

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

На правах рукописи

КОРНИЕНКО ТАТЬЯНА ЕВГЕНЬЕВНА

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы

**Поиск ингибиторов ферментов репарации ДНК как потенциальных
противораковых и противовирусных лекарств**

Направление подготовки 1.5 Биологические науки
Специальность 1.5.3 Молекулярная биология

Аспирант _____ Т. Е. Корниенко

Научный руководитель _____ к.х.н., А. Л. Захаренко

Рецензент _____ к.м.н., А. В. Сенькова

Новосибирск – 2024

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

Научный руководитель:

Захаренко Александра Леонидовна

Кандидат химических наук, старший научный сотрудник Лаборатории биоорганической химии ферментов, ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Злокачественные новообразования являются глобальной проблемой здравоохранения, приведшей к одной из шести смертей в мире. По данным представленным Министерством здравоохранения Российской Федерации (Минздрав РФ) за 2023 год общая заболеваемость онкологическими заболеваниями достигла 5420,2 случаев на 100 тысяч населения, что на 4,4% выше по сравнению с 2022 годом – 5191,4. По прогнозам Международного агентства по изучению рака (МАИР) и Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) этот показатель с каждым годом будет расти и к 2050 году может составить 35 миллионов в год.

Несмотря на достижение значительных успехов в лечении онкологии на сегодняшний день с помощью иммунотерапии, трансплантации стволовых клеток, наночастиц, радиочастотной абляции, таргетной и гормональной терапии, свою актуальность не теряет химиотерапия [1]. На протяжении многих десятилетий химиотерапия была одним из традиционных вариантов лечения рака наряду с хирургическим вмешательством и радиотерапией, позволивших снизить смертность и заболеваемость [2]. Однако терапия высокотоксичными химиопрепаратами несет ряд осложнений и побочных эффектов, которые могут быть как малозначительными и легко поддаваться лечению, так и необратимыми, значительно снижать качество жизни пациентов. Также существенная проблема химиотерапии – лекарственная устойчивость.

Одной из причин возникновения резистентности опухолей к терапии является активация репарации ДНК, так как действие практически всех химиотерапевтических препаратов направлено на повреждение структуры ДНК, ответом на которое является ее восстановление или запуск процессов клеточной гибели [3]. Например, топотекан является клинически используемым противоопухолевым препаратом, ингибирующим фермент топоизомеразу 1 (TOP1). TOP1 – фермент, изменяющий топологию ДНК во время репликации, транскрипции и сегрегации хромосом. TOP1 вносит одноцепочечный разрыв с 3'-конца ДНК, что позволяет 5'-концу вращаться вокруг неповрежденной цепи, тем самым релаксируя цепи ДНК. Тем самым фермент образует ковалентный комплекс с 3'-концом участка ДНК [4]. Топотекан стабилизирует этот ковалентный комплекс TOP1-ДНК, что делает последний препятствием для репликативных вилок и приводит к накоплению повреждений ДНК и дальнейшей гибели клеток опухоли [5-7].

Однако эффективность топотекана ограничена внутренней резистентностью опухолевых клеток, которая опосредована путями репарации ДНК [8-10]. Один из этих

путей ДНК регулируется ферментом тирозил-ДНК фосфодиэстеразой 1 (TDP1). TDP1 высвобождает ДНК из стабилизированных комплексов расщепления TOP1-ДНК, катализируя гидролиз фосфодиэфирной связи между каталитическим остатком тирозина TOP1 и фосфатной группой ДНК [11-13]. Активность TDP1 и TOP1 в опухолевых клетках положительно коррелирует [14]. Имеются данные о том, что повышенная экспрессия TDP1 может снижать цитотоксичность препаратов на основе камптотецина, в том числе топотекана, а также может влиять на чувствительность клеток к этим препаратам [15-17].

Ранее в нашей лаборатории были обнаружены эффективные ингибиторы Tdp1 – производные природных веществ, усиливающие цитотоксическое действие топотекана в отношении пассируемых опухолевых клеточных линий *in vitro* и противоопухолевое и антиметастатическое действие топотекана *in vivo* [18, 19]. Среди них отобраны соединения – лидеры, которые проявили способность потенцировать действие топотекана *in vitro* и *in vivo* и хорошо переносятся лабораторными животными.

Таким образом, применение ингибиторов TDP1 в комбинации с основным противоопухолевым препаратом является перспективной стратегией лечения ряда онкологических заболеваний, может повысить эффективность терапии, помочь отсрочить или обратить вспять резистентность.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы является поиск ингибиторов TDP1 и исследование их способности усиливать действие топотекана - ингибитора TOP1. Для достижения данной цели данной работы были поставлены следующие задачи:

1. Провести исследование ингибирующей способности енаминового (OL9-116) и бидериватизированного (AF-185) производных усниновой кислоты в отношении очищенного рекомбинантного фермента TDP1 и определить значения их IC₅₀ (концентрация полумаксимального ингибирования для соединений).
2. Оценить влияние OL9-116 и AF-185 на пассируемые опухолевые и неопухолевые клеточные линии человека и определить значения их CC₅₀ (концентрация соединения, при которой выживаемость клеток снижается на 50%).
3. Изучить способность исследуемых соединений усиливать действие топотекана в отношении пассируемых опухолевых клеточных линий.
4. Изучить канцерогенную безопасность соединений путем анализа их мутагенных свойств с помощью модифицированного теста Эймса *in vitro*.

5. Провести анализ способности соединений реактивировать экспрессию эпигенетически репрессированного гена *GFP* в клетках HeLa T1.
6. Проанализировать фармакокинетику OL9-116 в крови здоровых мышей.
7. Исследовать противоопухолевый эффект OL9-116/AF-185 в комбинации с топотеканом и индивидуально на моделях *in vivo*.
8. Изучить влияние AF-185 в комбинации с топотеканом и индивидуально на показатели белой и красной крови мышей с карциномой Кребс-2.

Научная новизна полученных результатов

В рамках данного исследования в качестве ингибиторов TDP1 были изучены соединения, синтезированные на основе усниновой кислоты (вторичный лишайниковый метаболит, обладает широким спектром биологической активности). Так как сама по себе усниновая кислота весьма токсична и не является эффективным ингибитором TDP1, с помощью разного рода модификаций были получены ее производные – енаминовое (OL9-116) и бидериватизированное (AF-185), способные подавлять активность TDP1 (IC₅₀ 0,12–0,16 мкМ) и сенсibilизировать цитотоксический/антипролиферативный эффект топотекана в отношении пассируемых клеточных линий. Бидериватизированные производные усниновой кислоты как ингибиторы TDP1 изучались впервые. Впервые была изучена канцерогенная безопасность енаминового и бидериватизированного производных усниновой кислоты с использованием модифицированного теста Эймса на мутагенную активность на *Salmonella typhimurium*, а также была проанализирована способность соединений реактивировать экспрессию эпигенетически репрессированного гена *GFP* в клетках HeLa T1. Впервые была изучена фармакокинетика енаминового производного усниновой кислоты в крови и органах мышей при внутрибрюшинном и внутривенном введении, что позволило снизить его дозу в 30 раз и выбрать оптимальный способ введения для дальнейших исследований. Выявлено, что OL9-116 в сниженной дозе в сочетании с топотеканом обладает противоопухолевым и антиметастатическим действием *in vivo*. Впервые для AF-185 была показана его способность усиливать противоопухолевый и антиметастатический эффект топотекана на моделях *in vivo*. Впервые была обнаружена способность AF-185 в комбинации с топотеканом нормализовать гемопоэз у мышей с карциномой Кребс-2.

Теоретическая и практическая значимость работы

Ингибирование активности TDP1 может повысить эффективность применения различных противораковых препаратов, которые направлены на повреждение ДНК опухолевых клеток, снизить токсическую нагрузку на организм, а также помочь преодолеть или отсрочить развитие лекарственной резистентности. С практической точки зрения в работе демонстрируется эффективность и безопасность применения ингибиторов TDP1 на основе усниновой кислоты как средств вспомогательной противоопухолевой терапии.

Апробация работы

По материалам исследования опубликовано 10 работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых изданиях и 7 тезисов конференций (докладчик – Корниенко Т.Е.):

Статьи

1. **Т.Е. Корниенко**, А.Л. Захаренко, Е.С. Ильина, А.А. Чепанова, О.Д. Захарова, Н.С. Дырхеева, Н.А. Попова, В.П. Николин, А.С. Филимонов, О.А. Лузина, Н.Ф. Салахутдинов, О.И. Лаврик Влияние производного усниновой кислоты (ингибитора тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1) на трансплантированные опухоли *in vivo* в качестве монотерапии и в сочетании с олапарибом //Молекулярная биология. – 2023. – Т. 57. – №. 2. – С. 220-231, doi:10.31857/S0026898423020143.

2. А.А. Okhina*, **Т.Е. Kornienko***, A.D. Rogachev, O.A. Luzina, N.A. Popova, V.P. Nikolin, A.L. Zakharenko, N.S. Dyrkheeva, A.G. Pokrovsky, N.F. Salakhutdinov, O.I. Lavrik Pharmacokinetic study of Tdp1 inhibitor resulted in a significant increase in antitumor effect in the treatment of Lewis lung carcinoma in mice by its combination with topotecan //Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2023. – Т. 236. – С. 115731, doi: 10.1016/j.jpba.2023.115731.

3. **Т.Е. Kornienko**, A.A. Chepanova, A.L. Zakharenko, A.S. Filimonov, O.A. Luzina, N.S. Dyrkheeva, V.P. Nikolin, N.A. Popova, N.F. Salakhutdinov, O.I. Lavrik Enhancement of the Antitumor and Antimetastatic Effect of Topotecan and Normalization of Blood Counts in Mice with Lewis Carcinoma by Tdp1 Inhibitors—New Usnic Acid Derivatives //International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Т. 25. – №. 2. – С. 1210, doi: 10.3390/ijms25021210.

Тезисы

1. **Корниенко Т.Е.**, Захаренко А.Л., Филимонов А.С., Лузина О.А., Ильина Е.С., Салахутдинов Н.Ф., Лаврик О. И. Цитотоксический эффект производного усниновой кислоты – ингибитора Tdp1 в сочетании с олапарибом. Материалы школы-конференции для

молодых ученых Молекулярные основы заболеваний: что молекулярная биология может сделать для современной медицины, 2021, Новосибирск, Россия, с. 44.

2. **Kornienko T.E., Zakharenko A.L., Filimonov A.S., Luzina O.A., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I.** Usnic acid derivative antitumor, antimetastatic and hematoprotective effects in the Lewis carcinoma model. The Thirteenth International Multiconference Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/ Systems Biology (BGRS/SB-2022), Abstracts, 2022, Novosibirsk, Russia, p. 990-991.

3. **Корниенко Т.Е.,** Захаренко А.Л., Николин В.П., Попова Н.А., Филимонов А.С., Лузина О.А., Салахутдинов Н.Ф., Лаврик О.И. Исследование противоопухолевых и гемопротекторных свойств ингибитора тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 на модели опухолей *in vivo*. Материалы конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика», 2022, Новосибирск, Россия, с. 189.

4. **Корниенко Т.Е.,** Захаренко А.Л., Николин В.П., Попова Н.А., Филимонов А.С., Лузина О.А., Салахутдинов Н.Ф., Лаврик О.И. Исследование противоопухолевых и гемопротекторных свойств ингибитора тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 в монорегиме и в комбинации с топотеканом (ингибитором топоизомеразы 1) на модели опухолей *in vivo*. Конференция «Физико-химическая энзимология», 7-9 августа 2023, Новосибирск, Россия, Сборник тезисов, с. 35.

5. **Т.Е. Корниенко,** А.Л. Захаренко, В.П. Николин, Н.А. Попова, А.С. Филимонов, О.А. Лузина, Н.Ф. Салахутдинов, О.И. Лаврик Противоопухолевое действие производного усниновой кислоты (ингибитора тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1) в сочетании с топотеканом (ингибитором топоизомеразы I) на модель опухоли лимфосаркомы RLS *in vivo*. Сборник материалов II международной конференции «Генетические технологии в трансляционной биомедицине», 6-8 сентября 2023, Томск, Россия, с. 26.

6. **Корниенко Т. Е.,** Захаренко А. Л., Николин В. П., Попова Н. А., Охина А. А., Рогачев А.Д., Филимонов А. С., Лузина О. А., Салахутдинов Н. Ф., Лаврик О. И. Производное усниновой кислоты усиливает противоопухолевое и антиметастатическое действие топотекана в отношении карциномы легкого Льюис *in vivo*. Научная молодежная школа-конференция «BioTop-2023. Достижения молодых ученых ИХБФМ» 30 ноября - 1 декабря 2023 г., Новосибирск, Россия, Материалы конференции, с. 58.

7. **Т.Е. Корниенко,** А.Л. Захаренко, В.П. Николин, Н.А. Попова, А.С. Филимонов, О.А. Лузина, Н.Ф. Салахутдинов, О.И. Лаврик. Производное усниновой кислоты (ингибитор тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1) усиливает противоопухолевый эффект топотекана *in vivo*. Материалы VIII Всероссийской конференции по молекулярной онкологии, 20-22 декабря 2023 г., Москва, с. 113.

Личный вклад автора

Основная часть работы была выполнена автором лично, либо с ее непосредственным участием. Производные биологически активных веществ природного происхождения были синтезированы и любезно предоставлены сотрудниками Лаборатории физиологически активных веществ НИОХ СО РАН Лузиной Ольгой Анатольевной и Филимоновым Александром Сергеевичем. Нарботка, выделение и очистка рекомбинантного фермента Tdp1 проводилась под руководством Дырхеевой Надежды Сергеевны и Анарбаева Рашида Октамовича в Лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН. Биосенсор для изучения активности Tdp1 был разработан в Лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН Рашидом Октамовичем Анарбаевым и синтезирован в Лаборатории химии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН. Скрининг ингибиторных свойств и цитотоксичности соединений *in vitro* проводилось автором работы. Изучение действия производных усниновой кислоты на моделях *in vivo* было выполнено автором совместно с сотрудниками Лаборатории регуляции экспрессии генов ИЦиГ СО РАН Поповой Нэлли Александровной и Николиным Валерием Петровичем. Исследование фармакокинетики в крови и органах мышей производного усниновой кислоты проведено автором совместно с сотрудниками Лаборатории физиологически активных веществ НИОХ СО РАН Рогачевым Артемом Дмитриевичем и Охиной Алиной Александровной. Анализ способности соединений реактивировать экспрессию эпигенетически репрессированного гена GFP в клетках HeLa T1 и изучение их канцерогенной безопасности *in vitro* выполнены автором на базе Отдела химического канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России под руководством Максимовой Варвары Павловны и Кирсанова Кирилла Игоревича.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Структура усниновой кислоты и ее производных (бидериватизированное и енаминовое)

Производные усниновой кислоты были синтезированы в Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН (НИОХ СО РАН). Усниновая кислота – доступный лишайниковый метаболит, биологическая активность которого весьма разнообразна (рис. 1А), но так как она сама по себе довольно токсична, на ее основе были синтезированы бидериватизированное производное AF-185 с модификациями в А и С кольца, а также енаминовое производное OL9-116 с модификацией в С кольце. Синтез производных усниновой кислоты описан в данных работах [24, 25].

