

Для цитирования: Сидоренко Ю.С., Кит О.И., Попов И.А., Шихлярова А.И., Росторгуев Э.Е., Тимошкина Н.Н., Гусарева М.А., Арапова Ю.Ю., Потемкин Д.С., Пушкин А.А., Стасов В.В. Влияние импульсных магнитных полей на экспрессию генов онкосупрессоров в эксперименте на культуре клеток глиобластомы человека Т98G. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18(6): 57–66. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-6-57-66.

For citation: Sidorenko Yu.S., Kit O.I., Popov I.A., Shikhlyarova A.I., Rostorguev E.E., Timoshkina N.N., Gusareva M.A., Arapova Yu.Yu., Potemkin D.S., Pushkin A.A., Stasov V.V. Effect of pulsed magnetic fields on the expression levels of tumor suppressor genes in human T98G glioblastoma cell line. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18(6): 57–66. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-6-57-66.

## ВЛИЯНИЕ ИМПУЛЬСНЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ОНКОСУПРЕССОРОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА Т98G

Ю.С. Сидоренко, О.И. Кит, И.А. Попов, А.И. Шихлярова, Э.Е. Росторгуев,  
Н.Н. Тимошкина, М.А. Гусарева, Ю.Ю. Арапова, Д.С. Потемкин,  
А.А. Пушкин, В.В. Стасов

Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, г. Ростов-на-Дону, Россия  
Россия, г. Ростов-на-Дону, 344037, ул. 14-я линия, 63. E-mail: Popov\_Ivan777@rambler.ru

### Аннотация

**Цель исследования** – изучить влияние импульсного магнитного поля (ИМП) на экспрессию ключевых генов онкосупрессоров APC, MLH, MGMT клеточной линии глиобластомы человека Т98G. **Материал и методы.** На культуре клеток Т98G проведено воздействие ИМП с параметрами индукции 15 и 300 мТ как самостоятельно, так и в сочетании с воздействием ионизирующего излучения (РОД 10 Гр). Ионизирующее излучение проводилось на аппарате Theratron Equinox фирмы Best Theratronics, где в качестве источника излучения использовался <sup>60</sup>Со. Источником импульсного магнитного поля служил аппарат «Нейро-МС/Д терапевтический расширенный» компании «Нейрософт». Определение живых/мертвых клеток проводили в счетчике клеток NanoEnTek JuliFI (Корея) с использованием 0,4 % раствора трипанового синего для окраски мертвых клеток. Экстракцию тотальной РНК проводили по протоколу изготовителя Trizol с изменениями: водную фазу сепарировали с реагентом Trizol дважды. Количественное измерение выделенной РНК проводили на флюориметре Qubit 2.0 с использованием набора реактивов с РНК-интеркалирующим красителем Quant-iT RNA Assay Kit (Life Technologies, США). Оценку экспрессии генов MLH, APC, MGMT проводили методом RT-PCR на амплификаторе CFX96 (BioRad, США). Данные анализировали с использованием метода порогового значения цикла (Ct) с нормализацией по экспрессии гена TBP в каждом образце. Относительную экспрессию генетического локуса (Exp) рассчитывали по методу 2-ΔCt. Статистический анализ результатов осуществляли с помощью пакета программ Statistica v10. **Результаты.** Установлено, что через сутки после воздействия ИМП индукцией 15 мТ и 300 мТ отношение уровня экспрессии MGMT к контролю имело значимые различия (p<0,05). Наиболее выраженное снижение транскрипционной активности гена MGMT в клетках глиобластомы отмечалось при ИМП 15 мТ и коррелировало с показателем летальности клеток. Уровень летальности, достигнутый после лучевого воздействия и ИМП 15 мТ, не изменялся, а при сочетании с ИМП 300 мТ снижался с 18,7 до 15 %. **Заключение.** Эффекты снижения транскрипционной активности MGMT в клетках глиобластомы Т98G и способность влияния ИМП как монофактора на их жизнеспособность характеризуют магнитовосприимчивость клеточных механизмов опухоли. При сочетании ИМП с ионизирующим излучением характер их взаимовлияния меняется от индифферентного до антагонистического, что указывает на необходимость подбора и обоснования ключевых биотропных параметров.

**Ключевые слова:** глиобластома Т98G, импульсное магнитное поле, ионизирующее излучение, экспрессия генов онкосупрессоров.

## EFFECT OF PULSED MAGNETIC FIELDS ON THE EXPRESSION LEVELS OF TUMOR SUPPRESSOR GENES IN HUMAN T98G GLIOBLASTOMA CELL LINE

Yu. S. Sidorenko, O.I. Kit, I.A. Popov, A.I. Shikhlyarova, E.E. Rostorguev, N.N. Timoshkina, M.A. Gusareva, Yu.Yu. Arapova, D.S. Potemkin, A.A. Pushkin, V.V. Stasov

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia  
Russia, 344037, Rostov-on-Don, 14-ya linia, 63. E-mail: Popov\_Ivan777@rambler.ru

