**Иммунофлуоресцентный анализ как инструмент для оценки эффективности ингибиторов поли(АДФ-рибоза)-полимераз на клеточных культурах**

***Смирновская М.С.1, Щербакова Т.А.2*, *Шрам С.И.3, Нилов Д.К.2***

*Студент, 6 курс специалитета*

*1Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия*

*2*[*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова*](https://istina.msu.ru/organizations/214524/)*,* [*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского*](https://istina.msu.ru/organizations/department/276005/)*, Москва, Россия*

*3Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, Россия*

*E–mail:* [*naturalhorsemanship19@gmail.com*](mailto:naturalhorsemanship19@gmail.com)

Поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (ПАРП) относятся к семейству эукариотических белков, вовлеченных в процессы репарации повреждений ДНК, регуляции экспрессии генов, реорганизации хроматина и в механизмы гибели клеток при ряде патологий. Ингибиторы ПАРП показали свою высокую терапевтическую эффективность при некоторых видах рака, а также на моделях ишемии/реперфузии тканей, сепсиса, лекарственной токсичности. Однако известные ингибиторы продемонстрировали ряд крайне нежелательных побочных эффектов. В этой связи актуален поиск новых ингибиторов ПАРП, в том числе на основе природных соединений. В настоящее время хорошо отработаны и коммерчески доступны системы скрининга ингибиторов на основе очищенных рекомбинантных белков ПАРП. Целью данного исследования было разработать клеточную тест-систему, которая бы позволила оценивать влияние «клеточного контекста» (посттрансляционных модификаций, белок-белковых взаимодействий, транспорта соединения через мембрану) на эффективность действия ингибитора. Предложенный нами подход основан на сравнительном анализе эффективности ПАРП-ингибиторного действия соединений одновременно на живых и пермеабилизованных дигитонином клетках, полученных из сестринских культур. Активность ПАРП оценивали по накоплению продукта реакции – поли(АДФ-рибозы) (ПАР), с применением иммунофлуоресцентного метода анализа. Исследования проводились на культурах клеток феохромоцитомы крысы РС12 и кардиомиобластов крысы Н9с2. Предложена оригинальная схема приготовления пермеабилизованных клеток, позволяющая избежать преждевременной активации и диффузии ПАРП из клетки. Были оптимизированы условия проведения анализа, включая: плотность клеток в культуре, время реакции, концентрацию субстрата NAD+ (для пермеабилизованных клеток), степень разведения антител и методы регистрации интенсивности флуоресценции. Разработанная тест-система была использована для анализа ПАРП-ингибиторной активности производных гуанина - 7-метилгуанина и 7-метил-8-оксигуанина. Было обнаружено, что 7-метил-8-оксигуанин проявляет большую активность, чем 7-метилгуанин. Эти соединения легко проникают в клетку и оказывают дозозависимое обратимое ингибирование ПАРП.

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант № 20-08-01161 А) и НИЦ «Курчатовский институт» - ИМГ (№ НИОКТР 121030200227-6). В работе использовано оборудование ЦКП «Центр клеточных и генных технологий» (НИЦ «Курчатовский институт» - ИМГ).*