

**Яковлева Е.А., Щеглова А.В., Десятова М.А., Сичкар Д.А., Макеев О.Г.
ИССЛЕДОВАНИЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО ВЛИЯНИЯ
СЛОЖНОМОДУЛИРОВАННОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ НА
КЛЕТОЧНУЮ КУЛЬТУРУ IN VITRO**

Кафедра медицинской биологии и генетики
Уральский государственный медицинский университет
Лаборатория технологий клеточной и генной терапии
Институт медицинских клеточных технологий
Екатеринбург, Российская Федерация

**Yakovleva E.A., Scheglova A.V., Desyatova M.A., Sichkar D.A., Makeev O.G.
RESEARCH OF EPIGENETIC INFLUENCE OF COMPLEX MODULATED
ELECTROMAGNETIC FIELD ON CELL CULTURE IN VITRO**

Department of medical biology and genetics
Ural State Medical University
Laboratory of cellular therapy and gen-technology
Institute of Medical Cell Technologies
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: larim@mail.ru

Аннотация. В статье рассмотрен феномен эпигенетического влияния низкочастотного импульсного сложномодулированного электромагнитного поля на культуру клеток человека *in vitro*, представлены результаты статистической обработки полученных данных.

Annotation. The article considers the phenomenon of the epigenetic effect of a low-frequency pulsed complex-modulated electromagnetic field on an *in vitro* human cell culture, presents the results of statistical processing of the obtained data.

Ключевые слова: эпигенетика, ацетилирование гистонов, ДНК, ЭМП, клеточная культура.

Keywords: epigenetics, histone acetylation, DNA, EMF, cell culture.

Введение

Эпигенетика – одно из самых перспективных направлений постгеномики на сегодняшний день. Предметом ее изучения являются закономерности и механизмы эпигенетического наследования, обеспечивающие регуляцию генной экспрессии и влияющие таким образом на фенотипические проявления признака. Отличительная особенность эпигенетического влияния – «надгенетический» уровень регуляции или, другими словами, реализация воздействия при сохранении нуклеотидной последовательности ДНК при

наличии определенных изменений, способных сохраняться при клеточном делении и передаваться далее. Наибольшее значение имеют метилирование ДНК и модификации гистоновых белков. Эпигенетические изменения - ключ к пониманию, и, в дальнейшем, лечению, различных патологий. Так, с уверенностью можно говорить о значительном вкладе эпигенетических модификаций в этиологию таких опухолевых заболеваний, как рак молочной железы и яичников (BRCA1- и BRCA2-ассоциированные, WRN - ассоциированные), некоторых толстокишечных опухолей (CIMP+ - ассоциированные) [1] за счет ингибирования работы генов-онкосупрессоров. Поэтому в настоящее время ведутся разработки подходов коррекции нарушений эпигенетической регуляции. Так, на рынке эпигенетических технологий существуют решения, направленные на терапию онкологической патологии, представляющие собой химические агенты (четыре препарата, официально одобренные FDA, управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов в США, – Золинза (вориностат, Merck) и Истодакс (ромидепсин, Celgene) - лечение лимфом, Видаза (5-азацитидин, Celgene) - лечение лейкозов, Дакоген (децитабин, Eisai Tokyo)). Два из них способствуют ингибированию метилирования ДНК, другие два тормозят модификацию гистонов. При этом перспективным представляется поиск путей эпигенетической коррекции с помощью физического воздействия. В профильной литературе [2] имеются данные, свидетельствующие о возможности прицельного влияния физическим агентом (ультразвуком) на так называемые регуляторные, промоторные области генома, где локализованы большинство этиопатогенетически значимых эпигенетических модификаций. Также существуют исследования [3], посвященные изучению биоуправляемых низкочастотных импульсных сложномодулируемых электромагнитных полей (ЭМП) и их стимулирующему влиянию на клеточном уровне. Поэтому нами в качестве агента воздействия выбрано импульсное сложномодулированное ЭМП (ИСЭМП).

