

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

На правах рукописи

ЧЕПАНОВА АРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы

Изучение механизмов процессинга повреждений, катализируемого тирозил-ДНК-фосфодиэстеразой 1 на ДНК различной структуры, и разработка ингибиторов этого фермента

Направление подготовки 06.06.01 Биологические науки
Направленность 03.01.03 Молекулярная биология

Аспирант _____ А. А. Чепанова
Научный руководитель _____ академик РАН, профессор, д.х.н. О. И. Лаврик
Научный руководитель _____ к.х.н. А. Л. Захаренко

Новосибирск – 2022

Работа выполнена в лаборатории биоорганической химии ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

Научный руководитель:

Лаврик Ольга Ивановна

Академик РАН, профессор, доктор химических наук, заведующая лабораторией биоорганической химии ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

Захаренко Александра Леонидовна

Кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории биоорганической химии ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Онкологические заболевания представляют собой обширный класс заболеваний, включающий как доброкачественные, так и злокачественные новообразования. Злокачественные новообразования являются второй причиной смертности (после сердечно-сосудистых заболеваний) как в России, так и во всем мире, и входят в перечень социально значимых заболеваний, определенных постановлением Правительства РФ. По данным ВОЗ от 2018 года, показатель смертности от онкологических заболеваний в России составил 108,6 на 100 тыс. населения — это 24-е место по смертности от онкологических заболеваний среди стран мира [1]. Снижение смертности — ключевая цель борьбы с онкологическими заболеваниями. Для этого предлагаются различные стратегии улучшения терапии онкологических заболеваний. Одним из таких направлений является поиск ингибиторов ферментов системы репарации ДНК. Повреждающие ДНК препараты и ионизирующее излучение применяют во многих схемах лечения различных онкозаболеваний. Однако, активная работа системы репарации ДНК может обуславливать устойчивость раковых клеток к химио- и радиотерапии, поэтому терапевтический эффект лечения зависит от эффективности работы системы репарации ДНК [2–4]. Селективное воздействие, направленное на ингибирование ферментов репарации ДНК, может быть основой как монотерапии, так и эффективной сопровождающей терапии [4–11].

Одной из перспективных мишеней – белков репарации ДНК является тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1) – фермент, препятствующий накоплению ковалентных аддуктов топоизомеразы 1 (Top1) с ДНК за счет гидролиза 3'-фосфотирозильной связи [12].

Топоизомераза 1 – фермент, отвечающий за изменение топологии ДНК во время репликации, транскрипции и сегрегации хромосом. Ферментативная активность Top1 включает в себя образование одноцепочечного разрыва ДНК, который позволяет 5'-концу разрыва вращаться вокруг неповрежденной цепи, тем самым снимая суперспирализацию ДНК. При этом фермент образует ковалентный комплекс с 3'-концом разрыва через остаток тирозина-723 (у человека) [13]. Затем Top1 катализирует лигирование концов ДНК и высвобождается из комплекса. Ингибиторы Top1 стабилизируют промежуточный ковалентный комплекс Top1 – ДНК. Невозможность восстановить структуру ДНК приводит к образованию одноцепочечных разрывов, которые могут превратиться в более токсичные двуцепочечные, что приведет к клеточной гибели. На данный момент два производных камптотецина (СРТ), топотекан и иринотекан, стабилизирующие комплекс Top1 – ДНК, применяются в клинической практике для лечения ряда онкологических заболеваний [14, 15].

Tdp1 расщепляет 3'-фосфодиэфирную связь между остатком тирозина-723 топоизомеразы 1 и 3'-концом ДНК, а также удаляет другие повреждения с 3'-конца ДНК [16, 17]. Таким образом, Tdp1 противостоит ингибиторам Top1, которые являются достаточно эффективными противораковыми препаратами [8, 14, 18] и является возможной причиной лекарственной устойчивости некоторых видов рака [2, 19–22].

Следовательно, применение ингибиторов Tdp1 может увеличить эффективность терапии и/или снизить число и интенсивность побочных эффектов традиционных препаратов.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является поиск ингибиторов Tdp1 среди производных усниновой кислоты и изучение их способности sensibilizировать опухоли к действию противоопухолевых препаратов, используемых в клинике.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Скрининг ингибиторной активности производных усниновой кислоты в отношении Tdp1 и определение эффективных концентраций ингибиторов.
2. Изучение цитотоксичности наиболее перспективных соединений в отношении ряда перевиваемых линий опухолевых клеток, представляющих модели различных видов рака.
3. Изучение влияния нетоксичной концентрации ингибитора на цитотоксический эффект топотекана в отношении перевиваемых линий опухолевых клеток.
4. Изучение накопления повреждений ДНК под действием ингибиторов Tdp1 отдельно и в комбинации с ингибиторами топоизомеразы 1.
5. Изучение про-апоптотического влияния соединений отдельно и в комбинации с топотеканом
6. Изучение влияния ингибиторов Tdp1 на торможение роста опухоли мышей в виде монопрепарата и в комбинации с топотеканом. Изучение общетоксического действия ингибиторов Tdp1 и их комбинации с топотеканом.

Научная новизна полученных результатов. В рамках данной работы в качестве ингибиторов Tdp1 были изучены соединения на основе усниновой кислоты (УК). УК обладает широким диапазоном биологической активности и имеет доступную сырьевую базу, однако обладает существенным токсическим эффектом в диапазоне эффективных концентраций. Нативная УК не подавляет активность Tdp1 в концентрациях до 50 мкМ [23, 24], поэтому, чтобы снизить токсический эффект УК и улучшить ингибиторные

характеристики в отношении Tdp1, были выполнены различные модификации исходного соединения. Впервые в качестве ингибиторов Tdp1 были изучены цианопроизводные УК, фураноновые производные УК и гидразонотиазольные производные УК с различными заместителями. Было показано, что многие соединения среди изученных классов обладают высокой ингибирующей активностью в отношении Tdp1. Так, цианопроизводные УК подавляют Tdp1 в микромолярном диапазоне концентраций (величины IC₅₀ 1,6–15 мкМ), а фураноновые и гидразонотиазольные производные УК ингибируют Tdp1 в наномолярных концентрациях (значения IC₅₀ от 10 нМ). Гидразонотиазольные производные УК являются наиболее эффективными ингибиторами Tdp1, известными на сегодняшний день.

В данной работе также была изучена цитотоксичность наиболее эффективных ингибиторов Tdp1 на основе УК в отношении перевиваемых линий опухолевых клеток. Было показано, что соединения на основе УК обладают умеренной цитотоксичностью или нетоксичны, что позволило выбрать нетоксичные концентрации ингибиторов для изучения их влияния на цитотоксический эффект топотекана. Наиболее эффективными сенситизаторами опухолевых клеток к действию топотекана оказались гидразонотиазольные производные УК. Было показано, что соединения **9e** и **20d**, усиливают действие топотекана в 4,7 и 7,5 раз соответственно.

Впервые методом ДНК-комет было показано увеличение количества повреждений ДНК при совместном использовании соединений **9e** и **20d** с топотеканом, при сравнении с применением только топотекана. Это указывает на то, что основной молекулярной мишенью исследуемых соединений в живой клетке является Tdp1.

В данной работе методом проточной цитометрии с окрашиванием показано, что соединение **20d** само по себе не индуцирует клеточную гибель, но при совместном использовании с топотеканом увеличивает количество апоптотических клеток, что позволяет использовать топотекан в более низких концентрациях.

Впервые было показано, что ингибиторы Tdp1 на основе УК **9e** и **20d** в комбинации с топотеканом усиливают его антиметастатический эффект *in vivo*. Так же было показано, что соединение **20d** обладает как собственным противоопухолевым эффектом при внутрибрюшинном введении на опухоли Кребс-2, так и способностью усиливать противоопухолевый эффект топотекана, на опухоли мышей Кребс-2 и LLC, при разных способах введения. В свою очередь, соединение **9e** не обладает противоопухолевым эффектом, но при индивидуальном внутрибрюшинном введении и в комбинации с топотеканом как при внутрибрюшинном, так и внутрижелудочном введении увеличивает продолжительность жизни мышей.

Практическая значимость работы. Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1) является перспективной мишенью для лечения онкологических заболеваний [17], поскольку играет ключевую роль в удалении повреждений ДНК, образующихся под действием клинически используемых в противораковой терапии ингибиторов Top1 (иринотекан и топотекан) [18]. Некоторые виды рака обладают повышенным уровнем экспрессии Tdp1 [25–28], этим может быть обусловлена их резистентность к различным противоопухолевым препаратам [29]. В свою очередь, мыши, нокаутные по Tdp1, и клеточные линии со сниженной экспрессией Tdp1 гиперчувствительны к камптотецину [30–33].

Таким образом, подавление активности Tdp1 может увеличить цитотоксичность различных противоопухолевых препаратов, направленных на повреждение опухолевой ДНК, а также помочь в борьбе с лекарственно устойчивыми опухолями. Терапевтическим эффектом от совместного применения таких веществ и ингибиторов Tdp1 может быть более активное подавление роста раковых клеток и/или снижение дозы традиционных препаратов.

Апробация работы. Публикации. По результатам исследования опубликовано 11 работ из них 5 статей в рецензируемых изданиях рекомендованного перечня ВАК и 6 тезисов конференций (докладчик – А.А.Чепанова).

Zakharenko, A., Luzina, O., Sokolov, D., Zakharova, O., Rakhmanova, M., **Chepanova, A.**, Dyrkheeva, N., Lavrik, O., Salakhutdinov, N. Usnic acid derivatives are effective inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1. Russ J Bioorg Chem 43, 84–90 (2017). doi.org/10.1134/S1068162017010125

Zakharova O, Luzina O, Zakharenko A, Sokolov D, Filimonov A, Dyrkheeva N, **Chepanova A**, Пина Е, Илына А, Клабенкова К, Челобанов В, Стетенко Д, Зафар А, Еуртивонг С, Рейниссон Ж, Волчо К, Салахутдинов Н, Лаврик О. Synthesis and evaluation of aryliden- and hetarylidenfuranone derivatives of usnic acid as highly potent Tdp1 inhibitors. Bioorg Med Chem. 2018 Aug 15;26(15):4470-4480. doi: 10.1016/j.bmc.2018.07.039.

Zakharenko A, Luzina O, Sokolov D, Kaledin V, Nikolin V, Popova N, Patel J, Zakharova O, **Chepanova A**, Zafar A, Reynisson J, Leung E, Leung IKH, Volcho K, Salakhutdinov N, Lavrik O. Novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors enhance the therapeutic impact of topotecan on in vivo tumor models. Eur J Med Chem. 2019 Jan 1; 161:581-593. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.10.055. A. S. Filimonov et al., “New hydrazinothiazole derivatives of usnic acid as potent TDP1 inhibitors,” Molecules, vol. 24, no. 20, pp. 1–34, Oct. 2019, doi: 10.3390/molecules24203711.

Luzina O, Filimonov A, Zakharenko A, **Chepanova A**, Zakharova O, Пина Е, Дыркеева Н, Лихатская Г, Салахутдинов Н, Лаврик О. Usnic Acid Conjugates with Monoterpenoids as

Potent Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibitors. J Nat Prod. 2020 Aug 28;83(8):2320-2329. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01089.

Н. С. Дырхеева, А. Л. Захаренко, Е. С. Новоселова, А. А. **Чепанова**, Н. А. Попова, В. П. Николин, О. А. Лузина, Н. Ф. Салахутдинов, Е. И. Рябчикова, О. И. Лаврик. Противоопухолевая активность комбинации топотекана и ингибитора тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 на модели асцитной карциномы Кребс-2 мыши. Мол. Биол., 2021, 55, 312-317. doi: 10.31857/S0026898421020051.

А. А. Чепанова, А. Л. Zakharenko, О. D. Zakharova et al. / Development of Tdp1 inhibitors based on natural biologically active compounds // Systems Biology of DNA Repair Processes and Programmed Cell Death (SbPCD-2018): Symposium, Novosibirsk, 20–22 августа 2018 года. – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2018. – P. 11. – DOI 10.18699/SbPCD-2018-05. – EDN FJRVBY.

А.А. Чепанова, А.Л. Захаренко, О.Д. Захарова, Е.С. Ильина, Т.М. Хоменко, Е.С. Можайцев, Е.В. Суслов, Н.С. Ли-Жуланов, А.С. Филимонов, О.А. Лузина, К.П. Волчо, Н.Ф. Салахутдинов, О.И. Лаврик / Разработка ингибиторов Tdp1, основанных на природных биологически активных соединениях// V Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов — 2018 : Сб. тез. / АНО «Инновационный центр Кольцово». — Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2018. С.391

А. А. Чепанова, А. L. Zakharenko, А. S. Filimonov et al. / Development of Tdp1 inhibitors based on natural biologically active compounds as prototypes of antitumor drugs // Systems Biology and Bioinformatics (SBB-2019) : The Eleventh International Young Scientists School, Novosibirsk, 24–28 июня 2019 года – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2019. – P. 13. – DOI 10.18699/SBB-2019-06. – EDN ALETPA.

А.А. Чепанова, А.Л. Захаренко, О.Д. Захарова, А.С. Филимонов, О.А. Лузина, Н.Ф. Салахутдинов, О.И. Лаврик / Разработка ингибиторов TDP1 на основе производных усниновой кислоты, как потенциальных противораковых препаратов // Первая всероссийская школа для молодых ученых по медицинской химии MEDCHEMSCHOOL2021 – 4-9 июля 2021, Новосибирск. С. 205

А.А. Чепанова, А.Л. Захаренко, О.Д. Захарова, А.С. Филимонов, О.А. Лузина, Н.Ф. Салахутдинов, О.И. Лаврик / Разработка ингибиторов Tdp1 на основе производных усниновой кислоты // Молекулярные основы заболеваний: что молекулярная биология может сделать для современной медицины – Новосибирск 22 - 24 ноября 2021, ИХБФМ СО РАН, 2021. С.47

Чепанова А.А., Захаренко А.Л., Захарова О.Д., Филимонов А.С., Лузина О.А., Салахутдинов Н.Ф., Лаврик О.И. / Ингибиторы Tdp1 на основе производных усниновой кислоты, как прототипы лекарственных препаратов // Синтетическая биология и

биофармацевтика : Материалы всероссийской конференции, Новосибирск, 24–28 июля 2022 года. – Новосибирск: ООО «Офсет-ТМ», 2022. – С. 239. – EDN UMNMMU.

Вклад автора. Представленные экспериментальные данные получены либо автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов.

Биосенсор для изучения активности Tdp1 был разработан в Лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН Р.О.Анарбаевым и синтезирован в Лаборатории химии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН.

Молекулярное моделирование связывания соединений с Tdp1 было выполнено Jóhannes Reynisson (Университет Окленда, Новая Зеландия) и Лихацкой Галиной (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН).

Клеточные работы были выполнены под руководством О.Д. Захаровой в ЛФР ИХБФМ СО РАН.

Исследования сенсibiliзирующего эффекта производных УК *in vivo* были выполнены группой лаборатории регуляции экспрессии генов ИЦИГ СО РАН под руководством Поповой Нэлли Александровны.

Материалы и методы

В работе использовалась рекомбинантная Tdp1 человека (КФ 3.1.4), экспрессированная в системе *Escherichia coli* (плазмида pET 16B-Tdp1 предоставлена доктором Кальдекотт К.У., Университет Сассекса, Великобритания) и выделенная по описанной в статье методике [16].

В качестве ингибиторов Tdp1 в работе были использованы соединения на основе урсниновой кислоты, синтезированные в Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН.

Исследование активности Tdp1 проводили флуоресцентным методом в режиме реального времени. Для этого была использована тест-система, основанная на способности Tdp1 удалять различные аддукты, в том числе флуорофоры, с 3'-конца ДНК. В качестве субстрата для Tdp1 был использован 16-мерный одноцепочечный олигонуклеотид, содержащий тушитель флуоресценции Black Hole Quencher 1 (BHQ1) на 3'-конце ДНК и флуорофор 5(6)-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце ДНК. Биосенсор для определения активности Tdp1 был разработан в лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН [35] и синтезирован в лаборатории химии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН. Влияние производных УК на активность Tdp1 оценивали по величине IC₅₀ (концентрация ингибитора, при которой активность фермента снижена наполовину).

Молекулярное моделирование для изучения связывания производных УК с Tdp1 было выполнено Jóhannes Reynisson (Университет Окленда, Новая Зеландия) и Лихацкой Галиной (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН)., данные приводятся с их разрешения. Для этого использовались алгоритмы ChemPLP, GoldScore, ChemScore, Astex Statistical Potential.

Оценку цитотоксичности соединений и их влияние на цитотоксический эффект топотекана изучали с помощью МТТ-теста. Для этого использовались различные линии перевиваемых опухолевых клеток, имеющиеся в коллекции ИХБФМ СО РАН. В их числе линии колоректальной карциномы (HCT-116), карциномы легкого (A-549), аденокарциномы молочной железы человека (MCF7), эмбриональных почек человека (HEK-293), глиобластомы (T98G). Работа проводилась автором в лаборатории ферментов репарации ИХБФМ СО РАН, под руководством Захаровой О.Д. Эксперименты на клеточной линии опухоли шейки матки (HeLa) были выполнены Е.С. Ильиной.

Влияние производных УК на количество повреждений ДНК вызванных топотеканом, оценивали методом щелочного электрофореза одной клетки (Alkaline Comet assay).

Влияние производных УК на апоптотический эффект топотекана в опухолевых клетках оценивали методом двойного окрашивания клеток Annexin V-FITC/PI.

