

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

На правах рукописи

ЧЕРНЫШОВА ИРИНА АЛЕКСЕЕВНА

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы

**Поиск ингибиторов PARP1 и других ферментов репарации ДНК,
способных повышать чувствительность опухолей к известным
химиопрепаратам**

Направление подготовки

1.5 Биологические науки

Специальность

1.5.3 Молекулярная биология

Аспирант _____ И. А. Чернышова

Научный руководитель _____ к.х.н., Н. С. Дырхеева

Рецензент _____ д.б.н., О.А. Коваль

Новосибирск – 2025

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

Научный руководитель:

Дырхеева Надежда Сергеевна

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

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

На сегодняшний день известно, что многие нарушения в работе систем репарации ДНК связаны с различными патологическими процессами, включая некоторые нейродегенеративные заболевания и канцерогенез [1,2]. Цитотоксический эффект двух основных клинически одобренных методов лечения рака, химиотерапии и радиотерапии, напрямую связан с повреждением ДНК под действием облучения и химиопрепаратов, а способность раковых клеток распознавать повреждения в ДНК и инициировать их репарацию является ключевым механизмом терапевтической резистентности. В то же время эндогенное повреждение ДНК является наиболее серьезной угрозой стабильности геномов клеток нервной системы [3]. Поэтому поиск новых соединений, взаимодействующих с репарационными ферментами ДНК и подавляющих их активность, является на сегодня актуальной научной задачей.

Поли(АДФ-рибозо)полимеразы 1 и 2 (PARP1/2) являются центральными компонентами различных путей репарации ДНК и, тем самым, играют важную роль в поддержании стабильности генома и выживаемости клеток [4,5]. Эти ферменты активируются при связывании с повреждениями ДНК и, используя NAD^+ в качестве субстрата, синтезируют поли(АДФ-рибозу) (PAR), которую присоединяют как к себе (автоPARилирование), так и к другим белкам и нуклеиновым кислотам (PARилирование) [6–9]. В клетках человека PARP1 обеспечивает синтез 85–90% всего PAR, остальные 10–15% приходятся на PARP2 [10]. На данный момент олапариб, талазопариб, нирапариб и другие ингибиторы PARP одобрены FDA для применения в клинической практике в качестве терапии некоторых видов опухолей с дефектами в системе гомологичной репарации ДНК, например, несущих мутации в генах BRCA [11–13]. Хотя ингибиторы PARP1/2 демонстрируют потенциал в монотерапии рака, их эффективность ограничена. Эти препараты, будучи NAD^+ -миметиками, подавляют каталитическую активность фермента, но из-за консервативности каталитического домена влияют и на ферментативную активность других членов семейства PARP, которые участвуют в различных клеточных процессах, например, в репликации теломер и иммунном ответе [14,15]. Это повышает риск побочных эффектов, что осложняет клиническое применение таких ингибиторов.

Перспективной терапевтической мишенью для лечения онкологических заболеваний является также фермент репарации ДНК тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (TDP1) [16–19]. TDP1 катализирует удаление с 3'-конца ДНК объемных аддуктов,

модифицированных и, менее эффективно, не модифицированных нуклеотидов [17]. Одним из основных природных субстратов TDP1 является аддукт топоизомеразы 1 (TOP1) с 3'-концом цепи ДНК [20]. TOP1 регулирует степень локального скручивания спирали ДНК посредством образования аддукта ДНК-TOP1. На сегодняшний день существуют клинически используемые ингибиторы TOP1, аналоги природного вещества камптотецина (Cpt), топотекан (Tpc) и иринотекан (Irn) [21–23], которые применяются для лечения рака легких, толстой кишки [24], шейки матки, яичников [25]. В результате действия препаратов камптотецинового ряда комплекс TOP1-ДНК стабилизируется, но TDP1 способна удалять такой комплекс и нивелировать эффект ингибиторов TOP1. Таким образом, ингибирование активности TDP1 может усиливать эффект противораковых препаратов – ингибиторов TOP1. Кроме того, TDP1 представляет интерес как молекулярная мишень при лечении рака из-за роли этого белка в восстановлении множества других аддуктов ДНК, индуцируемых другими химиотерапевтическими препаратами, такими как этопозид, блеомицин, темозоломид [26,27]. Человеческий TDP1 также является нейропротекторным ферментом, так как известно, что гомозиготная мутация TDP1 (H493R) ответственна за развитие нейродегенеративного синдрома, спиноцеребеллярной атаксии с аксональной нейропатией (SCAN1) [28].

Взаимодействие между TDP1 и PARP1 представляет собой сложную систему, включающую как прямые физические контакты [29], так и взаимную ферментативную регуляцию. В настоящее время считается, что репарация ДНК-белковых сшивок, возникающих после обработки клеток камптотецинами, включает протеолиз TOP1, TDP1-зависимое удаление ковалентно стабилизированного комплекса TOP1-ДНК (TOP1cc) и последующее восстановление разрывов преимущественно по пути эксцизионной репарации оснований (Base Excision Repair, BER) [30,31]. В этом процессе PARилирование, опосредованное PARP1, может играть разные роли для восстановления TOP1cc: PARилирование TOP1 служит сигналом для рекрутирования TDP1 [32] и защищает TOP1cc от протеасомной деградации до тех пор, пока не будет рекрутирован TDP1 [33], в то же время TDP1 также может подвергаться PARилированию, что усиливает его рекрутирование к повреждению ДНК [29]. Данные о тесной связи TOP1/TDP1/PARP1 привели к активному изучению ингибиторов PARP в комбинации с ингибиторами TOP1 в экспериментальных и клинических условиях. Так, комбинация олапариба с топотеканом или иринотеканом с велипарибом была эффективна при гораздо более низкой дозе, чем отдельные агенты [34–36]. Однако, поскольку PARP1 может влиять на TOP1cc посредством других механизмов, помимо TDP1, включая дестабилизацию TOP1cc [37,38], высвобождение остановленных репликационных комплексов TOP1 [39] и перезапуск репликативных вилок,

столкнувшихся с TOP1cc [40,41], а также поскольку PARP1 влияет на многие другие клеточные процессы, помимо TOP1 [42], ингибиторы TDP1 потенциально могут служить более специфичной альтернативой ингибиторам PARP для синергического сочетания с ингибиторами TOP1 при химиотерапии рака.

Таким образом, разработка ингибиторов PARP1 и TDP1 представляет собой важное направление в терапии рака и нейродегенеративных заболеваний. Ингибиторы PARP уже доказали свою эффективность в клинике, особенно при BRCA-ассоциированных опухолях, однако их широкое применение ограничено из-за перекрестного воздействия на другие PARP-зависимые процессы, что приводит к побочным эффектам. Поэтому поиск новых ингибиторов PARP1 других структурных классов все еще остается актуальной задачей медицинской химии. Перспективной является также разработка ингибиторов TDP1 – ключевого фермента в репарации повреждений, индуцированных ингибиторами TOP1, а учитывая функциональную взаимосвязь PARP1 и TDP1, особый интерес представляют также совместные ингибиторы этих белков. Такие соединения могут сенсibilизировать клетки к химиотерапии и потенциально способствовать решению ряда проблем, а именно проблемы недостаточной эффективности химиотерапии, резистентности злокачественных опухолей к лекарственным средствам, а также снизить уровень побочных эффектов химиотерапии и, возможно, расширить показания для применения известных химиопрепаратов на основании особенностей молекулярного профиля пациентов.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы является поиск ингибиторов ферментов репарации ДНК – PARP1, PARP2 и TDP1 среди узкобороздочных лигандов и производных природных нуклеозидов для дальнейшей разработки на их основе противоопухолевых препаратов. Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние серии морфолиновых и липофильных производных нуклеозидов и узкобороздочных лигандов на активность очищенных рекомбинантных ферментов TDP1, PARP1, PARP2. Для обнаруженных ингибиторов этих ферментов определить значения параметра IC₅₀ (концентрация ингибитора, при которой активность фермента снижена наполовину).
2. Определить тип ингибирования наиболее эффективных соединений соответствующими для каждого фермента методами.
3. Исследовать влияние обнаруженных ингибиторов ферментов репарации на выживаемость клеточной линии HeLa (рак шейки матки). Оценить уровень повреждений

ДНК клеточной линии HeLa под действием ингибиторов TDP1 и их комбинации с топотеканом методом щелочного анализа комет. Изучить влияние ингибиторов TDP1 на противоопухолевое действие топотекана *in vitro* и *in vivo*.

4. Создать панель клеточных клонов с нокаутом по гену *TDP1* на базе линии A549 (аденокарцинома альвеолярных базальных эпителиальных клеток человека) с использованием метода CRISPR-Cas9.

5. Изучить влияние соединений-лидеров на выживаемость клеточных линий HEK293A (почка эмбриона человека) и A549 дикого типа и с нокаутом по гену *TDP1* в монорежиме и в сочетании с топотеканом.

Научная новизна полученных результатов

Научная новизна полученных результатов заключается в том, что для поиска ингибиторов ферментов репарации ДНК впервые был проведен скрининг среди производных природных нуклеозидов и узкобородочных лигандов (УБЛ). Была изучена активность PARP1, PARP2 и TDP1 в присутствии УБЛ, сконструированных на основе бисбензимидазола с линкерами разной длины и строения, и различных производных пурин- и пиримидиннуклеозидов, в том числе их хиральных изомеров. Соединения, ингибирующие PARP1 и PARP2 впервые обнаружены в серии морфолиновых производных нуклеозидов (IC₅₀ 10-70 мкМ и 63-250 мкМ, соответственно). Новые эффективные ингибиторы TDP1 обнаружены в серии УБЛ (IC₅₀ 0,1-9 мкМ), а также в ряду производных нуклеозидов, содержащих 2',3',5'-три-О-бензоил-d-рибофуранозный фрагмент (IC₅₀ 0,3-22 мкМ). Показано, что D-липофильные производные нуклеозидов проявляют более высокую ингибирующую активность, чем их L-аналоги, а конфигурация углеводного фрагмента может влиять на механизм ингибирования TDP1. Было показано, что липофильные производные нуклеозидов могут усиливать цитотоксический эффект Трс *in vitro* на клетках линии HeLa. На основе скрининга и проверки собственной цитотоксичности найденных ингибиторов TDP1 для дальнейшего изучения были отобраны три наиболее эффективных соединения из серии липофильных производных нуклеозидов. Показано, что соединение-лидер с лабораторным шифром 577 усиливает ДНК-повреждающий эффект Трс на клетках HeLa и A549, обработанных Трс, и усиливает противоопухолевый эффект Трс *in vivo* на мышинной модели асцитной карциномы Кребс-2. В ходе работы с помощью системы CRISPR-Cas9 была создана и охарактеризована панель клеточных клонов с нокаутом по гену *TDP1* на базе клеточной линии A549. Методами MTT, xCELLigence и Comet assay было установлено, что синергический эффект соединения 577 и Трс не наблюдается при подавлении TDP1, что указывает на роль этого фермента в механизме действия исследуемого ингибитора TDP1

577 на клеточном уровне и подчеркивает важность этого фермента как мишени для повышения эффективности терапии рака препаратом - ингибитором TOP1.

Теоретическая и практическая значимость работы

Поисковые исследования ингибиторов ферментов репарации ДНК PARP1, PARP2 и TDP1 полезны для понимания типа структур, необходимых для снижения активности этих ферментов. Описанные в работе вещества являются перспективной платформой для дальнейшей разработки новых ингибиторов ферментов репарации ДНК, что может повысить эффективность противоопухолевой терапии и расширить область применения существующих химиопрепаратов. С практической точки зрения в работе демонстрируется эффективность применения ингибиторов TDP1 на основе липофильных производных нуклеозидов как средств вспомогательной противоопухолевой терапии.

Личный вклад автора

Основная часть работы была выполнена автором лично, либо с ее непосредственным участием. Соединения для скрининга были синтезированы и любезно предоставлены сотрудниками лаборатории ДНК-белковых взаимодействий (УБЛ), дизайна и синтеза биологически активных соединений (липофильные производные нуклеозидов) ИМБ РАН им. Энгельгардта, а также лаборатории органического синтеза ИХБФМ СО РАН (морфолиновые производные нуклеозидов). Нарботка, выделение и очистка рекомбинантного фермента TDP1 проводилась аспирантом самостоятельно, а ферменты PARP1 и PARP2 были любезно предоставлены Сухановой Марией Владиславовной и Кутузовым Михаилом Михайловичем (ЛБХФ ИХБФМ СО РАН). Биосенсор для изучения активности TDP1 был разработан в ЛБХФ ИХБФМ СО РАН Рашидом Октамовичем Анарбаевым и синтезирован в Лаборатории химии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН Жарковым Тимофеем Дмитриевичем. Плазмидные конструкции для создания клеток A549 с нокаутом по гену TDP1 были любезно предоставлены Медведевым Сергеем Петровичем (лаборатория эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН). Сортировка клеточных клонов и эксперименты по зарастанию царапины проводились в ЦКП ИЦиГ СО РАН под руководством Ефремова Ярослава Рейнгольдовича и Орищенко Константина Евгеньевича. Изучение липофильных производных нуклеозидов *in vivo* на модели Кребс-2 было выполнено автором совместно с сотрудниками Лаборатории регуляции экспрессии генов ИЦиГ СО РАН Поповой Нэлли Александровной и Николиным Валерием Петровичем.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Исследование активности PARP1/2 по включению α -[^{32}P]-NAD $^{+}$ в поли(АДФ-рибозу)

Активность PARP1/2 оценивалась по скорости включения радиоактивной метки в кислотонерастворимый продукт реакции – PAR, как описано ранее [43]. Реакционные смеси объемом 15 мкл содержали буфер (50 мМ Трис-HCl, pH 8,0; 50 мМ NaCl; 10 мМ MgCl₂; 7 мМ β -меркаптоэтанол и спермидин 3 мМ в случае PARP2), активированную ДНК (25% активации) 2 ое/мл, NAD $^{+}$ 300 мкМ (PARP1) или 600 мкМ (PARP2), α -[^{32}P]-NAD $^{+}$ (изотопное разбавление 1:300) и соединения в различных концентрациях. Реакция запускалась добавлением фермента в конечной концентрации 200 (PARP1) и 600 нМ (PARP2). Реакцию проводили на линейном участке кривой зависимости скорости реакции от времени при 37°C в течение 1 минуты (PARP1) и 5 минут (PARP2). Для остановки реакции переносили 10 мкл реакционной смеси на бумагу Whatman 1, пропитанную 5% трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Включение радиоактивной метки визуализировали с помощью сканера Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare). Количественный обсчет проводили с помощью программы QuantityOne 4.6.7, а расчет значений IC₅₀ с помощью программного обеспечения OriginPro 8.6.0.

Исследование активности TDP1 и определение параметров IC₅₀ флуоресцентным методом в режиме реального времени

Исследования активности TDP1 в режиме реального времени проводилось как описано ранее [[44]. Коротко, реакционные смеси объемом 200 мкл содержали буфер (50 мМ Трис-HCl, pH 8,0; 50 мМ NaCl; 7 мМ β -меркаптоэтанол), олигонуклеотид 50 нМ и различные концентрации соединений. Реакция запускалась добавлением TDP1 до концентрации 1,5 нМ. Измерение флуоресценции проводили через каждые 55 секунд при комнатной температуре с помощью многофункционального ридера для микропланшетов Polar Star (BMG LABTECH, Германия). На основе полученных данных рассчитывали значение параметра IC₅₀ (концентрация ингибитора, при которой активность фермента снижена на 50%) в программе MARS (BMG LABTECH, Германия).

Клеточные линии и условия культивирования

Клеточные линии HeLa (рак шейки матки), A549 (аденокарцинома альвеолярных базальных эпителиальных клеток человека) и HEK293A (клетки почки эмбриона человека) были получены из Российской коллекции клеточных культур (РККК) Института цитологии РАН

(Санкт-Петербург, Россия). Все клеточные линии, использованные в работе, культивировали в среде DMEM-F12 (Thermofisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) с добавлением 100 ед/мл пенициллин–стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) в присутствии 10% FBS (Thermofisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) при температуре 37°C в инкубаторе с 5% содержанием CO₂.

Оценка выживаемости пассируемых клеточных линий человека при обработке исследуемыми соединениями и определение значений их CC₅₀

Клетки высевали в 96-луночные планшеты в количестве 5000 клеток на лунку. Тестируемые соединения добавляли на следующий день после посадки (в соотношении 1:100 к общему объему питательной среды в лунке, таким образом, конечная концентрация ДМСО составляла 1%) и наблюдали за культурой клеток в течение 3 дней. Контрольные клетки выращивали в присутствии 1% ДМСО. Выживаемость клеток линии HeLa в присутствии исследуемых соединений оценивали с помощью набора EZ4U Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay (Biomedica, Вена, Австрия) в соответствии с протоколами производителя. Выживаемость клеток линии HEK293A, A549 WT и клеток с нокаутом по гену *TDP1* (TDP1-KO) оценивали с помощью стандартного МТТ-теста [45]. Оптическую плотность растворов измеряли с помощью многофункционального микропланшетного ридера CLARIOstar Plus. Параметры CC₅₀ (концентрация ингибитора, при которой выживаемость клеток снижена на 50%) рассчитывали с помощью программного обеспечения OriginPro 8.6.0. Все эксперименты выполнены минимум в трех повторях. Комбинаторный индекс (CI) Трс и соединения 577 для клеточной линии A549 был рассчитан с использованием программного обеспечения CompuSyn 1.0 (ComboSyn, США).

Анализ жизнеспособности клеток в режиме реального времени с помощью системы xCELLigence

Жизнеспособность клеток HEK293A, A549 WT и TDP1-KO (клоны клеток TDP1-KO B5, B6 и B10) оценивалась в реальном времени на анализаторе клеток xCELLigence с программным обеспечением RTCA (Agilent). Клетки высевали в приборные 16-луночные планшеты в концентрации 5000 клеток на лунку. На следующий день после посадки в среду добавляли тестируемые соединения в различных концентрациях (реагенты добавляли в соотношении 1:200 к общему объему питательной среды, таким образом, конечная концентрация ДМСО составляла 0,5 %) и наблюдали за культурой клеток в течение нескольких дней. Измерения проводили минимум в двух независимых экспериментах.

Оценка уровня повреждения ДНК методом щелочного анализа комет (Alkaline Comet assay)

Клетки высевали в 24-луночный планшет в концентрации 0,05 млн/мл. На следующий день клетки обрабатывали тестируемыми соединениями и инкубировали в течение 2 ч. Клеточную суспензию смешивали с 1% раствором расплавленной легкоплавкой агарозы (Certified™ LMAgarose; BIO-RAD), полученную смесь переносили на предметные стекла, предварительно покрытые 1%-ным раствором обычной агарозы (Agarose; Helicon), и оставляли на несколько минут при температуре 4°C для застывания. Предметные стекла инкубировали в лизирующем растворе (2,5 М NaCl, 100 мм ЭДТА, 10 мм Трис-основания, 1% Triton, 5% ДМСО, pH 10,0) в течение часа и в электрофорезном буфере (300 мм NaOH, 1 мм ЭДТА) в течение 45 мин при температуре 4°C. Электрофорез проводили при 20 В, 450 мА в течение 10 мин при охлаждении на льду. После этого предметные стекла дважды промывали холодной водой и окрашивали SYBR Green I (Thermo Fisher Scientific КК). Изображения были получены с помощью цифрового флуоресцентного микроскопа CELENA © (Logos Biosystems, Inc., Аннандейл, Вирджиния, США) и проанализированы с помощью программного обеспечения Comet analysis (Trevigen, Inc., Гейтерсберг, Мэриленд, США). Во всех экспериментах на стекле было подсчитано не менее 500 клеток. В качестве параметра для измерения уровня повреждения ДНК было выбрано среднее значение процентного содержания ДНК в хвосте ($\% \text{ ДНК в хвосте} = 100 \times \frac{\text{интенсивность флуоресценции ДНК в хвосте кометы}}{\text{интенсивность флуоресценции общей ДНК кометы}}$).

Изучение противоопухолевого действия комбинации ингибиторов TDP1 и Трс на модели карциномы Кребс-2 мыши

В исследовании использовали мышей линии C57Bl/6 (самцов и самок) в возрасте 3–4 месяцев (19–21 г) из питомника Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия. Животных содержали на опилках в пластиковых клетках по 5–7 мышей в клетке со свободным доступом к корму («Лабораторкорм», г. Москва, Россия) и водопроводной воде. Эксперименты на животных были проведены в соответствии с директивой 2010/63/EU и протоколами, одобренными межинститутской комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН №21.11 от 30.05.2014.

Экспериментальной опухолевой моделью служила перевиваемая карцинома Кребс-2, полученная из Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия) и поддерживаемая на мышах в виде перевиваемой опухоли. Карцинома Кребс-2 была получена из эпителиальных клеток брюшной стенки мыши, является неспецифичной к хозяину и может быть привита мышам с любым генетическим контекстом. При

внутрибрюшинной инокуляции образует асцитную форму. Опухоль слабо иммуногенна для мышей всех линий, не метастазирует [46–49].

Для получения трансплантата клетки асцита смешивали с 0,9% NaCl, вводили мышам внутрибрюшинно в объеме 0,2 мл в количестве 2 млн клеток/мышь. Животные были разделены на 5 групп по 6 мышей в каждой. Лечение начинали на четвёртый день после инокуляции опухоли, предполагая, что она только начала формироваться. В качестве терапии животным вводили Трс однократно в дозе 1 мг/кг внутрибрюшинно (в/б), ингибитор TDP1 (**5f**, **6c** или **6d**) в дозе 100 мг/кг в/б или их комбинацию. Ингибиторы TDP1 вводили по 0,2 мл/мышь в виде суспензии 10% ДМСО-15% Твин 80 в физиологическом растворе. Животных подвергали эвтаназии через восемь дней после трансплантации. Критериями противоопухолевой активности исследуемых соединений являлись вес асцита (по разнице массы мышей до и после удаления асцитической жидкости) и количество клеток в асцитической жидкости (подсчитывали в камере Горяева).

