглобулинов с каталитическими активностями является признаком протекания в организме аутоиммунных процессов. Иммуноглобулины крови здоровых доноров, а также пациентов, больных гриппом, пневмонией, туберкулезом, тонзиллитом, язвой 12 перстной кишки не проявляли каталитической активности, что, по-видимому, объясняется несущественными нарушениями иммунной системы [12, 13].

Кроме пациентов с указанными выше аутоиммунными патологиями, абзимы обнаружены в крови беременных, а также в крови и молоке кормящих женщин. Иммунный статус лактирующих женщин близок к аутоиммунному. Аналогично крови больных аутоиммунными заболеваниями, в крови беременных женщин в повышенных концентрациях содержатся ДНК и клетки плода [16]. Во время беременности иммунная система женщины претерпевает существенные изменения. Иммунная система “запоминает” всю информацию о вредных факторах окружающей среды. В дальнейшем эта информация используется по время лактации. В молоко секретируются иммуноглобулины против тех патогенов, с которыми женщина контактировала во время беременности [17].

В молоке человека содержатся каталитически активные антитела, обладающие широким спектром ферментативных активностей. Абзимы молока катализируют реакции гидролиза различных субстратов: ДНК, РНК, нуклеотидов и белков. Также в молоке

обнаружены абзимы, катализирующие не только реакции гидролиза, а также реакцию синтеза. Описаны антитела молока, катализирующие фосфорилирование более 15 белков молока, а также иммуноглобулины, фосфорилирующие минорные липиды и полисахариды [17, 18].

Биологическая роль каталитических активностей молочных абзимов до сих пор остается неустановленной. Учитывая важнейшую роль иммуноглобулинов молока в защите новорожденного от патогенов, можно предположить, что ферментативные функции антител молока расширяют возможности в борьбе с инфекционными агентами, гидролизуя их нуклеиновые кислоты и белки. Учитывая это, детальное изучение гидролитических функций антител молока представляет несомненный интерес.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является исследование протеолитической и нуклеазных активностей иммуноглобулинов молока человека.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить гомогенные препараты IgG и sIgA из молока человека, доказать, что препараты антител обладают гистон-, ОБМ- и РНК-гидролизующими активностями.
2. Детально исследовать специфичность протеолитической активности препаратов анти-гистон и анти-ОБМ sIgA при гидролизе гистонов и основного белка миелина.
3. Изучить особенности реакций гидролиза различных РНК, в том числе микроРНК, абзимами IgG и sIgA.

Научная новизна

В работе впервые показана способность молочных абзимов гидролизовать белковые субстраты: гистоны и основной белок миелина. Показана перекрестная реактивность в реакции гидролиза этих субстратов иммуноглобулинами sIgA против ОБМ и sIgA против суммарных гистонов. Проведен анализ субстратной специфичности гидролиза антителами молока субстратов – олигорибонуклеотидов с различными первичной и вторичной структурами.

Теоретическая и практическая значимость

Исследованы реакции гидролиза белков-субстратов (5 гистонов и основной белок миелина), ДНК (pBluescript) и РНК (гомоолигорибонуклеотиды и микроРНК). Аффинной хроматографией на ОБМ- и гистон-сепарозе выделены sIgA против ОБМ и sIgA против гистонов. С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа обнаружена каталитическая перекрестная реактивность гидролиза основного белка миелина и гистонов антителами sIgA против ОБМ и против гистонов.

Апробация работы. Публикации

По результатам настоящего исследования опубликовано 9 работ, из них 3 статьи в зарубежных журналах, 1 статья отправлена в печать; и 5 тезисов конференций:

1. Kompaneets I.Y., Ermakov E.A., Sedykh S.E., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Secretory immunoglobulin A from human milk hydrolyzes microRNA // Journal of Dairy Science. – 2020. – V. 103. – № 8. – P. 6782–6797.
2. Kompaneets I.Y., Ermakov E.A., Sedykh S.E., Buneva V.N., Nevinsky G.A. IgGs from Human Milk Hydrolyze microRNAs // Molecules. – 2020. – V. 25. – № 10. – E2366.
3. Nevinsky G.A., Zakharova O., Kompaneets I.Y., Timofeeva A.M., Dmitrenok P.S., Menzorova N.I. Six catalytic activities and cytotoxicity of immunoglobulin G and secretory immunoglobulin A from human milk // Journal of Dairy Science. – 2021. – V. 104. – № 6. – P. 1-18.
4. Kompaneets I.Y., Sedykh S.E., Buneva V.N., Dmitrenok P.S., Nevinsky G.A.. sIgAs from human milk hydrolyze five histones and myelin basic protein // Journal of Dairy Science. – 2021 (отправлено в печать)
5. Компанец И.Ю., Ермаков Е.А. Иммуноглобулины молока человека, гидролизующие микроРНК. Материалы XXI международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье». 2018, Санкт-Петербург. С. 204-205. (тезисы)
6. Компанец И.Ю., Седых С.Е. Невинский Г.А. Анализ состава микроРНК разных фракций молока человека. Материалы XXII международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье». 2019, Санкт-Петербург. С. 264. (тезисы)
7. Компанец И.Ю., Седых С.Е., Ермаков Е.А., Невинский Г.А. Антитела молока, гидролизующие микроРНК. II объединенный научный форум, VI съезд физиологов СНГ, VI съезд биохимиков России, IX российский симпозиум «белки и пептиды» (Сочи, Дагомыс, 1-6 октября 2019). Научные труды. Спецвыпуск АСТА NATURAE. Том 2. – М.: Издательство «Перо», 2019. – с.117 (тезисы)
8. Компанец И.Ю., Седых С.Е., Невинский Г.А. Иммуноглобулины молока человека с нуклеазными активностями. Вiotop 2020: актуальные вопросы современной биологии, международная научная конференция с элементами школы молодых ученых. 2020, Новосибирск. С.58. (тезисы)

9. Kompaneets I., Ermakov E., Sedykh S., Nevinsky G. Antibodies from human milk hydrolyze microRNAs. FEBS Open Bio. 2021. P122. (*тезисы*)

Вклад автора.

Основная часть работы выполнена автором самостоятельно. Автором получены гомогенные препараты суммарных IgG и sIgA из молочной плазмы человека. Из суммарных препаратов антител выделены анти-гистон и анти-ОБМ sIgA и проведен анализ гидролиза препаратов гистонов и основного белка миелина. Также автором проведены эксперименты по исследованию ДНКазной и РНКазной активностей иммуноглобулинов молока.

MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ выполнен сотрудником ТИБОХ ДВО РАН П. С. Дмитренко.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Выделение иммуноглобулинов IgG и sIgA из молока человека

Препараты IgG и sIgA получены из смеси семи препаратов молока здоровых по медицинским показаниям женщин на ранних стадиях лактации (первые 3 месяца). Молочную плазму наносили на соединенные последовательно колонки с сорбентами Protein G-Sepharose (с высоким сродством к IgG) и Protein A-Sepharose (с высоким сродством к IgG, IgA и sIgA). Иммуноглобулины элюировали с указанных колонок после их отсоединения с помощью 0,1 М раствором глицин-HCl, pH 2,6, оптическую плотность белка детектировали при длине волны 280 нм (рис. 1 и 2).

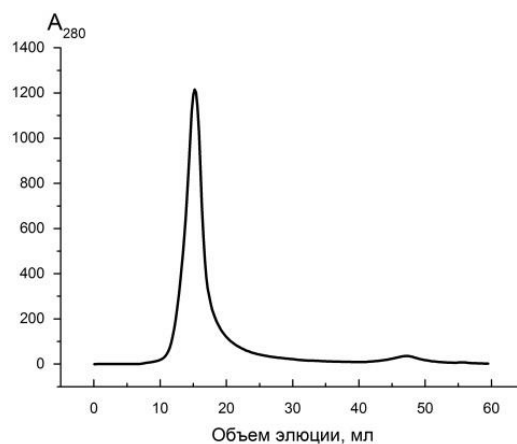
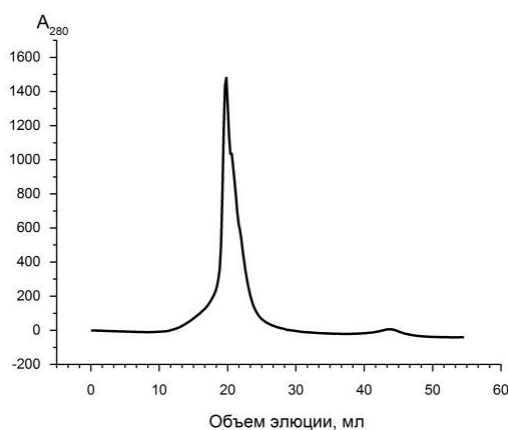


Рис. 1. Профиль аффинной хроматографии иммуноглобулинов молока человека на Protein G-Sepharose; (–) оптическая плотность, A_{280} . **Рис. 2.** Профиль аффинной хроматографии иммуноглобулинов молока человека на Protein A-Sepharose; (–) оптическая плотность, A_{280} .

Известно, что аффинная хроматография на Protein G-Sepharose не позволяет выделить все IgG, поэтому фракции, полученные хроматографией на Protein A-Sepharose, содержали как sIgA, так и небольшие примеси IgG. Учитывая это, необходимо было отделить примесь IgG от sIgA. Известно, что sIgA обладает большим сродством к ДЭАЭ-целлюлозе, чем IgG. На колонку с ДЭАЭ-целлюлозой наносили препараты антител, элюированные с Protein A-Sepharose. IgG элюировали при нанесении, а sIgA – 0–1 М градиентом концентрации NaCl в 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5. На рис. 3 представлен пример типичного профиля ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе препарата антител (АТ), полученного на Protein A-Sepharose.

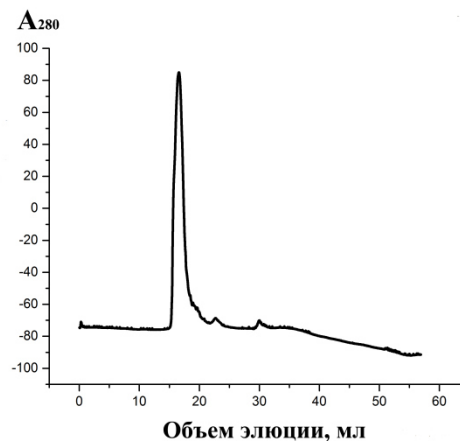
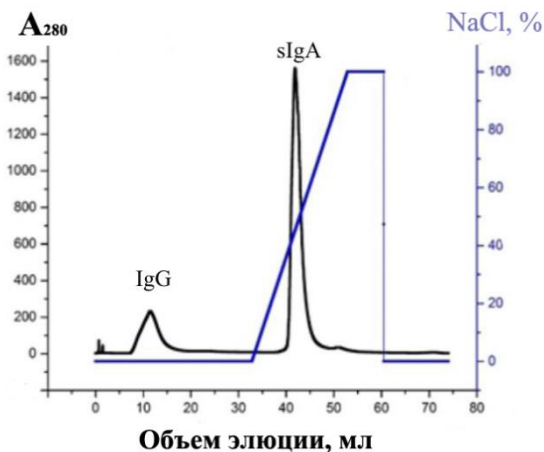


Рис. 3. Профиль ионообменной хроматографии фракций пика sIgA после выделения из молока иммуноглобулинов человека на Protein A-Sepharose (рис. 2) на ДЭАЭ целлюлозе. **Рис. 4.** Профиль гель-фильтрации молока человека на Superdex 200.

Препараты антител молока, выделенные на аффинных сорбентах и ионообменной хроматографией, дополнительно очищали от возможных примесей гель-фильтрацией на сорбенте Superdex 200 (рис. 4).

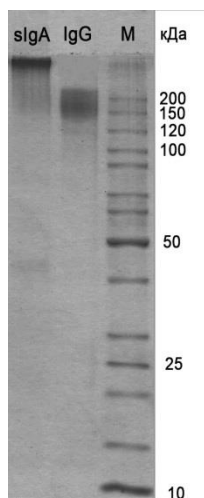


Рис. 5. Электрофоретический анализ фракций антител после гель-фильтрации в 4–18 % градиентном ПААГ. М – белковые маркеры с известной молекулярной массой. Окраска Coomassie Blue R-250.

Гомогенность полученных препаратов иммуноглобулинов проверена электрофоретическим анализом по методу Лэммли в 4–18 % градиентном ПААГ после окрашивания белков Coomassie Blue R-250. Как видно из рисунка 5, полученные препараты электрофоретически гомогенны. Препараты sIgA содержат две формы этих АТ: sIgA1 и sIgA2, последние не имеют дисульфидных мостиков и частично диссоциируют с образованием свободных цепей и их комплексов.

2. Анализ гистон- и ОБМ-гидролизующих активностей sIgA

В работе впервые проанализированы активности sIgA грудного молока в реакциях гидролиза ОБМ (основного белка миелина) и пяти гистонов: Н1, Н2А, Н2В, Н3 и Н4. На рисунке 6 представлены данные об относительном гидролизе смеси пяти гистонов семью индивидуальными препаратами sIgA. Процент гидролиза суммарных препаратов гистонов рассчитывали по снижению интенсивности полос белков после их инкубации с АТ по сравнению с контролем без sIgA. Активность разных препаратов sIgA в гидролизе гистонов существенно различалась, поэтому для получения достоверного результата инкубацию антител с гистонами для различных sIgA проводили различное время: от 1 до 24 ч. Затем относительная активность была пересчитана на время инкубации 1 ч (рис. 6). Принимая во внимание отсутствие нормального гауссовского распределения значений, определены не только их средние значения ($15,1 \pm 20,4\%$ за 1 ч инкубации), но также и значения медианы ($M = 4,9$) и межквартильных интервалов ($IQR = 1,4$).