Исследования сенсibiliзирующего эффекта производных УК *in vivo* проводили на перевиваемых опухолях мышей - солидной карциноме лёгких Льюис (LLC) и асцитной форме карциномы Кребс-2. Работы были выполнены совместно с группой лаборатории регуляции экспрессии генов ИЦИГ СО РАН под руководством Поповой Нэлли Александровны, результаты приводятся с ее разрешения.

Результаты и обсуждение

Исследование влияния соединений на активность Tdp1 *in vitro*

В данной работе в качестве ингибиторов Tdp1 были изучены производные усниновой кислоты. Усниновая кислота (УК) - это вторичный метаболит различных видов лишайников, обладающий широким диапазоном биологической активности (противовоспалительная, противовирусная, противоопухолевая и т.д.), относится к производным дибензофурана [23]. В природе усниновая кислота встречается в виде (+)- и (-)-энантиомеров в зависимости от положения ангулярной метильной группы относительно плоскости молекулы (Рис. 1) [36].

Нативная УК не подавляет активность Tdp1 в концентрациях до 50 мкМ [23, 24] и обладает существенным токсическим эффектом в диапазоне эффективных концентраций. В связи с этим были предприняты попытки модификации исходного соединения [24], приведшие к появлению нетоксичных и высокоэффективных ингибиторов Tdp1, созданных на основе УК. В нашей работе подавляющее большинство исследований выполнено на производных (+)-УК, в ином случае это указано отдельно.

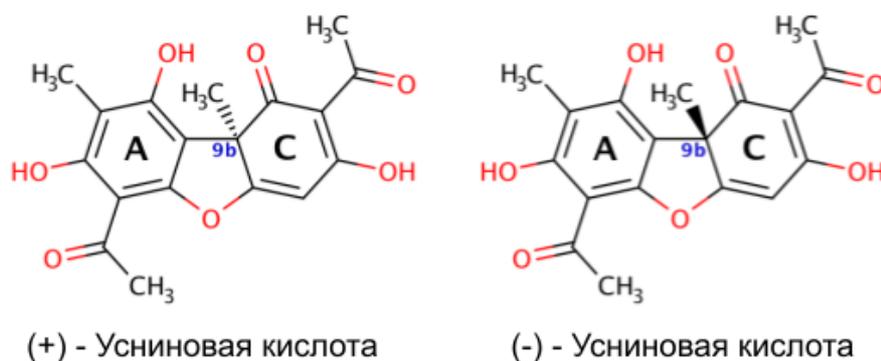


Рис. 1. Энантиомеры усниновой кислоты

В ходе нашей работы были получены данные об ингибиторной активности в отношении очищенного фермента Tdp1 для 125 производных усниновой кислоты.

Цианопроизводные УК

Одними из первых были протестированы цианопроизводные УК. Эти соединения содержали одну либо две цианогруппы, а другие структурные модификации остова УК. Показано, что введение нитрильной группы либо цианогрупп заметно повышает ингибиторную активность соединений (IC_{50} 10–15 мкМ) по сравнению с исходной УК (UA) ($IC_{50} > 50$ мкМ). Наибольшее влияние на ингибиторные характеристики соединений оказали модификации остова УК наряду с введением цианогрупп. Так, фуранановое производное УК (MR-150-3) (Рис. 2) ингибирует Tdp1 в микромолярном диапазоне (IC_{50} 11 мкМ), а присоединение к этому соединению двух цианогрупп (OL 8-44) (Рис. 2) приводит к значительному улучшению ингибиторной активности (IC_{50} 1,6 мкМ). Наличие пиразольного цикла (OL7-43), связанного с кольцом С, наряду с двумя цианогруппами в кольце А также повышает ингибиторные характеристики (IC_{50} 2,86 мкМ) (Рис. 2) по сравнению производным УК с двумя цианогруппами, но без пиразольного цикла (IC_{50} 15,6 мкМ).

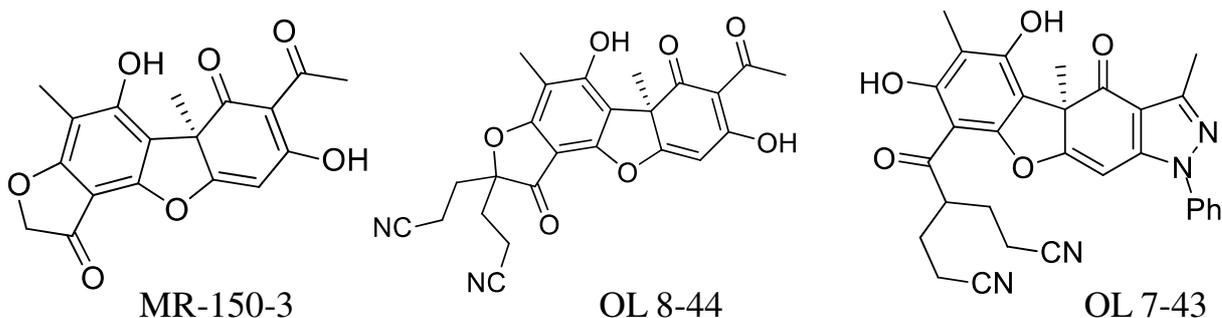


Рис. 2. Структуры цианопроизводных УК MR-150-3 (IC_{50} 11 мкМ), OL 8-44 (IC_{50} 1,6 мкМ), OL7-43 (IC_{50} 2,86 мкМ).

Далее нами была изучена цитотоксичность соединений, активных в отношении очищенного фермента Tdp1. Поскольку ингибиторы Tdp1 предполагается использовать для сопровождающей терапии и усиления действия клинически используемыми противораковыми препаратами, ожидается, что ингибиторы будут обладать низкой токсичностью, чтобы не увеличивать побочные эффекты терапии. Анализ цитотоксичности цианопроизводных УК проводили на линии клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7.

Наиболее токсичной оказалась исходная УК ($CC_{50} \sim 55$ мкМ). Остальные изученные соединения были значительно менее токсичными. Наибольший эффект снижения токсичности обеспечивает пиразольный фрагмент в кольце С соединения OL 7-43 (токсичность отсутствует во всём диапазоне исследованных концентраций до 100 мкМ).

Фуранановые производные УК

Далее были синтезированы производные УК, содержащие арил- или гетарилиденфураноновые фрагменты в кольце А (**6a-7x**) при сохраненном дибензофурановом остове природной УК. Эти соединения продемонстрировали высокую ингибирующую активность в отношении Tdp1 в субмикромольной и наномольной концентрации.

Соединение **6a** (Рис. 3), содержащее только фенильный остаток, продемонстрировало субмикромольную активность (IC_{50} 0,72 мкМ). Введение атома брома как в фенильный остаток соединения **6a**, так и в тиофеновый остаток соединения **6u** (IC_{50} 0,9 мкМ) приводит к увеличению ингибиторной активности бромированных соединений **6d** (IC_{50} 0,15 мкМ) и **6x** (IC_{50} 0,063 мкМ), соответственно (Рис. 3). Наиболее эффективным ингибитором Tdp1 из этой серии производных УК было соединение **6m** (Рис. 3) (значение IC_{50} 25 нМ), содержащее крупный 3,5-ди-трет-бутил-2-гидроксифенильный заместитель.

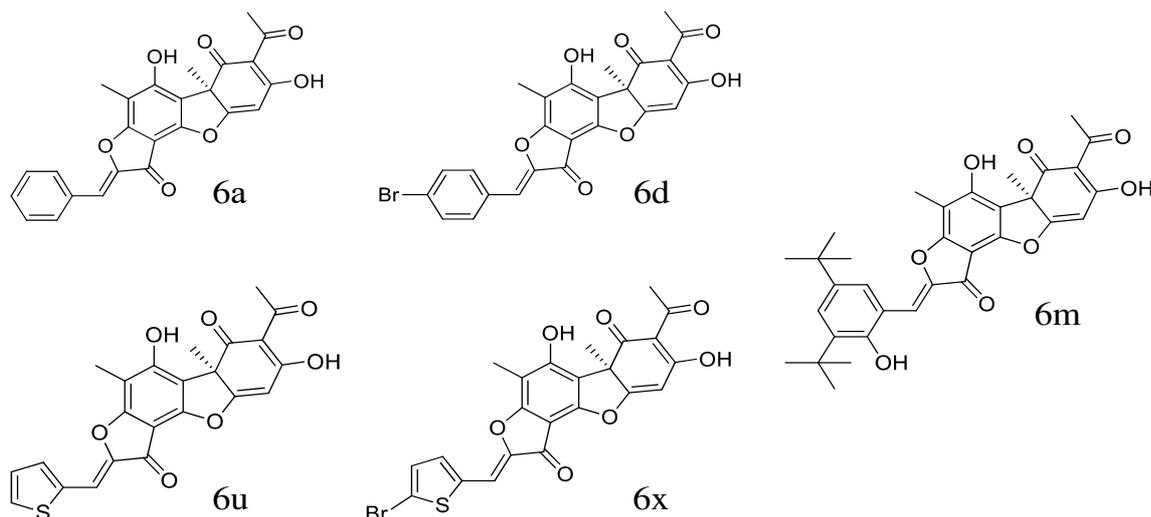


Рис. 3. Структурные формулы соединений **6a** (IC_{50} 0,72 мкМ), **6d** (IC_{50} 0,15 мкМ), **6u** (IC_{50} 0,9 мкМ), **6x** (IC_{50} 0,063 мкМ), **6m** (IC_{50} 0,025 мкМ).

Среди производных УК, содержащих арил- или гетарилиденфураноновые фрагменты, наиболее эффективное соединение **6m** (значение IC_{50} 25 нМ), содержало 3,5-ди-трет-бутил-2-гидроксифенильный заместитель. Для этого соединения алгоритмом ChemPLP была предсказана более высокая энергия связывания с аллостерическим центром фермента по сравнению с субстратсвязывающим центром. Однако другие алгоритмы (GoldScore, ChemScore, Astex Statistical Potential) предсказали более высокую энергию связывания для субстрат-связывающего центра. Поэтому мы считаем, что соединение **6m** связывается преимущественно с субстрат-связывающим центром Tdp1. На рисунке 4А показано связывание как с аллостерическим, так и с субстрат-связывающим центром. Молекулярное моделирование было выполнено Jóhannes Reynisson (Университет Окленда,

Новая Зеландия), данные приводятся с его разрешения. Молекулярное моделирование соединений **9a-9h** было выполнено Лихацкой Галиной результаты получены с использованием оборудования ЦКП "Дальневосточный вычислительный ресурс" ИАПУ ДВО РАН и приводятся с ее разрешения.

Производное УК **6m** образует водородные связи с каталитическими остатками His263 и Asn516, в активном центре Tdp1(PDB ID: 1MU7), а также может образовывать гидрофобные контакты с боковыми цепями аминокислотных остатков Tyr204, Pro461 и His493 каталитического центра(Рис. 4В). Механизм работы Tdp1 связан с каталитическими остатками His263 и His493, и они имеют важное значение для выполнения ферментом своих функций [38]. Следовательно, перспективной стратегией ингибирования является нарушение каталитических функций His263 и His493 в активном центре Tdp1, что и демонстрируют фураноновые производные УК.

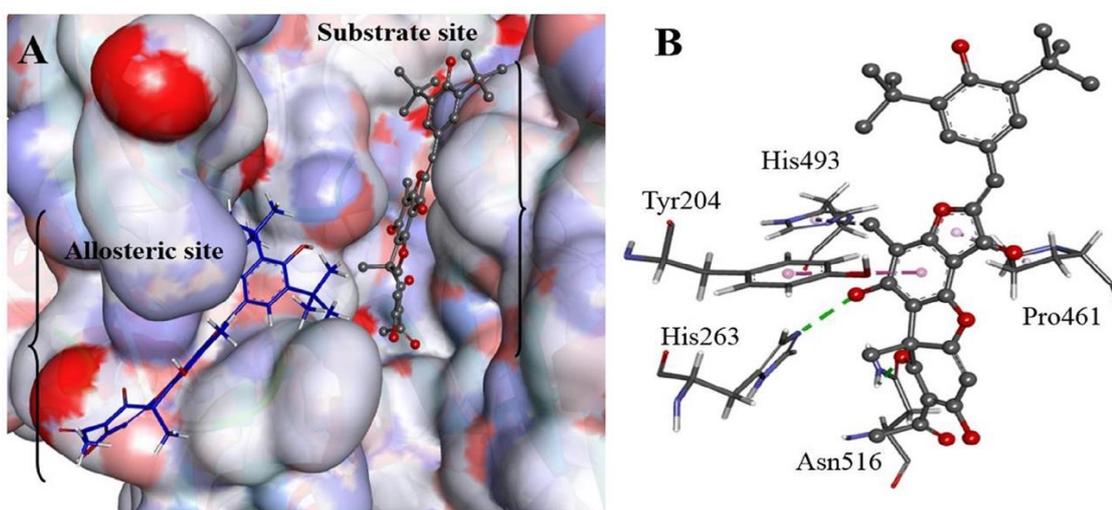


Рис. 4. Предсказанное алгоритмом ChemPLP связывание производного **6m** с аллостерическим и каталитическим центрами Tdp1 (PDB ID: 1MU7). (А) Частично положительно заряженные области белка окрашены в синий цвет, отрицательно заряженные — в красный, а нейтральные области — в серый. (В) Водородные связи между **6m** и аминокислотными остатками His263 и Asn516 обозначены зелеными пунктирными линиями. Липофильные контакты с His493, Tyr204 и Pro461 показаны фиолетовыми пунктирными линиями.

Для изучения цитотоксичности на клетках аденокарциномы легкого человека А-549 и линии почек эмбриона НЕК-293 были выбраны наиболее эффективные ингибиторы Tdp1 (**6d**, **6e**, **6f**, **6i**, **6k**, **6m**, **6s** и **6x**). Соединения оказались умеренно токсичными для клеток (значения CC_{50} в диапазоне от 4,6 до 20 мкМ), за исключением соединения **6s**, которое оказалось малотоксичным для обеих клеточных линий ($CC_{50} > 50$ мкМ).

Основываясь на полученных данных о цитотоксичности соединений, была выбрана нетоксичная концентрация ингибиторов для изучения их влияния на цитотоксический эффект топотекана, равная 5 мкМ. Наиболее эффективное в отношении очищенного

фермента Tdp1 соединение **6m** не влияло на цитотоксичность топотекана на клеточной линии НЕК-293, а на клеточной линии А-549 увеличивало CC_{50} топотекана, защищая клетки от его действия (таблица 1). Фураноновое производное УК **6x** в несколько раз усиливает цитотоксичность топотекана в отношении как А-549, так и НЕК-293 (Рис. 5).

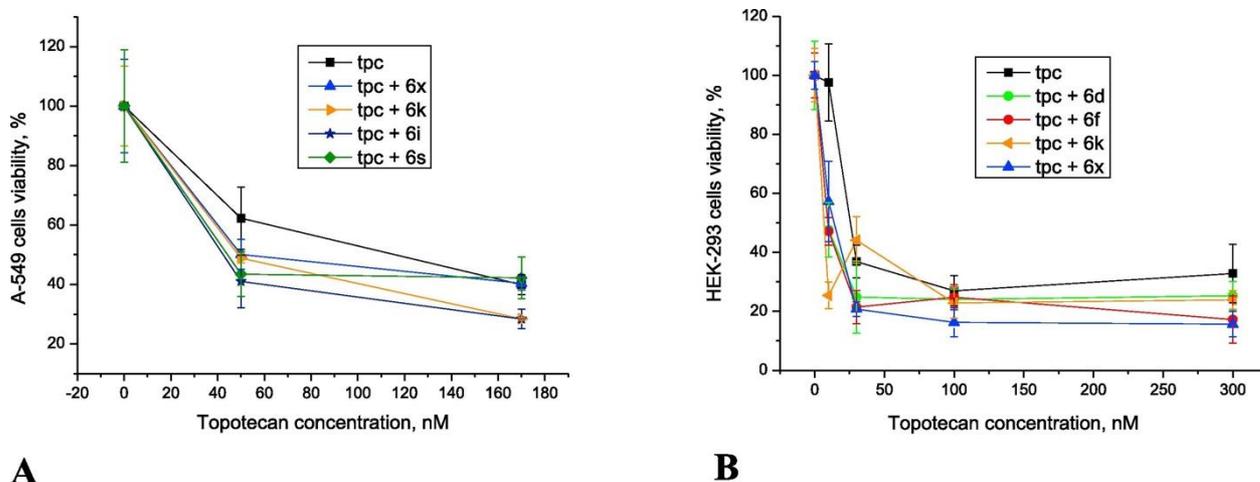


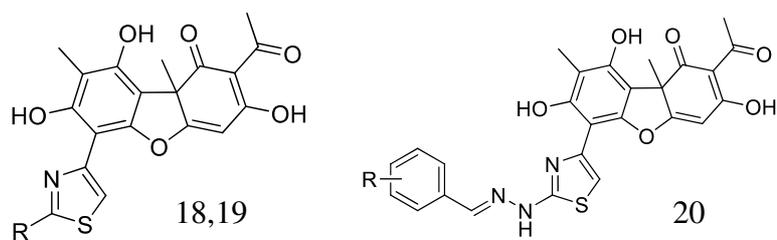
Рис. 5. Влияние фураноновых производных УК на цитотоксический эффект топотекана в отношении клеточных линий А549 (А) и НЕК-293 (Б)

Таким образом, среди фураноновых производных УК наиболее перспективным соединением оказалось **6x**, которое является эффективным ингибитором Tdp1 и обладает умеренной цитотоксичностью. Кроме того, **6x** оказался сенсibilизатором топотекана для клеточных линий А-549 и НЕК-293 с двукратным усилением цитотоксичности топотекана в нетоксичной концентрации ингибитора.