### Abstract

**Aim:** to study the effect of a pulsed magnetic field (PMF) on the expression of key tumor suppressor genes, such as APC, MLH, and MGMT in human T98G glioblastoma cell line. **Material and Methods.** The PMF with the intensity of 15 and 300 mT was used alone and in combination with ionizing radiation at a single dose of 10 Gy. To perform ionizing radiation, Theratron Equinox <sup>60</sup>Co unit Best Theratronics Ltd., Ottawa, Canada) was used. The source of the pulsed magnetic field was Neuro-MS / D Therapeutic Advanced device of the Neurosoft company. Live and dead cells were determined in NanoEnTekJuliFI cell counter (Korea) using a 0.4 % trypan blue solution to stain dead cells. Total RNA was extracted according to the protocol of the manufacturer Trizol with changes: the aqueous phase was separated with Trizol reagent twice. The quantitative measurement of the isolated RNA was carried out on a Qubit 2.0 fluorimeter using a kit of reagents with the Quant-iT RNA AssayKit RNA intercalating dye (Life Technologies, USA). The expression of MLH, APC, and MGMT genes was evaluated by RT-PCR using a CFX96 amplifier (BioRad, USA). Data were analyzed using the cycle threshold (Ct) method with normalization for TBP gene expression in each sample. Relative expression of the genetic locus (Exp) was calculated by the 2- $\Delta$ Ct method. Statistical analysis of the results was carried out using the Statistica v10 software package. **Results.** One day after exposure to PMF, significant differences in the MGMT expression level compared to the control were found ( $p < 0.05$ ). A significant decrease in the transcriptional activity of the MGMT gene in glioblastoma cells was observed with PMF intensity of 15 mT, and correlated with the cell mortality rate. No changes in the mortality rate were observed after radiation exposure combined with 15 mT PMF. However, the mortality rate decreased from 18.7 % to 15 % after radiation exposure combined with 300 mT PMF. **Conclusion.** The effect of reduction in the transcriptional activity of MGMT in T98G glioblastoma cells and the effect of PMF as a monofactor on their viability characterize the magnetic susceptibility of tumor cell mechanisms. Given the multidirectional nature of the combined interaction of ionizing radiation and PMF, it is necessary to emphasize the importance of choosing and justifying the role of biotopic parameters of PMF in order to exclude a negative effect on the treatment.

**Key words:** T98G glioblastoma, pulsed magnetic fields, ionizing radiation, expression of tumor suppressor genes.

Ежегодно во всем мире отмечается рост числа новообразований головного мозга. По данным CBTRUS, в 2018 г. в США число вновь выявленных больных с установленным диагнозом глиобластомы составляет 14,7 % от общего количества больных с первичными новообразованиями ЦНС [1]. В Российской Федерации за 2018 г. выявлено 32100 больных с первичными опухолями ЦНС, из них глиобластомы составили 15,6 % [2].

При лечении таких больных отдается предпочтение комплексному подходу, в котором внимание уделено не только этапам хирургического и химиолучевого лечения, но и воздействию на перифокальную зону ложа удаленной опухоли, которая является источником до 80 % всех рецидивов. В связи с этим в мире ведется разработка различных вспомогательных методик, одной из которых является бесконтактная транскраниальная импульсная электромагнитотерапия. В мире

накоплен большой опыт по изучению механизмов влияния постоянного и сверхнизкочастотного переменного электромагнитных полей на рост опухолей и организмы животных и человека [3–9]. За рубежом проведены исследования, которые доказали, что ИМП не только не оказывает стимулирующего влияния на клеточные культуры карциномы легкого (A549), карциномы протоков поджелудочной железы (MiaPaca2), колоректального рака (LDD1), но и увеличивает чувствительность клеток этих культур к ионизирующему излучению [10]. Однако имеющиеся данные относительно влияния импульсных магнитных полей на злокачественные глиальные опухоли головного мозга немногочисленны или практически отсутствуют. Ранее нами были проведены исследования и получены данные об ингибирующем влиянии импульсных магнитных полей на жизнеспособность мультиформных клеток глиобластомы человека линии T98G [11].

Представлялось необходимым дальнейшее изучение механизма такого влияния на уровне молекулярных изменений генетического аппарата клеток глиобластомы.

Изменения экспрессии генов супрессоров опухолевого роста рассматривают как важный механизм онкогенеза. Изменения в ДНК, продуцируемые во время репликации и рекомбинации, восстанавливаются системой репарации неспаренных оснований (MMR), частью которой является *MLH1*. В то же время белковый продукт гена *MGMT* является ключевым элементом системы прямой репарации ДНК. Многофункциональный белок *APC* играет критическую роль во многих клеточных процессах: регуляции деления через контроль Wnt сигнального пути, клеточной адгезии и поляриности, контроле количества хромосом после деления и т. д. Клетки, лишённые функций репарации и/или активности ключевых онкосупрессоров, приобретают мутантный фенотип, который может реализовываться в онкотрансформации. С другой стороны, в ходе лучевой и лекарственной терапии опухолей пониженная активность репарационных систем в злокачественных клетках может играть проонкогенную роль и быть положительным фактором течения заболевания.

**Целью исследования** было изучение влияния импульсного магнитного поля на экспрессию ключевых генов онкосупрессоров *APC*, *MLH*, *MGMT* в условиях эксперимента на клеточной линии T98G.

#### Материал и методы

В эксперименте использовали культуру глиобластомы человека T98G. Культивирование клеток T98G проводили в 12-луночной планшете (JetBio-Fil, Китай) при 37 °C в условиях контролируемого 5 % CO<sub>2</sub> и 95 % влажности в инкубаторе CB 150 (Binder, Германия) с использованием среды RPMI-1640 (Биолот, Россия), содержащей 10 % фетальной телячьей сыворотки (Биолот, Россия) и 50 мкг/мл гентамицина (Биолот, Россия).

