

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

Лаборатория химии РНК

*На правах рукописи*

ШАТУНОВА ЕЛИЗАВЕТА АНДРЕЕВНА

---

**НАУЧНЫЙ ДОКЛАД**  
**об основных результатах выполненной**  
**научно-квалификационной работы**

**Создание оптических аптасенсоров для детекции**  
**биомаркеров ревматических заболеваний**

Направление подготовки

04.06.01 Химические науки

Специальность

1.4.9 Биоорганическая химия

Аспирант \_\_\_\_\_ Е. А. Шатунова

Научный руководитель \_\_\_\_\_ к.х.н. М. А. Воробьева

Рецензент \_\_\_\_\_ к.х.н. Е. В. Дмитриенко

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

Научный руководитель:

**Воробьева Мария Александровна**

Кандидат химических наук, заведующая Лабораторией химии РНК ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность

Аптамеры - одноцепочечные синтетические ДНК или РНК, которые способны связывать молекулы-мишени с высокой аффинностью, вызывают особенный интерес в плане биомедицинского применения [1]. Высокое сродство и специфичность связывания аптамеров с мишенями позволяют рассматривать их в качестве альтернативы антителам. При этом среди преимуществ аптамеров можно выделить возможность химического синтеза, стабильность характеристик, возможность введения различных модификаций, широкий спектр возможных мишеней [2]. Среди потенциальных мишеней аптамеров особенно важно выделить белки-биомаркеры различных заболеваний. Свойства аптамеров позволяют использовать их для ингибирования белков-мишеней [3] и адресной доставки [4], но наиболее интенсивно в этой области развивается направление создания систем детекции на основе аптамеров [5–7]. Аптамеры в качестве узнающих элементов совместимы практически с любыми системами детекции с различным типом сигнала, например, флуоресцентным или электрохимическим [8], однако с точки зрения последующего применения для лабораторной диагностики одним из наиболее перспективных вариантов представляется создание колориметрических тест-систем.

Белки-биомаркеры сердечно-сосудистых, онкологических заболеваний и инфекций [9–11] на данный момент составляют большинство мишеней для существующих аптамеров. Многообещающим направлением является также получение и применение аптамеров к маркерам ревматических заболеваний: маркерам воспаления, метаболизма соединительной и костной тканей [12]. Высокая распространенность этих заболеваний, их хронический характер, а также важность ранней диагностики обуславливают необходимость создания новых диагностических тест-систем для мониторинга ряда биомаркеров. В частности, ингибитор Wnt-сигнального пути активации остеобластов Dickkopf-related protein 1 (DKK-1) рассматривают в качестве маркера структурных изменений при спондилоартритах, в частности, при анкилозирующем спондилите (болезни Бехтерева) [13,14]. При исследованиях роли и диагностической значимости этого белка требуются продолжительные многолетние исследования, для которых критически важна стабильность характеристик тест-систем для определения уровня DKK-1. Используемые в настоящее время ИФА-наборы на в полной мере удовлетворяют этим требованиям [15]. Перспективной альтернативой является применение систем на основе аптамеров [16].

Таким образом, создание совместимых с продолжительными исследованиями и рутинной практикой лабораторной диагностики систем детекции белка DKK-1 на основе

аптамеров на данный момент является актуальной задачей.

### **Цели и задачи исследования**

Целью данной работы является создание оптических аптасенсоров на основе НК-аптамеров к белку-биомаркеру DKK-1. В рамках данной работы были поставлены следующие задачи:

- 1) Оценить работоспособность опубликованного ранее в литературе ДНК-аптамера к белку DKK-1 в качестве компонента тест-системы для анализа сывороток пациентов с анкилозирующим спондилитом.
- 2) Провести отбор методом SELEX новых аптамеров к DKK-1, синтезировать и характеризовать новые аптамеры и их укороченные варианты.
- 3) На основе пар аптамер/аптамер и аптамер/антитело сконструировать и протестировать в модельных условиях сэндвич-системы детекции DKK-1.
- 4) Исследовать возможность применения сконструированной системы для определения уровня DKK-1 в образцах сыворотки больных анкилозирующим спондилитом.

### **Научная новизна полученных результатов**

Показана возможность быстрого и эффективного отбора ДНК-аптамеров из комбинаторной библиотеки ДНК с предформированными нуклеотидными мотивами в случайной области. Получена и охарактеризована серия новых ДНК-аптамеров к белку DKK-1, показана возможность их использования в качестве узнающих компонентов при создании системы колориметрической детекции DKK-1. Впервые показана возможность количественного определения DKK-1 в образцах сыворотки крови от больных анкилозирующим спондилитом с использованием колориметрических систем на основе сочетания аптамеров и антител.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

В результате выполнения работы предложен удобный и эффективный способ отбора аптамеров из ДНК-библиотеки с неравномерной случайной областью, который в дальнейшем может быть использован при получении аптамеров к широкому кругу белковых мишеней. Полученные аптамеры к одному из ключевых регуляторов Wnt-пути – белку DKK-1 - в перспективе могут быть использованы не только в качестве компонентов тест-систем, но и для таргетного ингибирования функциональной активности данного белка. Созданные колориметрические тест-системы расширяют арсенал средств для диагностики и мониторинга заболеваний, ассоциированных с изменением уровня DKK-1.

### **Апробация работы**

По результатам исследования опубликовано 6 работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых изданиях и 4 тезисов конференций:

1. **Shatunova E.A.**, Korolev M.A., Omelchenko V.O., Kurochkina Yu.D., Davydova A.S., Venyaminova A.G., Vorobyeva M.A. Aptamers for proteins associated with rheumatic diseases: progress, challenges, and prospects of diagnostic and therapeutic applications. *Biomedicines*. 2020. V. 8. 527. DOI: 3390/biomedicines8110527
2. Воробьева М.А., **Шатунова Е.А.**, Колпаков К.И., Курочкина Ю.Д., Королев М.А. Клинико-диагностическое значение уровня Dkk-1 при анкилозирующем спондилите: сравнение тест-систем на основе аптамеров и антител. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2022. Т. 173. № 3. С. 307-312. DOI: 10.47056/0365-9615-2022-173-3-307-312
3. **Шатунова Е.А.**, Тимошенко В.В., Кабилов М.Р., Королев М.А., Воробьева М.А. Селекция аптамеров к белку DKK-1 из ДНК-библиотеки с неравномерной случайной областью. *Высокопроизводительное секвенирование в геномике (HSG-2022)*, стр. 32
4. **Shatunova E.**, Kolpakov K., Kurochkina Y., Korolev M., Vorobyeva M. DKK-1 level detection in ankylosing spondylitis by the aptamer-based colorimetric assay. *Bioinformatics of genome regulation and structure/systems biology (BGRS/SB-2022)*, p. 843. DOI: 10.18699/SBB-2022-492
5. **Шатунова Е.А.**, Королев М.А., Воробьева М.А. создание колориметрических тест-систем на основе аптамеров для определения сывороточного уровня DKK-1. *Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям. Материалы XV международной научно-практической конференции имени академика Ю.И. Бородина (24-25 марта 2023, Новосибирск)*, с. 319.
6. Воробьева М.А. Давыдова А.С., **Шатунова Е.А.**, Курочкина Ю.Д., Королев М.А. Аптамеры к биомаркерам спондилоартритов как основа для новых тест-систем и таргетных терапевтических препаратов. Тезисы докладов 13-ой Международной научной конференции «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (Биокатализ - 2023), г. Суздаль, Россия, июнь, 25-29, 2023. С. 55

#### **Вклад автора**

Основная часть экспериментов выполнена лично автором. Химический синтез олигонуклеотидов и комбинаторной библиотеки проводился в Лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН к.х.н Мещаниновой М.И. и к.х.н. Новопашиной Д.С. Секвенирование обогащенной библиотеки после селекции и биоинформатический анализ проводил к.б.н. Кабилов М.Р. (ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН). Анализ образцов больных АС на ранней и развернутой стадии методом ИФА проводился совместно с Овчинниковым В.С. (НИИКЭЛ – филиал ФИЦ ИЦиГ СО РАН). Обработка результатов всех экспериментов проведена лично автором.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Селекция *in vitro*

Для проведения селекции использовали комбинаторную оцДНК-библиотеку и праймеры:

**Таблица 1.** Последовательности оцДНК-библиотеки и праймеров

Шифр	Последовательность 5'-3'
YR (71 нт)	AGA TGG CAC GAC TCG G-(YR) <sub>5</sub> -N <sub>5</sub> -(YR) <sub>5</sub> -N <sub>5</sub> -(YR) <sub>5</sub> -AGC CCT GTC GAT CCC
P3-3 (15 нт)	GGG ATC GAC AGG GCT
P3-4 (16 нт)	AGA TGG CAC GAC TCG G

A:C:G:T N – 1:1:1:1, Y – 5:45:5:45, R – 45:5:45:5

Перед каждым раундом проводили фолдинг библиотеки: 1 нмоль оцДНК-библиотеки в 1x PBS, pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub> выдерживали 5 мин при 95°C, 5 мин на льду и 10 мин при комнатной температуре. Затем вносили Твин-20 до 0.05%, polyA до 100 мкг/мл, человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) до 0.01% и инкубировали еще 10 мин при комнатной температуре. 2 мкг рекомбинантного DKK-1 (Cloud-Clone Corp., Китай) иммобилизовали на HisMag Sepharose Ni магнитные частицы (GE Healthcare, США). Каждый раунд включал стадию контрселекции: библиотеку после фолдинга инкубировали с «пустыми» магнитными частицами, 30 мин при комнатной температуре при перемешивании на мультиротаторе, выдерживали на магнитном сепараторе 1 мин, отделяли магнитные частицы, пул несвязавшихся ДНК отбирали для проведения селекции. Полученный набор ДНК инкубировали с DKK-1 на магнитных частицах 1 ч при комнатной температуре и перемешивании, выдерживали на магнитном сепараторе 1 мин, удаляли несвязавшиеся ДНК, частицы промывали 3 раза 1x PBS, pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% Твин-20. Для элюции комплексов ДНК-DKK-1 к магнитным частицам добавляли 15 мкл раствора, содержащего 20 mM Трис-НСl, pH 7.5, 100 mM имидазола и инкубировали 15 мин при комнатной температуре и перемешивании на мультиротаторе, выдерживали на магнитном сепараторе 1 мин, супернатант отделяли и использовали для проведения ПЦР: к раствору добавляли буфер для ПЦР (Биолабмикс, Россия), 7.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTPs, по 1 мкМ праймеров P3-3 и P3-4, 2.5 е.а. HotStart Taq ДНК-полимеразы (Биолабмикс, Россия) и амплифицировали: 94°C – 3 мин, 94° - 30 с, 50°C – 30 с, 72°C – 30 с (10 циклов), 72°C – 3 мин. Для получения обогащенной оцДНК-библиотеки использовали асимметричную ПЦР в присутствии только праймера P3-4

с последующей очисткой с использованием центрифужных концентраторов Amicon Ultra-0.5 mL (Millipore, США).

### **Синтез конъюгатов олигонуклеотидов с биотином и флуоресцентным красителем Cy5**

Для синтеза конъюгатов с биотином олигонуклеотидов (ON) к раствору 5'- или 3'-амино модифицированного ON (25 мкл) в 0.1 М  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  (pH 9.5) добавляли 100-кратного молярного избытка свежеприготовленного раствора N-гидроксисукцинимидного (NHS) эфира биотина (Sigma-Aldrich, США) в ДМФА (25 мкл) и инкубировали при 25 °С в течение 3 ч и перемешивании. Полученные конъюгаты осаждали 2%-ным раствором  $\text{NaClO}_4$  в ацетоне, осадок промывали ацетоном, сушили на воздухе в течение 15 мин и растворяли в  $\text{H}_2\text{O}$  (mQ). Для удаления избытка NHS-эфира биотина использовали хроматографию на самодельных колонках с фазой C18.

Для синтеза конъюгатов ON с флуоресцентным красителем Cy5 раствор 5'-амино модифицированного ON (25 мкл) в 0.5 М Трис-НСl, pH 8.0 инкубировали в присутствии 100-кратного молярного избытка свежеприготовленного раствора NHS-эфира Cy5 (Lumiprobe, Россия) в ДМСО (25 мкл) при 25 °С в течение 3 ч и перемешивании. Полученные конъюгаты осаждали 2%-ным раствором  $\text{NaClO}_4$  в ацетоне, осадок промывали ацетоном, сушили на воздухе в течение 15 мин и растворяли в  $\text{H}_2\text{O}$  (mQ). Для удаления избытка NHS-эфира Cy5 использовали хроматографию на самодельных колонках с фазой C18. Для получения Cy5-меченной библиотеки использовали асимметричную ПЦР в присутствии 5'-Cy5-модифицированного праймера P3-4 с последующей очисткой с использованием центрифужных концентраторов Amicon Ultra-0.5 mL (Millipore, США).