Тиазольные, аминотиазольные и гидразонотиазольные производные УК

Соединения, содержащие тиазольный или аминотиазольный фрагмент и объемный заместитель в тиазольном фрагменте (Рис. 6), **18a-c** и **19a-d**, продемонстрировали ингибирование в низком микромолярном диапазоне концентраций (IC_{50} около 1 мкМ). Среди этой группы производных отсутствие объемного заместителя в тиазольном кольце приводило к снижению ингибиторной активности: значения IC_{50} увеличивались с ~1 мкМ до ~5 мкМ.

Значительно более активными в отношении Tdp1 были соединения **20a-i** (Рис. 6), содержащие тиазольный цикл с фенилгидразоновым заместителем (значения IC_{50} от 26 до 450 нМ). Среди соединений **20a-i** наибольшей активностью обладают пара- производные с бром- (**20d**) (значение IC_{50} 26 нМ) и нитро- заместителями (**20h**, **20i**) (значения IC_{50} 35 нМ, 86 нМ).



18a R=Me	19a R=NH ₂	20a R=H	20e R=4-OH
18b R=Ph	19b R=NHMe	20b R=4-F	20f R=4-OMe
18c R=3-Py	19c R=NHPh	20c R=4-Cl	20g R=3-OMe
	19d R=NHAlI	20d R=4-Br	20h R=4-NO ₂
			20i R=3-NO ₂

Рис. 6. Общие структурные формулы серии соединений **18a-c**, **19a-d** и **20a-i**

С помощью молекулярного моделирования было показано, что соединение **20d** (структура на Рис. 7А) связывается с активным центром Tdp1 (PDB ID: 1MU7) (Рис. 7Б). Это соединение взаимодействует с каталитическими аминокислотными остатками гистидина (HIS493, HIS263) и образует водородные связи с аспарагином (ASN516), тирозином (TYR204) и аспарагином (ASN283) каталитического центра через гидроксильную, карбонильную и гидразонильную группы соответственно. Взаимодействие с гистидиновыми остатками (HIS493, HIS263) также было предсказано и для соединения **18b** (Рис. 7Б), а водородные связи это соединение образует с ASN516 и серином (SER459) через гидроксильную и карбонильную группы соответственно.

При сравнении этих производных УК видно, что 2-бензилиденгидразонильная часть **20d** встроена глубоко в липофильный карман, в то время как дибензофурановая часть **18b** в этот карман не встроена, в связи с чем более подвержена воздействию водной фазы, как показано на рисунке 7Б.

Данные, полученные методами молекулярного моделирования, говорят о том, что гидразоновый фрагмент соединений серии **20a-i** играет основную роль в ориентации ингибиторов в сайте связывания фермента и обладает большей конформационной гибкостью, что объясняет высокую ингибиторную активность соединений **20a-i** в отношении Tdp1.

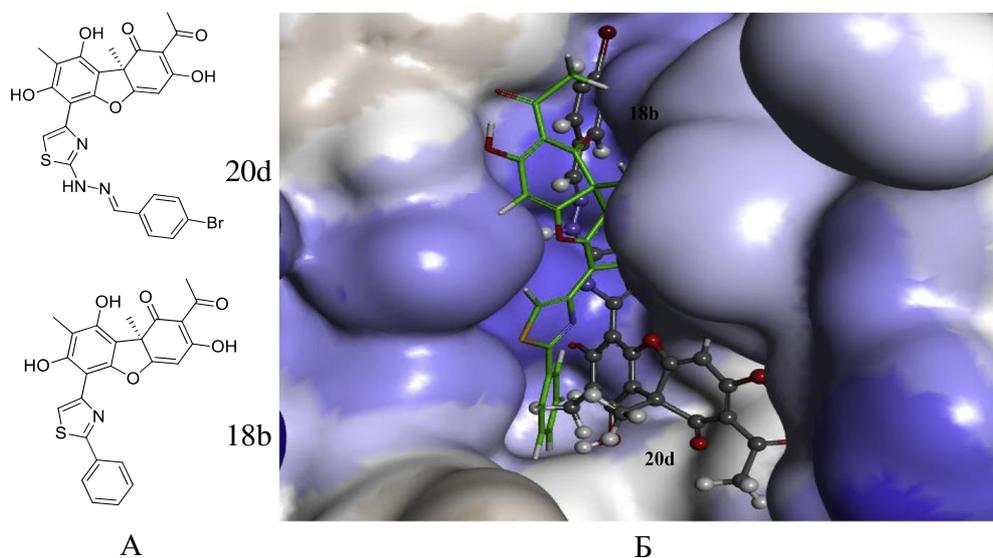


Рис. 7. **А)** Структурные формулы соединений **20d** и **18b**. **Б)** Взаимодействие соединений **18b** (зеленый) и **20d** (шаростержневая модель) с сайтом связывания Tdp1 (PDB ID: 1MU7), предсказанное с использованием функции оценки GoldScore. 4-Бромбензилиденный фрагмент соединения **20d** находится в липофильном кармане, дибензофурановая группа **18b** подвергается воздействию водной среды. Синим цветом обозначены гидрофильные области белка; коричневым/белым цветом - гидрофобные области на поверхности Tdp1.

Для соединения **20d**, проявившего высокую ингибирующую активность в тесте *in vitro* на очищенном ферменте, было проведено исследование цитотоксичности на ряде опухолевых клеточных линий и выбрана нетоксичная концентрация (1 мкМ) этого соединения для изучения его влияния на цитотоксический эффект топотекана.

Соединение **20d** оказалось достаточно токсично в отношении изученных клеточных линий (диапазон значений CC_{50} представлен в таблице 1), но при этом в нетоксичной концентрации усиливало эффект топотекана примерно в 7,5 раз для всех перевиваемых линий опухолевых клеток (таблица 1).

Таблица. 1. Значения полужитотоксических концентраций соединения **20d** и его влияние на цитотоксический эффект топотекана в отношении перевиваемых линий опухолевых клеток.

	20d	Трс	Трс+20d	Усиление топотекана, раз
CC_{50} мкМ, НСТ116	7,8±3,6	0,93	0,12	7,9
CC_{50} мкМ, А549	3,9±0,1	1,3	0,17	7,4
CC_{50} мкМ, МСF7	9,3±2,2	0,93	0,12	7,9

Суммируя данные об ингибирующем действии и токсичности производного УК **20d**, его можно рассматривать как наиболее перспективный для дальнейшего изучения

ингибитор Tdp1, так как он подавляет активность Tdp1 в наномолярном диапазоне концентраций и демонстрирует выраженный сенсibiliзирующий эффект действия топотекана в отношении опухолевых линий.

Данные молекулярного моделирования, полученные при исследовании соединений, содержащих арилиденгидразонотиазольные фрагменты, показали, что этот фрагмент взаимодействует с гидрофильной областью белка. Основываясь на этих данных, мы пришли к выводу, что замена арилиденового фрагмента на гетероарилиден может способствовать большему сродству с гидрофильным карманом, а введение удлиненных заместителей повысит ингибирующую активность соединений. Для проверки этой гипотезы и изучения влияния хирального центра, размера гетероцикла и типа гетероатома, а также положения и размера различных заместителей на активность соединений, были синтезированы новые гидразонотиазольные производные УК.

Среди новых гидразонотиазольных производных УК с гетероарилиденовым **16a-g** фрагментом были обнаружены высокоэффективные ингибиторы Tdp1 (значения IC_{50} 0,021-0,2 мкМ).

В этой серии также были изучены соединения с удлиненными линкерами, содержащие бензальдегид (**17a-17k**). Этот ряд соединений так же продемонстрировал высокую ингибирующую активность в отношении Tdp1 (значения IC_{50} 0,018-0,12 мкМ).

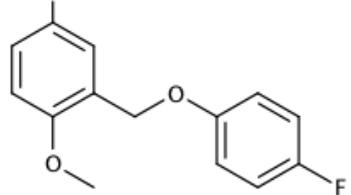
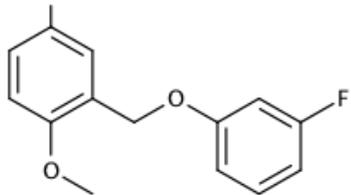
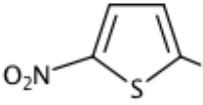
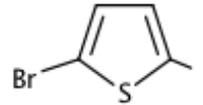
Энантиомеры, синтезированные из (-) и (+)-усниновой кислоты, продемонстрировали отличную друг от друга ингибирующую активность в отношении Tdp1, однако при этом не наблюдалось устойчивой корреляции значений IC_{50} с типом энантиомера. Дальнейший синтез соединений проводился из более доступной и распространённой (+)-усниновой кислоты.

Далее была изучена цитотоксичность наиболее эффективных гидразонотиазольных производных УК с гетероарилиденом в отношении клеточной линии HeLa (данные приведены в таблице 2.). Производные УК с арилиденом обладают низкой токсичностью ($CC_{50} > 50$ мкМ). Гетероарилиденовые производные УК (+)- и (-)-**16f**, содержащие остаток бромтиофена, также обладают низкой цитотоксичностью (CC_{50} около 80 мкМ), в то время как пара (+)(-)**16d**, содержащая нитрогруппу, подавляла рост клеток при концентрации 20 мкМ. На основании этих данных была выбрана концентрация 5 мкМ для исследования влияния соединений на цитотоксический эффект топотекана (данные приведены в таблице 2.).

Ингибиторы Tdp1 увеличивали цитотоксический эффект топотекана примерно в 2–3 раза, а значения CC_{50} топотекана снижалось с 6 мкМ до 2–3 мкМ. Сенсibiliзирующее

действие соединений не зависело от строения заместителя в гидразинотиазольном фрагменте.

Таблица 2. Значения полуцитотоксических концентраций производных УК и их влияние на цитотоксический эффект топотекана в отношении перевиваемых линий опухолевых клеток.

Шифр соединения	Радикал	IC ₅₀ , нМ	CC ₅₀ , мкМ HeLa	Трс CC ₅₀ , мкМ HeLa	Усиление Трс, раз
Трс	-			5,5	
(+) 17a		26 ± 8	>50	2	2,75
(-) 17a		54 ± 3	>50	2,3	2,39
(+) 17b		26 ± 4	>50	2,07	2,66
(-) 17b		78 ± 3	>50	1,86	2,96
(+) 16d		70 ± 4	18,9	2,45	2,24
(-) 16d		142 ± 4	19	2	2,75
(+) 16f		88 ± 3	>50	-	-
(-) 16f		43 ± 1	>50	-	-

Молекулярное моделирование взаимодействия **(+)-17b** с Tdp1 (PDB ID: 6DIE) показало, что это соединение связывается с каталитическими остатками в активном центре Tdp1 (Рис. 8). Карбонильная группа дибензофуранового остова УК образует водородную связь с гидроксильной группой боковой цепи треонина (Thr261). Фенильная группа в этом фрагменте образует водородную связь с аминогруппой боковой цепи аспарагина (Asn516). Фторидная группа этой молекулы также взаимодействует с амином боковой цепи глутамина (Gln241) и имидазольной группой гистидина (His237).

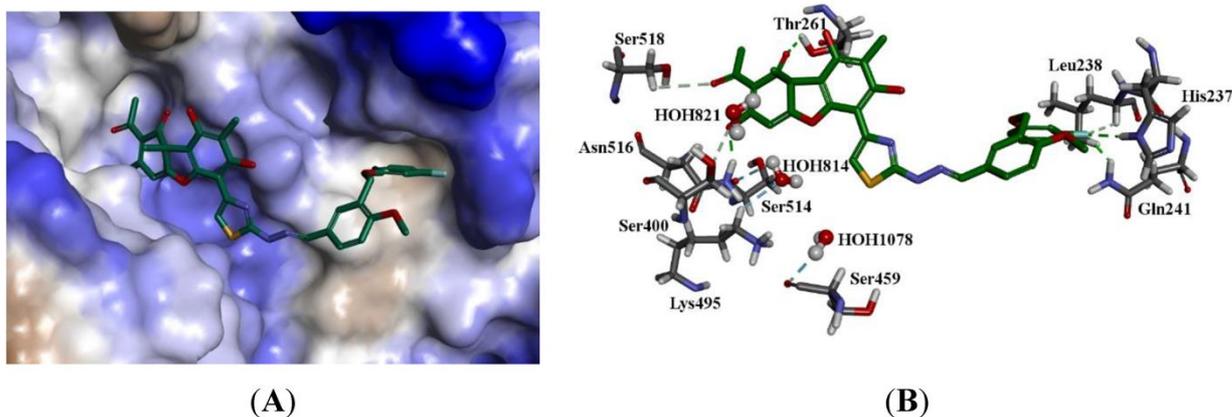


Рис. 8. Взаимодействие (+)-**17b** с сайтом связывания Tdp1 (PDB ID: 6DIE) предсказанное с использованием функции оценки ChemScore. (A) Синим цветом обозначены гидрофильные области на поверхности белка; коричневым цветом показаны гидрофобные участки, а белым цветом нейтральные области. (B) Водородные связи между соединением (+)-**17b** и аминокислотными остатками Thr261, Asn516 показаны зелеными линиями. Фторидная группа (+)-**17b** взаимодействует с Gln241 и His237. Молекулы воды обозначены как: HOH821, HOH814, HOH1078.

Таким образом, большинство из изученных производных УК с арилиденом и гетероариледеном являются высокоэффективными ингибиторами Tdp1 с величинами IC_{50} в низком наномолярном диапазоне концентраций, обладают низкой или умеренной токсичностью и усиливают цитотоксический эффект топотекана в отношении клеточной линии HeLa [40].

Далее были изучены производные УК, содержащие монотерпеновые фрагменты, присоединенные через гидразонотиазольный линкер. Выбор монотерпеноидов в качестве второго структурного компонента был основан на предыдущих исследованиях ингибиторов Tdp1, содержащих монотерпеноидные фрагменты и другие остовы, отличные от УК. Многие из этих соединений демонстрировали высокую ингибиторную активность и способность усиливать цитотоксическое действие ингибиторов Top1 [41–44]. Так же монотерпеноиды имеют собственный широкий спектр биологической активности и доступную сырьевую базу [45].

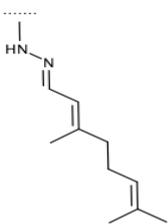
Производные (+)-УК с фрагментами монотерпеноидов (**9a-9h**) продемонстрировали высокую ингибирующую активность: значения IC_{50} в диапазоне 0,01 – 0,14 мкМ. Производные с бициклическими заместителями **9f-h** имели в 3-5 раз более высокие значения IC_{50} (45-31 нМ), чем соединения с ациклическими заместителями **9a,9b** (значения IC_{50} 10 и 16 нМ соответственно) Введение полярной гидроксильной группы в citronellal-остаток (**9c** по сравнению с **9b**) приводило к значительному снижению активности соединений (значения IC_{50} 139 и 16 нМ соответственно).

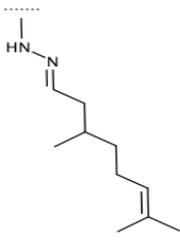
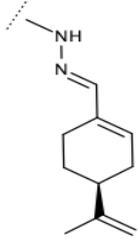
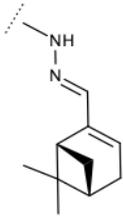
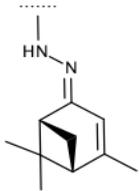
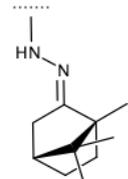
Далее была изучена цитотоксичность гидразонотиазольных производных УК с монотерпеновыми фрагментами в отношении клеточных линий HeLa (карцинома шейки матки), A-549 (рак легких), T98G (глиобластома). Наиболее токсичными в отношении трех клеточных линий оказались соединения **9g** и **9h**. Соединение **9f**, содержащее остаток миртеналя, наоборот, оказалось не токсичным во всем диапазоне изученных концентраций (до 100мкМ). Для клеточной линии HeLa (Рис. 19) производные УК, за исключением **9g**, **9h** и **9f**, были умеренно токсичны (значения CC_{50} от 33 до 77 мкМ) (данные приведены в таблице 3.).

Также была изучена способность соединений сенсibilизировать действие топотекана. Для этого были использованы нетоксичные концентрации ингибиторов Tdp1 (5 мкМ) и различные концентрации топотекана. Ингибиторы Tdp1 усиливали действие топотекана от 1,7 до 7 раз. Наиболее эффективными сенсibilизаторами клеток к действию топотекана оказались соединения **9a**, **9b** и **9e** (данные приведены в таблице 3.).

Таким образом, производные УК, содержащие монотерпеновые фрагменты, подавляют активность Tdp1 в наномолярном диапазоне концентраций. Многие производные были слабо или умеренно токсичны для исследуемых клеток, и в разы усиливали цитотоксичность топотекана. Данные опубликованы в статье [46].