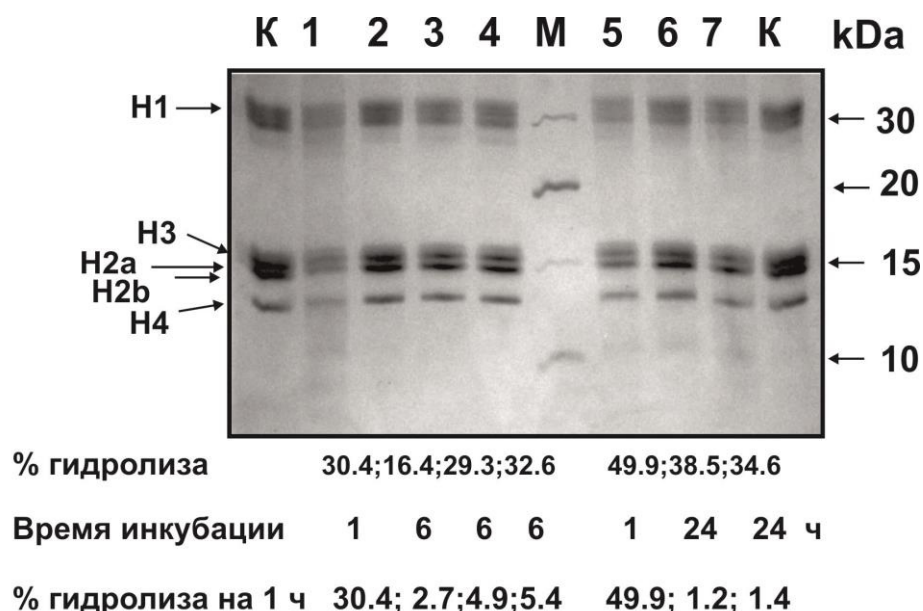


Рис. 6. Электрофоретический анализ относительной активности семи поликлональных sIgA в 15 % ПААГ при гидролизе смеси пяти гистонов (1 мг / мл). М – белковые маркеры с известной молекулярной массой. Окраска Coomassie Blue R-250. К – контроль (инкубация без АТ). Дорожки 1–7 – реакционные смеси, содержащие sIgA различных доноров.

К сожалению, электрофоретически гомогенные препараты ОБМ человека недоступны. Белковые препараты могут содержать несколько родственных форм (18,5, 17,5 и $\leq 14,0$ кДа), что объясняется процессами альтернативного сплайсинга и частичного гидролиза ОБМ в мозге разных людей [19]. На рисунке 7 представлен пример электрофореза продуктов гидролиза ОБМ семью препаратами sIgA. Дорожка К на рисунке 7 демонстрирует гетерогенность исходного препарата ОБМ, содержащего в основном

формы белка 14,5–18,5 кДа. После 5 ч инкубации с семью препаратами sIgA все формы ОБМ заметно уменьшались по сравнению с контролем (дорожка К). В отличие от гидролиза суммарных препаратов гистонов, все семь индивидуальных препаратов sIgA демонстрировали сопоставимую относительную активность при гидролизе ОБМ (3,3–10% в течение 1 ч; среднее значение $6,6 \pm 2,0\%$; медиана = 6,52, IQR = 5,86). Коэффициент корреляции между активностью семи sIgA в гидролизе пяти гистонов и ОБМ составляет 0,61. Полученные данные демонстрируют, что sIgA молока человека способны гидролизовать ОБМ и гистоны.

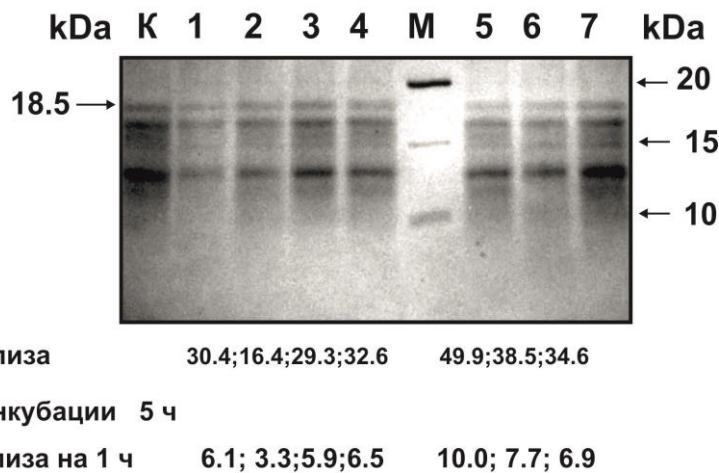


Рис. 7. Электрофоретический анализ относительной активности семи поликлональных sIgA в 15 % ПААГ при гидролизе ОБМ (1 мг / мл). Дорожки 1–7 – реакционные смеси, содержащие sIgA различных доноров. М – белковые маркеры с известной молекулярной массой. Окраска Coomassie Blue R-250. К – контроль (инкубация без АТ).

Чтобы доказать, что каталитическая активность является свойством иммуноглобулинов, разработан ряд общепринятых критериев [12, 13]. Одним из критериев, доказывающих, что протеазная активность принадлежит sIgA является совпадение профилей гель-фильтрации смеси sIgA_{mix} в кислых условиях («кислый шок»: при рН 2,6 происходит разрушение всех комплексов) с профилем каталитической активности полученных на гель-фильтрации фракций. На профиле гель-фильтрации отсутствуют пики других белков, а каталитическая активность определяется только во фракциях sIgA (рис. 8).

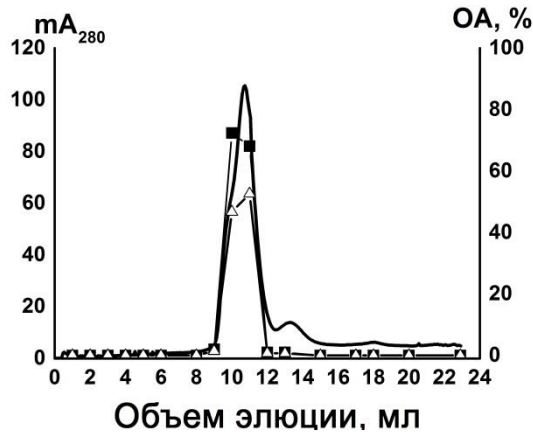


Рис. 8. Анализ протеолитической активности $sIgA_{mix}$ после гель-фильтрации FPLC (—) – $sIgA_{mix}$ *in situ*. а) Профиль относительной активности A_{280} ; относительная активность (%) $sIgA_{mix}$ в гидролизе смеси пяти гистонов (■) и гистонов (■) и ОБМ (Δ).

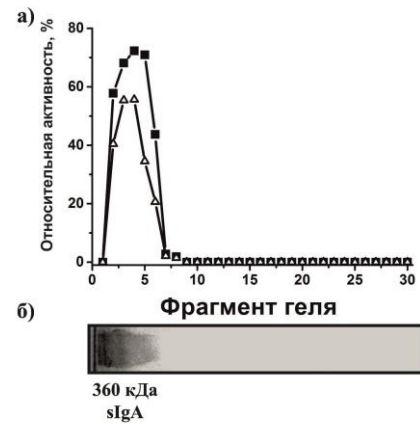


Рис. 9. Анализ протеолитической активности $sIgA_{mix}$ в гидролизе пяти гистонов (■) и гистонов (■) и ОБМ (Δ). б) фрагмент геля, определяющий положение интактного $sIgA_{mix}$; гель окрашен Coomassie R-250.

Самый строгий и достоверный критерий – анализ активности *in situ* применен для проверки, принадлежит ли выявленная протеолитическая активность абзимам $sIgA$, а не совместно выделенным каноническим протеазам (рис. 9). Ранее показано, что при выполнении этого критерия, выполняются и все остальные известные критерии доказательства принадлежности каталитической активности иммуноглобулинам [17, 18]. После электрофоретического разделения с помощью SDS-PAGE смеси препаратов $sIgA_{mix}$ и удаления из геля SDS гель разрезали на фрагменты шириной около 2 мм. Затем в элюированных из геля белках тестировали активность в реакциях гидролиза ОБМ и гистонов. Протеолитическая активность обнаружена после экстракции белков только из фрагментов геля, содержащих $sIgA_{mix}$ (рис. 9). Разрушение любых белковых комплексов с помощью SDS, тестирование протеазной активности в фрагментах геля, содержащих только интактные $sIgA_{mix}$ и отсутствие других пиков активностей – однозначное доказательство того, что ОБМ- и гистон-гидролизующие активности являются собственным свойством $sIgA_{mix}$.

Далее из исходных поликлональных препаратов $sIgA$ были получены препараты $sIgA$ против ОБМ и $sIgA$ против смеси из пяти гистонов. Так как относительное содержание таких абзимов в общем пуле $sIgA$ очень низкое, для получения анти-ОБМ и анти-гистоновых антител использованы смесь препаратов $sIgA$ нескольких доноров ($sIgA_{mix}$) и несколько аффинных хроматографий на ОБМ- и гистон-сефарозе.

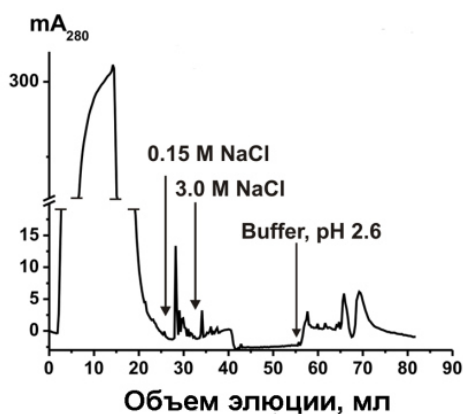


Рис. 10. Профиль аффинной хроматографии $sIgA_{mix}$ на ОБМ-сефарозе: (–) – оптическая плотность (A_{280}).

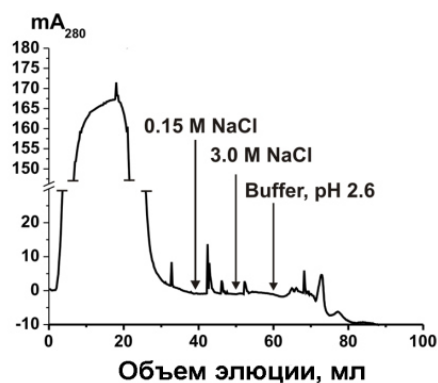


Рис. 11. Профиль аффинной хроматографии $sIgA_{mix}$ на гистон-сефарозе: (–) – оптическая плотность (A_{280}).

При аффинной хроматографии $sIgA$ на ОБМ-сефарозе (рис. 10) фракции, $sIgA$ с высоким сродством к этому сорбенту (антитела, элюированные буфером 0,1 М глицин-НСl рН 2,6) дополнительно отделяли от возможных потенциальных примесей антигистоновых иммуноглобулинов нанесением этих $sIgA$ на гистон-сефарозу. Иммуноглобулины, элюированные из этого сорбента, использовали в дальнейшем в качестве анти-ОБМ $sIgA$.

$sIgA$, элюированные из ОБМ-сефарозы во время нанесения, использовали для получения специфических антител против гистонов с помощью аффинной хроматографии на гистон-сефарозе (рис. 11). Фракции $sIgA$, элюированные из гистон-сефарозы кислым буфером 0,1 М глицин-НСl рН 2,6, дополнительно пропускали через ОБМ-сефарозу.

Из данных аффинной хроматографии, можно сделать вывод, что препарат $sIgA_{mix}$ содержит лишь около 1 % антител, элюируемых с двух сорбентов буфером 0,1 М глицин-НСl рН 2,6 и 3 М NaCl.

Неспецифическое комплексообразование различных белков с антителами против других подобных или чужеродных лигандов (и некоторых ферментов с различными соединениями) при аффинной хроматографии является широко распространенным явлением и известно как полиспецифическое комплексообразование антител [20, 21]. Специфические для разных субстратов классические ферменты обычно катализируют только одну химическую реакцию. Все описанные на сегодняшний день абзимы против разных белков обычно могут расщеплять только свои специфические белки. Поэтому была проанализирована возможная ферментативная перекрестная реактивность абзимов $sIgA$ молока против гистонов и против ОБМ. Первыми примерами каталитической перекрестной реактивности обнаружены анти-ОБМ IgG и антитела против гистонов H1,

H2A, H2B, H3 и H4 из сывороток ВИЧ-инфицированных пациентов [22, 23]. Прямые доказательства ферментативной перекрестной активности sIgA против гистонов и ОБМ могут быть получены только из данных анализа сайтов гидролиза гистонов и ОБМ с АТ против этих субстратов.

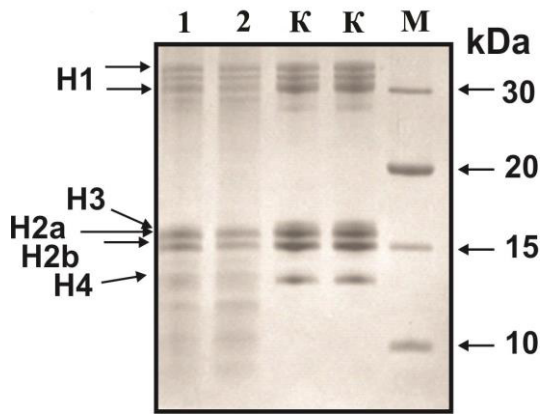


Рис. 12. Электрофоретический анализ относительной активности анти-гистон и анти-ОБМ sIgA_{mix}, очищенных аффинной хроматографией на гистон-сефарозе и ОБМ-сефарозе, при гидролизе 5 гистонов. Инкубация 5 ч. Дорожка 1 – sIgA против ОБМ. Дорожка 2 – sIgA против гистонов. К – контроль, инкубация без АТ. М – белковые маркеры с известной молекулярной массой.