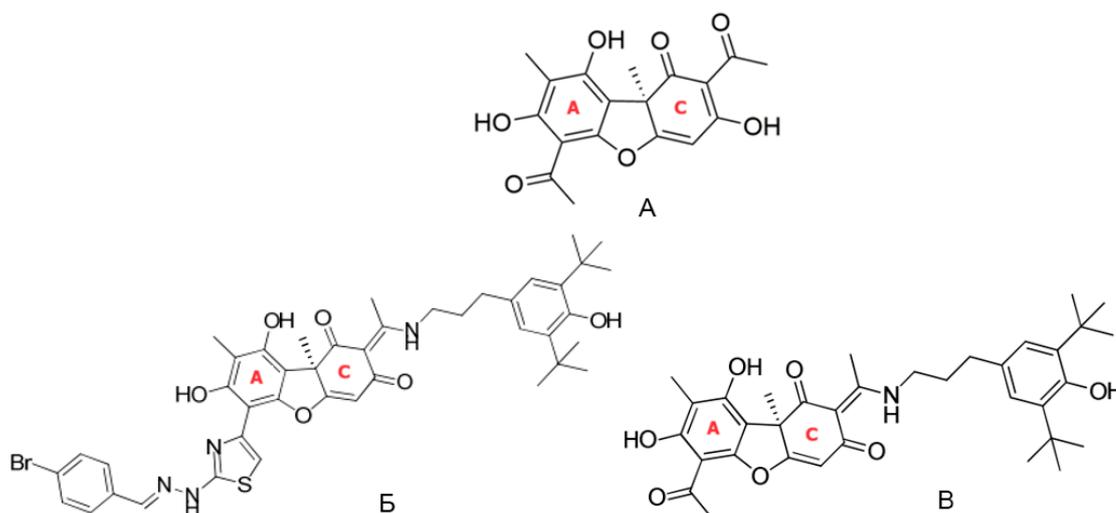


Рисунок 1. Структуры производных усниновой кислоты и ее производных. А – усниновая кислота; Б – бидериватизированное производное усниновой кислоты AF-185; В – енаминовое производное усниновой кислоты OL9-116.

Для проведения дальнейших исследований данные соединения были растворены в диметилсульфоксиде (ДМСО).

Наработка, выделение и очистка рекомбинантного фермента Tdp1

Для выделения фермента Tdp1 использовали клетки-продуценты *E.coli* BL21DE3, трансформированные плазмидой pET16B-Tdp1. Для проведения трансформации в 100 мкл клеточной суспензии добавляли 1 мкл плазмиды pET16B-Tdp1, после чего проводили электропорацию импульсом 1700 В в течение 5 секунд. Затем в течение 1 часа смесь инкубировали при 37°C с 700 мкл LB-среды (pH 7,5). Суспензию клеток высевали на чашки

с LB-агаром и ампициллином (100 мкг/мл) и инкубировали при 37°C 16 часов до появления колоний. По одной колонии переносили в 2 пробирки с 3 мл LB-среды и ампициллином (100 мкг/мл) в каждой и подращивали 8 часов при 30°C и аэрации. Далее из них переносили по 1 мл полученной клеточной суспензии в колбы объемом 300 мл, содержащие 100 мл LB-среды с ампициллином (100 мкг/мл), и подращивали 14 часов при 30°C и аэрации. По 7 мл полученной суспензии клеток перенесли в колбы объемом 1 л, содержащие 250 мл LB-среды с ампициллином (100 мкг/мл). Нарращивание биомассы проводили при 37°C до ОП600=0,6-0,8 при постоянной аэрации. Затем запускали экспрессию гена целевого белка добавлением индуктора – изопропил-β-D-тиогалактозида (1 мМ), после чего культивировали клетки при постоянной аэрации 2 часа при 30°C. Полученную суспензию центрифугировали при 4°C (3900 об/мин; 20 мин), промывали холодным раствором 0,1 М Tris-HCl, pH 8,0 (30 мл) и повторно центрифугировали (5000 об/мин; 20 мин). Клетки хранили при -80°C.

Для выделения фермента биомассу размораживали и ресуспендировали в 50 мл буфера (0,5 М NaCl, 5% глицерин, 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0, смесь ингибиторов протеаз) и инкубировали на льду в течение 30 минут. Затем для разрушения клеток *E. coli* добавляли 50 мл лизирующего буфера, содержащего лизоцим, и инкубировали на льду 30 минут. Далее обрабатывали полученную суспензию ультразвуком в режиме 15 секунд звук - 45 секунд перерыв (амплитуда 40%) для фрагментации ДНК. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 4°C (18000xg, 45 мин). К полученному супернатанту добавляли имидазол до 10 мМ (конечная концентрация) и наносили на колонку с Ni-сефарозой (V=5 мл) со скоростью 1 мл/мин. Элюция проводилась в два этапа: буфером 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0 с 100 мМ и 500 мМ имидазолом, со скоростью 14 мл/час на хроматографе АКТА Pure. Фракцию, содержащую основное количество белка, наносили на колонку с гепарин-сефарозой и проводили дальнейшую элюцию ступенчатым градиентом 0,1–1 М NaCl. Фракции, содержащие целевой белок, концентрировали, и к полученным препаратам добавляли глицерин до 50%, Tris-HCl, pH 8,0 до 50 мМ и β-меркаптоэтанол до 7 мкМ. Концентрацию полученных образцов определяли с помощью коллометрического метода (Метод Бредфорда) [20]. Оптическая плотность измерялась на длине волны 595 нм для растворов бычьего сывороточного альбумина (2, 4, 6, 8, 10 мг/мл) в качестве калибровочных в 1 мл реагента Бредфорда (краситель Кумасси R-250 в 5% уксусной кислоте и 10% этаноле) относительно раствора без белка. Затем строили калибровочную кривую и сопоставляли с ней значения оптической плотности для растворов фракций целевого белка, полученных добавлением 1 и 2 мкл препарата в 1 мл реагента Бредфорда.

Исследование ингибирующей способности OL9-116 и AF-185 в отношении очищенного рекомбинантного фермента TDP1 в режиме реального времени флуоресцентным методом и определение значений IC_{50} соединений

Для скрининга ингибирующей активности изучаемых соединений в отношении очищенного рекомбинантного фермента Tdp1 использовалась методика, ранее разработанная нашей группой [31]. Измерения проводились автоматически в линейном диапазоне зависимости скорости реакции от времени в течение 9 минут, аликвоты отбирали из реакционных смесей через каждые 55 секунд при комнатной температуре. В состав реакционной смеси ($V=200$ мкл/лунка) входят буфер для измерения активности Tdp1, 50 нМ олигонуклеотид и разные концентрации соединений. Реакция запускалась добавлением фермента Tdp1 до конечной концентрации 1,5 нМ. В качестве биосенсора использовался 16-мерный одноцепочечный олигонуклеотид, несущий флуорофор 5(6)-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и гаситель Black Hole Quencher 1 (BHQ1) на 3'-конце (рис. 2).

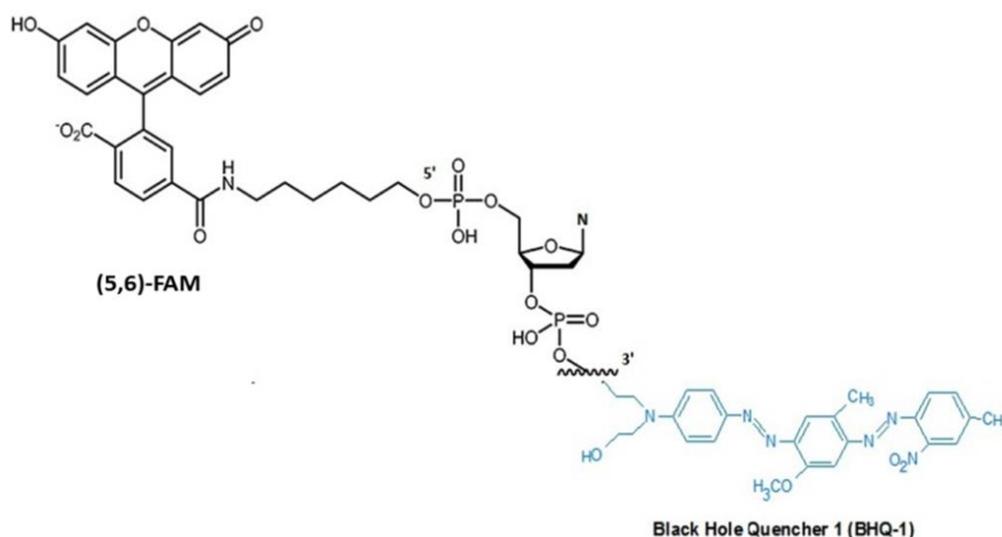


Рисунок 2. 16-мерный одноцепочечный олигонуклеотид – биосенсор для определения активности Tdp1.

Для определения IC_{50} :

а) устанавливали начальную скорость ферментативной реакции в присутствии различных концентраций изучаемых соединений-ингибиторов TDP1 (тангенс угла наклона кинетических кривых);

б) строили зависимость начальной скорости от концентрации ингибиторов;

в) далее для полученных данных использовали формулу $y = y_0 + Ae^{-x/t}$,

таким образом, $IC_{50} = -t \cdot \lg\left(\frac{y_0 - A}{2A}\right)$.

По результатам экспериментов была найдена скорость реакции при различных концентрациях исследуемых соединений и их влияние оценивалось по величине IC₅₀ (концентрация соединения, при которой активность фермента снижается 50%). Измерение флуоресценции производилось с использованием флуориметра POLARstar OPTIMA. Анализ полученных данных проводился с помощью программы MARS Data Analysis 2.0.

Клеточные линии

В работе использовались различные пассируемые клеточные линии человека, имеющиеся в коллекции Лаборатории биорганической химии ферментов, ИХБФМ СО РАН – HeLa (рак шейки матки), HCT-116 (колоректальная карцинома), A 549 (карцинома легкого), MCF-7 (аденокарцинома протоков молочной железы), T98G (фибробластоподобные клетки глиобластомы), HEK-293 (клетки почки эмбриона), MRC-5 (фибробласты, выделенные из легочной ткани эмбриона). Клетки содержались в культуральных чашках Петри с модифицированной по способу Дульбекко средой Игла (DMEM), дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS), 1% антибиотиком-антимикотиком (Anti-Anti) и 1% GlutaMAX при стандартных условиях (37°C, 5% CO₂), пересаживались раз в 3-4 дня путем промывания калий-фосфатным буфером (PBS) и с последующей обработкой буферным трипсином-ЭДТА 0,25% в соотношении 1:5 по объему для поддержания экспоненциального роста.

Оценка цитотоксичности OL9-116 и AF-185 в отношении пассируемых опухолевых и неопухолевых клеточных линий человека и определение значений их CC₅₀

Цитотоксичность соединений, используемых в исследовании, измеряли с помощью стандартного МТТ-теста [21]. Клетки высевали по 5×10³ клеток на лунку в 96-луночные планшеты с плоским дном и инкубировали в течение ночи. Затем добавляли серийные разведения соединений (количество ДМСО, используемого в качестве растворителя и контроля составляло 1% от объема среды) в трех повторностях и инкубировали в течение 72 часов в стандартных условиях. Затем клетки обрабатывали 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолийбромидом (МТТ). После трех часов воздействия МТТ среду удаляли и добавляли 100 мкл изопропанола. Оптическую плотность раствора измеряли при 540 нм и 620 нм с помощью многофункционального микропланшетного ридера CLARIOstar Plus. Полученные данные анализировали по трем независимым экспериментам.

Изучение способности производных усниновой кислоты усиливать действие топотекана в отношении пассируемых опухолевых клеточных линий человека

Далее изучалась способность производных усниновой кислоты усиливать действие топотекана на пассируемые клеточные линии человека, представляющие различные типы опухолей, с помощью стандартного МТТ-теста. Клетки рассаживали по 5×10^3 клеток на лунку в 96-луночные планшеты с плоским дном и инкубировали в течение ночи. Затем добавляли серийные разведения топотекана и соединения в нетоксичных концентрациях (количество ДМСО, используемого в качестве растворителя и контроля составляло 1% от объема среды) в трех повторностях и инкубировали в течение 72 часов в стандартных условиях. Затем клетки обрабатывали 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолийбромидом (МТТ). После трех часов воздействия МТТ среду удаляли и добавляли 100 мкл изопропанола. Оптическую плотность раствора измеряли при 540 нм и 620 нм с помощью многофункционального микропланшетного ридера CLARIOstar Plus. Полученные данные анализировали по трем независимым экспериментам.

Получение активированной фракции S9 из печени крыс

Для получения фракции S9 были использованы 3 половозрелых самца крыс Wistar массой 350-400 г, которым однократно вводили внутривентриально 500 мг/кг Арохлор-1254 (смесь полихлорированных бифенилов, которая многократно усиливает активность ферментов семейства цитохром Р450), разведенном в кукурузном масле. Спустя 5 суток у животных асептически извлекали печень и помещали в стеклянный стакан на льду в холодный 0,15 М КСl из расчета 1 мл на 1 грамм печени. Последовательные промывки КСl необходимы для обеспечения стерильности препарата и удаления гемоглобина, который может подавлять активность ферментов цитохрома Р450, после чего промытую печень перекладывали в стакан, содержащий 3 объема 0,15 М КСl (3 мл/г сырой печени), измельчали стерильными ножницами и гомогенизировали в аппарате. Гомогенат центрифугировали в течение 15 минут при 9000 g (8700 об/мин), затем собирали супернатант (фракцию S9) в пробирки Эппендорфа по 1-1,5 мл, замораживали при -20°C и хранили в низкотемпературном холодильнике при -70°C . Считается, что в этих условиях ферменты биотрансформации сохраняют свою активность без существенного снижения до 2-3-х лет.

Изучение канцерогенной безопасности соединений путем анализа их мутагенных свойств с помощью модифицированного теста Эймса *in vitro*

Данный тест является системой для учета мутаций при действии ксенобиотиков и их метаболитов, которые могут приводить к мутации типа сдвига рамки считывания или замены пар оснований в геноме бактерий *Salmonella typhimurium*. Бактерии несут мутации,

участвующие в синтезе гистидина, что позволяет установить способность исследуемых соединений провоцировать обратную мутацию в этом гене [22, 23]. Как следствие, *S. typhimurium* обретают способность расти на питательной среде с отсутствием гистидина. Для метаболической активации проканцерогенов применяют фракцию S9, выделенную из печени крыс, она содержит микросомы и цитозоль клеток с основными метаболическими ферментами I и II фаз метаболизма: цитохромы P450, флавин-монооксигеназы, альдегид оксидазы, глутатион трансферазы, моноамин оксидазы, УДФ (уридин-5 дифосфат-глюкокорозилтрансферазы) и другие.

