

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

На правах рукописи

Савиновская Юлия Ивановна

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы

ВЛИЯНИЕ МИКРОВЕЗИКУЛ И ЭКЗОСОМ КРОВИ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В
КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Направление подготовки

06.06.01 Биологические науки

Направленность

03.01.03 Молекулярная биология

Научный руководитель:

к.х.н., доцент Семенов Дмитрий Владимирович

Новосибирск–2019

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В настоящее время известно, что в крови млекопитающих кроме форменных элементов - эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов и др. - циркулирует множество мембранных микро- и нановезикул: экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца. Ранее предполагали, что мембранные везикулы являются результатом процессов удаления клетками побочных продуктов жизнедеятельности. Однако, в последнее десятилетие внеклеточные везикулы (ВВ) были признаны эффективными посредниками межклеточных коммуникаций как у прокариот, так и у эукариот. Это связано со способностью ВВ переносить белки, ДНК, РНК, липиды и метаболиты клеток-доноров к клеткам-реципиентам, модулируя в последних различные физиологические и патологические процессы (Yáñez-Mó M. et al. Extracell Vesicles. 2015. Vol. 4, № 1. P. 27066).

Предполагают, что высокая эффективность доставки биомолекул мембранными везикулами обусловлена тем, что везикулы вовлечены в функционирование “нативных” (естественных) механизмов захвата и интернализации клетками внеклеточных соединений. Понимание механизмов межклеточных коммуникаций, опосредованных внеклеточными везикулами, позволяет использовать потенциал этих процессов для векторной доставки терапевтических соединений, создания диагностических систем или, в более общем случае, для модуляции клеточных процессов *in vivo* (Marcus M.E. et al. Pharmaceuticals. 2013. Vol. 6, № 5. P. 659–680).

В современных клинических исследованиях установлено, что внеклеточные везикулы, секретлируемые дендритными клетками, стимулируют иммунную систему и могут быть использованы в качестве противоопухолевых вакцин. Внеклеточные везикулы, полученные из мезенхимальных стволовых клеток, были успешно протестированы на животных моделях для лечения острой почечной недостаточности, инфаркта миокарда и ишемии (Collino F. et.al. Stem Cell Rev. 2017. Vol. 16 № 2. P. 226-243).

Вместе с тем, молекулярные механизмы процессов, активируемых или подавляемых в клетках-реципиентах при взаимодействии с ВВ, в настоящее время исследованы лишь частично.

Цель и задачи исследования:

Целью данной работы является анализ влияния мембранных частиц крови человека на жизнеспособность, пролиферацию и экспрессию генов в клетках аденокарциномы легких линии A549.

В ходе работы необходимо решить следующие задачи:

1. Получить препараты мембранных частиц крови здоровых доноров и провести анализ их размера методами динамического светорассеяния, анализа траектории частиц и просвечивающей электронной микроскопии;
2. Провести анализ белков препаратов мембранных частиц крови здоровых доноров, осаждаемых при усилиях 160 000 g;
3. Определить влияние препаратов мембранных частиц крови здоровых доноров на жизнеспособность и индукцию апоптотических процессов в клетках аденокарциномы легких человека линии A549;
4. Провести анализ наборов РНК препаратов мембранных частиц крови здоровых доноров методом высокоэффективного параллельного секвенирования;
5. Провести полнотранскриптомный анализ изменений уровней РНК в клетках линии A549 под действием препаратов мембранных частиц крови человека.

Научная новизна и практическая значимость работы. Известно, что в крови человека циркулирует множество мембранных частиц: экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца. Известно также, что мембранные везикулы крови содержат нуклеиновые кислоты - РНК и ДНК. Детально описан состав коротких РНК (микроРНК, мяоРНК, мцРНК) мембранных частиц крови. Однако состав протяженных форм – фрагментов мРНК, днРНК и кцРНК в настоящее время исследован лишь частично. Кроме того, в современной литературе отсутствуют данные о молекулярных процессах, модулируемых в клетках человека циркулирующими мембранными частицами крови.

В данной работе получены препараты частиц крови здоровых доноров и установлено, что препараты частиц крови человека, осаждаемых при 160 000 g, содержат мембранные частицы с гидродинамическим диаметром от 80 до 400 нм. В мембранных частицах крови, осаждаемых при 160 000 g, выявлены антигены CD3, CD41a, CD79a и маркер экзосом – CD63, а также альфа-2-макроглобулин (A2M); белок, подобный мембранному белку эритроцитов band 2 (EPB41L4A); кератин I типа (KRT18); антиген Т-клеток CD4; ELKS/RAB6-взаимодействующий белок семейства CAST (ERC2) и ряд других белков клеток человека. Установлено, что мембранные частицы крови человека содержат РНК длиной 30 - 200 нуклеотидов. Инкубация клеток аденокарциномы легких линии A549 с препаратами мембранных частиц крови человека сопровождается снижением жизнеспособности клеток до 50%. При этом, ряд препаратов мембранных частиц крови здоровых доноров повышал жизнеспособность клеток A549 в 1.5 раза.

Протяженные ($n > 30$ н.) РНК мембранных частиц крови человека представлены фрагментами рРНК, тРНК, мяРНК, мцРНК, транскрибируемых геномных повторов,

мтРНК и множеством фрагментов мРНК и днРНК. Мажорные РНК мембранных частиц крови представлены мРНК, кодирующими гемоглобин, ферритин, тимозин и другие белки, характерные для форменных элементов крови. Набор из 200 наиболее представленных мРНК мембранных частиц обогащен формами, кодирующими белки рибосом, а также белки фокальной адгезии и секреторных гранул. Кроме того, достоверно повышен вклад мРНК, кодирующих белки циркулирующих мембранных частиц – экзосом, внеклеточных везикул и внеклеточных органелл.

На ранних этапах (6 ч) инкубации клеток A549 с мембранными частицами крови человека происходит повышение уровня мРНК, транскрипция которых контролируется факторами семейства NF-каппа В и кодирующих компоненты NF-каппа В сигнального каскада. Гены вторичного ответа, экспрессия которых активируется после 24 ч инкубации клеток A549 с мембранными частицами крови, контролируются не только NF-каппа В, но и такими факторами транскрипции, как REST, SMC3 и HIF1A. Продукты этих генов участвуют в гликолизе, сборке внеклеточного матрикса, регуляции клеточной адгезии, регуляции процессов программируемой клеточной гибели.

Полученные в данной работе результаты могут быть использованы для поиска новых диагностических маркеров, а также для разработки новых средств векторной доставки терапевтических соединений.

Личный вклад автора. Все основные эксперименты были выполнены автором самостоятельно. Культивируемые клетки человека предоставлены м.н.с. ЛБТ ИХБФМ СО РАН Нуштаевой А.А. Анализ ПЭМ проведен в ГМИ ИХБФМ СО РАН, д.б.н. Рябчиковой Е.И. Конструирование кДНК-библиотеки и секвенирование ДНК проводили на станции Illumina HiSeq 1500 (ЗАО «Геноаналитика», Москва). Биоинформационный анализ данных высокопроизводительного секвенирования проводился совместно с научным руководителем работы к.х.н., доцентом ЛБТ ИХБФМ СО РАН Семеновым Д.В.

Публикации и апробация работы. По результатам работы опубликовано 7 тезисов. Результаты работы были представлены на II Всероссийской конференции с международным участием "Высокопроизводительное секвенирование в геномике" (Новосибирск, Россия, 2017), Международном форуме Биотехнология: состояние и перспективы развития (Москва, Россия, 2018), International Workshop "Targeting RNA World" (Saint-Petersburg, Russia, 2018), Всероссийской мультikonференции с международным участием Биотехнология – медицине будущего (Новосибирск, Россия, 2019).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Получение препаратов мембранных частиц из крови здоровых доноров и анализ содержания белка и РНК в составе мембранных частиц

В настоящее время предложено множество методов выделения мембранных частиц из биологических жидкостей человека и культуральной среды, конденсированной клетками млекопитающих, в том числе: дробное центрифугирование; центрифугирование в градиенте плотности сахарозы; гель-фильтрация; осаждение с использованием коммерческих реагентов "ExoQuick" (System Biosciences); аффинная хроматография на сорбентах с антителами или лектинами к поверхностным маркерам мембран и другие.

В данной работе для выделения мембранных частиц из крови человека использовали метод центрифугирования с последующим ультрацентрифугированием, согласно схеме, представленной на Рис. 1.