Таблица 3. Значения полумитотоксических концентраций производных УК и их влияние на цитотоксический эффект топотекана в отношении перевиваемых линий опухолевых клеток

Шифр соединения	Радикал	IC ₅₀ , нМ	CC ₅₀ , мкМ HeLa	CC ₅₀ , мкМ A-549	CC ₅₀ , мкМ T98G	Усиление топотекана HeLa, раз
9a	 Остаток цитраля	10,3±0,4	33±9	35±11	14±2	3,4

<p>9b</p>	 <p>Остаток цитронеллала</p>	<p>16,4±0,1</p>	<p>77±17</p>	<p>>100</p>	<p>17±3</p>	<p>9,7</p>
<p>9e</p>	 <p>Остаток периллового альдегида</p>	<p>27±2</p>	<p>65±9</p>	<p>95±21</p>	<p>19±5</p>	<p>4,4</p>
<p>9f</p>	 <p>Остаток миртеналя</p>	<p>45±12</p>	<p>>100</p>	<p>>100</p>	<p>>100</p>	<p>2,2</p>
<p>9g</p>	 <p>Остаток вербенона</p>	<p>46±2</p>	<p>15±5</p>	<p>19±3</p>	<p>17±4</p>	<p>1,7</p>
<p>9h</p>	 <p>Остаток камфоры</p>	<p>31±11</p>	<p>11±4</p>	<p>34±7</p>	<p>13±3</p>	<p>2,2</p>

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что модификации молекулы исходной УК приводят к заметному усилению ингибирующего воздействия соединений на очищенный фермент. Были изучены цианопроизводные УК, фураноновые производные УК и гидразонотиазольные производные УК с различными заместителями. Многие соединения среди изученных классов показали высокую ингибирующую активность в отношении Tdp1. Однако фураноновые производные УК, несмотря на свою эффективность, плохо растворялись в системе вода-ДМСО, что затрудняет их применение. Класс цианопроизводных УК обладал низкой цитотоксичностью и подавлял активность Tdp1 в микромолярном диапазоне концентраций. Соединения класса гидразонотиазольных производных УК показали себя наиболее эффективными ингибиторами Tdp1. Эти соединения подавляют активность Tdp1 в наномолярном диапазоне концентраций и на сегодняшний день являются наиболее эффективными ингибиторами Tdp1.

Среди соединений этого класса было выбрано два соединения для дальнейшего изучения: **20d** и **9e**. Эти соединения эффективно подавляют активность Tdp1, умеренно токсичны сами по себе и обладают выраженными сенсibiliзирующими свойствами.

Исследование влияния производных УК на накопление повреждений ДНК методом Alkaline Comet assay

Время инкубации клеток с препаратами составляло 1 час и было выбрано на основании проведенных ранее экспериментов.

Из полученных результатов (рис. 9, 10) видно, что контрольные клетки, инкубированные с 1% ДМСО в течение 1 часа, содержали незначительное количество поврежденной ДНК 2 – 4 %.

При инкубации клеток с соединением **20d** в концентрациях 5 мкМ и 20 мкМ, количество поврежденной ДНК выросло до 8,6% и 9,7% соответственно (Рис. 9), что значимо отличалось ($p\text{-value} < 0,0001$) от клеток, инкубированных с 1% ДМСО. Инкубация клеток с топотеканом в концентрации 5 мкМ приводила к увеличению количества поврежденной ДНК до 14%. В результате совместного применения 5 мкМ топотекана и производного УК **20d** в концентрациях 5 мкМ и 20 мкМ количество поврежденной ДНК возрастало до 28% и 26% соответственно, что достоверно ($p\text{-value} < 0,0001$) отличается от повреждений, вызванных действием только топотекана в концентрации 5 мкМ (Рис. 9) и так же отличается от повреждений, вызванных самостоятельным использованием соединения **20d**.

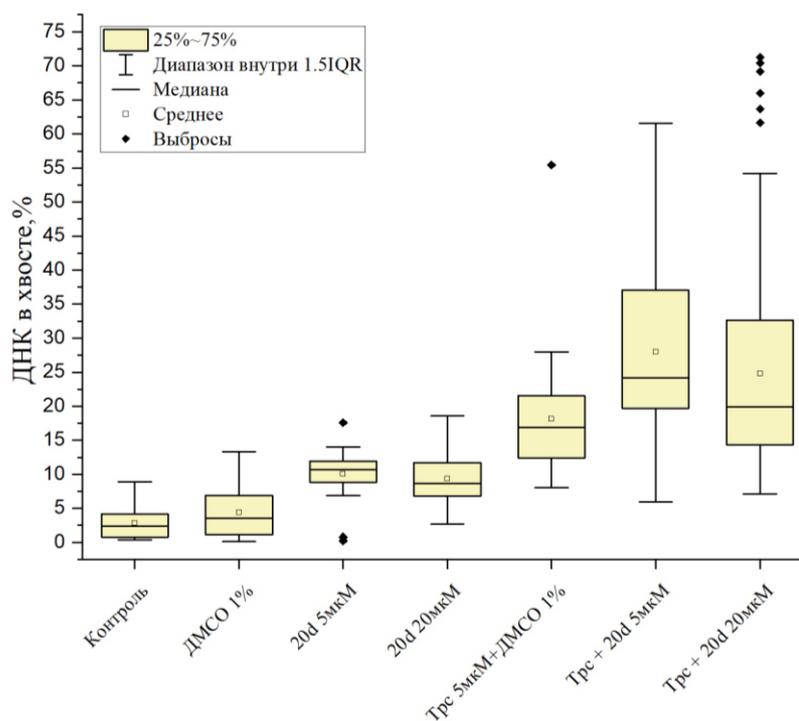


Рис.9. Данные статистической обработки экспериментов по изучению влияния соединения **20d** в различных концентрациях на действие топотекана

Таблица 4. Среднее количество повреждений ДНК вызванное применением **20d** самостоятельно и в комбинации с топотеканом

	Среднее количество ДНК в хвосте, %	Стандартное отклонение
Контроль	3,8	3,2
ДМСО	3,9	3,3
20d 5мкМ	8,7	4,4
20d 20мкМ	9,8	4,6
Трс 5мкМ	14,2	8,2
Трс + 20d 5мкМ	27,9	12,6
Трс + 20d 20мкМ	25,5	15,0

При инкубации клеток с соединением **9e** в концентрациях 5 мкМ и 100 мкМ было показано, что количество поврежденной ДНК незначительно отличается от контроля и составляет 3,2% и 4,3% соответственно (Рис. 10). Таким образом, соединение **9e** обладает низкой генотоксичностью и не влияет на накопление повреждений ДНК в концентрации до 100 мкМ.

Инкубация клеток с топотеканом в концентрации 10 мкМ приводила к увеличению количества поврежденной ДНК до 38%. Производное УК **9e** в различных концентрациях 1

мкМ, 5 мкМ, 20 мкМ, 100 мкМ инкубировали с 10 мкМ топотеканом. В случае совместного применения топотекана и **9e** в концентрации 1 мкМ наблюдалось небольшое, но статистически значимое повышение количества поврежденной ДНК и общее количество поврежденной ДНК составило 41%, что значимо отличалось от топотекана ($p\text{-value} < 0,05$) (Рис. 10). В случае повышения концентраций **9e** до 5 мкМ, 20 мкМ и 100 мкМ эффект от совместного применения с топотеканом увеличивался, и количество поврежденной ДНК составило 55%, 60% и 72%, соответственно. Полученные результаты для данных концентраций соединения **9e** совместно с топотеканом значимо отличались ($p\text{-value} < 0,0001$) от применения только топотекана в концентрации 10 мкМ. Попарное сравнение между собой результатов разных концентраций **9e**, примененных совместно с топотеканом, показало, что рост концентрации соединения **9e** приводит к значимому ($p\text{-value} < 0,001$) увеличению количества поврежденной ДНК.

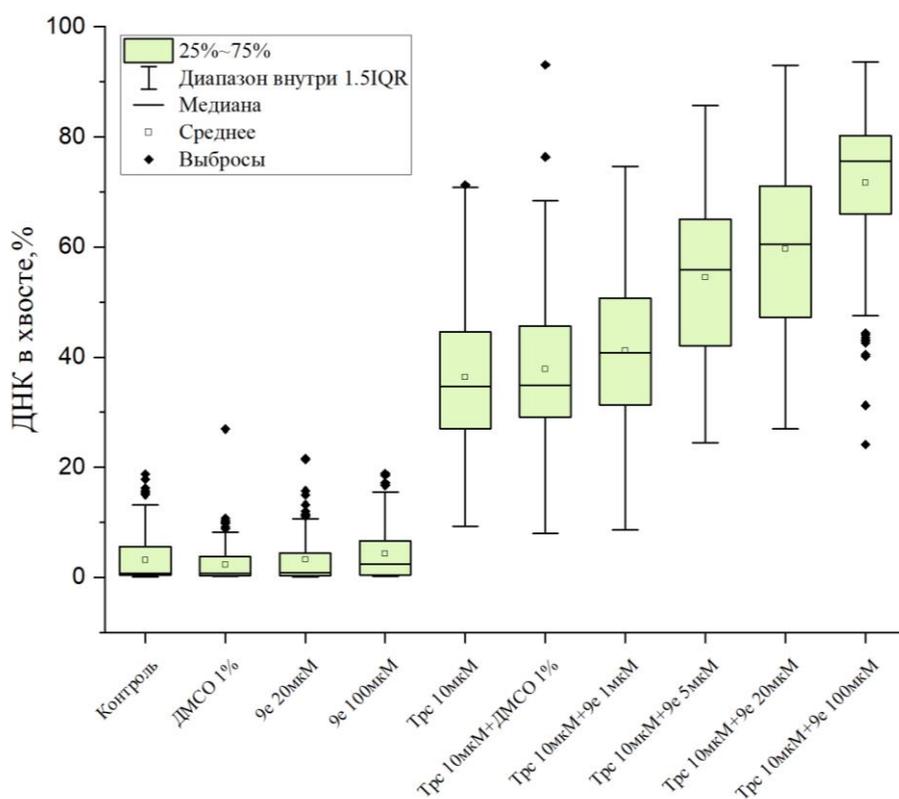


Рис. 10 Данные статистической обработки экспериментов по изучению влияния соединения **9e** в различных концентрациях на действие топотекана.

Таблица 5. Среднее количество повреждений ДНК вызванное применением **9e** самостоятельно и в комбинации с топотеканом

	Среднее количество ДНК в хвосте, %	Стандартное отклонение
Контроль	3,18	3,88

DMSO 1%	2,34	3,24
OL-11-8-3 (20 мкМ)	3,23	6,79
OL-11-8-3 (100 мкМ)	4,35	4,95
Трс 10 мкМ	36,35	12,66
Трс 10 мкМ+DMSO 1%	37,84	13,47
Трс 10 мкМ+OL(1 мкМ)	41,26	13,98
Трс 10 мкМ+OL(5 мкМ)	54,54	15,26
Трс 10 мкМ+OL(20 мкМ)	59,69	15,1
Трс 10 мкМ+OL(100 мкМ)	71,73	13,38

Из полученных результатов следует, что оба производных УК сами по себе незначительно увеличивают количество поврежденной ДНК по сравнению с контрольной группой клеток. При этом соединение **9e** не влияет на количество повреждений ДНК в концентрациях до 100 мкМ.

В случае совместного применения топотекана и ингибиторов Tdp1 на основе УК **9e** и **20d** количество поврежденной ДНК значимо росло по сравнению с применением одного топотекана. При этом для соединения **9e** при совместном применении с топотеканом наблюдалась концентрационная зависимость и при увеличении концентрации **9e** увеличивалось количество повреждений ДНК. Для соединения **20d** при совместном применении с топотеканом концентрационной зависимости не наблюдалось. Количество повреждений ДНК, вызванное совместным применением топотекана с **20d** было выше при использовании **20d** в концентрации 5 мкМ, чем при использовании **20d** в концентрации 20 мкМ.

Таким образом, было показано что совместное использование топотекана с ингибиторами Tdp1 **9e** и **20d** позволяет увеличить эффективность топотекана.

Так как известно, что Top1 является единственной мишенью для топотекана, а из полученных результатов видно, что сами по себе ингибиторы незначительно увеличивают количество поврежденной ДНК, то рост повреждений ДНК при совместном использовании ингибиторов и топотекана может быть связан с действием ингибиторов на Tdp1. Это подтверждает, что Tdp1 действительно является молекулярной мишенью исследуемых ингибиторов.

Исследование проапоптотического действия ингибитора Tdp1 20d

Тип клеточной гибели при совместном применении гидразонотиазольного производного УК **20d** и топотекана исследовали методом проточной цитометрии с окрашиванием клеток Аннексином V- FITC, результаты приведены на Рисунке 11.

Аннексин V имеет высокое сродство к фосфатидилсерину, структурному компоненту клеточных мембран. В нормальных клетках фосфатидилсерин находится на внутренней стороне плазматической мембраны. Миграция фосфатидилсерина с внутренней стороны мембраны на внешнюю служит сигналом к началу апоптоза и может детектироваться с помощью дифференциального окрашивания таких клеток флуоресцентно-меченным белком Аннексин V [47]. Дальнейшие изменения мембраны делают ее более проницаемой для PI, который связывается с нуклеиновыми кислотами. Совместное использование Аннексин V и PI позволяет разделить клетки на живые клетки (AnV-/PI-), ранние апоптотические клетки (AnV+/PI-), поздние апоптотические клетки (AnV+/PI+) и некротические клетки (AnV-/PI+) [48].

Для анализа проапоптотического действия производного усниновой кислоты **20d** были выбраны две концентрации этого соединения 5 мкМ и 20 мкМ. Величина CC_{50} для клеточной линии MCF-7 была определена равной 9,3 мкМ, первая концентрация в ~ 2 раза меньше CC_{50} , вторая в ~2 раза выше. Время инкубации было выбрано на основании развития морфологических изменений в клетках, – через 4 часа и 8 часов при данных концентрациях соединений и топотекана морфологических изменений не наблюдалось. Через 24 часа наблюдалось множество клеток с деформированными контурами, открепленных от пластиковой подложки (фото не приведены). На основании этого время инкубации было выбрано равным 14 часам.

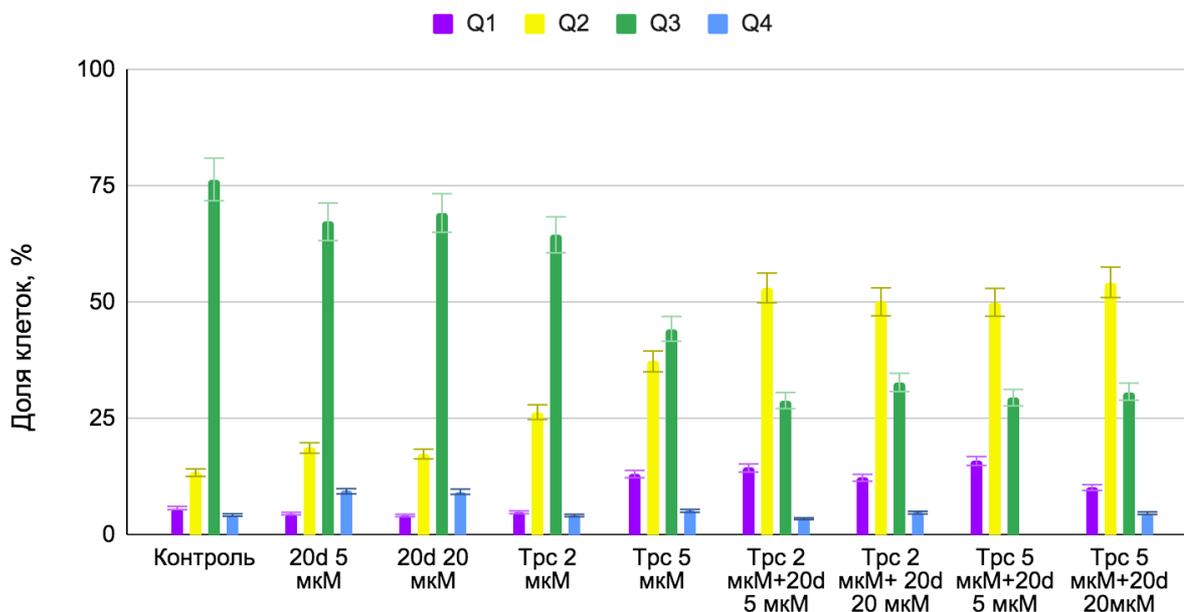


Рис.11. Анализ апоптоза в клетках MCF7, обработанных 20d, топотеканом и их комбинацией. Клетки с топотеканом в концентрациях 2 и 5 мкМ, ингибитором в концентрациях 5 и 20 мкМ и их комбинацией, инкубировали в течении 14 часов и анализировали методом проточной цитометрии с использованием окрашивания Annexin

V/PI. Q1 – (фиолетовый) некротическая популяция, Q2 – (желтый) поздняя апоптотическая популяция, Q3 (зеленый) – живые клетки, Q4 (голубой)– ранняя апоптотическая популяция.

Таблица 6. Процент клеток, находящихся на различной стадии клеточной гибели, вызванной применением **20d** как отдельно, так и в комбинации с топотеканом.

	Q1 (некроз)	Q2 (поздний апоптоз)	Q3 (живые клетки)	Q4 (ранний апоптоз)
Контроль	5,8±0,35	13,4± 1,07	76,4± 5,35	4,3± 0,56
20d 5 мкМ	4,6±0,55	18,7±1,12	67,3± 8,75	9,4± 0,66
20d 20 мкМ	4,2±0,21	17,4± 1,91	69,2± 7,61	9,3± 1,21
Трс 2 мкМ	4,9±0,25	26,4± 3,17	64,5± 6,45	4,2± 0,59
Трс 5 мкМ	13,1±0,79	37,3± 5,22	44,3± 5,32	5,2±0,31
Трс 2 мкМ+ 20d 5 мкМ	14,4±1,44	53,1± 4,43	28,9± 4,05	3,5± 0,49
Трс 2 мкМ+ 20d 20 мкМ	12,3±1,11	50,1± 6,01	32,8± 4,59	4,8± 0,48
Трс 5 мкМ+ 20d 5 мкМ	15,9±1,27	50,0± 4,00	29,5± 1,48	4,6± 0,69
Трс 5 мкМ+ 20d 20мкМ	10,2±1,12	54,3±5,43	30,8± 4,62	4,7± 0,66

Из полученных результатов (рис.11) видно, что контрольные клетки, инкубированные с 1% ДМСО в течение 14 час, содержали 76% живых клеток, 4% клеток в стадии раннего апоптоза, 13,4 % клеток в стадии позднего апоптоза и 5,8 % в стадии некроза. При инкубации клеток с топотеканом в концентрациях 2 мкМ и 5 мкМ популяция клеток в стадии раннего апоптоза практически не изменялась, тогда как популяция позднеапоптотических клеток увеличивалась до 26% и 37% соответственно, а также на 7,3% (p-value <0,005) увеличивалась популяция клеток с признаками некроза при инкубации клеток с 5 мкМ топотеканом, по сравнению с контрольной группой.

