

## КЛЕТОЧНЫЙ ОТВЕТ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ СВЕРХСЛАБЫХ СТАТИЧЕСКИХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ

© 2016 г. И.М. Спивак\* \*\* \*\*\*, М.Л. Куранова\*, Г.Р. Мавропуло-Столяренко\*\*, С.В. Сурма\*\*\*\*, Б.Ф. Щеголев\*\*\*\*\* \*\*\*, В.Е. Стефанов\*\*

\*Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4  
E-mail: irina\_spivak@hotmail.com

\*\*Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9  
E-mail: Stefanov@bio.spbu.ru

\*\*\*Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, 195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29

\*\*\*\*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6  
E-mail: shcheg@mail.ru

\*\*\*\*\*Федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова  
Министерства здравоохранения РФ, 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

Поступила в редакцию 31.10.15 г.

После доработки 18.11.15 г.

Изучено воздействие сверхслабого статического магнитного поля на клетки больных атаксией-телеангиэктозией. Изучено состояние штаммов диплоидных фибробластов здорового донора и больного атаксией-телеангиэктозией. Состояние белков P53, 53BP1 и P21 исследовано с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции. При воздействии сверхслабого статического магнитного поля клетки здорового донора демонстрируют картину, подобную той, которая возникает при повреждении ДНК – повышение количества белков P53 и P21, формирование фокусов 53BP1, тогда как в первичных фибробластах больных атаксией-телеангиэктозией никаких видимых изменений не обнаружено. Полученные данные свидетельствуют о возможной роли АТМ-зависимого сигнального пути в ответе фибробластов на воздействие сверхслабого статического магнитного поля.

*Ключевые слова:* атаксия-телеангиэктазия, АТМ, P53, 53BP1, P21, сверхслабые статические магнитные поля.

Накопленная информация о воздействии магнитных полей (МП) на биологические объекты [1–3] поставила перед исследователями вопрос о базовых механизмах таких эффектов [4]. Ответ на него требует проведения исследований МП в широком диапазоне, в том числе и воздействия относительно мало изученных сверхслабых магнитных полей (ССМП) с величиной индукции в диапазоне  $5 \cdot 10^{-12}$  Тл < ССМП <  $30 \cdot 10^{-6}$  Тл, т.е. меньше индукции геомагнитного поля. Для физического моделирования ССМП в наших экспериментах был использован способ магнитного экранирования, позволяющий не только достаточно просто получать такие поля в лабораторных условиях, но и практически

исключить наводки переменных внешних полей разного характера.

Моделью для изучения действия ССМП на живые объекты служили первичные фибробласты кожи человека – здорового донора и больной атаксией-телеангиэктозией. Атаксия-телеангиэктазия (АТ), или синдром Луи-Бара, – наследственное заболевание, проявляющееся мозжечковой атаксией, множественными телеангиэктазиями, нарушениями иммунитета, повышенной чувствительностью к рентгеновскому облучению, ускоренным старением и др. [5–8]. Заболевание проявляется при наличии мутаций в обоих аллелях гена *atm*, кодирующего протеинкиназу АТМ (Ataxia Telangiectasia Mutated). Белок АТМ – ключевой белок клеточного ответа, способный к автофосфорилированию в ответ на возникновение двухнитевых разрывов ДНК, конформационных изменений хроматина и быстрому последующему фосфорилированию

Сокращения: МП – магнитное поле, ССМП – сверхслабое статическое магнитное поле, АТ – атаксия-телеангиэктозия, DDR (DNA damage response) – ответ клеток на повреждение ДНК, DSBs – двунитевые разрывы ДНК.

различных белков-мишеней [7,8]. Белок P53 – наиболее подробно изученная мишень протеинкиназы АТМ. В ядрах  $\gamma$ -облученных клеток белок P53 выявляется практически сразу. В клетках больных АТ его стабилизация задерживается примерно на 1,5 ч [9,10]. Белок P21 – ингибитор циклин-зависимых киназ фазы G1 – является транскрипционной мишенью P53 и экспрессируется в ответ на его стабилизацию. Количество белка P21 после облучения в клетках больных АТ снижено по сравнению с клетками здорового донора [11]. Белок 53BP1 солюкализуется в общих фокусах после повреждения ДНК вместе с P53 и  $\gamma$ -H2AX. И 53BP1, и  $\gamma$ -H2AX являются наиболее часто используемыми маркерами ответа клеток на повреждение ДНК – DDR (DNA damage response). В клетках больных АТ динамика образования и элиминации этих фокусов нарушена [11].