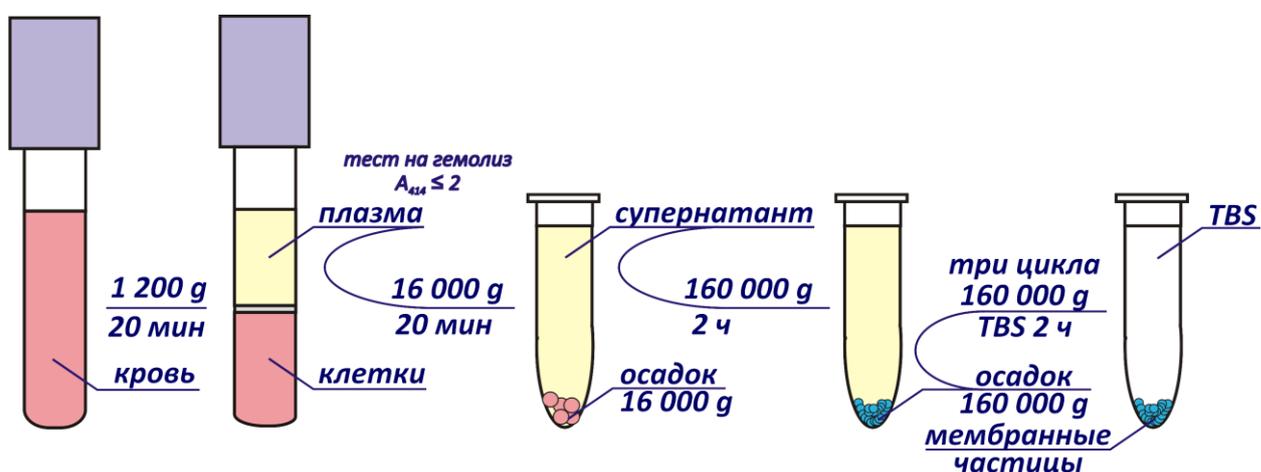


Рис. 1. Схема выделения мембранных частиц из крови здоровых доноров.

Для этого использовали препараты крови доноров без выявленных онкологических, аутоиммунных, инфекционных заболеваний, без обострения хронических заболеваний. Всего было использовано 32 препарата крови человека, обоих полов, в возрасте от 25 – 63 лет. Препараты крови были получены в Центре новых медицинских технологий СО РАН (лаборатория технологий управления здоровьем, зав. лаб., д.м.н. Морозов В.В.).

Препараты крови центрифугировали 20 мин при 1 200g, с получением осадка форменных элементов и плазмы крови. При этом проводили оценку гемолиза по оптическому поглощению гемоглобина на длине волны 414 нм и использовали препараты плазмы крови с индексом гемолиза < 2 . Полученный супернатант (плазму крови) центрифугировали 20 мин при 16 000g, с получением осадка мембранных частиц и

клеточного дроба. Супернатант, полученный при усилиях 16 000g, ультрацентрифугировали 2 ч при 160 000g. Полученные препараты мембранных частиц подвергли дополнительной очистке с помощью трех последовательных ультрацентрифугирований при 160 000g в TBS-буфере с 0,5 мМ ЭДТА (Рис. 1).

В полученных препаратах мембранных частиц определяли содержание белка и РНК с использованием наборов Qubit Protein Assay Kit, Qubit RNA HS Assay Kit и флуориметром Qubit (Invitrogen, США). Полученные препараты мембранных частиц содержали ~ от 1 до 10 нг белка/мл и ~ от 0,3 до 1 нг РНК /мл плазмы.

2. Анализ размера препаратов мембранных частиц крови методами динамического светорассеяния, анализа траектории частиц и просвечивающей электронной микроскопии

Известно, что мембранные частицы такие как: экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца различаются по размерам. Диаметр экзосом варьирует в диапазоне от 30 до 100 нм, микровезикул от 50 до 2000 нм и апоптотических телец от 50 до 5000 нм (Simpson R.J. et al. Journal of Proteomics and Bioinformatics. – 2012. – V. 2012. – doi: 10.4172/jpb.10000e10). Из Рис. 2, видно, что по данным динамического светорассеяния препараты мембранных частиц крови содержат две популяции частиц с гидродинамическим диаметром 50–200 и 300–1000 нм.

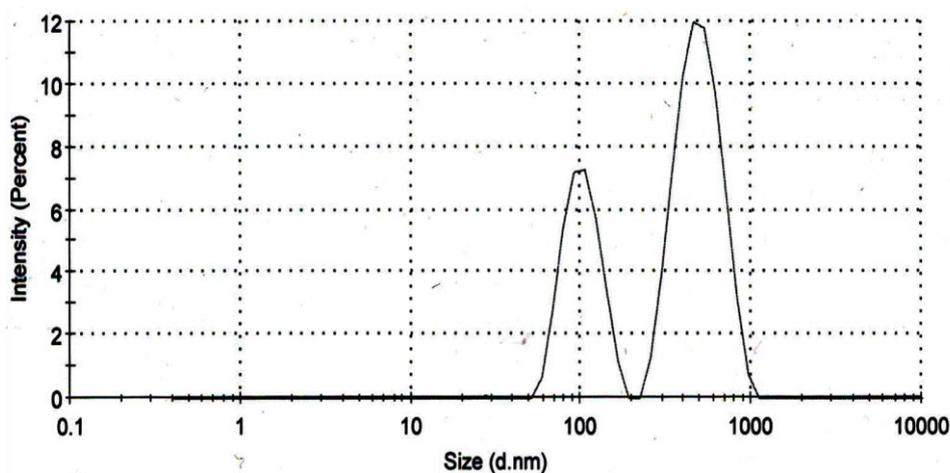


Рис. 2. Распределение мембранных частиц крови человека по размеру, определенное с помощью динамического светорассеяния (на приборе Malvern Zetasizer Nano ZS, Великобритания).

Кроме того, для анализа размеров мембранных частиц и оценки их концентрации в препаратах использовали метод анализа траектории частиц (Nanoparticle Tracking Analysis – NTA). По данным анализа траектории мембранных частиц, полученные препараты

содержат несколько субпопуляций частиц с гидродинамическим диаметром ~85, 155, 255 и 350-400 нм. При этом наибольший вклад вносит субпопуляция частиц со средним размером ~ 85 нм (Рис. 3). Полученные данные позволяют оценить выход использованного метода выделения и очистки мембранных частиц крови, который составляет $20-35 \cdot 10^3$ частиц/мкл плазмы.

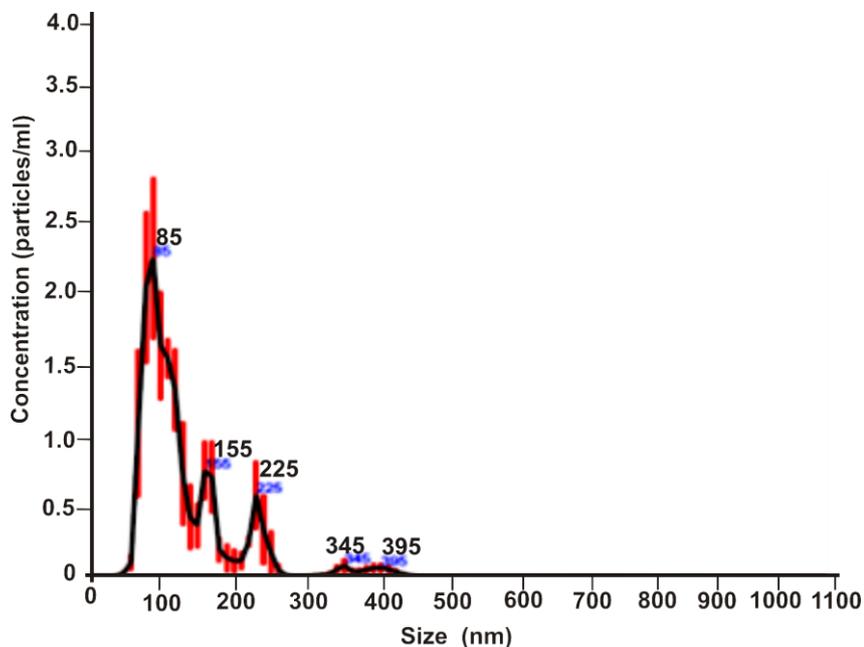


Рис. 3. Распределение мембранных частиц крови человека по размеру, определенное с помощью анализа траектории частиц NTA (на приборе NanoSight LM10, Malvern Panalytical, Великобритания).