Подсчет форменных элементов крови лабораторных животных

Забор биоматериала проводился из ретроорбитального синуса глаза. Для подсчета эритроцитов 5 мкл крови вносили в пробирки, содержащие 1 мл 0,9% NaCl (разведение 1:200). Для подсчета лейкоцитов 5 мкл крови вносили в пробирки, содержащие 0,1 мл 3% уксусной кислоты (разведение 1:20). Полученные образцы тщательно перемешивали и вносили в камеру Горяева по 10 мкл. Учет эритроцитов велся в пяти больших квадратах, состоящих из 16 малых, расположенных по диагонали, а лейкоциты подсчитывались в 100 больших квадратах с использованием правила Егорова.

Создание панели клеточных клонов с нокаутом по гену TDP1 на базе линии A549 с использованием метода CRISPR-Cas9

Клоны A549 с нокаутом по гену TDP1 были получены таким же образом, как и ранее описанные клоны HEK293FT с нокаутом по TDP1 [50]. Коротко, клетки A549 трансфицировали плазмидами pX458-TDP1-gRNA1 и pX458-TDP1-gRNA2 (по 0,25 мкг каждой) с использованием реагента Lipofectamine 3000 (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Через сорок восемь часов после трансфекции популяция путем сортировки клеток с использованием BD FACSAria III Cell Sorter (BD Biosciences, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, США) были отобраны GFP-позитивные клетки, по одной клетке в лунку 96-луночного планшета. Клоны одиночных клеток росли в течение двух недель и затем были охарактеризованы с помощью ПЦР и western-blot анализа, а также была проведена оценка активности TDP1 в цельноклеточных экстрактах клеток.

Анализ наличия CRISPR/Cas9-опосредованных делеций в гене TDP1 клеток после сортировки

Геномную ДНК полученных клонов анализировали на наличие CRISPR/Cas9-опосредованных делеций в гене *TDP1* путем ПЦР-амплификации целевой области с праймерами: TDP1-scF 5'-TCAGGAAGGCGATTATGGGGAG-3' и TDP1-scR 5'-TTGATGTGGAGGGCTCCAG-3'. Реакции проводили с использованием BioMaster HS-Taq PCR-Color (2×) (Biolabmix, Новосибирск, Россия) на термоциклере S1000 (Bio-Rad, Сингапур) по следующей программе: 95 °C в течение 3 мин; 35 циклов: 95 °C в течение 30 с; 65 °C в течение 30 секунд; 72 °C в течение 30 секунд; и 72 °C в течение 3 минут. Продукты реакции анализировали в 1,5%-ном агарозном геле, содержащем бромид этидия.

Вестерн-блот анализ клеточных экстрактов клеток A549 WT и TDP1-KO

Белки из цельноклеточных экстрактов (A549 WT и клонов B5, B6 и B10) разделяли с помощью электрофореза Леммли в 10%-ном полиакриламидном геле SDS и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (TransBlot Turbo, Bio-Rad, Hercules, Калифорния, США) полусухим методом. Мембрану инкубировали с антителами кролика к TDP1 (Invitrogen) или β-актину (Sigma). В качестве вторичных антител использовали IgG козы, конъюгированный с пероксидазой хрена, против кроличьего IgG (разведение 1:50 000, получены Матвеевым Леонидом Эдуардовичем, лаборатория биотехнологии ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия), иммунореактивность определяли методом хемилюминесценции (West Pico PLUS, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США).

Анализ активности TDP1 в клеточных экстрактах клеток A549 WT и TDP1-KO методом электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях

Анализ активности TDP1 проводили с использованием 50 нМ олигонуклеотидного субстрата (5'-(5,6 FAM-AAC GTC AGG GTC TTC C-BHQ1)-3'), инкубированного с рекомбинантным человеческим TDP1 в концентрации 10 нМ или с цельноклеточным экстрактом клеток A549 WT и TDP1-KO в концентрации 1 мг/мл в течение 30 мин при 37°C в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0, 50 мМ NaCl и 7 мМ β-меркаптоэтанола. Реакцию останавливали добавлением буфера нанесения (ТБЕ, 10% формамид, 7 М мочевины, 0,1% ксиленцианол и 0,1% бромфенолового синего, 20 мМ ЭДТА). Электрофоретическое разделение продуктов реакции проводили в 20% полиакриламидном геле (ПААГ) с 7 М мочевиной (соотношение акриламида к бисакриламиду 19:1). Для полимеризации ПААГ добавляли 10 мкл 10% персульфата аммония (PSA) и 1 мкл ТЕМЕД

на 1 мл объема геля. Электрофорез проводили в буфере TBE в вертикально расположенной камере при напряжении 25 В/см. Визуализацию продуктов проводили с помощью сканера Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare).

Анализ зарастания царапины клетками A549 WT и TDP1-KO

Клетки A549 WT и TDP1-KO сажали по 400 тысяч в 12-луночный планшет. Через 24 ч после посадки дно планшета с монослоем клеток царапали стерильным скальпелем. Анализ зарастания царапины проводился путем визуализации клеток A549 WT и TDP1-KO (клоны клеток B5, B6, B10) в реальном времени в течение суток на приборе Cell-IQ (CM Technologies Oy) в лаборатории клеточных технологий Института цитологии и генетики СО РАН. Эксперимент проводили не менее 3 раз для каждой клеточной линии. Данные были обработаны с помощью программного обеспечения Cell-IQ и OriginPro 8.6.0.

Результаты и обсуждение

1. Поиск ингибиторов ферментов репарации ДНК PARP1, PARP2 и TDP1 среди соединений разных классов

1.1. Узкобороздочные лиганды

Особый интерес в разработке новых противоопухолевых препаратов представляют узкобороздочные лиганды (УБЛ), которые минимально нарушают структуру двойной спирали и не обладают мутагенным действием. Такие соединения нековалентно взаимодействуют с ДНК, сохраняя ее целостность, и способны препятствовать связыванию белков с ДНК и процессам репликации и транскрипции. Их разработка открывает новые возможности для создания более безопасных и эффективных противоопухолевых препаратов.

В рамках данной работы была проанализирована активность ферментов PARP1, PARP2 и TDP1 в присутствии 22 соединений, относящихся к УБЛ. Серия исследуемых соединений включает четыре мономерных соединения, являющихся производными бисбензимидазола (MB₂, MB₂(Ac), MB₂Py(Ac), MB₃, Рис.1), где соединение MB₂ представляет собой аналог широко изученного УБЛ Hoechst 33258, в котором гидроксифенильная группа заменена на более гидрофильный аминотетильный фрагмент. Путем конденсации этих мономерных субъединиц с 1,4-пиперазиндиалкилдикарбоновыми и n-алкилдикарбоновыми кислотами были получены 3 серии димерных производных соответственно – DB₂P(n), DB₂Py(n) и DB₃P(n), где n – количество метиленовых звеньев в линкере (Рис.1).

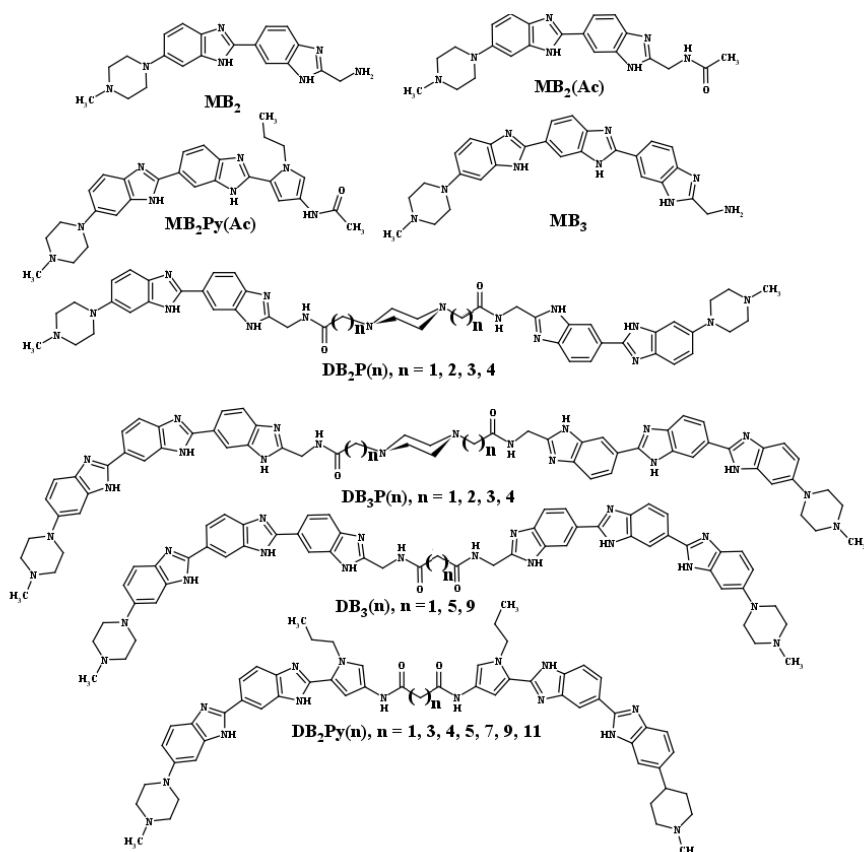


Рис 1. Структуры узкобороздочных лигандов на основе бисбензимидазола, исследуемых в работе.

Значения полуингибирующих концентраций (IC_{50}) исследуемых соединений были получены методом флуоресцентного анализа в реальном времени реакции отщепления BNQ1 от 3'-конца олигонуклеотида, катализируемой рекомбинантным очищенным ферментом TDP1, что приводит к разгоранию флуоресценции FAM на 5'-конце цепи [44]. Одноцепочечный олигонуклеотид был использован, чтобы исключить связывание димерных бисбензимидазолов как узкобороздочных лигандов с ДНК-субстратом и оценить их влияние непосредственно на ферментативную мишень. В ходе исследования производных бисбензимидазола были обнаружены эффективные ингибиторы TDP1 с IC_{50} в диапазоне от 0,1 до 9 мкМ. Полученные данные представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Величины IC_{50} для TDP1 и значения остаточной активности ферментов PARP1/2 в присутствии 500 мкМ концентрации соединения (%), полученные для УБЛ.

	Соединение	IC_{50} TDP1, мкМ	PARP1, % ост. акт.	PARP2, % ост. акт.
1	MB ₂	2 $\pm$ 1	~100 %	~100 %
2	MB ₂ (Ac)	1,5 $\pm$ 0,5	~100 %	~100 %
3	DB ₂ P(1)	6 $\pm$ 4	57 $\pm$ 16 %	~100 %
4	DB ₂ P(2)	9 $\pm$ 3	51 $\pm$ 15 %	80 $\pm$ 20 %
5	DB ₂ P(3)	4,1 $\pm$ 0,6	37 $\pm$ 10 %	64 $\pm$ 16 %
6	DB ₂ P(4)	2,3 $\pm$ 0,3	33 $\pm$ 13 %	85 $\pm$ 13 %
7	MB ₂ Py(Ac)	5 $\pm$ 2	~100 %	~100 %
8	DB ₂ Py(1)	0,25 $\pm$ 0,05	~100 %	~100 %
9	DB ₂ Py(3)	0,41 $\pm$ 0,09	~100 %	~100 %
10	DB ₂ Py(4)	0,4 $\pm$ 0,15	~100 %	~100 %
11	DB ₂ Py(5)	0,35 $\pm$ 0,13	~100 %	~100 %
12	DB ₂ Py(7)	0,28 $\pm$ 0,01	~100 %	~100 %
13	DB ₂ Py(9)	0,30 $\pm$ 0,08	~100 %	~100 %
14	DB ₂ Py(11)	0,9 $\pm$ 0,1	~100 %	~100 %
15	MB ₃	0,70 $\pm$ 0,05	65 $\pm$ 15 %	~100 %
16	DB ₃ (1)	>50	55 $\pm$ 13 %	~100 %
17	DB ₃ (5)	>50	62 $\pm$ 16 %	~100 %
18	DB ₃ (9)	>50	~100 %	~100 %
19	DB ₃ P(1)	0,10 $\pm$ 0,05	70 $\pm$ 12 %	~100 %
20	DB ₃ P(2)	0,11 $\pm$ 0,01	40 $\pm$ 5 %	~100 %
21	DB ₃ P(3)	0,20 $\pm$ 0,05	47 $\pm$ 14 %	~100 %
22	DB ₃ P(4)	0,15 $\pm$ 0,03	48 $\pm$ 15 %	~100 %

В ходе работы было показано, что параметры IC_{50} группы соединений, включающей соединения MB₂ и MB₂(Ac), а также их димерные производные DB₂P(n) (где n = 1, 2, 3, 4), лежат в микромолярном диапазоне концентраций, при этом мономеры оказались более эффективными ингибиторами TDP1, то есть димеризация не приводила к усилению ингибирующих свойств изученных соединений. Однако для димеров соединения MB₂Py(Ac) (IC_{50} 5 $\pm$ 2 мкМ) наблюдалось значительное снижение полуингибирующей концентрации – до 0,25–0,9 мкМ. Аналогично, переход от мономера MB₃ к димерной серии DB₃P(n) привел к повышению ингибиторной активности, хотя и менее выраженному. В то же время димерные производные MB₃ без пиперазинового фрагмента в линкере – соединения DB₃(n) – оказались наименее активными среди всех протестированных ингибиторов. Вероятно, это связано с их протяженной плоской геометрией и жестким линкером, что затрудняет оптимальное позиционирование в активном центре фермента.

Таким образом, все изученные соединения класса УБЛ, за исключением группы DB₃(n), эффективно подавляют активность TDP1 в микромолярном и субмикромолярном диапазонах концентраций. Была выявлена корреляция между структурой и активностью: снижение IC_{50} наблюдалось при увеличении числа фрагментов, способных к образованию

водородных связей. Кроме того, введение пиперазинового фрагмента в линкер (группа DB₂Py(n)) способствовало снижению IC₅₀, возможно, за счет повышения гидрофильности молекул.

На следующем этапе работы мы изучили способность производных бисбензимидазола ингибировать ферментативную активность рекомбинантных очищенных ферментов PARP1 и PARP2 путем оценки количества включенной радиоактивной метки (α -[³²P]-NAD⁺) в продукт реакции синтеза поли(АДФ-рибозы) (PAR) в присутствии исследуемых соединений. Все исследованные соединения показали низкую эффективность ингибирования этих двух ферментов. Наиболее активными соединениями оказались соединения группы DB₂P(n), представители которой с n = 2, 3, 4 снижали активность PARP1 и PARP2 в концентрации 500 мкМ. Ингибирующее действие также наблюдалось для соединений серий DB₃(n) и DB₃P(n) в концентрации 500 мкМ, в тоже время, данные соединения проявили ингибирующую активность только в реакции синтеза PAR, катализируемой PARP1, но не PARP2 (Табл. 1).

1.2. Морфолиновые производные нуклеозидов

Аналоги нуклеозидов являются одним из важнейших классов препаратов в клинической практике и широко используются как противораковые и противовирусные средства [51]. Известно, что некоторые производные нуклеозидов проявляют ингибирующую активность в отношении PARP1, например, показано, что производные тимидина, уридина и урацила, в частности модифицированные в 5- и / или 5'-положении, ингибируют PARP1 в более низких концентрациях, чем 3-аминобензамид, который относится к первому поколению ингибиторов PARP1 [52–54]. Поиск ингибиторов PARP среди морфолиновых производных нуклеозидов представляет особый интерес, поскольку такие соединения сочетают преимущества нуклеозидной структуры и морфолинового фрагмента, обладающего оптимальными физико-химическими и фармакокинетическими свойствами. Морфолин, в отличие от природной рибозы, более эффективно связывается с никотинамид-связывающим сайтом PARP1/2, что может повышать активность и селективность ингибиторов [43].

Преимущества нуклеозидов и морфолина объединяет в себе серия из 14 2'-аминометилморфолиновых и 2'-аминометилморфолинглициновых (Рис.2) производных нуклеозидов, действие которых на активность очищенных рекомбинантных ферментов PARP1/2 было оценено в рамках данной работы.

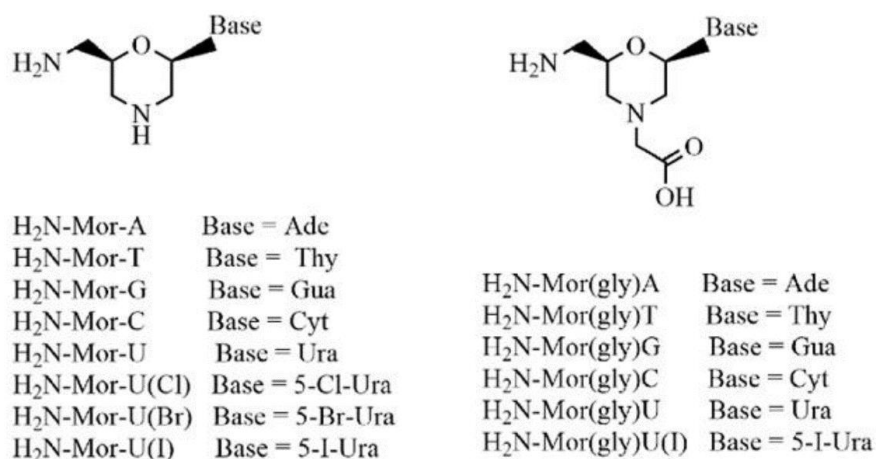


Рисунок 2. Структуры 2'-аминометилморфолиновых (слева) и 2'-аминометилморфолинглициновых (справа) производных нуклеозидов, исследуемых в работе.

Таблица 2. Величины IC_{50} , (мкМ) или значения остаточной активности PARP1/2 в присутствии 1 мМ соединения (%), полученные для морфолиновых производных нуклеозидов.

	Соединение	PARP1	PARP2
1	$\text{H}_2\text{N-Mor(gly)A}$	>30%	>30%
2	$\text{H}_2\text{N-Mor(gly)T}$	60 ± 14 мкМ	100 ± 12 мкМ
3	$\text{H}_2\text{N-Mor(gly)G}$	>30%	>30%
4	$\text{H}_2\text{N-Mor(gly)C}$	>30%	>30%
5	$\text{H}_2\text{N-Mor(gly)U}$	>30%	>30%
6	$\text{H}_2\text{N-Mor(gly)U(I)}$	70 ± 12 мкМ	142 ± 6 мкМ
7	$\text{H}_2\text{N-Mor-A}$	>30%	>30%
8	$\text{H}_2\text{N-Mor-T}$	10 ± 3 мкМ	133 ± 8 мкМ
9	$\text{H}_2\text{N-Mor-G}$	>30%	>30%
10	$\text{H}_2\text{N-Mor-C}$	>30%	>30%
11	$\text{H}_2\text{N-Mor-U}$	420 ± 66 мкМ	>30%
12	$\text{H}_2\text{N-Mor-U(Cl)}$	45 ± 5 мкМ	>30%
13	$\text{H}_2\text{N-Mor-U(Br)}$	30 ± 3 мкМ	250 ± 37 мкМ
14	$\text{H}_2\text{N-Mor-U(I)}$	12 ± 2 мкМ	63 ± 9 мкМ

Значения IC_{50} обнаруженных ингибиторов PARP1 и PARP2 находились в диапазоне концентраций от 10 до 140 мкМ (данные представлены в Таблице 2). Фрагмент глицина, который, как было показано ранее, усиливал ингибирующую эффективность конъюгатов, содержащих АДФ [55], показал сильный отрицательный эффект на ингибирующую способность морфолинонуклеозидных мономеров по отношению к PARP1 (например, соединения 2 и 5 против соединений 8 и 11, соответственно). Также показано, что введение галогенов по 5-положению урацила приводит к снижению значения параметра IC_{50} в ряду $\text{Cl} < \text{Br} < \text{I}$, что согласуется с имеющимися в литературе данными [54]. Аналогичный эффект

галогенирования был обнаружен ранее для конъюгатов морфолинонуклеозидов с АДФ [43]. Нуклеозид аминотилморфолино 5-Cl-урацила (соединение **12**) оказался высокоселективным ингибитором PARP1, несмотря на высокую гомологию между каталитическими центрами PARP1 и PARP2. Br- и I-замещенные аналоги также продемонстрировали в 5-8 раз более низкие значения IC_{50} для PARP1, чем для PARP2. Таким образом, аминотилморфолинонуклеозиды оказались даже более эффективными ингибиторами обоих ферментов PARP, чем соответствующие конъюгаты с АДФ [43]. По-видимому, именно эта часть ранее исследованных конъюгатов ответственна за ингибирование PARP1/PARP2.

Для четырех наиболее эффективных ингибиторов PARP1 (соединения **8**, **12**, **13** и **14**) были определены тип и константы ингибирования. Для этого оценивали уровень синтеза PAR при различных концентрациях субстрата NAD^+ и трех-четырёх различных фиксированных концентрациях ингибитора. Кинетические параметры реакции (V_{max} и K_M) были рассчитаны путем аппроксимации полученных данных уравнением Михаэлиса-Ментен. Вывод о типе ингибирования делали а) по характеру зависимости V_{max} и K_M от концентрации ингибитора, б) по виду графиков в линеаризующих координатах по методу Лайнуивера-Берка. В качестве репрезентативного примера представлены данные, полученные для соединения **14** (Рис.3). Все соединения снижали значения V_{max} и увеличивали значения K_M по мере увеличения концентрации ингибитора (Рис.П1), что указывает на смешанный тип ингибирования. Это дополнительно подтверждается видом графиков кинетических данных, представленных в двойных обратных координатах (Рис.3, Рис.П2). В результате этих экспериментов были определены константы ингибирования, отражающие сродство ингибиторов к свободному ферменту (K_I) и его комплекса с NAD^+ ($K_I(2)$) (Табл. 3).