При достижении 75–80 % уровня конfluence в лунках заменяли питательную среду. Ионизирующее излучение проводили на аппарате TheratronEquinox фирмы BestTheratronics, где в качестве источника излучения использовался <sup>60</sup>Co. Поле излучения 12×18 см соответствовало параметрам планшета, при этом доза излучения для каждой лунки составила 10 Гр. Воздействие импульсным магнитным полем проводилось с учетом принципов активационной терапии в режимах частот, близких к эндогенным ритмам мозга. Процедуру выполняли на аппарате «Нейро-МС/Д терапевтический расширенный» компании «Нейрософт» в режиме частот F=0,3Hz(5 min.)3,0Hz(1 min.)9,0 Hz (1 min.), t общее = 7 min при различных параметрах индукции – B=300 мТ и 15 мТ. После 3 и 24 ч инкубирования проводили микроскопирова-

Таблица 1  
Нуклеотидная последовательность использованных праймеров

Наименование праймера	Последовательность 5'→3'
MLH 1 exp F	CCT ACT TCC AGC AAC CCC AG
MLH 1 exp R	TGC AGT CAT TTC CTT TCG GGA
APC1 exp F	AGTCCCAAGCAACAGAAGCA
APC1 exp R	GACCTTCATTCTGCCGCTCA
MGMT exp F	CGC ACC GTT TGC GAC TTG
MGMT exp R	TGT CCA GTG TGG TGC GTTT
TBP exp F	GTG CCC GAA ACG CCG AA
TBP exp R	GTG GTT CGT GGC TCT CTT ATC C

ние культуры клеток с помощью микроскопа DM IL LED Fluo (Leica, Германия). Для каждого режима воздействия и контроля было предусмотрено три лунки. Эксперимент был воспроизведен дважды.

Затем клетки глиобластомы снимали с подложки путем трипсинизации раствором Трипсин/Версена 1:1 (Биолот, Россия). Определение живых/мертвых клеток проводили в счетчике клеток NanoEnTekJuliFl (Корея) с использованием 0,4 % раствора трипанового синего для окраски мертвых клеток. После подсчета клетки отмывали раствором DPBS и осаждали центрифугированием с последующим ресуспензированием в Trizol (ThermoFisherScientific, США). Экстракцию тотальной РНК проводили по протоколу изготовителя Trizol с изменениями: водную фазу сепарировали с реагентом Trizol дважды. Количественное измерение выделенной РНК проводили на флюориметре Qubit 2.0 с использованием набора реактивов с РНК-интеркалирующим красителем Quant-iT RNA AssayKit (LifeTechnologies, США).

Для наработки библиотеки кДНК проводили реакцию обратной транскрипции набором «Реверта-L» с использованием гексамерных случайных праймеров (Синтол, Россия). Оценку экспрессии генов *MLH*, *APC*, *MGMT* проводили методом ПЦР в реальном времени (RT-PCR) на амплификаторе CFX96 (BioRad, США) в присутствии праймеров, которые были разработаны нами с использованием базы NCBI GenBank (табл. 1).

После предварительной оценки стабильности экспрессии в программе geNorm из 8 кандидатных локусов в качестве референсного был выбран TBP. Проверка праймеров включала оценку градиента температур для определения оптимальной температуры отжига (56–64 °C) с последующей визуализацией ампликонов с помощью электрофореза в агарозном геле, анализ кривых плавления (рис. 1).

Матрицу комплементарной ДНК нормализовали до 2–3 нг на реакцию. Каждая постановка ПЦР включала контрольные образцы без матрицы (NTC), исходные образцы РНК (NRT) и образцы кДНК в трех повторах для отдельного генетического локуса. Режим ПЦР был следующим: 95b°C

300 сек, 60 °C 40 сек, 95 °C 15 сек, 40 циклов. В качестве красителя был использован интеркалирующий флуоресцентный краситель EvaGreen I (Евроген, Россия).

Данные анализировали с использованием метода порогового значения цикла (Ct) с нормализацией по экспрессии гена «домашнего хозяйства» TBP в каждом образце. Относительную экспрессию генетического локуса (Exp) рассчитывали по методу 2-ΔCt.

Статистический анализ результатов осуществляли с помощью пакета программ Statistica 10. Для оценки значимости различий в группах, включая уровни экспрессии, применяли тест Вилкоксона–Манна–Уитни для порогового уровня статистической значимости  $p < 0,05$ . Характер влияния факторов ИИ и ИМП по выживаемости клеток изучен с помощью метода общих линейных моделей Main Effects ANOVA.

**Результаты и обсуждение**

Характер роста моноклональных клеток линии T98G после однократного воздействия импульсным магнитным полем при 3- и 24-часовой экспозиции проиллюстрирован на рис. 2. Несмотря на незначительность визуальных различий при микроскопировании культуры клеток в разных

вариантах эксперимента, количественный анализ продемонстрировал четко выраженные различия абсолютного числа клеток в контроле от опытных вариантов (табл. 2, 3).