Цель исследования – зарегистрировать и охарактеризовать феномен эпигенетического влияния на клеточную культуру *in vitro* физическим агентом, в частности – сложномодулированным ЭМП с различными амплитудно-частотными характеристиками.

Материалы и методы исследования

Для реализации поставленной цели была выбрана культура клеток ЛЭЧ 3-81, полученная из ФБУН «Екатеринбургский научно – исследовательский институт вирусных инфекций» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Условия хранения культуры клеток: - 85°C, в криохранилище.

Культивирование осуществлялось в стандартных условиях и по стандартным протоколам - среда DMEM/Ham F-12 (SigmaAldrich, США) с 10% фетальной бычьей сыворотки (SigmaAldrich, США), с соблюдением всех необходимых требований асептики и антисептики до необходимой клеточной

массы в условиях чистых помещений с постоянным макро- и микроскопическим контролем отсутствия контаминации. Культивирование клеток проводили в стерильных ламинарных боксах, в инкубаторах (Sanyo, Япония) с оптимальными температурными (37°C), газовыми (с 5% CO₂) и влажностными (95%) характеристиками.

Эксперимент проводили в два этапа. В первую очередь оценивали факт наличия или отсутствия цитотоксического действия выбранного режима облучения путем исследования активности митохондриальных дегидрогеназ методом МТТ теста (Sigma Aldrich, США) с оценкой результатов на спектрофотометре, длина волны 507 нм (MultiskanGO Thermo Scientific, Япония) [4]. Для это клетки высевали на 96-луночные культуральные планшеты (Sarstedt). По достижении 60% конфлюэнтности в каждой лунке планшет облучали сложномодулированным ЭМП с помощью индуктора ИСЭМП «Малахит 010П», несущая частота 0,7 Гц, частота 120 Гц со временной экспозицией, равной 3 часам. Оценивали клеточную морфологию микроскопически. Далее следовали рекомендациям производителя набора. На следующий день в каждую лунку вносили ростовую среду с 10-% содержанием готового раствора для проведения МТТ теста, затем осуществляли инкубирование культурального планшета в течение 4 часов. По окончании требуемого времени полностью удаляли внесенный ранее раствор и лизировали клеточные мембраны добавлением 100 мкл раствора для экстракции формазана. Оптическую плотность регистрировали на вертикальном спектрофотометре (Multiskan GO Thermo Scientific, США) при длине волны 570 нм.

В рамках второго этапа, после получения необходимого количества клеточной массы, провели пассаж культуры на флаконы площадью 175 см² (Sarstedt, Германия), сформировав опыт и контроль. Далее по достижению 50% конфлюэнтности клеточного монослоя (вторые сутки), со вторых по шестые сутки опытную группу облучали сложномодулированным ЭМП посредством индуктора ИСЭМП «Малахит 010П», несущая частота 0,7 Гц, частота 120 Гц. Расстояние от катушки излучателя до флакона 5 см, протокол облучения: 60 минут 1 раз в сутки в течение 3 дней. Далее клетки опытной и контрольной групп лизировали и оценивали степень ацетилирования гистоновых белков посредством анализа активности гистонацетилтрансферазы (НАТ) в соответствии с протоколом изготовителя набора (Histone Acetyltransferase (НАТ) Activity Assay Kit, Sigma-Aldrich).

Статический анализ полученных результатов проводили в программе RStudio (Version 0.99.903 – © 2009-2016 RStudio, Inc.).

Результаты исследования и их обсуждение

По результатам проведенных экспериментов получены следующие данные: в первом опыте по оценке метаболической активности клеток при воздействии импульсного сложномодулированного электромагнитного поля наблюдается:

-во-первых, сохранение исходной морфологии культивируемых клеток при увеличении конфлюэнтности монослоя в каждой лунке, что свидетельствует о сохранении пролиферативного потенциала клеточной культуры,

-во-вторых, активное накопление нерастворимого формазана, который имеет пурпурное окрашивание, что свидетельствует об активности НАДФ-Н-зависимых клеточных оксидоредуктазных ферментов, восстанавливающих тетразолиевый краситель, и позволяет судить об отсутствии цитотоксического, а также цитостатического действия в рамках выбранного нами режима облучения.



