

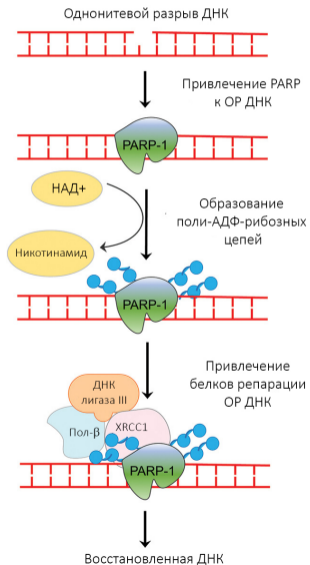
Выпускная квалификационная работа:  
Исследование летального действия рентгеновского излучения на  
клетки меланомы B16 в сочетании с ингибированием  
репарационного белка PARP

Студента 6 курса Физического факультета  
Кафедра Физики элементарных частиц  
Шаврин И.А.

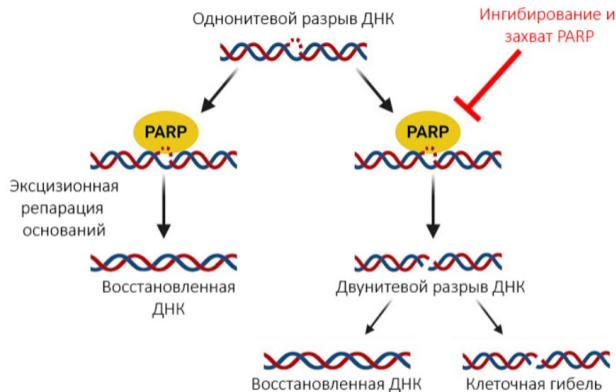
Научный руководитель: доц. к.ф.-м.н. Леонтьев В.В.  
Консультант: Храмов Т.С.

МГУ имени М.В.Ломоносова, г. Москва  
ОИЯИ, Лаборатория радиационной биологии, г. Дубна

- Актуальность исследования определяется фундаментальной задачей радиобиологии – поиском агентов, способных избирательно повышать чувствительность опухолевых клеток к ИИ. Одним из механизмов выживания клеток после облучения является репарация ДНК. Ингибиторы данного процесса, такие как бензамид, способны усиливать действие облучения. Бензамид относится к группе ингибиторов белка PARP (поли-АДФ-рибоза)полимеразы

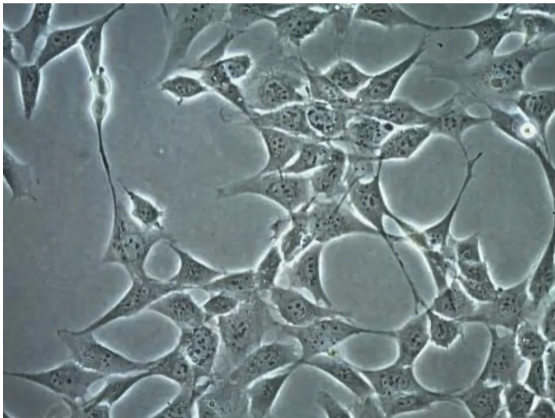


- При возникновении однонитевого разрыва ДНК фермент PARP синтезирует и присоединяет к себе или другим белкам цепи PAR (PARylation), что способствует рекрутированию репарационных ферментов для восстановления повреждения: ДНК лигазу III, ДНК полимеразу бета, XRCC1.



- Ингибитор PARP – бензамид блокирует активный сайт PARP и закрепляет белок на однонитевом разрыве ДНК. Образовавшийся комплекс останавливает репликативную вилку, превращая однонитевые разрывы в двунитевые.

- Исследование совместного действия рентгеновского излучения и ингибитора репарации ДНК бензамида на:
  - выживаемость клеток меланомы мыши В16 в зависимости от дозы облучения методом макроколоний
  - на формирование двунитевых разрывов (ДР) ДНК методом иммуноцитохимического окрашивания с использованием белков репарации  $\gamma$ H2AX и 53BP1 в качестве маркеров.