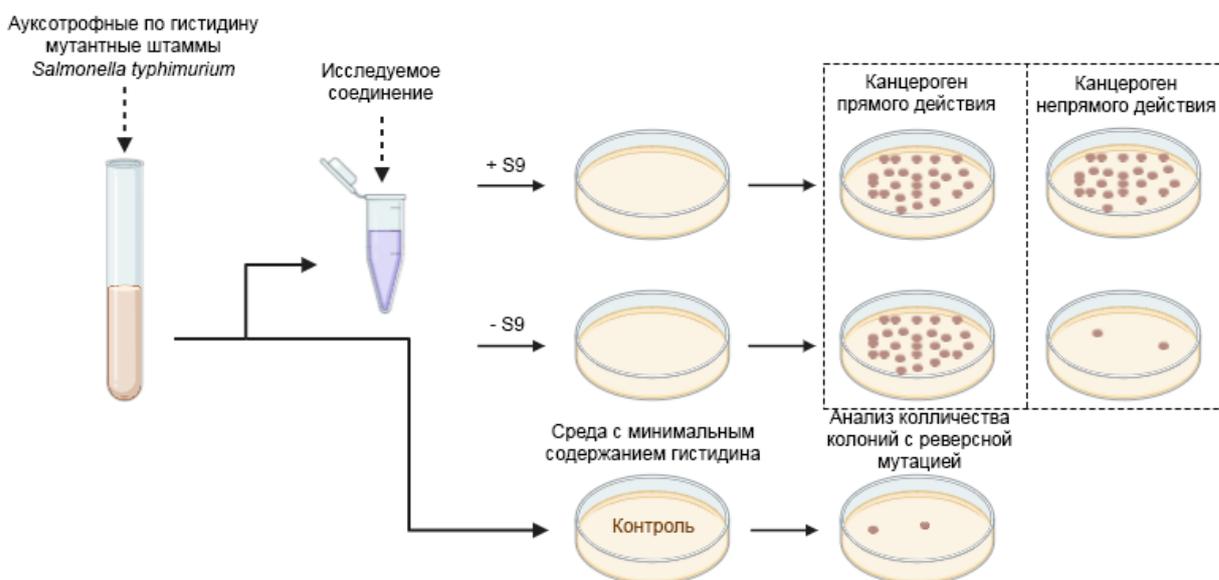


Рисунок 3. Схема проведения модифицированного теста Эймса на мутагенную активность производных усниновой кислоты в диапазоне концентраций 10^{-4} – 10^{-2} М на чашку на штаммах TA98 (замена пар оснований) и TA100 (сдвиг рамки считывания) *Salmonella typhimurium*

В эксперименте проводилась обработка бактерий *S. Typhimurium* штаммов TA98 и TA100 AF-185 и OL9-116 с S9 и без. Затем проводилась инкубация чашек Петри в течение 72 часов в термостате при 37°C , после чего осуществлялся подсчет количества мутировавших колоний в сравнении с количеством спонтанных реверсий (рис. 3). В случае если исследуемые соединения проявляют мутагенную активность, то они будут провоцировать реверсивные мутации у гистидин-зависимых штаммов бактерий.

Положительными контролями выступали вещества, которые индуцируют мутации у соответствующих индикаторных штаммов с активацией фракцией S9 или без. Для вариантов тестирования без активирующей фракции S9 были использованы азид натрия (NaN_3) и 2,7-диамино-4,9-диокси-5,10-диоксо-4,5,9,10-тетрагидро-4,9-дiazопирен

(ДДТДП). При использовании активирующей фракции S9, её активность контролировали по эффекту бензапирена (БП) и 2-аминофлуорена (2-АФ).

Оценка способности производных усниновой кислоты AF-185 и OL9-116 реактивировать экспрессию эпигенетически репрессированного гена *GFP* в клетках HeLa T1

Для скрининга эпигенетической активности соединений в качестве тест-системы были использованы клетки HeLa трихостатин А (TSA)-индуцируемые (HeLa T1), которые несут молчащий вектор *GFP* на основе ретровируса саркомы птиц [26, 27]. Эта популяция клеток HeLa T1 была ранее получена с помощью нескольких последовательных процессов сортировки клеток с молчащим геном *GFP*. Клетки содержались в пластиковых культуральных флаконах в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂). Их переносили путем промывания раствором Версена и обрабатывали буферным трипсином-ЭДТА 0,25% в соотношении 1:5 по объему каждые 3–4 дня. Клетки содержались в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM), дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS), 50 ед/мл пенициллина-стрептомицина и 200 мкМ L-глутамина.

Клетки высевали в 24-луночные планшеты по $1,8 \times 10^4$ клеток на лунку в объеме 0,5 мл, обрабатывали и анализировали в соответствии со стандартным протоколом. Соединения и концентрации: TSA 0,12 и 0,25 мкМ [32], AF-185 10 и 20 мкМ, OL9-116 10 и 20 мкМ. Максимальная концентрация ДМСО в среде составляла 0,4%.

Затем после 24 часов инкубации с исследуемыми соединениями, клетки HeLa T1 снимались с планшета с помощью раствора Версена и трипсина, центрифугировали 4 минуты 1100 оборотов/мин и промывали клетки PBS. Анализ уровня реактивации гена *GFP* проводили с использованием проточного цитометра BD LSR II UV A Cytometers II и программного обеспечения BD FACS Diva Software. Флуоресценцию *GFP*-позитивных клеток регистрировали в режиме флуоресцентного зеленого красителя флуоресцеина изотиоцианата (FITC). В качестве отрицательного контроля использовали необработанные и обработанные ДМСО в той же концентрации, что и анализируемые соединения, клетки HeLa T1.

Изучение фармакокинетики енаминового производного усниновой кислоты OL9-116 в крови мышей

Все эксперименты на животных, описанные в данном исследовании, были проведены в соответствии с директивой 2010/63/EU и протоколами, одобренными межинститутской

комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН №21.11 от 30.05.2014. Эксперименты по обнаружению соединения OL9-116 в крови после внутрижелудочного и внутривентриального введения проводили на 12 четырехмесячных мышьях-самцах C57BL/6. Животные содержались на подстилках из опилок в пластиковых клетках, со свободным доступом к корму и воде.

Вещество растворили в ДМСО, затем добавили Tween-80 и 0,9% физраствор (конечные концентрации ДМСО 15%, Tween-80 10%) в дозе 150 мг/кг. Полученную суспензию вводили мышьям в объеме 200 мкл при внутрижелудочно с помощью зонда или внутривентриально с использованием инсулинового шприца. Кровь отбирали из хвостовой вены через 30 минут; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10 и 24 часа после внутрижелудочного или внутривентриального введения, затем обрабатывались в соответствии с протоколом подготовки образцов (описанным в работе [28]). Образцы были проанализированы методом ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией в режиме мониторинга множественных реакций. Хроматографическая система, использованная в работе, состояла из хроматографа Shi madzu LC-20AD Prominence, данные детектировались с использованием масс-спектрометра SCIEX 6500 QTRAP.

Далее на основе данных, полученных при введении соединения OL9-116 в дозе 150 мг/кг, было проведено исследование фармакокинетики OL9-116 в крови при внутривентриальном введении в дозе 5 мг/кг на 8 четырехмесячных мышьях-самцах C57BL/6. Вещество растворили так же в ДМСО, затем добавили Tween-80 и 0,9% физраствор (конечные концентрации ДМСО 15%, Tween-80 10%). Кровь отбирали через 15; 30 минут; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 24 часа. По разработанной ранее градуировочной зависимости были рассчитаны концентрации вещества в крови. Фармакокинетические параметры представлены в виде среднего значения \pm стандартного отклонения (SD).

Исследование противоопухолевого эффекта OL9-116 и AF-185 в комбинации с топотеканом и индивидуально на моделях *in vivo*

Все эксперименты на животных, описанные в данном исследовании, были проведены в соответствии с директивой 2010/63/EU и протоколами, одобренными межинститутской комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН №21.11 от 30.05.2014. Животные содержались на подстилках из опилок в пластиковых клетках, со свободным доступом к корму и воде.

Исследования проводили на перевиваемых опухолях (карцинома легких Льюис (LLC) и асцитная карцинома Кребс-2) по стандартной методике. Перевиваемые опухоли были получены из криохранилища клеток ИЦиГ СО РАН. Эксперименты были проведены на

четырёхмесячных мышах-самках C57BL/6. Карцинома легких (LLC) является наиболее распространенной моделью рака легких; метастазирует в легкие у мышей C57BL. Опухолевую ткань измельчали и ресуспендировали в 0,9% физиологическом растворе (NaCl) перед трансплантацией. Суспензию клеток вводили внутримышечно в правое бедро мышей в количестве 800 тысяч клеток в 0,1 мл на мышь. Еще одной распространенной экспериментальной моделью является асцитная карцинома Кребс-2 (не дает метастазов). Для получения трансплантата клетки асцита смешивали с 0,9% NaCl, вводили мышам внутривентриально в объеме 0,2 мл в количестве 2 млн клеток/мышь. Критериями противоопухолевой активности исследуемых соединений являлись: динамика роста объема опухоли; вес первичного опухолевого узла; количество метастазов в легких, подсчитанных макроскопически для карциномы Льюис; весу асцита и количеству клеток в асцитической жидкости для карциномы Кребс-2.

Подсчет эритроцитов с помощью камеры Горяева

В пробирки, содержащие 1 мл 0,9% NaCl, вносили 5 мкл крови, разведение 1:200 (забор биоматериала проводился из ретроорбитального синуса глаза). Далее содержимое пробирки тщательно перемешивалось, подсчет эритроцитов производится далее в счетной камере Горяева по стандартному протоколу. Учет эритроцитов велся в пяти больших квадратах, состоящих из 16 малых, расположенных по диагонали, с использованием правила Егорова.

Подсчет лейкоцитов с помощью камеры Горяева

В пробирки, содержащие 0,1 мл 3% уксусной кислоты, вносили 5 мкл крови 1:20 (забор биоматериала проводился из ретроорбитального синуса глаза). Далее содержимое пробирки тщательно перемешивалось, подсчет лейкоцитов производится в счетной камере Горяева по стандартному протоколу. Лейкоциты подсчитывались в 100 больших квадратах с использованием правила Егорова.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование ингибирующей способности OL9-116 и AF-185 в отношении очищенного рекомбинантного фермента TDP1 в режиме реального времени флуоресцентным методом и определение значений IC₅₀ соединений

В ходе исследования были получены данные о способности енаминового и бидериватизированного производных усниновой кислоты ингибировать очищенный рекомбинантный фермент TDP1 с использованием метода, базирующегося на свойстве данного фермента удалять разного рода аддукты с 3'-конца (в том числе флуорофор).

При нахождении в радиусе Ферстера гаситель подавлял флуоресценцию флуорофора. Гаситель удалялся TDP1, что приводило к испусканию флуоресценции. Данные по ингибированию TDP1 производными усниновой кислоты OL9-116 и AF-185 приведены в таблице 1.

Таблица 1. Концентрация полумаксимального ингибирования TDP1 (IC₅₀, мкМ), данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (SD)

Соединение	IC ₅₀ , мкМ
OL9-116	0,12 ± 0,01
AF-185	0,16±0,04

По результатам эксперимента, можно отметить, что оба соединения являются эффективными ингибиторами TDP1.

Оценка цитотоксичности OL9-116 и AF-185 в отношении пассируемых опухолевых и неопухолевых клеточных линий человека и определение значения их CC₅₀

Дополнительно была проведена оценка цитотоксических/антипролиферативных свойств соединений OL9-116 и AF-185 с помощью стандартного МТТ-теста, поскольку важно, чтобы сопутствующая терапия на основе ингибиторов TDP1 не приводила к усилению и без того тяжелых побочных эффектов. В результате обнаружено, что OL9-116 и AF-185 не оказывают влияние на метаболическую активность разных типов культивируемых клеток в концентрациях до 100 мкМ, то есть являются нетоксичными в отношении пассируемых опухолевых и неопухолевых клеточных линий (табл. 2, приложение 1).

Таблица 2. Цитотоксичность OL9-116 и AF-185 в отношении пассируемых опухолевых и неопухолевых клеточных линий человека (CC₅₀, мкМ)

Соединение	HCT-116	A 549	MCF-7	T98G	HeLa	MRC-5	HEK-293
AF-185	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80
OL9-116	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80

Изучение способности исследуемых соединений усиливать действие топотекана в отношении пассируемых опухолевых клеточных линий

Соединения OL9-116 и AF-185 в концентрации 5 мкМ значительно усиливали эффект топотекана в отношении пассируемых опухолевых клеточных линий (табл. 3).

Таблица 3. Величина CC₅₀ топотекана в комбинации с 5 мкМ ингибиторами TDP1, мкМ

Комбинация	HCT-116	A 549	MCF-7	T98G	HeLa
Трс+ДМСО	0,81	1,5	1,4	2,5	9,6
Трс+AF-185	0,21	0,25	0,63	1,3	4,6
Трс+ OL9-116	0,32	0,2	0,55	2	3,3

Изучение канцерогенной безопасности соединений путем анализа их мутагенных свойств с помощью модифицированного теста Эймса *in vitro*

Эксперименты по индукции реверсий у *Salmonella typhimurium* в модифицированном тесте Эймса на штаммах TA98 и TA100 в диапазоне концентраций 10⁻⁴–10⁻² М/чашку показали отсутствие мутагенной активности у OL9-116 и AF-185, соединения не приводят к мутациям типа замены пар оснований или сдвига рамки считывания, как в условиях активации микросомальной фракцией S9, так и без нее (табл. 4). Цветовое обозначение указывает на мутагенную активность соединения в эксперименте: серый – отсутствие; черный – наличие; белый – исследование не проводилось (ДДДТДП – 2,7-диамино-4,9-диокси-5,10-диоксо-4,5,9,10-тетрагидро-4,9-диазапирен, 2-АФ – 2-аминофлуорен, БП – бензапирен, NaN₃ – азид натрия).

Таблица 4. Результаты тестирования мутагенной активности OL9-116 и AF-185 на индикаторных штаммах TA98 и TA100 *S. Typhimurium*

Соединение	Концентрация М/чашку	Штамм <i>Salmonella Typhimurium</i>							
		TA98				TA100			
		S9-		S9+		S9-		S9+	
		1	2	1	2	1	2	1	2
Контроль									
ДДТ/ДП	0,067	■	■						
2-АФ	0,11			■	■			■	■
БП	0,04							■	■
NaN ₃	0,068					■	■		
OL9-116	10 ⁻⁴								
	10 ⁻³								
	10 ⁻²								
AF-185	10 ⁻⁴								
	10 ⁻³								
	10 ⁻²								

Оценка способности производных усниновой кислоты AF-185 и OL9-116 реактивировать экспрессию эпигенетически репрессированного гена GFP в клетках HeLa TI

Результаты скрининга производных усниновой кислоты AF-185 и OL9-116 на их способность реактивировать экспрессию гена *GFP* в тест-системе HeLa TI представлены на рисунке 4.