### **Анализ аффинности методом задержки в геле**

Проводили фолдинг 0.2 мкМ раствора Cy5-меченной библиотеки в 1x PBS, pH 7.4, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ : выдерживали 5 мин при 95°C, 5 мин на льду и 15 при комнатной температуре, затем вносили Твин-20 до 0.1%, polyA до 200 мкг/мл. Равный объем раствор ДКК-1 в концентрации 0-10 мкМ добавляли к библиотеке и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Затем к 10 мкл комплекса добавляли 2.5 мкл 0.05% ВР в 30% глицерине и наносили на 12% ПААГ (49:1, 0.5xТВ). Проводили электрофорез при 200 В 2.5 ч с последующей визуализацией с использованием лазерного сканера Amersham Typhoon (GE Healthcare, США). Обработку изображения проводили с помощью пакета программ Quantity One 4.5.1 (Bio-Rad). Для построения кривых связывания использовали уравнение бимолекулярного связывания в рамках программного пакета GraphPad Prism 8.

### **Анализ аффинности ДНК-аптамеров колориметрическим методом в**

### **микропланшетном варианте**

В лунках планшета высокой сорбционной емкости (Greiner, Германия) инкубировали 100 мкл 2 мкг/мл раствора ДКК-1 в 1х PBS, pH 7.4 при 4°C в течение 18 ч. Промывали 3 раза по 200 мкл 1х PBS, pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% Твин-20 и блокировали 150 мкл 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) в 1х PBS 2 ч при 25°C и перемешивании. Раствор удаляли, лунки промывали. Добавляли биотинилированный аптамер после фолдинга после фолдинга в 1х PBS, pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% Твин-20 (95°C – 5 мин, комнатная температура – не менее 30 минут) и инкубировали 1 ч при 25°C и перемешивании, после чего раствор удаляли, лунки промывали. Вносили по 100 мкл 0.2 мкг/мл конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена (SA-HRP), инкубировали 1 ч при 25°C и перемешивании, раствор удаляли, планшет промывали. Добавляли раствор 0.2 мг/мл ТМВ в 0.1 М NaOAc, pH 5.2, содержащий 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, инкубировали 20 мин. Для фиксации окраски добавляли 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и измеряли оптическую плотность на 450 нм с использованием микропланшетного ридера AMR-100 (All-Sheng).

Для расчета констант диссоциации использовали уравнение бимолекулярного связывания в рамках программного пакета GraphPad Prism 8.

### **Колориметрическая микропланшетная детекция ДКК-1 в сэндвич-формате**

Амино-модифицированные аптамеры иммобилизовали в лунки NucleoLink™ (Thermo Fisher Scientific, США): 100 мкл 250 нМ раствора аптамера, содержащего 10 mM 1-метилимдазола, 10 mM EDC инкубировали 16 ч при 50°C и перемешивании. Затем раствор удаляли и промывали 3 раза по 300 мкл PBSMT (1х PBS, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% Твин-20).

Моноклональное антитело к ДКК-1 (CloudClone Corp., Китай) иммобилизовали в лунки планшета высокой сорбционной емкости: 100 мкл 10 мкг/мл антитела в 1х PBS инкубировали 16 ч при 4°C, раствор удаляли и промывали 3 раза по 300 мкл PBSMT.

После иммобилизации блокировали поверхность 250 мкл 1% раствора БСА в 1х PBS. Инкубировали 1.5 ч при 25°C и перемешивании, затем промывали 3 раза по 300 мкл PBSMT. Вносили 0-10 нг/мл ДКК-1 в буфере для связывания (1х PBS, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% Твин-20), инкубировали 1 ч при 25°C, раствор удаляли, промывали 3 раза по 300 мкл PBSMT.

В качестве второго компонента использовали конъюгат поликлональных антител с HRP или биотинилированный аптамер.

В первом случае добавляли в лунки по 100 мкл 1:500 разбавленного конъюгата антитела с HRP (CloudClone Corp., Китай) в 1х PBS, 0.05% Твин-20, инкубировали 1 ч при 25°C и перемешивании, после чего раствор удаляли и промывали 5 раз по 300 мкл PBSMT.

Во втором случае добавляли 100 мкл 100 нМ раствора биотинилированного аптамера в PBSMT после фолдинга (95°C – 5 мин, 25°C – не менее 30 мин). Инкубировали 1 ч при 25°C и



перемешивании, промывали по 300 мкл PBSMT 4 раза. Затем вносили по 100 мкл 0.2 мкг/мл конъюгата SA-HRP, инкубировали 1 ч при 25°C и перемешивании, раствор удаляли, промывали 5 раз по 300 мкл PBSMT.

Добавляли раствор 0.2 мг/мл ТМВ в 0.1 М NaOAc, pH 5.2, содержащий 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, инкубировали 20 мин при 25°C до появления стабильной голубой окраски. Для фиксации окраски добавляли 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, инкубировали 1 мин при 25°C и перемешивании для получения равномерной желтой окраски и измеряли оптическую плотность на 450 нм с использованием микропланшетного ридера AMR-100 (All-Sheng).

Для построения калибровочных кривых использовали 4PL-уравнение в рамках программного пакета GraphPad Prism 8.

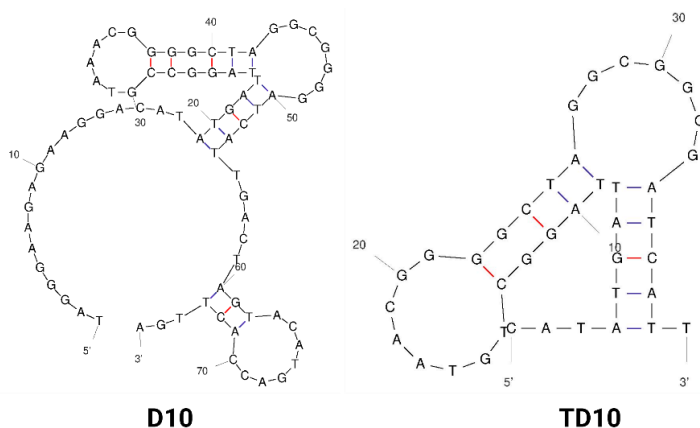
Образцы сывороток больных анкилозирующим спондилитом предоставлены Лабораторией патологии соединительной ткани НИИКЭЛ – Филиала ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Забор крови и все инструментальные исследования проводились после подписания информированного добровольного согласия. Исследование выполнено в соответствии с этическими стандартами, разработанными в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266, а также одобрено локальным этическим комитетом НИИКЭЛ - Филиала ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

Для проведения анализа сывороток образцы разбавляли в 10 раз 1x PBS, для каждого образца проводили 2 параллельных измерения. Для построения калибровочных кривых и расчета концентраций ДКК-1 в образцах сыворотки использовали 4PL-уравнение в рамках пакета сервиса <https://www.myassays.com/four-parameter-logistic-curve.assay>. Для сравнения использовали коммерческий ИФА-набор для определения ДКК-1 (Cloud Clone Corp., Китай).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

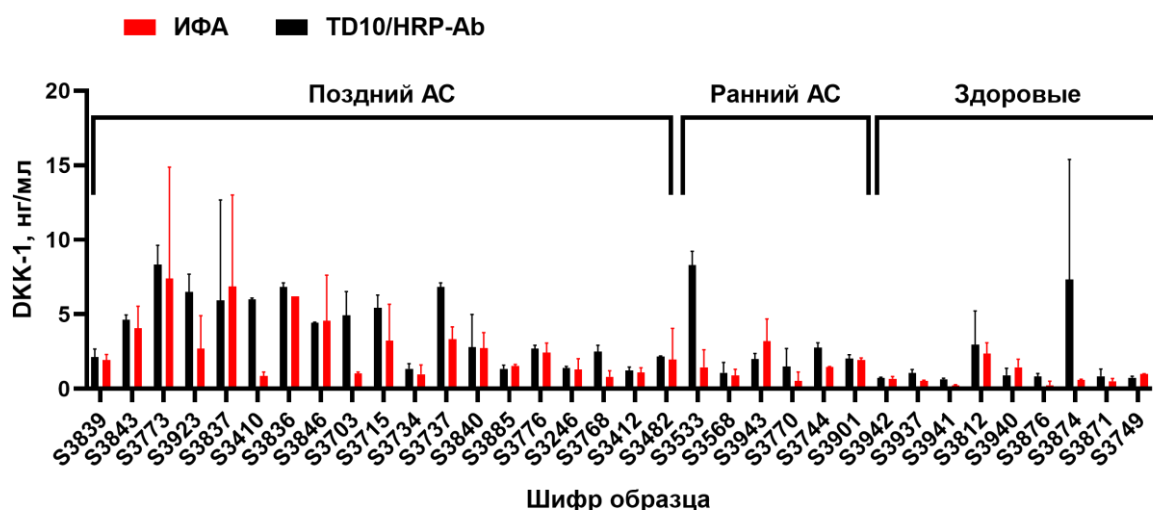
### 1. Литературные аптамеры к ДКК-1

К моменту начала данной работы была опубликована одна статья по селекции ДНК-аптамеров к ДКК-1 и их использованию при создании тест-систем для диагностики гепатоцеллюлярной карциномы [17]. 76-звенный аптамер D10 был получен с использованием метода SELEX, после дополнительной оптимизации и укорочения был получен и охарактеризован 39-звенный оцДНК-аптамер TD10 (рис. 1).



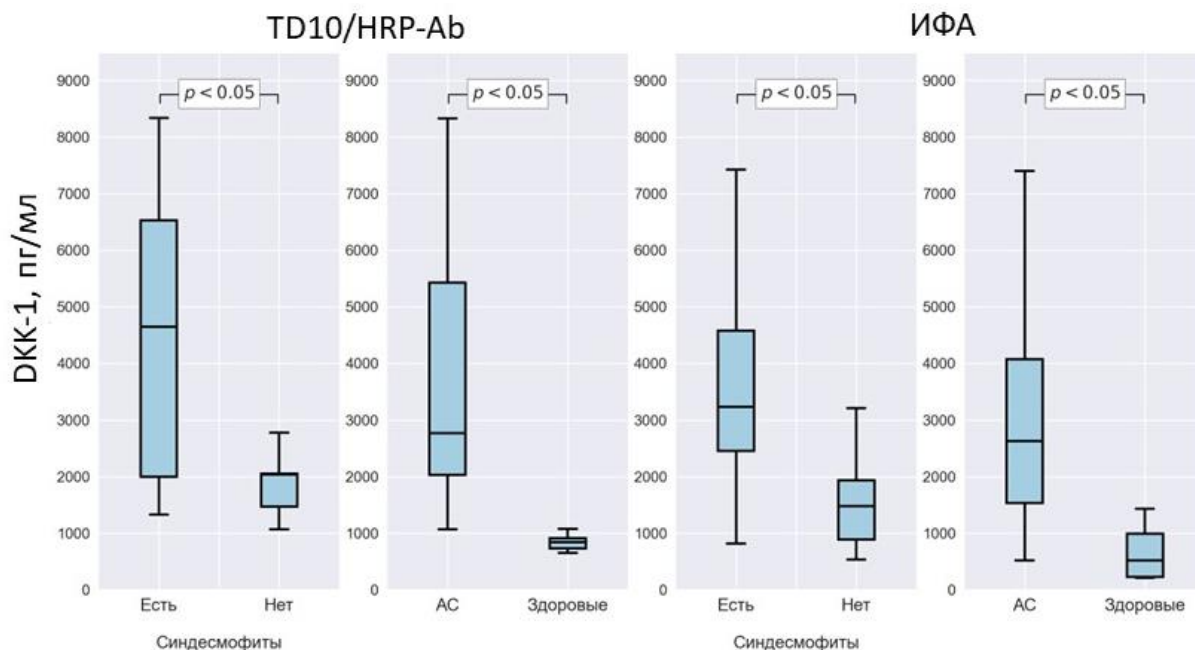
**Рисунок 1.** Вторичные структуры аптмеров D10 и TD10 [17], полученные с использованием программного пакета mfold [20].