Одним из наиболее информативных методов анализа препаратов мембранных частиц - микровезикул и экзосом является метод просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Из данных анализа препаратов частиц плазмы крови ПЭМ видно, что во фракции частиц, осаждаемых при 16 000g, присутствуют не только мембранные частицы, но и митохондрии, а также клеточный дебрис (Рис. 4, А). При этом препараты очищенных мембранных частиц крови (фракции 160 000g, Рис. 4, Б) не содержат митохондрий, и представлены наборами частицы, размер которых варьирует в диапазоне от 50 до 150 нм.

В целом эти данные позволяют заключить, что препараты мембранных частиц крови (160 000g - фракции) содержат частицы диаметром ~ 100 нм, которые можно отнести к экзосомам, а также более крупные частицы, размер которых по данным литературы соответствует таковому микровезикул.

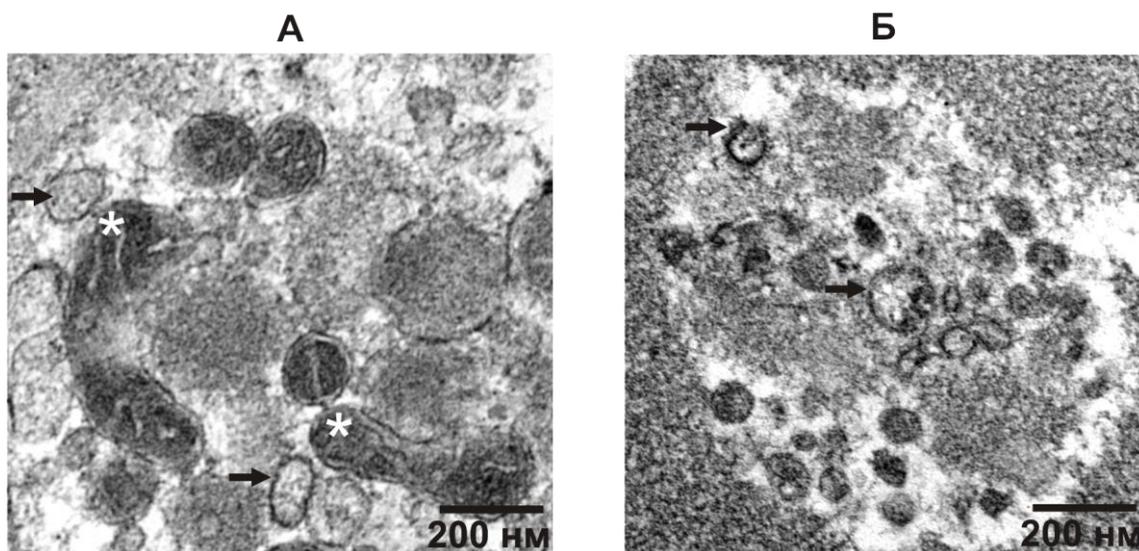


Рис. 4. Данные просвечивающей электронной микроскопией ультратонких срезов препаратов мембранных частиц. Препараты мембранных частиц, полученные центрифугированием плазмы крови при усилиях 16 000g (А) и 160 000g (Б). Черными стрелками обозначены мембранные частицы, звездочками обозначены митохондрии. Анализ ПЭМ проведен в ГМИ ИХБФМ СО РАН, д.б.н. Рябчикова Е.И.

3. Анализ белков и РНК препаратов мембранных частиц крови методами MALDI-TOF масс-спектрометрии, проточной цитофлуориметрии и методом капиллярного электрофореза

Известно, что в состав мембранных частиц крови входит множество структурных и регуляторных белков в том числе: тетраспанины CD63; CD9; CD81; CD82; белки теплового шока Hsp 70 и Hsp 90, белки главного комплекса гистосовместимости МНС I и II, белки клеточной адгезии – интегрины, белки цитоскелета – актин, тубулин, костимулирующий белок CD40, селектин CD62 и др.

В данной работе, для того чтобы охарактеризовать наборы белков в препаратах мембранных частиц крови человека белки подвергали трипсинолизу, а продукты трипсинолиза анализировали MALDI-TOF масс-спектрометрией. В препаратах частиц были выявлены следующие индикаторные белки: альфа-2-макроглобулин (A2M); белок, подобный мембранному белку эритроцитов band 2 (EPB41L4A); кератин I типа (KRT18); антиген Т-клеток CD4; ELKS/RAB6-взаимодействующий белок семейства CAST (ERC2); актин-связывающий Rho-активируемый белок (ARBA); GTP циклогидролаза 1 (GCH1); компонент 2-оксоглутарат дегидрогеназы; дигидролипоиллизин сукцинил трансферазы

(ODO2); фактор роста фибробластов 16 (FGF16); компонент лизосомного комплекса 1 субъединица 3 (BLOC1S3); синтаксин 2 (STX2); протокадгерин альфа 8 (PCDNA8).

Известно, что мембранные частицы секретируются клетками различных типов. Маркеры на поверхности мембран частиц схожи с маркерами мембраны родительской клетки. С использованием метода проточной цитофлуориметрии можно оценить клеточное происхождение мембранных частиц, идентифицировать и количественно определить поверхностные маркеры клеток.

Для того чтобы оценить антигенный состав мембранных частиц методом проточной цитофлуориметрии проведен анализ белковых маркеров мембранных частиц крови с использованием наборов антител к следующим антигенам: CD63 – трансмембранному белку экзосом/эндосом клеток; антигену Т-клеток – CD3; антигену В-клеток – CD79a; антигену тромбоцитов - CD41a.

Таблица 1. Анализ содержания белковых маркеров в препаратах мембранных частиц, полученных центрифугированием плазмы крови здоровых доноров при усилиях 160 000g.

Маркеры	Содержание, %
CD63	$\sim 51.4 \pm 12$
CD3	$\sim 51 \pm 22$
CD79a	$\sim 5.0 \pm 3.5$
CD41a	$\sim 43.6 \pm 11$

Установлено, что набор очищенных мембранных частиц крови, полученных центрифугированием плазмы при 16 000 g с последовательной серией из трех ультрацентрифугирований при 160 000 g, содержит частицы с маркером тромбоцитов/мегакариоцитов (~43%), Т-клеток (~50%), В-клеток (~5%). ~50% очищенных частиц крови несут маркеры экзосом CD63 (Таблица 1).

Из препаратов очищенных мембранных частиц крови была выделена суммарная РНК (методом экстракции с реагентом Trizol LS и осаждением из водно-спиртовых растворов), и проведен анализ распределения форм РНК по длинам нуклеотидных цепей методом капиллярного электрофореза на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США).

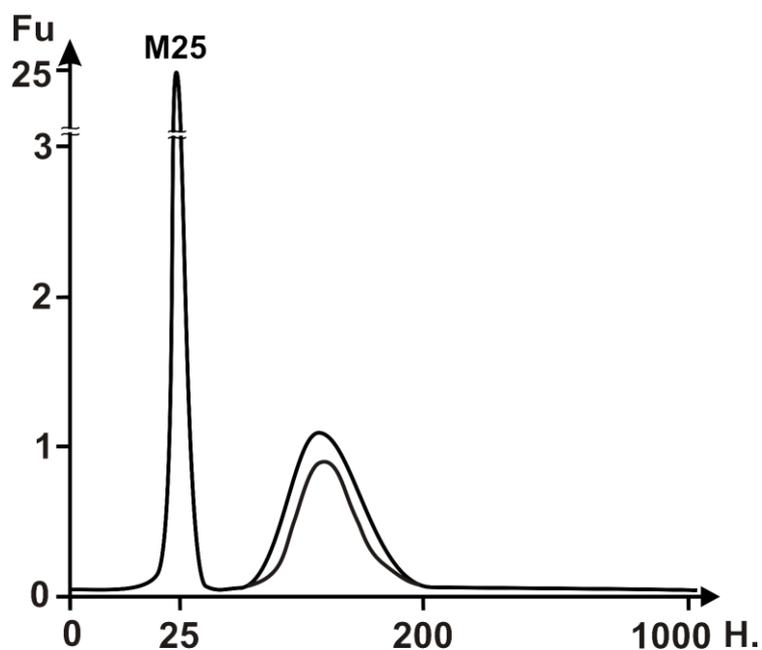


Рис. 5. Распределение РНК мембранных частиц крови человека по длинам нуклеотидных цепей, определенное капиллярным электрофорезом на Bioanalyzer 2100, Agilent. M25 –маркер электрофоретической подвижности РНК.

Из данных Рис. 5 можно заключить, что РНК мембранных частиц крови представлена набором форм, длина которых, варьирует в диапазоне от 30 до 200 н. с максимумом на ~ 100 н.