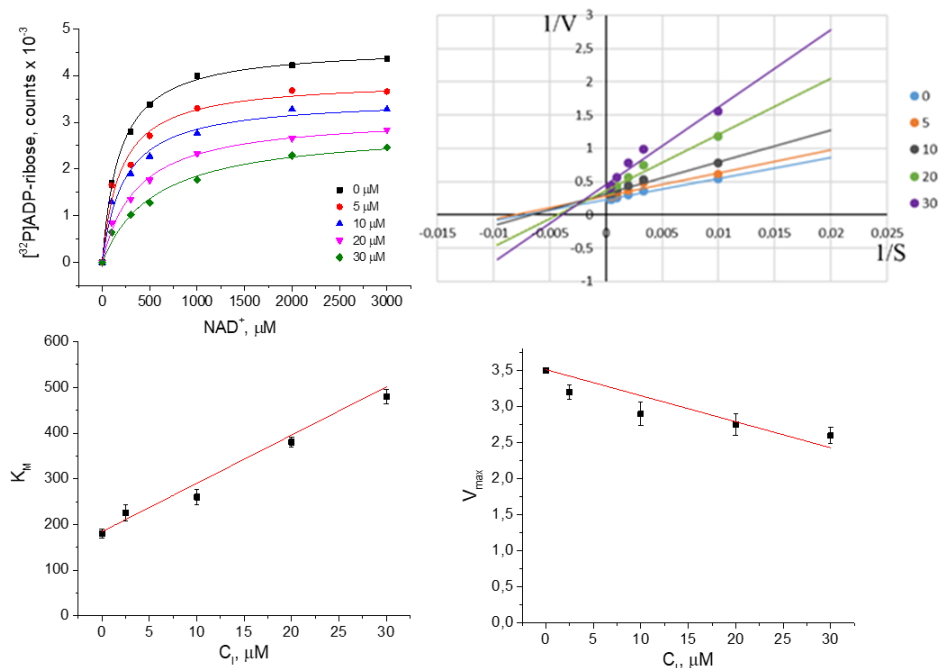


Рисунок 3. Графическое представление определения типа ингибирования PARP1 выбранными соединениями. Для соединения **14** ($\text{H}_2\text{N-Mor-U(I)}$) по характеру изменения кинетических параметров ($\downarrow V_{\max}$ и $\uparrow K_M$), а также по виду графика в координатах Лайнуивера-Берка можно сделать вывод о смешанном типе ингибирования.

Таблица 3. Константы ингибирования наиболее активных соединений в отношении PARP1

	Соединение	K_I^* , мкМ	$K_{I(2)}^*$, мкМ
8	$\text{H}_2\text{N-Mor-T}$	12 ± 2	40 ± 8
12	$\text{H}_2\text{N-Mor-U(Cl)}$	79 ± 6	300 ± 60
13	$\text{H}_2\text{N-Mor-U(Br)}$	25 ± 4	130 ± 30
14	$\text{H}_2\text{N-Mor-U(I)}$	15 ± 3	50 ± 10

* Значение K_I отражает сродство к свободному ферменту. Значение $K_{I(2)}$ отражает сродство к фермент-субстратному комплексу PARP1- NAD^+ (формулы для расчета представлены на Рис.П2).

Смешанный тип ингибирования подразумевает, что ингибиторы могут подавлять активность фермента за счет взаимодействия как с ферментом, так и с фермент-субстратным комплексом. Было показано, что значения K_I и IC_{50} уменьшаются в ряду $\text{U(Cl)} > \text{U(Br)} > \text{U(I)} \approx \text{T}$ в зависимости от природы нуклеозидного основания, а соответствующие значения $K_{I(2)}$ примерно в 4–7 раз выше значений K_I , что указывает на предпочтительное взаимодействие тестируемых соединений именно в NAD^+ -связывающем кармане PARP1, что было дополнительно продемонстрировано с помощью молекулярного докинга и модели искусственного интеллекта RoseTTAFold All-Atom [56].

1.3. Липофильные производные нуклеозидов

На сегодняшний день ингибиторы TDP1 были обнаружены среди соединений из различных химических классов: ортованадаты и вольфраматы, производные прогестерона,

пиперидинилсульфамиды, производные бензопентатиепина, сульфокислот, диамидины, производные желчных кислот, тиено [2,3-b] пиридина, инденоизохинолина, кумарина, усниновой кислоты, адамантана [19,57–66]. В том числе в лаборатории ЛБХФ ИХБФМ СО РАН совместно с коллегами из других организаций были разработаны несколько классов ингибиторов Tdp1, которые активны в нано- и микромолярном диапазоне и проявляют низкую цитотоксичность [19], причем некоторые из найденных ингибиторов TDP1 были способны усиливать цитотоксическое действие топотекана на клеточные линии разных типов [67–69]. Для некоторых соединений, например, производных енаминов и гидразинотиазолов усниновой кислоты, было выявлено, что они повышают эффективность химиотерапии топотеканом на моделях опухолей мыши [70–72].

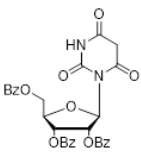
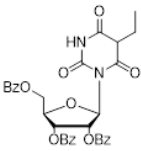
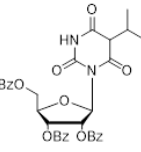
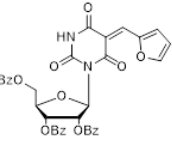
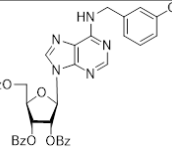
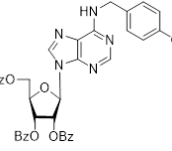
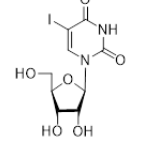
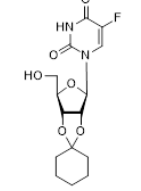
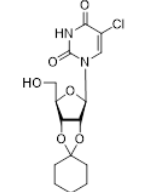
Перспективным классом соединений для поиска ингибиторов ферментов репарации ДНК являются производные природных нуклеозидов. Например, в нашей лаборатории было показано, что дисахаридные нуклеозиды являются эффективными ингибиторами TDP1 [73] и PARP1 [52,74].

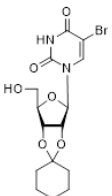
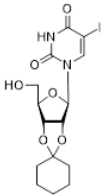
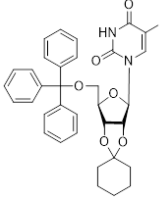
В рамках дипломной работы специалиста для поиска ингибиторов ферментов репарации ДНК впервые был проведен широкомасштабный скрининг среди липофильных производных нуклеозидов. Тогда нами были обнаружены эффективные ингибиторы TDP1, параметры IC₅₀ которых находились в нижнем микромолярном и субмикромолярном диапазонах. Было показано, что липофильность модифицированных нуклеозидных соединений, обеспечиваемая присутствием остатков бензойной кислоты, линейно коррелировала с эффективностью обнаруженных ингибиторов TDP1 [75]. Помимо TDP1, влияние липофильных производных нуклеозидов оценивалось на активность PARP1 и PARP2, однако ингибиторов этих ферментов обнаружить не удалось. Поэтому в рамках данной работы был продолжен поиск соединений, ингибирующих TDP1, PARP1 и PARP2 среди данного класса соединений.

1.3.1 Совместные ингибиторы PARP1/PARP2/TDP1, обнаруженные среди липофильных производных нуклеозидов

В ходе работы среди липофильных производных нуклеозидов были обнаружены ингибиторы ферментов PARP1 и PARP2. Результаты, полученные в ходе скрининга представлены в Таблице 4.

Таблица 4. Параметры IC_{50} или остаточная активность ферментов PARP1/2 при 1 мМ концентрации липофильных производных нуклеозидов.

Структура	TDP1 IC_{50} , мкМ	PARP1 IC_{50} , мкМ	PARP2 IC_{50} , мкМ
1 	2,6±0,5	207±10	>30%
2 	5,7±0,7	207±79	286±58
3 	>15	204±3	223±10
4 	0,48±0,02	>30%	48±3
5 	0,5±0,1	414±122	>30%
6 	0,7±0,3	260±100	>30%
7 	>50	400±20	88±24
8 	>15	>30%	>30%
9 	>15	>30%	330±71

10		>15	196±46	124±17
11		>15	56±17	30±7
12		0,48±0,04	>30%	262±8

* OBz — бензоильная группа

Среди изученных соединений лишь 11 были способны снижать активность PARP1 или PARP2. Они проявляли слабую ингибирующую активность со значениями IC₅₀ в диапазоне 30-400 мкМ. Наиболее эффективными ингибиторами оказались соединения **11** (IC₅₀ PARP1/2 56±17 мкМ и 30±7 мкМ соответственно) и **4** (IC₅₀ PARP2 48±3 мкМ). В ряду галогензамещенных производных уридина (соединения **7-12**) ингибиторная активность соединений с 2',3'-О-циклогексиденовым заместителем увеличивалась в ряду F<Cl<Br<I. Дополнительная модификация соединения **12** трифенилметильным заместителем в 5'-положении приводила к резкому снижению параметров IC₅₀ PARP1 и PARP2 по сравнению с соединением **11**, которое не содержит этой модификации. В данной серии соединений на активность PARP1 существенным образом влияла комбинация атома галогена и липофильного заместителя в 2' и 3' положениях рибозы, при этом 5' положение, по-видимому, должно оставаться немодифицированным. Некоторые соединения также снижали активность TDP1 (IC₅₀ 0,48 – 5,7 мкМ), причем наиболее эффективные ингибиторы содержали объемные липофильные заместители в 2', 3', 5' положениях рибофуранозного кольца и/или в составе азотистых оснований.

В ходе работы обнаружены как соединения, ингибирующие активность обоих ферментов (**3**, **7**, **10**, **11**), так и селективный ингибитор PARP2 (соединение **9**). Особый интерес представляют двойные ингибиторы (таблица 4): TDP1/PARP1 (**1**, **5**, **6**) и TDP1/PARP2 (**4**, **12**), а также тройной ингибитор TDP1/PARP1/PARP2 (соединение **2**). Полученные результаты открывают перспективы для разработки новых многоцелевых ингибиторов ферментов репарации ДНК, которые могут расширить набор инструментов для онкологов и стать основой для персонализированных подходов в химиотерапии.

1.3.2. Влияние пространственной изомерии на эффективность ингибирования TDP1 производными пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов

Новые эффективные ингибиторы TDP1 были обнаружены в серии оптических изомеров производных пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов, IC_{50} которых находились в диапазоне концентраций 2,7–6,7 мкМ (Табл.5).

Таблица 5. Параметры IC_{50} для пространственных изомеров производных пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов.

	Структура	IC_{50} , мкМ	Eut/Dis	ER*
1D		2.3 ± 0.6	Eut	0.343
1L		6.7 ± 1.9	Dis	
2D		4.2 ± 0.3	Eut	0.808
2L		5.2 ± 0.2	Dis	
3D		3.8 ± 0.4	Eut	0.745
3L		5.1 ± 0.1	Dis	
4D		2.7 ± 0.6	Eut	0.108
4L		>25	Dis	
4'D		3.4 ± 0.2	-	-

5R		3.1 ± 0.2	Dis	0.871
5S		2.7 ± 0.2	Eut	
6R		5.8 ± 0.5	Dis	0.896
6S		5.2 ± 0.8	Eut	
7R		4.4 ± 0.8	Eut	0.956
7S		4.6 ± 0.9	Dis	
8D		>50	-	-
8L		>50	-	

*ER (эвдисмическое соотношение) = IC_{50} (Эутомер)/ IC_{50} (Дистомер)

Было показано, что D-формы 2,3,5-три-О-бензоилированной рибофуранозы **2D** и полностью О-бензоилированного уридина **3D**, более эффективно ингибировали TDP1, чем соответствующие соединения L-формы, **2L** и **3L**. Инверсия конфигурации при атоме С 2'-рибофуранозного фрагмента привела к существенному различию в ингибировании TDP1 (Рис.4А). Между производными тимина **4D** и **4L** и их 6-позиционными изомерами **4'D** и **4'L** наблюдалось наибольшее различие в эффективности ингибирования TDP1. Этот результат указывает на необходимость наличия метильной группы в пиримидине и D-конфигурации рибофуранозного фрагмента для того, чтобы нуклеозид обладал более высокой

способностью связываться с TDP1. В серии 5'-С- метилрибонуклеозидов пиримидиновые аналоги с (R)-конфигурацией при 5'-атоме углерода рибофуранозильной части проявили более низкую способность ингибировать TDP1, чем 5'(S)-изомеры (Рис.4В). Замена пиримидинового основания на пурин не привела к существенной разнице в IC₅₀ между (R) и (S)-изомерами (Рис.4В).

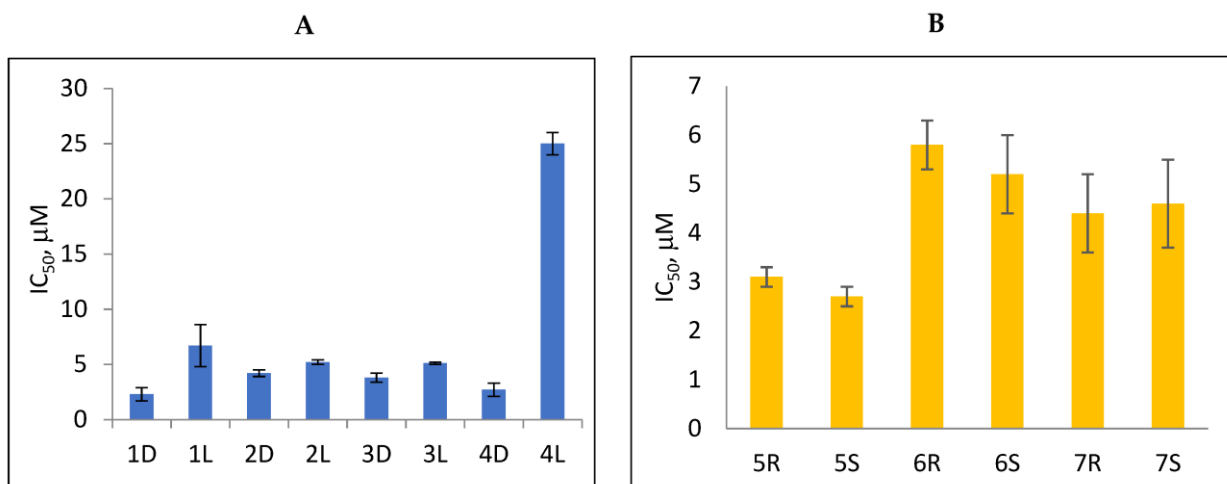


Рисунок 4. Сравнение эффективности ингибирования TDP1 (IC₅₀, мкМ) для (А) D-/L- и (В) 5'(R)/5'(S)- производных нуклеозидов.

Селективность каждой пары пространственных изомеров была проанализирована путем расчета эвдисмического соотношения (ER), фармакологического параметра, иллюстрирующего разницу в активности двух энантиомеров. Стереизомер с большей ингибирующей активностью называется эутомером (Eut), а с меньшей активностью - дистомером (Dis) [76], а ER рассчитывается как отношение IC₅₀ дистомера к IC₅₀ эутомера. Большинство соединений проявляло сравнимую селективность (ER близки к 1, Табл.5), однако производное арабинофуранозы **1D** было более селективным ингибитором, чем **1L** (ER=0,343, Табл.5), а наименьшее значение ER показано для производных тимина **4D** и **4L** (ER=0,108, Табл.5). Таким образом, пространственная изомерия может влиять на ингибирующую активность производных нуклеозидов, что стоит учитывать при дальнейшей разработке ингибиторов TDP1 на основе нуклеозидов.

В ходе работы для соединений **3D**, **3L**, **7R** и **7S** был определен тип ингибирования TDP1. Для соединений **3D** и **3L** значения кажущихся V_{max} и K_M снижались с увеличением концентрации ингибитора, что характерно для бесконкурентного типа ингибирования (Рис.ПЗ). Такие ингибиторы не связываются со свободным ферментом, а взаимодействуют с фермент-субстратным комплексом. Эта модель согласуется с результатами молекулярного моделирования, где было показано, что соединения **3D** и **3L** связываются с ферментом вблизи участка связывания ДНК (субстрата) [77]. В присутствии

соединения **7S** значение K_M увеличивалось, но значение V_{max} оставалось практически постоянным (Рис.П3). Это характерно для конкурентного типа ингибирования, т.е. **7S** связывается с активным центром TDP1 и препятствует образованию комплекса фермент-субстрат, необходимого для каталитической реакции.

Характер изменения кинетических параметров реакции в присутствии соединения **7R** не укладывался ни в одну из схем классических типов ингибирования. При этом значение V_{max} снижалось во всем диапазоне концентраций ингибитора (Рис.5), однако значение K_M увеличивалось после снижения концентрации до $IC_{50} = 4,4$ мкМ, что свидетельствует о сложном механизме ингибирования (бесконкурентном при низких концентрациях ингибитора и смешанном при высоких).

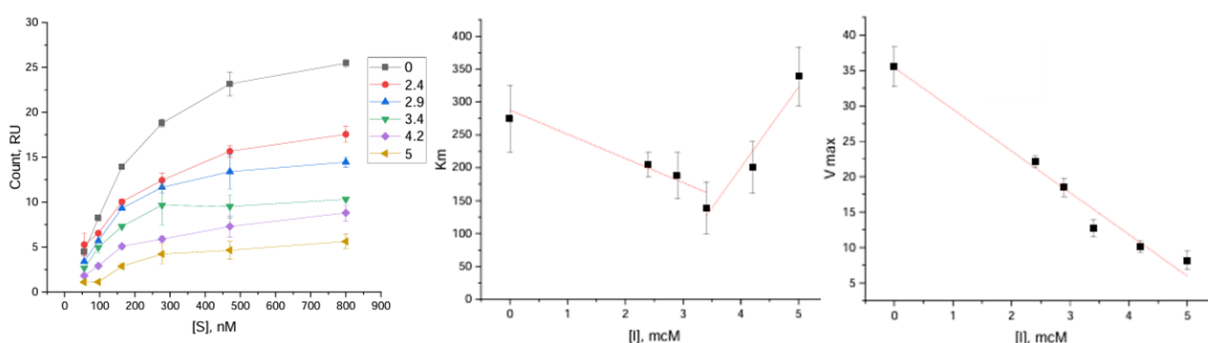


Рисунок 5. Графическое представление определения типа ингибирования TDP1 соединением **7R**. Нелинейная зависимость K_M от концентрации ингибитора свидетельствует о сложном механизме ингибирования TDP1.

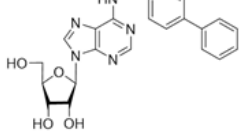
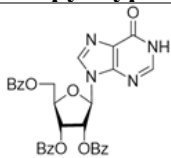
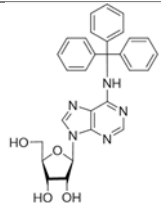
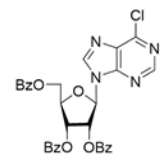
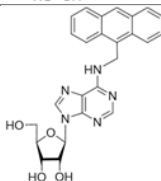
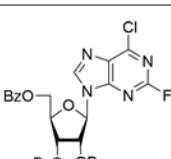
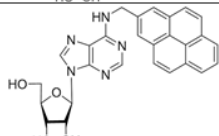
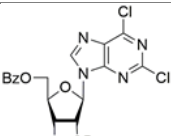
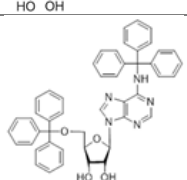
Из литературных данных известно, что среди производных природных нуклеозидов существуют эффективные ингибиторы ферментов PARP1/2 [52–54,74]. Поэтому дополнительно было изучено влияние серии пространственных изомеров производных пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов на активность ферментов PARP1/2, однако ингибиторов этих ферментов обнаружить не удалось.

1.3.3. Серия липофильных пуриновых нуклеозидов

Новые эффективные ингибиторы TDP1 были обнаружены в серии ароматических липофильных производных пуриновых нуклеозидов (**5a-f**, **6a-d**), IC_{50} которых лежат в диапазоне от 0,3 до 7 мкМ (Табл.6). Было показано, что соединения с объёмными ароматическими заместителями в гетероцикле практически не приводили к снижению активности TDP1 (соединения **5a**, **5b**, **5d**). Однако добавление объемной трифенилметильной группы в положение 5' нуклеозида в соединении **5f** приводило к радикальному снижению IC_{50} по сравнению с соединением **5b**, не имеющим такого заместителя (IC_{50} $0,3 \pm 0,06$ и >50 мкМ соответственно). На ингибирование TDP1

благоприятно влияло присутствие бензоильных групп по 2',3',5'-положениям рибофуранозного остова, поскольку группа 6 является более эффективными ингибиторами TDP1 по сравнению с группой 5, не содержащими бензоильных групп, и введение галогенов во второе и шестое положения гетероцикла. Производное 2,6-дихлорпурина **6d**, объединяющее эти факторы, оказалось одним из наиболее эффективных ингибиторов с IC_{50} $0,82 \pm 0,02$ мкМ.

Таблица 6. Величины IC_{50} , полученные для липофильных производных пуриновых нуклеозидов.

Структура	IC_{50} TDP1, мкМ	Структура	IC_{50} TDP1, мкМ
5a 	>50	6a 	7 ± 1
5b 	>50	6b 	2.0 ± 0.6
5c 	22 ± 3	6c 	1.0 ± 0.2
5d 	>50	6d 	0.82 ± 0.02
5f 	0.30 ± 0.06		

* OBz — бензоильная группа

Поскольку ранее было показано, что производные нуклеозидов могут ингибировать ферменты семейства PARP [52–54,74], мы также проверили, способны ли исследуемые соединения ингибировать ферменты PARP1 и PARP2. В результате ни одно из соединений этой серии не вызывало заметного снижения активности этих ферментов вплоть до концентрации 1 мМ (Табл.П1).

Для наиболее эффективных соединений **5f**, **6c** и **6d** был определен тип ингибирования TDP1, чтобы предположить механизм их действия. В результате для соединений **5f** и **6d** наблюдалось пропорциональное уменьшение значений V_{max} и K_M с ростом концентрации ингибитора (Рис.П4), что характерно для бесконкурентного типа ингибирования. Такие соединения, предположительно, будут более специфичными

ингибиторами TDP1, поскольку будут связываться с ферментом только в присутствии комплекса фермент-субстрат. Однако для соединения **6с** зависимость нелинейная; в этом случае $V_{\max}$ и K_M экспоненциально уменьшаются, что может указывать на более сложный механизм ингибирования TDP1 этим соединением. По этой причине данное соединение нуждается в дополнительном изучении механизма его ингибирования другими методами.