На основе аптамера TD10 авторами была предложена ИФА-подобная колориметрическая система детекции ДКК-1 для анализа сывороток пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой [17]. На первом этапе работы мы исследовали возможность использования аптамера TD10 в аналогичном формате для определения уровня ДКК-1 в образцах больных АС на разных стадиях и здоровых доноров. Аптамер ковалентно иммобилизовали в лунки планшета, после добавления аналита в лунки вносили конъюгат антитела к ДКК-1 с пероксидазой хрена. В исследуемую группу вошли: 19 пациентов с АС на поздней стадии заболевания, 6 пациентов с АС на ранней стадии, 9 здоровых доноров.



**Рисунок 2.** Значения концентраций DKK-1 в образцах сыворотки больных анкилозирующим спондилитом и здоровых доноров, полученные с использованием ИФА-набора и колориметрической системы на основе пары TD10/HRP-Ab. Каждый столбец – усредненное значение двух независимых измерений.

Из полученных данных (рис. 2) можно видеть, что система на основе пары TD10/HRP-Ab позволяет получить согласующиеся с традиционным ИФА результаты, и полученные значения концентрации DKK-1 в сыворотках крови лежат в типичном для данного белка диапазоне. Более детальный анализ полученных данных позволил выявить статистически значимое повышение уровня DKK-1 у пациентов с анкилозирующим спондилитом, наличие структурной прогрессии заболевания обуславливало более высокий уровень DKK-1 (рис. 3).



**Рисунок 3.** Уровни сывороточного Dkk-1 у здоровых добровольцев и у пациентов с наличием или отсутствием синдесмофитов, определённые методом аптамер/антитело и ИФА.

Нас интересовала возможность создания колориметрических систем, в которых оба узнающих анализ компонента были бы представлены аптамерами. Поскольку для этого необходимо было получение дополнительных аптамеров к белку DKK-1, мы провели новую селекцию ДНК-аптамеров к белку DKK-1.

## **2. Дизайн библиотеки**

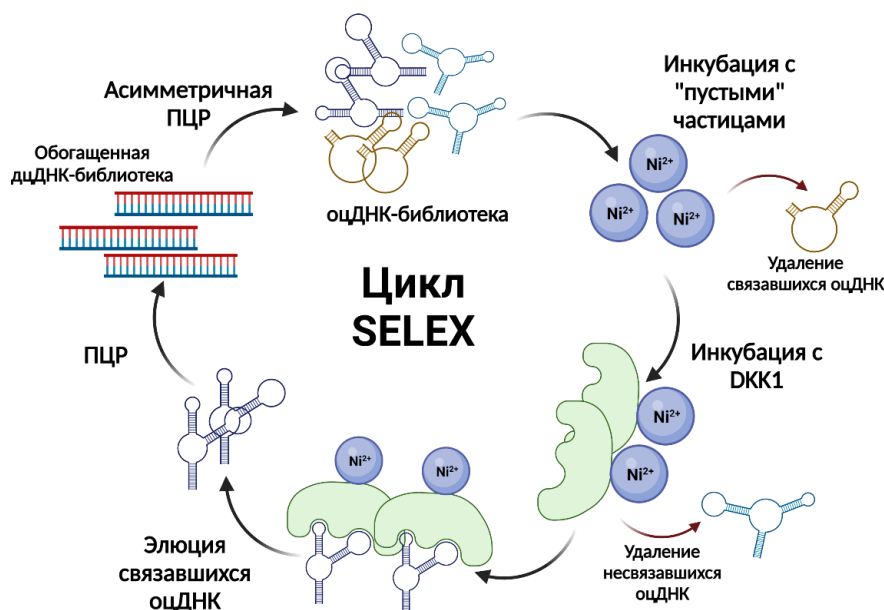
Классическим подходом для получения аптамеров является селекция *in vitro* из комбинаторных библиотек оцДНК или РНК. Комбинаторная библиотека представляет собой набор молекул НК, в которых два константных участка для связывания праймеров фланкируют рандомизированную область. Как правило, в каждой позиции рандомизированной области с равной вероятностью может находиться любой из четырех нуклеотидов. Перспективной с нашей точки зрения стратегией повышения эффективности отбора является использование частично структурированных комбинаторных библиотек или библиотек с предформированными элементами вторичной структуры. Такой подход может повысить эффективность отбора, позволить сократить число раундов селекции и получить аптамеры с большей эффективностью связывания [18].

Для отбора аптамеров к DKK-1 мы адаптировали подход к созданию библиотек с заранее заданными мотивами в рандомизированной области, предложенный Ruff et al. [19]. 40-звенная рандомизированная область комбинаторной библиотеки состояла из участков чередования пиримидиновых и пуриновых нуклеотидов и участков с равномерной рандомизацией (Табл. 1). Позиции Y содержали преимущественно пиримидиновые нуклеотиды, но были допированы при синтезе пуриновыми нуклеотидами, а позиции R содержали преимущественно пуриновые и были допированы пиримидиновыми. Такой дизайн рандомизированной области позволяет повысить вероятность формирования благоприятных для связывания с мишенью пространственных структур при сохранении высокой степени разнообразия.

## **3. Селекция *in vitro***

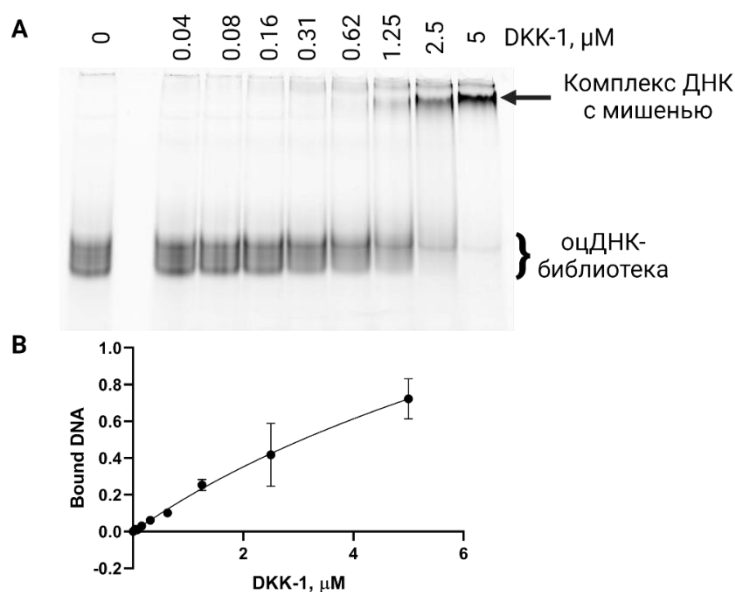
Для получения аптамеров к DKK-1 использовали метод селекции *in vitro* или SELEX – систематическую эволюцию лигандов путем экспоненциального обогащения. Рекомбинантный белок DKK-1 с N-концевым гексагистидиновым фрагментом иммобилизовали на Ni-содержащие магнитные частицы. Для удаления из библиотеки пула ДНК со сродством к носителю использовали контрселекцию на частицы, не нагруженные белком. Каждый раунд селекции включал: контрселекцию, инкубацию с частицами, несущими белок-мишень, элюцию комплексов ДНК-DKK-1 с частиц, амплификацию полученного пула молекул в ПЦР (рис. 4). Для подавления неспецифического связывания

ДНК-библиотеки с белком и носителем в буфер для связывания добавляли ЧСА и polyA.



**Рисунок 4.** Схема цикла селекции аптамеров к DKK-1

Для получения обогащенной оцДНК-библиотеки для следующего раунда использовали асимметричную ПЦР с избытком одного из праймеров. После 4-х раундов селекции оценили обогащение библиотеки оцДНК, способными связывать мишень. Для этого обогащенную оцДНК-библиотеку амплифицировали в присутствии олигонуклеотидного праймера, несущего на 5'-конце флуоресцентный краситель Су5. Полученную Су5-меченую библиотеку использовали для исследования образования комплексов с DKK-1 методом задержки в нативном ПААГ (рис. 5).



**Рисунок 5.** Оценка обогащения библиотеки после 4-х раундов отбора. А – электрофоретическое разделение продуктов комплексообразования Су5-меченной библиотеки с DKK-1, 12% нативный ПААГ (49:1). В – Кривая связывания Су5-меченной библиотеки с DKK-1, полученная с использованием уравнения бимолекулярного

связывания программного пакета GraphPad Prism 8. Каждая точка представляет собой усредненное значение двух независимых экспериментов.

На электрофореграмме с ростом концентрации белка ДКК-1 зафиксировано накопление полос с низкой подвижностью, которые с высокой вероятностью соответствуют ДНК-белковому комплексу. Это указывает на заметное обогащение библиотеки молекулами ДНК, обладающими сродством к мишени, уже после 4-раундов селекции. Как правило, при отборе из равномерно рандомизированных библиотек для этого требуется большее количество раундов отбора. Полученный результат говорит о более высокой эффективности селекции при использовании библиотеки с пурин/пиримидиновыми чередованиями. Для установления состава библиотеки и нуклеотидных последовательностей индивидуальных аптамеров было проведено высокопроизводительное секвенирование библиотеки после 4-го раунда в дцДНК-форме на платформе MiSeq Illumina.

#### 4. Получение и характеристика новых аптамеров к ДКК-1

При анализе результатов секвенирования обогащенной ДНК-библиотеки наблюдается выраженное накопление ограниченного набора последовательностей ДНК, что подтверждает обогащение библиотеки в ходе селекции. 20 наиболее представленных последовательностей составляют 22,5 % от всего пула после 4-х раундов отбора (Табл. 2). Это дополнительно подтверждает эффективность выбранной нами стратегии конструирования библиотеки и *in vitro* селекции.

**Таблица 2.** Результаты секвенирования библиотеки после 4-х раундов отбора

Шифр	Последовательность рандомизированной области	Частота встречаемости, %*
DK1	CATGTATCTGGCTGCTGAGTGTACGATTCCAGTATATATG	2,29
DK2	TGTACCCGCATAGACCCTGCGTCCGCTGTATGTACACGTA	2,17
DK3	CATGACGTTAGGCTGCATCAGTACGATTCCCTACACGCATG	1,84
DK4	AGTGCGTACAGCAAGCACATATGTGCTCTCCAGAGCGTG	1,52
DK5	TGTATGCTGAGCAGGCGCGAGTGGGGACCCCGGGCACG	1,36
DK6	CGTATGAAACGGGGACCCCTATGGGCGTTTGCTATGCACATA	1,24
DK7	CGTGCATACGAGCCGCATGTACACATTCTCTGTATGTACG	1,04
DK8	CACGTGCGAAGTGGTTAACCATGGCCTAGTCCCGCAAGTG	1,01
DK9	CAGGGACACGGGGACCCCTACGGGCGTGTCTCATATACATG	1,00
DK10	CATATATGAGAGCCGCGTAATTATACTCTCTGCATGTATG	0,97
DK11	CGTGCATGTAAGCCGCGTATACATACTCTTCACTTGCACG	0,95
DK12	CGTGGATATAGCCGCAACGTCCATAGTTTCTAGATACACG	0,94
DK13	CACATATGCAGCCGCTGTGTATGCACATCTGACATGTGTG	0,88
DK14	CGGGTGGATAACCAGCTGCGTGTAAACTCTGTGTACCCCG	0,82
DK15	CATGAGTGTGGTTGCCGATGTAATTCAACCCATCCATG	0,82
DK16	CACGTGTATGAAAGCCGCGTATATACTCTTACTTCCGTG	0,80
DK17	CATAGGTATACGCGCTGCGTCTACGCAACGTACACTCATG	0,74

DK18	TACCTGAGCAGGGGTTGGACGGGGACCCTCTGGGCGTACT	0,71
DK19	CACATACGTCAGCCGCATGTGTATACATTCTGTGTTGTG	0,70
DK20	CATATGTCTGCCGGGTCCTTATGGCGGCACGTCTATG	0,67