Анализ относительных показателей летальности клеток T98G, представленный в табл. 3, характеризовал следующие изменения. Через 3 ч после воздействия импульсного магнитного поля с индукцией 15 мТ уровень летальности клеток превысил контрольный уровень в 2,5 раза, а магнитного поля с индукцией 300 мТ – в 2,75 раза. Использование радиоактивного излучения увеличило летальность по отношению к контролю в 3,6 раза. После сочетанного воздействия импульсным магнитным полем 15 мТ с ионизирующим излучением на культуру клеток глиобластомы (табл. 2, 3) индуцировало аналогичный эффект гибели клеток T98G.

Увеличение экспозиции до 24 ч после воздействия существенно не повлияло на регистрируемый уровень гибели клеток. Только моно-воздействие импульсного магнитного поля с индукцией 15 мТ повысило показатель летальности до 13,6%. Гибель клеток во всех вариантах эксперимента статистически значимо превышала фоновый уровень нежизнеспособных клеток в контроле, составивший 5,7% ( $p < 0,01$ ). В целом летальность

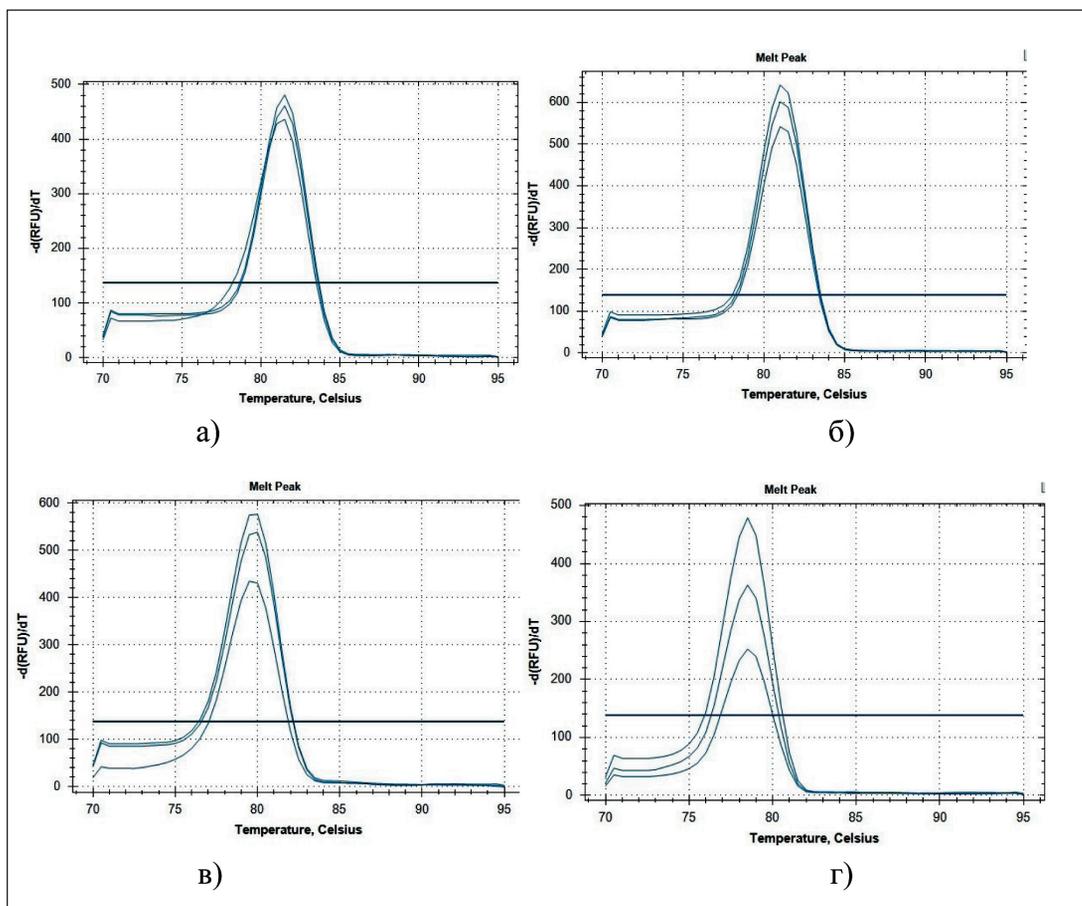


Рис. 1. Анализ кривых плавления ампликонов, полученных на матрице кДНК: а) TBP; б) APC; в) MGMT; г) MLH 1

Таблица 2

**Результаты раздельного и сочетанного влияния ионизирующего и неионизирующего излучения на жизнеспособность клеток линии T98G**