Ранее [12] мы исследовали действие ССМП на первичные фибробласты здорового донора (VN10) при обработке антителами к белку P53, которое уже через час приводило к свечению в ядрах клеток, что свидетельствовало о стабилизации P53 в ответ на изменение внешних условий. В клетках больной атаксией-телеангиэктазией АТ8SP (АТ – атаксия-телеангиэктазия, 8 – порядковый номер больного, SP – Санкт-Петербург, место нахождения пробанда) свечение в тех же условиях не наблюдалось. В рамках других исследований нами была описана стабилизация белка P53 в клетках здорового донора и ее задержка в течение 1,5 ч в клетках больных атаксией-телеангиэктазией после действия ионизирующей радиации [10]. На основании этих результатов, в тех же клетках в тех же условиях были выявлены маркеры DDR-ответа. При окрашивании клеток VN10 и АТ8SP, предварительно подвергнутых действию ССМП на 1 ч, антителами к P53, был получен тот же самый результат, что и в ранее опубликованной работе [12] – в клетках здорового донора методом непрямой иммунофлуоресценции был обнаружен белок P53, тогда как в клетках больной АТ белок не был обнаружен. Настоящая работа является продолжением этих экспериментов с 1 ч до 24 ч, с проведением измерений через каждые 2, 6 и 24 ч.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Клеточные культуры.** В работе использованы штаммы диплоидных фибробластов от больной АТ8SP и здорового донора VN10. Штамм диплоидных фибробластов получен от пациентки с АТ – девочки 11 лет. VN10 – диплоидные фибробласты крайней плоти мальчика 11 лет

[13,14], предоставлены проф. А. Кольман (А. Kolman, Стокгольмский университет, Швеция). Клетки выращивали в пластиковых флаконах, в чашках Петри (Nunclon, США) и на предметных стеклах, помещенных в чашку Петри, в среде F-10 или DMEM («Биолот», Россия; Gibco, США) с добавлением 13% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Nucleon, США; Gibco, США) и антибиотиков (100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) при 37°C в атмосфере с содержанием 5% CO<sub>2</sub>.

**Получение первичной культуры фибробластов кожи.** Для выделения фибробластов вырезали фрагмент кожи размером не более 5×5 мм с области предплечья и помещали в чашку Петри в питательную среду DMEM с добавлением антибиотиков. В той же чашке Петри кожу механически измельчали до получения дисперсных фрагментов. Затем кожные фрагменты помещали под покровное стекло в другие чашки Петри диаметром 3 см и добавляли полную ростовую питательную среду DMEM (Gibco, США) с 16%-й сывороткой (Gibco, США), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 25 мкг/мл фунгизона и 0,3 мг/мл L-глутамин. Эксплантат кожи инкубировали, меняя питательную среду один раз в 4–7 суток, до появления достаточного количества фибробластов. По достижении монослоя клетки снимали с подложки стандартным способом с помощью раствора трипсин-ЭДТА и культивировали в чашках Петри в стандартных условиях. Растущие клетки после достижения субконфлюэнтного состояния помещали на различные промежутки времени в ССМП. В качестве контроля использовали интактные образцы.

**Облучение.** Облучение проводили на рентгеновской установке РУМ-17. Чашки Петри при облучении помещали в стерильные контейнеры.

**Метод непрямой иммунофлуоресценции.** Клетки, выращенные на помещенных в чашки Петри предметных стеклах, отмывали от культуральной среды фосфатно-солевым буфером («Биолот», Россия) и фиксировали 10 мин в 3,7%-м растворе формальдегида в фосфатно-солевом буфере на льду, затем продолжали фиксацию в течение 24 ч в 70%-м этаноле и промывали фосфатно-солевым буфером в течение 30 мин. Для перфорации цитоплазматической мембраны препараты инкубировали 5 мин в 3%-м растворе тритона X-100 («Хеликон», Россия) на фосфатно-солевом буфере. Для блокирования мест неспецифического связывания препараты инкубировали от 30 мин до 1 сут в 1%-м растворе бычьего сывороточного аль-

бумина (Sigma, США) на фосфатно-солевом буфере, затем промывали.