Таким образом, в ходе работы был проведен широкомасштабный скрининг соединений разных классов для поиска ингибиторов ферментов репарации ДНК TDP1, PARP1 и PARP2. Среди УБЛ, морфолиновых и липофильных производных нуклеозидов обнаружены ингибиторы PARP1 и PARP2, но в эффективности они значительно уступают применяемым на данный момент в клинической практике олапарибу, талазапарибу и нирапарибу (PARP1 IC_{50} = 5, 0.57 и 3.8 нМ соответственно против 10 мкМ для лучшего найденного ингибитора в группе морфолиновых производных нуклеозидов H2N-Mor-T (Табл.2). Однако, описанные в работе вещества являются перспективной платформой для дальнейшей разработки новых, в том числе селективных, ингибиторов данных ферментов, что может помочь снизить побочные эффекты существующих препаратов, связанные с перекрестным воздействием на другие ферменты семейства PARP. Больших успехов удалось достичь в поиске ингибиторов TDP1. Так, в ходе работы охарактеризованы ингибиторы этого фермента среди разных классов соединений с характерными IC_{50} 0,1-9 мкМ. Особый интерес также представляют двойные ингибиторы: TDP1/PARP1 (**1**, **5**, **6**) и TDP1/PARP2 (**4**, **12**), а также тройной ингибитор TDP1/PARP1/PARP2 (соединение **2**) (Табл.4), обнаруженные среди липофильных производных нуклеозидов. Такие соединения могут стать более мощным и универсальным инструментом для борьбы с устойчивыми и агрессивными формами рака путем одновременного выключения нескольких критических систем выживания опухолевой клетки.

Ингибиторы TDP1 предназначены для использования в терапевтических коктейлях для сенситизации опухолей к действию ингибиторов TOP1. Поэтому важно, чтобы они не проявляли собственной токсичности и не усиливали существующие побочные эффекты противораковой терапии. Для оценки токсичности соединений изучалось влияние наиболее эффективных ингибиторов в данной серии на выживаемость клеточной линии HeLa (рак шейки матки человека) с помощью колориметрического теста метаболической активности клеток EZ4U, который отражает выживаемость клеток в присутствии изучаемых соединений. Было показано, что производные нуклеозидов обладали умеренной или низкой цитотоксичностью в отношении клеток HeLa. Значения CC_{50} (концентрация, при которой жизнеспособность клеток снижена на 50%) варьировались в диапазоне выше 30 мкМ (Табл.7), причем некоторые соединения не оказывали влияния на выживаемость клеток в

концентрациях до 100 мкМ. В ходе исследования влияния соединений на цитотоксическое действие Трс наиболее эффективными сенсibilизаторами оказались галогензамещенные производные, содержащие атомы галогена во втором и шестом положениях азотистого основания **6c** и **6d**. Таким образом, для дальнейшего исследования мы выбрали три наиболее активных ингибитора TDP1: **5f**, **6c** и **6d**. Соединение **5f** имело наименьшее значение IC_{50} ($0,30 \pm 0,06$ мкМ, Табл.6). Соединения **6c** и **6d** также были эффективными ингибиторами TDP1 и сенсibilизировали клетки к действию Трс.

Таблица 7. CC_{50} ингибиторов TDP1, обнаруженных среди липофильных пуриновых нуклеозидов.

Соединение	TDP1 IC_{50} , μ M	HeLa CC_{50} , μ M	Снижение CC_{50} Трс, раз
5f	0.30 ± 0.06	>100	1.7
6a	7 ± 1	58 ± 5	1.8
6b	2.0 ± 0.6	56 ± 26	1.9
6c	1.0 ± 0.2	35 ± 20	6.5
6d	0.82 ± 0.02	33 ± 15	4.8

Было исследовано влияние самых эффективных ингибиторов TDP1 **5f** и **6d** на количество повреждений ДНК, вызванных Трс с помощью метода щелочного анализа комет (Comet assay). Обработка соединениями **5f** и **6d** в концентрациях до 1 мМ не повлияла на целостность ДНК (процент ДНК в хвосте для клеток, обработанных только ингибиторами, был сопоставим с тем же параметром для необработанных клеток или клеток, обработанных 1% ДМСО, Рис.П5). При обработке комбинацией 10 мкМ Трс и **5f** количество повреждений ДНК (% ДНК в хвосте) существенно не отличалось от количества повреждений, вызванных только Трс (Рис.6). Соединение **6d**, напротив, увеличивало количество повреждений ДНК с увеличением концентрации в сочетании с 10 мкМ Трс (Рис.6). Было также показано, что процент повреждения ДНК был схожим в экспериментах, где клетки обрабатывались только Трс 10 мкМ и комбинацией Трс 1 мкМ и **6d** 5 мкМ (Рис.П6). Таким образом, *in vitro* удалось снизить дозу химиотерапевтического препарата Трс, необходимую для достижения серьезного уровня повреждения ДНК, в 10 раз в присутствии ингибитора TDP1 **6d**.

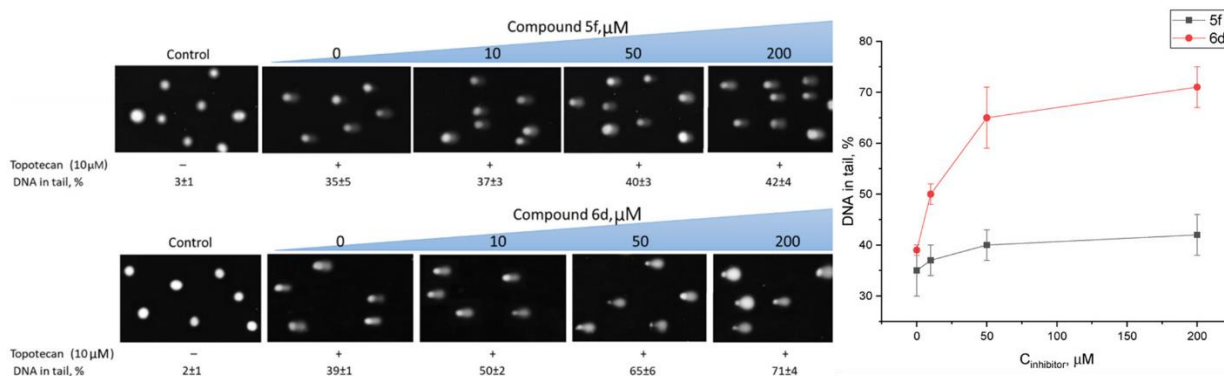


Рисунок 6. Влияние соединений **5f** и **6d** на накопление повреждений ДНК, вызванных топотеканом. Изображения клеток, обработанных комбинацией топотекана и лидерных соединений в различных концентрациях (слева). Зависимость процента ДНК в хвосте от концентрации ингибитора TDP1 (справа). Наблюдается дозозависимое увеличение % ДНК хвоста с увеличением концентрации **6d**. Погрешности показывают стандартное отклонение (SD) для двух независимых экспериментов.

Влияние соединений **5f**, **6c** и **6d** на эффективность Трс было изучено также в экспериментах *in vivo* на модели асцитной карциномы Кребс-2 мышей. Карцинома Кребс-2 может быть трансплантирована мышам различной генетической конституции. При внутрибрюшинной инокуляции она образует асцитную форму и не метастазирует [46,47]. В ходе эксперимента мышам внутрибрюшинно вводили 2 млн опухолевых клеток, после чего на месте инокуляции разрасталась жидкая асцитная опухоль. Далее мышей разделили на контрольную группу, не получавшую лечения, и четыре группы, которым лечение проводилось внутрибрюшинно однократно на четвёртый день после инокуляции опухоли: (1) растворитель (растворитель ДМСО 15% + Твин-80 10% в физиологическом растворе); (2) Трс – 1 мг/кг массы тела; (3) Трс – 1 мг/кг и ингибитор TDP1 – 100 мг/кг; (4) ингибитор TDP1 – 100 мг/кг (согласно схеме на Рис.7А). Влияние препаратов на опухоль оценивали в конце эксперимента по массе асцитной опухоли (разница между массой мыши с опухолью и после удаления опухоли), а также по количеству опухолевых клеток в асците.

Совместное лечение Трс и соединениями **5f** и **6c** не привело к достоверному снижению массы и количества клеток опухоли по сравнению с применением только Трс (Рис.П7). Напротив, соединение **6d** в сочетании с Трс приводило к значительному снижению характеристик опухоли по сравнению с применением только Трс ($p = 0,0018$) (Рис.7В), тогда как сам ингибитор TDP1 не влиял на эти параметры.

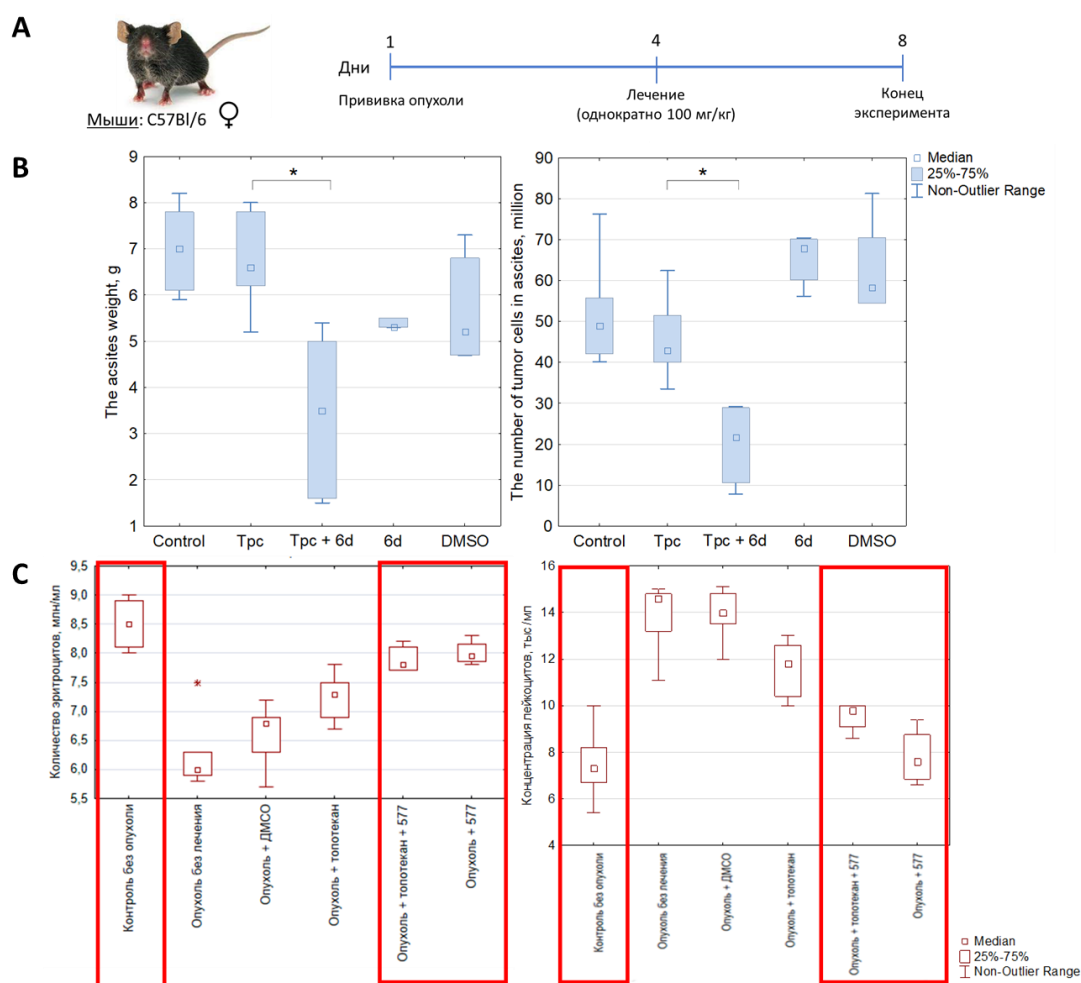


Рисунок 7. Исследование влияния соединения **6d** (**577**) на противоопухолевый эффект топотекана *in vivo* на модели карциномы Кребс-2. **A**) Схема дизайна эксперимента. **В**) Слева представлены данные по массе асцитической жидкости; справа – по количеству опухолевых клеток в асцитической жидкости, * $p < 0,01$. Соединение **6d** в сочетании с Трс приводило к синергетическому уменьшению размера опухоли по сравнению с применением только Трс. **С**) Результаты подсчета элементов крови мышей: эритроцитов (слева) и лейкоцитов (справа).

В ходе исследования периферической крови животных наблюдалась нормализация кроветворения, угнетенного опухолевым процессом и действием Трс, под действием лидерного соединения **6d**. Так, у мышей с привитой опухолью, не получавших лечения, или получающих только Трс, число эритроцитов оказалось в 1,5 и 1,3 раза ниже референтных значений соответственно (Рис.7С). У мышей в этих группах также наблюдалось повышение количества лейкоцитов в 2 раза по сравнению со здоровыми животными, что указывает на активацию иммунной системы и воспалительный процесс. Однако, при дополнительном введении соединения **6d** эти показатели возвращались в норму. Таким образом соединение **6d** способно не только усиливать эффективность химиотерапии Трс, но и снижать побочные проявления опухолевого процесса в виде анемии и воспалительного процесса. Похожие данные были получены в нашей лаборатории для ингибиторов TDP1, обнаруженных среди производных усниновой кислоты [71,78]. По-видимому,

гематопротекторные свойства – общий признак ингибиторов TDP1, однако это требует проведения дальнейших исследований, в том числе среди ингибиторов TDP1, принадлежащих другим классам соединений.

2. Создание нокаутов

Среди липофильных производных нуклеозидов был обнаружен ингибитор TDP1 (соединение **6d**, лабораторный шифр 577, $IC_{50} = 0,82 \mu M$), который был способен повышать чувствительность клеток HeLa к топотекану, повышал уровень повреждений ДНК, вызванных Трс *in vitro* и усиливал противоопухолевый эффект Трс *in vivo* на мышинной модели асцитной карциномы Кребс-2 [79]. Однако, несмотря на эффективное ингибирование рекомбинантного фермента TDP1, точный механизм действия соединения 577 остается неизвестным.

Исходя из предположения об усилении действия Трс именно через подавление функции TDP1, при отсутствии этого фермента синергия не должна наблюдаться. Для проверки этой гипотезы была создана панель клеточных клонов, с нокаутом по гену *TDP1*, на базе линии A549 (аденокарцинома легкого) с использованием метода CRISPR-Cas9 согласно схеме на Рисунке 8А. Клеточная модель была выбрана в связи с тем, что одним из показаний для назначения Трс является рак легкого [80,81]. В ходе работы клетки A549 трансфицировали плазмидой pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458), экспрессирующей направляющую РНК, нуклеазу SpCas9 и флуоресцентный белок EGFP. Затем клетки, содержащие EGFP, были отсортированы в планшет по одной в лунку с помощью клеточного сортера. В результате были получены 4 клеточные линии, предположительно содержащие делеции в области третьего экзона, который является первым белок-кодирующим в гене *TDP1* (согласно схеме на Рис.8А) – B5, B6, B10, E3. Полученные клоны были охарактеризованы с помощью ПЦР и вестерн-блот анализа, а также была проведена оценка уровня активности TDP1 в цельноклеточных экстрактах клеток.

Геномная ДНК четырех клеточных клонов была проанализирована с помощью ПЦР на наличие делеций в целевых участках. Было показано, что клон E3 не содержит целевую делецию (Рис.8В, дорожка 1), в то время как для остальных клонов было характерно наличие ПЦР продукта (~ 300 п.о.), соответствующего укороченному фрагменту гена *TDP1* с делецией (Рис.8В дорожки 2, 3, 4 для B5, B6, B10 соответственно). Однако, мы не можем говорить о гомозиготности этих клеток, поскольку мы наблюдали также в геле ПЦР-продукт, соответствующий по подвижности полноразмерному гену TDP1 (продукт ~ 550 п.о., Рис.8В, дорожка WT).

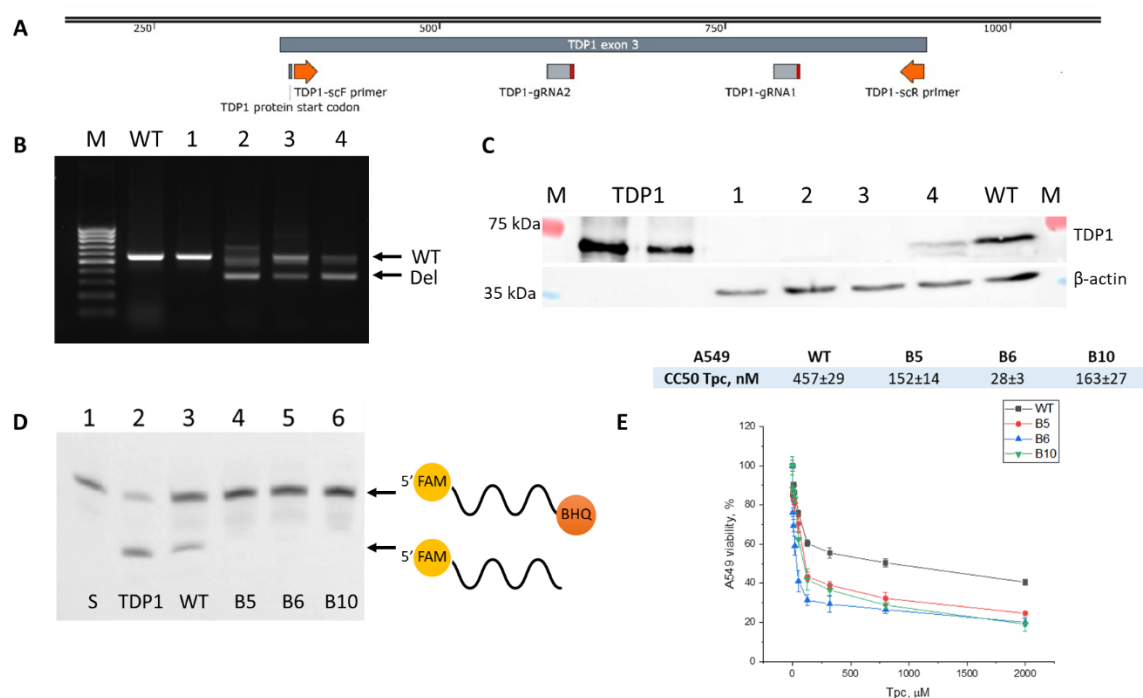


Рисунок 8. Создание панели клонов TDP1-KO на базе линии клеток A549 и их характеристика. **A)** Схема вносимой с помощью системы CRISPR-Cas9 делеции и положения праймеров для ПЦР-анализа. **B)** Электрофореграмма результата ПЦР геномной ДНК полученных клонов. М- 100 bp ladder molecular size marker (100-1000 bp). Для клонов B5, B6 и B10 (дорожки 2, 3 и 4 соответственно) показано наличие продукта, соответствующего делеции целевого гена, в то время как клон E3 полностью соответствует клеткам дикого типа (дорожка 1). **C)** Western-blot анализ цельноклеточных экстрактов клеток A549. В дорожках 1, 2 и 3 (клеточные линии B5, B6 и B10 соответственно) отсутствует полоса, соответствующая белку TDP1. Дорожка 4 отражает присутствие белка в экстракте клеток клона E3. **D)** Электрофореграмма, полученная в ходе изучения активности TDP1 в цельноклеточных экстрактах клеток A549 WT и TDP1-KO. Продукт ферментативной реакции TDP1 отсутствует для клонов B5, B6 и B10 (дорожки 4, 5 и 6 соответственно). **E)** Изучение влияния Трс на относительную выживаемость клеток A549 WT и TDP1-KO. Показана гиперчувствительность клеток нокаутных по гену *TDP1* к Трс.

Ввиду неоднозначности данных, полученных методом ПЦР, был проведен вестерн-блот анализ, чтобы оценить уровень белка TDP1 в цельноклеточных экстрактах полученных клонов. Показано, что в линиях B5, B6 и B10 целевой белок отсутствует (Рис.8С дорожки 1, 2, 3 соответственно), в то время как в клетках E3 обнаруживается бенд, соответствующий TDP1 (Рис.8С, дорожка 4). Так как клон E3 по результатам ПЦР не содержит делецию в гене TDP1 и экспрессирует целевой белок, мы исключили его из дальнейших исследований.

В ходе работы была изучена ферментативная активность TDP1 в цельноклеточных экстрактах линий A549 WT и TDP1-KO (B5, B6 и B10) с последующим разделением продуктов ферментативной реакции в ПААГ. Для всех изученных клонов было характерно отсутствие на геле бенда, соответствующей продукту реакции (Рис.8D, дорожки 4, 5, 6 для

B5, B6, B10 соответственно), который присутствовал в пробах с очищенным рекомбинантным ферментом TDP1 и контрольным клеточным экстрактом A549 WT.

Из литературных данных известно, что клетки, в которых отсутствует экспрессия TDP1, проявляют гиперчувствительность к камптотецину и его производным, таким как Трс [82,83]. Поэтому с помощью МТТ теста мы проанализировали относительное количество жизнеспособных клеток после обработки панели клонов A549 TDP1-KO Трс в различных концентрациях (Рис.8Е). Было показано, что все отобранные TDP1-KO клоны были более чувствительны к действию ингибитора TOP1, чем клетки дикого типа. Полутоксические концентрации CC_{50} для клонов B5 и B10 были примерно в 3 раза ниже, чем для клеток дикого типа (152 ± 14 нМ и 163 ± 27 нМ против 457 ± 29 нМ). Самой чувствительной к Трс оказалась клеточная линия B6, демонстрирующая 15-ти кратное снижение параметра CC_{50} относительно A549 WT (28 ± 3 нМ).