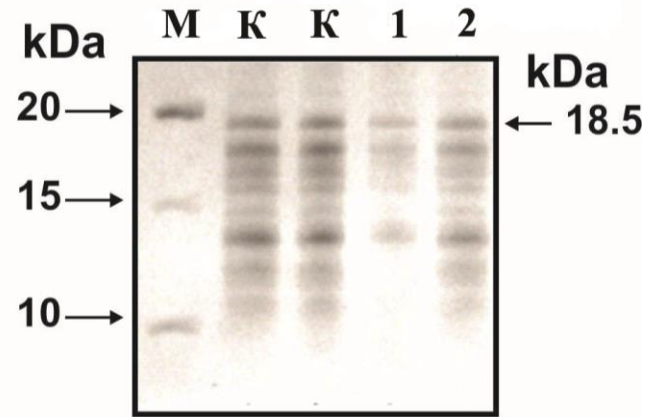


Рис. 13. Электрофоретический анализ относительной активности анти-гистон и анти-ОБМ sIgA_{mix}, очищенных аффинной хроматографией на гистон-сефарозе и ОБМ-сефарозе, при гидролизе ОБМ. Инкубация 5 ч. Дорожка 1 – sIgA против ОБМ. Дорожка 2 – sIgA против гистонов. К – контроль, инкубация без АТ. М – белковые маркеры с известной молекулярной массой.

Рисунок 12 демонстрирует, что инкубация смеси пяти гистонов в течение 5 ч с анти-гистон и анти-ОБМ sIgA приводит к эффективному гидролизу гистонов. sIgA против ОБМ и против гистонов также эффективно гидролизуют ОБМ (рис. 13). Эти данные могут потенциально указывать на то, что sIgA против ОБМ и против гистонов могут иметь не только полиспецифичность комплексообразования с ОБМ и гистонами, но также обладать каталитической перекрестной полиреактивностью. Однако эти данные не предоставляют абсолютных доказательств каталитической перекрестной полиреактивности между анти-ОБМ и анти-гистоновыми sIgA, так как, несмотря на очистку этих препаратов с помощью нескольких аффинных хроматографий, все же возможны небольшие примеси альтернативных антител.

Доказательством ферментативной кросс-реактивности антител может служить наличие общих сайтов гидролиза гистонов антителами против гистонов и против ОБМ.

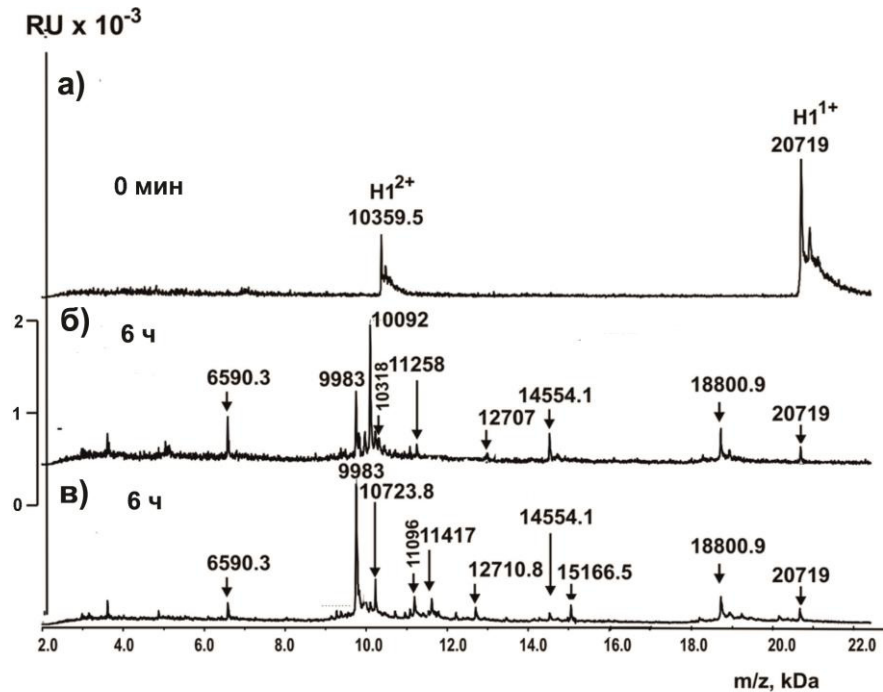
Препараты антител с высоким сродством к пяти гистонам (анти-гистон sIgA) и к ОБМ (анти-ОБМ sIgA) использовали для выявления сайтов расщепления гистонов H1, H2A и H2B с помощью масс-спектрометрии MALDI TOF.

Анализ гидролиза H1 проводили антителами sIgA против ОБМ и против гистонов через 3, 6 и 24 ч инкубации. Почти все основные пики, соответствующие различным сайтам гидролиза H1, четко видны через 6 ч гидролиза (рис. 14б). Инкубация смесей в течение 24 ч приводила к полному гидролизу H1 с образованием мелких фрагментов (<5 кДа).

Проведен анализ молекулярных масс (ММ) всех возможных последовательностей фрагментов H1, ММ которых соответствовала бы этим пикам. Из всех спектров (3–24 ч инкубации) идентифицировано девять сайтов гидролиза гистона H1 антигистоновыми sIgA: 14544.1 (K135-K136), 12696 (A117-T118), 11771.4 (T109-K110), 12498.7 (V75-T76), 11258.0 (A88-S89), 10325.6 (K96-S97), 9983.4 (R93-L94), 6590.3 (K131-A132), 3626.3 (P159-K160). Все сайты гидролиза H1 антигистоновыми sIgA представлены на рисунке 14г.

В результате анализа данных по гидролизу H1 с помощью sIgA против ОБМ идентифицировано 11 достоверно определенных сайтов гидролиза (Da): 18800,9 (A128-A129), 15166,5 (P141-V142), 14544.1 (K135-K136), 12722 (R73-L74), 11771.4 (T109-K110), 11414.1 (F106-K107), 11096 (S97-D98), 10723 (R93-L94), 9983,4 (P100-K101), 6590.3 (K131-A132) и 4647 (L149-A150).

Интересно, что основные сайты гидролиза H1 расположены в основном в двух протяженных кластерах от P73 до T118 и от A129 до T161, но расположение сайтов гидролиза в этих кластерах в случае анти-гистон и анти-ОБМ антител отличается. Среди девяти сайтов гидролиза H1 антителами против гистонов и 11 сайтов гидролиза с помощью анти-ОБМ sIgAs совпадают только три сайта: P100-K101, K131-A132 и K135-K136. В то же время, по усредненным данным анализа нескольких спектров, K131-A132 – мажорные сайты гидролиза H1 обоими типами sIgA; сайт P100-K101 является минорным в случае антител против гистонов, но умеренным для анти-ОБМ sIgA. Таким образом, sIgA против гистонов и против ОБМ обладают не только полиспецифичностью комплексообразования, но и кросс-каталитической активностью в гидролизе гистона H1.



Сайты гидролиза H1 sIgAs против гистонов

1-Tenstapaakprakaskkstdhpkysdmivaaiqaeknragssrqsikykyshykvgen-62
 63-adsqiklsirIV*TtgvlkqtkgygA*SgsfrlaK:SdeP*Kksvafkktkkek-115
 116-A*ТрkkaskpkkaasK★A*PtK:KрkatpvkkakkklaatpkkakpK★T-161
 162-vkakpvkaskpkkakpvkpkakssakragkkk-193

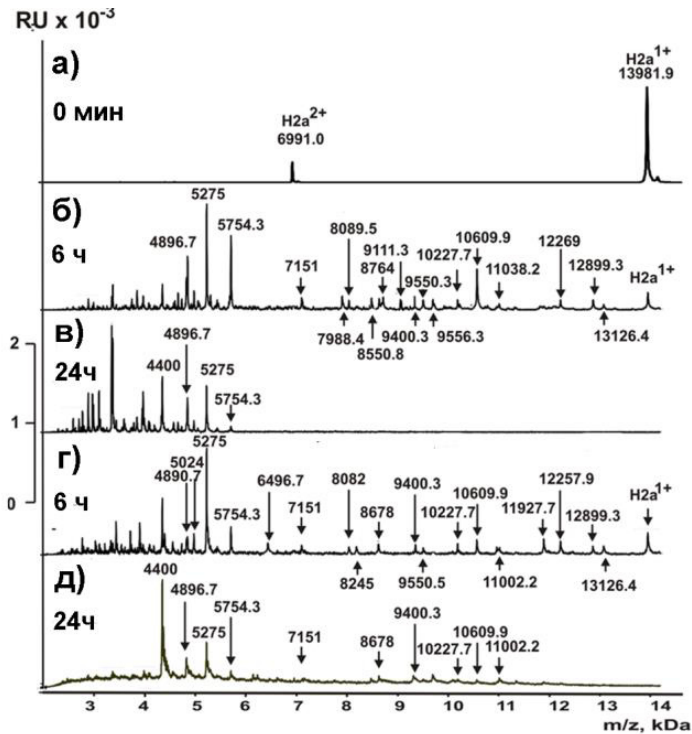
Сайты гидролиза H1 sIgAs против ОБМ

1-Tenstapaakprakaskkstdhpkysdmivaaiqaeknragssrqsikykyshykvgen-62
 63-adsqiklsikR:LvtgvlkqtkgygagsgfR:LaksdeP:KkS*VaF*KkT*Kkeik-113
 114-kvatpkkaskpkkA:AsK★AptK*KрkatP*VkkakkkL:Aatpkkakpkt-161
 162-vkakpvkaskpkkakpvkpkakssakragkkk-193

Рис.14. MALDI-масс-спектры гистона H1 (0,7 мг / мл) в отсутствие АТ (а), продуктов гидролиза гистона H1 антигистоновыми sIgA (б) и sIgA против ОБМ (в) через 6 ч инкубации. Все сайты расщепления гистона H1 антителами sIgAs против гистонов (г) и sIgAs против ОБМ (д) показаны коричневым цветом. Все мажорные сайты гидролиза показаны большими звездочками (★), умеренные – двоеточия (:), минорные сайты – маленькими звездочками (*).

Чтобы идентифицировать сайты расщепления гистона H2A, был проанализирован его гидролиз во времени с анти-ОБМ и анти-гистоновыми sIgA. Через 6 ч инкубации в присутствии анти-гистон sIgA обнаружено 15 пиков, соответствующих различным сайтам расщепления MM (Da): 13126,4 (K9-A10), 12269 (R17-S18), 11038,2 (T110-I11).), 10609.9 (R32-L33), 10227.7 (R35-K36), 9550.3 (S40-E41), 9556.4 (R88-N89), 9400.3 (87-R88), 9109.1 (G46-A47), 8550.8 (Y50-L51) , 8089.5 (T76-R77), 7988.4 (K75-T76), 7151.0 (L63-E64), 5754.3 (R77-I78), 4896.7 (K95-L96) (рисунок 15б). После 24 ч инкубации обнаружены

только небольшие (<5,7 кДа) олигопептиды (рис. 15в). Все участки гидролиза H2A представлены на рисунке 15е.



Сайты гидролиза H2A sIgA против гистонов

1-sgrgkqgg**K***Arakaks**R***Ssraglqfpvgrvh**R★**LIR**K**gny**S***Erv**G***A-45
 46-gapv**Y***Laavlyltael**L***Elagnaardnk**K***T**R★**liprh**L★**Qla**I***R**N-**89
 90-deeln**K***Llgrv**T***Iaqqgvlpniqavllpkkteshkkakgk-129

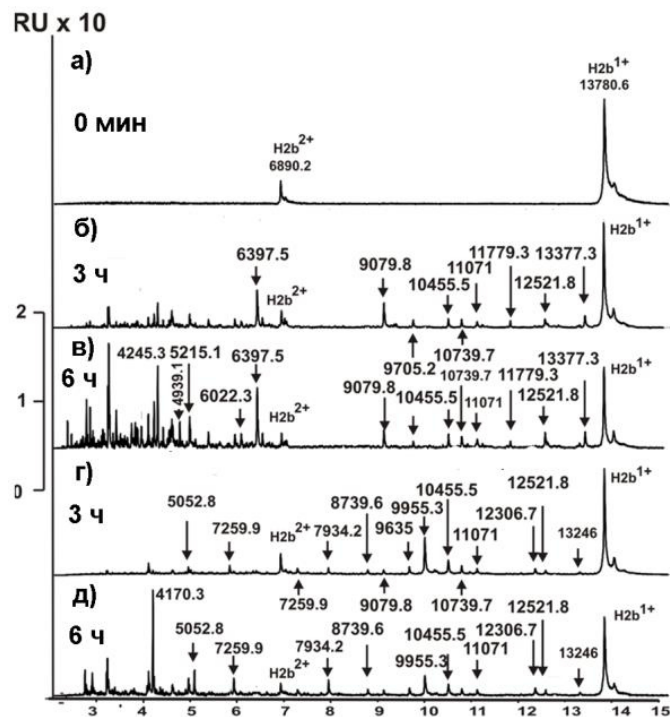
Сайты гидролиза H2A sIgA против ОБМ

1-sgrgkqgg**K:AR:AkaksR:SsR★**AglqfpvgR:VhR:LIR:KgnyS:Ervga-45
 46-G:Apv**Y:**Laavl**E*Y**ltael***E**lagna**A*R***Dnkkt**R***lip**R★**HL:QlaI:Rn-89
 90-deelnklervtiaqqgvlpniqavllpkkteshkkakgk-129

Рис. 15. MALDI-масс-спектры гистона H2A (0,7 мг / мл) в отсутствие АТ (а), продуктов гидролиза гистона H2A антигистоновыми sIgA через 6 ч и 24 ч инкубации (б, в) и с помощью sIgA против ОБМ через 6 ч и 24 ч инкубации (г, д). Все сайты расщепления гистона H2A с помощью sIgA против гистонов (е) и sIgAs против ОБМ (ж) показаны коричневым цветом. Все мажорные сайты гидролиза показаны большими звездочками (★), умеренные – двоеточиями (:), минорные сайты – маленькими звездочками (*).