В качестве первых антител использовали IgG кролика против белка 53BP1 (Abcam, Англия) и IgG мыши против белка P21 (Abcam, Англия) в разведении 1:150. В качестве вторых антител использовали козы антикроличьи и антимышинные IgG, конъюгированные с ФИТЦ, в разведении 1:150 (Sigma-Aldrich Co., США). После инкубации с антителами стекла промывали по 30 мин 0,1%-м растворе твин-20 («Хеликон», Россия) на PBS. В качестве контроля специфичности иммунной реакции использовали препараты клеток, инкубированные только со вторыми антителами. После окрашивания препараты помещали в раствор пропилгаллата в 90%-м глицерине для предотвращения «выгорания» флуоресцентной метки. Для анализа воспроизводимости полученных результатов все тесты проводили в двух–трех повторах, не менее 200 клеток на каждую точку.

**Метод «ДНК-комет».** Метод включал следующие этапы: приготовление геля-слайда, лизис клеток, щелочную инкубацию, электрофорез, нейтрализацию, окраску слайдов, анализ и обработку данных. Все этапы (кроме последнего) проводили при 4°C, в условиях минимального попадания света. Для получения геля-слайдов использовали предметные стекла, покрытые 1%-м водным раствором агарозы («Биолот», Россия). Далее 50 мкл клеточной суспензии смешивали с 150 мкл агарозы с низкой (37°C) точкой плавления (Agarose-prep. Ultra 100w-gelling and melting point, ЛКВ, Швеция) (1%-й раствор в фосфатно-солевом буфере) и быстро наносили на подготовленное предметное стекло примерно по 100 мкл на каждый слайд, сверху накрывали покровным стеклом и оставляли на 5 мин при 4°C. Затем снимали покровное стекло и приступали к этапу лизиса. Непосредственно перед процедурой лизиса к лизирующему буферу (2,5 мМ NaCl, 100 мМ Na<sub>2</sub>EDTA, 10 мМ трис, pH 10,0) добавляли детергент тритон X-100 до конечной концентрации 1%. Лизис проводили в течение 1 ч при 4°C. Затем слайды подсушивали и подвергали дальнейшей процедуре щелочной обработки. Для щелочной инкубации и электрофореза использовали один и тот же буфер (1 мМ Na<sub>2</sub>EDTA, 300 мМ NaOH, pH 13,0), и, следовательно, первая процедура проводилась сразу в электрофорезном танке для избежания лишних манипуляций со слайдами, которые могли бы привести к потере геля с поверхности предметного стекла. Длительность щелочной инкубации составляла 40 мин при температуре 4°C. Электрофорез проводили в течение 40 мин (4°C,

напряжение 5 В/см). После извлечения слайдов избыток электрофоретического буфера удаляли фильтровальной бумагой, слайды подсушивали 5–7 мин и нейтрализовали трехкратной промывкой в 0,4 М трис, pH 7,5 по 5 мин. Для окраски слайдов использовали SYBR® Green I (Sigma, США) в 90%-м глицерине («Биолот», Россия) в разведении 1,5 мкл на 10 мл буфера TE (Tris-EDTA, pH 7,5) (Sigma, США). После нанесения покровных стекол слайды помещали во влажную камеру и оставляли в холодильнике при 4°C до начала визуального анализа.

**Микроскопия и анализ изображений.** В работе использовали лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM 5 PASCAL (Zeiss, Германия). Для визуализации флуорофоров использовали аргоновый (488 нм) и гелий-неоновый (543 нм) лазеры. Для получения изображений использовали сканирующий модуль микроскопа и программное обеспечение LSM 5 PASCAL. Для анализа изображений (определение уровня интенсивности флуоресценции) использовали программы LSM 5 PASCAL и WCIF ImageJ 1.37m (National Institute of Health, Maryland, США).