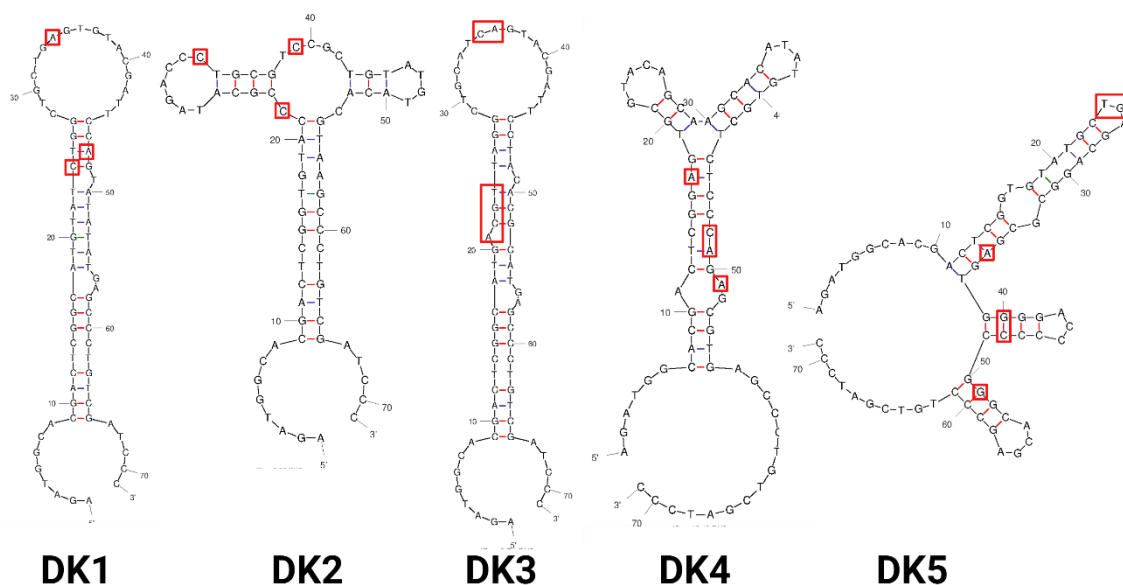
N – нуклеотид, не соответствующий паттерну, красным выделены участки паттерна YR, синим – участки равномерной рандомизации

\* частота встречаемости рассчитана как отношение числа копий ДНК данной нуклеотидной последовательности к общему числу молекул ДНК в отсекованном пуле

С использованием программного пакета mfold [21] были построены наиболее вероятные вторичные структуры 20-ти ДНК, лидирующих в отсекованном пуле. Их анализ выявил сходство элементов структуры, на основании которого мы выделили два структурных семейства. В первое (семейство «1») вошли структуры DK1, DK3, DK7, DK8, DK10-DK17, DK19, DK20: протяженный двуцепочечный фрагмент с петлёй. Во второе семейство (семейство «2») вошли DK2, DK4, DK6, DK9, в структуре которых присутствует менее протяженный двуцепочечный участок и разветвленный структурный элемент three-way junction. В отдельную группу были отнесены структуры DK5 и DK18, для которых не было замечено сходства с семействами «1» и «2» (приложение 1).

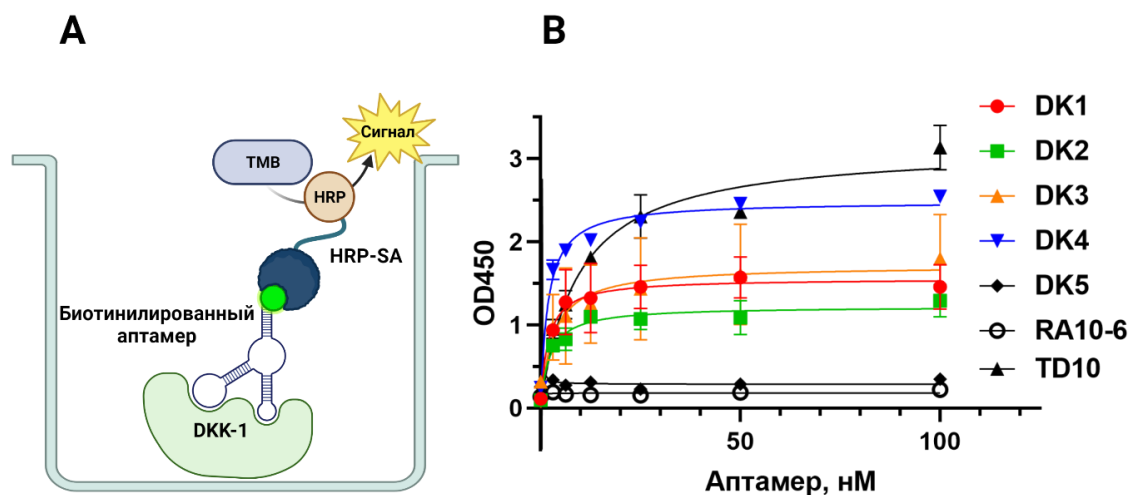
Интересно отметить, что заданный на стадии синтеза ДНК-библиотеки паттерн чередования пиримидиновых и пуриновых нуклеотидов у лидеров отбора в основном сохраняется. При этом 5%-ное допирование пуриновых позиций пиримидиновыми нуклеотидами, а пиримидиновых пуриновыми также играет свою роль в ходе эволюции библиотеки: в ряде позиций оно дает возможность позволяет сменить тип нуклеотида (то есть, реализовать трансверсию). Все лидеры отбора содержали несколько трансверсий, медианное значение количества трансверсий для двадцати наиболее представленных ДНК составило 3.5. Сопоставление нуклеотидных последовательностей и наиболее вероятных вторичных структур показывает, что трансверсии локализованы в различных элементах структуры без каких-либо явных предпочтений. Можно предположить, что появление трансверсии в двуцепочечных участках оптимизирует стабильность ключевых элементов пространственной структуры аптамера, а трансверсии в одноцепочечных участках дают возможность «подстройки» трехмерного интерфейса связывания аптамер-мишень для повышения скорости либо аффинности связывания.

Для химического синтеза и скрининга аффинности были выбраны пять наиболее представленных последовательностей DK1-DK5 (рис. 6). При синтезе в их состав на 3'-конец вводили алифатическую аминогруппу через C18-линкер, чтобы получить возможность введения дополнительных функциональных групп.



**Рисунок 6.** Вторичные структуры аптамеров DK1-5, полученные с использованием программного пакета mfold. Красным обозначены нуклеотиды, несоответствующие паттерну чередования пиримидин-пуринов.

Оценку аффинности кандидатных аптамеров проводили с использованием колориметрического микропланшетного метода, используя белок-мишень, иммобилизованный в лунке планшета, и биотинилированный аптамер (рис. 7А). Предварительно синтезировали конъюгаты аптамеров с биотином с использованием его N-гидроксисукцинимидного эфира. Для сравнения данным методом дополнительно оценивали сродство ранее опубликованного ДНК-аптамера к DKK-1 (TD10). Для контроля специфичности взаимодействия аптамеров с DKK-1 формате использовали аптамер к неродственному белку (рецептору интерлейкина-17 [21]).



**Рисунок 7.** Оценка аффинности аптамеров к DKK-1. А – схема колориметрического микропланшетного метода исследования аффинности. В – кривые связывания аптамеров с DKK-1, полученные с использованием бимолекулярного уравнения связывания в программном пакете GraphPad Prism 8. Каждая точка представляет собой усредненное значение двух независимых экспериментов.



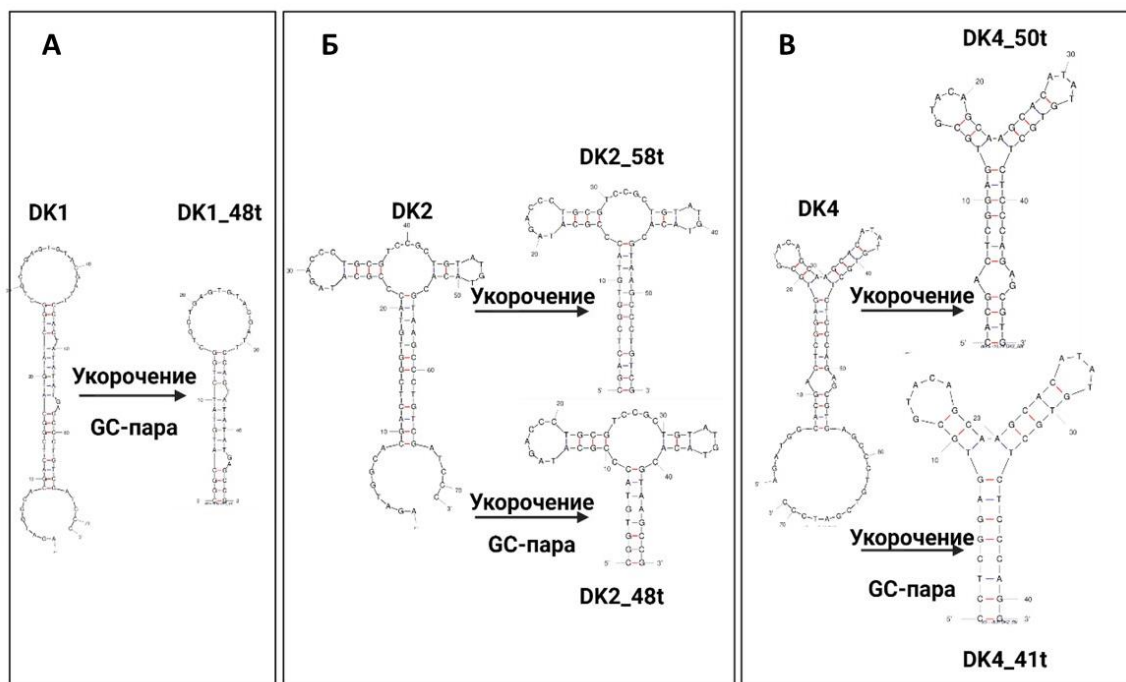
Кривые связывания (рис. 7B) и рассчитанные из них константы диссоциации аптамер-белковых комплексов (Табл. 3) говорят о высоком сродстве аптамеров DK1-DK4 показали высокое сродство к DKK-1 со значениями  $K_d$  в нМ диапазоне. Аптамер DK5, вторичная структура которого по данным моделирования вторичной структуры отличается от остальных, не связывается с мишенью во всем диапазоне концентраций. Контрольный ДНК-аптамер к неродственному белку IL-17 (RA10-6) также не проявил никакого сродства к DKK-1, что подтверждает специфичность связывания целевых аптамеров. Для ранее опубликованного ДНК-аптамера TD10 значение  $K_d$  составило около 7 нМ, то есть полученные нами аптамеры демонстрируют сопоставимую с литературным и даже несколько более высокую аффинность к мишени.

**Таблица 3.** Значения констант диссоциации аптамеров к DKK-1

Шифр	$K_d$ , нМ
DK1	1.3±1
DK2	1.8±1
DK3	3.7±3
DK4	1.8±0.5
TD10	7±5

## 5. Оптимизация нуклеотидной последовательности

На данный момент не существует универсального общепринятого алгоритма оптимизации нуклеотидной последовательности и модификации аптамеров после селекции. Рациональный дизайн - выявление ключевых для связывания с мишенью фрагментов нуклеотидной последовательности и структурных элементов - остается задачей, решение которой индивидуально для каждого аптамера. Укорочение аптамеров позволяет сделать их химический синтез более быстрым и экономичным, в ряде случаев оно дополнительно повышает специфичность связывания и снижает вероятность образования непродуктивных вторичных структур. Нашей задачей при модификации нуклеотидных последовательностей аптамеров было сохранение центрального элемента структуры (stem-loop или three-way junction) при максимальном сокращении длины за счет удаления концевых одноцепочечных участков и укорочения двуцепочечных фрагментов (рис. 8). Для стабилизации вторичной структуры в ряде случаев в состав аптамера вводили дополнительную GC-пару.



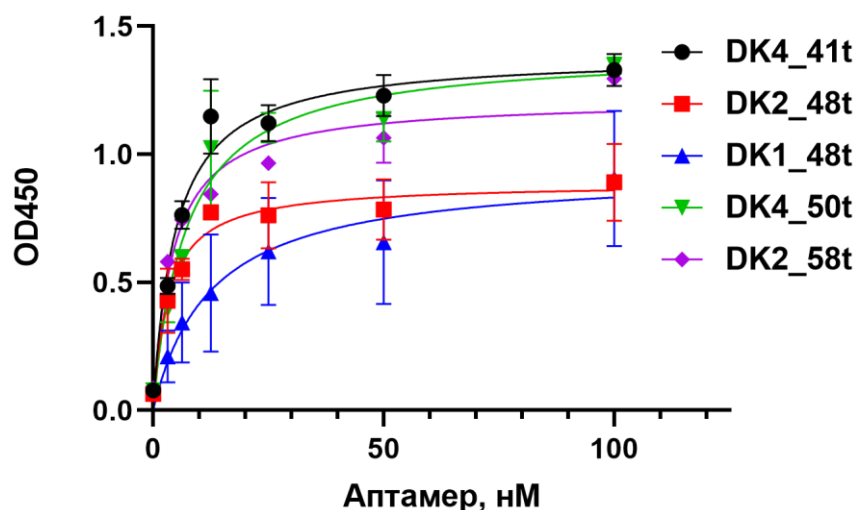
**Рисунок 8.** Схема оптимизации нуклеотидной последовательности аптамеров к DKK-1: DK1 (А), DK2 (Б), DK4 (В)

На основе анализа наиболее вероятной вторичной структуры аптамеров DK1, DK2 и DK4 с использованием рационального дизайна была предложена серия укороченных вариантов для химического синтеза и скрининга аффинности (Табл. 4).