Также на рис. 15 представлены данные MALDI-спектров гидролиза H2A анти-ОБМ антителами в течение 6 и 24 ч. После анализа ММ продуктов гидролиза установлены следующие 18 сайтов гидролиза H2A: 13126,4 (K9-A10), 12899,3 (R11-A12), 12269 (R17-S18), 11927,7 (R20-A21), 11002,2 (R29-V30), 10609.9 (R32-L33), 10227.7 (R35-K36), 9550.3 (S40-E41), 9400.3 (I87-R88), 8678.9 (Y57-L58), 8245.5 (R77-I78), 8082.6 (E56-Y57), 7151.0 (I63-E64), 6496.7 (R71-D72), 5275.0 (R81-H82), 5024.8 (L83-Q84), 4896.7 (L83-Q84), 4890.7 (G46-A47). Все сайты гидролиза H2A антителами против ОБМ представлены на рис. 15ж.

Среди 15 и 18 сайтов гидролиза H2A антителами против гистонов и ОБМ соответственно совпадают только 10 сайтов, а 5 и 8 сайтов гидролиза H2A различаются. Эффективность гидролиза в 10 совпадающих сайтах анти-гистон и анти-ОБМ антителами существенно различается. В случае антител против гистонов обнаружены три мажорных сайта гидролиза: R32-L33, R77-I78 и L83-Q84, но два совершенно других мажорных сайта гидролиза идентифицированы для антител против ОБМ: R20-A21 и R81-H82. Таким образом, очевидно, что sIgA против гистонов и против ОБМ обладают не только способностью образовывать комплексы с гистоном H2A, но также гидролизуют этот гистон, проявляя каталитическую перекрестную реактивность.



Сайты гидролиза H2B sIgA против гистонов

1-pepaksapapkkG:SkkavtK:AqkkdggkkR*KR:SrkesY*SiY:VY:Kv-44
lkQ:VhpdTgisskamgimnsfvN★DiF:ErigeasR:L★Ahynkrstitsre
94-iatavrlllpgelakhavsegtkavtK:Ytssk-125

Сайты гидролиза H2B sIgA против ОБМ

1-pepaksapapkkG*SK*KavtkaqkkdggkkR*KR:Srke★SyS*IyvY*Kv-44
45-L*KqvhdT:GisskaM*GimnsfvN★DiferigeasR:LahY*N*K*R*Stitsre-9?
94-iatavR*Lllpgelakhavsegtkavtkvtssk-125

Рис. 16. MALDI-масс-спектры гистона H2B (0,7 мг / мл) в отсутствие АТ (а), продуктов гидролиза гистона H2B антигистоновыми sIgA через 3 ч и 6 ч инкубации (б, в) и sIgA против ОБМ через 3 ч и 6 ч инкубации (г, д). Все сайты расщепления H2B после инкубации с sIgA против гистонов (е) и sIgA против ОБМ (ж) показаны коричневым цветом. Все мажорные сайты гидролиза показаны большими звездочками (★), умеренные – двоеточиями (:), минорные сайты – маленькими звездочками (*).

Через 3 и 6 ч инкубации H2B с антигистоновыми sIgA (рис 16б и 16в) обнаружено 12 пиков, соответствующих различным сайтам гидролиза этого гистона (Da): 13377,3 (K120-Y121), 12521,8 (G13-S14), 11779,3 (K20-A21), 10739,7 (R29-K30), 10455,5 (R31-S32), 9705,2 (Y37-S38), 9079,8 (Y42-K43), 6397,5 (N67-D68), 6022,3 (F70-E71), 5315,1 (Q47-V48), 4939,7 (L80-A81).

Рисунки 16г и 16д демонстрируют MALDI-спектры расщепления H2B с помощью sIgA против ОБМ после инкубации смесей в течение 3 и 6 ч. Выявлено 17 сайтов расщепления H2B: 12521.8 (G13-S14), 12521.8 (15K-14K), 11071.0 (R99-L100), 10739.7 (R29-K30), 10455.5 (R31-S32), 9955.3 (E35-S36), 9618.1 (S38-I39), 9079.8 (Y42-K43), 8739.6 (L45-K46), 7934.2 (T52-G53), 7259.9 (M59-G60), 6397.5 (N67-D68), 5052.8 (R79-L80), 4568,5 (Y83-N84) и (R86-S87). Все сайты гидролиза гистона H2B антителами sIgA против ОБМ представлены на рис. 16ж.

Из 12 сайтов гидролиза H2B антигистоновыми sIgA только пять совпадают с сайтами гидролиза этого гистона с помощью анти-ОБМ sIgA (из 17 сайтов гидролиза для анти-ОБМ sIgA). Более того, только один сайт (N67-D68) одновременно является мажорным сайтом расщепления для этих двух типов антител, в то время как два других мажорных сайта: L80-A81 (антигистоновые антитела) и E37-S38 (sIgA против ОБМ) не совпадают (рис. 16ж).

Интересной особенностью является то, что анти-ОБМ sIgA гидролизуют три исследованных гистона в большем количестве сайтов, чем абзимы против самих гистонов. Ранее показано, что кластеры основных сайтов гидролиза ОБМ в случае антител против ОБМ при ВИЧ-инфекции обнаружены в четырех антигенных детерминантах, локализованных в разных частях этого белка [22, 23]. В то же время все последовательности четырех кластеров гидролиза основного белка миелина в случае анти-ОБМ абзимов демонстрируют высокий уровень гомологии с последовательностями областей гистонов, в которых они гидролизуются антителами против гистонов. Авторы работы сделали вывод, что в случае IgG ВИЧ-инфицированных пациентов кросс-каталитическая реактивность антител против ОБМ и гистонов является следствием высокого уровня гомологии между последовательностями основного белка миелина, гидролизуемого анти-ОБМ антителами и последовательности гистонов, доступных для комплексообразования и гидролиза абзимами анти-ОБМ.

В настоящей работе впервые показано, что молочные sIgA против гистонов и против ОБМ, аналогично IgG из крови ВИЧ-инфицированных пациентов, демонстрируют не только перекрестное комплексообразование, но также обладают каталитической перекрестной полиреактивностью.

3. Анализ ДНКазной активности

В крови беременных женщин в повышенных концентрациях содержатся ДНК и клетки плода. Известно, что внеклеточная ДНК стимулирует воспалительные реакции, а также образование аутоантител, среди которых образуются и каталитические антитела. Представляет интерес анализ способности иммуноглобулинов молока гидролизовать ДНК.

Для определения ДНКазной активности в качестве субстрата использовали плазмидную суперскрученную ДНК (pBluescript). Антитела вносят одно- и двунитевые разрывы в молекулу ДНК, вследствие чего плазида переходит из суперскрученного состояния в релаксированное. На рисунке 17 представлен анализ относительной ДНКазной активности семи препаратов sIgA и IgG.

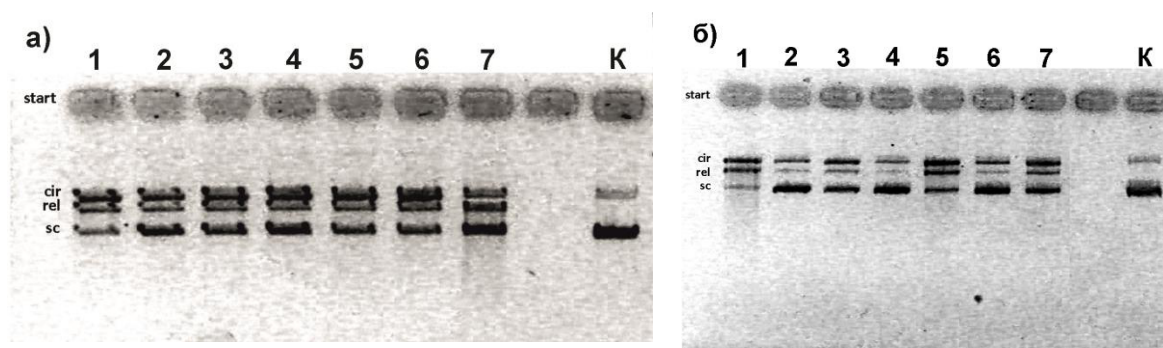


Рис. 17. Электрофореграмма разделения продуктов гидролиза ДНК pBluescript препаратами IgG (а) и sIgA (б) 7 доноров (время инкубации 1 ч, 0,8% агарозный гель, окраска бромистым этидием, 0,5 мкг/мл), sc – суперскрученная форма ДНК, rel – релаксированная форма ДНК, cir – кольцевая форма ДНК, start – «карманы» нанесения. Дорожка К – контроль (инкубация без АТ).

Видно, что для всех препаратов по сравнению с контролем наблюдается эффективное образование релаксированной и кольцевой форм ДНК из суперскрученной. Относительная активность гидролиза ДНК антителами разных доноров различается (таблица 1). Особенно это заметно в случае sIgA, когда активность между разными донорами варьирует от 8 до 99 %. Активность препаратов IgG между разными донорами различается менее существенно: от 10 до 59,2 %.

Таблица 1. Относительная активность препаратов IgG и sIgA 7 доноров в реакции гидролиза плазмидной ДНК pBluescript, %

№ донора	1	2	3	4	5	6	7
IgG	15,4	10	59,2	51,1	58,7	11,9	41,9
sIgA	99	8,6	29	8,2	42	8	31

4. Анализ РНКазной активности

Молоко человека является богатым источником РНК, в том числе микроРНК. В грудном молоке обнаружено до нескольких тысяч различных микроРНК. Наибольшее количество микроРНК обнаружено в клеточной и липидной (в составе молочных жировых глобул) фракций молока. Содержание микроРНК в молочной плазме существенно ниже. В обезжиренном молоке микроРНК найдены, как в виде свободных молекул, так и в составе экзосом. Некодирующие короткие микроРНК (18–25 нуклеотидов) играют важную роль в регуляции экспрессии генов у млекопитающих. В настоящее время показано, что микроРНК молока способны достигать кишечника в неповрежденном виде и поглощаться клетками кишечника. Предполагается, что микроРНК молока обладают важными регуляторными функциями и играют большую роль в здоровье и развитии младенца [24].

Чтобы оценить РНКазную активность индивидуальных препаратов sIgA, были использованы флуоресцентные (Flu) производные гомоолигонуклеотидов: Flu-(pA)₂₃, Flu-(pU)₂₃ и Flu-(pC)₂₃, а также микроРНК: Flu-miR-137, Flu-miR-9-5p, Flu-miR-219-2-3p, Flu-miR-219a-5p, Flu-miR-148a-3p, Flu-miR-200c-3p. Продукты гидролиза флуоресцентно-меченых микроРНК анализировали электрофорезом в денатурирующих условиях.

Относительные активности sIgA при гидролизе трех гоморибо-ОН в одинаковых условиях достоверно различались ($P < 0,05$). Все 7 препаратов sIgA обладали детектируемой высокой РНКазной активностью в реакциях гидролиза всех субстратов – гомоолигорибонуклеотидов (рисунок 18).