Условия эксперимента		Кол-во клеток		
Экспозиция	Режим облучения	Живые	Мертвые	Общее кол-во клеток
3 ч	Контроль	720000 ± 44497,2	39850 ± 10589,2	759850 ± 51665,6
	10 Гр	680000 ± 46904,2 p=0,57	157000 ± 11687,6 p=0,0002*	837000 ± 51386,8 p=0,42
	15 мТ	711666 ± 90642,8 p=0,68	104833 ± 13653,9 p=0,01*	816500 ± 102953 p=0,7
	300 мТ	686666,7 ± 34608,9 p=0,74	114833,314265,2 p=0,006*	801500 ± 45975,2 p=0,93
	15мТ + 10 Гр	666666,7 ± 79148,2 p=0,47	152833,3 ± 23465,5 p=0,005*	819500 ± 100969,5 p=0,69
	300мТ + 10 Гр	686666,7 ± 31797,9 p=0,63	123500 ± 11032,5 p=0,0003*	810166,7 ± 29690 p=0,4
24 ч	Контроль	961667 ± 67499	58166 ± 10637,7	1019833 ± 7508,5
	10 Гр	510000 ± 85945,7 p=0,008*	116833 ± 21769,1 p=0,04*	626833 ± 103784,5 p=0,03*
	15 мТ	975000 ± 100124,9 p=0,6	153833 ± 19964 p=0,01*	1128833 ± 110610 p=0,69
	300 мТ	1148000 ± 85229,1 p=0,2	156400 ± 23936,6 p=0,008*	1304400 ± 105220,5 p=0,06
	15мТ + 10 Гр	760000 ± 115441,2 p=0,1	165500 ± 16694,8 p=0,005*	925500 ± 114519,5 p=0,4
	300мТ + 10 Гр	813333 ± 52578 p=0,17	143333 ± 9489,2 p=0,005*	956666 ± 58759,8 p=0,5

Примечание: \* – различия статистически значимы по сравнению с контролем (p≤0,05).

Таблица 3

**Относительные показатели летальности клеток глиобластомы T98G в разные сроки после воздействий ИИ и ИМП**

Условия эксперимента	Летальность клеток через 3 ч после воздействия, %	Летальность клеток через 24 ч после воздействия, %	Митотический индекс через 24 ч после воздействия, %
Контроль	5,2	5,7	6,6
10 Гр	18,7	18,6	4,4
15 мТ	12,8	13,6	1,8
300 мТ	14,3	14,4	2,8
15мТ + 10 Гр	18,6	17,9	3,5
300мТ + 10 Гр	15,2	15,0	3,1

клеток при разных режимах неионизирующего и ионизирующего излучения оставалась на одном уровне и подтвердила тенденцию, описанную ранее [11].

Проведенное с помощью метода общих линейных моделей «Основные эффекты ANOVA» сравнительное изучение монофакторного влияния ИИ, ИМП (15 мТ), ИМП (300 мТ), а также их сочетания – ИИ + ИМП (15 мТ) и ИИ + ИМП (300 мТ) на выживаемость клеток глиомы при экспозиции 3 и 24 ч подтвердило значимое влияние на выживаемость клеток (табл. 4). Установлено, что при монофакторном воздействии ИИ так же, как и при сочетании ИИ с ИМП (15 мТ), выживаемость клеток глиомы наименьшая. Очевидно, что сочетание ИИ и ИМП (15 мТ) проявляет индифферентный характер влияния на выживаемость клеток глиомы.

В отличие от этого, добавление ИМП 300 мТ к ИИ ослабляет влияние последнего.

Согласно полученным данным, экспрессия генов *APC* и *MLH* при воздействии импульсным магнитным полем не изменилась. Увеличение экспозиции также не отразилось на транскрипционной активности указанных локусов (табл. 5). Статистически достоверное снижение относительной экспрессии было зафиксировано для гена *MGMT* после 24-часовой экспозиции (рис. 3).

После воздействия импульсным магнитным полем мощностью 15 мТ и экспозиции в 24 ч экспрессия гена *MGMT* снизилась в 1,7 раза по сравнению с контролем (t=4,33 при p=0,012). При воздействии импульсным магнитным полем индукцией 300 мТ и экспозицией 24 ч экспрессия снизилась в 1,9 раза по сравнению с контролем

Таблица 4

**Сравнительная эффективность влияния используемых в эксперименте факторов и их сочетания на выживаемость клеток линии T98G**

Условия эксперимента		Коэффициент выживаемости	Результаты ANOVA				
Экспозиция	Режим облучения		SS	DF	MS	F	p
3 ч	Контроль	0,95 ± 0,01					
	10 Гр	0,81 ± 0,01 p <sub>1</sub> =0,005*	0,06	1	0,06	78,6	0,001*
	15 мТ	0,87 ± 0,008 p <sub>1</sub> =0,005* p <sub>2</sub> =0,03*	0,02	1	0,02	25,04	0,001*
	300 мТ	0,86 ± 0,01 p <sub>1</sub> =0,005* p <sub>2</sub> =0,04*	0,02	1	0,02	33,7	0,001*
	15мТ+10 Гр	0,82 ± 0,008 p <sub>1</sub> =0,005* p <sub>2</sub> =0,67	0,05	1	0,05	72,9	0,001*
	300мТ +10Гр	0,85 ± 0,01 p <sub>1</sub> =0,002* p <sub>2</sub> =0,03*	0,0005	1	0,0005	0,6	0,4
24 ч	Контроль	0,94 ± 0,008					
	10 Гр	0,81 ± 0,01 p <sub>1</sub> =0,004*	0,05	1	0,05	32,5	0,004*
	15 мТ	0,86 ± 0,02 p <sub>1</sub> =0,005* p <sub>2</sub> =0,01*	0,02	1	0,02	12,5	0,001*
	300 мТ	0,88 ± 0,01 p <sub>1</sub> =0,007* p <sub>2</sub> =0,02*	0,01	1	0,01	6,5	0,02*
	15 мТ+10 Гр	0,81 ± 0,02 p <sub>1</sub> =0,005* p <sub>2</sub> =0,7	0,05	1	0,05	33,3	0,003*
	300 мТ +10Гр	0,85 ± 0,008 p <sub>1</sub> =0,005* p <sub>2</sub> =0,04*	0,03	1	0,03	16,6	0,003*

Примечания: \* – статистически значимые различия, p≤0,05; p<sub>1</sub> – уровень достоверности по отношению к контролю по критерию Вилкоксона–Манна–Уитни, p<sub>2</sub> – уровень достоверности по отношению к ИИ (10 Гр) по критерию Вилкоксона–Манна–Уитни; SS – сумма квадратов, Df – число степеней свободы, MS – средний квадрат ошибки, F – критерий Фишера, p – уровень достоверности влияния режима облучения с помощью метода общих линейных моделей Main Effects ANOVA.