**Таблица 4.** Нуклеотидные последовательности укороченных вариантов аптамеров к DKK-1

Аптамер	Последовательность
DK1_48t	CGGCATGTATCTGGCTGCTGAGTGTACGATTCAGTATATATGAGCCG
DK2_58t	C G A C T C G G T G T A C C C G C A T A G A C C C T G C G T C C G C T G T A T G T A C A C G T A A G C C C T G T C G
DK2_48t	C G G T G T A C C C G C A T A G A C C C T G C G T C C G C T G T A T G T A C A C G T A A G C C G
DK4_50t	C A C G A C T C G G A G T G C G T A C A G C A A G C A C A T A T G T G C T C T C C C A G A G C G T G
DK4_41t	C C T C G G A G T G C G T A C A G C A A G C A C A T A T G T G C T C T C C C A G G

Для оценки их аффинности использовали описанный выше колориметрический микропланшетный метод (рис. 9). Предварительно были синтезированы конъюгаты укороченных вариантов аптамеров с биотином. Все пять укороченных аптамеров DK1\_48t, DK2\_48t, DK2\_58t, DK4\_50t, DK4\_41t сохранили высокую аффинность к DKK-1 с незначительным увеличением значений констант диссоциации по сравнению с полноразмерными вариантами аптамеров (Табл. 5).



**Рисунок 9.** Оценка аффинности укороченных аптамеров к DKK-1. Кривые связывания аптамеров с DKK-1, полученные с использованием бимолекулярного уравнения связывания в программном пакете GraphPad Prism 8. Каждая точка представляет собой усредненное значение двух независимых экспериментов.

**Таблица 5.** Значения констант диссоциации укороченных вариантов аптамеров

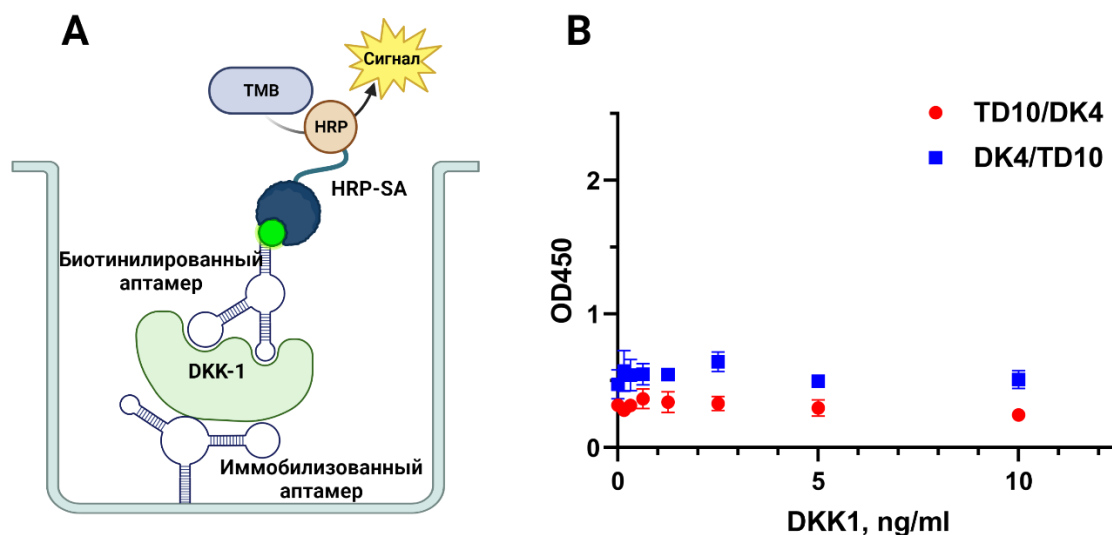
Шифр	$K_d$ , нМ
DK1_48t	$10 \pm 6$
DK2_58t	$3.6 \pm 2$
DK2_48t	$3.3 \pm 2$
DK4_50t	$6.1 \pm 2$
DK4_41t	$5.6 \pm 3$

## 6. Конструирование колориметрической системы детекции DKK-1 на основе аптамеров

Аптамер DK4 был выбран для конструирования и тестирования различных вариантов сэндвич-систем детекции DKK-1 из-за достаточно высокой аффинности и наибольшей амплитуды колориметрического сигнала при использовании микропланшетного варианта оценки сродства к мишени. В качестве второго компонента использовали аптамер TD10 или специфичные к DKK-1 антитела. При тестировании систем детекции мы ориентировались на диапазон концентраций DKK-1 0-10 нг/мл, поскольку именно такой диапазон используют в стандартных наборах для определения DKK-1 в сыворотке методом ИФА с предварительным 10-кратным разведением сыворотки перед анализом.

В первом варианте системы аптамер DK4 или TD10 ковалентно иммобилизовали на поверхность карбокси-модифицированного планшета через концевую аминогруппу по

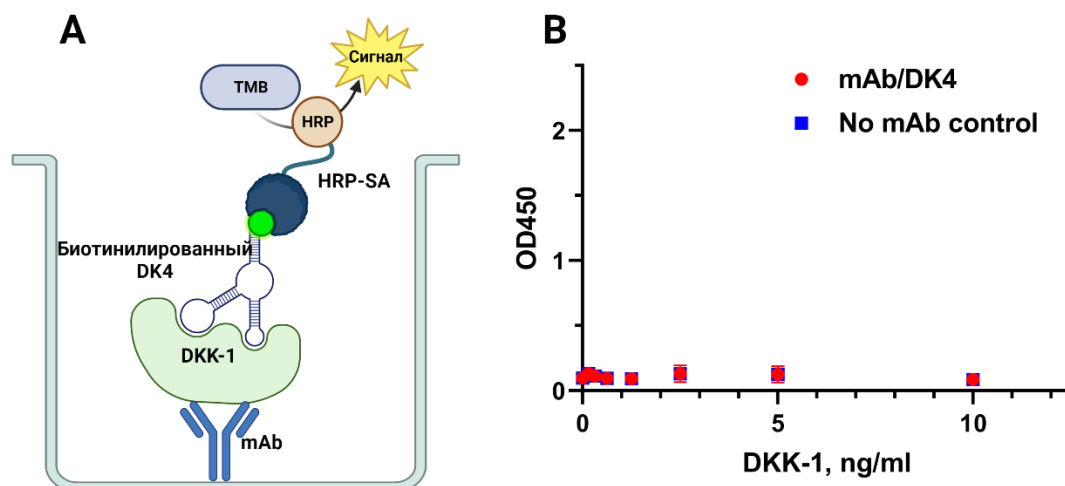
реакции карбодимидной конденсации. В качестве второго компонента сэндвича использовали биотинилированный аптамер - соответственно, TD10 или DK4 (рис. 10А). Для получения колориметрического сигнала использовали реакцию окисления ТМВ пероксидазой хрена.



**Рисунок 10.** Колориметрическая сэндвич-детекция DKK-1 в микропланшетном варианте в формате аптамер/аптамер. А – схема колориметрической сэндвич-системы детекции DKK-1. В – Зависимость колориметрического сигнала от концентрации DKK-1. Каждая точка представляет собой усредненное значение двух независимых экспериментов.

Для сэндвич-пары аптамер/аптамер мы не наблюдали роста оптической плотности с увеличением концентрации белка-аналита (рис. 10В), независимо от того, который из аптамеров был иммобилизован на поверхности, а который выступал в качестве репортерного компонента. Можно предположить, что участки узнавания и связывания на поверхности DKK-1 аптамеров TD10 и DK4 полностью или частично перекрываются. Поэтому после связывания DKK-1 с аптамером на поверхности планшета, сайт связывания становится недоступен для второго аптамера.

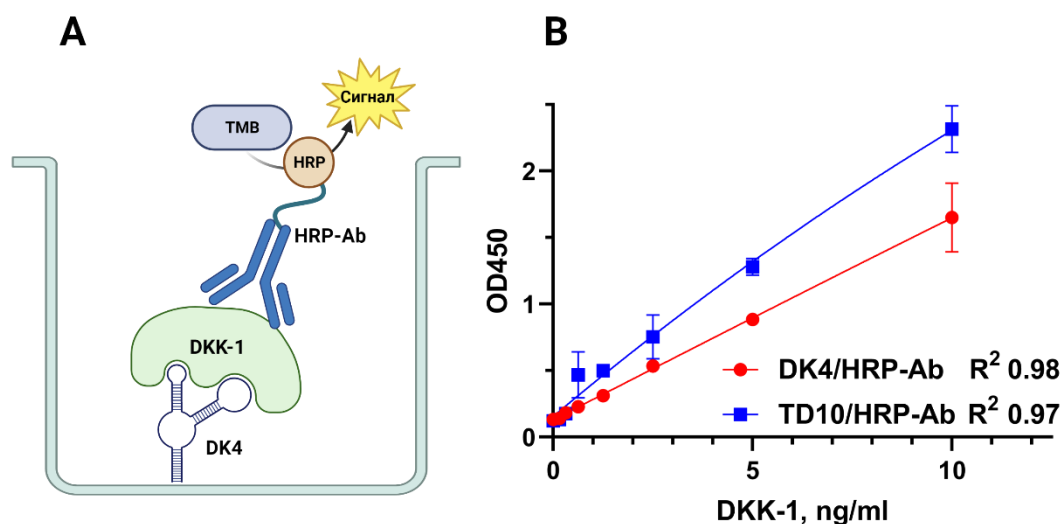
Для следующего варианта колориметрической детекции DKK-1 моноклональное антитело к DKK-1 нековалентно иммобилизовали на поверхность планшета высокой сорбционной емкости для связывания белка-мишени. Биотинилированный аптамер DK4 использовали для связывания конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена и получения колориметрического сигнала (рис. 11А).



**Рисунок 11.** Колориметрическая сэндвич-детекция DKK-1 в микропланшетном варианте в формате антитело/аптамер. А – схема колориметрической сэндвич-системы детекции DKK-1. В – Зависимость колориметрического сигнала от концентрации DKK-1. Каждая точка представляет собой усредненное значение двух независимых экспериментов.

Для такого варианта колориметрической детекции также не удалось получить стабильной зависимости колориметрического сигнала от концентрации белка DKK-1 (рис. 11В). Причиной этого может быть частичная денатурация антитела при взаимодействии с планшетом либо стерическая недоступность сайта связывания белка после иммобилизации антитела.

В третьем варианте колориметрической детекции DKK-1 аптамер DK4 ковалентно иммобилизовали на поверхность планшета, а для получения колориметрического сигнала использовали конъюгат антитела к DKK-1 с пероксидазой хрена (рис. 12А).



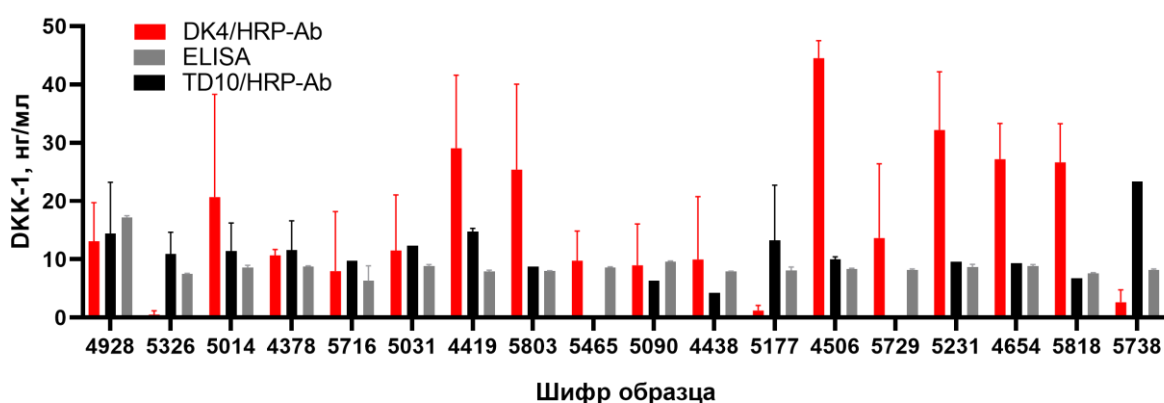
**Рисунок 12.** Колориметрическая сэндвич-детекция DKK-1 в микропланшетном варианте в формате аптамер/антитело. А – схема колориметрической сэндвич-системы детекции DKK-1. В – Зависимость колориметрического сигнала от концентрации DKK-1. Для аппроксимации данных использовали 4PL-уравнение в программном пакете GraphPad Prism 8. Каждая точка представляет собой усредненное значение двух независимых экспериментов.