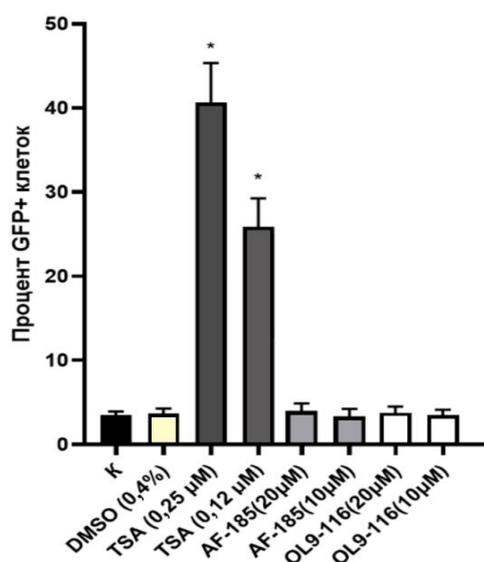


Рисунок 4. Реактивация экспрессии *GFP* в клетках HeLa TI с помощью TSA и производных усниновой кислоты.

Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение (SD), Звездочкой отмечены статистически значимые различия по сравнению с отрицательным контролем ($p < 0,05$). Соединения считаются эпигенетически активными, если процент *GFP*-положительных клеток превышает 10%. Таким образом, OL9-116 и AF-185 не обладают эпигенетической активностью.

Изучение фармакокинетики енаминового производного усниновой кислоты OL9-116 в крови здоровых мышей

На первом этапе работы были получены данные для OL9-116, введенного внутривентрикулярно в дозе 150 мг/кг (рис.5).

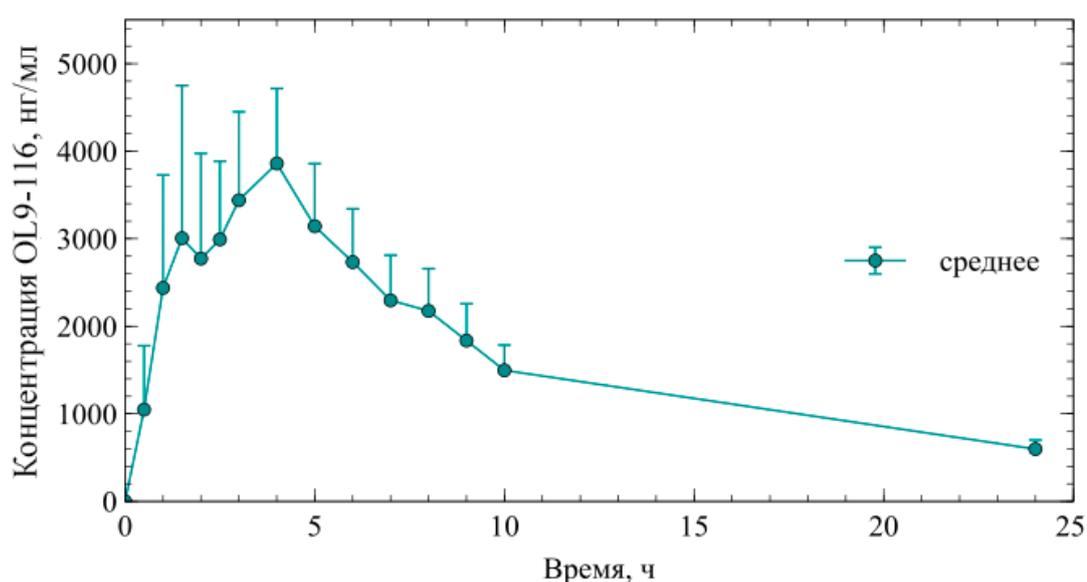


Рисунок 5. Концентрационно-временной профиль соединения OL9-116 в крови мышей после внутривентрикулярного введения в дозе 150 мг/кг (среднее значение \pm стандартное).

Из приведенного графика видно, что максимальная концентрация OL9-116 (около 5000 нг/мл) в крови мышей была достигнута примерно за 3-4 часа. После достижения максимальной концентрации концентрация вещества монотонно шла на спад, выходясь из организма. Через 24 часа после введения концентрация вещества в крови все еще была достаточно высока (500 нг/мл).

На втором этапе исследования было проведено исследование фармакокинетики OL9-116 после внутривентрикулярного введения мышам в дозе 150 мг/кг (рис. 6).

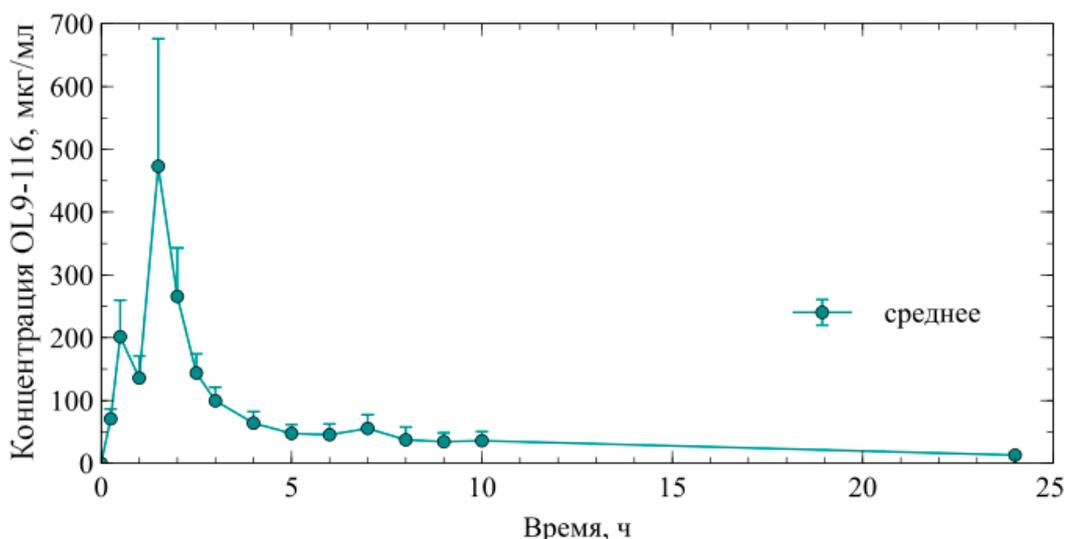


Рисунок 6. Концентрационно-временной профиль соединения OL9-116 в крови мышей после внутрибрюшинного введения в дозе 150 мг/кг (среднее значение \pm стандартное).

При внутрибрюшинном введении максимальная концентрация OL9-116 в крови достигалась через 2 часа после инъекции и составляла около 0,5 мг/мл (500 мкг/мл), что является максимальным значением, которое прибор может детектировать. Таким образом, внутрибрюшинный способ введения OL9-116 повышает его биодоступность и позволяет снизить его дозу.

Затем на основе полученных данных, описанных выше, было проведено исследование фармакокинетики OL9-116 после внутрибрюшинной инъекции в крови мышей в сниженной дозе 5 мг/кг (рис. 7).

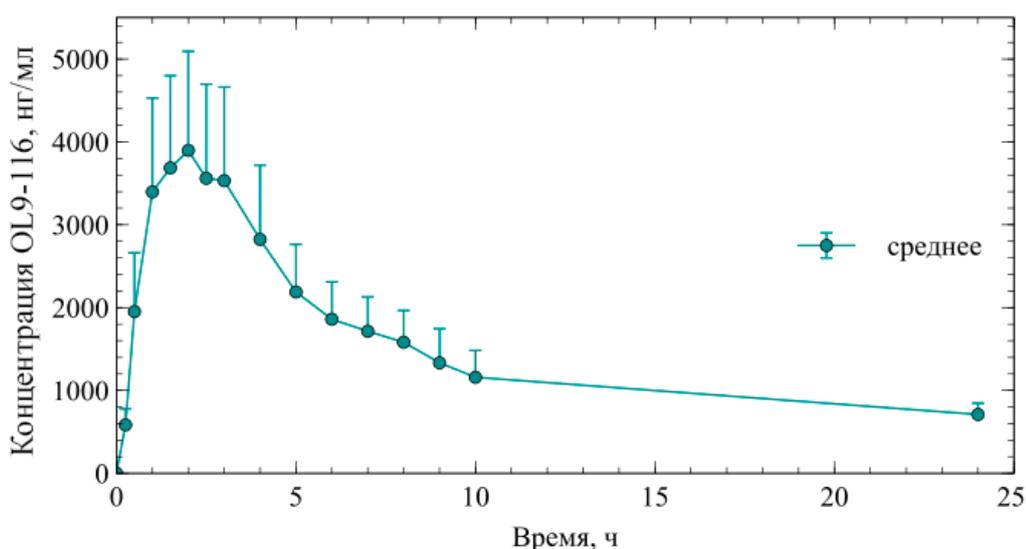


Рисунок 7. Концентрационно-временной профиль соединения OL9-116 в крови мышей после внутрибрюшинного введения в дозе 5 мг/кг (среднее значение \pm стандартное).

Пик максимума OL9-116, введенного внутривнутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг, детектируется спустя 2 часа после инъекции, как и при внутривнутрибрюшинном введении в дозе 150 мг/кг (см. рис. 6). Однако максимальная концентрация OL9-116, введенного внутривнутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг, сопоставима с данными фармакокинетики при внутривнутрижелудочном введении в дозе 150 мг/кг (см. рис. 5).

Таким образом, было обнаружено, что внутривнутрибрюшинное введение производного усниновой кислоты OL9-116 значительно повышает его биодоступность и позволяет снизить дозу в 30 раз. При этом максимум концентрации вещества в крови после внутривнутрибрюшинного введения в дозе 5 мг/кг (~4000 нг/мл) практически совпадает с таковым, наблюдающимся при внутривнутрижелудочном введении в дозе 150 мг/кг (~3800 нг/мл).

Исследование противоопухолевого эффекта OL9-116 в комбинации с топотеканом и индивидуально при разных режимах введения на опухолевой модели карциноме легких Льюис (LLC)

Ранее в работе [29] нашей командой было показано, что соединение OL9-116 усиливает противоопухолевое и антиметастатическое действие топотекана. Исследуемые вещества вводились одновременно. Так как топотекан вводился внутривнутрибрюшинно, он очень быстро попадал в кровоток и выводился из организма в течение нескольких часов: двукратное падение концентрации топотекана через 1,5 часа и десятикратное через 3-4 часа [30]. На первом этапе эксперимента по изучению фармакокинетики OL9-116, описанного выше, было обнаружено, что максимальная концентрация OL9-116 в крови при внутривнутрижелудочном введении в дозе 150 мг/кг достигается через 3-4 часа, в то время, как концентрация топотекана к этому времени уже снижается в 10 раз, если вещества вводить одновременно. Поэтому мы разнесли во времени введение OL9-116 и топотекана на три часа, чтобы совместить пики концентрации препаратов в крови.

Предварительно случайным образом было сформировано 6 групп по 6 особей в каждой, лечение проводили единожды спустя 7 дней после трансплантации опухоли:

1. Интактный контроль – мышам этой группы вводили 0,9% NaCl;
2. ДМСО+Tween-80 – мышам вводили однократно внутривнутрижелудочно с помощью зонда 0,2 мл раствора, содержащего физиологический раствор, Tween-80 (10%) и ДМСО (15%) – растворитель для OL9-116;
3. Топотекан – мышам вводили однократно внутривнутрибрюшинно 0,2 мл топотекана в разовой дозе 1 мг/кг;

4. Топотекан+OL9-116 (одновременно) – мышам ввели однократно топотекан как описано для группы 3 и OL9-116 в дозе 150 мг/кг внутрижелудочно;
5. OL9-116+Топотекан (через 3 ч) – мышам ввели OL9-116 150 мг/кг внутрижелудочно и спустя 3 часа сделали инъекцию топотекана;
6. OL9-116 – мышам ввели OL9-116.

При совмещении пиков концентраций OL9-116 и топотекана (введение топотекана через три часа после OL9-116) общий противоопухолевый эффект был заметно выше: средняя масса первичного опухолевого узла в группе, которой вводили топотекан при максимальной концентрации OL9-116 в крови мышей, была значительно ниже по сравнению с группой, которой топотекан вводили одновременно с OL9-116, и с группой, которой вводили только топотекан, данные статистически значимы (рис. 8 и табл. 5).

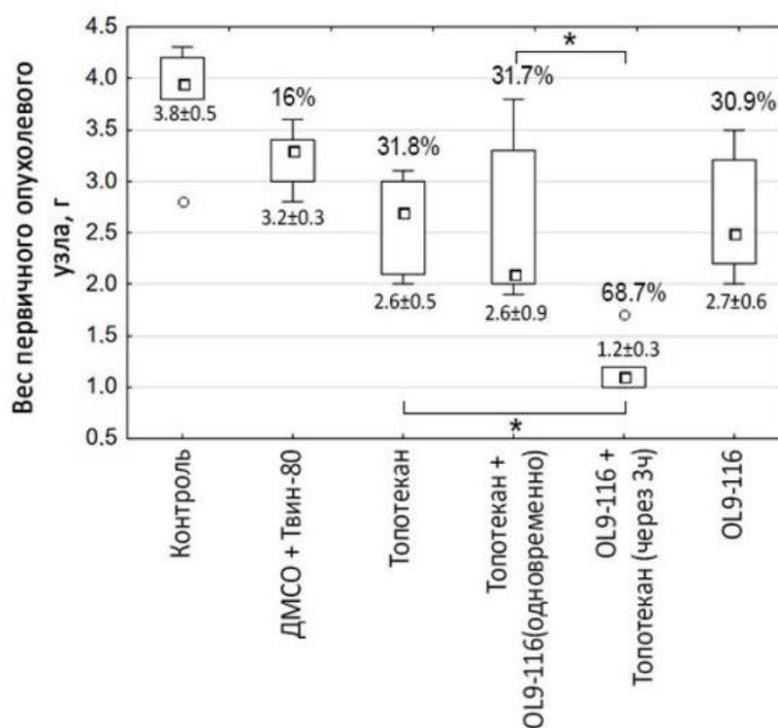


Рисунок 8. Влияние топотекана, OL9-116 и их комбинаций на массу первичного опухолевого узла

После индивидуального введения топотекана торможение роста опухоли (ТРО, %) по сравнению с контролем без лечения составило всего 31,8% (рис. 8 и табл. 5), тогда как комбинация OL9-116 с топотеканом, введенным через 3 часа, привела к торможению роста опухоли на 68,7%, этот показатель в два раза выше, чем в группе, которой вводили топотекан и OL9-116 одновременно – 31,7%. В других группах ТРО составило: ДМСО+Tween-80 – 16%; OL9-116 – 30,9%.

Антиметастатический эффект комбинации OL9-116 с топотеканом, введенным через 3 часа, был выше по сравнению с группой, получавшей комбинацию этих веществ одновременно, и группами, которым вводили их отдельно, но данные статистически не значимы (рис. 9 и табл. 5).