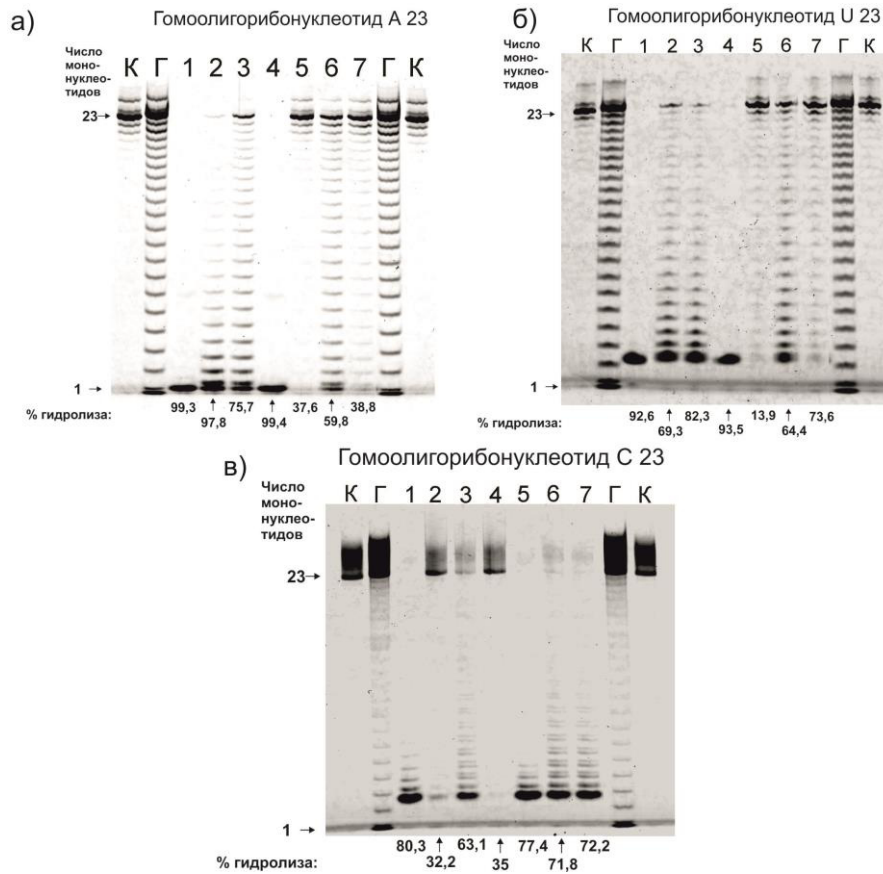


Рис. 18. Электрофоретический анализ продуктов реакции гидролиза гомоолигорибонуклеотидов A_{23} (а), U_{23} (б) и C_{23} (в) препаратами sIgA 7 доноров в 20% ПААГ в денатурирующих условиях. К – контроль (инкубация без АТ). Дорожки 1–7 – реакционные смеси, содержащие sIgA различных доноров. Дорожка Г – маркеры фрагментов соответствующего ОН различной длины, полученные путем статистического щелочного гидролиза.

Как видно из рисунка 18, некоторые препараты sIgA гидролизовали гоморибо-ОН (A_{23} , U_{23} , C_{23}) слабее других. Например, sIgA4 гидролизовал $(pA)_{23}$ (38,6%) и $(pU)_{23}$ (13,9%) медленнее, чем sIgA других доноров. Средние значения активности 7 препаратов sIgA в гидролизе $(pA)_{23}$, $(pU)_{23}$ и $(pC)_{23}$ ($61,7 \pm 19,6$, $70,1 \pm 27,3$, и $72,6 \pm 27,7\%$ соответственно) в некоторой степени сопоставимы. Все гоморибо-ОН гидролизовались с образованием олигонуклеотидов различной длины. Однако, в случае $(pA)_{23}$ конечным продуктом гидролиза был мононуклеотид, а в случае $(pU)_{23}$ и $(pC)_{23}$ тринуклеотиды.

Чтобы доказать, что РНКазная активность принадлежит непосредственно sIgA, а не совместно выделенным РНКазам, проанализирована РНКазная активность sIgA *in situ*. Как указано выше в главе 1, этот критерий является наиболее строгим и общепринятым. На рисунке 19 видно, что профиль относительной активности гидролиза микроРНК соответствует положению на геле sIgA_{mix}, что свидетельствует о том, что РНКазная активность принадлежит молочным sIgA_{mix}.

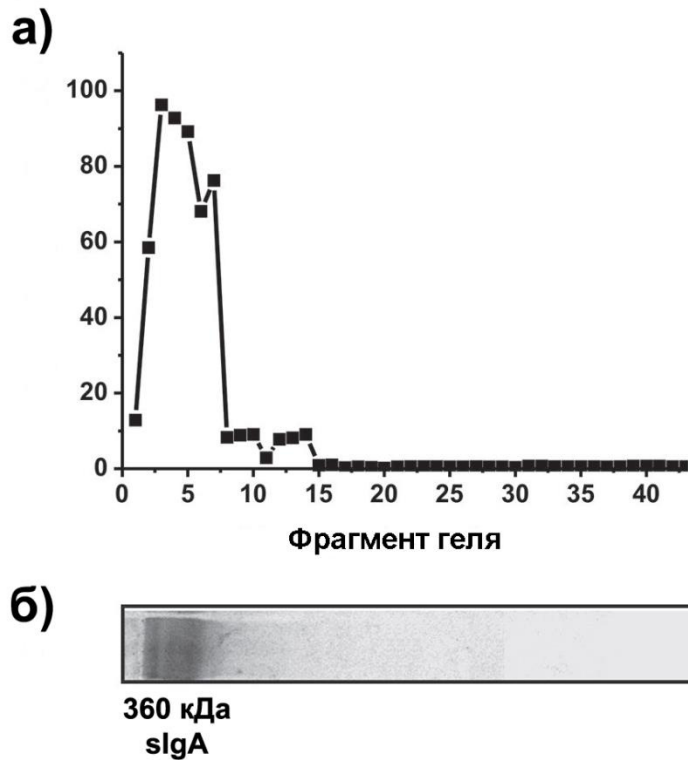


Рис. 19. Анализ РНКазной активности *in situ*. а) Профиль относительной активности (%) sIgA_{mix} в гидролизе микроРНК. б) фрагмент геля, определяющий положение интактного sIgA_{mix}; гель окрашен Coomassie R-250.

Относительные активности IgG при гидролизе трех гоморибо-ОН в одинаковых условиях существенно различались (рисунок 20). В течение 1 ч некоторые IgG почти полностью гидролизовали все рибо-ОН. Все 7 препаратов IgG гидролизовали субстраты (pA)₂₃, (pU)₂₃ и (pC)₂₃ по всем межнуклеозидным связям неспецифически и с сопоставимой эффективностью. Интересно, что, как и в случае с sIgA, самым коротким основным продуктом гидролиза (pA)₂₃ был мононуклеотид, а для (pC)₂₃ и (pU)₂₃ – тринуклеотиды, а в случае гидролиза (pC)₂₃ и (pU)₂₃ абзимами IgG также наблюдалось менее эффективное образование мононуклеотидов.

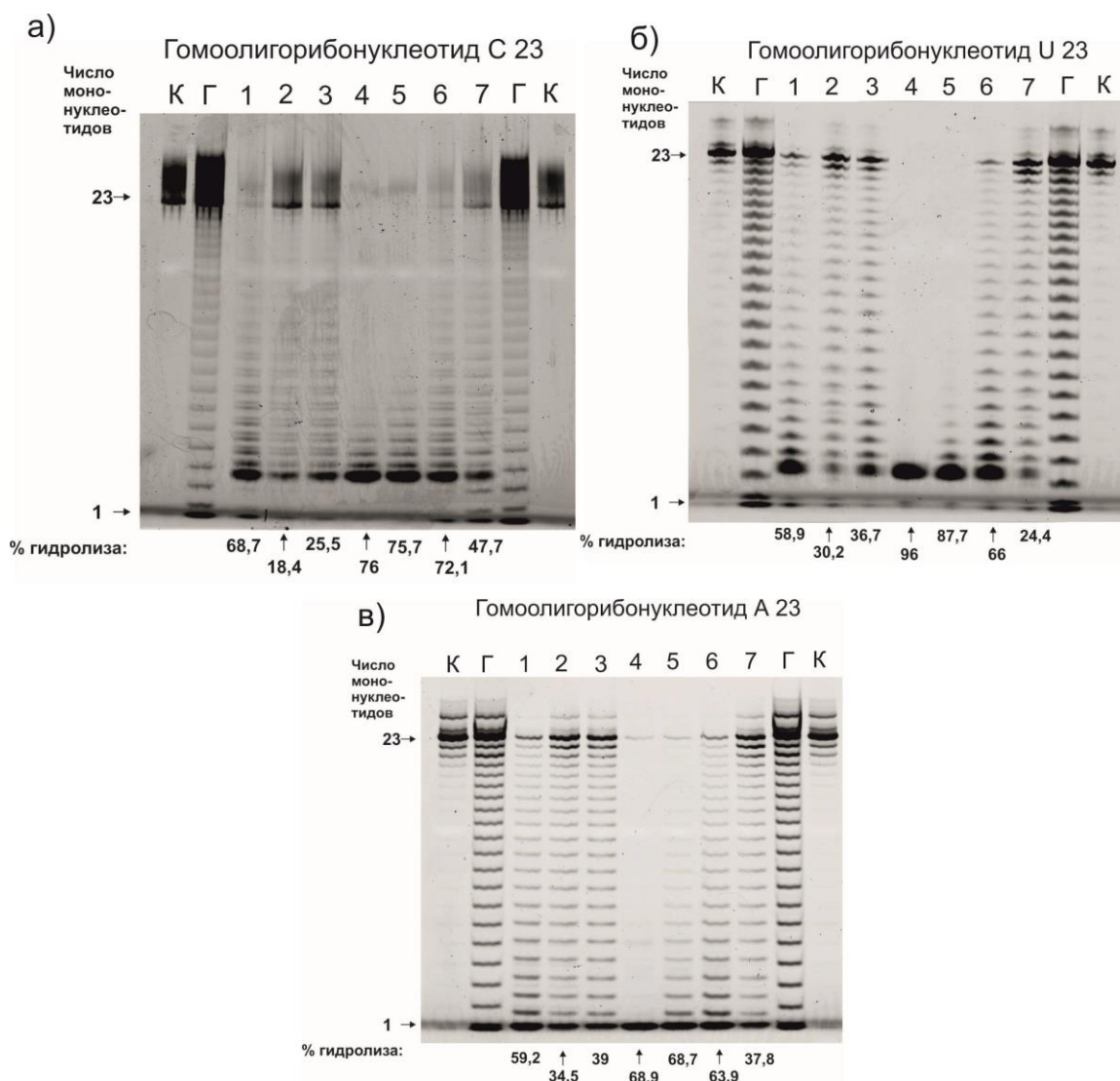


Рис. 20. Электрофоретический анализ продуктов реакции гидролиза гомоолигорибонуклеотидов A_{23} (а), U_{23} (б) и C_{23} (в) препаратами IgG семи доноров в 20% ПААГ в денатурирующих условиях. К – контроль (инкубация без АТ). Дорожки 1–7 – реакционные смеси, содержащие sIgA различных доноров. Дорожка Г – маркеры фрагментов соответствующего ON различной длины, полученные путем статистического щелочного гидролиза.

Известно, что микроРНК регулируют экспрессию генов у млекопитающих [25]. Ранее авторами работы [26] показан гидролиз miR-9-5p, miR-219-2-3p, miR-219a-5p и miR-137 с помощью IgG из сывороток пациентов с шизофренией. Эти микроРНК также обнаружены в низкой концентрации и в молоке [24, 27, 28].

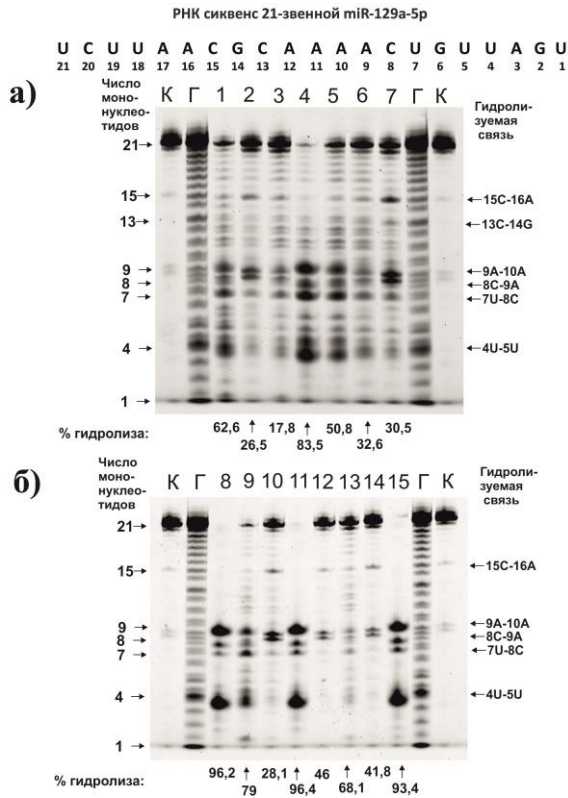


Рис. 21. Электрофореграмма продуктов реакции гидролиза miR-129a-5p препаратами IgG (а) и sIgA (б) 7-ми доноров в 20% ПААГ в денатурирующих условиях. Дорожка К – контроль (реакционная смесь, не содержащая АТ). Дорожки 1–7 – реакционные смеси, содержащие IgG семи доноров. Дорожки 8–15 – реакционные смеси, содержащие sIgA семи доноров, Дорожка Г – маркеры фрагментов miR-129a-5p различной длины, полученные путем статистического щелочного гидролиза.

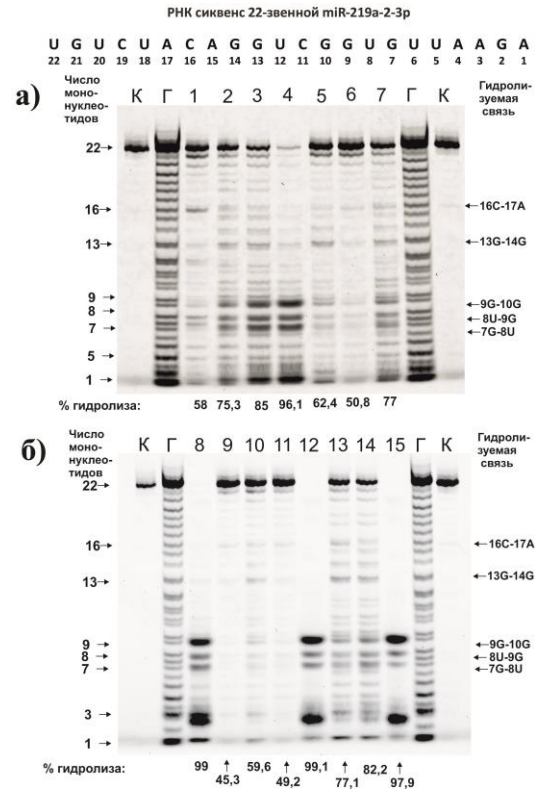


Рис. 22. Электрофоретический анализ продуктов реакции гидролиза miR-219a-2-3p препаратами IgG (а) и sIgA (б) 7-ми доноров в 20% ПААГ в денатурирующих условиях. Дорожка К – контроль (реакционная смесь, не содержащая АТ). Дорожки 1–7 – реакционные смеси, содержащие IgG семи доноров. Дорожки 8–15 – реакционные смеси, содержащие sIgA семи доноров, Дорожка Г – маркеры фрагментов miR-219a-2-3p различной длины, полученные путем статистического щелочного гидролиза.