Инкубация клеток с производным УК **20d** приводила к увеличению популяции клеток с признаками раннего и позднего апоптоза примерно на 5%, как в концентрации 5 мкМ, так и в 20 мкМ концентрации. Популяция некротических клеток сравнима с контрольной группой при инкубации клеток с **20d** в концентрации 5 мкМ и 20 мкМ. Следовательно, повышение концентрации ингибитора **20d** не вело к увеличению гибели клеток.

В результате совместного применения 2 мкМ топотекана и производного УК **20d** в концентрациях 5 мкМ и 20 мкМ, популяция клеток в стадии позднего апоптоза увеличивалась до 53% и 50% соответственно, что значимо больше (p-value <0,005) по сравнению с использованием только 2 мкМ топотекана, рост составил 23% и 26% соответственно. По сравнению с обработкой клеток только **20d** позднеапоптотическая популяция увеличилась на 31-33% для концентраций **20d** 5 и 20 мкМ соответственно. При

повышении концентрации топотекана до 5 мкМ и в присутствии ингибитора **20d** в концентрациях 5 мкМ и 20 мкМ количество клеток в стадии позднего апоптоза составило 50-54%, превышение по сравнению с использованием только 5 мкМ топотекана составило 13-17 %, что было значимо больше (p -value <0,05). По сравнению с использованием только **20d** количество клеток в стадии позднего апоптоза выросло на 18-20%. Стоит отметить, что поздняя стадия апоптоза наступает, когда клеточная мембрана становится проницаемой, характеризуется фрагментацией ДНК и является необратимой фазой программируемой клеточной гибели. Таким образом, повышение доли позднеапоптотических клеток под действием **20d** позволяет сделать вывод, что совместное использование топотекана с ингибитором Tdp1 увеличивает эффективность топотекана и позволяет использовать его в более низких концентрациях.

Изучение влияния соединений на противоопухолевый эффект топотекана *in vivo*

Для исследования сенсibiliзирующего эффекта производных УК *in vivo* были использованы перевиваемые опухоли мышей - солидная карцинома лёгких Льюис (LLC) и асцитная форма карциномы Кребс-2. Эти штаммы перевиваемых опухолей были получены из Банка клеточных штаммов Института цитологии и генетики (Новосибирск, Россия), и поддерживаются у мышей в качестве трансплантированных опухолей. Работы были выполнены группой лаборатории регуляции экспрессии генов ИЦИГ СО РАН под руководством Поповой Нэлли Александровны, результаты приводятся с ее разрешения.

Мышиная модель LLC является наиболее широко используемой моделью мелкоклеточного рака легкого человека. Опухоль экспрессирует гены главного комплекса гистосовместимости и является линейно специфичной для мышей линии C57BL. Опухоль обладает высокой туморогенностью (при трансплантации солидные опухолевые узлы развиваются у 100% самок и самцов мышей) и способностью метастазировать в легкие, что и является причиной гибели животных. Трансплантация опухолевых клеток производится внутримышечно в правое бедро, в итоге на месте прививки образуется первичный опухолевый узел [49].

Асцитная форма LLC была получена и любезно предоставлена Калединым В.И., ИЦИГ СО РАН. Перевивка этой формы опухоли внутрибрюшинно дает асцит в брюшной полости и затем метастазы в легкие.

Опухолевые клетки Карциномы Кребс-2 не экспрессируют генов главного локуса гистосовместимости и могут быть трансплантированы мышам разных инбредных линий, а также и аутбредным. В наших экспериментах опухоленосителями этого штамма были

мышь линии C57BL. При внутрибрюшинной прививке образуется асцитная форма опухоли. Опухоль слабо иммуногенна и не даёт метастазов [50, 51].

Противоопухолевое и антимагастатическое действие гидразонотиазольного производного УК 20d в монорежиме и в сочетании с топотеканом в отношении опухоли LLC

В этом эксперименте была изучена способность соединения **20d** сенсбилизировать противоопухолевое и антимагастатическое действие топотекана на опухоль LLC.

После трансплантации опухоли LLC по 800 тыс клеток на мышь все животные были разделены рандомно на экспериментальные группы. Лечение животных топотеканом и соединением **20d** проводилось четырежды на 4, 5, 7 и 9 дни после трансплантации опухоли.

- **Группа 1** – контрольная – мышь этой группы получали внутривентриально смесь 15% ДМСО и 10% Твин-80 (контроль растворителя);
- **Группа 2** получала топотекан внутривентриально в разовой дозе 1,5 мг/кг. Выбранная доза топотекана неэффективна против первичной опухоли при четырехкратном введении, но достаточна для выявления синергического эффекта ингибитора Tdp1;
- **Группа 3** получала одновременно топотекан в дозе 1,5 мг/кг и ингибитор Tdp1 **20d** внутривентриально в разовой дозе 100 мг/кг в виде суспензии в ДМСО/Твин-80 (0,3 мл/мышь);
- **Группа 4** получала внутривентриально в виде суспензии только ингибитор Tdp1 **20d** в разовой дозе 100 мг/кг в ДМСО/Твин-80 (0,3мл/мышь).

Действие препаратов оценивали в конце эксперимента на 17-й день по весу опухолей, массе тела и внутренних органов (печень и селезенка), а также подсчитали количество метастазов в лёгких всех животных. Конечной точкой эксперимента считалась смерть мышей или один или два дня до расчетного времени смерти мышей в контроле. На рисунке 12. приведены данные об изменении веса мышей.

К моменту окончания эксперимента вес тела мышей контрольной группы увеличился на 4,4%, что было связано с ростом опухоли. После вычета массы опухоли вес животных в контрольной группе был на 10% меньше исходного. В экспериментальных группах вес тела мышей после удаления опухоли так же снижался примерно на 10%, и достоверных различий между экспериментальными группами и контрольной не было выявлено. Ни в одной группе мышей не было отмечено значительного изменения массы селезенки или печеночного индекса. Таким образом, выбранная доза ингибитора Tdp1 не приводила к усилению общетоксического действия топотекана у мышей.

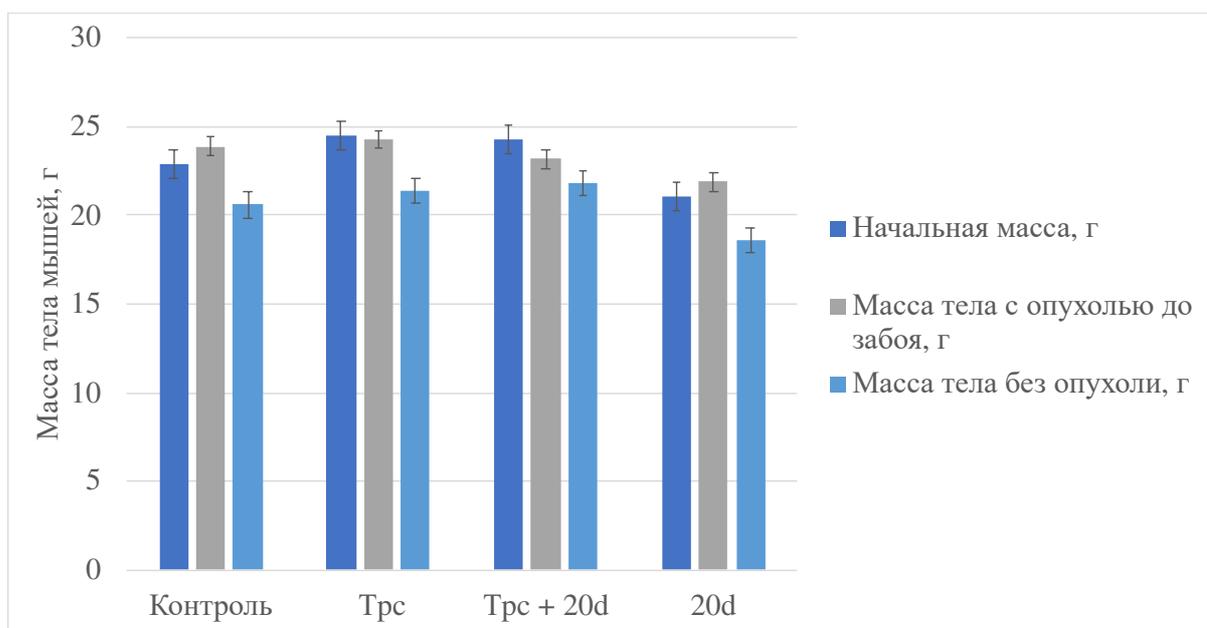


Рис. 12. Изменение веса мышей под действием топотекана и соединения **20d**, достоверных различий между экспериментальными группами и контрольной не выявлено.

При введении в монорежиме соединение **20d** не влияло на вес опухоли, но в комбинации с топотеканом значительно усиливало его противоопухолевое действие, снижая массу опухоли на 58% по сравнению с контролем (рис 13 А). Что касается метастазов, лечение топотеканом снизило их количество примерно в 2 раза по сравнению с контрольной группой мышей. Применение топотекана в комбинации с ингибитором Tdp1 **20d** увеличило антиметастатический эффект топотекана на 88% (рис 13Б), при сравнении с использованием топотекана в монорежиме. Количество метастазов в группе мышей, получавшей только ингибитор **20d**, было незначительно больше, чем в контрольной группе.

Таким образом, ингибитор Tdp1 **20d** не усиливает общетоксическое действие топотекана и не влияет на вес опухоли и количество метастазов в монорежиме. Однако при сочетанном применении значительно усиливает противоопухолевый и антиметастатический эффект топотекана. Данные опубликованы в [39].

Противоопухолевое действие гидразонотиазольного производного УК 20d в монорежиме и в сочетании с топотеканом в отношении карциномы Кребс-2 мышей

В этом эксперименте ингибитор Tdp1 **20d** вводили внутрибрюшинно. Этот способ введения препарата обеспечивает доступ ингибитора непосредственно к опухолевым клеткам, что позволяет оценить его собственный противоопухолевый эффект.

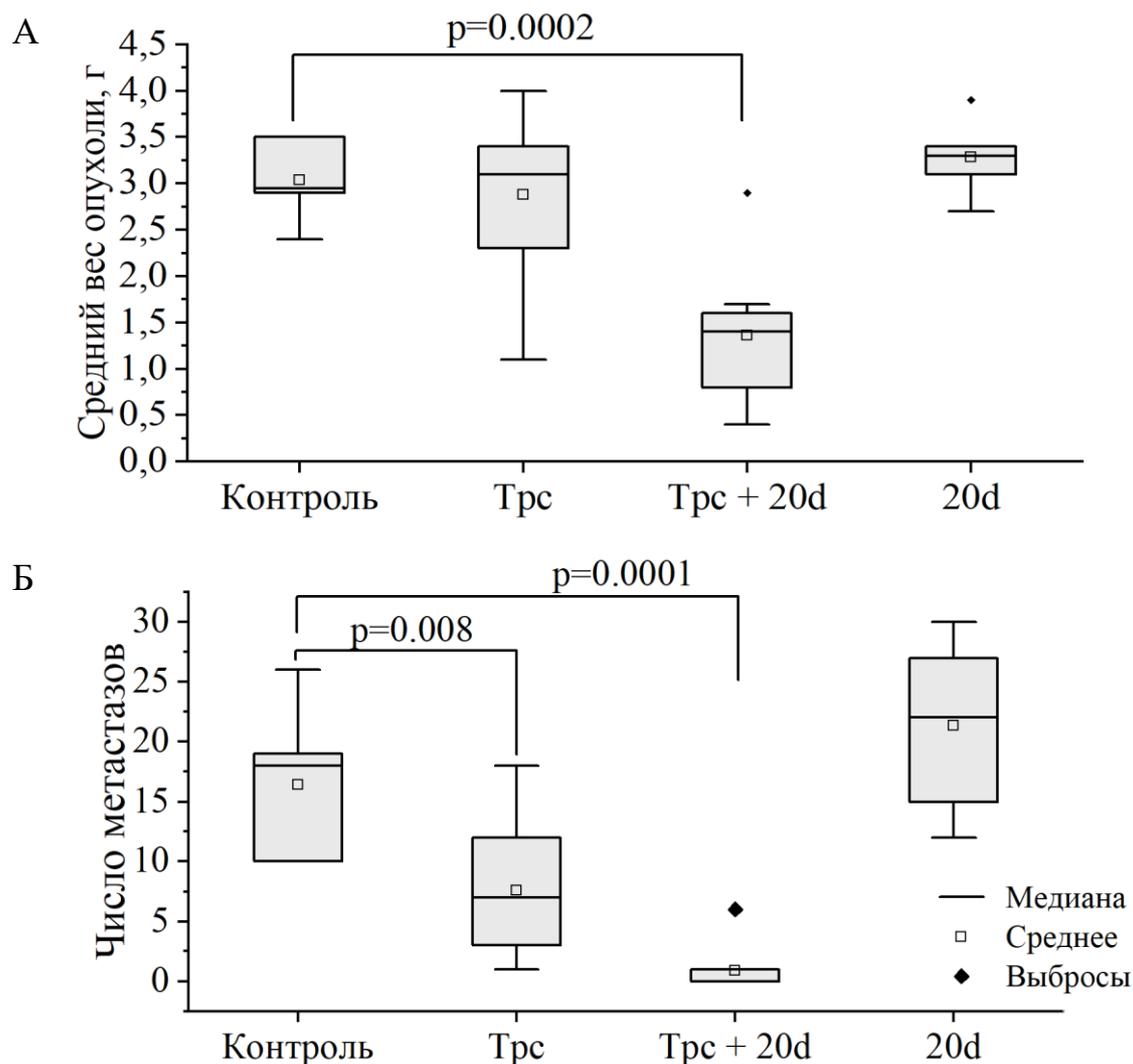


Рис.13. Диаграммы влияния соединения **20d** на противоопухолевый и антиметастатический эффект топотекана. (А) Влияние **20d** на массу опухоли через 17 дней после трансплантации. (Б) Влияние **20d** на количество метастазов в легких на 17-е сутки после внутримышечной трансплантации LLC.

После внутрибрюшинной трансплантации опухоли Кребс-2 в дозе 2 млн клеток на мышь экспериментальные группы мышей были сформированы схожим образом с описанным выше экспериментом, препараты вводили дважды на 2-й и 4-й день после прививки опухоли. Концентрация топотекана при введении в разовой дозе составляла 2 мг/кг. Концентрация ингибитора Tdp1 **20d** при введении в разовой дозе составляла 100 мг/кг в виде суспензии в ДМСО/Твин-80. Действие препаратов на опухоль оценивали в конце эксперимента на 10-й день по весу опухоли (разница в весе мыши с опухолью и после удаления опухоли) и числу опухолевых клеток в асците, определенному с помощью подсчёта в камере Горяева.

Индивидуальное введение как топотекана, так и ингибитора Tdp1 **20d** приводило к достоверному снижению веса опухоли и концентрации опухолевых клеток в асците

(рис.14А.) по сравнению с контрольной группой (мышам этой группы не проводили химиотерапию) и с группой мышей, получавших 15% ДМСО и 10% Твин-80 (контроль действия растворителя). При этом следует отметить, что соединение **20d** снизило концентрацию опухолевых клеток в асците достоверно эффективнее, чем топотекан в выбранной дозе. Собственный противоопухолевый эффект соединения **20d**, наблюдаемый на асцитной опухоли Кребс-2 и отсутствующий на солидной опухоли LLC, может быть связан как со способом введения, так и с разной чувствительностью модельных опухолей. Так как при внутрибрюшинном способе введения обеспечивается доступ ингибитора непосредственно к опухолевым клеткам, это приводит к более быстрому и интенсивному воздействию ингибитора на клетки опухоли.

Комбинированное введение топотекана и соединения **20d** также привело к снижению веса опухоли (недостоверно) и концентрации опухолевых клеток в асците (достоверно) по сравнению с лечением только топотеканом (рис. 14Б.). Данные опубликованы в статье [52].