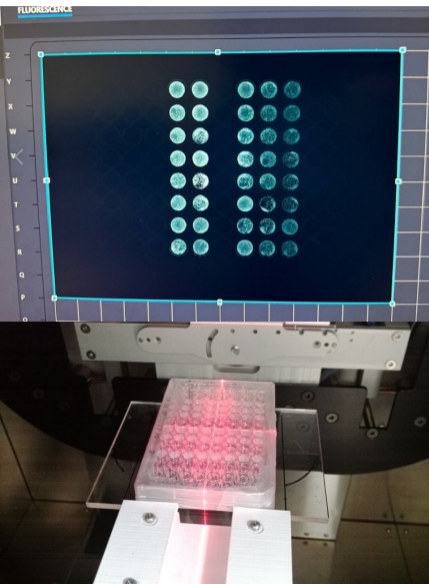
## Клеточная культура:

- клетки меланомы мыши B16 – классическая модельная система в радиобиологии

# Источник излучения

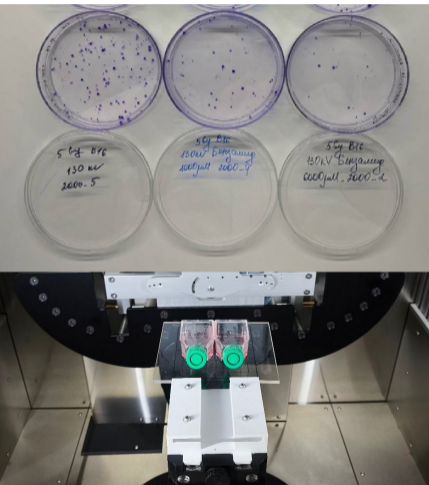


- Рентгеновская установка SARRP (ЛРБ ОИЯИ)
- 130 кВ 6,7 мА 0,1 мм Al
- Мощность дозы 1,5 Гр/мин
- Дозы от 1 до 5 Гр



## Анализ цитотоксического действия бензамида:

- нанесение клеточной суспензии на планшеты
- добавление бензамида (0,1 - 10 мМ)
- окрашивание dsGreen
- измерение на денситометре Sapphire



**Макроколонии** – клоногенная активность:

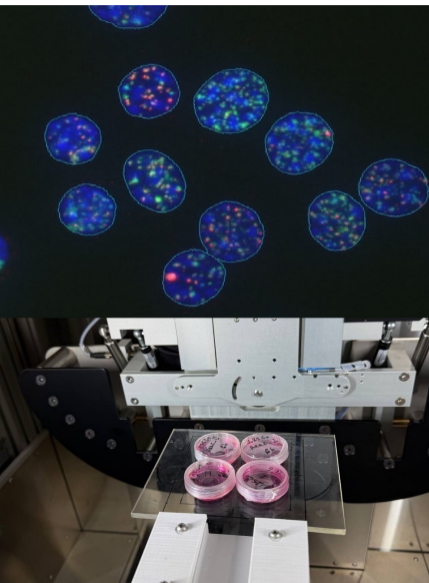
-добавление бензамида (1 мМ) за 1ч до облучения

-облучение (1-5 Гр) культуральных флаконов

-высев клеточной суспензии на чашки Петри

-окрашивание макроколоний

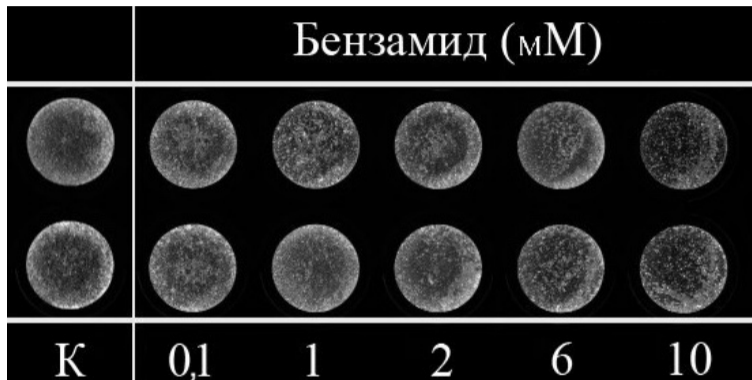
-количественный анализ



**Иммуноцитохимия –  $\gamma$ H2AX и 53BP1 фокусы:**

- добавление бензамида (1 мМ) за 1ч до облучения
- облучение (1,25 Гр) чашек Петри
- окрашивание и подготовка слайдов к микроскопии
- микроскопия и автоматический анализ в ПО JQuant+

# Анализ цитотоксического действия бензамида на клетки В16

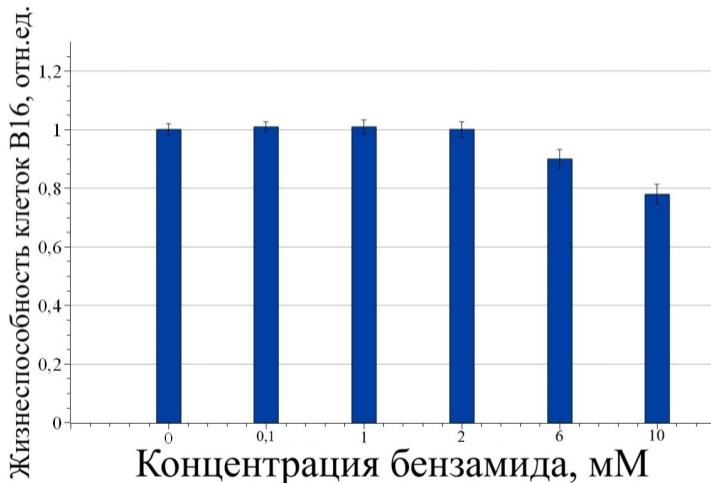


*клетки В16, окрашенные ДНК интеркалирующим красителем dsGreen через 72ч после добавления ингибитора*