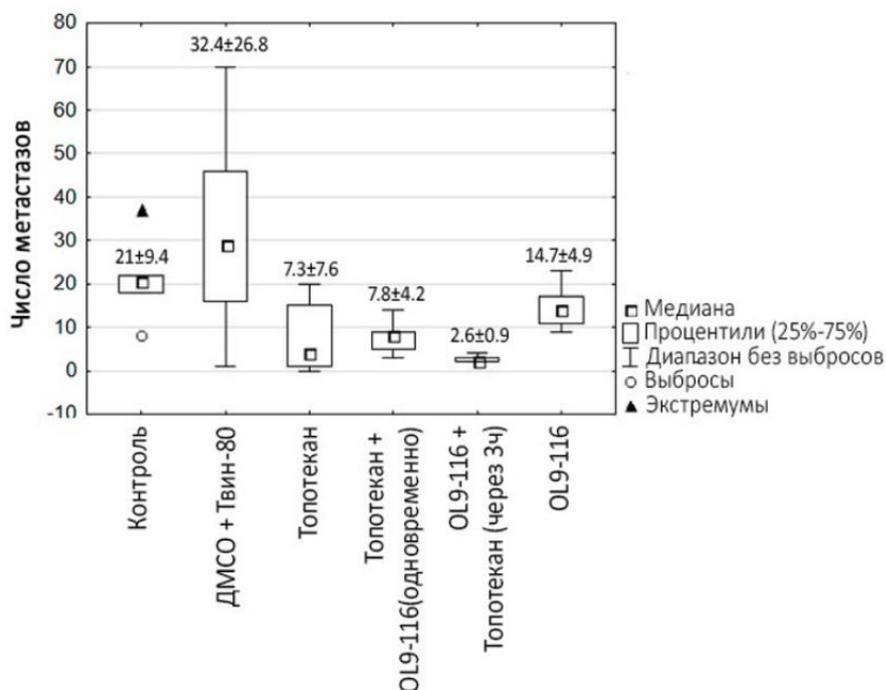


Рисунок 9. Влияние топотекана, OL9-116 и их комбинаций на количество метастазов в легких

Применение комбинации OL9-116 с топотеканом, введенным через 3 часа, привело к значительному замедлению роста опухоли (данные статистически значимы, $p < 0,05$), по сравнению с группой, которой топотекан вводили одновременно с OL9-116, и с группой, которой вводили только топотекан.

Таблица 5. Общий противоопухолевый эффект топотекана, OL9-116 и их комбинаций

Группа	Средний вес первичного опухолевого узла, г	Среднее число метастазов	Торможение роста опухоли (ТРО), %
Контроль без лечения	3,8±0,5	21,0±9,4	—
ДМСО+Tween-80	3,2±0,3	32,4±26,8	16
Топотекан	2,6±0,5	7,3±7,6	31,8
OL9-116+ Топотекан (одновременно)	2,6±0,9	7,8±4,2	31,7
OL9-116+ Топотекан (через 3 ч)	1,2±0,3	2,6±0,9	68,7
OL9-116	2,7±0,6	14,7±4,9	30,9

Исследование противоопухолевого эффекта OL9-116 в сниженной дозе в комбинации с топотеканом и индивидуально на опухолевой модели карциноме легких Льюис (LLC)

На основе данных по изучению фармакокинетики OL9-116, описанных выше, было установлено, что внутривнутрибрюшинное введение вещества повышает его биодоступность и позволяет снизить дозу в 30 раз. При этом максимум концентрации вещества в крови достигался спустя 2 часа после внутривнутрибрюшинного введения в дозе 5 мг/кг (~4000 нг/мл) практически сопоставим с таковым, наблюдающимся при внутривнутрижелудочном введении в дозе 150 мг/кг (~3800 нг/мл). Поэтому далее мы разнесли во времени введение OL9-116 в дозе 5 мг/кг и топотекана на два часа, чтобы совместить пики концентрации препаратов в крови.

Перед введением препаратов случайным образом было сформировано 6 групп по 6 особей в каждой, лечение проводили единожды спустя 7 дней после трансплантации опухоли:

1. Интактный контроль – мышам этой группы вводили 0,9% NaCl;
2. ДМСО+Tween-80 – мышам вводили однократно внутривнутрибрюшинно 0,2 мл раствора, содержащего физиологический раствор, Tween-80 (10%) и ДМСО (15%) – растворитель для OL9-116;
3. Топотекан – мышам вводили однократно внутривнутрибрюшинно 0,2 мл топотекана в разовой дозе 1 мг/кг;
4. Топотекан+OL9-116 (одновременно) – мышам ввели однократно топотекан как описано для группы 3 и OL9-116 в дозе 5 мг/кг как описано для группы 2;
5. OL9-116+Топотекан (через 2 часа) – мышам ввели OL9-116 в дозе 5 мг/кг и спустя 2 часа сделали инъекцию топотекана;
6. OL9-116 – мышам ввели OL9-116 в дозе 5 мг/кг внутривнутрибрюшинно.

При совмещении пиков концентраций OL9-116 в сниженной дозе 5 мг/кг и топотекана (введение топотекана через два часа после OL9-116) общий противоопухолевый эффект был заметно выше, чем при одновременном введении: средняя масса первичного опухолевого узла в группе, которой вводили топотекан при максимальной концентрации OL9-116 в крови мышей, была значительно ниже по сравнению с группой, которой топотекан вводили одновременно с OL9-116, и с группой, которой вводили только топотекан, данные статистически значимы (рис. 10 и табл. 6).

Таблица 6. Общий противоопухолевый эффект топотекана, OL9-116 в сниженной дозе и их комбинаций

Группа	Средний вес первичного опухолевого узла, г	Среднее число метастазов	Торможение роста опухоли (ТРО), %
Контроль без лечения	4,7 ± 0,6	46,3 ± 10,7	-
ДМСО+Твин-80	4,6 ± 0,5	40,8 ± 8,1	-
Топотекан	3,9 ± 0,9	23,2 ± 5,9	15,2
Топотекан + OL9-116 (одновременно)	3,2 ± 0,5	14,5 ± 4,3	31,9
OL9-116 + Топотекан (через 2 ч)	2,1 ± 0,2	5,4 ± 2,1	54,3
OL9-116	5,2 ± 0,3	13,7 ± 2,7	-

После введения топотекана в монорегиме торможение роста опухоли (ТРО, %) по сравнению с контролем без лечения составило всего 15,2% (рис. 10 и табл. 6), тогда как комбинация OL9-116 в дозе 5 мг/кг с топотеканом, введенным через 2 часа, привела к торможению роста опухоли на 54,3%, этот показатель в 1,7 раз выше, чем в группе, которой вводили топотекан и OL9-116 одновременно – 31,9%.

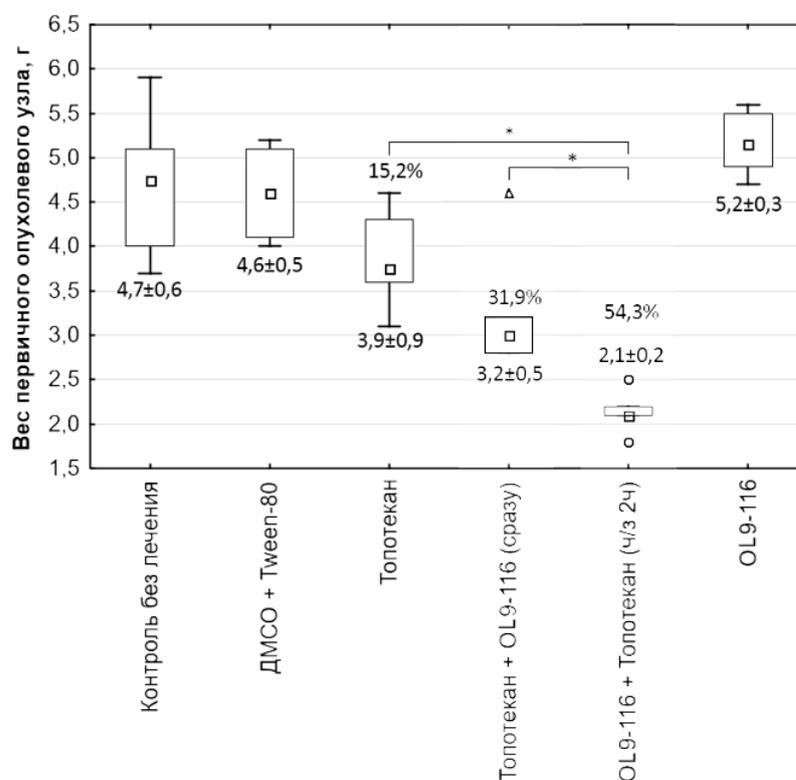


Рисунок 10. Влияние топотекана, OL9-116 в дозе 5 мг/кг и их комбинаций на массу первичного опухолевого узла.

Антиметастатический эффект комбинации OL9-116 в дозе 5 мг/кг с топотеканом, введенным через 2 часа, был выше по сравнению с группой, получавшей комбинацию этих веществ одновременно, и группами, которым вводили их отдельно (рис. 11 и табл. 6).

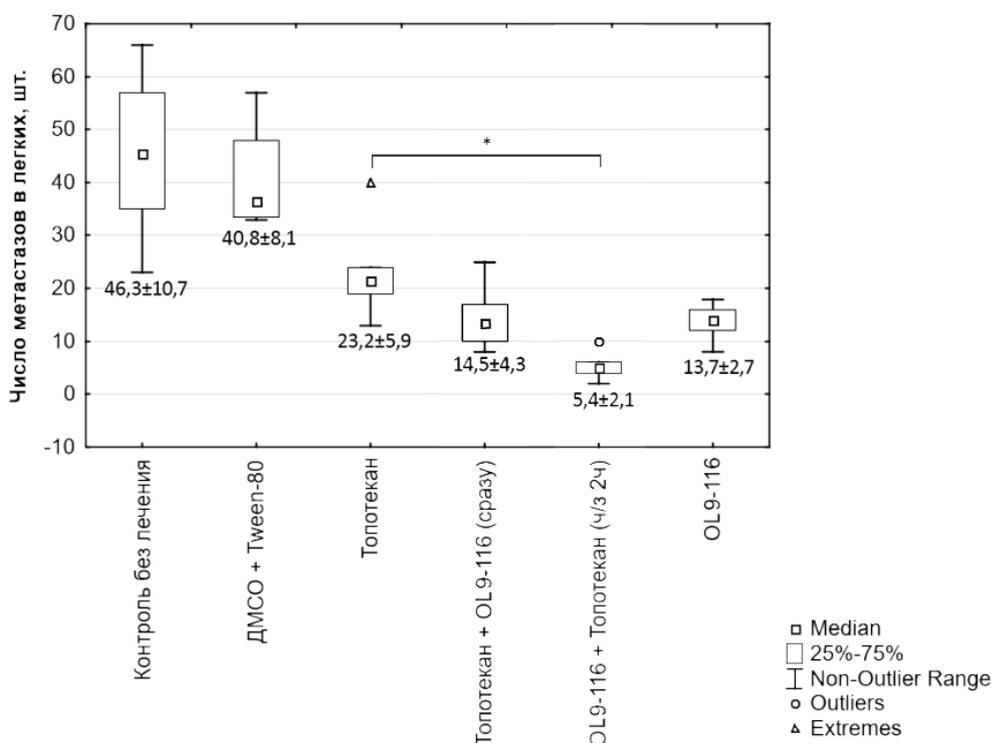


Рисунок 10. Влияние топотекана, OL9-116 в дозе 5 мг/кг и их комбинаций на количество метастазов в легких

Введение комбинации OL9-116 в дозе 5 мг/кг с топотеканом, введенным через 2 часа, привело к значительному замедлению роста опухоли (данные статистически значимы, $p < 0,05$), по сравнению с группой, которой топотекан вводили одновременно с OL9-116, и с группой, которой вводили только топотекан.

Исследование влияния соединения AF-185 на противоопухолевое и антиметастатическое действие топотекана на модели карциномы Льюис мышей

Поскольку соединение AF-185 оказалось эффективным и нетоксичным ингибитором TDP1, а также усиливало действие топотекана на широкой панели клеточных линий, данное соединение дополнительно было выбрано для дальнейших исследований *in vivo*.

В данном эксперименте случайным образом было сформировано 7 групп по 6 особей в каждой, лечение проводили единожды спустя 7 дней после трансплантации опухоли:

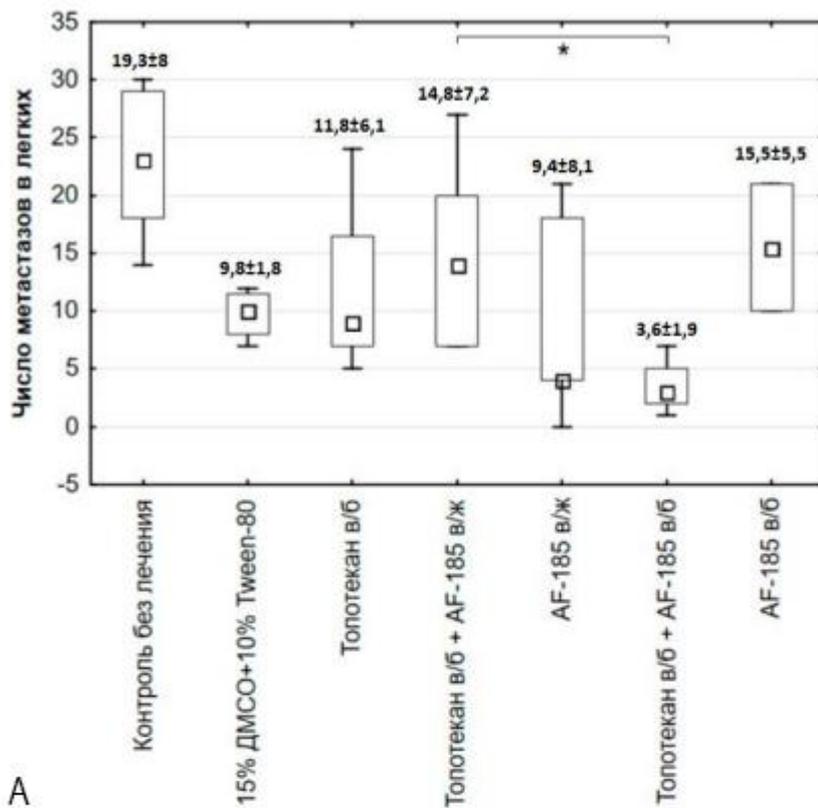
1. Интактный контроль – мышам этой группы вводили 0,9% NaCl;
2. ДМСО-Tween-80 – мышам вводили однократно 0,2 мл раствора, содержащего 0,9% NaCl, Tween-80 (10%) и ДМСО (15%) – растворитель для AF-185;
3. Топотекан – мышам вводили однократно внутрибрюшинно 0,2 мл топотекана в разовой дозе 1 мг/кг;
4. Топотекан + AF-185 в/ж – мышам ввели однократно топотекан как описано для группы 3 и AF-185 в виде 0,2 мл суспензии (Tween-80 (10%) и ДМСО (15%) в физрастворе) однократно внутрижелудочно в дозе 50 мг/кг;
5. AF-185 в/ж – мышам ввели AF-185 как для группы 4;
6. Топотекан + AF-185 в/б – мышам ввели однократно топотекан как описано для группы 3 и AF-185 в виде 0,2 мл суспензии (Tween-80 (10%) и ДМСО (15%) в физрастворе) однократно внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг;
7. AF-185 в/б – мышам ввели AF-185 как для группы 6.