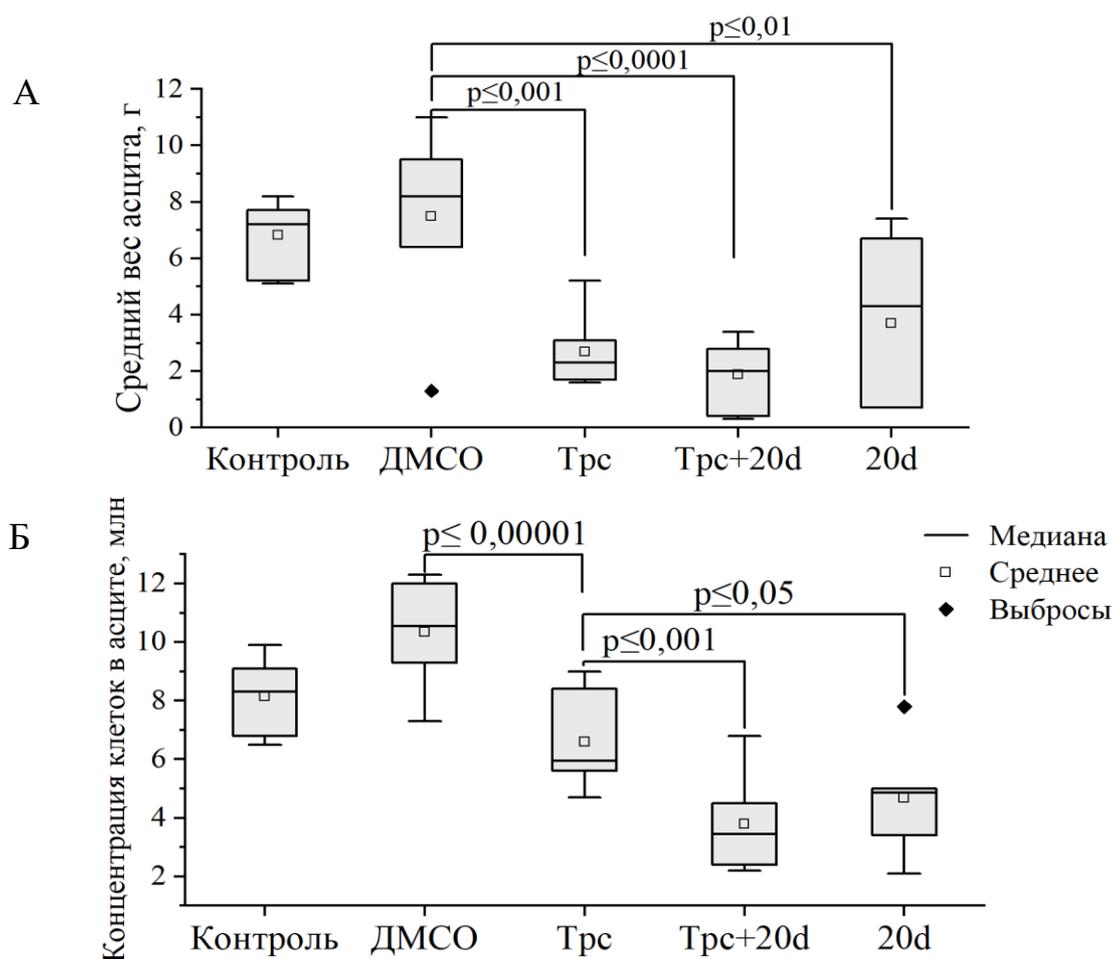


Рис.14. Диаграммы влияния соединения **20d** на вес асцита и концентрацию опухолевых клеток .А) Влияние **20d** на средний вес асцитной опухоли на 10-й день эксперимента, Б) Влияние **20d** на концентрацию опухолевых клеток в асците.

Противоопухолевое и антиметастатическое действие гидразонотиазольного производного УК **9e** в монорежиме и в сочетании с топотеканом в отношении асцитной формы опухоли LLC

Одним из важных показателей выбора соединений для дальнейшего изучения является общая токсичность соединений. Соединение **20d** эффективно подавляет активность Tdp1 и усиливает действие топотекана *in vitro*, но при этом оно является достаточно токсичным для разных типов клеточных. Поэтому для дальнейшего изучения *in vivo* было выбрано еще одно производное УК – **9e**. Как структурно, так и по ингибиторным характеристикам соединения **20d** и **9e** схожи между собой. Оба соединения эффективно подавляют активность Tdp1 (IC₅₀ 0.026 и 0.027 мкМ соответственно) и являются производными модифицированной по А-кольцу усниновой кислоты, содержащими тиазольный цикл и гидразоновый линкер. В производном **20d** остов УК связан через гидразонотиазольный фрагмент с *para*-бромфенильным остатком, а в соединении **9e** – с остатком периллового альдегида. Также оба производных УК сенсibiliзируют опухолевые клетки к цитотоксическому действию топотекана, но в отличие от **20d** соединение **9e** менее токсично.

Была изучена способность соединения **9e** сенсibiliзировать противоопухолевое действие топотекана на асцитную форму опухоли LLC, полученной Калединым В.И., ИЦиГ СО РАН. Преимущество асцитной формы по сравнению с солидной заключается в более быстром темпе роста и легкой перевивке мышам, а также в возможности более точного определения концентрации перевиваемых клеток.

Эффективность воздействия **9e** оценивали по массе опухоли LLC и числу метастазов в легких мышей на 13 день после перевивки опухоли. На 4 и 6 сутки после трансплантации опухолевых клеток мышам из опытных групп вводили:

- **Группа 1** 15% ДМСО и 10% Твин-80 (0.2 мл на мышь) контроль действия растворителя;
- **Группа 2** внутрибрюшинно топотекан в разовой дозе 0,5 мг/кг;
- **Группа 3** топотекан совместно с **9e** в концентрации 80 мг/кг. Ингибитор вводили внутривентрально.

Соединение **9e** не оказало влияния на вес опухоли, в комбинации с топотеканом, но увеличило антиметастатический эффект топотекана в два раза при внутривентральном введении (рис.15.).

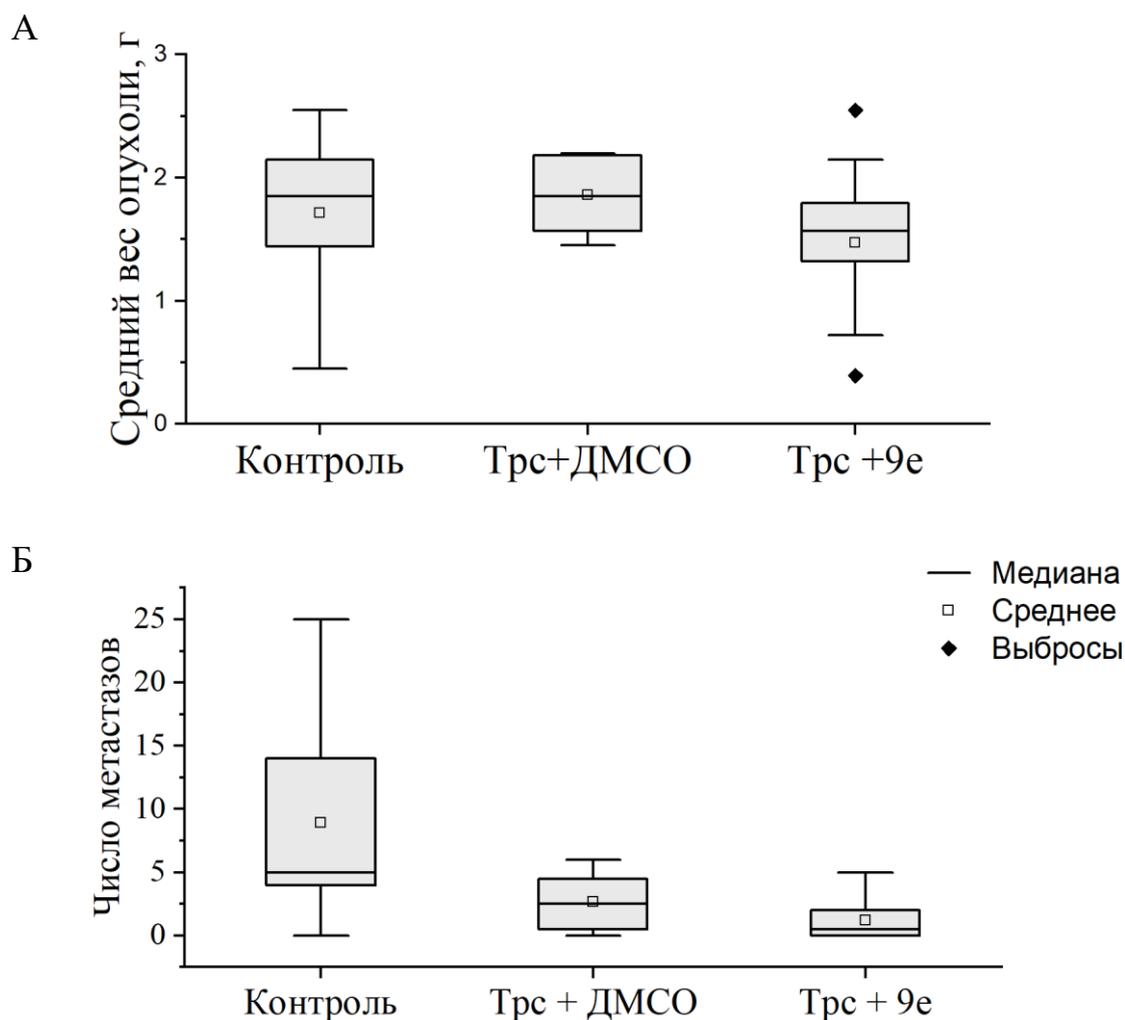


Рис.15. Влияние **9e** на противоопухолевый и антиметастатический эффект топотекана. А) Влияние **9e** на противоопухолевый эффект топотекана Б) Влияние **9e** на антиметастатический эффект топотекана.

Далее было изучено влияние **9e** на ежедневный прирост асцита LLC (рис. 16.) и продолжительность жизни мышей (рис.17.) при различных способах введения **9e**: внутрибрюшинном и внутрижелудочном.

Как внутрибрюшинное, так и внутрижелудочное индивидуальное введение соединения **9e** замедляет скорость роста асцитической опухоли (рис.16.). При внутрибрюшинном индивидуальном введении соединение **9e** достоверно замедляет рост опухоли в 1,5 раза по сравнению с контролем. При внутрижелудочном введении соединения **9e** эффект не так выражен, и достоверных отличий с контрольной группой мышей нет. Совместное использование топотекана и **9e** приводило к такому же замедлению роста опухоли, как и топотекан в монорежиме, иными словами, сенсibiliзирующего эффекта соединения **9e** на скорость роста асцита мы не наблюдали.

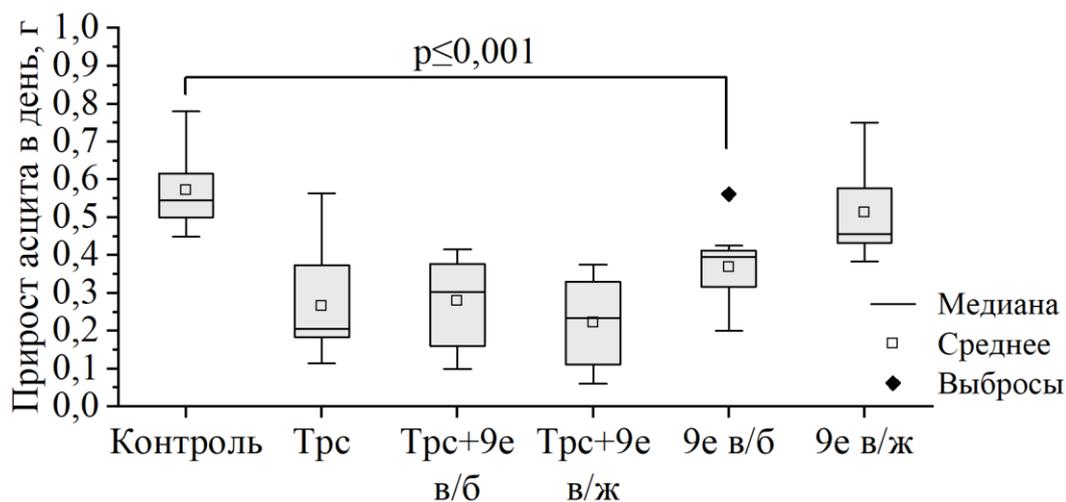


Рис.16. Влияние соединения **9e** на прирост асцита у мышей самостоятельно и в комбинации с топотеканом.

Индивидуальное введение топотекана увеличивало продолжительность жизни мышей в полтора раза и тормозило рост асцита более чем вдвое. Индивидуальное внутрибрюшинное введение **9e** достоверно увеличивало продолжительность жизни мышей в два раза и тормозило рост опухоли в полтора раза, по сравнению с контрольной группой мышей (рис.17.). В комбинации с топотеканом действие препаратов не зависело от способа введения соединения **9e**, и как внутрибрюшинно, так и внутрижелудочно достоверно увеличивало продолжительность жизни мышей по сравнению с использованием только топотекана в ~1,2 раза. При индивидуальном внутрижелудочном использовании **9e** увеличения продолжительности жизни мышей не наблюдалось, замедление роста асцита было незначительным (рис.17 и 16.).

Переносимость лечения была удовлетворительной. Снижения массы селезенки и увеличения индекса печени и изменения поведения мышей не наблюдалось.

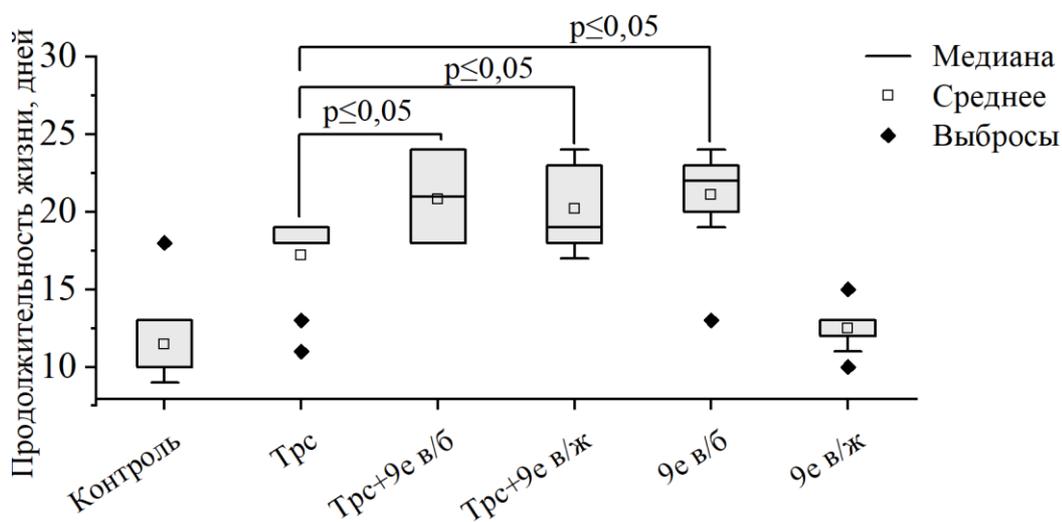


Рис.17. Влияние соединения **9e** на продолжительность жизни мышей в монорежиме и в комбинации с топотеканом.

Таким образом, при внутрибрюшинном введении и непосредственном контакте с опухолевыми клетками производное УК **9e** не усиливает общетоксическое действие топотекана, замедляет прирост опухоли и увеличивает продолжительность жизни мышей в два раза.

На основании данных, полученных *in vivo*, можно сделать следующие выводы. Оба соединения в комбинации с топотеканом усиливают его антиметастатический эффект, при этом соединение **20d** также усиливает противоопухолевый эффект топотекана на солидной модели LLC. На модели Кребс-2 соединение **20d** снижает число опухолевых клеток в асците как при индивидуальном внутрибрюшинном введении, так и в комбинации с топотеканом.

Соединение **9e** не оказало влияния на вес асцита, но в комбинации с топотеканом как при внутрибрюшинном, так и внутрижелудочном введении увеличило продолжительность жизни мышей по сравнению с использованием только топотекана. Также соединение **9e** при индивидуальном внутрибрюшинном введении увеличивало продолжительность жизни мышей в два раза.

Таким образом, оба гидразонотиазольных производных УК влияют больше на антиметастатический эффект топотекана, чем на противоопухолевый, что ценно, учитывая значимость проблемы метастазирования. Стоит отметить, что производные УК не усиливают острую общетоксическую нагрузку на организм и имеют удовлетворительную переносимость. Таким образом, эти соединения являются перспективными кандидатами для дальнейшей разработки в качестве сенсibilизаторов действия топотекана.

Заключение

В рамках данной работы в качестве ингибиторов Tdp1 были изучены соединения на основе усниновой кислоты (УК). УК обладает широким диапазоном биологической активности и имеет доступную сырьевую базу, однако обладает существенным токсическим эффектом в диапазоне эффективных концентраций. Нативная УК не подавляет активность Tdp1 в концентрациях до 50 мкМ [23, 24], поэтому, чтобы снизить токсический эффект УК и улучшить ингибиторные характеристики в отношении Tdp1, были выполнены различные модификации исходного соединения.

Целью данной работы был поиск сенсibilизаторов действия топотекана в отношении опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* среди ингибиторов Tdp1 – производных УК.

Впервые в качестве ингибиторов Tdp1 были изучены цианопроизводные УК, фураноновые производные УК и гидразонотиазольные производные УК с различными заместителями. Было показано, что многие соединения среди изученных классов обладают высокой ингибирующей активностью в отношении Tdp1. Так, цианопроизводные УК подавляют Tdp1 в микромолярном диапазоне концентраций (величины IC₅₀ 1,6–15 мкМ), а фураноновые и гидразонотиазольные производные УК ингибируют Tdp1 в наномолярных концентрациях (значения IC₅₀ от 10 нМ).

Автором работы так же была изучена цитотоксичность наиболее эффективных ингибиторов Tdp1 на основе УК в отношении перевиваемых линий опухолевых клеток. Поскольку ингибиторы Tdp1 предназначены для сопровождающей терапии, их собственная низкая токсичность и отсутствие дополнительных побочных эффектов имеют существенное значение. Было показано, что соединения на основе УК обладают умеренной цитотоксичностью или нетоксичны, что позволило выбрать нетоксичные концентрации ингибиторов для изучения их влияния на цитотоксический эффект топотекана. Ожидаемым эффектом совместного применения топотекана и ингибиторов Tdp1 является повышение чувствительности опухолевых клеток к действию топотекана. Наиболее эффективными сенсibilизаторами действия топотекана на опухолевые клетки оказались гидразонотиазольные производные УК. Было показано, что соединения **9e** и **20d** усиливают действие топотекана в 4,7 и 7,5 раз соответственно.

Впервые методом ДНК-комет было показано увеличение количества повреждений ДНК при совместном использовании соединений **9e** или **20d** с топотеканом, при сравнении с применением только топотекана. Это указывает на то, что основной молекулярной мишенью исследуемых соединений в живой клетке является Tdp1.