Таблица 5

**Относительная экспрессия генетических локусов в эксперименте (Exp)**

Условия эксперимента		Среднее значение Exp (M ± m) генетических локусов		
Экспозиция	Воздействие	APC	MLH	MGMT
3 ч	Контроль	0,3879 ± 0,0064	0,8105 ± 0,0121	3,2541 ± 0,0190
	15 мТ	0,4269 ± 0,0181 p=0,228	0,8160 ± 0,0285 p=0,400	3,5103 ± 0,0291 p=0,628
	300 мТ	0,4463 ± 0,0142 p=0,057	0,7278 ± 0,0076 p=0,857	2,9019 ± 0,0195 p=0,400
24 ч	контроль	0,3849 ± 0,0054	0,7819 ± 0,0084	2,9201 ± 0,0175
	15 мТ	0,3844 ± 0,0,034 p=0,718	0,6325 ± 0,0,120 p=0,207	1,6737 ± 0,0260 <b>p=0,041</b>
	300 мТ	0,3383 ± 0,0373 p=0,592	0,6392 ± 0,0138 p=0,692	1,4952 ± 0,0119 <b>p=0,049</b>

Примечание: p – статистические различия значений Exp контроля и опыта.



В нашем исследовании физическое воздействие ионизирующего излучения и магнитного поля привело к достоверному увеличению гибели злокачественных клеток линии T98G без аккумуляющего эффекта при сочетании воздействий. Оценка экспрессии четырех онкосупрессоров, активность которых важна для процессов ДНК-репарации и выживаемости клетки, продемонстрировала эффект в отношении одного локуса *MGMT*. Магнитное поле в исследованных режимах (15 мТ, 300 мТ) повлияло на относительную экспрессию гена *MGMT*, вызвав снижение его транскрипционной активности более чем в 1,7 раза. Отметим, что данный эффект наблюдался отсроченно и был зафиксирован через 24 ч.

Важно отметить, что самостоятельное действие импульсного магнитного поля может оказывать ингибирующее влияние на жизнеспособность злокачественных глиальных клеток. Однако в условиях сочетания ИИ с воздействием ИМП разной интенсивности по-разному проявляется характер их взаимовлияния: при ИМП 15 мТл остаётся устойчивым (статистически не изменяется) уровень летальности, достигнутый ИИ, т.е. проявляется индифферентный характер взаимодействия.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ostrom Q.T., Gittleman H., Truitt G., Boscia A., Kruchko C., Barnholtz-Sloan J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro Oncol.* 2018 Oct 1; 20(suppl\_4): iv1iv86. doi: 10.1093/neuonc/noy131.
2. Первичные опухоли центральной нервной системы. Клинические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2018. [Интернет]. URL: <http://cr.rosminzdrav.ru/#/recomend/853>. (дата обращения: 17.05.2019). [Pervichnye opukholi tsentral'noi nervnoy sistemy. Klinicheskie rekomendatsii Ministerstva zdravookhraneniya Rossiiskoi Federatsii, 2018. [Интернет]. URL: <http://cr.rosminzdrav.ru/#/recomend/853>. (cited 17.05.2019). (in Russian)].
3. Zhu P., Zhu J.J. Tumor treating fields: a novel and effective therapy for glioblastoma: mechanism, efficacy, safety and future perspectives. *Chin Clin Oncol.* 2017 Aug; 6(4): 41. doi: 10.21037/cco.2017.06.29.
4. Улащик В.С. Магнитотерапия: современные представления о механизмах действия магнитных полей на организм. Здравоохранение (Минск). 2015; 11: 2129. [Ulashchik V.S. Magnet therapy: current understanding of mechanisms of magnet field action on body. *Healthcare.* 2015; 11: 21–29. (in Russian)].
5. Гурко Т.С. Применение магнитотерапии в реабилитации больных с рассеянным склерозом. Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. 2015; 20(3): 545–546. [Gurko T.S. Magnetic therapy application in the rehabilitation of patients with multiple sclerosis. *Tambov University Reports. Series Natural and Technical Sciences.* 2015; 20(3): 545–546. (in Russian)].
6. Куташов В.А., Шульга А.С. Транскраниальная магнитотерапия в неврологической клинике. Центральный научный вестник. 2016; 1(12): 9–11. [Kutashov V.A., Shulga A.S. Transcranial magnetic therapy in neurological clinic. *Central Scientific Herald.* 2016; 1(12): 9–11. (in Russian)].
7. Falone S., Grossi M.R., Cinque B., D'Angelo B., Tettamanti E., Cimini A., Di Ilio C., Amicarelli F. Fifty hertz extremely low-frequency electromagnetic field causes changes in redox and differentiative status in neuroblastoma cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(11): 2093–2106. doi: 10.1016/j.biocel.2007.06.001.
8. Destefanis M., Viano M., Leo C., Gervino G., Ponzetto A., Silvagno F. Extremely low frequency electromagnetic fields affect proliferation and mitochondrial activity of human cancer cell lines. *Int J Radiat Biol.* 2015; 91(12): 964–72. doi: 10.3109/09553002.2015.1101648.
9. Marchesi N., Osera C., Fassina L., Amadio M., Angeletti F., Morini M., Magenes G., Venturini L., Biggiogera M., Ricevuti G., Govoni S., Caorsi S., Pascale A., Comincini S. Autophagy Is Modulated in Human Neuroblastoma Cells Through Direct Exposure to Low Frequency