Рисунок 21 демонстрирует типичные паттерны гидролиза miR-129a-5p с помощью 7 препаратов sIgA и IgG. Иммуноглобулины обоих классов гидролизировали miR-129a-5p в мажорных сайтах 4U-5U и 9C-10A. Умеренными сайтами гидролиза были 7U-8C, 8C-9C и 15C-16A. Процент гидролиза для разных sIgA варьировал от 28,1 до 96,4 %; средняя эффективность гидролиза miR-129a-5p всеми 7-ю sIgA составила $64,7 \pm 26,6$ %. Для препаратов IgG 7 доноров процент гидролиза варьировал от 17,8 до 83,5 %. Среднее значение относительной активности IgG в реакции гидролиза miR-129a-5p было $43,4 \pm 18,9$ %.

В отличие от miR-219a-5p, гидролиз miR-219a-5p, кроме пяти специфических сайтов, наблюдался почти во всех межнуклеозидных фосфатных группах этой микроРНК; большинство из них можно отнести к умеренным сайтам гидролиза (рис. 22). Среднее значение относительной активности IgG в реакции гидролиза miR-219a-2-3p составило 79,5 %, а для препаратов sIgA – 59,6 %.

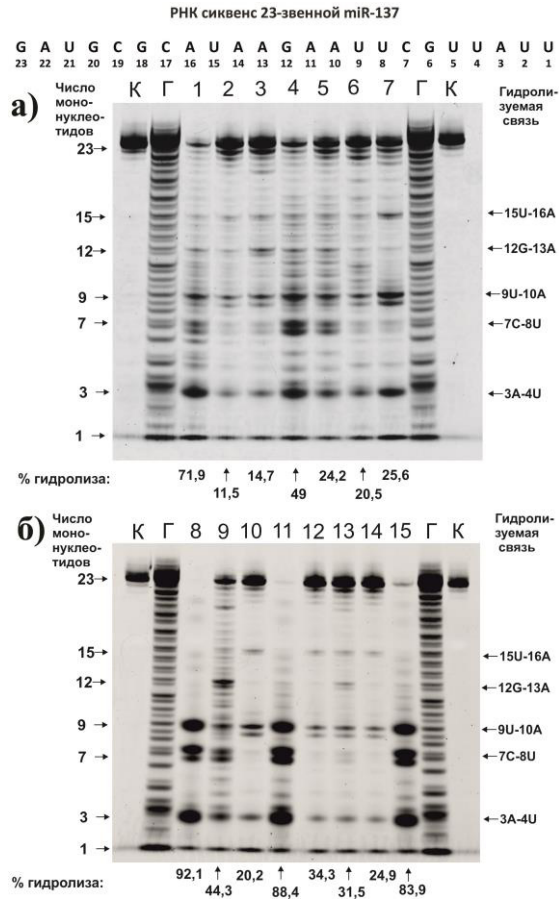


Рис. 23. Электрофореграмма продуктов реакции гидролиза miR-137 препаратами IgG и sIgA 7-ми доноров в 20% ПААГ в денатурирующих условиях. Дорожка К – контрольная реакционная смесь, не содержащая АТ. Дорожки 1–7 – реакционные смеси, содержащие IgG семи доноров. Дорожки 8–15 – реакционные смеси, содержащие sIgA семи доноров. Дорожка Г – маркеры фрагментов miR-137 различной длины, полученные путем статистического щелочного гидролиза.

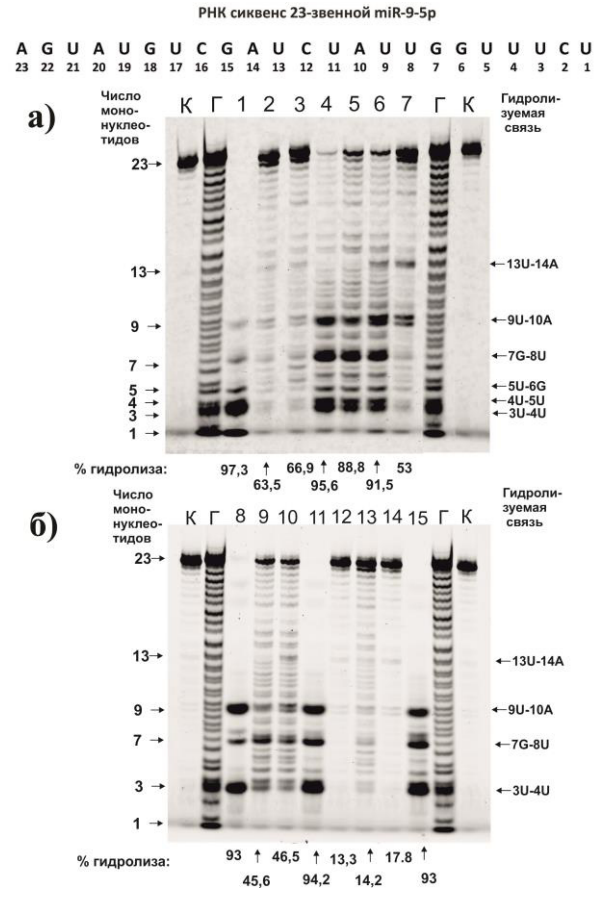


Рис. 24. Электрофоретический анализ продуктов реакции гидролиза miR-9-5p препаратами IgG и sIgA 7-ми доноров в 20% ПААГ в денатурирующих условиях. Дорожка К – контрольная реакционная смесь (инкубация без АТ). Дорожки 1–7 – реакционные смеси, содержащие IgG семи доноров. Дорожки 8–15 – реакционные смеси, содержащие sIgA семи доноров. Дорожка Г – маркеры фрагментов miR-9-5p различной длины, полученные путем статистического щелочного гидролиза.

Среди большого числа сайтов гидролиза miR-137, в том числе средних и слабых, есть пять основных сайтов гидролиза, которые наблюдались для всех IgG и sIgA: 15U-16A, 12G-13A, 9U-10A, 7C-8U и 3A-4U (рис. 23). Эффективность гидролиза miR-137 на основных и других участках сильно различается между препаратами антител разных доноров. Относительная активность гидролиза miR-137 антителами sIgA варьировала с 20,2 до 92,1 %; средняя эффективность гидролиза miR-137 составила $46,8 \pm 28,0\%$. Средняя активность препаратов IgG 7 доноров составила 31,05 % при вариации от 11,5 до 71,9 %.

Все препараты IgG демонстрируют комбинацию неспецифического и сайт-специфического гидролиза miR-9-5p (рисунок 24). Четыре препарата (IgG1, IgG4, IgG5 и IgG6) показывают ярко выраженный гидролиз в четырех основных участках: 9U-10A, 7G-8U, 4U-5A и 3U-4U. IgG6 и IgG7 проявляют еще один мажорный сайт 13U-14A гидролиза miR-9-5p. В то же время для IgG7 три основных сайта гидролиз (7G-8U, 4U-5A и 3U-4U) не являются мажорными. IgG2 и IgG3 гидролизуют эту микроРНК почти полностью неспецифично. Семь препаратов sIgA расщепляют miR-9-5p также по-разному. sIgA5 и sIgA6 плохо гидролизуют miR-9-5p.

Одними из наиболее представленных микроРНК в молоке человека являются miR-148a-3p и miR-200c-3p. Проведен анализ РНКазной активности препаратов IgG и sIgA в реакциях гидролиза этих микроРНК. Все препараты IgG и sIgA гидролизуют miR-148a-3p по мажорным сайтам гидролиза: 3U-4U, 5U-6C, 8A-9G, 12A-13C (рисунок 25). sIgA донора 4 и 5 демонстрируют также мажорный сайт 14C-15A. Относительная активность IgG при гидролизе miR-148a-3p варьировала от 12,6 до 58,2 %, среднее значение 29,5 %. Средняя эффективность sIgA при гидролизе miR-148a-3p выше, чем IgG – 56,2 %.

На рисунке 26 представлены типичные паттерны гидролиза miR-200c-3p с помощью 7 препаратов sIgA и IgG. Общими мажорными сайтами для всех исследуемых антител являются 5A-6G, 9A-10U, 10U-11G, 14C-15U. Для препаратов IgG доноров 1, 4 и 5 характерны дополнительные мажорные сайты гидролиза 6G-7U и 11G-12G. Средняя эффективность гидролиза miR-200c-3p антителами IgG составляет 33,1 %; а антителами sIgA – 54,4 %.

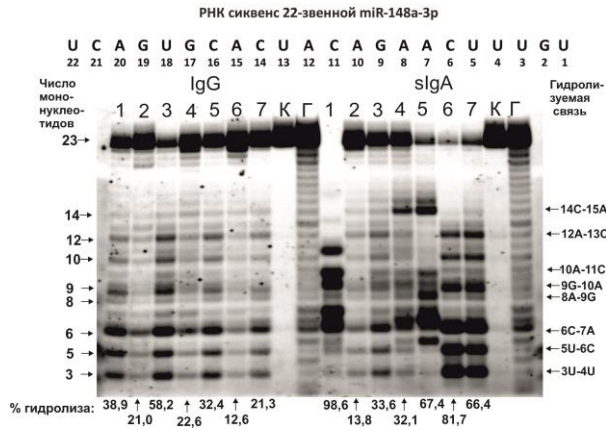


Рис. 25. Электрофореграмма продуктов реакции гидролиза miR-148a-3p препаратами IgG и sIgA семи доноров в 20% ПААГ в денатурирующих условиях. Дорожка К – контрольная реакционная смесь, не содержащая АТ. Дорожки 1–7 – реакционные смеси, содержащие АТ семи доноров (IgG или sIgA). Дорожка Г – маркеры фрагментов miR-148a-3p различной длины, полученные путем статистического щелочного гидролиза.

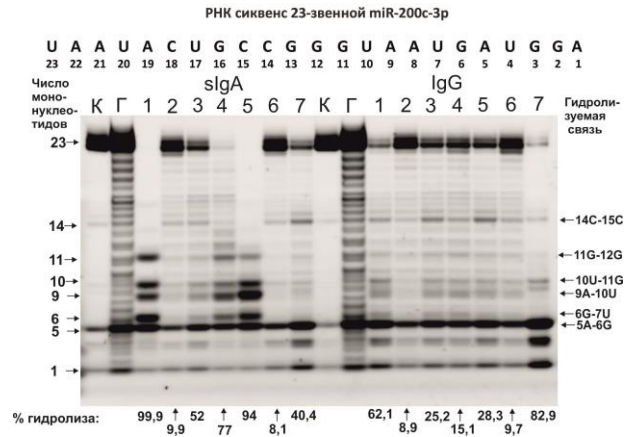


Рис. 26. Электрофоретический анализ продуктов реакции гидролиза miR-200c-3p препаратами IgG и sIgA семи доноров в 20% ПААГ в денатурирующих условиях. Дорожка К – контрольная реакционная смесь (инкубация без АТ). Дорожки 1–7 – реакционные смеси, содержащие АТ семи доноров (IgG или sIgA). Дорожка Г – маркеры фрагментов miR-200c-3p различной длины, полученные путем статистического щелочного гидролиза.

Из полученных данных можно заключить, что иммуноглобулины IgG и sIgA молока человека эффективно гидролизуют гомоолигорибонуклеотиды и микроРНК. sIgA гидролизуют гомоолигорибонуклеотиды более эффективно, чем IgG. Гидролиз гомоолигорибонуклеотидов антителами молока происходит неспецифично по всем сайтам. При гидролизе микроРНК идентифицируются мажорные и минорные сайты гидролиза. Конечным продуктом гидролиза гомо- и гетероолигорибонуклеотидов является моно- либо тринуклеотиды.

Выводы

1. Показано, что полученные гомогенные препараты иммуноглобулинов молока человека IgG и sIgA эффективно гидролизуют гистоны человека (H1, H2A, H2B, H3 и H4), основной белок миелина (ОБМ), ДНК и РНК. Доказано, что гидролитические активности являются собственным свойством исследуемых иммуноглобулинов.
2. Полученные гомогенные анти-гистон и анти-ОБМ фракции sIgA демонстрируют каталитическую перекрестную реактивность при гидролизе ОБМ и гистонов.
3. Анализ гидролиза различных гомоолигорибонуклеотидов абзимами IgG и sIgA показал более высокую эффективность последних. Иммуноглобулины молока с различной эффективностью гидролизуют микроРНК с образованием конечных продуктов – моно- и тринуклеотидов.