4. Определение влияния препаратов мембранных частиц на жизнеспособность и апоптотические изменения в клетках аденокарциномы легких человека линии A549

Известно, что мембранные частицы способны модулировать жизненно-важные процессы в клетках-реципиентах (пролиферация, дифференцировка, апоптоз и др.). Однако механизмы действия мембранных частиц на клетки человека в настоящее время исследованы лишь частично (Yáñez-Mó M. et al. *Extracell Vesicles*. 2015. Vol. 4, № 1. P. 27066).

Для того чтобы оценить влияние мембранных частиц крови на жизнеспособность клеток в данной работе использовали клетки аденокарциномы легких человека линии A549. Анализ действия препаратов мембранных частиц крови на клетки проводили после предкультивирования клеток в среде без эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота для того, чтобы исключить влияние собственных мембранных частиц этого компонента культуральной среды.

Для того чтобы оценить влияние мембранных частиц крови на жизнеспособность клеток аденокарциномы легких человека линии A549, инкубированных в присутствии препаратов мембранных частиц, использовали метод МТТ–теста. Клетки аденокарциномы легких человека линии A549 инкубировали с препаратами мембранных частиц в течение 48 и 72 ч. Установлено, что препараты мембранных частиц от разных доноров оказывают различное действие на клетки A549 (Рис. 6).

Видно, что часть препаратов мембранных частиц крови вызывала снижение жизнеспособности клеток на 30 и 50% (Рис. 6, II и I, соответственно). При этом серия препаратов вызывала повышение МТТ-индекса клеток A549 до 150% (Рис. 6, III).

В целом эти данные позволяют заключить, что вариабельность состава препаратов мембранных частиц и их компонентов оказывает существенное влияние на жизнеспособность клеток в культуре, при этом ответ клеток варьирует в широком диапазоне от снижения до повышения активности метаболических процессов и жизнеспособности.

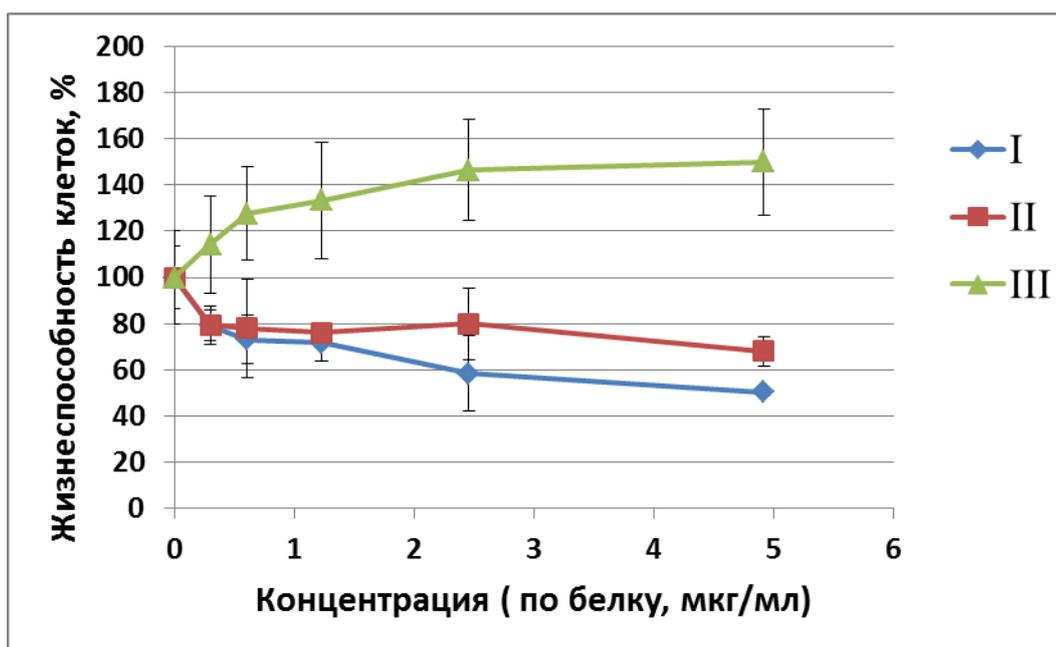


Рис. 6 Изменения жизнеспособности клеток аденокарциномы легких человека линии A549, инкубированных в среде с препаратами мембранных частиц крови (МТТ-тест). Кривые I, II и III соответствуют изменениям МТТ-индекса клеток при инкубации в среде с препаратами частиц крови трех различных доноров.

Известно, что в апоптотических клетках фосфатидилсерин (PS) транслоцируется с внутренней стороны плазматической мембраны на внешнюю. Аннексин V имеет высокое

сродство к PS и связывается с клетками. Аннексин V может быть ковалентно-модифицирован флуорохромами, включая FITC. Окраска клеток FITC-аннексин V указывает на нарушение ассиметрии клеточной мембраны и предшествует индукции проницаемости цитоплазматической мембраны, которая сопровождает последние стадии гибели клеток в результате апоптотических или некротических процессов. Поэтому окрашивание с помощью FITC- аннексин V обычно используют в сочетании с витальным красителем, таким как пропидий йодид (PI), чтобы идентифицировать ранние апоптотические клетки (PI⁻, аннексин V⁺).

Методом проточной цитофлуориметрии с красителями FITC-аннексин V и пропидий йодид (PI) оценивали влияния препаратов мембранных частиц на активацию апоптотических изменений в клетках аденокарциномы легких человека A549. Из данных Рис. 7 видно, что под действием препарата мембранных частиц 1 (МЧ 1) происходит активация апоптотических процессов в клетках A549. При этом для ряда препаратов мембранных частиц не выявлено достоверного влияния на апоптотические изменения мембран клеток в культуре, как это показано для препарата МЧ 2 (Рис. 7).

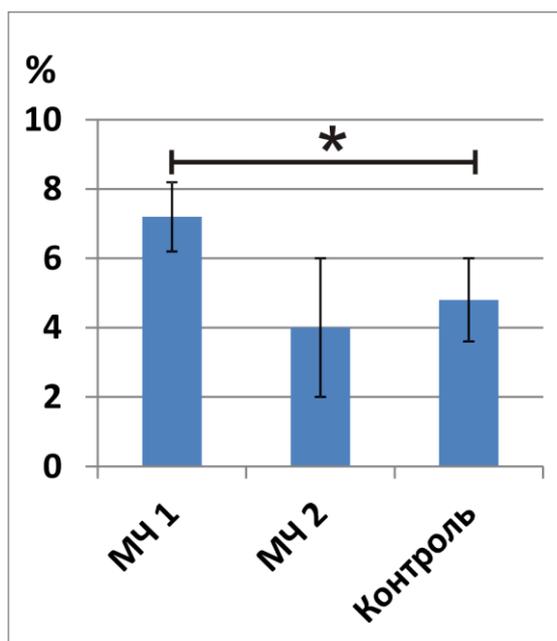


Рис. 7. Анализ апоптотических изменений в клетках A549 под действием мембранных частиц крови человека методом проточной цитофлуориметрии. По оси ординат отложен вклад клеток, окрашенных с помощью FITC-аннексин V и PI в общую популяцию клеток A549. МЧ 1, МЧ 2 – репрезентативные препараты мембранные частицы крови различных доноров. * – $p_{ст} < 0.05$.

В целом, полученные данные указывают на то, что различия во влиянии препаратов мембранных частиц на жизнеспособность и апоптотические изменения клеток

аденокарциномы легких человека линии A549, могут быть обусловлены различиями в составе препаратов частиц и их компонентов.

5. Анализ наборов РНК мембранных частиц крови человека методом высокоэффективного параллельного секвенирования

Для того чтобы охарактеризовать отдельные формы и целые классы РНК, РНК мембранных частиц крови (Рис. 5) использовали для конструирования полнотранскриптомных кДНК-библиотек. Полученные библиотеки секвенировали на станции Illumina HiSeq 1500 (ЗАО "Генноаналитка", Москва).

Для двух независимых реплик препарата мембранных частиц (обозначенных нами как D1 и D2) было получено 3.4 и 4.3 млн экспериментальных последовательностей РНК, совпадающих или гомологичных геному/транскриптому человека. Необходимо отметить, что при конструировании полнотранскриптомных кДНК-библиотек в секвенных библиотеках присутствуют в основном ДНК-копии протяженных форм РНК – рРНК, мРНК и днРНК, а короткие формы (микроРНК и мярРНК) представлены в библиотеках только единичными копиями.

Таблица 2. Вклад основных классов РНК человека в общий набор РНК мембранных частиц.