Напротив, при ИМП 300 мТл этот уровень снижается с 18,7 до 15 %, демонстрируя определенный антагонизм взаимодействия.

## Закключение

Согласно полученным данным, воздействие ИМП приводит к выраженному снижению транскрипционной активности гена *MGMT*, которое четко проявляется в клетках глиобластомы в течение суток. Это согласуется с современными представлениями о высокой электромагнитной чувствительности генов, физическая природа которых включает определенные частотные характеристики диполей-вibrаторов. Очевидно, в основе полученного эффекта снижения транскрипционной активности гена *MGMT* могло лежать попадание режима электромагнитной энергии экзогенных колебаний, репрессирующих работу данного гена в течение определенного времени. Учитывая разнонаправленный характер сочетанного взаимодействия ионизирующего излучения и ИМП в зависимости от величины его индукции, необходимо подчеркнуть важность выбора и обоснования роли биотропных параметров ИМП для исключения негативного влияния на лечебный процесс.

*Electromagnetic Fields. J Cell Physiol.* 2014 Nov; 229(11): 1776–86. doi: 10.1002/jcp.24631.

10. Storch K., Dickreuter E., Artati A., Adamski J., Cordes N. BEMER Electromagnetic Field Therapy Reduces Cancer Cell Radioresistance by Enhanced ROS Formation and Induced DNA Damage. *PLoS One.* 2016; 11(12): e0167931. doi: 10.1371/journal.pone.0167931.

11. Попов И.А., Шихлярова А.И., Росторгуев Э.Е., Гусарева М.А., Тимошкина Н.Н., Потемкин Д.С., Арапова Ю.Ю., Стасов В.В. Ингибирующее влияние импульсных магнитных полей и ионизирующего излучения на культуру клеток глиобластомы человека T98G. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2019; 14 (1–2): 228–231. [Popov I.A., Shikhliarova A.I., Rostorguev E.E., Gusareva M.A., Timoshkina N.N., Potemkin D.S., Arapova Yu. Yu., Stasov V.V. Nhibiting influence of impulse magnetic fields and ionizing radiation on the culture of human T98G glioblastoma cells. *Medical news of the north Caucasus.* 2019; 14 (12): 228–231. (in Russian)]. doi: 10.14300/mnnc.2019.14021.

12. Mitra S. *MGMT: A personal perspective. DNA Repair (Amst).* 2007 Aug 1; 6(8): 1064–70.

13. Pegg A.E. Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res.* 2000 Apr; 462(2–3): 83–100. doi: 10.1016/s1383-5742(00)00017-x.

14. Lukash L.L., Man'ko V.G., Lylo V.V. Role of O-alkylguanine-DNA alkyltransferase in repairing lesions, induced by alkylating compounds. *Biopolymers and Cell.* 2001; 17(4): 265–277. doi: 10.7124/bc.0005B7.

15. Bell E.H., Zhang P., Fisher B.J., Macdonald D.R., McElroy J.P., Lesser G.J., Fleming J., Chakraborty A.R., Liu Z., Becker A.P., Fabian D., Aldape K.D., Ashby L.S., Werner-Wasik M., Walker E.M., Bahary J.P., Kwok Y., Yu H.M., Laack N.N., Schultz C.J., Gray H.J., Robins H.I., Mehta M.P., Chakravarti A. Association of *MGMT* promoter methylation status with survival outcomes in patients with high-risk glioma treated with radiotherapy and temozolomide: an analysis from the NRG Oncology/RTOG 0424 Trial. *JAMA Oncol.* 2018 Oct 1; 4(10): 1405–1409. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.1977.

16. Мацко М.В. Лекарственная терапия опухолей мозга. Практическая онкология. 2013; 14(3): 166–174. [Matsko M.V. Drug treatment of brain tumors. *Practical oncology.* 2013; 14(3): 166–174. (in Russian)].

17. Kontic M., Stojic J., Jovanovic D., Bunjevacki V., Ognjanovic S., Kuriger J., Puumala S., Nelson H.H. Aberrant promoter methylation of *CDH13* and *MGMT* genes is associated with clinicopathological characteristics of primary non small cell lung carcinoma. *Clin Lung Cancer.* 2012 Jul; 13(4): 297–303. doi: 10.1016/j.clcc.2011.11.003.