Список использованной литературы

1. Van de Perre, P. Transfer of antibody via mother's milk // *Vaccine*. – 2003.
2. Danilova, N., Amemiya, C. T. Going adaptive: the saga of antibodies // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2009.
3. Хаитов Р.М. Иммунология: структура и функции иммунной системы. – 2013.
4. Lawrence, Ruth A. *Breastfeeding : a guide for the medical profession*. – 2011.
5. Невинский Г. А., Бунева В. Н. Особенности абзимов из крови и молока здоровых доноров и пациентов с аутоиммунными и вирусными заболеваниями // *Биохимия*. – 2009.
6. Ermakov E.A., Nevinsky G.A., Buneva V.N. Immunoglobulins with non-canonical functions in inflammatory and autoimmune disease states // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020.
7. Dimitrov J.D Noncanonical functions of antibodies // *Trends in Immunology*. – 2020.
8. Pauling, L. Molecular basis of biological specificity // *Am. Scientist*. – 1948.
9. Tramontano, A., Janda, K. D., Lerner, R. A. Catalytic antibodies // *Science*. – 1986.
10. Pollack, S. T., Jacobs, J. F., Schultz, P. G. Selective chemical catalysis by an antibody // *Science*. – 1986.
11. Blackburn, G. M., Kang, A. S., Kingsbury, G. A., Burton, D. R. Catalytic antibodies // *Biochem J*. – 1989.
12. Nevinsky, G. A., V. N. Buneva. Catalytic antibodies in healthy humans and patients with autoimmune and viral pathologies // *J. Cell. Mol. Med.* – 2003.

13. Gabibov, A. G. Antibody catalysis: biochemistry, immunology, pathology // *Immunol. Lett.* – 2006.
14. Paul, S., D. J. Volle, C. M. Beach, D. R. Johnson, M. J. Powell, R. J. Massey. Catalytic hydrolysis of vasoactive intestinal peptide by human autoantibody // *Science* – 1989.
15. Nevinsky, G. A., Buneva, V. N. Human catalytic RNA- and DNA-hydrolyzing antibodies // *J. Immunol. Methods.* – 2002.
16. Richard A. Polin *Fetal and neonatal physiology* – 2011.
17. Невинский Г.А., Канышкова Т.Г., Бунева В.Н. Природные каталитически активные антитела (абзимы) в норме и при патологии // *Биохимия.* – 2000.
18. Nevinsky G.A., Kanyshkova T.G., Semenov D.V., Vlassov A.V., Galvita A.V., Buneva V.N. Secretory immunoglobulin A from healthy human mothers' milk catalyzes nucleic acid hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2000.
19. Polosukhina, D. I., T. G. Kanyshkova, B. M. Doronin, O. B. Tyshkevich, V. N. Buneva, A. N. Boiko, E. I. Gusev, O. O. Favorova, G. A. Nevinsky. Hydrolysis of myelin basic protein by polyclonal catalytic IgGs from the sera of patients with multiple sclerosis // *J. Cell Mol. Med.* – 2004.
20. Zhou, Z.H., A.G. Tzioufas, A.L. Notkins. Properties and function of polyreactive antibodies and polyreactive antigen-binding B cells. *J. Autoimmun.* – 2007.
21. Nevinsky, G. A. Autoimmune processes in multiple sclerosis: production of harmful catalytic antibodies associated with significant changes in the hematopoietic stem cell differentiation and proliferation. – 2016.
22. Baranova S. V., P. S. Dmitrienok, A. D. Zubkova, N. V. Ivanisenko, E. S. Odintsova, V. N. Buneva, G. A. Nevinsky. Antibodies against H3 and H4 histones from the sera of HIV-infected patients catalyze site-specific degradation of these histones // *J. Mol. Recognit.* – 2018.
23. Baranova, S. V., V. N. Buneva, G. A. Nevinsky. Antibodies from the sera of HIV-infected patients efficiently hydrolyze all human histones // *J. Mol. Recognit.* – 2016.
24. Alsaweed M. Human milk miRNAs primarily originate from the mammary gland resulting in unique miRNA profiles of fractionated milk // *Scientific Reports.* – 2016.
25. Herwijnen M. Abundantly present miRNAs in milk-derived extracellular vesicles are conserved between mammals // *Frontiers in Nutrition.* – 2018.
26. Ermakov, E.A.; Ivanova, S.A.; Buneva, V.N.; Nevinsky, G.A. Hydrolysis by catalytic IgGs of microRNA specific for patients with schizophrenia. *IUBMB Life.* – 2018.
26. Weber J. The microRNA spectrum in 12 body fluids // *Clinical Chemistry.* – 2010.

27. Melnik B. MicroRNAs: milk's epigenetic regulators // Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2017.

Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: Компанеец Иван Юрьевич

Проверяющий: Гапонова Светлана Константиновна (sveta-mira@yandex.ru / ID: 4540715)

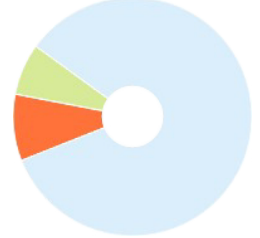
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://users.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 6
Начало загрузки: 02.09.2021 08:53:14
Длительность загрузки: 00:00:44
Имя исходного файла: Научный доклад_Компанеец_.pdf
Название документа: Научный доклад_Компанеец_
Языки текста документа: русский, английский
Размер текста: 1 кБ
Символов в тексте: 51791
Слов в тексте: 6128
Число предложений: 359
Method of text extraction: OCR

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)
Начало проверки: 02.09.2021 08:53:58
Длительность проверки: 00:01:12
Комментарии: не указано
Поиск с учетом редактирования: да
Модули поиска: ИПС Адилет, Библиография, Сводная коллекция ЭБС, Интернет Плюс, Сводная коллекция РГБ, Цитирование, Переводные заимствования (RuEn), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (KkRu), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (KyRu), Переводные заимствования по Интернету (EnRu), Переводные заимствования по Интернету (KkRu), Переводные заимствования по Интернету (KyRu), Переводные заимствования (KkEn), Переводные заимствования (KyEn), Переводные заимствования издательства Wiley (RuEn), eLIBRARY.RU, СПС ГАРАНТ, Интернет, Медицина, Диссертации НББ, Перефразирования по eLIBRARY.RU, Перефразирования по Интернету, Патенты СССР, РФ, СНГ, СМИ России и СНГ, Шаблонные фразы, Кольцо вузов, Издательство Wiley, Переводные заимствования



ЗАИМСТВОВАНИЯ

9,47%

САМОЦИТИРОВАНИЯ

0%

ЦИТИРОВАНИЯ

6,7%

ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

83,83%

Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
Самоцитирования — доля фрагментов текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа, по отношению к общему объему документа.
Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.
Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.
Заимствования, самоцитирования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.
Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Доля в тексте	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте	Комментарии
[01]	5,67%	5,67%	не указано	раньше 2011	Библиография	3	3	
[02]	3,86%	5,62%	Ермаков, Евгений Александрович Природные каталитические иммуноглобулины класса G при шизофрении : диссертация ... кандидата биологических наук : 03.01.04 Новосибирск 2020 http://dlib.rsl.ru	16 Июн 2021	Сводная коллекция РГБ	9	12	
[03]	0,17%	4,16%	Ермаков, Евгений Александрович Природные каталитические иммуноглобулины класса G при шизофрении : автореферат дис. ... кандидата биологических наук : 03.01.04 Новосибирск 2020 http://dlib.rsl.ru	16 Июн 2021	Сводная коллекция РГБ	1	9	
[04]	0,64%	1,15%	Седых, Сергей Евгеньевич диссертация ... кандидата биологических наук : 03.01.04 Новосибирск 2012 http://dlib.rsl.ru	07 Мар 2013	Сводная коллекция РГБ	2	4	
[05]	0%	1,01%	Десятая Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей - Документ https://refdb.ru	24 Мая 2020	Интернет Плюс	0	6	
[06]	0%	0,89%	Иммуноглобулины крови больных рассеянным склерозом – каталитически гетерогенные нуклеазы. http://elibrary.ru	26 Дек 2008	eLIBRARY.RU	0	5	
[07]	0%	0,87%	http://www.vector.nsc.ru/userfiles/model/s/autoreferats-files/achikaev.pdf http://vector.nsc.ru	28 Сен 2019	Интернет Плюс	0	4	

Чикаев, Антон Николаевич Пептиды-

[08]	0,32%	0,78%	имитаторы эпителий ВИЧ-1, узнаваемых нейтрализующими антителами широкого спектра действия : автореферат дис. ... кандидата биологических наук : 03.01.03 Кольцово 2015 http://dlib.rsl.ru	17 Июл 2015	Сводная коллекция РГБ	1	1
[09]	0%	0,78%	http://www.vector.nsc.ru/userfiles/models/autoreferats-files/achikaev.pdf http://vector.nsc.ru	28 Сен 2019	Интернет	0	1
[10]	0%	0,76%	file_595465345d1c5мжпфи290617	29 Июн 2017	Кольцо вузов	0	3
[11]	0,03%	0,73%	ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТКАНЕЙ НА ИМПЛАНТАЦИЮ БИОПЛАСТИЧЕСКИХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ ФИЗИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ - Диссертация http://konf.x-pdf.ru	31 Авг 2021	Интернет Плюс	1	3
[12]	0,35%	0,73%	не указано	раньше 2011	Шаблонные фразы	4	9
[13]	0%	0,72%	Заключение Диссертационного совета http://bionet.nsc.ru	02 Сен 2021	Интернет Плюс	0	4
[14]	0%	0,7%	Uncategorised - Ассоциация Биофарм https://npbio.ru	27 Июл 2021	Интернет Плюс	0	3
[15]	0%	0,7%	19 вузов России получили право присудить ученые степени http://ug.ru	16 Янв 2019	СМИ России и СНГ	0	3
[16]	0,68%	0,68%	Приказ Министерства здравоохранения РФ от 30 апреля 2013 г. N 281 "Об утверждении научных платформ медицинской науки" http://ivo.garant.ru	22 Фев 2019	СПС ГАРАНТ	3	3
[17]	0%	0,65%	Флавоноиды и фталаты Equisetum silvaticum L., Equisetum arvense L. и Pseudosiphora alopecuroides L. http://dslib.net	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	3
[18]	0%	0,65%	ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ДНК КРОВИ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ. http://elibrary.ru	30 Авг 2014	eLIBRARY.RU	0	3
[19]	0%	0,65%	Международные стандарты лечения онкогематологических заболеваний обсудили в Новосибирске. http://ria-ami.ru	28 Дек 2018	СМИ России и СНГ	0	3
[20]	0,33%	0,65%	Биохимические и поведенческие показатели в отдаленный период после острых отравлений нейротоксикантами и их фармакологическая коррекция (экспериментальное исследование) http://toxicology.ru	11 Июл 2020	Интернет Плюс	1	2
[21]	0%	0,65%	https://instmech.s3.amazonaws.com/site/s/4fc2ad8be2e7980003000004/content_enry5113107ba95280003000dbf/5c86581c3d8dd700040023a3/files/Disser_Tatarkova.pdf https://instmech.s3.amazonaws.com	04 Июн 2019	Интернет Плюс	0	2
[22]	0%	0,65%	https://instmech.s3.amazonaws.com/site/s/4fc2ad8be2e7980003000004/content_enry5113107ba95280003000dbf/5c86581c3d8dd700040023a3/files/Disser_Tatarkova.pdf https://instmech.s3.amazonaws.com	15 Июн 2020	Интернет Плюс	0	2
[23]	0%	0,65%	https://instmech.s3.amazonaws.com/site/s/4fc2ad8be2e7980003000004/content_enry5113107ba95280003000dbf/5c86581c3d8dd700040023a3/files/Avtoreferat_Tatarkova.pdf https://instmech.s3.amazonaws.com	14 Мая 2021	Интернет Плюс	0	2
[24]	0%	0,65%	Кострова, Таисия Александровна Биохимические и поведенческие показатели в отдаленный период после острых отравлений нейротоксикантами и их фармакологическая коррекция : экспериментальное исследование : автореферат дис. ... кандидата медицинских наук : 1... http://dlib.rsl.ru	16 Июн 2021	Сводная коллекция РГБ	0	2
[25]	0,32%	0,64%	Анатомо-топографическое обоснование миниинвазивного метода лечения гнойно-некротических осложнений синдрома диабетической стопы http://vmeda.mil.ru Анатомо-топографические	02 Окт 2018	Интернет Плюс	1	2