В данной работе методом проточной цитометрии с окрашиванием показано, что соединение **20d** само по себе не индуцирует клеточную гибель, но при совместном

использовании с топотеканом увеличивает количество апоптотических клеток, что позволяет использовать топотекан в более низких концентрациях. Полученные результаты согласуются с результатами, полученными методом ДНК-комет.

На основе совокупности данных, полученных *in vitro*, соединения **9e** и **20d** были выбраны для изучения сенсibiliзирующего эффекта *in vivo* на перевиваемых опухолях мышей. Впервые было показано, что ингибиторы Tdp1 в комбинации с топотеканом усиливают его антиметастатический эффект не только на культурах опухолевых клеток, а на реальных опухолях. Так же было показано, что соединение **20d** обладает как собственным противоопухолевым эффектом при внутрибрюшинном введении на опухоли Кребс-2, так и способностью усиливать противоопухолевый эффект топотекана на опухоли мышей Кребс-2 и LLC при разных способах введения. В свою очередь, соединение **9e** не обладает противоопухолевым эффектом, но при индивидуальном внутрибрюшинном введении и в комбинации с топотеканом как при внутрибрюшинном, так и внутрижелудочном введении увеличивает продолжительность жизни мышей

В данной работе были решены все поставленные задачи и среди большого количества производных УК найдены высокоэффективные ингибиторы Tdp1. Так же в данной работе были впервые протестированы *in vivo* ингибиторы Tdp1 на основе УК. Полученные *in vivo* данные свидетельствуют о том, что найденные ингибиторы пригодны для эффективной сопровождающей терапии онкологических заболеваний. Тем не менее, необходимо детальнее изучить влияние полученных ингибиторов на организм и выявить возможные побочные эффекты. Для этого требуются провести дополнительные доклинические испытания, включающие изучение общей и специфической токсичности, фармакокинетики и фармакодинамики, разработку лекарственной формы, после чего будет возможен переход к клиническим испытаниям ингибиторов Tdp1.

Выводы

Данная работа представляет собой систематическое исследование, в результате которого были найдены высокоэффективные ингибиторы тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы1 (Tdp1) на основе производных усниновой кислоты. Изучена их собственная цитотоксичность и способность сенсibiliзировать действие клинического препарата топотекана на клеточных линиях, представляющих модели различных видов рака. Показано влияние соединений на накопление повреждений ДНК, вызванных топотеканом, и на усиление про-апоптотического эффекта топотекана при его совместном использовании с ингибитором **20d**. Показано, что совместное применение ингибиторов Tdp1 с топотеканом усиливает противоопухолевый и антиметастатический эффект топотекана *in vivo*.

1. Проанализирована ингибирующая активность соединений на основе УК в отношении рекомбинантного фермента репарации ДНК Tdp1. Изучены цианопроизводные, фуранопроизводные и гидразонотиазольные производные УК, все эти соединения проявляют ингибирующую активность по отношению к Tdp1. Наиболее эффективными ингибиторами Tdp1 из испытанных являются гидразонотиазольные производные УК, ингибирующие Tdp1 в наномолярном диапазоне концентраций. Методом молекулярного моделирования было установлено, что эти соединения связываются с важными каталитическими остатками в активном центре Tdp1.
2. При исследовании собственной цитотоксической активности соединений было показано, что гидразонотиазольные производные УК умеренно токсичны в отношении изученных клеточных линий, представляющих модели различных видов рака. Потенциально низкая собственная цитотоксичность соединений позволяет уменьшить токсическую нагрузку на организм при совместном использовании этих соединений с противораковыми препаратами.
3. При исследовании влияния производных УК на цитотоксичность топотекана показано, что среди всех изученных классов имеются соединения – ингибиторы Tdp1, которые усиливают цитотоксическое действие топотекана в нетоксичных концентрациях, то есть проявляют сенсibiliзирующий эффект. Наиболее эффективными сенсibiliзаторами оказались гидразонотиазольные производные УК.
4. Показано, что при совместном использовании топотекана и гидразонотиазольных производных УК **9e** или **20d** происходит накопление

повреждений ДНК, вызванных топотеканом, что говорит о влиянии найденных ингибиторов Tdp1 на процесс репарации повреждений ДНК в клетке.

5. Исследование про-апоптотического эффекта **20d** показало, что само по себе соединение не индуцирует апоптоз, но его использование в комбинации с топотеканом приводит к увеличению популяции апоптотических клеток.
6. Показано, что производные УК **9e** и **20d** обладают способностью усиливать противоопухолевый и антиметастатический эффект топотекана на различных моделях опухолей мышей, не усиливая при этом остроту общетоксической нагрузки на организм. Соединения имеют удовлетворительную переносимость. Соединение **20d** проявляет собственный противоопухолевый эффект в отношении карциномы Кребс-2 мыши при внутрибрюшинном введении.

Список литературы

1. Каприн А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность) / А. Д. Каприн, В. В. Старинский, Г. В. Петрова – Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. – 1–250с.
2. Dexheimer T. Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase as a Target for Anticancer Therapy / Dexheimer T., Antony S., Marchand C., Pommier Y. // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* – 2012. – Т. 8 – № 4 – С.381–389.
3. Hengel S.R. Small-Molecule Inhibitors Targeting DNA Repair and DNA Repair Deficiency in Research and Cancer Therapy // *Cell Chem. Biol.* – 2017. – Т. 24. – № 9. – 1101–1119с.
4. Abbotts R. DNA repair in cancer: Emerging targets for personalized therapy / Abbotts R., Thompson N., Madhusudan S. // *Cancer Management and Research* – 2014. – Т. 6 – № 1 – С.77–92.
5. Захаренко А.Л. ФЕРМЕНТЫ РЕПАРАЦИИ ДНК КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МИШЕНИ В ОНКОТЕРАПИИ, “Биоорганическая химия” / Захаренко А.Л., Лебедева Н.А., Лаврик О.И. // *Биоорганическая химия* – 2018. – № 1 – С.3–21.
6. Curtin N.J. Inhibiting the DNA damage response as a therapeutic manoeuvre in cancer / Curtin N.J. // *British Journal of Pharmacology* – 2013. – Т. 169 – № 8 – С.1745.
7. Laev S.S. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase inhibitors: Progress and potential // *Bioorganic Med. Chem.* – 2016. – Т. 24. – № 21. – 5017–5027с.
8. Brettrager E.J. Targeting Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I to enhance toxicity of phosphodiester linked DNA-adducts. / Brettrager E.J., Waardenburg R.C.A.M. van // *Cancer drug resistance (Alhambra, Calif.)* – 2019. – Т. 2 – С.1153–1163.
9. Zakharenko A. Dual DNA topoisomerase 1 and tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibition for improved anticancer activity // *Med. Res. Rev.* – 2019. – Т. 39. – № 4. – 1427–1441с.
10. Matsuno Y. Sensitization of Cancer Cells to Radiation and Topoisomerase I Inhibitor Camptothecin Using Inhibitors of PARP and Other Signaling Molecules / Matsuno Y., Hyodo M., Fujimori H., Shimizu A., Yoshioka K. // *Cancers* – 2018. – Т. 10 – № 10 – С.364.
11. Cuya S.M. DNA topoisomerase-targeting chemotherapeutics: what’s new? / Cuya S.M., Bjornsti M.-A., Waardenburg R.C.A.M. van // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* – 2017. – Т. 80 – № 1 – С.1–14.
12. Yang S.W. A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and type I topoisomerases. / Yang S.W., Burgin A.B., Huizenga B.N., Robertson C.A., Yao K.C., Nash H.A. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 1996. – Т. 93 – № 21 – С.11534–11539.
13. Stewart L. A model for the mechanism of human topoisomerase I / Stewart L., Redinbo M.R., Qiu X., Hol W.G.J.J., Champoux J.J. // *Science* – 1998. – Т. 279 – № 5356 – С.1534–1541.
14. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond / Pommier Y. // *Nature*

Reviews Cancer – 2006. – Т. 6 – № 10 – С.789–802.

15. Pommier Y. DNA topoisomerase I Inhibitors: Chemistry, biology, and interfacial inhibition / Pommier Y. // Chemical Reviews – 2009. – Т. 109 – № 7 – С.2894–2902.

16. Interthal H. The tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1 is a member of the phospholipase D superfamily / Interthal H., Pouliot J.J., Champoux J.J. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – 2001. – Т. 98 – № 21 – С.12009–12014.

17. Comeaux E.Q. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I resolves both naturally and chemically induced DNA adducts and its potential as a therapeutic target / Comeaux E.Q., Waardenburg R.C.A.M. Van // Drug Metabolism Reviews – 2014. – Т. 46 – № 4 – С.494–507.

18. Pommier Y. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs // Chem. Biol. – 2010. – Т. 17. – № 5. – 421–433с.

19. Beretta G. Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Targeting for Modulation of Camptothecin-Based Treatment / Beretta G., Cossa G., Gatti L., Zunino F., Perego P. // Current Medicinal Chemistry – 2010. – Т. 17 – № 15 – С.1500–1508.

20. Chen A.Y. DNA Topoisomerases: Essential Enzymes and Lethal Targets / Chen A.Y., Liu L.F. // Annual Review of Pharmacology and Toxicology – 1994. – Т. 34 – № 1 – С.191–218.

21. Wang J.C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective / Wang J.C. // Nature Reviews Molecular Cell Biology – 2002. – Т. 3 – № 6 – С.430–440.

22. Alagoz M. TDP1 deficiency sensitizes human cells to base damage via distinct topoisomerase I and PARP mechanisms with potential applications for cancer therapy / Alagoz M., Wells O.S., El-Khamisy S.F. // Nucleic Acids Research – 2014. – Т. 42 – № 5 – С.3089–3103.

23. Лузина О.А. Биологическая активность усниновой кислоты и ее производных. Часть 1. Активность в отношении одноклеточных организмов / Лузина О.А., Салахутдинов Н.Ф. // Биоорганическая химия – 2016. – Т. 42 – № 2 – С.129–149.

24. Лузина О.А. Биологическая активность усниновой кислоты и ее производных. Часть 2. Действие усниновой кислоты и ее производных на высшие организмы, молекулярные и физико-химические аспекты биологической активности / Лузина О.А., Салахутдинов Н.Ф. // Биоорганическая химия – 2016. – Т. 42 – № 3 – С.276–300.

25. Liu C. Increased expression and activity of repair genes TDP1 and XPF in non-small cell lung cancer / Liu C., Zhou S., Begum S., Sidransky D., Westra W.H., Brock M., Califano J.A. // Lung cancer (Amsterdam, Netherlands) – 2007. – Т. 55 – № 3 – С.303–311.

26. Yu J. Gene expression profiling of the irinotecan pathway in colorectal cancer / Yu J., Shannon W.D., Watson M.A., McLeod H.L. // Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research – 2005. – Т. 11 – № 5 – С.2053–2062.

27. Dean R.A. Identification of a putative Tdp1 inhibitor (CD00509) by in vitro and cell-based assays / Dean R.A., Fam H.K., An J., Choi K., Shimizu Y., Jones S.J.M., Boerkoel C.F., Interthal H., Pfeifer T.A. // Journal of biomolecular screening – 2014. – Т. 19 – № 10 – С.1372–

28. Fam H.K. TDP1 and PARP1 deficiency are cytotoxic to rhabdomyosarcoma cells / Fam H.K., Walton C., Mitra S.A., Chowdhury M., Osborne N., Choi K., Sun G., Wong P.C.W., O'Sullivan M.J., Turashvili G., Aparicio S., Triche T.J., Bond M., Pallen C.J., Boerkoel C.F. // *Molecular cancer research : MCR* – 2013. – T. 11 – № 10 – C.1179–1192.
29. Barthelmes H.U. TDP1 overexpression in human cells counteracts DNA damage mediated by topoisomerases I and II / Barthelmes H.U., Habermeyer M., Christensen M.O., Mielke C., Interthal H., Pouliot J.J., Boege F., Marko D. // *Journal of Biological Chemistry* – 2004. – T. 279 – № 53 – C.55618–55625.
30. Das B.B. Optimal function of the DNA repair enzyme TDP1 requires its phosphorylation by ATM and/or DNA-PK / Das B.B., Antony S., Gupta S., Dexheimer T.S., Redon C.E., Garfield S., Shiloh Y., Pommier Y. // *EMBO Journal* – 2009. – T. 28 – № 23 – C.3667–3680.
31. El-Khamisy S.F. Synergistic decrease of DNA single-strand break repair rates in mouse neural cells lacking both Tdp1 and aprataxin / El-Khamisy S.F., Katyal S., Patel P., Ju L., McKinnon P.J., Caldecott K.W. // *DNA Repair* – 2009. – T. 8 – № 6 – C.760–766.
32. Hirano R. Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy: consequence of a Tdp1 recessive neomorphic mutation? / Hirano R., Interthal H., Huang C., Nakamura T., Deguchi K., Choi K., Bhattacharjee M.B., Arimura K., Umehara F., Izumo S., Northrop J.L., Salih M.A.M.M., Inoue K., Armstrong D.L., Champoux J.J., Takashima H., Boerkoel C.F. // *The EMBO Journal* – 2007. – T. 26 – № 22 – C.4732–4743.
33. Katyal S. TDP1 facilitates chromosomal single-strand break repair in neurons and is neuroprotective in vivo / Katyal S., El-Khamisy S.F., Russell H.R., Li Y., Ju L., Caldecott K.W., McKinnon P.J. // *EMBO Journal* – 2007. – T. 26 – № 22 – C.4720–4731.
34. Murai J. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1) repairs DNA damage induced by topoisomerases I and II and base alkylation in vertebrate cells / Murai J., Huang S.Y.N., Das B.B., Dexheimer T.S., Takeda S., Pommier Y. // *Journal of Biological Chemistry* – 2012. – T. 287 – № 16 – C.12848–12857.
35. Zakharenko A. Synthesis and biological evaluation of novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors with a benzopentathiepine moiety / Zakharenko A., Khomenko T., Zhukova S., Koval O., Zakharova O., Anarbaev R., Lebedeva N., Korchagina D., Komarova N., Vasiliev V., Reynisson J., Volcho K., Salakhutdinov N., Lavrik O. // *Bioorganic and Medicinal Chemistry* – 2015. – T. 23 – № 9 – C.2044–2052.
36. Galanty A. Enantioselective activity of usnic acid: a comprehensive review and future perspectives / Galanty A., Paško P., Podolak I. // *Phytochemistry Reviews* 2019 18:2 – 2019. – T. 18 – № 2 – C.527–548.
37. Zakharova O. Synthesis and evaluation of aryliden- and hetarylidenfuranone derivatives of usnic acid as highly potent Tdp1 inhibitors / Zakharova O., Luzina O., Zakharenko A., Sokolov D., Filimonov A., Dyrkheeva N., Chepanova A., Ilina E., Ilyina A., Klabenkova K., Chelobanov B., Stetsenko D., Zafar A., Eurtivong C., Reynisson J., Volcho K., Salakhutdinov N., Lavrik O.

// Bioorganic and Medicinal Chemistry – 2018. – T. 26 – № 15 – C.4470–4480.

38. Pommier Y. DNA topoisomerases and cancer / Y. Pommier / под ред. Y. Pommier. – New York, NY: Springer New York, 2012. – 1–443c.

39. Zakharenko A.L. Novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors enhance the therapeutic impact of topotecan on in vivo tumor models / Zakharenko A.L., Luzina O.A., Sokolov D.N., Kaledin V.I., Nikolin V.P., Popova N.A., Patel J., Zakharova O.D., Chepanova A.A., Zafar A., Reynisson J., Leung E., Leung I.K.H.H., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I. // European Journal of Medicinal Chemistry – 2019. – T. 161 – C.581–593.

40. Filimonov A.S. New hydrazinothiazole derivatives of usnic acid as potent TDP1 inhibitors / Filimonov A.S., Chepanova A.A., Luzina O.A., Zakharenko A.L., Zakharova O.D., Ilina E.S., Dyrkheeva N.S., Kuprushkin M.S., Kolotaev A. V., Khachatryan D.S., Patel J., Leung I.K.H.H., Chand R., Ayine-Tora D.M., Reynisson J., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I. // Molecules – 2019. – T. 24 – № 20 – C.1–34.

41. Khomenko T. New inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (Tdp 1) combining 7-hydroxycoumarin and monoterpenoid moieties / Khomenko T., Zakharenko A., Odarchenko T., Arabshahi H.J., Sannikova V., Zakharova O., Korchagina D., Reynisson J., Volcho K., Salakhutdinov N., Lavrik O. // Bioorganic and Medicinal Chemistry – 2016. – T. 24 – № 21 – C.5573–5581.

42. Ponomarev K.Y. Aminoadamantanes containing monoterpene-derived fragments as potent tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors / Ponomarev K.Y., Suslov E. V., Zakharenko A.L., Zakharova O.D., Rogachev A.D., Korchagina D. V., Zafar A., Reynisson J., Nefedov A.A., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I. // Bioorganic Chemistry – 2018. – T. 76 – C.392–399.

43. Mozhaitsev E.S. Novel Inhibitors of DNA Repair Enzyme TDP1 Combining Monoterpenoid and Adamantane Fragments / Mozhaitsev E.S., Zakharenko A.L., Suslov E. V., Korchagina D. V., Zakharova O.D., Vasil'eva I.A., Chepanova A.A., Black E., Patel J., Chand R., Reynisson J., Leung I.K.H., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I. // Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry – 2018. – T. 19 – № 4 – C.463–472.