18. Кут О.И., Водолажский Д.И., Дваденко К.В., Ефимова И.Ю., Олейникова Е.Н., Олейников Д.Д., Тимошкина Н.Н. Аберрантное метилирование промоторных участков генов *APC*, *CDH13* и *MGMT*

у больных колоректальным раком. Сибирский онкологический журнал. 2016; 15(2): 48–55. [Kit O.I., Vodolazhskiy D.I., Dvadenko K.V., Efimova I.Yu., Oleynikova E.N., Oleynikov D.D., Timoshkina N.N. Aberrant methylation of the promoter of APC, CDH13 and MGMT genes in

colorectal cancer patients. Siberian Journal of Oncology. 2016; 15(2): 48–55. (in Russian)]. doi: 10.21294/1814-4861-2016-15-2-48-55.

Поступила/Received 05.06.19  
Принята в печать/Accepted 13.08.19

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Сидоренко Юрий Сергеевич**, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Минздрава России (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 8341-5407. Author ID (Scopus): 6603967956. ORCID: 0000-0001-8511-7280.

**Кит Олег Иванович**, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, генеральный директор Ростовского научно-исследовательского онкологического института Минздрава России (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 1728-0329. Researcher ID: U-2241-2017. Author ID (Scopus): 55994103100. ORCID: 0000-0003-3061-6108.

**Попов Иван Александрович**, врач-нейрохирург, аспирант, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 9372-4638. ORCID: 0000-0002-1126-3186 E-mail: Popov\_Ivan777@rambler.ru.

**Шихлярова Алла Ивановна**, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник испытательного лабораторного центра, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 6271-0717. Researcher ID (WOS): Author ID (Scopus): 6507723229. ORCID: 0000-0003-2943-7655.

**Росторгуев Эдуард Евгеньевич**, кандидат медицинских наук, заведующий отделением нейроонкологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 8487-9157. Author ID (Scopus): 57196005138. ORCID: 0000-0003-2937-0470.

**Тимошкина Наталья Николаевна**, кандидат биологических наук, руководитель лаборатории молекулярной онкологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 9483-4330. Researcher ID: D-3876-2018. Author ID (Scopus): 24077206000. ORCID: 0000-0001-6358-7361.

**Гусарева Марина Александровна**, кандидат медицинских наук, заведующая отделением радиологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт (г. Ростов-на-Дону, Россия). Author ID (Scopus): 56613594900. ORCID: 0000-0002-9426-9662.

**Арапова Юлия Юрьевна**, кандидат биологических наук, научный сотрудник испытательного лабораторного центра, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 8454-0547. Author ID (Scopus): 57208054166. ORCID: 0000-0002-4300-6272.

**Потемкин Дмитрий Сергеевич**, младший сотрудник лаборатории молекулярной онкологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 2789-0569. ORCID: 0000-0002-5221-3644.

**Пушкин Антон Андреевич**, младший сотрудник лаборатории молекулярной онкологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 9223-1871. AuthorID (Scopus): 57200548010. ORCID: 0000-0003-2385-6285. E-mail: anton.a.pushkin@gmail.com.

**Стасов Виталий Викторович**, кандидат физико-математических наук, эксперт-физик по контролю за источниками ионизирующих и неионизирующих излучений отделения радиологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 7435-8372. ORCID: 0000-0002-6953-5391.

#### **Финансирование**

*Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.*

#### **Конфликт интересов**

*Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.*

#### ABOUT THE AUTHORS

**Yury S. Sidorenko**, MD, Professor, Member of the Russian Academy of Sciences, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). Author ID (Scopus): 6603967956. ORCID: 0000-0001-8511-7280.

**Oleg I. Kit**, MD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, General Director of Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). ResearcherID (WOS): U-2241-2017. Author ID (Scopus): 55994103100. ORCID: 0000-0003-3061-6108.

**Ivan A. Popov**, Post-graduate, Oncology Department, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). ORCID: 0000-0002-1126-3186 E-mail: Popov\_Ivan777@rambler.ru

**Alla I. Shikhlyarova**, Professor, Senior Researcher of Experimental Laboratory Center, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). ORCID: 0000-0003-2943-7655.

**Eduard E. Rostorguev**, MD, PhD, Head of the Department of Neurooncology, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). Author ID (Scopus): 57196005138, ORCID: 0000-0003-2937-0470

**Marina A. Gusareva**, MD, PhD, Head of the Radiology Department, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). ORCID: 0000-0002-9426-9662 E-mail: oncorad@mail.ru

**Natalya N. Timoshkina**, PhD, Head of the Laboratory Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). ORCID: 0000-0001-6358-7361. E-mail: n\_timoshkina@mail.ru.

**Yulia Yu. Arapova**, PhD, Researcher, Experimental Laboratory Center, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). ORCID: 0000-0002-4300-6272. e-mail: juli.arapova@yandex.ru

**Dmitrii S. Potemkin**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). ORCID: 0000-0002-5221-3644 E-mail: desmonddimon@gmail.com.

**Anton A. Pushkin**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). AuthorID (Scopus): 57200548010. ORCID: 0000-0003-2385-6285. E-mail: anton.a.pushkin@gmail.com.

**Vitaly V. Stasov**, PhD, expert-physicist for the control of ionizing and non-ionizing radiation sources of radiology Department, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). ORCID: 0000-0002-6953-5391.

### ***Funding***

*This study required no funding.*

### ***Conflict of interest***

*The authors declare that they have no conflict of interest.*