Вес первичной опухоли определяли как разницу в массе здоровой конечности и конечности с опухолью после выведения мышей из опыта на 18 день после трансплантации LLC.

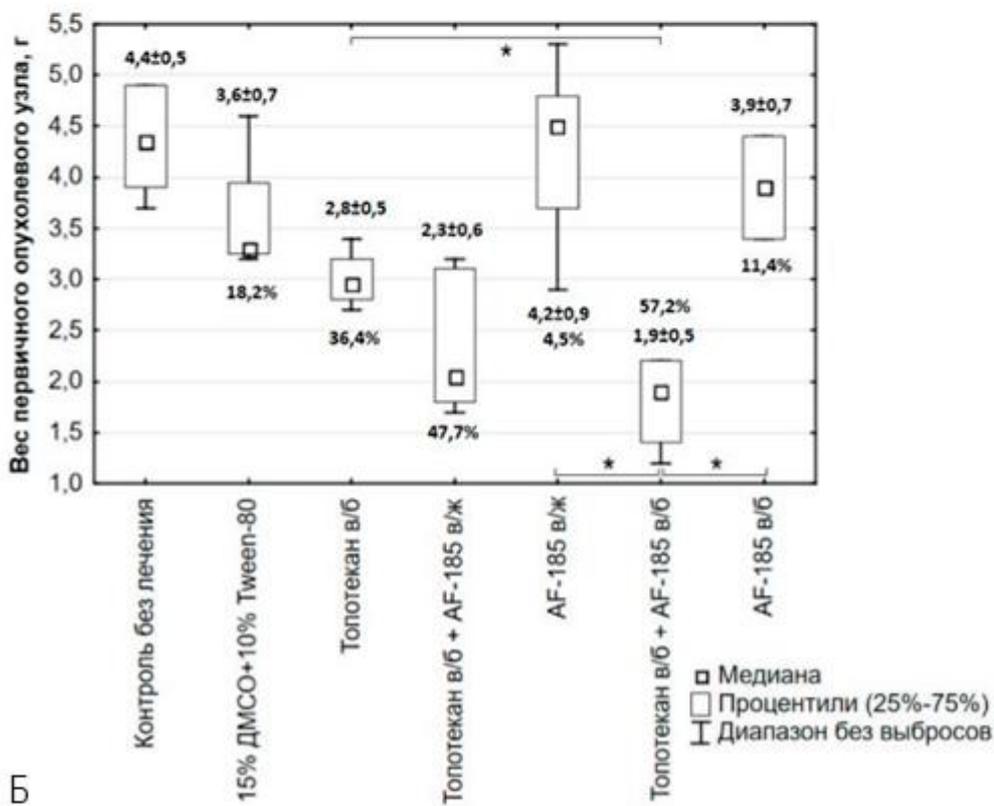
На рисунке 11Б видно, что введение топотекана снижает размер первичного узла, ТРО 36,4%, по сравнению с интактным контролем. Применение комбинации топотекан AF-185 в/ж приводит к дальнейшему снижению веса опухоли, ТРО 47,7%. Введение AF-185 в/ж само по себе не приводит к снижению веса опухоли. Наилучшие результаты получены для комбинации топотекан-AF-185 в/б, ТРО составило 57,2%, разница достоверна как по сравнению с обоими контролями, так и с группой топотекана ($p > 0,05$).

Менее выражено влияние AF-185 на антиметастатические свойства топотекана (рис. 11А). В использованной дозе топотекан практически не влиял на число метастазов в легких, также на число метастазов не оказало влияния применение AF-185 как в/ж, так и в/б, а также комбинации топотекан-AF-185 в/ж.

Комбинация топотекан-AF-185 в/б снижает число метастазов, хотя разница с контролем и с группой топотекана недостоверна. Таким образом, применение AF-185 в монорежиме не оказывает влияния ни на рост первичного узла, ни на число метастазов в легких. В комбинации с топотеканом наблюдается тенденция к снижению веса первичной опухоли и числа метастазов, более выраженная при внутрибрюшинном введении AF-185.



А



Б

Рисунок 11. Среднее количество метастазов в легких мышей (А) и средний вес первичного опухолевого узла LLC (Б). Цифры над квадратами указывают среднее значение ± стандартное отклонение; цифры под квадратами указывают ТРО, %. Звездочка указывает на статистически значимое различие между группами ($p < 0,05$).

Противоопухолевый эффект AF-185, используемого индивидуально или в сочетании с топотеканом на модели асцитной карциномы Кребса-2

В данном эксперименте случайным образом было сформировано 8 групп по 6 особей в каждой, лечение проводили единожды спустя 7 дней после трансплантации опухоли:

1. Интактный контроль – мышам этой группы вводили 0,9% NaCl;
2. ДМСО-Tween-80 – мышам вводили внутривентрикулярно однократно 0,2 мл раствора, содержащего 0,9% NaCl, Tween-80 (10%) и ДМСО (15%) – растворитель для AF-185;
3. ДМСО-Tween-80 – мышам вводили внутривентрикулярно однократно 0,2 мл раствора, содержащего 0,9% NaCl, Tween-80 (10%) и ДМСО (15%) – растворитель для AF-185;
4. Топотекан – мышам вводили однократно внутривентрикулярно 0,2 мл топотекана в разовой дозе 1 мг/кг;
5. Топотекан + AF-185 в/ж – мышам ввели однократно топотекан как описано для группы 3 и AF-185 в виде 0,2 мл суспензии в дозе 50 мг/кг;
6. AF-185 в/ж – мышам ввели AF-185 внутривентрикулярно в дозе 50 мг/кг;
7. Топотекан + AF-185 в/б – мышам ввели однократно топотекан как описано для группы 3 и AF-185 в виде 0,2 мл суспензии (Tween-80 (10%) и ДМСО (15%) в физрастворе) однократно внутривентрикулярно в дозе 50 мг/кг;
8. AF-185 в/б – мышам ввели AF-185 внутривентрикулярно в дозе 50 мг/кг.

Комбинация топотекана и AF-185, введенного внутривентрикулярно в дозе 50 мг/кг, оказалась более эффективной с точки зрения веса асцита и количества опухолевых клеток в асцитической жидкости, чем та же комбинация с соединением AF-185, введенным внутривентрикулярно в той же дозе. Кроме того, комбинация топотекана и AF-185, введенного внутривентрикулярно, имела более выраженный противоопухолевый эффект, чем топотекан, AF-185, введенный внутривентрикулярно и внутривентрикулярно по отдельности (рис.12).

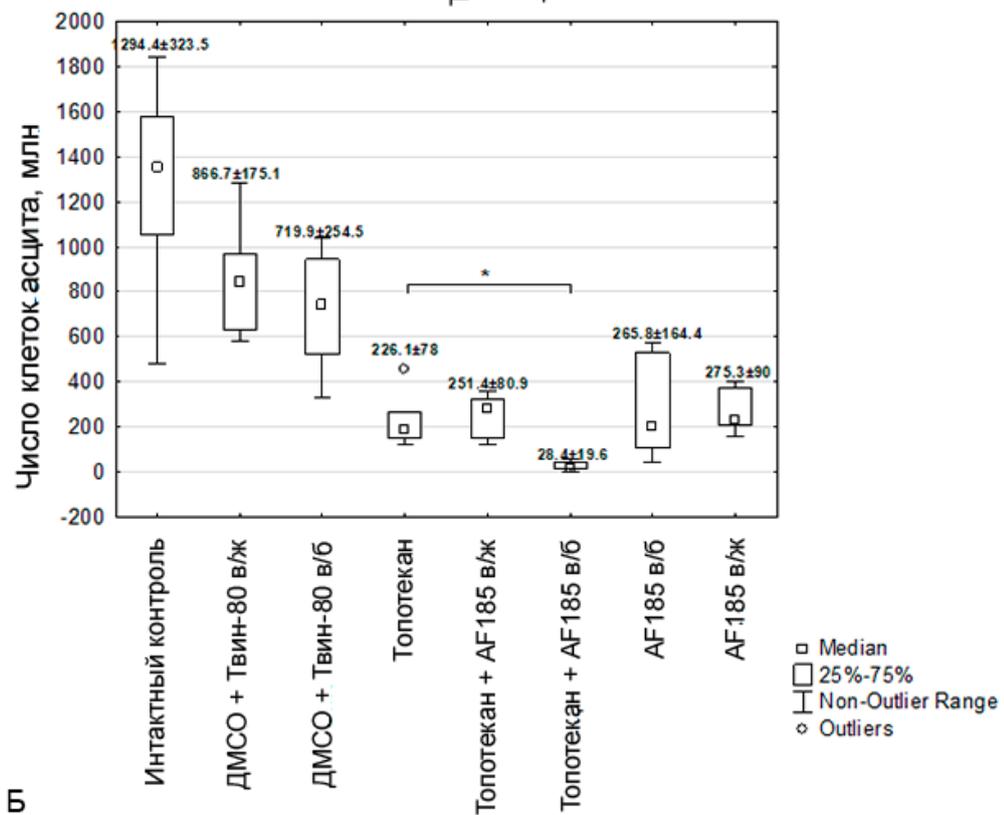
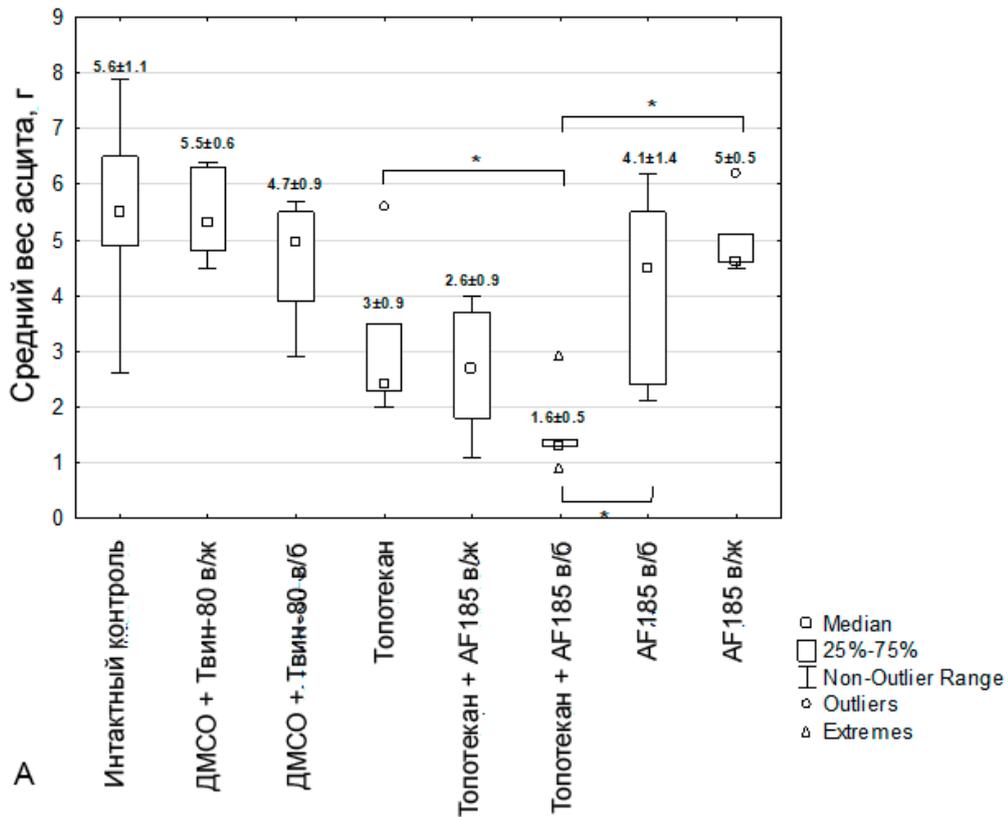


Рисунок 12. Средний вес асцита (А), общее количество опухолевых клеток (Б). Числа над прямоугольниками указывают среднее значение ± стандартное отклонение. Звездочка указывает на статистически значимое различие между группами ($p > 0,05$).

Влияние исследуемых веществ на показатели белой и красной крови у мышей с карциномой Кребса-2

Ранее мы уже наблюдали нормализацию гемопоэза при лечении мышей ингибитором TDP1 OL7-43 [33], который также является производным усниновой кислоты, но с модификациями, отличными от ингибитора AF-185. Механизм действия ингибиторов TDP1 на гемопоэз неизвестен и требует дальнейшего изучения. Поэтому нами был проведен подсчет лейкоцитов и эритроцитов у мышей с карциномой Кребса-2. Как видно из данных рис. 13А, у мышей с карциномой Кребса-2 (интактный контроль) наблюдается повышенное количество лейкоцитов и пониженное количество эритроцитов по сравнению со здоровыми мышами.

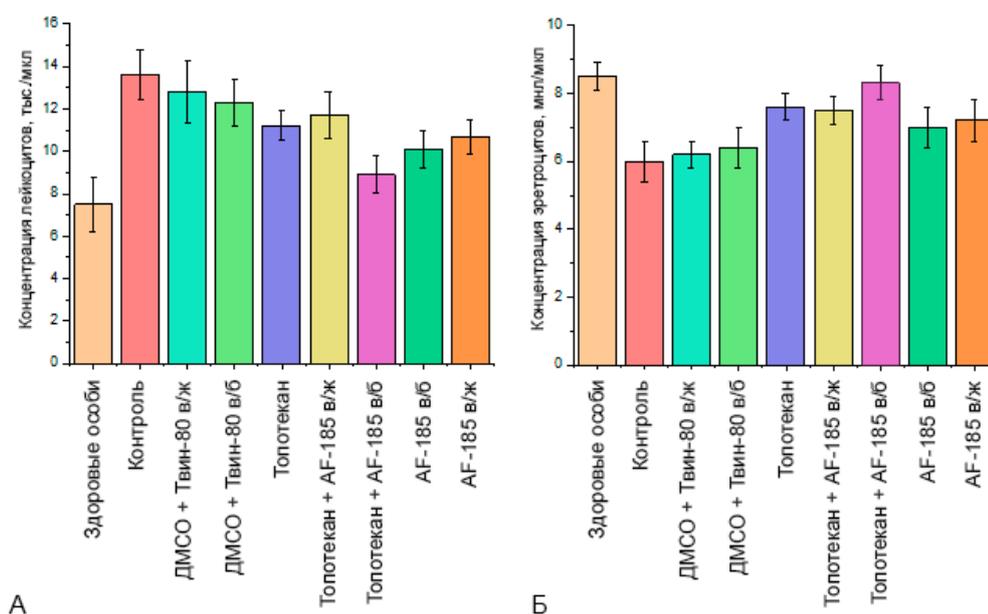


Рисунок 13. Концентрация лейкоцитов и эритроцитов в периферической крови мышей

Повышение количества лейкоцитов в периферической крови может быть связано с воспалительным процессом, развивающимся при формировании и росте опухоли. Введение растворителя для AF-185 (ДМСО + Твин-80), топотекана отдельно, а также топотекана в сочетании с AF-185 в/ж несколько снижало количество лейкоцитов. Следует отметить, что топотекан в дозе 1 мг/кг не обладал гемотоксичностью и частично нормализовал концентрацию лейкоцитов и эритроцитов, по-видимому, за счет своего противоопухолевого действия. Лечение мышей только AF-185, независимо от пути введения, снижало количество лейкоцитов несколько эффективнее, чем перечисленные выше препараты, но снижение было значимым только по сравнению с контролем без лечения. Введение

топотекана в сочетании с АF-185 в/б достоверно снижало количество лейкоцитов по сравнению с контролем без лечения, контролем с ДМСО + Твин-80 и группой мышей, получавших только топотекан.