В таком варианте была получен стабильный рост оптической плотности при увеличении концентрации ДКК-1 (рис. 12В). Для сравнения в таком же формате был протестирован ранее опубликованный аптамер TD10. Оба аптамера показали достаточно высокую интенсивность сигнала на высокой концентрации белка и равномерное увеличение значений оптической плотности при увеличении концентрации аналита.

## 7. Колориметрическое определение ДКК-1 в образцах больных анкилозирующим спондилитом

Система аптамер/антитело на основе аптамера DK4, и конъюгата антитела к ДКК-1 с пероксидазой хрена была протестирована при анализе реальных биологических образцов - сывороток крови от пациентов с анкилозирующим спондилитом. В качестве контроля использовали коммерческий ИФА набор для определения ДКК-1, для сравнения была использована также система аптамер/антитело с аптамером TD10. В исследуемую группу вошли 18 образца сыворотки больных анкилозирующим спондилитом на ранней и развернутой стадии заболевания. Этот этап течения болезни является ключевым для определения направления ее дальнейшего развития и выбора терапевтической стратегии.

Образцы сыворотки для проведения анализа разбавляли в 10 раз 1x PBS, по аналогии с протоколом анализа коммерческим ИФА-набором. Для расчета значений концентраций из оптической плотности использовали 4PL-калибровочную кривую программного пакета сервиса myassays.com.



**Рисунок 13.** Значения концентраций ДКК-1 в образцах сыворотки больных анкилозирующим спондилитом, полученные с использованием ИФА-набора и колориметрических систем на основе пар DK4/HRP-Ab и TD10/HRP-Ab. Каждый столбец представляет собой усредненное значение двух независимых измерений.

Из полученных данных (рис. 13) можно заключить, что значения концентраций ДКК-1, полученные с использованием всех трех систем, лежат в характерном для этого белка диапазоне и в целом согласуются между собой. Но для ряда образцов заметно

различие между значениями, полученными разными тест-системами. Из этого можно заключить, что хотя система на основе аптамера и конъюгата антитела с HRP требует дальнейшей оптимизации и тестирования на больших по размеру выборках образцов от пациентов с АС и здоровых доноров, она принципиально подходит для определения уровня ДКК-1 в образцах сыворотки при анкилозирующем спондилите.

## ВЫВОДЫ

1. Показана возможность использования комбинаторной ДНК-библиотеки с 40-звенной случайной областью, содержащей регулярные пурин-пиримидиновые мотивы, для *in vitro* селекции аптамеров к белку Dickkopf-1 человека. Показано, что выбранный дизайн случайной области позволяет добиться значительного обогащения ДНК-библиотеки целевыми аптамерами уже после четырех раундов отбора. При этом, как правило, наблюдается несколько отклонений от основного паттерна случайной области за счет появления трансверсий.
2. Получены и охарактеризованы новые 71-нуклеотидные ДНК-аптамеры DK1, DK2, DK3, DK4 с высоким сродством к белку DKK-1 с константами диссоциации аптамер-белок в диапазоне 1-3 нМ. С использованием рационального дизайна нуклеотидных последовательностей получена серия укороченных до 41-50 нуклеотидов ДНК-аптамеров к белку DKK-1. Показано, что при укорочении аптамеры сохраняют высокую аффинность к DKK-1 с константами диссоциации 3 - 10 нМ.
3. На основе аптамера DK4, ранее опубликованного аптамера TD10 и антител сконструированы и протестированы три варианта колориметрической сэндвич-системы детекции DKK-1. Показано, что только система формата аптамер/антитело с ковалентно иммобилизованным в лунках планшета аптамером дает возможность количественного определения концентрации DKK-1 в модельных условиях в диапазоне 0.156-10 нг/мл. С использованием сэндвич-систем на основе пары аптамер/антитело с аптамерами DK4 и TD10 проанализированы серии сывороток крови больных анкилозирующим спондилитом и здоровых доноров. Показана, принципиальная применимость данных систем для количественного определения уровня DKK-1 в сыворотке.

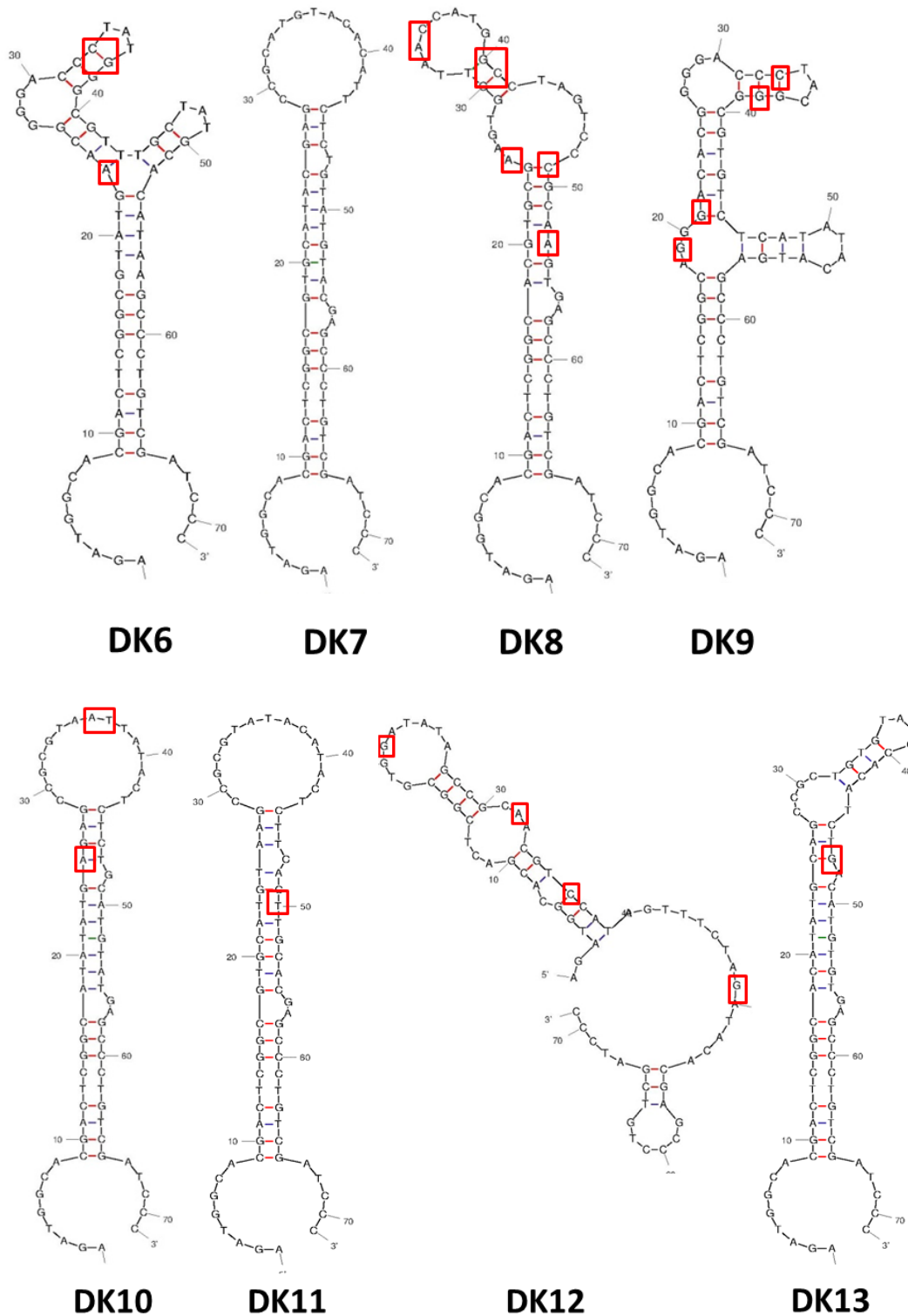


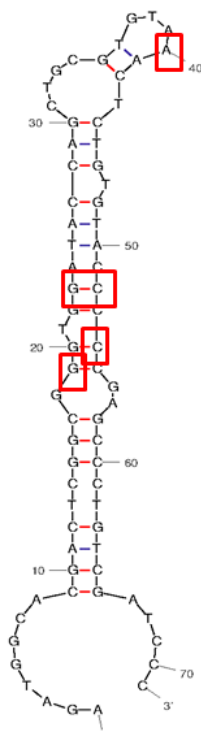
## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaur H. et al. Aptamers in the Therapeutics and Diagnostics Pipelines // *Theranostics*. *Theranostics*, 2018. Vol. 8, № 15. P. 4016–4032.
2. Byun J. Recent Progress and Opportunities for Nucleic Acid Aptamers // *Life (Basel)*. *Life (Basel)*, 2021. Vol. 11, № 3. P. 1–18.
3. Shraim A.S. et al. Therapeutic Potential of Aptamer-Protein Interactions // *ACS Pharmacol Transl Sci*. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2022. Vol. 5, № 12. P. 1211–1227.
4. He S. et al. Advances in aptamer-mediated targeted delivery system for cancer treatment // *Int J Biol Macromol*. *Int J Biol Macromol*, 2023. Vol. 238.
5. Xu R. et al. Recent Advances in Biomolecular Detection Based on Aptamers and Nanoparticles // *Biosensors (Basel)*. *Biosensors (Basel)*, 2023. Vol. 13, № 4.
6. Kara N. et al. Aptamers Targeting Membrane Proteins for Sensor and Diagnostic Applications // *Molecules*. *Molecules*, 2023. Vol. 28, № 9.
7. Behzad F. et al. Recent advances in gold nanoparticle-based colorimetric aptasensors for chemical and biological analyses // *Bioanalysis*. *Bioanalysis*, 2022. Vol. 14, № 23. P. 1509–1524.
8. Davydova A., Vorobyeva M. Aptamer-Based Biosensors for the Colorimetric Detection of Blood Biomarkers: Paving the Way to Clinical Laboratory Testing // *Biomedicines*. *Biomedicines*, 2022. Vol. 10, № 7.
9. Rhouati A., Rhouati A., Marty J.L. A Review on Aptamers Selection and Application in Heart Diseases Diagnosis // *Curr Top Med Chem*. *Curr Top Med Chem*, 2022. Vol. 22, № 30. P. 2463–2473.
10. Hu X. et al. Aptamer-Based Probes for Cancer Diagnostics and Treatment // *Life (Basel)*. *Life (Basel)*, 2022. Vol. 12, № 11.
11. Chen J. et al. Aptamers: A prospective tool for infectious diseases diagnosis // *J Clin Lab Anal*. *John Wiley & Sons, Ltd*, 2022. Vol. 36, № 11. P. e24725.
12. Shatunova E.A. et al. Aptamers for Proteins Associated with Rheumatic Diseases: Progress, Challenges, and Prospects of Diagnostic and Therapeutic Applications // *Biomedicines*. *Biomedicines*, 2020. Vol. 8, № 11. P. 1–44.
13. Yuliasih Y. et al. The Increasing Level of DKK-1 as a New Bone Formation Factor in Patients with Early Spondyloarthritis // *Autoimmune Dis*. *Autoimmune Dis*, 2023. Vol. 2023.
14. Daoussis D., Andonopoulos A.P. The emerging role of Dickkopf-1 in bone biology: is it the main switch controlling bone and joint remodeling? // *Semin Arthritis Rheum*. *Semin Arthritis Rheum*, 2011. Vol. 41, № 2. P. 170–177.
15. Weller M.G. Quality Issues of Research Antibodies // *Anal Chem Insights*. *Anal Chem Insights*, 2016. Vol. 11, № 11. P. 21–27.
16. Arshavsky-Graham S. et al. Aptasensors versus immunosensors—Which will prevail? // *Eng Life Sci*. *John Wiley & Sons, Ltd*, 2022. Vol. 22, № 3–4. P. 319–333.
17. Zhou Y. et al. Developing slow-off dickkopf-1 aptamers for early-diagnosis of hepatocellular carcinoma // *Talanta*. *Elsevier B.V.*, 2019. Vol. 194, № September 2018. P. 422–429.
18. Vorobyeva M.A. et al. Key Aspects of Nucleic Acid Library Design for in Vitro Selection // *Int J Mol Sci*. *Int J Mol Sci*, 2018. Vol. 19, № 2.
19. Ruff K.M., Snyder T.M., Liu D.R. Enhanced functional potential of nucleic acid aptamer libraries patterned to increase secondary structure // *J Am Chem Soc*. *J Am Chem Soc*, 2010. Vol. 132, № 27. P. 9453–9464.
20. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // *Nucleic Acids Res*. *Nucleic Acids Res*, 2003. Vol. 31, № 13. P. 3406–3415.
21. Chen L. et al. IL-17RA aptamer-mediated repression of IL-6 inhibits synovium inflammation in a murine model of osteoarthritis // *Osteoarthritis Cartilage*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2011. Vol. 19, № 6. P. 711–718.