Класс РНК	Препарат D1	Препарат D2	Среднее
рРНК	3 126 571 (72.16%)	2 457 922 (71.87%)	2 792 246.5 (72.02%)
тРНК, U1-U12 мярРНК, УРНК, мцРНК, транскрибируемые геномные повторы	95 427 (2.20%)	84 643 (2.47%)	90 035 (2.33%)
Митохондриальные транскрипты	23 213 (0.53%)	27 388 (0.80%)	25 300.5 (0.66%)
Транскрипты генома человека (<i>hg19</i>) аннотированные и не аннотированные в базе RefSeq RNA (мРНК, днРНК, кцРНК и др.)	1 087 172 (25.09%)	849 674 (24.84%)	968 423 (24.97%)
Всего	4 332 383 (100%)	3 419 627 (100%)	3 876 005 (100%)

Из данных таблицы 2 видно, что мембранные частицы крови здоровых доноров содержат рибосомные РНК до 72%. Вклад протяженных транскриптов ядерного генома человека – мРНК и днРНК составляет ~25%.

Наиболее информативными являются данные об отдельных мРНК анализ наборов которых, в мембранных частицах крови, позволяет оценить функции их белковых

продуктов и выявить биологические процессы, потенциально модулируемые этими частицами.

Таблица 3. 15 мажорных мРНК мембранных частиц крови человека.

№	Репрезентативный идентификатор в базе RefSeq	Идентификатор гена	Средний FPKM*	Названия
1.	NM_000518	HBB	6 551	hemoglobin subunit beta
2.	NM_000146	FTL	2 765	ferritin light chain
3.	NM_000999	RPL38	2 304	ribosomal protein L38
4.	NM_021103	TMSB10	1 821	thymosin beta 10
5.	NM_001015	RPS11	1 762	ribosomal protein S11
6.	NM_000998	RPL37A	1 729	ribosomal protein L37a
7.	NM_000517	HBA2	1 614	hemoglobin subunit alpha 2
8.	NM_000973	RPL8	1 465	ribosomal protein L8
9.	NM_000558	HBA1	1 405	hemoglobin subunit alpha 1
10.	NM_002032	FTH1	1 363	ferritin heavy chain 1
11.	NM_001003	RPLP1	1 351	ribosomal protein lateral stalk subunit P1
12.	NM_001101	ACTB	1 253	actin beta
13.	NM_001020	RPS16	1 241	ribosomal protein S16
14.	NM_001024	RPS21	1 217	ribosomal protein S21
15.	NM_001016	RPS12	1 107	ribosomal protein S12

*- Fragment count per kilobase per million.

Из данных таблицы 3 видно, что мРНК мембранных частиц кодируют мажорные цитоплазматические белки форменных элементов и клеток крови человека субъединицы гемоглобина, ферритин, тимозин бета, актин и белки рибосом.

Для того чтобы определить основные характеристики набора мРНК в данной работе использовали платформу Enrichr, которая позволяет анализировать списки мРНК/белков или генов человека с использованием набора из 154 библиотек, связанных текстовыми аннотациями. Видно, что набор из 200 мажорных РНК мембранных частиц обогащен мРНК, транскрипция которых контролируется транскрипционными факторами RBMX, NFKB1, SP1 и другими (по данным анализа Enrichr с библиотекой TRRUST_Transcription_Factors_2019, Таблица 4).

Таблица 4. Анализ свойств набора из 200 наиболее представленных мРНК мембранных частиц крови человека на платформе Enrichr (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>).

Enrichr Library/Terms	Overlap	P-value	Adjusted P-value
TRRUST_Transcription_Factors_2019			
RBMX_human	4/8	5.83E-07	3.33E-04
NFKB1_human	14/303	1.64E-06	4.69E-04
SP1_mouse	13/270	2.48E-06	4.72E-04
STAT3_human	9/142	1.04E-05	0.001483523
RELA_human	12/301	3.98E-05	0.004547924
ENCODE_and_ChEA_Consensus_TFs_from_ChIP-X			
TAF7_ENCODE	67/640	6.74E-51	7.01E-49
MYC_CHEA	59/573	5.06E-44	2.63E-42
NELFE_ENCODE	42/234	2.58E-41	8.95E-40
ATF2_ENCODE	101/2852	1.06E-35	2.76E-34
PML_ENCODE	78/1596	1.51E-35	3.15E-34
WikiPathways_2016			
Cytoplasmic Ribosomal Proteins_Homo sapiens_WP477	57/89	2.43E-95	1.06E-92
Cytoplasmic Ribosomal Proteins_Mus musculus_WP163	47/70	8.62E-80	1.88E-77
Histone Modifications_Homo sapiens_WP2369	11/66	3.63E-11	5.29E-09
mRNA processing_Mus musculus_WP310	20/398	2.12E-09	2.31E-07
Oncostatin M Signaling Pathway_Homo sapiens_WP2374	8/65	2.13E-07	1.86E-05
GO_Cellular_Component_2017b			
cytosolic large ribosomal subunit (GO:0022625)	33/68	4.37E-49	3.56E-46
cytosolic small ribosomal subunit (GO:0022627)	26/56	4.13E-38	1.69E-35
focal adhesion (GO:0005925)	44/356	5.87E-36	1.60E-33
small ribosomal subunit (GO:0015935)	9/13	4.36E-16	8.89E-14
cytosolic ribosome (GO:0022626)	12/41	3.04E-15	4.96E-13
ribosome (GO:0005840)	11/33	8.64E-15	1.17E-12
polysomal ribosome (GO:0042788)	12/64	1.04E-12	1.21E-10
secretory granule lumen (GO:0034774)	11/115	1.59E-08	1.62E-06
chromaffin granule lumen (GO:0034466)	11/115	1.59E-08	1.44E-06
dense core granule lumen (GO:0098898)	11/116	1.74E-08	1.42E-06
Jensen_COMPARTMENTS			
Cytosolic_ribosome	60/107	2.58E-95	5.89E-92
Ribosomal_subunit	60/161	3.07E-81	3.51E-78
Cytosolic_part	62/205	2.45E-77	1.86E-74
Ribosome	62/220	3.88E-75	2.21E-72
Cytosolic_large_ribosomal_subunit	33/58	2.98E-52	1.36E-49
Intracellular_ribonucleoprotein_complex	71/737	1.17E-51	4.47E-49
Ribonucleoprotein_complex	71/738	1.29E-51	4.21E-49
Extracellular_exosome	110/2740	2.98E-45	8.51E-43
Extracellular_vesicle	110/2754	4.94E-45	1.25E-42
Extracellular_organelle	110/2755	5.12E-45	1.17E-42
Human_Gene_Atlas			
WholeBlood	22/514	6.15E-09	5.17E-07
CD33+_Myeloid	24/679	4.77E-08	2.00E-06
FetalThyroid	5/66	4.51E-04	0.012634483

Из результатов анализа Enrichr с библиотекой "ENCODE and ChEA Consensus TFs from ChIP-X" можно заключить, что набор из 200 мажорных РНК мембранных частиц

крови обогащен транскриптами, контролируемые факторами TAF7, c-Myc, NELFE и др. (Таблица 4).

Набор из 200 наиболее представленных мРНК мембранных частиц обогащен мРНК кодирующими белки рибосом, а также белки фокальной адгезии, секреторных гранул и др. Кроме того, в наборе достоверно повышен вклад мРНК, кодирующих белки циркулирующих мембранных частиц - экзосом, внеклеточных везикул и внеклеточных органелл (GO_Cellular_Component_2017b, Jensen_COMPARTMENTS, Таблица 4).

По данным анализа в библиотеке Human_Gene_Atlas можно заключить, что наборы мРНК мембранных частиц обогащены молекулами, характерными для всего набора форменных элементов крови человека, а также CD33+ миелоидных клеток. Эти данные позволяют предположить, что клетки миелоидного ряда вносят основной вклад в формирование пула циркулирующих мембранных частиц крови человека в норме.

6. Полнотранскриптомный анализ изменений уровней РНК в клетках линии A549 под действием препаратов мембранных частиц крови человека

Известно, что мембранные частицы, такие как экзосомы и микровезикулы способны взаимодействовать с цитоплазматической мембраной и проникать внутрь клеток-реципиентов. В зависимости от типа клеток мембранные частицы могут оставаться связанными на плазматической мембране, с последующей активацией поверхностных рецепторов или могут быть интернализированы клатрин-опосредованным эндоцитозом, макропиноцитозом, фагоцитозом, а также через кавеолы и липидные рафты (Guillaume van Niel G. et.al. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2018. Vol. 19, № 4. P. 213–228).