Рис. 1. Оценка цитотоксичности в рамках выбранного нами режима воздействия

Результаты второго эксперимента позволяют косвенно судить об изменении уровня ацетилирования гистонов по статистически значимому уменьшению активности гистонацетилтрансферазы (НАТ) в опытном образце по сравнению с контролем. После 3 дней облучения культуры в установленном режиме по выбранному протоколу в опытной группе было отмечено статистически достоверное ($p < 0.001$) снижение уровня ацетилирования гистоновых белков на 18,2% относительно контроля.

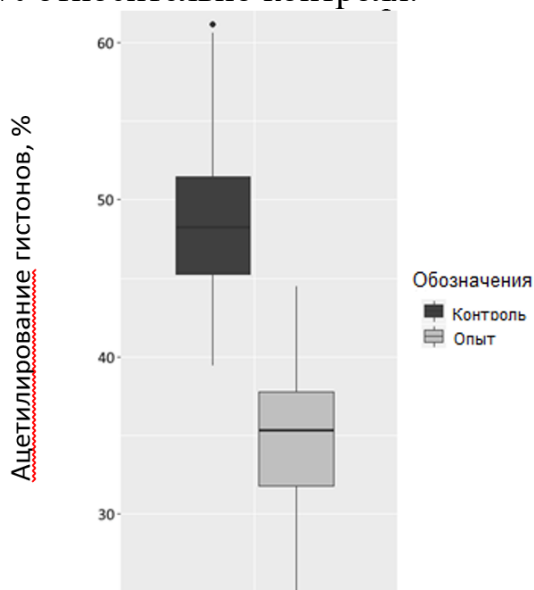


Рис. 2. Сравнение уровня ацетилирования гистонов опытной и контрольной групп. Второй опыт

Таким образом, мы получили данные, свидетельствующие о факте качественного воздействия низкочастотных импульсных сложномодулируемых электромагнитных полей (ЭМП) на эпигенетический уровень организации.

Выводы:

1. Зарегистрирован феномен качественного воздействия низкочастотных импульсных сложномодулируемых электромагнитных полей (ЭМП) на уровень эпигенетической организации клеточной культуры.

2. Отсутствует цитостатическое и цитотоксическое действие в выбранном нами режиме облучения.

3. Качественное влияние ИСЭМП на эпигеном проявляется в снижении уровня ацетилирования гистоновых белков, что открывает перспективы разработки новой технологии профилактики и терапии различных заболеваний, прежде всего – онкологических.

Список литературы:

1. Краснов Г. С. и др. Перспективные маркеры СІМР+ опухолей толстой кишки, выявленные на основе анализа данных ресурса TCGA //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2018. – Т. 21. – №. 8. – С. 920-924

2. Нечипуренко Ю. Д. и др. Физические характеристики регуляторных участков генома, эпигенетика и канцерогенез //Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2018. – Т. 3. – №. 4. – С. 884-887

3. Челноков А. Н. Применение импульсного сложномодулированного электромагнитного поля в лечении диафизарных переломов костей голени по ГА Илизарову : дис. – Пермь, 1997, 1997

4. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток. Практическое руководство; пер. 5-го англ.изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. – 691 с.

МЕНЕДЖМЕНТ, ЭКОНОМИКА И ОРГАНИЗАЦИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

UDC 614.2

Shirokova E.I.

INTERNATIONALIZATION OF MEDICINE: CURRENT WORLD HEALTH CARE DEVELOPMENT TRENDS

Department of Foreign Languages
Ural State Medical University
Yekaterinburg, Russian Federation

Email: eugenias2000@mail.ru