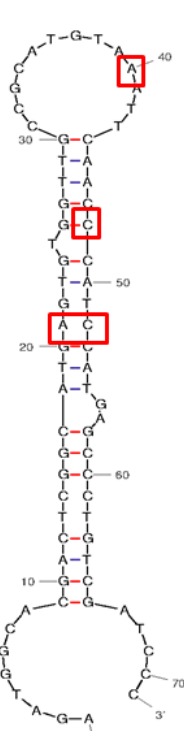
## Приложение 1.

Наиболее вероятные вторичные структуры аптамеров DK6 - DK20, полученные с использованием программного пакета mfold [20]. Красным обозначены нуклеотиды, не соответствующие паттерну чередования пиримидин-пурин.

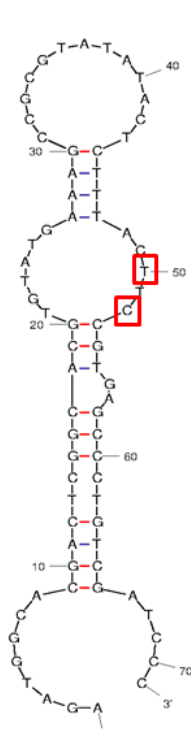




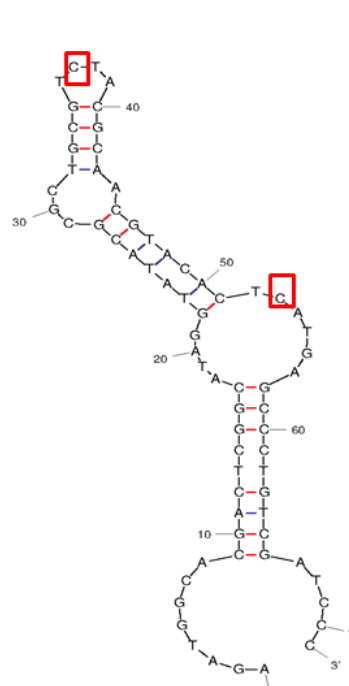
**DK14**



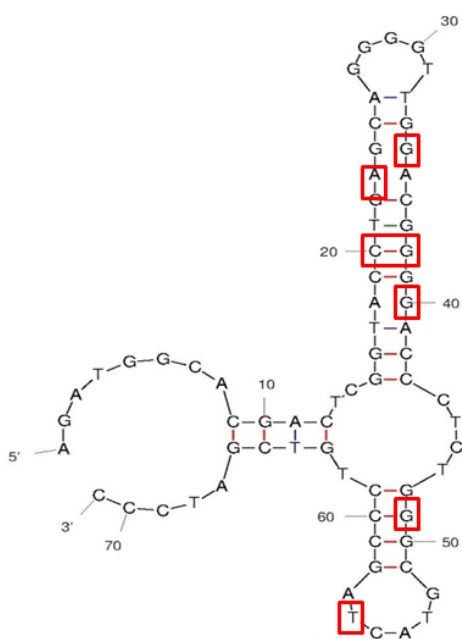
**DK15**



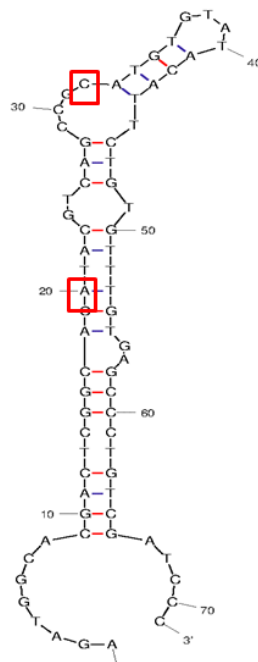
**DK16**



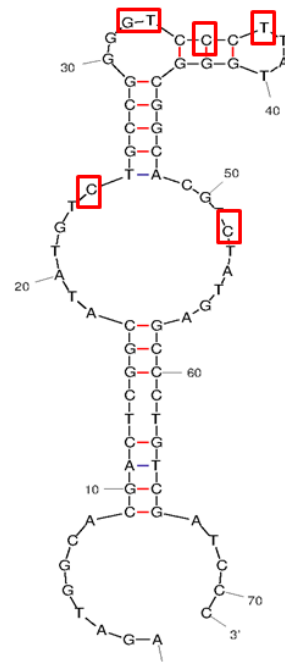
**DK17**



**DK18**



**DK19**



**DK20**

# Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: Шатунова Елизавета Андреевна

Проверяющий: Гапонова Светлана Константиновна

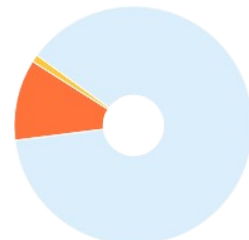
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://users.antiplagiat.ru>

## ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 17  
 Начало загрузки: 11.09.2023 13:16:45  
 Длительность загрузки: 00:00:50  
 Имя исходного файла:  
 Научный\_Доклад\_Шатунова\_без\_ссылок.docx  
 Название документа:  
 Научный\_Доклад\_Шатунова\_без\_ссылок  
 Размер текста: 42 кБ  
 Символов в тексте: 43481  
 Слов в тексте: 5430  
 Число предложений: 282  
 Способ извлечения текста: OCR

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Начало проверки: 11.09.2023 13:17:35  
 Длительность проверки: 00:01:17  
 Комментарии: не указано  
 Поиск с учетом редактирования: да  
 Модули поиска: ИПС Адилет, Библиография, Сводная коллекция ЭБС, Интернет Плюс\*, Сводная коллекция РГБ, Цитирование, Переводные заимствования (RuEn), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (KkRu), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (KyRu), Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика, Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Переводные заимствования по Интернету (EnRu), Переводные заимствования по Интернету (KkRu), Переводные заимствования по Интернету (KyRu), Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Переводные заимствования (KkEn), Переводные заимствования (KyEn), Переводные заимствования издательства Wiley, eLIBRARY.RU, СПС ГАРАНТ: аналитика, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, IEEE, Медицина, Диссертации НББ, Коллекция НБУ, Перефразирования по eLIBRARY.RU, Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика, Перефразирования по Интернету, Перефразирования по Интернету (EN), Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Перефразирования по коллекции издательства Wiley, Патенты СССР, РФ, СНГ, СМИ России и СНГ, Шаблонные фразы, Кольцо вузов, Издательство Wiley, Переводные заимствования



### СОВПАДЕНИЯ

10,95%

### САМОЦИТИРОВАНИЯ

1,2%

### ЦИТИРОВАНИЯ

0%

### ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

87,85%

**Совпадения** — фрагменты проверяемого текста, полностью или частично сходные с найденными источниками, за исключением фрагментов, которые система отнесла к цитированию или самоцитированию. Показатель «Совпадения» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к совпадениям, в общем объеме текста.

**Самоцитирования** — фрагменты проверяемого текста, совпадающие или почти совпадающие с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа. Показатель «Самоцитирования» — это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.

**Цитирования** — фрагменты проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнесла к корректно оформленным. К цитированиям относятся также шаблонные фразы; библиография; фрагменты текста, найденные модулем поиска «СПС Гарант: нормативно-правовая документация». Показатель «Цитирования» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к цитированию, в общем объеме текста.

**Текстовое пересечение** — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.

**Источник** — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.

**Оригинальный текст** — фрагменты проверяемого текста, не обнаруженные ни в одном источнике и не отмеченные ни одним из модулей поиска. Показатель «Оригинальность» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к оригинальному тексту, в общем объеме текста.

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

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

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте	Комментарии
[01]	6,11%	5,15%	Рычкова А. С. 18405с	05 Июн 2023	Кольцо вузов	14	15	
[02]	3,51%	2,87%	Давыдова, Анна Сергеевна Новые мо... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	21 Сен 2021	Сводная коллекция РГБ	11	14	
[03]	1,46%	0,34%	Ковалева, Елена Васильевна "Используй... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	28 Янв 2020	Сводная коллекция РГБ	1	4	
[04]	1,38%	0%	<a href="https://www.actabiomedica.ru/jour/iss...">https://www.actabiomedica.ru/jour/iss...</a> <a href="https://actabiomedica.ru">https://actabiomedica.ru</a>	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	5	
[05]	1,38%	0%	Том 6, № 1 (2021) <a href="https://actabiomedica.ru">https://actabiomedica.ru</a>	02 Апр 2021	Интернет Плюс*	0	5	
[06]	1,35%	0%	Том 10, № 4 (2021) <a href="https://nii-kpssz.com">https://nii-kpssz.com</a>	23 Дек 2021	Интернет Плюс*	0	6	
[07]	1,29%	0,45%	Шушарин, Алексей Геннадьевич Кли... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	27 Дек 2019	Сводная коллекция РГБ	1	3	
[08]	1,27%	1,27%	Получение высокоаффинных ДНК ап... <a href="https://core.ac.uk">https://core.ac.uk</a>	21 Янв 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	2	2	