С использованием реакционноспособного аналога флуоресцеина - флуоресцеинизотиоцианата (FITC) нами получены препараты мембранных частиц плазмы крови человека ковалентно-меченных этим красителем. Методом люминисцентной микроскопии было установлено, что после 24 ч инкубации клеток A549 с FITC-мечеными мембранными частицами крови, FITC окрашенные структуры детектируются в цитоплазме клеток реципиентов.

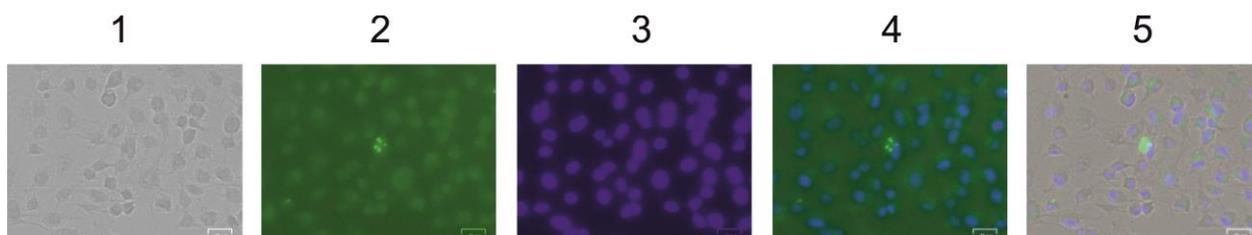


Рис. 8. Интернализация мембранных частиц крови клетками аденокарциномы легких человека линии A549. Клетки A549 инкубировали 24 ч в среде с FITC-мечеными мембранными частицами фиксировали формалином, окрашивали DAPI и анализировали флуоресцентной микроскопией на приборе ZOE (Bio-Rad, США). 1 – клетки A549 в проходящем свете; 2 – флуоресценция FITC-меченных частиц, 3 – флуоресценция ядер клеток (DAPI); 4 – совмещение (суперпозиция) 2 и 3; наложение (суперпозиция) 1, 2 и 3.

Эти данные указывают на то, что при инкубации клеток A549 с мембранными частицами крови человека частицы могут захватываться и интернализироваться клетками.

Известно, что мембранные частицы, доставляя биологически активные молекулы, способны модулировать жизненно-важные процессы в клетках-реципиентах.

Для того чтобы провести анализ молекулярно-биологического действия мембранных частиц крови на клетки человека в культуре, клетки аденокарциномы легких линии A549 культивировали в среде с сывороткой крови эмбрионов крупного рогатого скота. Затем среду удаляли и предкультивировали клетки в среде без сыворотки. После чего клетки инкубировали с препаратами очищенных мембранных частиц крови здоровых доноров в течение 6, 12 и 24 ч. Проводили выделение polyA РНК из контрольных клеток и клеток, инкубированных с мембранными частицами крови. Конструировали кДНК-библиотеки и секвенировали ДНК на станции Illumina HiSeq 1500 (ЗАО «Геноаналитика», Москва). Было получено от 12 до 15 млн экспериментальных последовательностей для каждого из двух биологических повторов, каждой из трех пар опыт/контроль (6, 12 и 24 ч инкубации клеток с частицами).

Выравнивание последовательностей с геномом человека hg19 проводили с помощью HiSAT2 с использованием аннотаций к геному human RefSeq (NCBI). Дифференциальный анализ экспрессии генов проводили с использованием программы CuffDiff из пакета Cufflinks (University of Maryland, Maryland, США).

Установлено, что инкубация клеток A549 с препаратами мембранных частиц крови здоровых доноров в течение 24 ч приводит к изменениям экспрессии ~1500 генов. При этом изменения экспрессии 54 генов могут быть обнаружены уже через 6 ч инкубации (Рис. 9, а).

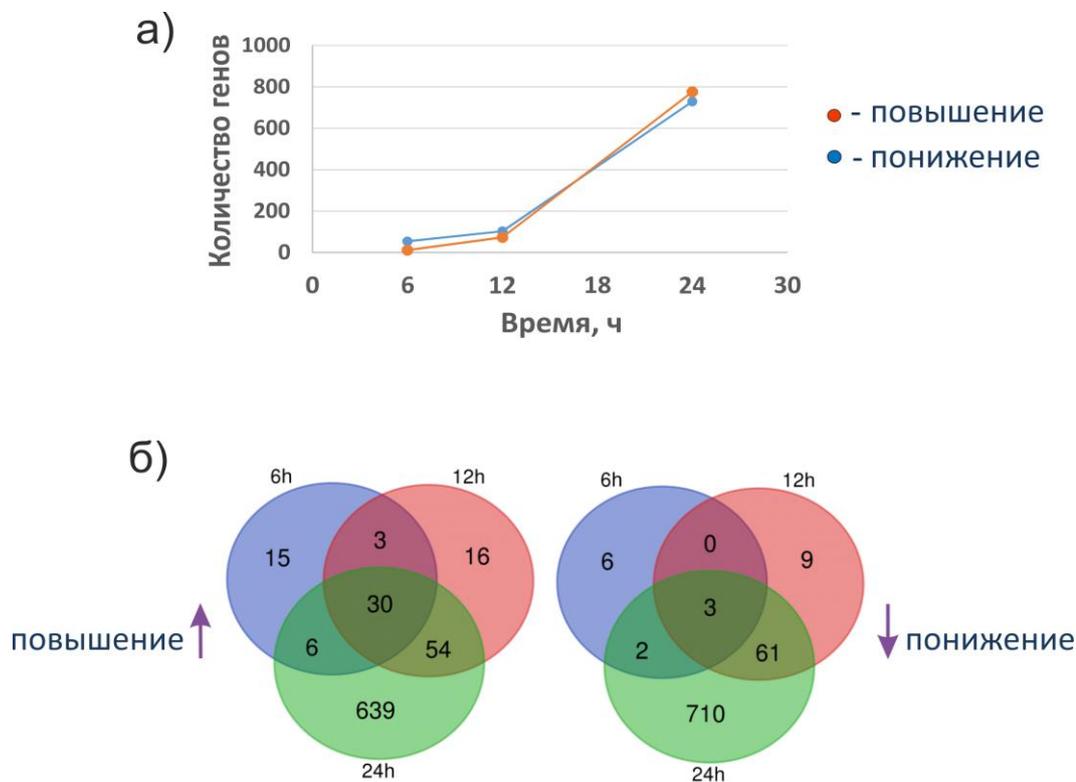


Рис. 9. а) Количество генов, экспрессия которых изменяется в клетках A549 при инкубации с мембранными частицами крови человека. б) Диаграмма Венна для наборов генов, экспрессия которых изменяется в клетках A549, при инкубации с мембранными частицами крови в течение 6, 12 и 24 ч.

Было установлено также, что уровень 30 мРНК повышался через 6 ч и оставался повышенным через 12 и 24 ч инкубации клеток A549 с мембранными частицами крови (Рис 9, б).

Из данных таблицы 5 видно, что в этом списке присутствуют гены хемокинов, интерлейкина 32, а также субъединиц транскрипционного фактора NF- карра В и др. Для того, чтобы охарактеризовать набор мРНК, уровень которых в клетках повышается на ранних этапах (6 ч) инкубации с частицами крови, мы провели анализ этого набора на платформе Enrichr.

Было установлено, что экспрессия этого набора генов контролируется транскрипционным фактором RELA, который относится к семейству NF-карра В (карра-light-chain-enhancer of activated B cells). Кроме того, продукты этих генов участвуют в сигнальном каскаде, взаимодействуют и модулируют активность транскрипционного фактора NF-карра В (Таблица 5).

Таким образом, можно заключить, что при взаимодействии клеток A549 с мембранными частицами крови человека ранний ответ клеток включает в себя не только повышение уровня мРНК генов-участников сигнального каскада NF-карра В, но и активацию самого сигнального каскада NF-карра В.

Таблица 5. Гены, уровень мРНК которых повышается через 6 ч инкубации клеток A549 с мембранными частицами крови, и остается повышенным через 12 и 24 ч инкубации.