У мышей с карциномой Кребс-2 наблюдается снижение количества эритроцитов по сравнению со здоровыми мышами (рис. 13Б), что может быть обусловлено общей интоксикацией организма. Количество эритроцитов практически не изменялось при введении растворителя. В то же время лечение препаратами и их комбинациями достоверно увеличивало количество эритроцитов, независимо от способа введения АF-185. Наибольший эффект снова оказала комбинация топотекана и АF-185, введенного в/ж или в/б, которая увеличила количество эритроцитов до здорового контроля. Таким образом, комбинация топотекана и АF-185, введенного внутривенно, нормализовала гемопоэз.

ВЫВОДЫ

1. Енаминовое производное усниновой кислоты OL9-116 и бидериватизированное производное усниновой кислоты AF-185 являются эффективными ингибиторами TDP1 (в диапазоне IC_{50} 0,11-0,2 мкМ).

2. OL9-116 и AF-185 не оказывают влияние на метаболическую активность разных типов культивируемых клеток в концентрациях до 100 мкМ, то есть являются нетоксичными в отношении пассируемых опухолевых и неопухолевых клеточных линий (величина их CC_{50} > 80 мкМ).

3. Оба соединения усиливают цитотоксическое действие топотекана в отношении различных пассируемых линий опухолевых клеток.

4. Эксперименты по индукции реверсий у *Salmonella typhimurium* в модифицированном тесте Эймса на штаммах TA98 и TA100 показали отсутствие мутагенной активности у OL9-116 и AF-185, соединения не приводят к мутациям типа замены пар оснований или сдвига рамки считывания, как в условиях активации микросомальной фракцией S9, так и без нее.

5. По результатам анализа способности OL9-116 и AF-185 реактивировать экспрессию репрессированного гена *GFP* в клетках HeLa T1 было показано, что соединения не обладают эпигенетической активностью (процент *GFP*-положительных клеток не превышает 10%).

6. Исследование фармакокинетики OL9-116 в крови здоровых мышей дало представление о биодоступности вещества, о времени достижения максимальной концентрации и ее величине. А также позволило выбрать оптимальный способ введения и снизить дозу в 30 раз.

7. Соединения OL9-116 и AF-185 в комбинации с топотеканом усиливают его противоопухолевый эффект в отношении опухолевых моделей *in vivo*.

8. Сочетанное применение AF-185 и топотекана приводит к нормализации гемопоза у мышей с карциномой Кребса-2.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Debela D. T. et al. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives // *SAGE open medicine*. – 2021. – Т. 9. – С. 20503121211034366.
2. Arruebo M. et al. Assessment of the evolution of cancer treatment therapies // *Cancers*. – 2011. – Т. 3. – №. 3. – С. 3279-3330.
3. Shapira A. et al. Nanomedicine for targeted cancer therapy: towards the overcoming of drug resistance // *Drug resistance updates*. – 2011. – Т. 14. – №. 3. – С. 150-163.
4. Stewart L. et al. A model for the mechanism of human topoisomerase I // *Science*. – 1998. – Т. 279. – №. 5356. – С. 1534-1541.
5. Li T. K., Liu L. F. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs // *Annual review of pharmacology and toxicology*. – 2001. – Т. 41. – №. 1. – С. 53-77.
6. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond // *Nature Reviews Cancer*. – 2006. – Т. 6. – №. 10. – С. 789-802.
7. Koster D. A. et al. Antitumour drugs impede DNA uncoiling by topoisomerase I // *Nature*. – 2007. – Т. 448. – №. 7150. – С. 213-217.
8. Nickoloff J. A. et al. Drugging the cancers addicted to DNA repair // *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. – 2017. – Т. 109. – №. 11. – С. djx059.
9. Alagoz M. et al. DNA repair and resistance to topoisomerase I inhibitors: mechanisms, biomarkers and therapeutic targets // *Current medicinal chemistry*. – 2012. – Т. 19. – №. 23. – С. 3874-3885.
10. G. L. Beretta et al. Camptothecin resistance in cancer: insights into the molecular mechanisms of a DNA-damaging drug // *Current medicinal chemistry*. – 2013. – Т. 20. – №. 12. – С. 1541-1565.
11. Heo J. et al. TDP1 promotes assembly of non-homologous end joining protein complexes on DNA // *DNA repair*. – 2015. – Т. 30. – С. 28-37.
12. Interthal H., Pouliot J. J., Champoux J. J. The tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1 is a member of the phospholipase D superfamily // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2001. – Т. 98. – №. 21. – С. 12009-12014.
13. Pouliot J. J. et al. Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes // *Science*. – 1999. – Т. 286. – №. 5439. – С. 552-555.
14. Jakobsen A. K. et al. Correlation between topoisomerase I and tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 activities in non-small cell lung cancer tissue // *Experimental and Molecular Pathology*. – 2015. – Т. 99. – №. 1. – С. 56-64.

15. Barthelmes H. U. et al. TDP1 overexpression in human cells counteracts DNA damage mediated by topoisomerases I and II // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Т. 279. – №. 53. – С. 55618-55625.
16. Murai J. et al. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1) repairs DNA damage induced by topoisomerases I and II and base alkylation in vertebrate cells // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Т. 287. – №. 16. – С. 12848-12857.
17. Interthal H. et al. SCAN1 mutant Tdp1 accumulates the enzyme–DNA intermediate and causes camptothecin hypersensitivity // *The EMBO journal*. – 2005. – Т. 24. – №. 12. – С. 2224-2233.
18. Zakharenko A.L. et al. Dual DNA topoisomerase 1 and tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibition for improved anticancer activity // *Medicinal Research Reviews*. – 2019. – Т. 39. – №. 4. – С. 1427-1441.
19. Дырхеева Н. С. и др. Противоопухолевая активность комбинации топотекана и ингибитора тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 на модели асцитной карциномы Кребс-2 мыши // *Молекулярная биология*. – 2021. – Т. 55. – №. 2. – С. 312-317.
20. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical biochemistry*. – 1976. – Т. 72. – №. 1-2. – С. 248-254.
21. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *Journal of immunological methods*. – 1983. – Т. 65. – №. 1-2. – С. 55-63.
22. Ames B. N. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria // *Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Detection Volume 1*. – Boston, MA: Springer US, 1971. – С. 267-282.
23. Maron D. M., Ames B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test // *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. – 1983. – Т. 113. – №. 3-4. – С. 173-215.
24. Kornienko T. E. et al. Enhancement of the Antitumor and Antimetastatic Effect of Topotecan and Normalization of Blood Counts in Mice with Lewis Carcinoma by Tdp1 Inhibitors—New Usnic Acid Derivatives // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Т. 25. – №. 2. – С. 1210.
25. Tazetdinova A. A. et al. Amino-derivatives of usnic acid // *Chemistry of natural compounds*. – 2009. – Т. 45. – С. 800-804.
26. Katz R. A. et al. High-frequency epigenetic repression and silencing of retroviruses can be antagonized by histone deacetylase inhibitors and transcriptional activators, but uniform

reactivation in cell clones is restricted by additional mechanisms //Journal of virology. – 2007. – Т. 81. – №. 6. – С. 2592-2604.

27. Poleshko A. et al. Identification of cellular proteins that maintain retroviral epigenetic silencing: evidence for an antiviral response //Journal of virology. – 2008. – Т. 82. – №. 5. – С. 2313-2323.

28. Okhina A. A. et al. Pharmacokinetic study of Tdp1 inhibitor resulted in a significant increase in antitumor effect in the treatment of Lewis lung carcinoma in mice by its combination with topotecan //Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2023. – Т. 236. – С. 115731.

29. Nikolin V. P. et al. The influence of an enamine usnic acid derivative (a tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitor) on the therapeutic effect of topotecan against transplanted tumors in vivo //Clinical & Experimental Metastasis. – 2021. – Т. 38. – №. 5. – С. 431-440.

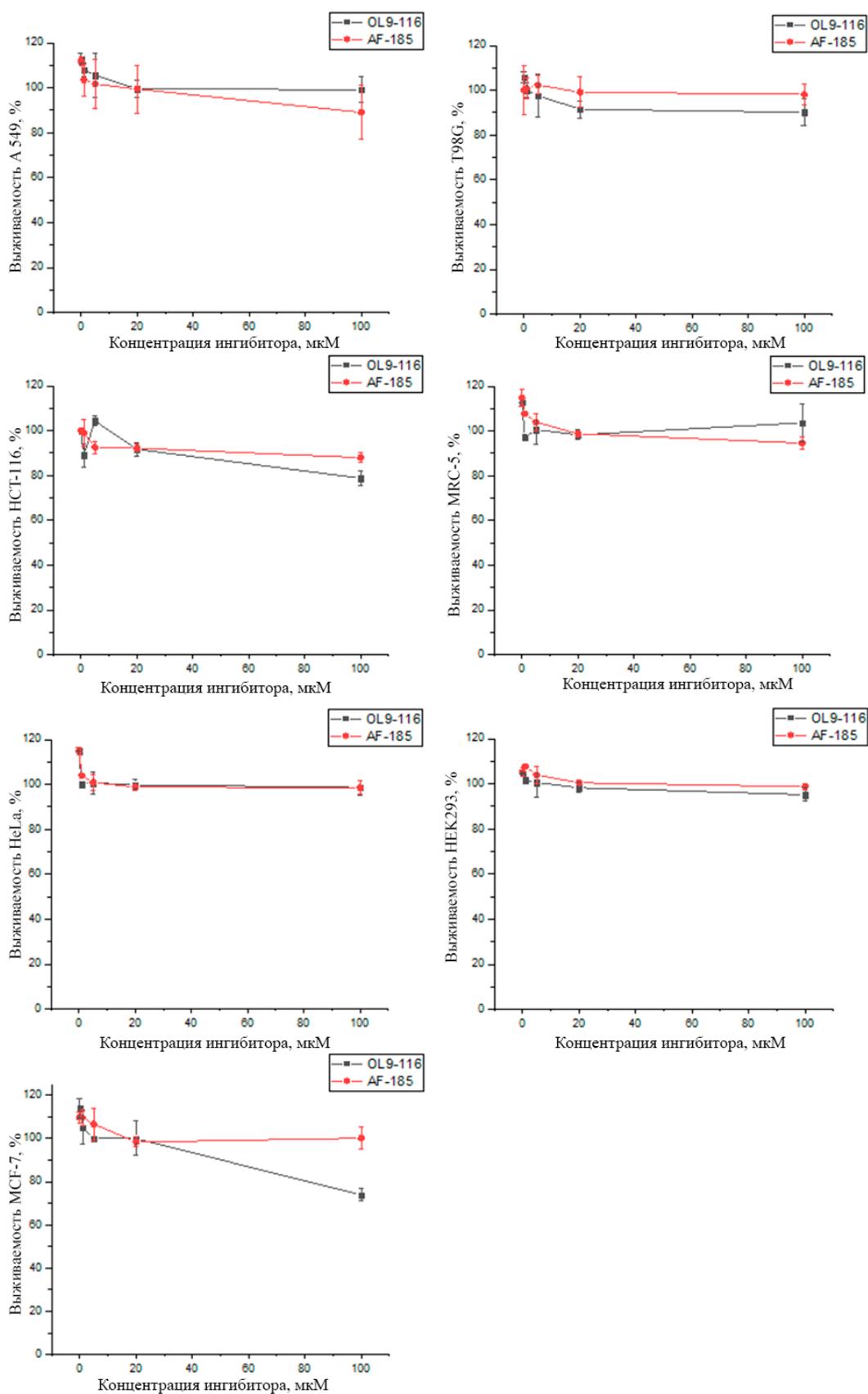
30. Chen J., Lu Q., Balthasar J. P. Mathematical modeling of topotecan pharmacokinetics and toxicodynamics in mice //Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics. – 2007. – Т. 34. – С. 829-847.

31. Zakharenko A. L. et al. Natural products and their derivatives as inhibitors of the DNA repair enzyme tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т. 24. – №. 6. – С. 5781.

32. Zakharenko A. L. et al. Novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors enhance the therapeutic impact of topotecan on in vivo tumor models //European Journal of Medicinal Chemistry. – 2019. – Т. 161. – С. 581-593.

33. Корниенко Т.Е. и др. Влияние производного усниновой кислоты (ингибитора тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1) на трансплантированные опухоли in vivo в качестве монотерапии и в сочетании с олапарибом //МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ. – 2023. – Т. 57. – №. 2. – С. 220-231.

Приложение 1. Изучение цитотоксичности AF-185 OL9-116 в отношении разных клеточных линий





Отчет о проверке

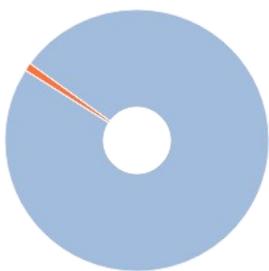
Автор: Корниенко Татьяна Евгеньевна

Проверяющий: Мирошниченко Светлана Константиновна

Название документа: Научный доклад_Корниенко_wr

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ

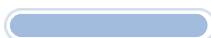
Тариф: FULL



Совпадения:
0,61%



Оригинальность:
99,39%



Цитирования:
0%



Самоцитирования:
0%



«Совпадения», «Цитирования», «Самоцитирования», «Оригинальность» являются отдельными показателями, отображаются в процентах и в сумме дают 100%, что соответствует проверенному тексту документа.