44. Chepanova A.A. The Development of Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibitors. Combination of Monoterpene and Adamantine Moieties via Amide or Thioamide Bridges / Chepanova A.A., Mozhaitsev E.S., Munkuev A.A., Suslov E. V., Korchagina D. V., Zakharova O.D., Zakharenko A.L., Patel J., Ayine-Tora D.M., Reynisson J., Leung I.K.H., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I. // Applied Sciences 2019, Vol. 9, Page 2767 – 2019. – T. 9 – № 13 – C.2767.

45. Newman D.J. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014 // J. Nat. Prod. – 2016. – T. 79. – № 3. – 629–661c.

46. Luzina O. Usnic Acid Conjugates with Monoterpenoids as Potent Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibitors / Luzina O., Filimonov A., Zakharenko A., Chepanova A., Zakharova O., Ilina E., Dyrkheeva N., Likhatskaya G., Salakhutdinov N., Lavrik O. // Journal of Natural Products – 2020. – T. 83 – № 8 – C.2320–2329.

47. Schlegel R.A. Phosphatidylserine, a death knell // *Cell Death Differ.* – 2001. – T. 8. – № 6. – 551–563c.
48. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death // *Toxicol. Pathol.* – 2007. – T. 35. – № 4. – 495–516c.
49. Zhu H. A Simple Bioluminescence Imaging Method for Studying Cancer Cell Growth and Metastasis after Subcutaneous Injection of Lewis Lung Carcinoma Cells in Syngeneic C57BL/6 Mice. / Zhu H., Kauffman M.E., Trush M.A., Jia Z., Li Y.R. // *Reactive oxygen species (Apex, N.C.)* – 2018. – T. 5 – № 14 – C.118–125.
50. Patt H.M. Quantitative Studies of the Growth Response of the Krebs Ascites Tumor / Patt H.M., Blackford M.E. // *Cancer Research* – 1954. – T. 14 – № 5 – C.391–396.
51. Yushok W.D. Properties of Krebs 2 ascites carcinoma cells: Weight, size, specific gravity, and protein content / Yushok W.D., Mallalieu L.J., Batt W.G. // *Journal of the Franklin Institute* – 1956. – T. 262 – № 6 – C.507–509.
52. Dyrkheeva N.S. Antitumor Activity of the Combination of Topotecan and Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 Inhibitor on Model Krebs-2 Mouse Ascite Carcinoma / Dyrkheeva N.S., Zakharenko A.L., Novoselova E.S., Chepanova A.A., Popova N.A., Nikolin V.P., Luzina O.A., Salakhutdinov N.F., Ryabchikova E.I., Lavrik O.I. // *Molekuliarnaia biologii* – 2021. – T. 55 – № 2 – C.312–317.

Отчет о проверке на заимствования №1



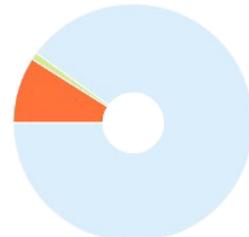
Автор: Чепанова Арина Александровна
Проверяющий: Гапонова Светлана Константиновна
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://users.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 11
Начало загрузки: 01.09.2022 09:24:04
Длительность загрузки: 00:00:39
Имя исходного файла: Научный доклад_Чепанова А.А_woref.docx
Название документа: Научный доклад_Чепанова А.А_woref
Языки текста документа: русский, английский
Размер текста: 70 кБ
Символов в тексте: 71957
Слов в тексте: 9078
Число предложений: 1524
Способ извлечения текста: OCR

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Начало проверки: 01.09.2022 09:24:44
Длительность проверки: 00:00:21
Комментарии: не указано
Поиск с учетом редактирования: да
Модули поиска: Кольцо вузов, Коллекция Национальной Библиотеки Узбекистана, ИПС Адилет, Интернет Плюс, Издательство Wiley, Диссертации НББ, Библиография, Переводные заимствования издательства Wiley (RuEn), Шаблонные фразы, eLIBRARY.RU, СПС ГАРАНТ, СМИ России и СНГ, Сводная коллекция ЭБС, Сводная коллекция РГБ, Перефразирования по коллекции издательства Wiley, Перефразирования по Интернету (EN), Перефразирования по Интернету, Перефразирования по eLIBRARY.RU, Переводные заимствования по Интернету (KyRu), Переводные заимствования по Интернету (KkRu), Переводные заимствования по Интернету (EnRu), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (KyRu), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (KkRu), Цитирование, Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu), Переводные заимствования (RuEn), Переводные заимствования (KyEn), Переводные заимствования (KkEn), Переводные заимствования, Патенты СССР, РФ, СНГ, Медицина



ЗАИМСТВОВАНИЯ

8,59%

САМОЦИТИРОВАНИЯ

0%

ЦИТИРОВАНИЯ

1,36%

ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

90,05%

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

№	Доля в отчете	Доля в тексте	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте	Комментарии
[01]	1,85%	1,85%	ФЕРМЕНТЫ РЕПАРАЦИИ ДНК КАК ПЕР... http://elibrary.ru	22 Фев 2018	Перефразирования по eLIBRARY.RU	3	3	
[02]	0,54%	1,5%	http://www.piboc.dvo.ru/conf/piboc201... http://piboc.dvo.ru	15 Июн 2021	Интернет Плюс	6	19	
[03]	0,42%	1,48%	Диплом_Филимонов_АС	13 Июн 2020	Кольцо вузов	3	6	
[04]	1,15%	1,46%	Гущина, Ирина Владимировна Разра... http://dlib.rsl.ru	28 Дек 2021	Сводная коллекция РГБ	3	3	
[05]	0,74%	1,36%	Лаборатория биоорганической хими... http://niboch.nsc.ru	11 Апр 2022	Интернет Плюс	2	8	
[06]	0%	1,36%	Филимонов Диплом предварительный	28 Мая 2020	Кольцо вузов	0	5	
[07]	1,36%	1,36%	не указано	13 Янв 2022	Шаблонные фразы	29	29	
[08]	0,18%	1,35%	Лузина, Ольга Анатольевна Синтез б... http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2019	Сводная коллекция РГБ	4	6	
[09]	0%	1,28%	https://www.cnmt.ru/doc/BMF-2019_fin... https://cnmt.ru	05 Мая 2022	Интернет Плюс	0	10	
[10]	0%	1,28%	https://www.cnmt.ru/doc/BMF-2019_fin... https://cnmt.ru	22 Июн 2022	Интернет Плюс	0	10	
[11]	1,09%	1,25%	Диплом Чернышовой И.А.	26 Мая 2021	Кольцо вузов	5	6	
[12]	0,04%	1,18%	Информационные события [Институт... http://niboch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	1	10	
[13]	0%	1,18%	Информационные события [Институт... http://niboch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	10	
[14]	0%	1,18%	Информационные события [Институт... http://niboch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	10	
[15]	0%	1,18%	Информационные события [Институт... http://niboch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	10	

[16]	0,35%	1,11%	https://www.openbio.ru/openbio_tezis... https://openbio.ru	26 Ноя 2019	Интернет Плюс	4	14	
[17]	0,11%	1,02%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch... http://niboch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	1	6	
[18]	0,43%	1%	Публикации сотрудника по видам пу... http://web.nioch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	5	11	
[19]	0%	1%	Публикации сотрудника по видам пу... http://web.nioch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	11	
[20]	0%	1%	Публикации сотрудника по видам пу... http://web.nioch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	11	
[21]	0%	1%	Публикации сотрудника по видам пу... http://web.nioch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	11	
[22]	0%	1%	Публикации сотрудника по видам пу... http://web.nioch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	11	
[23]	0%	0,95%	Белогуров, Алексей Анатольевич Био... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2018	Сводная коллекция РГБ	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[24]	0%	0,95%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch... http://niboch.nsc.ru	24 Мая 2022	Интернет Плюс	0	7	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[25]	0%	0,88%	Мохамед, Ислам Сабер Еад Молекуля... http://dlib.rsl.ru	28 Июн 2022	Сводная коллекция РГБ	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[26]	0%	0,88%	Информационные события [Институт... http://niboch.nsc.ru	03 Июн 2022	Интернет Плюс	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[27]	0%	0,84%	Рахманова_диплом	11 Июн 2016	Кольцо вузов	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[28]	0%	0,84%	Производные усниновой кислоты как... http://elibrary.ru	04 Мая 2017	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[29]	0,3%	0,83%	Воробьев, Иван Иванович Методы ф... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2019	Сводная коллекция РГБ	2	2	
[30]	0,79%	0,79%	Диплом Орлова	26 Мая 2021	Кольцо вузов	3	3	
[31]	0%	0,76%	ФЕРМЕНТЫ РЕПАРАЦИИ ДНК КАК ПЕР... http://elibrary.ru	22 Фев 2018	eLIBRARY.RU	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[32]	0%	0,75%	19 вузов России получили право прис... http://ug.ru	16 Янв 2019	СМИ России и СНГ	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[33]	0%	0,69%	Ингибиторы поли(адф-рибозо)полим... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[34]	0%	0,67%	http://www.spsl.nsc.ru/FullText/konfe/5... http://spsl.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	6	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[35]	0%	0,64%	https://openbio.ru/openbio_tezis_2019... https://openbio.ru	30 Мая 2022	Интернет Плюс	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[36]	0%	0,63%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch... http://niboch.nsc.ru	11 Фев 2022	Интернет Плюс	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[37]	0,61%	0,61%	Диссертация (7/16) http://web.nioch.nsc.ru	01 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	1	1	
[38]	0%	0,6%	Онкология. Аналитический отчет https://tochno.st	11 Мар 2021	Интернет Плюс	0	6	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[39]	0%	0,59%	Публикации сотрудника по годам http://web.nioch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	7	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[40]	0%	0,59%	Публикации сотрудника по видам пу... http://web.nioch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	7	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[41]	0%	0,59%	Публикации сотрудника по видам пу... http://web.nioch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	7	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[42]	0%	0,58%	Онкология в регионах России https://tochno.st	18 Мая 2022	Интернет Плюс	0	6	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[43]	0%	0,58%	Производные усниновой кислоты как... http://elibrary.ru	04 Мая 2017	eLIBRARY.RU	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[44]	0%	0,58%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch... http://niboch.nsc.ru	28 Апр 2022	Интернет Плюс	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[45]	0%	0,57%	Лаборатория биомедицинской хими... http://niboch.nsc.ru	19 Апр 2021	Интернет Плюс	0	6	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[46]	0%	0,49%	ТИРОЗИЛ-ДНК-ФОСФОДИЭСТЕРАЗА 1... http://elibrary.ru	03 Дек 2015	eLIBRARY.RU	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[47]	<input type="text" value="0%"/>	0,46%	Зонов, Евгений Владимирович Механ... http://dlib.rsl.ru	19 Фев 2018	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[48]	<input type="text" value="0%"/>	0,46%	Публикации сотрудника по видам пу... http://web.nioch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[49]	<input type="text" value="0%"/>	0,46%	Публикации сотрудника по видам пу... http://web.nioch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[50]	<input type="text" value="0%"/>	0,46%	Теоретические и прикладные аспекты... http://studentlibrary.ru	27 Ноя 2017	Сводная коллекция ЭБС	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[51]	<input type="text" value="0%"/>	0,46%	file_595465345d1c5мжпфи290617	29 Июн 2017	Кольцо вузов	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[52]	<input type="text" value="0%"/>	0,46%	Т. 2 http://emll.ru	08 Июл 2017	Медицина	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[53]	<input type="text" value="0%"/>	0,45%	Мохамед_Ислам_Сабер_Диплом	19 Мая 2022	Кольцо вузов	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[54]	<input type="text" value="0%"/>	0,44%	Экраны электромагнитного излучени... http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[55]	<input type="text" value="0%"/>	0,44%	сонин диплом на антиплагиат попыт...	25 Мая 2022	Кольцо вузов	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[56]	<input type="text" value="0%"/>	0,44%	Собачкин, Алексей Викторович Форм... http://dlib.rsl.ru	31 Янв 2014	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[57]	<input type="text" value="0%"/>	0,44%	Кузнецов, Виталий Викторович Олиг... http://dlib.rsl.ru	15 Окт 2015	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[58]	<input type="text" value="0%"/>	0,44%	Алкилирующие фторированные про... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[59]	<input type="text" value="0%"/>	0,44%	Фосфорсодержащие фторированные ... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[60]	<input type="text" value="0%"/>	0,44%	Способ получения наноразмерной с... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[61]	<input type="text" value="0%"/>	0,44%	Теоретические основы новых направ... http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[62]	<input type="text" value="0%"/>	0,43%	Багаманшина, Анастасия Викторовна... http://dlib.rsl.ru	11 Июн 2020	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[63]	<input type="text" value="0%"/>	0,41%	Рецепт «второго дыхания» от академ... http://elibrary.ru	16 Янв 2016	eLIBRARY.RU	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[64]	<input type="text" value="0%"/>	0,4%	Kaledin Vasily I. Sciact - cris system https://sciact.nioch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[65]	<input type="text" value="0%"/>	0,38%	Антиоксидантные и антирадикальны... http://dslib.net	10 Фев 2020	Интернет Плюс	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[66]	<input type="text" value="0%"/>	0,37%	План мероприятий ФАНО России ("до... http://ivo.garant.ru	13 Янв 2017	СПС ГАРАНТ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[67]	<input type="text" value="0%"/>	0,34%	Сведения об авторах. http://elibrary.ru	31 Авг 2011	eLIBRARY.RU	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[68]	<input type="text" value="0%"/>	0,33%	V СЪЕЗД БИОФИЗИКОВ РОССИИ. http://elibrary.ru	11 Дек 2015	eLIBRARY.RU	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[69]	<input type="text" value="0%"/>	0,29%	Диссертация (16/16) http://web.nioch.nsc.ru	08 Янв 2017	ПЕРЕФРАЗИРОВАНИЯ ПО ИНТЕРНЕТУ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[70]	<input type="text" value="0%"/>	0,29%	Перечень научных конференций, си...	09 Янв 2019	СМИ России и СНГ	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[71]	<input type="text" value="0%"/>	0,28%	Молекулярно импринтированные по... http://elibrary.ru	05 Авг 2016	eLIBRARY.RU	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[72]	<input type="text" value="0%"/>	0,26%	ИНГИБИТОРНЫЕ СВОЙСТВА АЗОТСО... http://elibrary.ru	01 Янв 2015	ПЕРЕФРАЗИРОВАНИЯ ПО eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[73]	<input type="text" value="0%"/>	0,24%	Диплом Ли-Жуланов	01 Июн 2020	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[74]	<input type="text" value="0%"/>	0,24%	Диплом Ли-Жуланов	10 Июн 2020	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[75]	<input type="text" value="0%"/>	0,23%	ПОСТРОЕНИЕ МЕХАНИСТИЧЕСКОЙ П... http://elibrary.ru	24 Янв 2012	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[76]	<input type="text" value="0%"/>	0,21%	Алемасов, Николай Александрович К... http://dlib.rsl.ru	26 Мар 2019	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[77]	<input type="text" value="0%"/>	0,2%	БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИН... https://docplayer.ru	17 Мар 2019	Интернет Плюс	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[78]	<input type="text" value="0%"/>	0,2%	Бреннер, Евгений Владиславович Мо... http://dlib.rsl.ru	11 Окт 2010	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[79]	<input type="text" value="0%"/>	0,19%	http://www.spsl.nsc.ru/FullText/konfe/... http://spsl.nsc.ru	12 Мая 2022	Интернет Плюс	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[80]	<input type="text" value="0%"/>	0,19%	https://lomonosov-msu.ru/file/event/5... https://lomonosov-msu.ru	02 Фев 2022	Интернет Плюс	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[81]	<input type="text" value="0%"/>	0,16%	137951 http://biblioclub.ru	15 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[82]	<input type="text" value="0%"/>	0,16%	Молекулярная биология. 2017. Т. 51, ... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[83]	<input type="text" value="0%"/>	0,16%	Молекулярная биология. 2017. Т. 51, ... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[84]	<input type="text" value="0%"/>	0,16%	Генетика. 2017. Т. 53, № 8 http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[85]	<input type="text" value="0%"/>	0,16%	Всероссийская научно-практическая ... http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[86]	<input type="text" value="0%"/>	0,16%	Артериальная гипертония у лиц приз... http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[87]	<input type="text" value="0%"/>	0,16%	Т. XCIV, № 4, июль-август http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[88]	<input type="text" value="0%"/>	0,15%	«Росгосстрах» в Корткеросе Республи... http://zvezdakomi.ru	19 Мая 2020	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[89]	<input type="text" value="0%"/>	0,14%	http://web.nioch.nsc.ru/nioch/template... http://web.nioch.nsc.ru	20 Июн 2022	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[90]	<input type="text" value="0%"/>	0,14%	https://www.volgmed.ru/uploads/dsov... https://volgmed.ru	14 Окт 2020	Интернет Плюс	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[91]	<input type="text" value="0%"/>	0,11%	АСПИРАНТЫ ВОРОНЕЖСКОГО ГАУ ПО... http://voronej.bezformata.com	17 Авг 2019	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[92]	<input type="text" value="0%"/>	0,11%	Эксклюзивное лекарство против рака... http://nsknews.info	08 Янв 2019	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[93]	<input type="text" value="0%"/>	0,11%	https://congress.regenerative-med.ru/fi... https://congress.regenerative-med.ru	27 Фев 2022	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[94]	<input type="text" value="0%"/>	0,09%	Российские ученые выяснили, что ме... http://gorodskoportal.ru	08 Янв 2019	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[95]	<input type="text" value="0%"/>	0,09%	Женщины в науке: учёные Дальневос... http://to-ros.info	17 Авг 2019	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[96]	<input type="text" value="0%"/>	0,09%	Человеческое молоко в борьбе с онк... http://infopro54.ru	16 Ноя 2018	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[97]	<input type="text" value="0%"/>	0,08%	https://elar.urfu.ru/bitstream/10995/41... https://elar.urfu.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.