Genes	Annotation
ASS1	argininosuccinate synthetase
BIRC3	clAP the inhibitor of apoptosis
CCL2	cytokines belonging to the chemokine family regulated by NF-kappa-B
CXCL1	
CXCL2	
CXCL3	
CXCL5	
CXCL8	
DRAM1	
EFNA1	ephrin receptor protein-tyrosine kinase
EREG	epiregulin ligand of epidermal growth factor receptor
GPRC5B	G protein-coupled receptor
IL32	interleukin 32
IRAK2	interleukin-1 receptor-associated kinase 2
KCCAT211	long non-coding RNA
LAMC2	laminin subunit gamma-2, extracellular matrix glycoprotein
NFKB2	nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit
NFKBIA	inhibitor of the NF-kB transcription factor
RELB	NF-kB subunit
NUAK2	NUAK family SNF1-like kinase 2
PTGS2	prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase
SLC39A10	SLC39 family of solute-carrier genes zinc transporters functions in the cellular import of zinc at the onset of inflammation
SLC39A8	
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial, antiapoptotic action against oxidative stress, ionizing radiation, and inflammatory cytokines.
TNFAIP2	TNF alpha induced protein 2
TNFAIP3	zinc finger protein and ubiquitin-editing enzyme, inhibitor NF-kappa B activation as well as TNF-mediated apoptosis

Genes	Annotation
TNIP1	A20-binding protein involved in the regulation of NF-kappa B activation
ZC3H12A	bifunctional endoribonuclease and deubiquitinase involved in cellular inflammatory response
ZNF143	selenocysteine tRNA Gene Transcription-Activating Factor
ZNF341	zinc finger protein, nucleic acid binding

Таблица 6. Характеристики набора генов, уровень мРНК которых повышается через 6 ч инкубации клеток A549 с мембранными частицами крови, и остается повышенным через 12 и 24 ч инкубации.

KEGG 2016

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
1	TNF signaling pathway_Homo sapiens_hsa04668	4.286e-14	3.086e-12	-1.91	58.93
2	NF-kappa B signaling pathway_Homo sapiens_hsa04064	8.650e-13	3.114e-11	-1.74	48.29
3	NOD-like receptor signaling pathway_Homo sapiens_hsa04621	2.017e-12	4.841e-11	-1.73	46.57
4	Legionellosis_Homo sapiens_hsa05134	1.843e-10	3.317e-9	-1.79	40.21
5	Chemokine signaling pathway_Homo sapiens_hsa04062	9.475e-9	1.364e-7	-1.82	33.71

ENCODE and ChEA Consensus Transcription factors from CHIP-X

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
1	RELA_ENCODE	4.068e-7	0.00002848	-1.80	26.53
2	VDR_CHEA	0.0001988	0.006960	-1.80	15.36
3	BCL3_ENCODE	0.007778	0.1230	-1.72	8.35
4	PPARG_CHEA	0.007992	0.1230	-1.61	7.78
5	RAD21_ENCODE	0.01012	0.1230	-1.64	7.55
6	HNF4A_ENCODE	0.01054	0.1230	-1.55	7.05

Transcription Factor PPIs

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
1	NFKB1	0.00003491	0.001257	-1.87	19.20
2	BCL3	0.002161	0.03889	-1.51	9.25
3	TP53	0.01380	0.1099	-1.86	7.96
4	E2F1	0.01526	0.1099	-1.62	6.77
5	NANOG	0.02389	0.1434	-1.57	5.88
6	SIN3A	0.04074	0.1705	-1.67	5.35

Гены вторичного ответа, экспрессия которых активируется после 24 ч инкубации клеток A549 с мембранными частицами крови, контролируются не только NF-каппа В, но и такими факторами транскрипции, как REST, SMC3, HIF1A. Продукты этих генов участвуют в гликолизе, сборке внеклеточного матрикса, регуляции клеточной адгезии, регуляции процессов программируемой клеточной гибели и др. (таблица 7).

Таким образом, реакция клеток аденокарциномы человека A549 на мембранные частицы крови включает, на раннем этапе активацию сигнального пути NF-каппа В, который, в свою очередь, индуцирует вторичные метаболические и структурные изменения в клетках-реципиентах.

Таблица 7. Характеристики набора генов, уровень мРНК которых повышается через 24 ч инкубации клеток A549 с мембранными частицами крови.

ENCODE and ChEA Consensus TFs from CHIP-X

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Odds Ratio	Combined score
1	REST_ENCODE	7.347e-10	7.641e-8	2.94	61.77
2	SMC3_ENCODE	2.816e-8	0.00001464	1.88	32.71
3	FOXA2_ENCODE	0.000005325	0.00007912	2.52	30.57
4	GATA2_CHEA	0.000003706	0.00006424	1.92	24.00
5	RELA_ENCODE	0.00001961	0.0002550	2.10	22.73
6	ZBTB7A_ENCODE	5.276e-7	0.00001829	1.55	22.33
7	CTCF_ENCODE	0.000001146	0.00002981	1.59	21.80
8	RAD21_ENCODE	0.000003474	0.00007226	1.69	21.26
9	VDR_CHEA	0.001739	0.007861	3.25	20.65
10	TP53_CHEA	0.0001192	0.001033	2.24	20.20

TRRUST Transcription Factors 2019

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Odds Ratio	Combined score
1	RELA_human	1.474e-12	4.209e-10	3.65	99.32
2	HIF1A_human	1.374e-12	7.844e-10	6.94	189.59
3	NFKB1_human	7.696e-12	1.465e-9	3.53	90.36
4	NFKB1_mouse	2.232e-10	3.187e-8	3.98	88.40
5	SP1_human	4.727e-10	5.398e-8	2.73	58.66
6	JUN_mouse	5.834e-8	0.000005552	4.19	69.77
7	TP53_human	1.379e-7	0.00001125	3.68	58.14
8	EGR1_mouse	2.264e-7	0.00001616	5.41	82.77
9	ATF4_human	3.126e-7	0.00001983	7.84	117.41
10	AR_human	0.000001283	0.00007324	4.42	60.03

GO Biological Process 2018

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Odds Ratio	Combined score
1	glucose catabolic process to pyruvate (GO:0061718)	1.935e-7	0.0003291	9.50	146.80
2	extracellular matrix organization (GO:0030198)	3.351e-7	0.0004275	3.10	46.24
3	canonical glycolysis (GO:0061621)	1.935e-7	0.0004936	9.50	146.80
4	glycolytic process through glucose-6-phosphate (GO:0061620)	1.935e-7	0.0009872	9.50	146.80
5	positive regulation of apoptotic process (GO:0043065)	0.000001083	0.001105	2.67	36.71
6	positive regulation of cell adhesion (GO:0045785)	0.000003434	0.002503	5.06	63.73
7	positive regulation of programmed cell death (GO:0043068)	0.000002995	0.002547	2.76	35.16
8	regulation of cell death (GO:0010941)	0.00001097	0.006995	3.96	45.22
9	gluconeogenesis (GO:0006094)	0.00001636	0.007591	5.88	64.79
10	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to endoplasmic reticulum stress (GO:0070059)	0.00002248	0.007646	7.68	82.22

Известно, что сигнальный путь NF-карра-В активируется в ответ на фактор некроза опухоли (TNF α), бактериальные липополисахариды и другие паттерны патогенов, гипоксию и генотоксический стресс (Рис. 10). Активация сигнального пути NF-карра-В модулирует процессы воспаления, пролиферации и клеточной гибели. Компоненты сигнального пути NF-карра-В вовлечены в другие сигнальные каскады, например, TNF α и Toll-подобных рецепторов.