Ранее было показано существенное снижение числа метастазов у мышей с карциномой Льюис под действием ингибиторов TDP1 – производных усниновой кислоты [71,72]. Такое антиметастатическое действие может быть следствием как ингибирования TDP1, так и воздействия производных усниновой кислоты на другие клеточные мишени. Нокаут TDP1 в клетках HEK293A приводил к снижению подвижности клеток в тесте на заживление ран. Транскриптомный анализ клеток HEK293A с нокаутом по гену *TDP1* выявил изменения в экспрессии генов, связанных с клеточной адгезией, коммуникацией и сигнальным путем MAPK, которые важны для развития опухоли [84]. Поэтому в рамках данной работы была изучена способность клеток A549WT и TDP1-KO к инвазии и метастазированию путем анализа миграции клеток в монослойной культуре методом заращения царапины, или раневой поверхности.

Скорость заращения царапины для клонов A549 TDP1-KO статистически не отличалась от клеток A549 дикого типа (Рис.9). Таким образом, дефицит TDP1, по-видимому, может потенциально влиять на клеточную адгезию, однако, этот эффект зависит и от других факторов. Для полного понимания роли TDP1 в инвазии и метастазировании опухолей необходимы дальнейшие исследования, включающие комплексный анализ молекулярных механизмов действия TDP1, изучение его влияния на метастатический потенциал опухолей *in vitro* и *in vivo*, а также изучение корреляции уровня TDP1 с прогнозом, стадией опухоли и ответом на лечение, что выходит за рамки цели данного исследования.

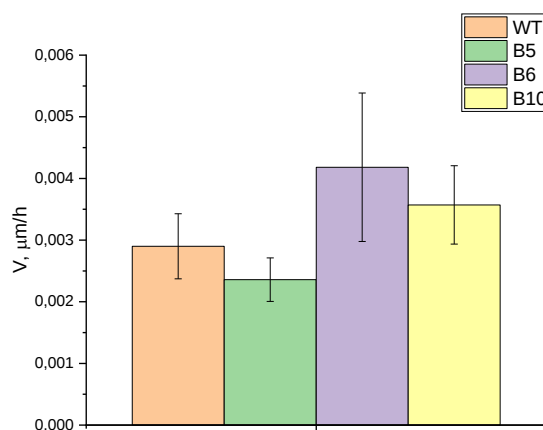


Рисунок 9. Гистограмма, отражающая скорость застывания царапины клетками A549 WT и TDP1-KO (скорость уменьшения ширины царапины, $\mu\text{m/h}$).

Таким образом, для дальнейшей работы были выбраны клеточные клоны A549 TDP1-KO B5, B6, B10, так как они содержат делецию гена *TDP1*, не экспрессируют белок TDP1, и их клеточные экстракты не обладают специфичной для этого фермента активностью. Эти клеточные линии не отличаются от клеток дикого типа по скорости пролиферации, а также проявляют гиперчувствительность к Трс, что согласуется с литературными данными.

3. Изучение влияния соединения 577 на действие топотекана на линиях клеток с дефицитом TDP1

В ходе работы была изучена способность соединения 577 усиливать действие Трс на линиях клеток A549 WT и TDP1-KO. С помощью МТТ теста было показано, что соединение 577 в нетоксичных концентрациях 5 и 10 μM ($\text{CC}_{50} \geq 20 \mu\text{M}$, кривые выживаемости представлены на Рис.П8) усиливает цитотоксическое действие Трс на клетках A549 дикого типа в 3 и 4 раза соответственно (Рис.10А). Для исключения аддитивного действия комбинации препаратов с помощью программы CompuSyn были рассчитаны комбинаторные индексы (CI) для каждого сочетания Трс и 577. Значение $\text{CI} < 1$, $= 1$ и > 1 указывают на синергизм, аддитивный эффект и антагонизм соответственно. Интересно, что $\text{CI} < 1$ и, соответственно, синергический эффект препаратов наблюдается не во всем диапазоне концентраций Трс, а лишь на участке 120 - 5000 нМ (Табл. П2). Эти результаты указывают на перспективность соединения 577 как сенситизатора Трс, однако для подбора оптимального соотношения препаратов необходимы дополнительные исследования. В случае экспериментов на линиях клеток A549 TDP1-KO, кривые выживаемости клеток при обработке Трс и его комбинацией с соединением 577 совпадали для всех клеточных клонов, то есть синергического эффекта не наблюдалось. В качестве

репрезентативного примера представлены результаты для клона В6 (Рис. 10А), данные для линий клеток В5 и В10 представлены в Приложении (Рис.П9).

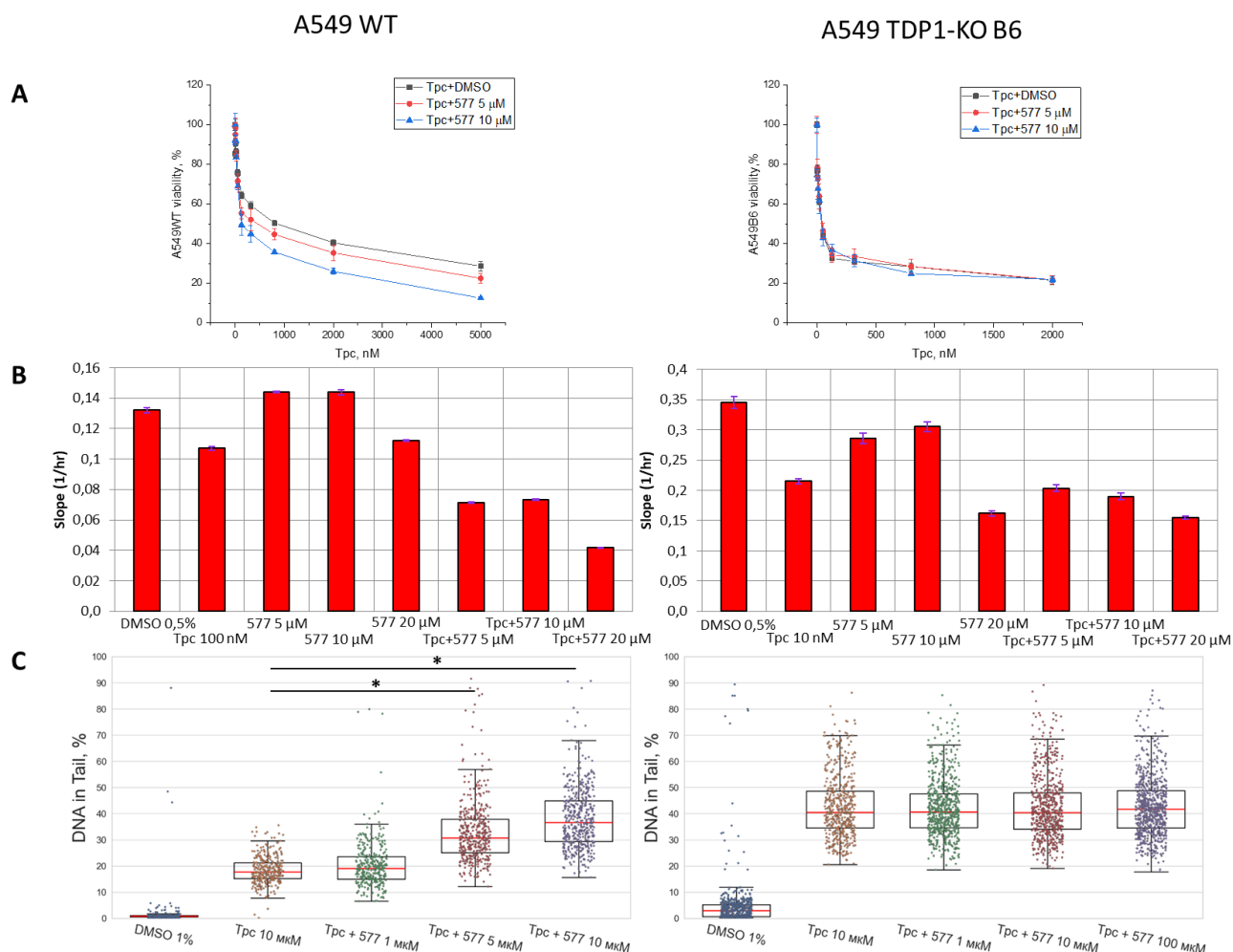


Рисунок 10. Изучение влияния соединения 577 на действие Трс на линии клеток A549 WT и TDP1-KO B6. **А)** Данные выживаемости, полученные методом МТТ. При совместном действии Трс и 577 наблюдается снижение выживаемости клеток A549 WT (слева) и отсутствие синергии на клетках B6 (справа), **В)** Данные выживаемости, полученные by the impedance-based real-time assay on the xCELLigence System. При совместном действии Трс и 577 наблюдается снижение клеточного индекса в сравнении с индивидуальным Трс для клеток A549 WT (слева) и отсутствие синергии на клетках B6 (справа) **С)** Уровень повреждения клеточной ДНК, оцененный в ходе Alkaline Comet assay. Процент ДНК в хвосте статистически значимо (*p<0.01) увеличивается при совместной обработке клеток A549WT (слева) Трс и соединением 577 относительно обработки Трс в монорежиме. Такого эффекта не наблюдалось в случае клеток TDP1-KO B6 (справа); процент ДНК в хвосте группы Трс и его комбинаций с соединением 577 не отличается.

В дополнение к методу МТТ мы использовали также систему xCELLigence для непрерывного мониторинга живых клеток в реальном времени, принцип работы которой заключается в детектировании электрического сопротивления в лунках планшета раз в заданный промежуток времени, что позволяет получить график - функцию зависимости клеточного индекса (величина, пропорциональная количеству клеток) от времени. В ходе работы наблюдалось снижение клеточного индекса для клеток A549 дикого типа в 1,5 (в концентрации 5 и 10 μ M) и в 2 раза (в концентрации 20 μ M) при применении соединения

577 совместно с Трс по сравнению с обработкой Трс в монорежиме (Рис.10В). Этот эффект не наблюдался при обработке клеток А549 с дефицитом TDP1, что подтверждает данные, полученные методом МТТ (Рис.10В).

Механизм действия Трс заключается в стабилизации TOP1 на разрывах ДНК, генерируемых самим ферментом в процессе его каталитического цикла. Образующиеся в результате TOP1cc в ходе репарации ДНК быстро делящихся клеток приводят к накоплению одно- и двуцепочечных разрывов ДНК [21]. Дополнительное применение ингибиторов TDP1 может приводить к увеличению уровня такого типа повреждений и более эффективной гибели опухолевых клеток. Поэтому далее был оценен уровень повреждений ДНК клеток А549 WT и TDP1-KO под действием Трс и его комбинации с соединением 577 методом щелочного анализа комет (Alkaline Comet assay). В ходе работы было показано, что процент ДНК в хвосте клеток А549 дикого типа при обработке Трс индивидуально и в комбинации с соединением 577 не отличался ($18\pm3\%$ и $20\pm4\%$ соответственно, Рис.10С). Использована концентрация соединения 577, равная $1\text{ }\mu\text{M}$, что практически соответствует величине IC_{50} ($0,82\text{ }\mu\text{M}$). Такой концентрации соединения 577 в культуральной среде, вероятно, недостаточно для ингибирования фермента TDP1 в клетке. При концентрациях соединения 577 выше IC_{50} наблюдалось повышение уровня повреждений ДНК, по сравнению с обработкой только Трс. При повышении концентрации 577 в составе комбинации с Трс наблюдалось статистически значимое ($p<0.01$) увеличение уровня повреждений ДНК (Рис.10С). Процент ДНК в группе комбинированной обработки препаратами составил $33\pm3\%$ с соединением 577 в концентрации $5\text{ }\mu\text{M}$ и $39\pm3\%$ в концентрации $10\text{ }\mu\text{M}$ против $18\pm3\%$ в группе, обработанной только Трс. В аналогичном эксперименте при обработке Трс клеточных клонов А549 с дефицитом TDP1 наблюдалось увеличение процента ДНК в хвосте до 40% для всех линий, что свидетельствует о повышенной чувствительности к Трс (Рис.10С, П9). Однако, при совместной обработке соединение 577 не влияло на уровень повреждений ДНК, генерируемых Трс (Рис.10С, П9).

Таким образом, тремя независимыми методами было показано, что соединение 577 способно усиливать действие Трс на клеточной линии А549 WT. При этом синергический эффект соединения 577 зависит от присутствия в клетках фермента TDP1, что подтверждается отсутствием статистически значимого усиления действия Трс на трех линиях клеток А549 TDP1-KO во всех проведенных экспериментах. Эти данные подтверждают, что молекулярный механизм синергического взаимодействия соединения 577 и Трс может быть опосредован именно через ингибирование или модуляцию активности TDP1.

Дополнительно была изучена способность соединения 577 усиливать действие Трс на линии HEK293A WT и TDP1-KO, которые ранее были получены и охарактеризованы в нашей лаборатории [85]. С помощью МТТ теста было показано, что соединение 577 в нетоксичных концентрациях (параметры CC_{50} приведены на Рис.П10) не влияет на процент выживаемости клеток HEK293A WT и TDP1-KO под действием Трс (Рис.11А и Рис.П11 соответственно). Аналогичные результаты для клеток HEK293A дикого типа были получены в экспериментах непрерывного мониторинга живых клеток в реальном времени с помощью системы xCELLigence (Рис.11В). Было показано, что применение Трс совместно с соединением 577 приводило к аддитивному снижению клеточного индекса линии HEK293A по сравнению с использованием препаратов по отдельности. Синергического усиления действия ингибитора TOP1 также не происходило на уровне количества повреждений ДНК по результатам экспериментов Comet assay. Процент ДНК в хвосте клеток HEK293A WT составил около 27% и статистически не отличался в группах, обработанных Трс индивидуально и в комбинации с серией концентраций соединения 577 (Рис.11С).

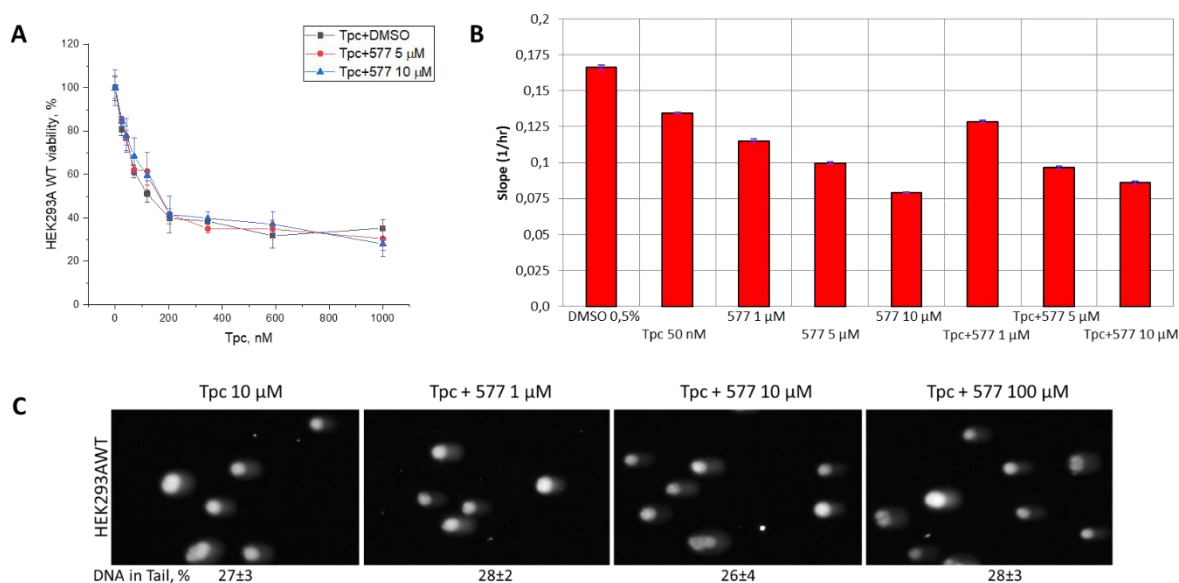


Рисунок 11. Изучение влияния соединения 577 на действие Трс на линии клеток HEK293A WT. Данные цитотоксичности получены А) методом МТТ, В) by the impedance-based real-time assay on the xCELLigence System. С) Микрофотографии клеток, полученные в ходе Alkaline Comet assay. Уровень повреждений ДНК клеток HEK293A WT в присутствии только Трс и его комбинации с соединением 577 не отличается (длины хвостов и процент ДНК в хвосте в этих группах одинаковы).

Отсутствие влияния соединения 577 на действие Трс на клетках HEK293A дикого типа может свидетельствовать об избирательном действии этого соединения в отношении опухолевых клеток. Возможно, это связано с различиями в уровне экспрессии TDP1, особенностях посттрансляционных модификаций фермента или взаимодействии с другими

белками репарационного комплекса. Кроме того, нельзя исключать, что проницаемость мембраны для соединения 577 или эффективность его внутриклеточного накопления в линиях НЕК293А и А549 отличается. Эти данные подчеркивают потенциальную терапевтическую ценность соединения 577, поскольку его избирательное действие на опухолевые клетки может означать более благоприятный профиль безопасности при возможном клиническом применении. Однако для подтверждения этой гипотезы необходимы дальнейшие исследования на более широком наборе опухолевых и условно нормальных клеточных линий.

Таким образом, в ходе исследования методами МТТ, xCELLigence и Comet assay было установлено, что соединение 577, которое эффективно ингибирует рекомбинантный фермент TDP1, способно усиливать цитотоксическое и ДНК-повреждающее действие Трс на клеточной линии А549 WT. Для клеточных клонов с нокаутом по *TDP1* было показано, что в отсутствие TDP1 синергетический эффект соединения 577 и Трс не наблюдался. Полученные данные указывают на то, что соединение 577 усиливает действие Трс именно через ингибирование TDP1, и подчеркивают важность этого фермента как мишени для повышения эффективности терапии рака препаратом - ингибитором TOP1.

ВЫВОДЫ

1. В ходе скрининга серии узкобороздочных лигандов, морфолиновых и липофильных производных нуклеозидов были обнаружены ингибиторы ферментов репарации ДНК (TDP1, PARP1, PARP2). Аминотетилморфолиновые производные нуклеозидов проявили себя как наиболее эффективные ингибиторы PARP1/2 (IC_{50} 10 – 140 мкМ), при этом предпочтительными основаниями являются Thy и Ura, а введение галогена по 5-положению Ura приводит к снижению значения параметра IC_{50} в ряду Cl<Br<I. Эффективные ингибиторы TDP1 обнаружены среди узкобороздочных лигандов (IC_{50} 0,1 – 9 мкМ), причем более низкими значениями IC_{50} преимущественно обладали димерные соединения. Для липофильных производных нуклеозидов (IC_{50} TDP1 0,48 – 7 мкМ) показано, что D-изомеры в основном более эффективно ингибируют TDP1, и введение остатков бензойной кислоты по рибофуранозному фрагменту нуклеозида или объемных липофильных заместителей по азотистому основанию приводили к снижению значения IC_{50} .
2. Определен тип ингибирования ферментов PARP1 и TDP1 наиболее эффективными соединениями. Показано, что аминотетилморфолиновые производные нуклеозидов ингибируют PARP1 по смешанному типу, однако разница в значениях K_i и $K_i(2)$

указывает на предпочтительное взаимодействие тестируемых соединений именно в NAD⁺-связывающем кармане PARP1. Показано также, что все обнаруженные ингибиторы TDP1 снижают активность этого фермента путем взаимодействия с фермент-субстратным комплексом (бесконкурентный тип ингибирования).

3. Показано, что найденные ингибиторы TDP1 не влияют ($CC_{50} > 100$ мкМ) или оказывают слабое влияние ($CC_{50} > 30$ мкМ) на выживаемость клеточной линии HeLa (рак шейки матки). Наиболее эффективными сенситизаторами клеток к действию топотекана (Трс) являлись 2, 6-галогензамещенные липофильные производные нуклеозидов **6c** и **6d** (снижали CC_{50} Трс в 6,5 и 4,8 раза соответственно). Методом щелочного анализа комет (Comet assay) показано, что соединение **6d** дозозависимо увеличивает количество повреждений ДНК клеточной линии HeLa, генерируемых Трс (с 39 ± 1 до $71 \pm 4\%$), а также показана возможность снижения дозы Трс в комбинации с соединением **6d** с сохранением уровня повреждений ДНК. Соединение **6d** в сочетании с Трс *in vivo* приводило к достоверному снижению массы опухоли Кребс-2 по сравнению с применением только Трс, а также проявило гематопротекторные свойства.
4. В ходе работы получены 3 клеточные линии с нокаутом по гену *TDP1* (A549 TDP1-KO B5, B6, B10) с помощью метода CRISPR-Cas9. Было показано, что они содержат делецию гена *TDP1*, не экспрессируют белок TDP1, а их клеточные экстракты не обладают специфичной для этого фермента активностью. Эти клеточные линии не отличаются от клеток дикого типа по скорости пролиферации, однако проявляют гиперчувствительность к Трс.
5. В ходе исследования клеточных линий A549 WT и TDP1-KO методами MTT, xCELLigence и Comet assay было установлено, что соединение **6d** способно усиливать цитотоксическое и ДНК-повреждающее действие Трс на клеточной линии A549 WT, однако в отсутствие TDP1 синергетического эффекта не наблюдается, что указывает на роль этого фермента в механизме действия исследуемого ингибитора TDP1 на клеточном уровне.