**Статическое магнитное поле.** Для физического моделирования сверхслабого статического магнитного поля была создана экранирующая камера в виде цилиндра ( $D = 26$  см,  $L = 84$  см), покрытого 40 слоями экранирующего материала, изготовленного из сплавов аморфного магнитомягкого материала АМАГ172 [15]. Все слои «намотаны» в одну сторону и сгруппированы в четыре пакета по 10 слоев в каждом с воздушными промежутками 3 мм между пакетами. С одного торца цилиндр имеет фиксированную заглушку, с другого – съемную крышку. Заглушка и крышка также имеют экранирующее покрытие. Конструкция съемной крышки позволяет избежать появления «магнитных дыр» в экране. Внутри камеры предусмотрена подставка из немагнитного материала для размещения биологических объектов в центре камеры. Размеры камеры и количество слоев рассчитывали исходя из характеристик ферромагнетика и требований обеспечения экранирования по постоянному и переменному полю, так что в центре закрытой камеры величина индукции МП составляла 0,2 мкТл, вне камеры она составляла 48 мкТл. Неоднородность суммарного магнитного поля в центре камеры не превышала нескольких процентов, поэтому ССМП в месте расположения клеток в первом приближении считалось однородным. Все измерения МП проводили с помощью магнитометров Fluxmaster (Stefan Mayer Instruments, Dinslaken, Германия) (1 нТл – 200 мкТл, с

разрешением 1 нТл) и НВ0302.1А (Санкт-Петербург, Россия) (0,1 мкТл – 100 мкТл, с разрешением 0,1 мкТл).

**Статистическая обработка результатов.** Статистическую обработку проводили с помощью программы MS Excel 2007 общепринятыми для медико-биологических исследований методами: расчет средней арифметической величины, среднего квадратичного отклонения, ошибки репрезентативности для каждого параметра в исследуемых группах клеток, сравнение средних значений по критерию Стьюдента с определением достоверности различий.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время накоплены многочисленные экспериментальные данные, указывающие на то, что для репарации двунитевых разрывов ДНК (DSBs) необходимо ремоделирование хроматина, которое происходит при строго ассоциированном с образованием DSB специфическом фосфорилировании С-концевого серина-139 вариантного гистона H2AX [16,17]. Гистон H2AX (replacement histone) является одним из известных вариантов корового гистона H2A, который, в отличие от основного H2A и других коровых гистонов, может быть встроен в хроматин в течение всех фаз клеточного цикла, а не только во время S-фазы. Мегабазные участки хроматина, покрывающие DSB, можно легко визуализировать в ядрах или экстрактах облученных клеток как фокусы фосфорилированного H2AX (названного  $\gamma$ -H2AX) с помощью специфических антител на фосфорилированный короткий пептид, соответствующий С-концу H2AX. Эти фокусы могут служить маркерами DSBs и способствуют изучению их индукции и процессинга [18,19]. Их также называют маркерами ответа на повреждение ДНК. В то же время наблюдается накопление фокусов  $\gamma$ -H2AX в ядрах стареющих клеток в культуре, клетках старых доноров или больных прогериями [20]. Это явление может быть связано как с накоплением нерепарированных DSBs или модификаций хроматина, воспринимаемых как DSBs стресс-киназами ATM и DNA-PK при повреждении ДНК [21] или ATR (Ataxia-Telangiectasia Related) при остановке репликации [22], так и появлением незащищенных коротких теломер [23]. В изучаемых нами клетках VH10 и AT8SP, которые окрашены антителами к  $\gamma$ -H2AX после 2 ч пребывания в ССМП, в клетках здорового донора наблюдается ярко выраженное свечение фокусов  $\gamma$ -H2AX, а в клетках больной АТ такого явления не наблюдается.

Еще одним традиционным маркером репарационных процессов является белок 53BP1 [24]. Его динамика в ядре в ответ на повреждение ДНК обычно совпадает с динамикой  $\gamma$ -H2AX, так как они часто сококализируются в зоне конформационных изменений хроматина (двунитевых разрывов ДНК). Белок 53BP1 после воздействия ионизирующего облучения фосфорилируется по серину-1219 [25]. Он также играет важную роль в остановке клеточного цикла в контрольной точке в ответ на повреждающие воздействия [26,27]. Так как фосфорилирование белка P53 в ответ на повреждение ДНК в клетке осуществляет протеинкиназа ATM, то повышение количества фокусов белка 53BP1 в клетках, полученных от больных с АТ, задерживается по сравнению с клетками здорового донора. Ранее [11] были изучены процессы репарации ДНК после действия рентгеновского облучения в клетках больных АТ и их кровных родственников. Было показано, что через 2,5 ч после облучения, когда в клетках здорового донора уже начинается процесс элиминации фокусов белка 53BP1, в клетках больных АТ их количество несколько возрастает, не достигая уровня репарационного ответа в клетках здорового донора, и сохраняется на стабильно высоком уровне через 24 ч после облучения. В это время в клетках здорового донора подавляющее число фокусов уже элиминируется.