[09]	1,25%	0,06%	Том 34, № 4 (2019) <a href="https://cardiotomsk.elpub.ru">https://cardiotomsk.elpub.ru</a>	22 Янв 2020	Интернет Плюс*	1	7	
[10]	1,2%	1,2%	Клинико-диагностическое значение у... <a href="https://elibrary.ru">https://elibrary.ru</a>	17 Июл 2022	eLIBRARY.RU	3	3	
[11]	1,07%	0,11%	ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА, ... <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	20 Мар 2020	eLIBRARY.RU	1	2	
[12]	1,07%	0,32%	BMF-2019_final_compressed.pdf <a href="https://cnmt.ru">https://cnmt.ru</a>	25 Мая 2021	Интернет Плюс*	3	8	
[13]	1,03%	0,38%	Андреева, Евгения Александровна Им... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	21 Сен 2021	Сводная коллекция РГБ	1	1	
[14]	0,93%	0%	<a href="http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch...">http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch...</a> <a href="http://niboch.nsc.ru">http://niboch.nsc.ru</a>	01 Сен 2022	Интернет Плюс*	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[15]	0,89%	0%	не указано	13 Янв 2022	Шаблонные фразы	0	10	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[16]	0,88%	0%	Семейный случай редкого аутовоспа... <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	01 Янв 2023	eLIBRARY.RU	0	1	
[17]	0,87%	0%	<a href="http://ibmc.msk.ru/content/thesisDocs...">http://ibmc.msk.ru/content/thesisDocs...</a> <a href="http://ibmc.msk.ru">http://ibmc.msk.ru</a>	08 Июн 2021	Интернет Плюс*	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[18]	0,86%	0%	Т. 2 <a href="http://emll.ru">http://emll.ru</a>	08 Июл 2017	Медицина	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[19]	0,82%	0%	СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ФУНКЦИО... <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	01 Янв 2020	eLIBRARY.RU	0	1	
[20]	0,79%	0%	КОСТНАЯ АУТОПЛАСТИКА КРЫШИ ВЕ... <a href="http://poly-trauma.ru">http://poly-trauma.ru</a>	10 Мар 2020	Интернет Плюс*	0	2	
[21]	0,78%	0%	Прием статей <a href="https://bulletin.tomsk.ru">https://bulletin.tomsk.ru</a>	17 Янв 2021	Интернет Плюс*	0	1	
[22]	0,78%	0%	Прием статей <a href="https://pharmjournal.ru">https://pharmjournal.ru</a>	04 Июн 2019	Интернет Плюс*	0	1	
[23]	0,78%	0%	Особенности кишечной микробиоты... <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	01 Янв 2023	eLIBRARY.RU	0	1	
[24]	0,78%	0%	Меднова, Ирина Андреевна Клинико-... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	01 Янв 2020	Сводная коллекция РГБ	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[25]	0,77%	0%	Совершенствование ультразвуковог... <a href="http://emll.ru">http://emll.ru</a>	28 Апр 2017	Медицина	0	1	
[26]	0,77%	0%	<a href="https://www.volgmed.ru/uploads/journ...">https://www.volgmed.ru/uploads/journ...</a> <a href="https://volgmed.ru">https://volgmed.ru</a>	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	2	
[27]	0,76%	0%	Павлова, Гера Алексеевна Роль белко... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	01 Янв 2020	Сводная коллекция РГБ	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[28]	0,76%	0%	Иценко, Евгения Николаевна диссерт... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	20 Янв 2010	Сводная коллекция РГБ	0	1	
[29]	0,75%	0%	<a href="https://mine-med.ru/archive/polytravm...">https://mine-med.ru/archive/polytravm...</a> <a href="https://mine-med.ru">https://mine-med.ru</a>	13 Фев 2020	Интернет Плюс*	0	2	
[30]	0,75%	0%	Постановление Правительства Новос... <a href="http://ivo.garant.ru">http://ivo.garant.ru</a>	29 Дек 2019	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[31]	0,74%	0%	Т. 11, № 3 <a href="http://emll.ru">http://emll.ru</a>	21 Дек 2016	Медицина	0	1	
[32]	0,74%	0%	№ 2, июнь <a href="http://emll.ru">http://emll.ru</a>	28 Апр 2017	Медицина	0	1	
[33]	0,73%	0%	Т. 27, № 4 <a href="http://emll.ru">http://emll.ru</a>	21 Дек 2016	Медицина	0	1	
[34]	0,71%	0%	ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ МАТР... <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	16 Июл 2018	eLIBRARY.RU	0	1	
[35]	0,7%	0%	Белов Д.В, Наркевич А.Н., Абрамовск...	25 Мая 2023	Кольцо вузов	0	1	
[36]	0,69%	0%	<a href="https://bionanomed.sfedu.ru/assets/fil...">https://bionanomed.sfedu.ru/assets/fil...</a> <a href="https://bionanomed.sfedu.ru">https://bionanomed.sfedu.ru</a>	22 Мар 2022	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[37]	0,68%	0%	Фундаментальные исследования. № 7... <a href="http://bibliorossica.com">http://bibliorossica.com</a>	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	
[38]	0,68%	0%	Вестник Кемеровского государственн... <a href="http://bibliorossica.com">http://bibliorossica.com</a>	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	
[39]	0,68%	0%	277006 <a href="http://biblioclub.ru">http://biblioclub.ru</a>	20 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	
[40]	0,68%	0%	Механизмы формирования резистен... <a href="https://ivrach.ru">https://ivrach.ru</a>	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	7	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[41]	0,67%	0%	222688 <a href="http://biblioclub.ru">http://biblioclub.ru</a>	19 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	
[42]	0,64%	0%	Оценка функционального состояния ... <a href="http://medlinks.ru">http://medlinks.ru</a>	15 Мар 2021	СМИ России и СНГ	0	1	
[43]	0,63%	0%	<a href="https://mdpi-res.com/d_attachment/bi...">https://mdpi-res.com/d_attachment/bi...</a> <a href="https://mdpi-res.com">https://mdpi-res.com</a>	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[44]	0,63%	0%	Давыдов, Евгений Леонардович Науч... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	12 Окт 2017	Сводная коллекция РГБ	0	1	
[45]	0,61%	0%	Полный текст диссертации (размеще... <a href="http://kemcardio.ru">http://kemcardio.ru</a>	23 Апр 2020	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[46]	0,61%	0%	Способ оценки нарушения микровяз... <a href="http://findpatent.ru">http://findpatent.ru</a>	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	
[47]	0,61%	0%	Решение Советского районного суда ... <a href="http://arbitr.garant.ru">http://arbitr.garant.ru</a>	24 Сен 2016	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[48]	0,6%	0%	Диплом_Прохоренко.docx	04 Июн 2023	Кольцо вузов	0	1	
[49]	0,59%	0%	ru:education:postgraduate:students:сп... <a href="http://niboch.nsc.ru">http://niboch.nsc.ru</a>	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[50]	0,59%	0%	Постановление Правительства Новос... <a href="http://ivo.garant.ru">http://ivo.garant.ru</a>	27 Июл 2015	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[51]	0,59%	0%	Постановление Правительства Новос... <a href="http://ivo.garant.ru">http://ivo.garant.ru</a>	15 Окт 2014	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[52]	0,58%	0%	<a href="https://dissov.msmsu-portal.ru/image/i...">https://dissov.msmsu-portal.ru/image/i...</a> <a href="https://dissov.msmsu-portal.ru">https://dissov.msmsu-portal.ru</a>	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	1	
[53]	0,58%	0%	Способ определения гистидина в эри... <a href="http://findpatent.ru">http://findpatent.ru</a>	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	
[54]	0,58%	0%	Способ оценки нарушения импрегна... <a href="http://findpatent.ru">http://findpatent.ru</a>	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	
[55]	0,58%	0%	Способ оценки угрозы гибели эмбри... <a href="http://findpatent.ru">http://findpatent.ru</a>	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	
[56]	0,58%	0%	Способ оценки влияния антител igg и ... <a href="http://findpatent.ru">http://findpatent.ru</a>	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	
[57]	0,55%	0%	Триазиниламидофосфатные олигону... <a href="https://elibrary.ru">https://elibrary.ru</a>	31 Дек 2021	eLIBRARY.RU	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[58]	0,51%	0%	Кому и где делают тест на коронавир... <a href="https://iskitim.bezformata.com">https://iskitim.bezformata.com</a>	22 Мая 2020	СМИ России и СНГ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[59]	0,5%	0%	ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР YY1 У... <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	31 Авг 2008	eLIBRARY.RU	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[60]	0,48%	0%	<a href="https://new.ras.ru/upload/iblock/561/1...">https://new.ras.ru/upload/iblock/561/1...</a> <a href="https://new.ras.ru">https://new.ras.ru</a>	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[61]	0,46%	0%	Т. 53, № 7 <a href="http://emll.ru">http://emll.ru</a>	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[62]	0,46%	0%	Вып. 4, декабрь <a href="http://emll.ru">http://emll.ru</a>	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[63]	0,46%	0%	Клиническая медицина № 01.2016 <a href="http://studentlibrary.ru">http://studentlibrary.ru</a>	27 Ноя 2017	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[64]	0,46%	0%	225087 <a href="http://biblioclub.ru">http://biblioclub.ru</a>	19 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[65]	0,45%	0%	Междисциплинарный подход к собл... <a href="http://ivo.garant.ru">http://ivo.garant.ru</a>	12 Мар 2022	Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[66]	0,43%	0%	Ферментативный синтез ДНК с высок... <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	31 Авг 2017	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[67]	0,39%	0%	ASSA <a href="http://assa.bionet.nsc.ru">http://assa.bionet.nsc.ru</a>	22 Авг 2023	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[68]	0,36%	0%	Технология микроволнового обезво... <a href="http://diss.natlib.uz">http://diss.natlib.uz</a>	23 Июл 2021	Коллекция НБУ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[69]	0,36%	0%	Исследование интеллектуализации эл... <a href="http://diss.natlib.uz">http://diss.natlib.uz</a>	07 Сен 2021	Коллекция НБУ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[70]	0,36%	0%	Теоретические основы новых направ... <a href="http://emll.ru">http://emll.ru</a>	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[71]	0,36%	0%	Поздравляем директора Российско-а... <a href="http://barnaul.bezformata.com">http://barnaul.bezformata.com</a>	17 Авг 2019	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[72]	0,36%	0%	Способ получения наноразмерной с... <a href="http://findpatent.ru">http://findpatent.ru</a>	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[73]	0,36%	0%	Interpretation of radioimpedance soun... <a href="https://ieeexplore.ieee.org">https://ieeexplore.ieee.org</a>	04 Ноя 2013	IEEE	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[74]	0,36%	0%	Джаксыбаев Арыстан.16-111	08 Июн 2023	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[75]	0,35%	0%	List of abstracts accepted for publication <a href="https://bgrssb.icgbio.ru">https://bgrssb.icgbio.ru</a>	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[76]	0,35%	0%	<a href="http://igeb.ru/images/biodiversity/mat...">http://igeb.ru/images/biodiversity/mat...</a> <a href="http://igeb.ru">http://igeb.ru</a>	18 Окт 2022	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[77]	0,34%	0%	Anti-IL-17 nucleic acid aptamer alleviate... <a href="https://ieeexplore.ieee.org">https://ieeexplore.ieee.org</a>	23 Янв 2023	IEEE	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[78]	0,34%	0%	Anti-IL-17 nucleic acid aptamer alleviate... <a href="https://ieeexplore.ieee.org">https://ieeexplore.ieee.org</a>	23 Янв 2023	IEEE	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[79]	0,34%	0%	Прогнозирование, ранняя диагности... <a href="http://dep.nlb.by">http://dep.nlb.by</a>	16 Янв 2020	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[80]	0,33%	0%	Клинико-иммунологические аспекты... <a href="http://diss.natlib.uz">http://diss.natlib.uz</a>	25 Дек 2020	Коллекция НБУ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[81]	0,33%	0%	О Национальном Совете по биоэтике... <a href="http://ivo.garant.ru">http://ivo.garant.ru</a>	17 Июл 2021	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[82]	0,33%	0%	Междисциплинарный подход к сопл... <a href="http://ivo.garant.ru">http://ivo.garant.ru</a>	12 Мар 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[83]	0,33%	0%	Борисов А.Н., Борисова М.А., Вайпан ... <a href="http://ivo.garant.ru">http://ivo.garant.ru</a>	18 Авг 2018	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[84]	0,33%	0%	Медицинская диссертация: современ... <a href="http://studentlibrary.ru">http://studentlibrary.ru</a>	20 Янв 2020	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[85]	0,33%	0%	Биоэтика и глобальные вызовы	17 Авг 2019	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[86]	0,33%	0%	Вестник новых медицинских техноло... <a href="http://bibliorossica.com">http://bibliorossica.com</a>	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[87]	0,33%	0%	Регламент Европейского Парламента... <a href="http://ivo.garant.ru">http://ivo.garant.ru</a>	08 Июн 2021	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[88]	0,3%	0%	Нейрогуморальные механизмы пато... <a href="http://diss.natlib.uz">http://diss.natlib.uz</a>	22 Фев 2018	Коллекция НБУ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[89]	0,3%	0%	<a href="https://oor.ru/files/novosti/OX_2_2020...">https://oor.ru/files/novosti/OX_2_2020...</a> <a href="https://oor.ru">https://oor.ru</a>	30 Авг 2022	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[90]	0,3%	0%	Костно-метаболические нарушения у... <a href="http://dep.nlb.by">http://dep.nlb.by</a>	06 Дек 2018	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[91]	0,27%	0%	Всероссийская научно-практическая ... <a href="http://emil.ru">http://emil.ru</a>	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[92]	0,27%	0%	Вестник гематологии. Том IX. № 2, 2013 <a href="http://bibliorossica.com">http://bibliorossica.com</a>	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[93]	0,26%	0%	Постановление Администрации Алик... <a href="http://ivo.garant.ru">http://ivo.garant.ru</a>	06 Авг 2011	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[94]	0,25%	0%	137952 <a href="http://biblioclub.ru">http://biblioclub.ru</a>	15 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[95]	0,25%	0%	141945 <a href="http://biblioclub.ru">http://biblioclub.ru</a>	18 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[96]	0,24%	0%	Правовые проблемы проведения кли... <a href="http://ivo.garant.ru">http://ivo.garant.ru</a>	12 Апр 2014	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[97]	0,2%	0%	Рахматуллин, Радмир Рифович Моде... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	01 Янв 2022	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[98]	0,19%	0%	<a href="https://iteb.ru/upload/iblock/04e/Biolo...">https://iteb.ru/upload/iblock/04e/Biolo...</a> <a href="https://iteb.ru">https://iteb.ru</a>	26 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[99]	0,18%	0%	Диссертация на тему «Синтез и иссле... <a href="https://dissercat.com">https://dissercat.com</a>	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[100]	0,17%	0%	Metabolomic profiling of biological fluid... <a href="https://ieeexplore.ieee.org">https://ieeexplore.ieee.org</a>	27 Июл 2021	IEEE	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[101]	0,15%	0%	<a href="https://gamaleya.org/upload/archive/b...">https://gamaleya.org/upload/archive/b...</a> <a href="https://gamaleya.org">https://gamaleya.org</a>	07 Окт 2022	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[102]	0,12%	0%	не указано	13 Янв 2022	Цитирование	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

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

Отчёт о проверке текста научно-квалификационной работы на  
объём заимствования

Шатунова Елизавета Андреевна

«Создание оптических аптасенсоров для детекции биомаркеров  
ревматических заболеваний»

Оригинальность работы составляет 87.84%, что соответствует требованиям порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на заседании Итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

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