Публикации по теме диссертации

Статьи:

1. Dyrkheeva NS, **Chernyshova IA**, Ivanov GA, et al. In Vitro and In Silico Studies of Human Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 (Tdp1) Inhibition by Stereoisomeric Forms of Lipophilic Nucleosides: The Role of Carbohydrate Stereochemistry in Ligand-Enzyme Interactions. *Molecules*. 2022;27(8):2433. <https://doi.org/10.3390/molecules27082433>

2. **Chernyshova I. A.** et al. The Lipophilic Purine Nucleoside—Tdp1 Inhibitor—Enhances DNA Damage Induced by Topotecan In Vitro and Potentiates the Antitumor Effect of Topotecan In Vivo //Molecules. – 2022. – Т. 28. – №. 1. – С. 323. <https://doi.org/10.3390/molecules28010323>
3. **Chernyshova, I.**, Vasil'eva, I., Moor, N., Ivanisenko, N., Kutuzov, M., Abramova, T., ... & Lavrik, O. (2024). Aminomethylmorpholino Nucleosides as Novel Inhibitors of PARP1 and PARP2: Experimental and Molecular Modeling Analyses of Their Selectivity and Mechanism of Action. International Journal of Molecular Sciences, 25(23), 12526. <https://doi.org/10.3390/ijms252312526>

Тезисы:

1. **Чернышова И.А.**, Дырхеева Н.С., Захаренко А.Л., Дреничев М.С., Михайлов С.Н., Лаврик О.И. Разработка ингибиторов тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 для применения в противоопухолевой терапии. Молекулярные основы заболеваний: что молекулярная биология может сделать для современной медицины научная школа-конференция для молодых ученых MBD2021, с. 30.
2. **Чернышова И.А.**, Дырхеева Н.С., Захаренко А.Л., Дреничев М.С., Михайлов С.Н., Лаврик О.И. Ингибиторы тирозил-ДНК фосфодиэстеразы 1 как сенситизаторы топотекана. Успехи молекулярной онкологии. 2021; Т. 8, №4, с. 158.
3. **Chernyshova IA**, Dyrkheeva NS, Zakharenko AL, Drenichev MS, Oslovsky VE, Ivanov GA, Kurochkin NN, Mikhailov SN, Lavrik OI. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 Inhibitors as topotecan sensitizers. Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/ Systems Biology. 2022; с. 972-973.
4. **Чернышова И.А.**, Корниенко Т.Е., Дырхеева Н.С., Захаренко А.Л., Дреничев М.С., Михайлов С.Н., Лаврик О.И. Липофильный пуриновый нуклеозид – ингибитор Tdp1 – перспективный сенситизатор топотекана для применения в противоопухолевой терапии. Сборник материалов международной конференции «Генетические технологии в трансляционной биомедицине», с. 53
5. **Чернышова И.А.**, Корниенко Т.Е., Дырхеева Н.С., Захаренко А.Л., Дреничев М.С., Михайлов С.Н., Лаврик О.И. Липофильный пуриновый нуклеозид – перспективный сенситизатор противоопухолевого действия топотекана. Материалы всероссийской конференции «От микробиологии к генетическим технологиям». Новосибирск, 22–25 сентября 2023 г., с. 125.
6. **Чернышова И.А.**, Корниенко Т.Е., Дырхеева Н.С., Захаренко А.Л., Дреничев М.С., Михайлов С.Н., Лаврик О.И. Поиск ингибиторов Tdp1 для комбинированного

- применения в противоопухолевой терапии с топотеканом. Сборник тезисов докладов всероссийской конференции «Политех наукам о жизни», с. 187.
7. **Чернышова И. А.**, Корниенко Т. Е. 1, Дырхеева Н. С., Захаренко А. Л., Дреничев М. С. 2, Лаврик О. И. Липофильный пуриновый нуклеозид - ингибитор Tdp1 - эффективный сенсibilизатор топотекана *in vitro* и *in vivo*. Сборник тезисов молодежной школы-конференции BioTop-2023: Достижения молодых ученых ИХБФМ, с. 19.
 8. **И.А. Чернышова**, Т.Е. Корниенко, Н.С. Дырхеева, А.Л. Захаренко, М.С.Дреничев, О.И. Лаврик. Липофильные нуклеозиды как сенсibilизаторы топотекана *in vitro* и *in vivo*. Сборник тезисов X Юбилейного Всероссийского форума молодых исследователей «ХимБиоSeasons 2024», с. 195.
 9. **И.А. Чернышова**, Т.Е. Корниенко, Н.С. Дырхеева, А.Л. Захаренко, М.С.Дреничев, О.И. Лаврик. Ингибиторы тирозил –ДНК-фосфодиэстеразы 1 как потенциальные онкопрепараты: исследование *in vitro* и *in vivo*. Материалы V всероссийской конференции, приуроченной к 40-летию ИХБФМ СО РАН. – Новосибирск, с. 31.
 10. **И.А. Чернышова**, Т.Е. Корниенко, Н.С. Дырхеева, А.Л. Захаренко, М.С.Дреничев, О.И. Лаврик. Ингибиторы тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 на базе липофильных производных нуклеозидов как сенсibilизаторы топотекана *in vitro* и *in vivo*. Материалы II Всероссийской научной школы-конференции молодых ученых и студентов «Генетические технологии в исследованиях природных соединений», с. 64.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen C. New Research Directions in DNA Repair. BoD – Books on Demand, 2013. 676 с.
2. Konopka A., Atkin J.D. The Role of DNA Damage in Neural Plasticity in Physiology and Neurodegeneration // *Front. Cell. Neurosci. Frontiers*, 2022. Т. 16.
3. Gesuete R. и др. Glial Cells Drive Preconditioning-Induced Blood-Brain Barrier Protection // *Stroke*. Lippincott Williams & Wilkins Hagerstown, MD, 2011.
4. Amé J., Spenlehauer C., De Murcia G. The PARP superfamily // *BioEssays*. 2004. Т. 26, № 8. С. 882–893.
5. Azarm K., Smith S. Nuclear PARPs and genome integrity // *Genes Dev*. 2020. Т. 34, № 5–6. С. 285–301.
6. Zhen Y., Yu Y. Proteomic Analysis of the Downstream Signaling Network of PARP1 // *Biochemistry*. 2018. Т. 57, № 4. С. 429–440.
7. Gros Lambert J., Prokhorova E., Ahel I. ADP-ribosylation of DNA and RNA // *DNA Repair (Amst)*. 2021. Т. 105. С. 103144.
8. Spiegel J.O., Van Houten B., Durrant J.D. PARP1: Structural insights and pharmacological targets for inhibition // *DNA Repair (Amst)*. 2021. Т. 103. С. 103125.
9. Rouleau-Turcotte É. и др. Captured snapshots of PARP1 in the active state reveal the mechanics of PARP1 allostery // *Mol Cell*. 2022. Т. 82, № 16. С. 2939-2951.e5.
10. Hoch N.C., Polo L.M. ADP-ribosylation: from molecular mechanisms to human disease // *Genet Mol Biol*. 2019. Т. 43, № 1 suppl 1. С. e20190075.
11. Farmer H. и др. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy // *Nature*. 2005. Т. 434, № 7035. С. 917–921.
12. Ellisen L.W. PARP inhibitors in cancer therapy: promise, progress, and puzzles // *Cancer Cell*. 2011. Т. 19, № 2. С. 165–167.
13. Lord C.J., Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic // *Science*. 2017. Т. 355, № 6330. С. 1152–1158.
14. Liu Y. и др. Vault poly(ADP-ribose) polymerase is associated with mammalian telomerase and is dispensable for telomerase function and vault structure in vivo // *Mol Cell Biol*. 2004. Т. 24, № 12. С. 5314–5323.
15. Rosado M.M. и др. Beyond DNA repair, the immunological role of PARP-1 and its siblings // *Immunology*. 2013. Т. 139, № 4. С. 428–437.
16. Cortes Ledesma F. и др. A human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage // *Nature*. 2009. Т. 461, № 7264. С. 674–678.
17. Comeaux E.Q., van Waardenburg R.C.A.M. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I resolves both naturally and chemically induced DNA adducts and its potential as a therapeutic target // *Drug Metab Rev*. 2014. Т. 46, № 4. С. 494–507.
18. Laev S.S., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase inhibitors: Progress and potential // *Bioorg Med Chem*. 2016. Т. 24, № 21. С. 5017–5027.
19. Zakharenko A.L. и др. Natural Products and Their Derivatives as Inhibitors of the DNA Repair Enzyme Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 // *Int J Mol Sci*. 2023. Т. 24, № 6. С. 5781.
20. Interthal H., Pouliot J.J., Champoux J.J. The tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1 is a member of the phospholipase D superfamily // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001. Т. 98, № 21. С. 12009–12014.
21. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond // *Nat Rev Cancer*. 2006. Т. 6, № 10. С. 789–802.
22. Pommier Y. и др. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs // *Chem Biol*. 2010. Т. 17, № 5. С. 421–433.
23. Beretta G.L. и др. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 targeting for modulation of camptothecin-based treatment // *Curr Med Chem*. 2010. Т. 17, № 15. С. 1500–1508.

24. O'Brien M., Eckardt J., Ramlau R. Recent advances with topotecan in the treatment of lung cancer // *Oncologist*. 2007. T. 12, № 10. С. 1194–1204.
25. Lorusso D. и др. Review role of topotecan in gynaecological cancers: current indications and perspectives // *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010. T. 74, № 3. С. 163–174.
26. Murai J. и др. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1) repairs DNA damage induced by topoisomerases I and II and base alkylation in vertebrate cells // *J Biol Chem*. 2012. T. 287, № 16. С. 12848–12857.
27. Nitiss K.C. и др. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase (Tdp1) participates in the repair of Top2-mediated DNA damage // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006. T. 103, № 24. С. 8953–8958.
28. Takashima H. и др. Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy // *Nat Genet*. 2002. T. 32, № 2. С. 267–272.
29. Das B.B. и др. PARP1-TDP1 coupling for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage // *Nucleic Acids Res*. 2014. T. 42, № 7. С. 4435–4449.
30. Lin C.-P. и др. A ubiquitin-proteasome pathway for the repair of topoisomerase I-DNA covalent complexes // *J Biol Chem*. 2008. T. 283, № 30. С. 21074–21083.
31. Lebedeva N.A., Rechkunova N.I., Lavrik O.I. The new base excision repair pathway in mammals mediated by tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 1 // *Biopolym. Cell*. 2012. T. 28, № 3. С. 202–206.
32. Das S.K. и др. Poly(ADP-ribose) polymers regulate DNA topoisomerase I (Top1) nuclear dynamics and camptothecin sensitivity in living cells // *Nucleic Acids Res*. 2016. T. 44, № 17. С. 8363–8375.
33. Sun Y. и др. PARYlation prevents the proteasomal degradation of topoisomerase I DNA-protein crosslinks and induces their deubiquitylation // *Nat Commun*. 2021. T. 12, № 1. С. 5010.
34. Murai J., Pommier Y. PARP Trapping Beyond Homologous Recombination and Platinum Sensitivity in Cancers // *Annual Review of Cancer Biology*. 2019. T. 3.
35. LoRusso P.M. и др. Phase I Safety, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Study of the Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitor Veliparib (ABT-888) in Combination with Irinotecan in Patients with Advanced Solid Tumors // *Clin Cancer Res*. 2016. T. 22, № 13. С. 3227–3237.
36. Wahner Hendrickson A.E. и др. A Phase I Clinical Trial of the Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitor Veliparib and Weekly Topotecan in Patients with Solid Tumors // *Clin Cancer Res*. 2018. T. 24, № 4. С. 744–752.
37. Malanga M., Althaus F.R. Poly(ADP-ribose) Reactivates Stalled DNA Topoisomerase I and Induces DNA Strand Break Resealing * // *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier, 2004. T. 279, № 7. С. 5244–5248.
38. Park S.-Y., Cheng Y.-C. Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Could Facilitate the Religation of Topoisomerase I-linked DNA Inhibited by Camptothecin // *Cancer Research*. 2005. T. 65, № 9. С. 3894–3902.
39. Sugimura K. и др. PARP-1 ensures regulation of replication fork progression by homologous recombination on damaged DNA // *J Cell Biol*. 2008. T. 183, № 7. С. 1203–1212.
40. Berti M. и др. Human RECQ1 promotes restart of replication forks reversed by DNA topoisomerase I inhibition // *Nat Struct Mol Biol*. 2013. T. 20, № 3. С. 347–354.
41. Ray Chaudhuri A. и др. Topoisomerase I poisoning results in PARP-mediated replication fork reversal // *Nat Struct Mol Biol*. 2012. T. 19, № 4. С. 417–423.
42. Schreiber V. и др. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006. T. 7, № 7. С. 517–528.
43. Sherstyuk Y.V. и др. Design, Synthesis and Molecular Modeling Study of Conjugates of ADP and Morpholino Nucleosides as A Novel Class of Inhibitors of PARP-1, PARP-2 and PARP-3 // *Int J Mol Sci*. 2019. T. 21, № 1. С. 214.

44. Zakharenko A. и др. Synthesis and biological evaluation of novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors with a benzopentathiepine moiety // *Bioorg Med Chem.* 2015. Т. 23, № 9. С. 2044–2052.
45. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J Immunol Methods.* 1983. Т. 65, № 1–2. С. 55–63.
46. Klein G., Klein E. The Transformation of a Solid Transplantable Mouse Carcinoma into an “Ascites Tumor” // *Cancer Res.* 1995. Т. 11, № 6. С. 466–469.
47. Blackford H.P.A. Quantitative Studies of the Growth Response of the Krebs Ascites Tumor // *Cancer Research.* 1954. Т. 5, № 14. С. 391–396.
48. Yushok W.D., Mallalieu L.J., Batt W.G. Properties of Krebs 2 ascites carcinoma cells: Weight, size, specific gravity, and protein content // *Journal of the Franklin Institute.* 1956. Т. 262, № 6. С. 507–509.
49. Parsons D.F. и др. Ascites tumor invasion of mouse peritoneum studied by high-voltage electron microscope stereoscopy // *Cancer Res.* 1982. Т. 42, № 11. С. 4574–4583.
50. Il'ina I.V. и др. Design, Synthesis, and Biological Investigation of Novel Classes of 3-Carene-Derived Potent Inhibitors of TDP1 // *Molecules.* 2020. Т. 25, № 15. С. 3496.
51. Jordheim L.P. и др. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases // *Nat Rev Drug Discov.* 2013. Т. 12, № 6. С. 447–464.
52. Efremova A.S. и др. Disaccharide pyrimidine nucleosides and their derivatives: a novel group of cell-penetrating inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase 1 // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2013. Т. 32, № 9. С. 510–528.
53. Pivazyan A.D. и др. Inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase activity by nucleoside analogs of thymidine // *Biochem Pharmacol.* 1992. Т. 44, № 5. С. 947–953.
54. Banasik M. и др. Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase // *J Biol Chem.* 1992. Т. 267, № 3. С. 1569–1575.
55. Sherstyuk Yu.V. и др. Synthesis of a series of NAD⁺ analogues, potential inhibitors of PARP 1, using ADP conjugates functionalized at the terminal phosphate group // *Russ J Bioorg Chem.* 2017. Т. 43, № 1. С. 76–83.
56. Chernyshova I. и др. Aminomethylmorpholino Nucleosides as Novel Inhibitors of PARP1 and PARP2: Experimental and Molecular Modeling Analyses of Their Selectivity and Mechanism of Action // *Int J Mol Sci.* 2024. Т. 25, № 23. С. 12526.
57. Antony S. и др. Novel high-throughput electrochemiluminescent assay for identification of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase (Tdp1) inhibitors and characterization of furamidine (NSC 305831) as an inhibitor of Tdp1 // *Nucleic Acids Res.* 2007. Т. 35, № 13. С. 4474–4484.
58. Bermingham A. и др. Identification of Natural Products That Inhibit the Catalytic Function of Human Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase (TDP1) // *SLAS Discov.* 2017. Т. 22, № 9. С. 1093–1105.
59. Jun J.H. и др. Synthesis, anti-cancer screening and tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (Tdp1) inhibition activity of novel piperidinyl sulfamides // *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2018. Т. 111. С. 337–348.
60. Liao Z. и др. Inhibition of Human Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase by Aminoglycoside Antibiotics and Ribosome Inhibitors // *Molecular Pharmacology.* 2006. Т. 70, № 1. С. 366–372.
61. Lv P.-C. и др. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of O-2-Modified Indenoisoquinolines as Dual Topoisomerase I–Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase I Inhibitors // *J. Med. Chem.* 2014. Т. 57, № 10. С. 4324–4336.
62. Marchand C. и др. Identification of phosphotyrosine mimetic inhibitors of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase I by a novel AlphaScreen high-throughput assay // *Mol Cancer Ther.* 2009. Т. 8, № 1. С. 240–248.
63. Martino E. и др. The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs // *Bioorg Med Chem Lett.* 2017. Т. 27, № 4. С. 701–707.

64. Meisenberg C. и др. Clinical and cellular roles for TDP1 and TOP1 in modulating colorectal cancer response to irinotecan // *Mol Cancer Ther.* 2015. Т. 14, № 2. С. 575–585.
65. Nguyen T.X. и др. Synthesis and Biological Evaluation of Nitrated 7-, 8-, 9-, and 10-Hydroxyindenoisoquinolines as Potential Dual Topoisomerase I (Top1)–Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase I (TDP1) Inhibitors // *J. Med. Chem.* 2015. Т. 58, № 7. С. 3188–3208.
66. Sirivolu V.R. и др. 5-Arylidenethiothiazolidinones as inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase I // *J Med Chem.* 2012. Т. 55, № 20. С. 8671–8684.
67. Khomenko T. и др. New inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (Tdp 1) combining 7-hydroxycoumarin and monoterpenoid moieties // *Bioorg Med Chem.* 2016. Т. 24, № 21. С. 5573–5581.
68. Zakharenko A. и др. Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibitors: Usnic Acid Enamines Enhance the Cytotoxic Effect of Camptothecin // *J Nat Prod.* 2016. Т. 79, № 11. С. 2961–2967.
69. Zakharova O. и др. Synthesis and evaluation of aryliden- and hetarylidenfuranone derivatives of usnic acid as highly potent Tdp1 inhibitors // *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2018. Т. 26, № 15. С. 4470–4480.
70. Zakharenko A.L. и др. Novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors enhance the therapeutic impact of topotecan on *in vivo* tumor models // *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2019. Т. 161. С. 581–593.
71. Kornienko T.E. и др. Enhancement of the Antitumor and Antimetastatic Effect of Topotecan and Normalization of Blood Counts in Mice with Lewis Carcinoma by Tdp1 Inhibitors-New Usnic Acid Derivatives // *Int J Mol Sci.* 2024. Т. 25, № 2. С. 1210.
72. Koldysheva E.V. и др. Antimetastatic Activity of Combined Topotecan and Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase-1 Inhibitor on Modeled Lewis Lung Carcinoma // *Bull Exp Biol Med.* 2019. Т. 166, № 5. С. 661–666.
73. Komarova A.O. и др. Novel group of tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 1 inhibitors based on disaccharide nucleosides as drug prototypes for anti-cancer therapy // *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2018. Т. 33, № 1. С. 1415–1429.
74. Efremova A.S. и др. The selective toxic effect of dialdehyde derivatives of pyrimidine nucleosides on human ovarian cancer cells // *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B.* 2014. Т. 8, № 4. С. 318–322.
75. Zakharenko A.L. и др. Inhibition of Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 by Lipophilic Pyrimidine Nucleosides // *Molecules.* 2020. Т. 25, № 16. С. 3694.
76. HUTT A.J. DRUG CHIRALITY AND ITS PHARMACOLOGICAL CONSEQUENCES // Smith and Williams' Introduction to the Principles of Drug Design and Action. 3-е изд. CRC Press, 1998. 70 с.
77. Dyrkheeva N.S. и др. In Vitro and In Silico Studies of Human Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 (Tdp1) Inhibition by Stereoisomeric Forms of Lipophilic Nucleosides: The Role of Carbohydrate Stereochemistry in Ligand-Enzyme Interactions // *Molecules.* 2022. Т. 27, № 8. С. 2433.
78. Kornienko T.E. и др. Effect of Usnic Acid-Derived Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibitor Used as Monotherapy or in Combination with Olaparib on Transplanted Tumors In Vivo // *Mol Biol.* 2023. Т. 57, № 2. С. 214–224.
79. Chernyshova I.A. и др. The Lipophilic Purine Nucleoside-Tdp1 Inhibitor-Enhances DNA Damage Induced by Topotecan In Vitro and Potentiates the Antitumor Effect of Topotecan In Vivo // *Molecules.* 2022. Т. 28, № 1. С. 323.
80. Vennepureddy A., Atallah J.-P., Terjanian T. Role of Topotecan in Non-Small Cell Lung Cancer: A Review of Literature // *World J Oncol.* 2015. Т. 6, № 5. С. 429–436.
81. Spigel D.R. и др. RESILIENT Part 2: A Randomized, Open-Label Phase III Study of Liposomal Irinotecan Versus Topotecan in Adults With Relapsed Small Cell Lung Cancer // *J Clin Oncol.* 2024. Т. 42, № 19. С. 2317–2326.

82. Li J. и др. TDP1 is required for efficient non-homologous end joining in human cells // DNA Repair (Amst). 2017. Т. 60. С. 40–49.
83. Brettrager E.J., Segura I.A., van Waardenburg R.C.A.M. Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase I N-Terminal Domain Modifications and Interactions Regulate Cellular Function // Genes (Basel). 2019. Т. 10, № 11. С. 897.
84. Dyrkheeva N.S. и др. Transcriptomic analysis of HEK293A cells with a CRISPR/Cas9-mediated TDP1 knockout // Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2024. Т. 1868, № 7. С. 130616.
85. Dyrkheeva N.S. и др. New Hybrid Compounds Combining Fragments of Usnic Acid and Monoterpenoids for Effective Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibition // Biomolecules. 2021. Т. 11, № 7. С. 973.