# Анализ цитотоксического действия бензамида на клетки меланомы В16

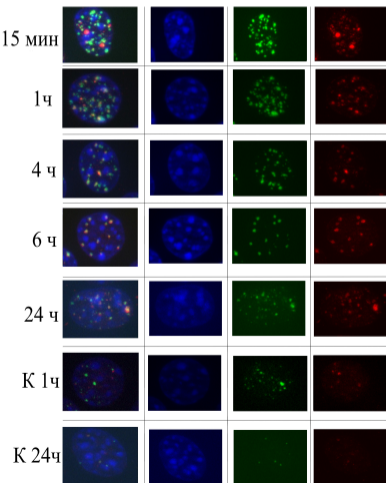
Таблица 1: Относительная жизнеспособность - ОЖ

п, мМ	ОЖ	SEM
0 (κ)	1,00	0,020
0,1	1,01	0,016
1	1,01	0,024
2	1,00	0,027
6	0,90	0,032
10	0,78	0,034

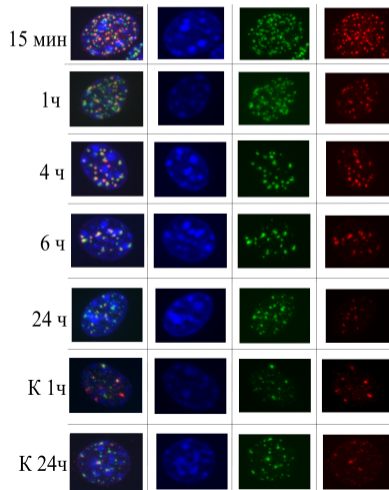


# Кинетика формирования и элиминации $\gamma$ H2AX и 53BP1 фокусов в ядрах клеток V16 при совместном действии облучения и бензамида