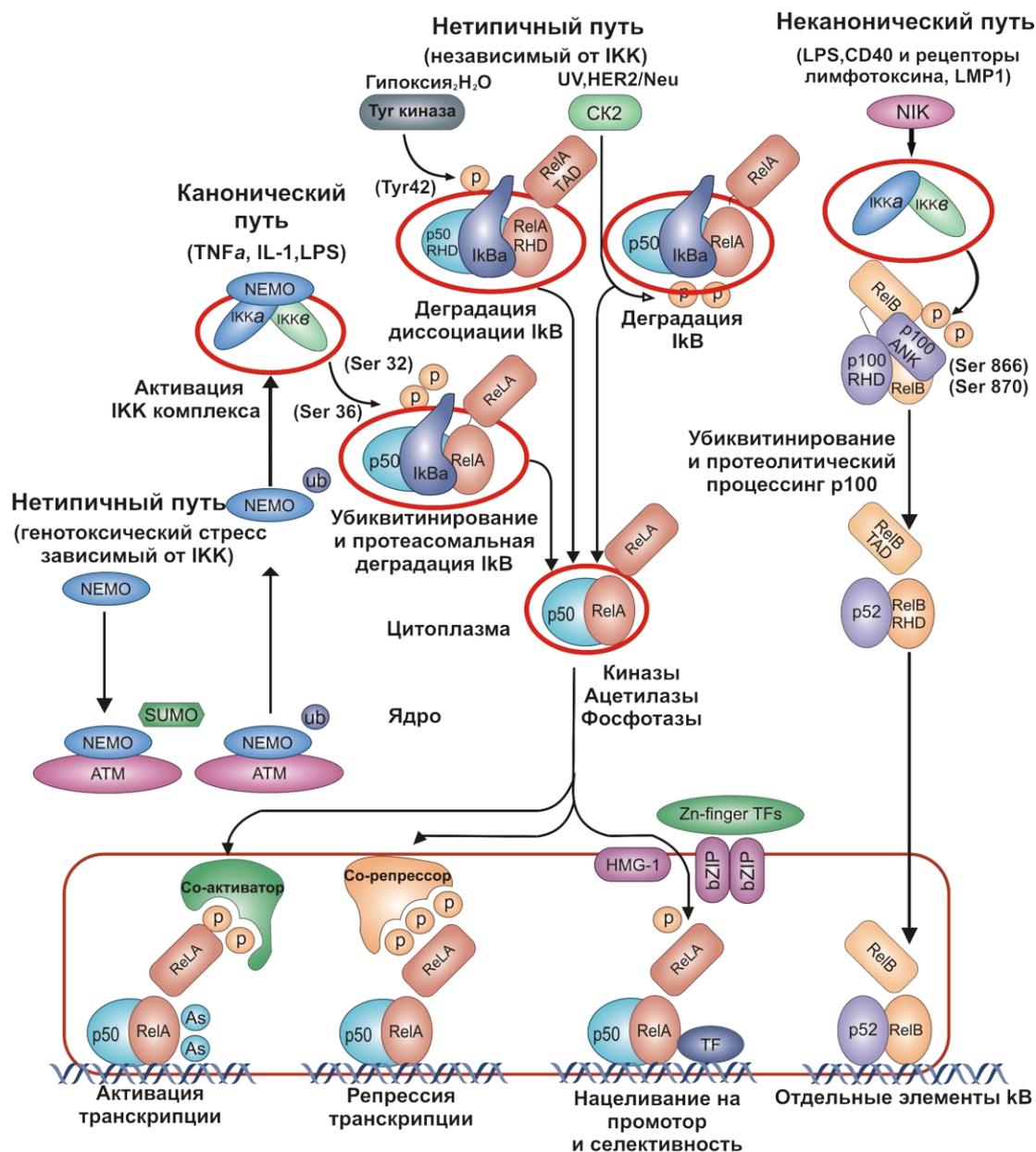


Рис. 10. Активация экспрессии генов фактором NF-κарра-В. Красными овалами выделены компоненты сигнальных каскадов, экспрессия которых в клетках A549 модулируется мембранными частицами крови здоровых доноров (адаптировано по Perkins N.V. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2007. Vol. 8. P. 49-62).

Таким образом, наши данные о том, что мембранные частицы крови при взаимодействии с эпителиоцитами человека активируют в них NF-κарра-В сигнальный каскад, указывают на то, что компоненты циркулирующих частиц являются провоспалительным и проапоптотическим стимулом для культивируемых клеток человека.

ВЫВОДЫ

1. С использованием центрифугирования при 1 200 g, 16 000 g и трех последовательных ультрацентрифугирований при 160 000 g получены препараты частиц крови здоровых доноров. Установлено, что препараты частиц крови человека, осаждаемых при 160 000 g, содержат мембранные частицы с гидродинамическим диаметром от 80 до 400 нм, которые можно отнести к экзосомам, а также к более крупным частицам, размер которых по данным литературы соответствует таковому микровезикул.

2. Установлено, что в препаратах мембранных частиц крови, осаждаемых при 160 000 g, выявлены белки CD3, CD41a, CD79a и маркер экзосом – CD63. В препаратах мембранных частиц крови человека выявлены: альфа-2-макроглобулин (A2M); белок, подобный мембранному белку эритроцитов band 2 (EPB41L4A); кератин I типа (KRT18); антиген Т-клеток CD4; ELKS/RAB6-взаимодействующий белок семейства CAST (ERC2) и ряд других белков клеток человека. Установлено, что препараты мембранных частиц крови человека содержат набор форм РНК длиной 30 - 200 нуклеотидов.

3. Установлено, что инкубация клеток аденокарциномы легких линии A549 с препаратами мембранных частиц крови человека приводит к снижению жизнеспособности клеток до 50%. При этом, ряд препаратов мембранных частиц крови здоровых доноров повышал жизнеспособность клеток A549 в 1.5 раза.

4. С использованием метода массового параллельного секвенирования установлено, что протяженные ($n > 30$ н.) РНК мембранных частиц крови человека представлены фрагментами рРНК (~72%), тРНК, мяРНК, мцРНК, транскрибируемых геномных повторов (~2%), мтРНК (~0.7%) и множеством фрагментов мРНК и днРНК (~25%). В составе мажорных РНК мембранных частиц крови выявлены мРНК, кодирующие гемоглобин, ферритин, тимозин и другие белки, характерные для форменных элементов крови. Набор из 200 наиболее представленных мРНК мембранных частиц обогащен формами, кодирующими белки рибосом, а также белки фокальной адгезии и секреторных гранул. Кроме того, в наборе достоверно повышен вклад мРНК, кодирующих белки циркулирующих мембранных частиц - экзосом, внеклеточных везикул и внеклеточных органелл.

5. С помощью полнотранскриптомного анализа РНК клеток аденокарциномы легких человека линии A549 установлено, что 6 ч инкубации этих клеток с мембранными частицами крови человека приводит к повышению уровня мРНК, транскрипция которых

контролируется факторами семейства NF-каппа В и кодирующих компоненты NF-каппа В сигнального каскада. Гены вторичного ответа, экспрессия которых активируется после 24 ч инкубации клеток A549 с мембранными частицами крови, контролируются не только NF-каппа В, но и такими факторами транскрипции, как REST, SMC3 и HIF1A. Продукты этих генов участвуют в гликолизе, сборке внеклеточного матрикса, регуляции клеточной адгезии, регуляции процессов программируемой клеточной гибели.

Отчет о проверке на заимствования №1



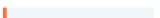
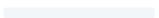
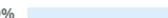
Автор: Новопашина Дарья Сергеевна danov@niboch.nsc.ru / ID: 7007712
Проверяющий: Новопашина Дарья Сергеевна (danov@niboch.nsc.ru / ID: 7007712)
 Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <https://users.antiplagiat.ru>

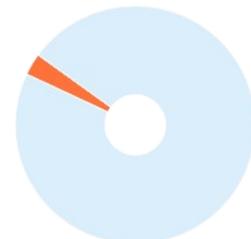
ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 3
 Начало загрузки: 06.09.2019 05:44:34
 Длительность загрузки: 00:00:05
 Имя исходного файла:
 Савиновская_Научный доклад
 Размер текста: 1759 КБ
 Символов в тексте: 38393
 Слов в тексте: 4698
 Число предложений: 225

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)
 Начало проверки: 06.09.2019 05:44:40
 Длительность проверки: 00:00:06
 Комментарии: не указано
 Модули поиска: Цитирование, Модуль поиска Интернет

ЗАИМСТВОВАНИЯ 3,31%  **ЦИТИРОВАНИЯ** 0%  **ОРИГИНАЛЬНОСТЬ** 96,69% 



Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, 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, 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	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска
[01]	1,36%	BIOTECH_2018.pdf (1/8)	https://istina.msu.ru	15 Сен 2018	Модуль поиска Интернет
[02]	0,59%	26513328.pdf (2/2)	http://digibug.ugr.es	15 Янв 2018	Модуль поиска Интернет
[03]	0,35%	Gene Expression Profiling of Peripheral Tissues in Amyotrophic Lateral Sclerosis	http://etheses.whiterose.ac.uk	19 Фев 2017	Модуль поиска Интернет
[04]	0,35%	Распределение внеклеточных РНК во фракциях плазмы крови человека и влияние...	http://niboch.nsc.ru	02 Окт 2018	Модуль поиска Интернет
[05]	0,31%	Лаборатория молекулярных основ стрессоустойчивости растений - ИБХ РАН	http://ibch.ru	21 Дек 2017	Модуль поиска Интернет
[06]	0,18%	Изучение процесса сборки вирусных рибонуклеопротеидов и вирусоподобных ча...	http://istina.msu.ru	26 Мар 2016	Модуль поиска Интернет
[07]	0,17%	https://esu.citis.ru/dissertation/0uAQW00KH0Id15JHL22cLb00	https://esu.citis.ru	20 Мар 2018	Модуль поиска Интернет

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

Савиновская Юлия Ивановна

«Влияние микровезикул и экзосом крови на экспрессию генов в клетках
человека»

Оригинальность работы составляет ___96.69___ %, 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.х.н. Д.С. Новопашина