ПРИЛОЖЕНИЕ

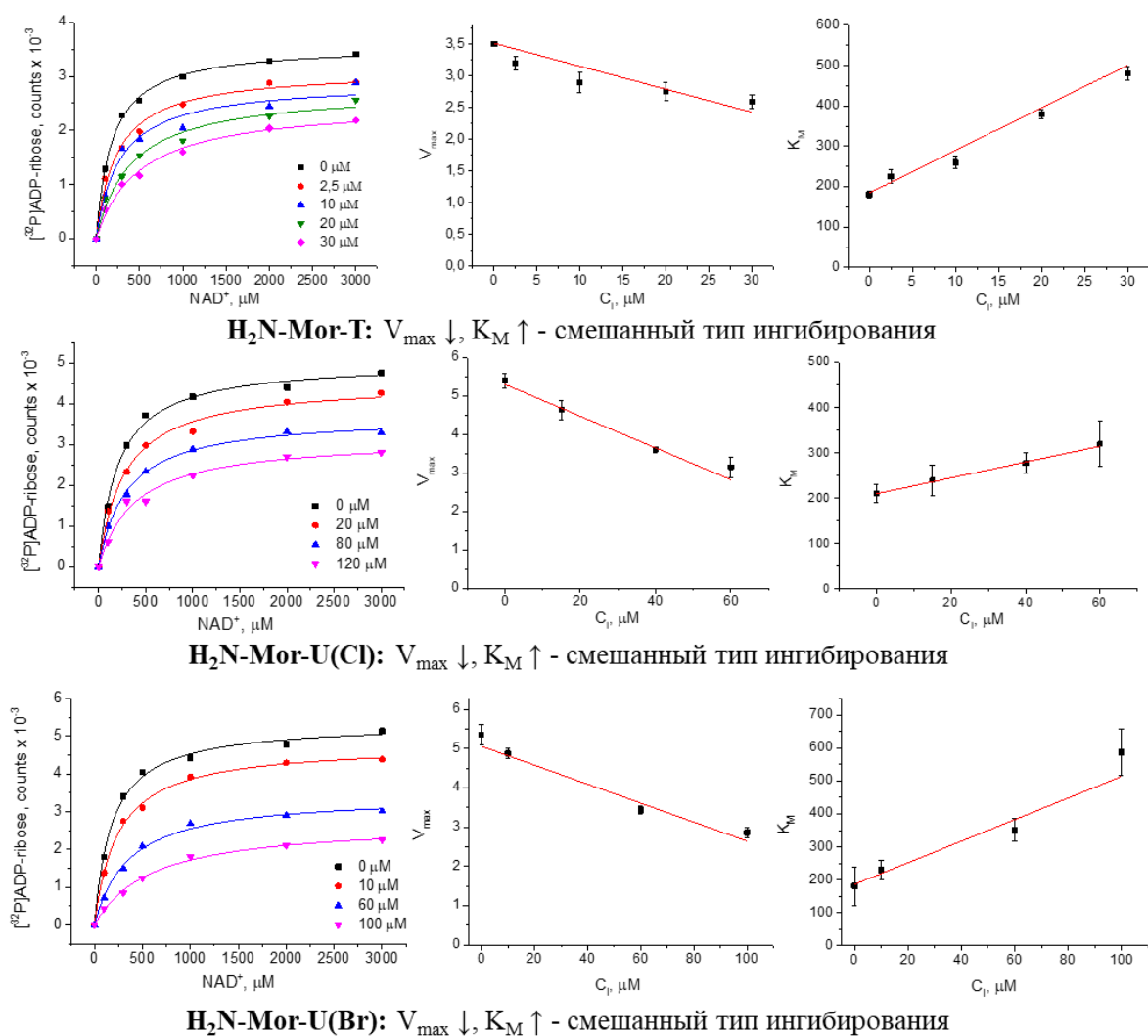


Рисунок П1. Графическое представление определения типа ингибирования PARP1 для наиболее активных соединений среди морфолиновых производных нуклеозидов.

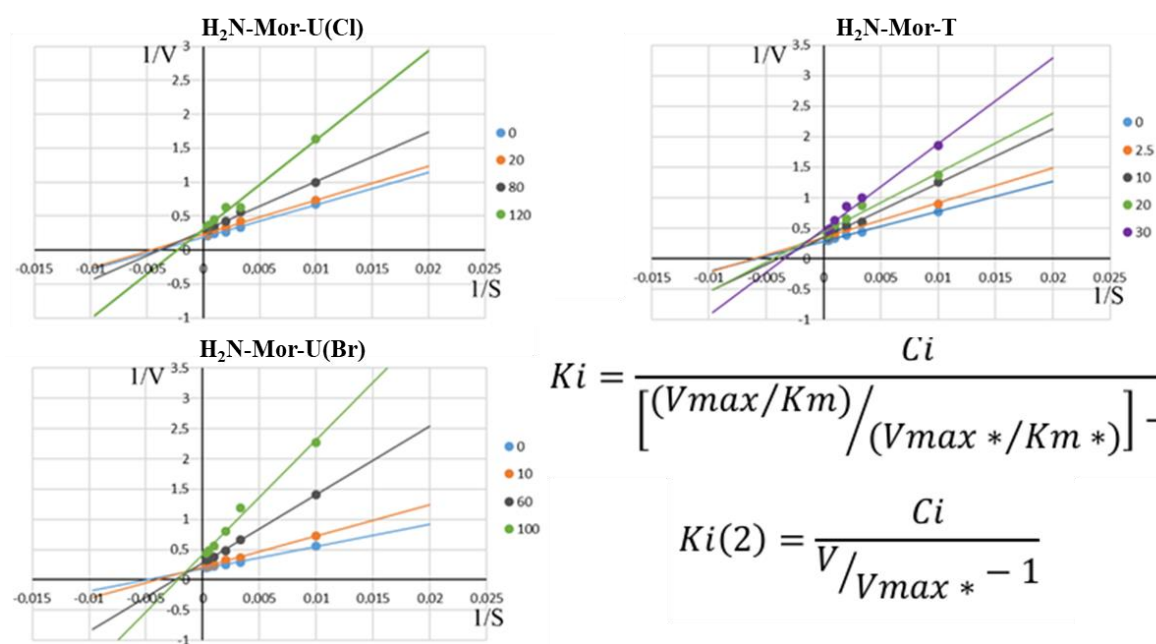


Рисунок П2. Графическое представление определения типа ингибирования PARP1 в координатах Лайнуивера-Берка. Формулы для расчета K_i и $K_i(2)$, где V_{max} (V_{max}^*) максимальная скорость реакции в отсутствии (присутствии) ингибитора; K_m (K_m^*) – константы Михаэлиса в отсутствии (присутствии) ингибитора; C_i – концентрация ингибитора.

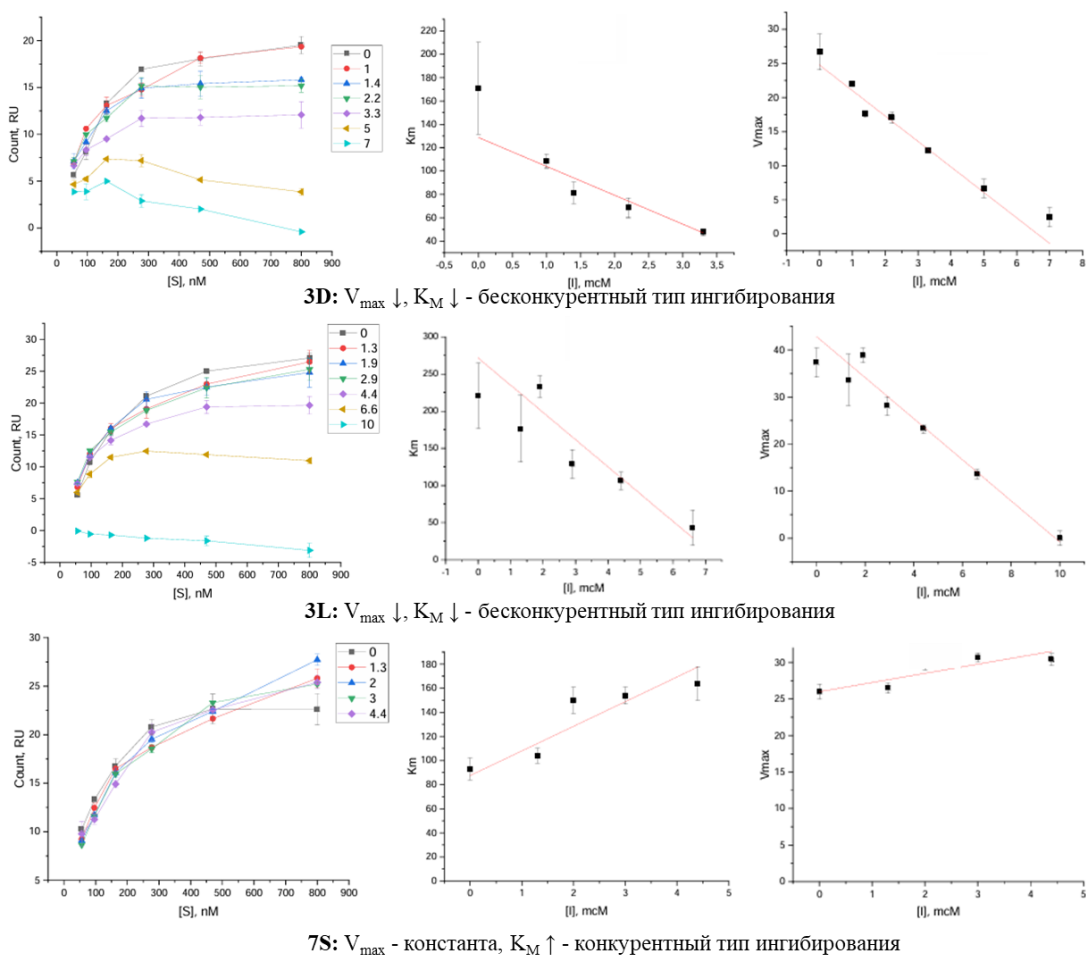


Рисунок П3. Графическое представление определения типа ингибирования TDP1 для некоторых пространственных изомеров липофильных производных нуклеозидов.

Таблица П1. Остаточная активность ферментов PARP1 и PARP2 в присутствии липофильных производных пуриновых нуклеозидов в концентрации 1 мМ.

№	PARP1, % ост.акт.	PARP2, % ост.акт.
1	86±5	91±5
2	102±11	87±18
3	94±9	95±9
4	84±12	79±15
5a	112±11	101±24
5b	99±8	107±9
5c	92±14	104±16
5d	88±21	100±15
5f	100±10	113±18
6a	87±10	96±30
6b	86±8	75±16
6c	82±17	80±20
6d	96±12	86±9

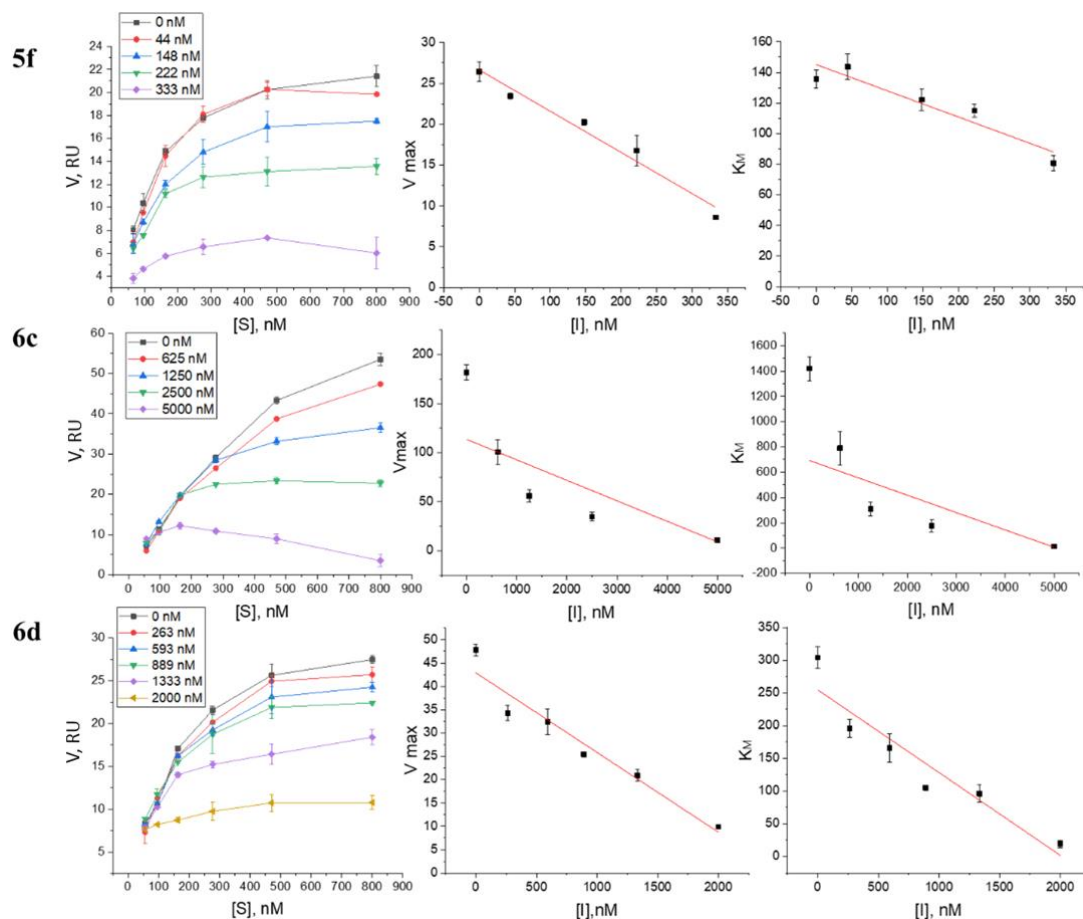


Рисунок П4. Графическое представление определения типа ингибирования TDP1 для наиболее эффективных соединений среди липофильных производных пуриновых нуклеозидов. Для соединений **5f** и **6d** характерно снижение $V_{\max}$ и K_M , что характерно для бесконкурентного типа ингибирования. В случае соединения **6c** наблюдается экспоненциальное падение этих параметров, что свидетельствует о сложном механизме взаимодействия с TDP1.

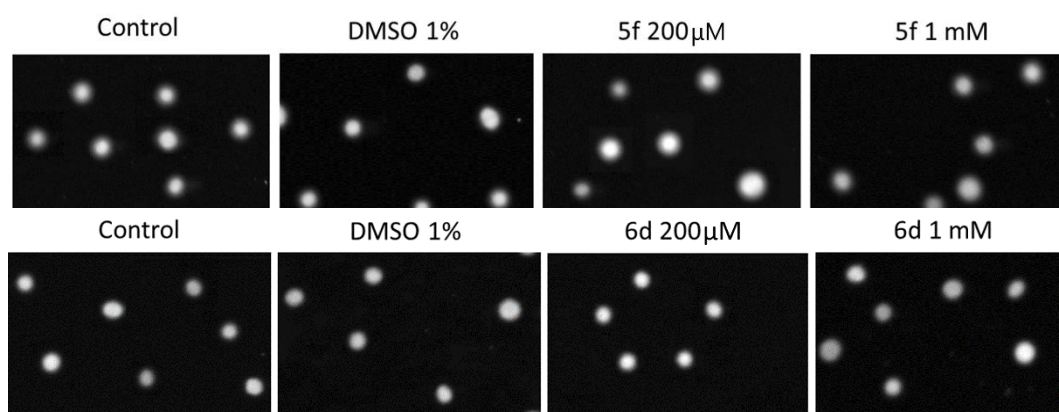
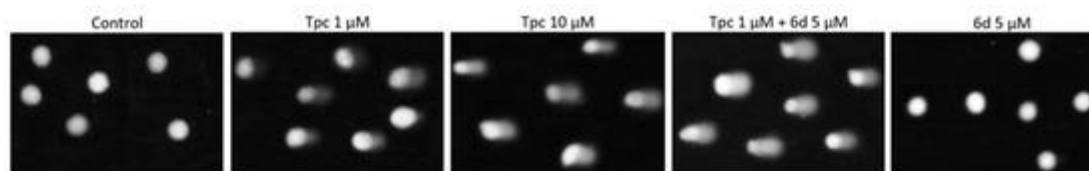
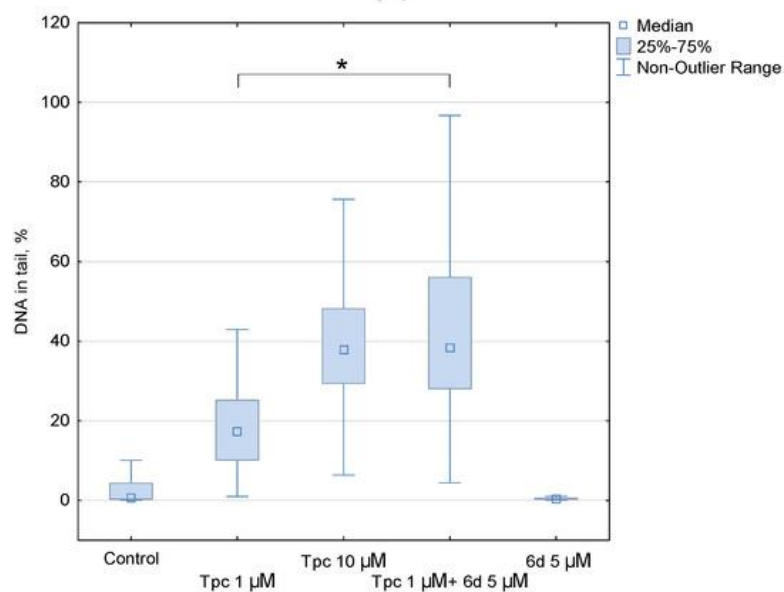


Рисунок П5. Микрофотографии слайдов, полученных в ходе щелочного анализа комет клеток HeLa. Клетки без обработки (Control), в присутствии 1% DMSO или соединений **5f** и **6d** не содержат повреждений ДНК.



(A)



(B)

Рисунок П6. Использование соединения **6d** в нетоксичной концентрации снижает дозу топотекана, необходимую для получения серьезного уровня повреждения ДНК, в 10 раз. Соединение **6d** приводит к накоплению аналогичного уровня повреждений ДНК в случаях обработки только Трс 10 мкМ и комбинацией Трс 1 мкМ и **6d** 5 мкМ (фотографии (A) и гистограмма (B)), * $p < 0,05$.

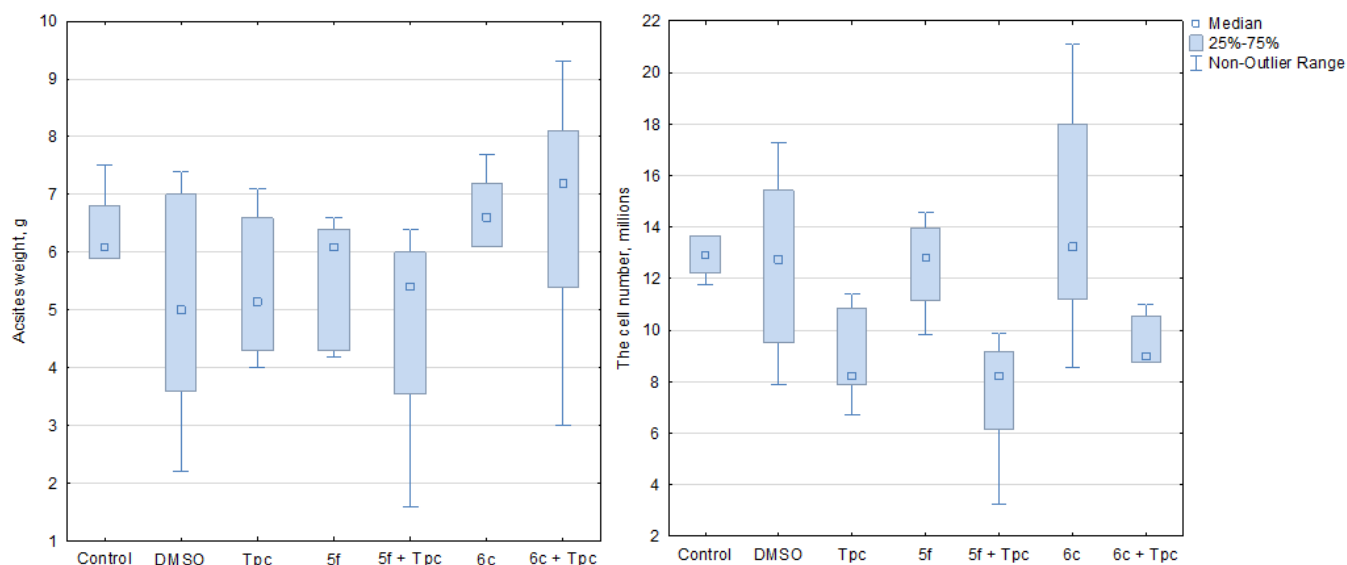


Рисунок П7. Изучение влияния соединений **5f** и **6c** на действие Трс на модели асцитной карциномы мыши Кребс-2. Показано, что данные соединения не проявляют синергического действия с Трс *in vivo*.

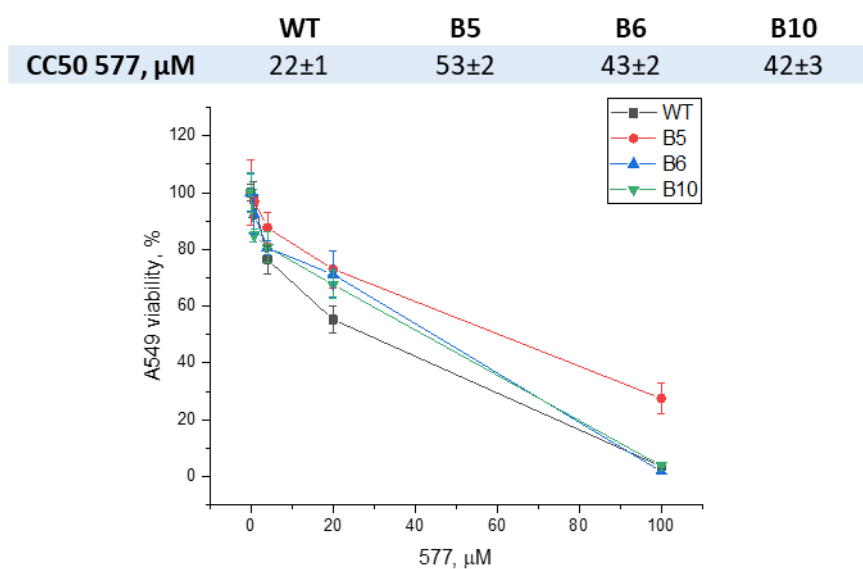


Рисунок П8. Цитотоксичность соединения **577** на линиях клеток A549 WT и TDP1-KO. Данные получены методом МТТ.