[26]	0%	0,64%	особенности артерий и элементов клапанного аппарата сердца человека http://dep.nlb.by	06 Дек 2018	Диссертации НББ	0	2
[27]	0%	0,6%	Новые правила защиты диссертаций. http://elibrary.ru	11 Мар 2020	eLIBRARY.RU	0	3
[28]	0%	0,6%	Определен перечень вузов и научных организаций, получивших право самостоятельно присуждать ученые степени http://magadan.yodda.ru	10 Янв 2019	СМИ России и СНГ	0	3
[29]	0%	0,58%	Патогенетическое обоснование методов экстракорпоральной и внутрисосудистой гемокоррекции в терапии больных вульгарным псориазом http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	2
[30]	0,33%	0,55%	Добролюбова_диплом	11 Июн 2016	Кольцо вузов	1	2
[31]	0,32%	0,55%	Принц_диплом	11 Июн 2016	Кольцо вузов	1	2
[32]	0%	0,54%	Гигиеническое обоснование критериев оценки воздействия многокомпонентного загрязнения атмосферного воздуха на здоровье населения http://dep.nlb.by	06 Дек 2018	Диссертации НББ	0	2
[33]	0%	0,54%	Доклад студента ПГУ оценен на XVIII Международной медико-биологической конференции молодых исследователей в Санкт-Петербурге http://penza.bezformata.ru	29 Дек 2018	СМИ России и СНГ	0	2
[34]	0%	0,54%	Сведения об авторах. http://elibrary.ru	31 Авг 2011	eLIBRARY.RU	0	3
[35]	0,04%	0,49%	Молекулярная биология. 2017. Т. 51, № 1 http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	1	2
[36]	0%	0,49%	science-education.ru_file_58c63f9cd97ec.docx	13 Мар 2017	Кольцо вузов	0	2
[37]	0,48%	0,48%	Диплом-2021-Урусов (3)	25 Мая 2021	Кольцо вузов	2	2
[38]	0%	0,47%	Ультразвуковая и функциональная диагностика. 2017. № 3 http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	2
[39]	0%	0,46%	Молекулярная биология. 2017. Т. 51, № 5 http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	2
[40]	0%	0,46%	Фундаментальные исследования. № 5, часть 2, 2013 http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	2
[41]	0%	0,46%	Артериальная гипертония у лиц призывного возраста: особенности клинического течения, диагностической и лечебно-профилактической помощи в амбулаторной практике http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	2
[42]	0%	0,46%	Всероссийская научно-практическая конференция "Молекулярно-генетические и иммуногенетические методы диагностики в практике врача гематолога", Санкт-Петербург, 25-26 апреля 2013 г. http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	2
[43]	0%	0,46%	Т. XCIV, № 4, июль-август http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	2
[44]	0%	0,46%	science-education.ru_file_5879043788084.doc	16 Янв 2017	Кольцо вузов	0	2
[45]	0%	0,45%	Прогнозирование, ранняя диагностика и профилактика сепсиса при ожоговой болезни http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	0	2
[46]	0,16%	0,45%	Природные каталитически активные антитела в норме и при патологиях. http://elibrary.ru	01 Янв 2015	eLIBRARY.RU	2	5
[47]	0%	0,41%	К ЮБИЛЕЮ ПРОФЕССОРА СЕРГЕЯ ОЛЕГОВИЧА МАЗУРЕНКО. http://elibrary.ru	09 Июл 2020	eLIBRARY.RU	0	2
[48]	0,39%	0,39%	Влияние дегликозилирования иммуноглобулинов молока человека на их каталитические активности. http://elibrary.ru	25 Янв 2016	Перефразирования по eLIBRARY.RU	1	1
[49]	0%	0,39%	Генетическое разнообразие и филогеография печеночных сосальщиков opisthorchis f elineus и clonorchis sinensis (trematoda, opisthorchiidae) на территории россии и стран восточной азии	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	2

<http://h.120-bal.ru>

[50]	0%	0,36%	Доклинические исследования эффективности и безопасности ранозаживляющего геля содержащего хитозан, таурин и аллантион http://dslib.net	22 Дек 2020	Интернет Плюс	0	2
[51]	0,33%	0,33%	СИСТЕМНАЯ КРАСНАЯ ВОЛЧАНКА: МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ ЛЕГКИЕ ЦЕПИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРОТИВ ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА (ОБМ) СПЕЦИФИЧЕСКИ ГИДРОЛИЗУЮТ ОБМ. http://elibrary.ru	17 Янв 2013	Перефразирования по eLIBRARY.RU	1	1
[52]	0,33%	0,33%	Особенности окислительно-восстановительных, амилазной и АТРазной активностей IgG антител из крови больных шизофренией. http://elibrary.ru	01 Янв 2018	Перефразирования по eLIBRARY.RU	1	1
[53]	0%	0,32%	http://aaidcongress.ru/files/aaid2018program.pdf http://aaidcongress.ru	07 Фев 2019	Интернет Плюс	0	1
[54]	0,15%	0,32%	Липид- и полисахаридкиназная активности антител молока человека + " - скачать бесплатно автореферат диссертации по " + биологии + ", специальность " + Биохимия (1/2) http://earthpapers.net	30 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	1	1
[55]	0%	0,3%	Физиология растений. 2017. Т. 64, № 2 http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	1
[56]	0%	0,3%	Брусенцов, Илья Иванович Генетическое разнообразие и филогеография печеночных сосальщиков <i>Opisthorchis felineus</i> и <i>Clonorchis sinensis</i> (Trematoda, Opisthorchiidae) на территории России и стран Восточной Азии : автореферат дис. ... кандидата биологических... http://dlib.rsl.ru	31 Янв 2014	Сводная коллекция РГБ	0	1
[57]	0%	0,3%	Всероссийская конференция "Физика низкотемпературной плазмы" ФНТП-2014: сборник материалов: в 2 т. Т. 1 http://studentlibrary.ru	19 Дек 2016	Медицина	0	1
[58]	0%	0,3%	Теоретические основы новых направлений в медицине http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	1
[59]	0%	0,3%	Т. 2 http://emll.ru	08 Июл 2017	Медицина	0	1
[60]	0%	0,3%	Способ очистки вируса осповакцины или его рекомбинантных вариантов. Патент РФ 2537000 http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1
[61]	0%	0,3%	Средство для нейтрализации вируса натуральной оспы. Патент РФ 2515905 http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1
[62]	0%	0,3%	Способ получения наноразмерной системы доставки нуклеозидтрифосфатов в клетки млекопитающих. Патент РФ 2527681 http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1
[63]	0%	0,3%	NYmnik_35098. Шедько Елизавета Дмитриевна. Оптимизация технологии наработки и очистки препаратов бактериофагов для персонализированного лечения инфекционных заболеваний у пациентов с гнойно-некротическими изменениями при синдроме диабетической http://umnik.fasie.ru	06 Мая 2017	Кольцо вузов	0	1
[64]	0%	0,3%	applied-research.ru_file_5a1691d9b6b19.docx	23 Ноя 2017	Кольцо вузов	0	1
[65]	0%	0,3%	antyhova_e_a_evolyuciya-otechestvennoy-sistemy-prisujdeniya-uchenyh-stepeny-problemy-i-resheniya.pdf	20 Фев 2020	Кольцо вузов	0	1
[66]	0,29%	0,29%	Соколова Ольга Сергеевна - пользователь, сотрудник ИСТИНА – Интеллектуальная Система Тематического Исследования НАукометрических данных https://istina.msu.ru	07 Июн 2021	Интернет Плюс	1	1
[67]	0,27%	0,27%	РНК- И микроРНК-ГИДРОЛИЗУЮЩИЕ IgG АНТИТЕЛА ИЗ КРОВИ БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ. http://elibrary.ru	17 Июл 2018	eLIBRARY.RU	6	6
[68]	0,27%	0,27%	Природные каталитически активные антитела в норме и при патологиях. http://elibrary.ru	01 Янв 2015	Перефразирования по eLIBRARY.RU	1	1

[69]	0%	0,27%	Полисахаридкиназная активность IgG антител из молока человека. http://elibrary.ru	01 Янв 2007	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	1	
[70]	0%	0,26%	Общие новости (1/4) https://tvgm.ru	23 Июл 2020	Интернет	0	1	
[71]	0%	0,25%	Таинственные абзимы. http://elibrary.ru	28 Авг 2006	eLIBRARY.RU	0	1	
[72]	0,24%	0,24%	Природные каталитически активные антитела при вирусных и бактериальных инфекциях + " - скачать бесплатно автореферат диссертации по " + биологии + ", специальность " + Биохимия http://earthpapers.net	05 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	1	1	
[73]	0%	0,23%	Общие новости (1/4) https://tvgm.ru	23 Июл 2020	Интернет Плюс	0	1	
[74]	0%	0,23%	Общие новости https://tvgm.ru	26 Мая 2020	Интернет Плюс	0	1	
[75]	0%	0,23%	Сергеева Марина Глебовна - пользователь, сотрудник ИСТИНА – Интеллектуальная Система Тематического Исследования НАукометрических данных https://istina.msu.ru	12 Мар 2021	Интернет Плюс	0	1	
[76]	0%	0,23%	Общие новости https://tvgm.ru	27 Ноя 2020	Интернет Плюс	0	1	
[77]	0%	0,23%	Зубова, Анна Владимировна Липопротеины плазмы крови и активность матриксных металлопротеиназ при сахарном диабете 2 типа : диссертация ... кандидата биологических наук : 03.01.04 Новосибирск 2020 http://dlib.rsl.ru	16 Июн 2021	Сводная коллекция РГБ	0	1	
[78]	0%	0,23%	II объединенный научный форум, VI съезд физиологов СНГ, VI съезд биохимиков России, IX Российский симпозиум «Белки и пептиды» http://stavropol.bezformata.com	20 Мая 2020	СМИ России и СНГ	0	1	
[79]	0%	0,23%	ВКР_МасамрехРА.pdf	27 Мая 2020	Кольцо вузов	0	1	
[80]	0,22%	0,22%	Системная красная волчанка: моноклональные легкие цепи иммуноглобулинов против основного белка миелина, обладают протеолитической и ДНКазной активностью. http://elibrary.ru	27 Дек 2016	Перефразирования по eLIBRARY.RU	1	1	
[81]	0%	0,21%	Амилолитическая активность каталитических антител http://dslib.net	02 Сен 2021	Интернет Плюс	0	2	
[82]	0%	0,21%	ЧАСТОТА НОСИТЕЛЬСТВА КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА Сур2С19 У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ ИЗ ЦЕНТРАЛЬНОЙ, ВОСТОЧНОЙ, СЕВЕРНОЙ СИБИРИ И МОСКОВСКОГО РЕГИОНА https://e.lanbook.com	22 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	1	
[83]	0%	0,21%	141945 http://biblioclub.ru	18 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	
[84]	0%	0,21%	Противоопухолевое средство тритерпеновой природы, полученное путем модификации глицирретовой кислоты. Патент РФ 2401273 http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	
[85]	0%	0,2%	II Объединенный научный форум: VI Съезде биохимиков России и IX Российском симпозиуме «Белки и пептиды» http://tver.bezformata.com	20 Мая 2020	СМИ России и СНГ	0	2	
[86]	0%	0,19%	Биохимики нашли связь дефектов стволовых клеток с аутоиммунными заболеваниями https://gazeta.ru	18 Дек 2018	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[87]	0%	0,19%	СУБТИЛИЗИНОПОДОБНАЯ ПРОТЕИНАЗА, СЕКРЕТИРУЕМАЯ ШТАММОМ « <i>Bacillus pumilus</i> » КММ 62 НА РАЗНЫХ ФАЗАХ РОСТА. http://elibrary.ru	09 Янв 2012	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[88]	0%	0,17%	Учёные провели исследование о том, у кого больше всего антител к COVID-19 — RT на русском https://russian.rt.com	02 Сен 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[89]	0%	0,16%	Ссылка на методические и иные документы, разработанные РГУФКСМиТ для обеспечения	02 Сен 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент

			образовательн ого процесса https://sportedu.ru					пересечения.
[90]	0%	0,16%	Отзыв научного руководителя по научно-квалификационной работе (диссертации) аспиранта _ (Ф. И. О. полностью) кафедры _ (полностью) на тему _ и подготовленном научном докладе об основных результатах выполненной научно-квалификационной работы (диссертация... https://pandia.ru	22 Июн 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[91]	0%	0,16%	Аспирантура https://1spbgmu.ru	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[92]	0%	0,16%	АСПИРАНТЫ ВОРОНЕЖСКОГО ГАУ ПОЛУЧИЛИ ЗАВЕТНЫЕ ДИПЛОМЫ http://voronej.bezformata.com	17 Авг 2019	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[93]	0%	0,15%	Природные иммуноглобулины с нуклеазными активностями + " - скачать бесплатно автореферат диссертации по " + биологии + ", специальность " + Биохимия http://earthpapers.net	02 Сен 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[94]	0%	0,15%	Научные подразделения https://igmn.nsc.ru	05 Окт 2020	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[95]	0%	0,13%	Качество и стойкость в хранении сгущенного молока с сахаром в зависимости от бактериальной обсемененности молока диссертация по технологии продовольственных продуктов, скачайте бесплатно автореферат диссертации на тему "Технология мясных, молочных и рыб... http://tekhnosfera.com	09 Апр 2019	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[96]	0%	0,13%	Диссертация на тему «Эффективность использования селенсодержащего препарата ДАФС-25 и кормовой добавки "Бенут" при производстве свинины в условиях промышленного комплекса», скачать бесплатно автореферат по специальности ВАК РФ 06.02.04 - Частная зоотехн... https://dissercat.com	02 Сен 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[97]	0%	0,12%	http://www.misd.ru/guide/scientific_council/applicants_info/Shakhtorin_diccertasiya.pdf http://misd.ru	23 Мая 2019	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[98]	0%	0,11%	ХОРИОНИЧЕСКИЙ ГОНАДОТРОПИН КАК ФАКТОР, РЕГУЛИРУЮЩИЙ ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ Т-КЛЕТОК ИММУННОЙ ПАМЯТИ. http://elibrary.ru	16 Фев 2017	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[99]	0%	0,1%	Информационная значимость мониторинга популяций CD4+ Т-лимфоцитов в диагностике и прогнозировании реакции организма на трансплантат. http://elibrary.ru	26 Дек 2013	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчет о проверке текста научно-квалификационной работы на
объем заимствования

Компанеец Иван Юрьевич

«Гидролитические активности иммуноглобулинов классов G и A молока
человека»

Оригинальность работы составляет ___83.83___ %, что соответствует требованиям порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на итоговом заседании Государственной итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь ГЭК - к.б.н. С.К. Гапонова