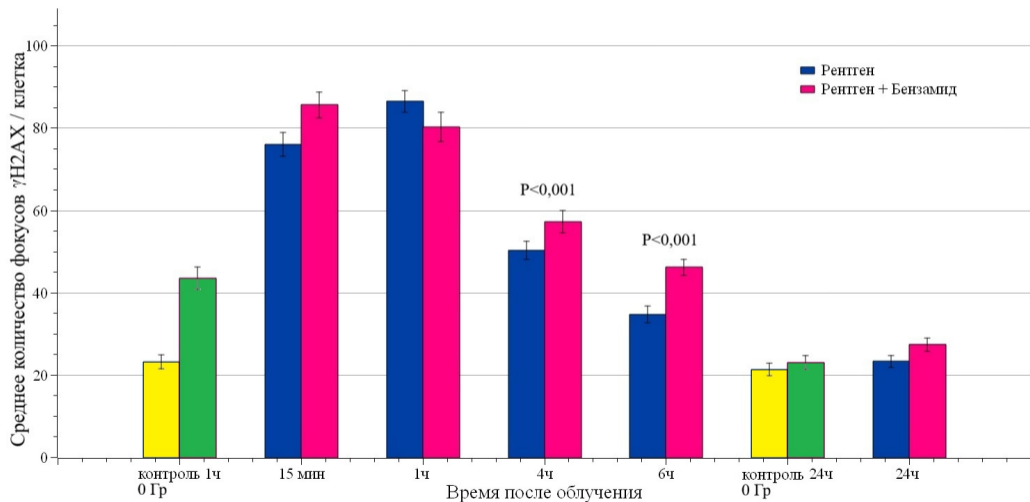
## Рентгеновское облучение



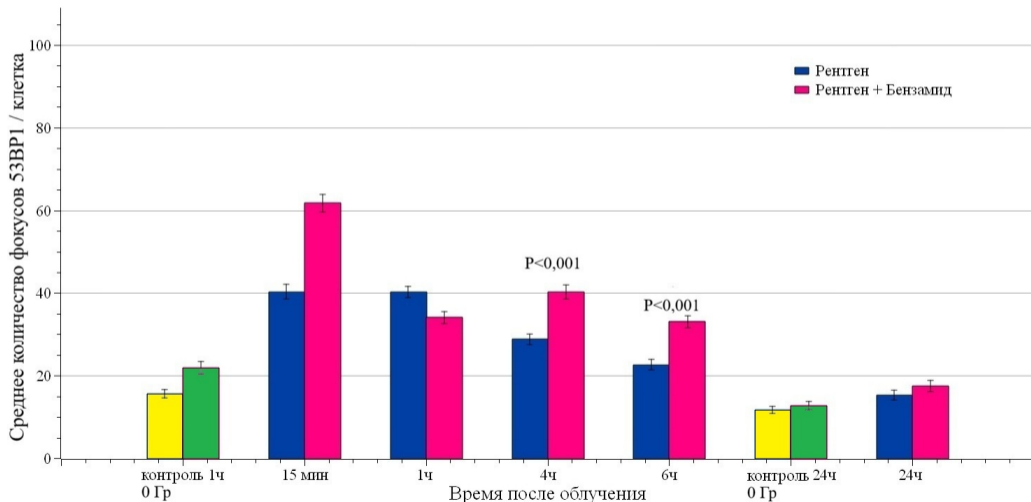
## Рентгеновское облучение + бензамид



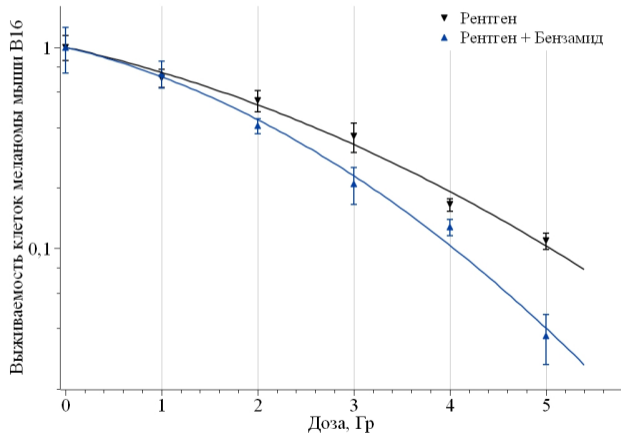
# Кинетика формирования и элиминации $\gamma$ H2AX фокусов в ядрах клеток В16 при совместном действии облучения и бензамида



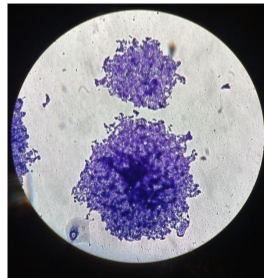
# Кинетика формирования и элиминации 53BP1 фокусов в ядрах клеток В16 при совместном действии облучения и бензамида



# Выживаемость клеток В16 при совместном действии облучения и бензамида



- Аппроксимация линейно-квадратичной функцией  $S(D) = e^{-\alpha D - \beta D^2}$
- Фактор изменения дозы (ФИД<sub>10%</sub>) =  $1,25 \pm 0,21$



## Оценка синергического эффекта облучения и бензамида

- Оценка по методу Блисса (индекс комбинации ИК = эксперимент / ожидаемый аддитивный эффект)
- ИК < 1 – синергизм; ИК > 1 – антагонизм

Доза, Гр	Выживаемость (рентген+бензамид)	Ожидаемый аддитивный эффект	Индекс комбинации
0	1,00	1,00	1,00
1	0,74	0,70	1,06
2	0,41	0,54	0,76*
3	0,21	0,36	0,58*
4	0,13	0,17	0,76*
5	0,04	0,11	0,36*

*\*Для доз 2–5 Гр индекс комбинации <1, что указывает на синергическое усиление радиочувствительности.*

- 1 Оценка токсического действия бензамида на клетки V16 показала, что в диапазоне исследованных концентраций жизнеспособность начинает снижаться при концентрации 6 мМ. При меньших концентрациях показатели жизнеспособности не отличаются от контрольных.
- 2 Выявлено, что совместное применение рентгеновского облучения и бензамида синергически снижает выживаемость клеток V16 по сравнению с облученным контролем.
- 3 Фактор изменения дозы (ФИД) при 10% выживаемости клеток V16 в присутствии бензамида (1мМ) составил  $1,25 \pm 0,21$ .
- 4 Установлено, что облучение в присутствии ингибитора значительно увеличивается количество  $\gamma\text{H2AX}$  и 53BP1 фокусов через 4 и 6 ч ( $P < 0,001$ ). Выявлено, что в присутствии бензамида элиминация  $\gamma\text{H2AX}$  фокусов снижается в 1,14 ( $P = 0,029$ ) и 1,33 ( $P < 0,001$ ) раза через 4 и 6 ч, соответственно; Элиминация 53BP1 фокусов также затруднена и снижается в 1,4 ( $P < 0,001$ ) и 1,5 ( $P = 0,006$ ) раза через 4 и 6 ч.

**Спасибо за внимание!**