Таблица П2. Комбинаторные индексы (CI) для комбинации соединения 577 и Трс, рассчитанные для результатов эксперимента МТТ на клетках A549WT.

Dose Трс	Dose 577	Effect	CI	Dose Трс	Dose 577	Effect	CI
3.0	5.0	0.05	6.28621	3.0	10.0	0.07	3.91290
8.0	5.0	0.01	795.098	8.0	10.0	0.08	5.73736
20.0	5.0	0.15	2.42159	20.0	10.0	0.16	2.65377
51.0	5.0	0.28	1.09167	51.0	10.0	0.31	1.24913
128.0	5.0	0.45	0.57309	128.0	10.0	0.5	0.71007
320.0	5.0	0.48	0.79742	320.0	10.0	0.55	0.75455
800.0	5.0	0.55	0.89911	800.0	10.0	0.64	0.67916
2000.0	5.0	0.65	0.79212	2000.0	10.0	0.74	0.54600
5000.0	5.0	0.77	0.50595	5000.0	10.0	0.87	0.29590

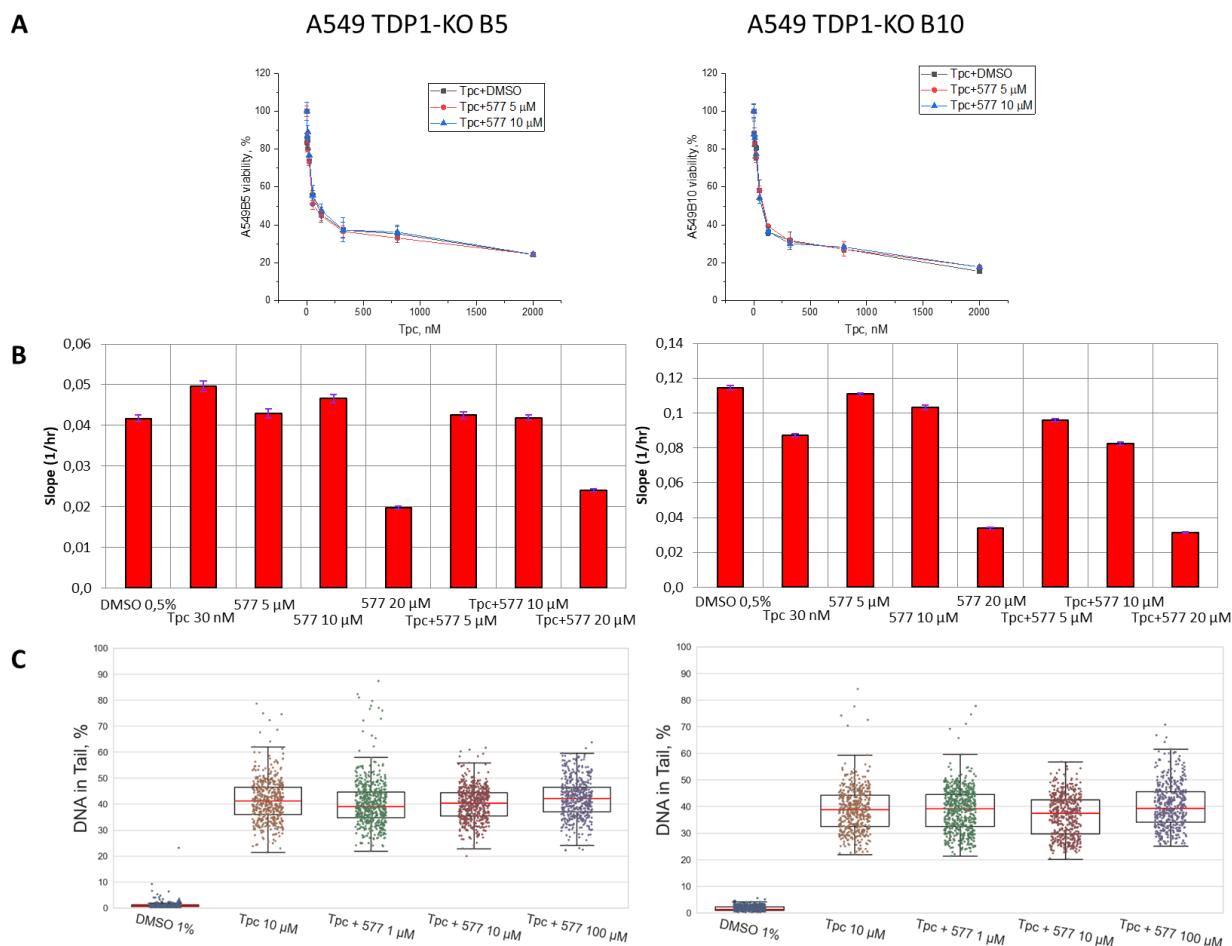


Рисунок П9. Изучение влияния соединения 577 на действие Трс на линии клеток A549 TDP1-KO B5 и B10. **А)** Данные выживаемости, полученные методом МТТ. При совместном действии Трс и 577 не наблюдается снижения выживаемости обеих клеточных линий по сравнению с Трс в монорежиме, **В)** Данные выживаемости, полученные by the impedance-based real-time assay on the xCELLigence System. При совместном действии Трс и 577 не наблюдается снижение клеточного индекса в сравнении с индивидуальным Трс для клеток B5 (слева) и B6 (справа) **С)** Уровень повреждения клеточной ДНК, оцененный в ходе Alkaline Comet assay. Процент ДНК в хвосте для клеток TDP1-KO B5 (слева) и B10 (справа) в группах Трс и его комбинаций с соединением 577 не отличается.

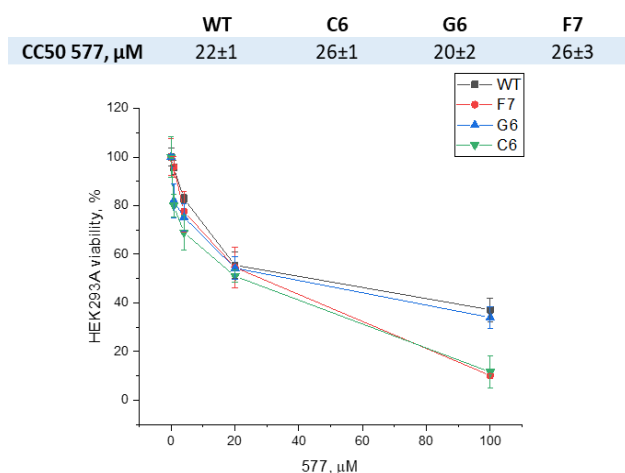


Рисунок П10. Цитотоксичность соединения 577 на линиях клеток HEK293A WT и TDP1-KO. Данные получены методом МТТ.

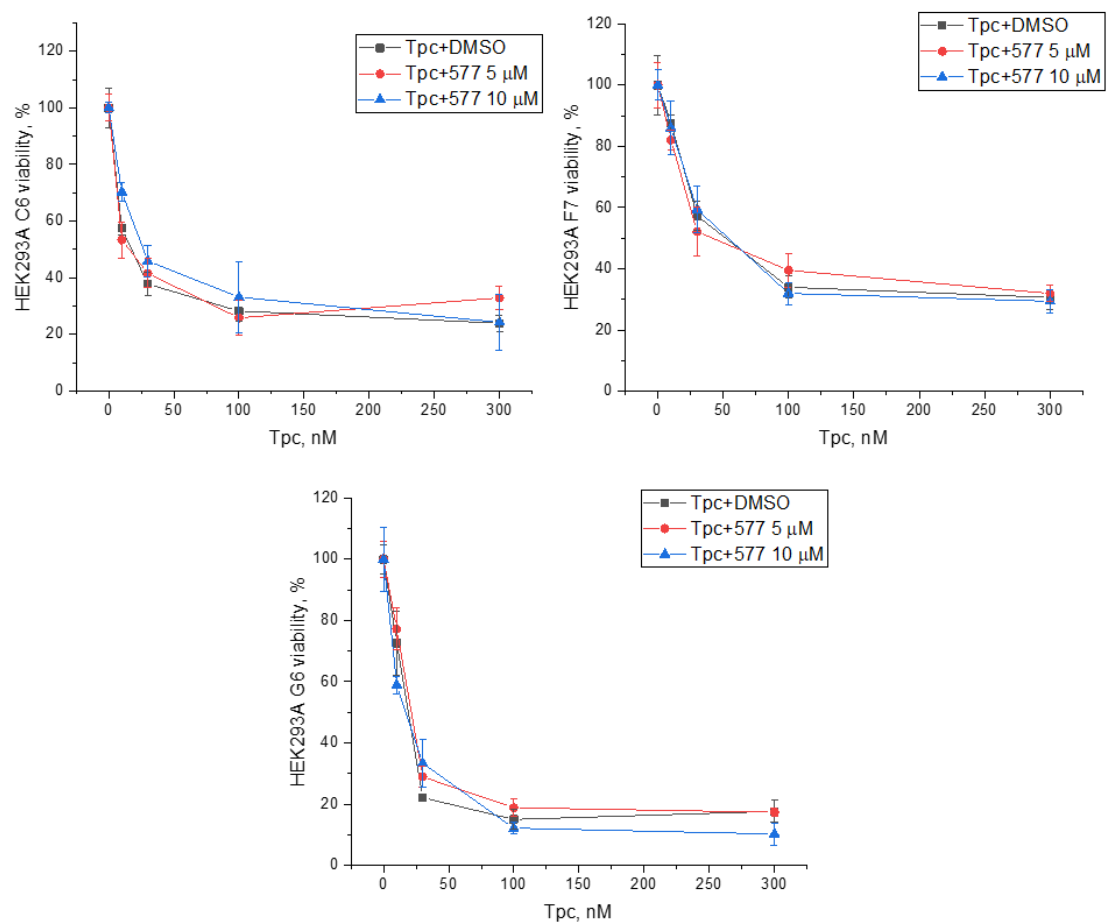


Рисунок П11. Цитотоксичность Трс в присутствии соединения 577 в нетоксичных концентрациях на линиях клеток HEK293A TDP1-КО. Данные получены методом МТТ.



Отчет о проверке

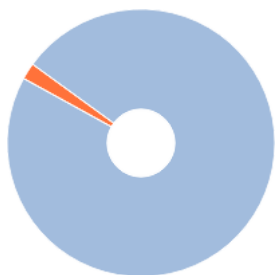
Автор: Чернышова Ирина Алексеевна

Проверяющий: Мирошниченко Светлана Константиновна

Название документа: Чернышова И.А. Научный доклад_wg

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ

Тариф: FULL



Совпадения:
1,55%



Оригинальность:
98,45%



ИИ-контент:
0%



Цитирования:
0%



Самоцитирования:
0%



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

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

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

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

Номер документа: 30

Тип документа: Не указано

Дата проверки: 09.09.2025 10:46:17

Дата корректировки: 09.09.2025 10:58:37

Количество страниц: 50

Символов в тексте: 93644

Слов в тексте: 13780

Число предложений: 1030

Комментарий: не указано

ПАРАМЕТРЫ ПРОВЕРКИ

Выполнена проверка с учетом редактирования: Да
Исключение элементов документа из проверки: Нет
Выполнено распознавание текста (OCR): Да
Выполнена проверка с учетом структуры: Нет

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

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

ИСТОЧНИКИ

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Комментарий
[01]	9,53%	0%	Диплом Чернышовой И.А.	26 Мая 2021	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Собственный диплом автора, на основе которого выполнен научный доклад
[02]	7,05%	0%	Диплом Чернышовой И.А.	26 Мая 2021	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Собственный диплом автора, на основе которого выполнен научный доклад
[03]	3,71%	0%	chepanova_dissert.pdf http://niboch.nsc.ru	20 Апр 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[04]	3,71%	0%	chepanova_dissert.pdf http://niboch.nsc.ru	19 Дек 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[05]	2,81%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	01 Ноя 2022	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[06]	2,59%	0%	Диплом Михайлова М.А.	07 Июн 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики эксперимента, не является плагиатом
[07]	2,49%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	03 Фев 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики эксперимента, не является плагиатом
[08]	2,21%	0%	Диплом Орлова	26 Мая 2021	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[09]	2,2%	0%	Синтез 3-оксабицикло[3.3.1]ноне... http://elibrary.ru	01 Янв 2023	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики эксперимента, не является плагиатом
[10]	1,99%	0%	Диплом Михайлова М.А.	07 Июн 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[11]	1,77%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	03 Фев 2024	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[12]	1,52%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	05 Апр 2024	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[13]	1,43%	0%	https://earchive.tpu.ru/jspui/bitstre... https://earchive.tpu.ru	26 Апр 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики эксперимента, не является плагиатом

[14]	1,34%	0%	Противоопухолевая активность К... http://elibrary.ru	01 Янв 2021	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики эксперимента, не является плагиатом
[15]	1,25%	0%	Чепанова, Арина Александровна ... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2022	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[16]	1,23%	0%	РАЗРАБОТКА ИНГИБИТОРОВ ФЕР... http://elibrary.ru	01 Янв 2017	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики эксперимента, не является плагиатом
[17]	1,21%	0,83%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	29 Ноя 2024	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	
[18]	1,17%	0%	Диплом. Колобенко МВ. Для реце...	19 Мая 2025	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики эксперимента, не является плагиатом
[19]	1,05%	0%	Влияние производного усниново...	18 Апр 2023	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики эксперимента, не является плагиатом
[20]	1,03%	0%	Синтез 3-оксабицикло[3.3.1]ноне... http://elibrary.ru	01 Янв 2023	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики эксперимента, не является плагиатом
[21]	0,98%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	05 Апр 2024	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[22]	0,96%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	05 Апр 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[23]	0,83%	0%	https://earchive.tpu.ru/jspui/bitstre... https://earchive.tpu.ru	23 Апр 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики эксперимента, не является плагиатом
[24]	0,73%	0%	Противоопухолевая активность К... http://elibrary.ru	01 Янв 2021	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[25]	0,71%	0%	не указано	13 Янв 2022	Шаблонные фразы	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[26]	0,69%	0%	Диплом Орлова	26 Мая 2021	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[27]	0,59%	0%	Estudio de la deleción espontánea ... https://educacion.gob.es	11 Апр 2025	Переводные заимствования	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[28]	0,57%	0%	РАЗРАБОТКА ИНГИБИТОРОВ ФЕР... http://elibrary.ru	01 Янв 2017	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики эксперимента, не является плагиатом
[29]	0,57%	0%	Диплом. Колобенко МВ. Для реце...	19 Мая 2025	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[30]	0,51%	0%	ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФЕРМЕНТОВ ... http://elibrary.ru	03 Янв 2016	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[31]	0,44%	0,44%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	29 Ноя 2024	Переводные заимствования	
[32]	0,43%	0%	13072_2025_594_MOESM10_ESM.pdf https://static-content.springer.com	19 Авг 2025	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[33]	0,43%	0%	Информационные события [Инст... http://niboch.nsc.ru	17 Авг 2024	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[34]	0,41%	0%	Сведения об авторах. http://elibrary.ru	01 Янв 2024	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[35]	0,37%	0%	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/... https://ncbi.nlm.nih.gov	10 Окт 2024	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики эксперимента, не является плагиатом
[36]	0,36%	0%	ГЛАВА 12. ИНГИБИРОВАНИЕ ФЕР...	24 Окт 2023	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[37]	0,35%	0%	chepanova_autoref.pdf http://niboch.nsc.ru	12 Фев 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[38]	0,34%	0%	Гнедина, Ольга Олеговна Подавл... http://dlib.rsl.ru	03 Апр 2025	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[39]	0,32%	0%	Производные усниновой кислот... http://elibrary.ru	04 Мая 2017	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[40]	0,3%	0%	Паращенко, Максим Александро... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2015	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[41]	0,29%	0%	ШИЛИНА Мария Александровна ... https://docplayer.ru	18 Мар 2019	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[42]	0,29%	0%	Чан Ньян Хау Комбинированные ... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2024	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[43]	0,28%	0,28%	ENERGY STAR Portfolio Manager https://portfoliomanager.energystar.gov	01 Ноя 2024	Переводные заимствования	
[44]	0,28%	0%	A robust quality-related fault detec... https://ieeexplore.ieee.org	17 Июл 2017	IEEE	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[45]	0,28%	0%	Три бердских предприятия назва... http://berdsk.bezformata.ru	07 Апр 2014	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[46]	0,28%	0%	БЭМЗ, Нотис и Продсиб из Бердс... http://berdsk.bezformata.ru	07 Апр 2014	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[47]	0,28%	0%	Учёные степени — без Высшей а... http://cheboksari.yodda.ru	21 Дек 2017	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[48]	0,28%	0%	Искитимцемент стал надежным р... http://vesiskitim.ru	05 Апр 2014	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[49]	0,28%	0%	Формирование подходов к оценк... https://book.ru	01 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[50]	0,28%	0%	Отчет_2024_Нуштаева_итог	31 Янв 2025	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[51]	0,28%	0%	Способ очистки вируса осповакц... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[52]	0,28%	0%	Алкилирующие фторированные ... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[53]	0,28%	0%	Средство для нейтрализации вир... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[54]	0,28%	0%	Способ получения наноразмерн... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[55]	0,28%	0%	Список кавалеров ордена Алекса... https://ru.ruwiki.ru	раньше 2011	Рувики	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[56]	0,28%	0%	Постановление Правительства Н... http://ivo.garant.ru	27 Июл 2015	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[57]	0,28%	0%	Распоряжение Губернатора Ново... http://ivo.garant.ru	18 Фев 2024	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[58]	0,28%	0%	Постановление Правительства Н... http://ivo.garant.ru	15 Окт 2014	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[59]	0,25%	0%	Т. 2 part#1 http://emil.ru	08 Июл 2017	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[60]	0,25%	0%	Прохорова, Дарья Вадимовна Вл... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2024	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[61]	0,25%	0%	Становление и развитие историо...	06 Сен 2025	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики эксперимента, не является плагиатом
[62]	0,24%	0%	Поставить оценку работе налого...	12 Авг 2025	Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики эксперимента, не является плагиатом
[63]	0,24%	0%	ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДО... http://elibrary.ru	01 Янв 2012	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[64]	0,23%	0%	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ РНК ОПР... http://elibrary.ru	10 Мая 2010	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[65]	0,22%	0%	Зенченко, Анастасия Андреевна ... http://dlib.rsl.ru	03 Апр 2025	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[66]	0,22%	0%	Способ определения активности ... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[67]	0,21%	0%	Информационные события [Инст... http://niboch.nsc.ru	17 Авг 2024	Перефразированные заимствования по	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

						коллекции Интернет в русском сегменте	
[68]	0,21%	0%	Иванкина. Диплом. АДФ-рибозил...	20 Мая 2022	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[69]	0,21%	0%	Новиков, Лев Васильевич Аппар... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2006	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[70]	0,19%	0%	Клеточная линия hufshik, секрет... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[71]	0,19%	0%	5-Хлорметилизоксазолы – удобн... http://elibrary.ru	01 Янв 2021	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[72]	0,19%	0%	https://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de	14 Апр 2025	Переводные заимствования	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[73]	0,18%	0%	An Indirect Rate-Distortion Charact... https://ieeexplore.ieee.org	13 Июл 2023	Переводные заимствования IEEE	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[74]	0,17%	0%	Палеогидрология Средней Азии (... http://diss.natlib.uz	29 Авг 2014	Коллекция НБУ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[75]	0,17%	0%	Prototype parallel readout system f... https://ieeexplore.ieee.org	08 Ноя 2004	IEEE	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[76]	0,17%	0%	http://www.isp.nsc.ru/autoreferat/... http://isp.nsc.ru	28 Сен 2019	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[77]	0,17%	0%	Study on KPI-related subspace dec... https://ieeexplore.ieee.org	17 Ноя 2016	IEEE	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[78]	0,16%	0%	Лаборатория физиологически ак... http://web3.nioch.nsc.ru	16 Июн 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[79]	0,16%	0%	Демин, Сергей Анатольевич Стох... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2019	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[80]	0,16%	0%	Cement rotary kiln model using fra... https://ieeexplore.ieee.org	27 Фев 2014	IEEE	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[81]	0,16%	0%	Использование Stamm 3.0 при ре... http://elibrary.ru	01 Янв 2017	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[82]	0,15%	0%	Эколого-геохимическая оценка а... https://elib.nlb.by	01 Янв 2010	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[83]	0,14%	0%	Дилом_10_06_2	10 Июн 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[84]	0,12%	0%	Бирюков_диплом_асп	16 Мая 2025	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[85]	0,12%	0%	Насосы. Вентиляторы. Кондицио...	19 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[86]	0,11%	0%	A modified PCA-based approach fo... https://ieeexplore.ieee.org	17 Июл 2017	IEEE	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[87]	0,11%	0%	Особенности микроэлементного ... http://diss.natlib.uz	02 Сен 2014	Коллекция НБУ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[88]	0,11%	0%	Диссертация целиком	09 Дек 2019	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[89]	0,11%	0%	Светоизлучающие структуры на ... https://elib.nlb.by	01 Янв 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[90]	0,11%	0%	Водород как основа низкоуглеро... http://elibrary.ru	01 Янв 2022	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[91]	0,11%	0%	Введение в нанотеплофизику	20 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[92]	0,1%	0%	Усовершенствование технологи... http://diss.natlib.uz	02 Сен 2014	Коллекция НБУ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[93]	0,1%	0%	Обоснование и выбор рационал... http://diss.natlib.uz	02 Сен 2014	Коллекция НБУ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[94]	0,1%	0%	Иванов, Сергей Владимирович И... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2005	Публикации РГБ	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

Чернышова Ирина Алексеевна

«Поиск ингибиторов PARP1 и других ферментов репарации ДНК, способных
повышать чувствительность опухолей к известным химиопрепаратам»

Оригинальность работы составляет 98.45%, что соответствует требованиям
порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на
заседании Итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

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