- **Совпадения** — фрагменты проверяемого текста, полностью или частично сходные с найденными источниками, за исключением фрагментов, которые система отнесла к цитированию или самоцитированию. Показатель «Совпадения» – это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к совпадениям, в общем объеме текста.
- **Самоцитирования** — фрагменты проверяемого текста, совпадающие или почти совпадающие с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа. Показатель «Самоцитирования» – это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.
- **Цитирования** — фрагменты проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнесла к корректно оформленным. К цитированиям относятся также шаблонные фразы; библиография; фрагменты текста, найденные модулем поиска «СПС Гарант: нормативно-правовая документация». Показатель «Цитирования» – это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к цитированию, в общем объеме текста.
- **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.
- **Оригинальный текст** — фрагменты проверяемого текста, не обнаруженные ни в одном источнике и не отмеченные ни одним из модулей поиска. Показатель «Оригинальность» – это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к оригинальному тексту, в общем объеме текста.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые совпадения проверяемого документа с проиндексированными в системе источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности совпадений или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

Номер документа: 19

Тип документа: Не указано

Дата проверки: 10.09.2024 06:54:22

Дата корректировки: 10.09.2024 07:14:05

Количество страниц: 37

Символов в тексте: 61256

Слов в тексте: 8791

Число предложений: 735

Комментарий: не указано

ПАРАМЕТРЫ ПРОВЕРКИ

Выполнена проверка с учетом редактирования: Да

Выполнено распознавание текста (OCR): Да

Выполнена проверка с учетом структуры: Нет

Модули поиска: Перефразирования по коллекции IEEE, Коллекция НБУ, Переводные заимствования (KkEn), Перефразирования по Интернету (EN), Кольцо вузов, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Сводная коллекция ЭБС, Переводные заимствования*, Шаблонные фразы, Переводные заимствования по Интернету (KyRu), Цитирование, Переводные заимствования (KuEn), IEEE, Переводные заимствования (RuEn), СПС ГАРАНТ: аналитика, Библиография, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, СМИ России и СНГ, Переводные заимствования по Интернету (KkRu), Публикации РГБ, Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, ИПС Адилет, Переводные заимствования по Интернету (EnRu), Патенты СССР, РФ, СНГ, Публикации eLIBRARY, Перефразирования по Интернету, Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика, Диссертации НББ, Переводные заимствования IEEE, Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования), Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика, Публикации РГБ (переводы и перефразирования), Интернет Плюс*, Медицина, Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Кольцо вузов (переводы и перефразирования), СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация

➔ **Модули, недоступные в рамках тарифа:** Интернет Free

ИСТОЧНИКИ

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Комментарий
[01]	21,62%	0%	Чепанова, Арина Александровна... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2022	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[02]	17,6%	0%	chepanova_dissert.pdf http://niboch.nsc.ru	20 Апр 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[03]	15,83%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/... http://niboch.nsc.ru	07 Июн 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[04]	9,22%	0%	Чепанова, Арина Александровна... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2022	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[05]	9,19%	0%	Диплом Чернышовой И.А.	26 Мая 2021	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[06]	8,75%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/... http://niboch.nsc.ru	01 Ноя 2022	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[07]	8,67%	0%	chepanova_dissert.pdf http://niboch.nsc.ru	20 Апр 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[08]	8,22%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/... http://niboch.nsc.ru	07 Июн 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[09]	7,72%	0%	Влияние производного усниново...	18 Апр 2023	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[10]	6,73%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/... http://niboch.nsc.ru	28 Мая 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[11]	4,83%	0%	Диплом Чернышовой И.А.	26 Мая 2021	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[12]	4,55%	0%	Dissertatsiya-Kirsanov-K.I..pdf https://ronc.ru	25 Апр 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[13]	4,55%	0%	Dissertatsiya-Kirsanov-K.I..pdf https://ronc.ru	26 Мая 2021	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[14]	4,14%	0%	Кирсанов, Кирилл Игоревич Узк... http://dlib.rsl.ru	16 Июн 2021	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[15]	3,48%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/... http://niboch.nsc.ru	06 Июн 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[16]	3,32%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/... http://niboch.nsc.ru	28 Мая 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[17]	3,19%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/... http://niboch.nsc.ru	07 Июн 2024	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.

[18]	3,1%	0%	https://pureportal.spbu.ru/files/1... https://pureportal.spbu.ru	29 Фев 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[19]	2,71%	0%	chepanova_dissert.pdf http://niboch.nsc.ru	20 Апр 2023	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[20]	2,6%	0%	Мохамед_Ислам_Сабер_Диплом	19 Мая 2022	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[21]	2,54%	0%	https://www.ronc.ru/upload/ibloc... https://ronc.ru	14 Июн 2022	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[22]	2,32%	0%	Противоопухолевая активность ... http://elibrary.ru	01 Янв 2021	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[23]	2,29%	0%	Фармакология для врачей скоро... http://ivo.garant.ru	23 Июл 2011	Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[24]	2,26%	0%	Узкобороздочные лиганды в кан... https://ronc.ru	11 Июл 2020	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[25]	2,19%	0%	SBB_2022.pdf https://pure.nsu.ru	03 Ноя 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[26]	1,84%	0%	Диплом Михайлова М.А.	07 Июн 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[27]	1,75%	0%	БЛАСТОМОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ... http://elibrary.ru	23 Дек 2016	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[28]	1,51%	0%	не указано http://toxreview.ru	30 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[29]	1,51%	0%	Информационные события [Инс... http://niboch.nsc.ru	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[30]	1,46%	0%	https://pureportal.spbu.ru/files/1... https://pureportal.spbu.ru	08 Апр 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[31]	1,46%	0%	https://pureportal.spbu.ru/files/1... https://pureportal.spbu.ru	06 Мая 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[32]	1,39%	0%	Фармакология для врачей скоро... http://ivo.garant.ru	23 Июл 2011	Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[33]	1,38%	0%	Диплом Орлова	26 Мая 2021	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[34]	1,27%	0%	Кирсанов, Кирилл Игоревич Узк... http://dlib.rsl.ru	16 Июн 2021	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[35]	1,23%	0%	Лаборатория направленных тра... http://web.nioch.nsc.ru	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[36]	1,23%	0%	https://www.ronc.ru/upload/ibloc... https://ronc.ru	20 Июн 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[37]	1,18%	0%	PDF http://influenza.spb.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[38]	1,14%	0%	https://www.ronc.ru/upload/ibloc... https://ronc.ru	28 Апр 2022	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[39]	1,14%	0%	https://www.ronc.ru/upload/ibloc... https://ronc.ru	07 Июн 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[40]	0,97%	0%	Диссертация (16/16) http://web.nioch.nsc.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[41]	0,93%	0%	Молекулярная биология. Т. 57, Н... https://sciencejournals.ru	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[42]	0,93%	0%	Молекулярная биология. Т. 57, Н... https://sciencejournals.ru	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[43]	0,91%	0%	Медицина и здоровье https://sbras.ru	02 Апр 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[44]	0,86%	0%	Ли-Жуланов, Николай Сергеевич... http://dlib.rsl.ru	16 Июн 2021	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[45]	0,83%	0%	Савин, Иннокентий Андреевич ... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2023	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[46]	0,81%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/... http://niboch.nsc.ru	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[47]	0,81%	0%	Синтез новых производных усни... http://elibrary.ru	01 Янв 2023	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[48]	0,75%	0%	https://new.ras.ru/upload/iblock/... https://new.ras.ru	22 Апр 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[49]	0,74%	0%	МАСШТАБИРОВАНИЕ ТЕХНОЛОГ... http://elibrary.ru	16 Июл 2018	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.

[50]	0,71%	0%	Диплом Михайлова М.А.	07 Июн 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[51]	0,68%	0%	Диплом Орлова	26 Мая 2021	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[52]	0,67%	0%	Постановление об утверждении ... https://npbio.ru	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[53]	0,64%	0%	Конференции ИХБФМ СО РАН И... http://niboch.nsc.ru	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[54]	0,64%	0%	Анонсы конференций [Институт ... http://niboch.nsc.ru	26 Авг 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[55]	0,64%	0%	Публикации Института (БД) https://web3.nioch.nsc.ru	05 Июн 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[56]	0,61%	0,61%	https://www.openbio.ru/openbio_... https://openbio.ru	30 Мая 2023	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[57]	0,61%	0%	Ермаков, Евгений Александрови... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2020	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[58]	0,56%	0%	Меднова, Ирина Андреевна Кли... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2020	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[59]	0,52%	0%	https://disk.icgbio.ru/s/ejG5gRfYG... https://disk.icgbio.ru	28 Авг 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[60]	0,51%	0%	ВКР_Бишани	20 Мая 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[61]	0,49%	0%	не указано	13 Янв 2022	Шаблонные фразы	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[62]	0,48%	0%	http://abilev.narod.ru/pics/avtoref... http://abilev.narod.ru	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[63]	0,46%	0%	Биохимия. 2017. Т. 82, вып. 4 http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[64]	0,46%	0%	Т. 2 part#1 http://emll.ru	08 Июл 2017	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[65]	0,43%	0%	Диплом2023_Шаяхметова	22 Мая 2023	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[66]	0,41%	0%	Противоопухолевая активность ... http://elibrary.ru	01 Янв 2021	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[67]	0,41%	0%	NYmnik_68112. Милахина Елена ... http://umnik.fasie.ru	31 Окт 2020	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[68]	0,41%	0%	ГИСТОНОВЫЕ МЕТИЛТРАНСФЕРА... 29 Окт 2023	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.	
[69]	0,39%	0%	Алкилирующие фторированные ... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[70]	0,39%	0%	Государственная фармакопея Ро... http://ivo.garant.ru	21 Апр 2020	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[71]	0,35%	0%	Вахрушева, Ольга Александровн... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2022	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[72]	0,35%	0%	Автореферат http://web.nioch.nsc.ru	28 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[73]	0,33%	0%	Заборовский, Андрей Владимиро... http://dlib.rsl.ru	14 Янв 2020	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[74]	0,33%	0%	List of abstracts accepted for publ... https://bgrssb.icgbio.ru	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[75]	0,32%	0%	ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ И П... http://elibrary.ru	01 Янв 2018	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[76]	0,32%	0%	МОДЕЛЬ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ... https://cyberleninka.ru	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[77]	0,32%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/... http://niboch.nsc.ru	11 Апр 2022	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[78]	0,31%	0%	Одаренко-диплом	09 Июн 2020	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[79]	0,31%	0%	ФИНАЛ Диплом Алексева Викто...	08 Июн 2018	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[80]	0,29%	0%	Pharmacokinetic study of Tdp1 in... https://pure.nsu.ru	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[81]	0,29%	0%	Dissertatsiya-Kirsanov-K.I..pdf https://ronc.ru	25 Апр 2024	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[82]	0,29%	0%	Dissertatsiya-Kirsanov-K.I..pdf https://ronc.ru	26 Мая 2021	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[83]	0,27%	0%	https://disk.icgbio.ru/s/ejG5gRfYG... https://disk.icgbio.ru	28 Авг 2024	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[84]	0,27%	0%	Кирсанов, Кирилл Игоревич Инд... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2010	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[85]	0,26%	0%	Candidate genes in quantitative tr... http://esdocs.com	09 Янв 2018	Перефразирования по Интернету (EN)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[86]	0,25%	0%	Формирование подходов к оценк... https://book.ru	01 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[87]	0,25%	0%	Interpretation of radioimpedance ... https://ieeexplore.ieee.org	04 Ноя 2013	IEEE	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[88]	0,25%	0%	Три бердских предприятия назв... http://berdsk.bezformata.ru	07 Апр 2014	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[89]	0,25%	0%	БЭМЗ, Нотис и Продсиб из Бердс... http://berdsk.bezformata.ru	07 Апр 2014	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[90]	0,25%	0%	Учёные степени — без Высшей ... http://cheboksari.yodda.ru	29 Дек 2018	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[91]	0,25%	0%	В Сыктывкаре состоялась церем... http://komiinform.ru	25 Дек 2018	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[92]	0,25%	0%	Искитимцемент стал надежным ... http://vesiskitim.ru	05 Апр 2014	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[93]	0,25%	0%	Способ очистки вируса осповакц... http://findpatent.ru	25 Июнь 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[94]	0,25%	0%	Средство для нейтрализации ви... http://findpatent.ru	25 Июнь 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[95]	0,25%	0%	Способ получения наноразмерн... http://findpatent.ru	25 Июнь 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[96]	0,25%	0%	ТЕХНОЛОГИИ РАСПРЕДЕЛЕННОГ... http://elibrary.ru	01 Янв 2012	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[97]	0,25%	0%	Решение Думы города Томска от ... http://ivo.garant.ru	26 Окт 2019	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[98]	0,25%	0%	Постановление Правительства Н... http://ivo.garant.ru	08 Ноя 2014	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[99]	0,25%	0%	Постановление Правительства Н... http://ivo.garant.ru	27 Июл 2015	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[100]	0,25%	0%	Постановление Правительства Н... http://ivo.garant.ru	15 Окт 2014	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[101]	0,24%	0%	Transfer Learning for Hand Arthri... https://ieeexplore.ieee.org	10 Мая 2023	IEEE	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[102]	0,24%	0%	https://www.academpharm.ru/im... https://academpharm.ru	12 Апр 2022	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[103]	0,23%	0%	https://www.icgbio.ru/wp-content... https://icgbio.ru	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[104]	0,22%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/... http://niboch.nsc.ru	19 Авг 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[105]	0,21%	0%	Структура лекарственной устойч... http://elibrary.ru	14 Сен 2015	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[106]	0,19%	0%	Вестник гематологии. Том IX. № ... http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[107]	0,19%	0%	Молекулярная биология. 2017. Т... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[108]	0,19%	0%	Всероссийская научно-практиче... http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[109]	0,17%	0%	Жильникова_ДИПЛОМ	21 Мая 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[110]	0,17%	0%	VARICOEASE – A Soothebe... https://ieeexplore.ieee.org	23 Ноя 2023	IEEE	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[111]	0,17%	0%	Metabolomic profiling of biologica... https://ieeexplore.ieee.org	27 Июл 2021	IEEE	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[112]	0,17%	0%	Early Detection and Prevention of ... https://ieeexplore.ieee.org	28 Авг 2023	IEEE	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[113]	0,16%	0%	Диплом_Ильина_AA	12 Июнь 2020	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[114]	0,16%	0%	Бойко, Анастасия Сергеевна Кли... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2023	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[115]	0,15%	0%	Т. 11, № 3 http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[116]	0,14%	0%	http://www1.jinr.ru/Proceedings/r... http://www1.jinr.ru	01 Июнь 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[117]	0,13%	0%	Исследователи выявили механи... https://poisknews.ru	28 Июн 2023	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[118]	0,13%	0%	Способ получения свето- и терм... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[119]	0,13%	0%	Особенности токсического дейст... http://dep.nlb.by	04 Июл 2017	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[120]	0,11%	0%	https://medchem.ipac.ac.ru/doc/... https://medchem.ipac.ac.ru	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[121]	0,1%	0%	https://diss.unn.ru/files/2021/112... https://diss.unn.ru	21 Янв 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

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

Отчёт о проверке текста научно-квалификационной работы на
объём заимствования

Корниенко Татьяна Евгеньевна

«Поиск ингибиторов ферментов репарации ДНК как потенциальных
противораковых и противовирусных лекарств»

Оригинальность работы составляет 99.39%, что соответствует требованиям
порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на
заседании Итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь АК – к.б.н. С.К. Мирошниченко