В настоящее время идентифицировано более сотни генов, являющихся мишенями транскрипционной активности P53. Среди них гены, продукты которых регулируют клеточный цикл. Важнейшим из них является белок P21<sup>Waf1/Cip1</sup> – ингибитор циклин-зависимых киназ из семейства Cip/Kip [28]. Повышение его экспрессии вызывает остановку клеточного цикла в поздней G1-фазе, что обуславливается связыванием им комплексов циклин–E/Cdk2, подавлением их способности фосфорилировать белки семейства pRb и высвобождать транскрипционные факторы E2F [29–31]. В клетках больных АТ многие процессы, наблюдаемые в клетках здорового донора после рентгеновского облучения, либо происходят с существенной временной задержкой, например стабилизация белка P53, либо вовсе полностью подавлены, например остановка клеточного цикла [32]. Таким образом, уменьшенное количество P21 в клетках больных АТ соответствует снижению количества фосфорилированного P53 в этих клетках, с этим же связана и радиорезистентность клеточного цикла при АТ. Количество P21 возрастает в течение суток в ответ на повреждение ДНК. Ранее нами было показано, что данный белок появляется в клетках больных АТ с существенной задерж-

Количество клеток, содержащих фокусы 53BP1 и  $\gamma$ -H2AX, а также величины интенсивностей флуоресценции белка P21, определенные в диплоидных фибробластах здорового донора (VH10) и больной АТ (АТ8).

	Количество клеток с фокусами 53BP1, %		Количество клеток с фокусами $\gamma$ -H2AX, %		Интенсивность флуоресценции белка P21, усл. ед.	
	VH10	АТ8	VH10	АТ8	VH10	АТ8
Интактные	23,5 ± 0,7	43,0 ± 1,2*	2,3 ± 1,2	19,1 ± 1,1*	19,44 ± 2,20	18,07 ± 2,12
2 ч	56,5 ± 0,7*	42,0 ± 1,3	21,1 ± 2,3*	20,1 ± 0,8	36,78 ± 0,98*	21,92 ± 5,56
6 ч	34,3 ± 1,2*	37,0 ± 10,4	18,6 ± 1,7*	18,8 ± 2,5	20,93 ± 0,45*	20,93 ± 3,45
24 ч	74,3 ± 1,2*	47,5 ± 5,1	32,3 ± 4,1*	23,1 ± 2,9	43,44 ± 0,39*	19,18 ± 2,53
30 мин облуч. 2,5 Гр	85,7 ± 1,5*	45,0 ± 5,6	48,1 ± 5,4*	62,4 ± 7,3*	26,23 ± 4,79	23,85 ± 4,37

Примечание. Суммированы данные по флуоресценции 300 клеток каждого штамма в трех независимых опытах; \* – статистически достоверные отличия от контроля при  $P < 0,001$ .

кой по отношению к контролю и в существенно меньших количествах [11].

В наших экспериментах по изучению биологических эффектов статического магнитного поля на клеточном уровне клетки экспонировались в условиях ССМП в течение 24 ч и несколько раз в течение этого времени анализировались (через 2 и 6 ч). Данные, полученные после подсчета клеток, содержащих фокусы  $\gamma$ -H2AX и 53BP1, а также величины интенсивностей флуоресценции P21, представлены в таблице. Эти данные наглядно показывают, что клетки здорового донора реагируют на применение ССМП как на повреждение ДНК. Клетки же больной АТ не демонстрируют достоверных отличий от контроля. Мы полагаем, что это связано с тем, что реакция клеток на действие ССМП и поддержание их стабильности в обычных условиях осуществляется АТМ-зависимым путем.

Поскольку реакция клеток здорового донора в ответ на применение ССМП развивалась так же, как в ответ на радиационное повреждение, т.е. на возникновение двунитевых разрывов ДНК, было необходимо проверить наличие DSBs в клетках, находящихся в ССМП. Для этого был применен метод электрофореза отдельно взятых клеток – метод «комет», позволяющий определить наличие разрывов ДНК, приводящих в условиях электрофореза к выпетливанию «порванной» ДНК – возникновению «хвоста кометы». Клетки на всех временных фазах опыта были исследованы нами с применением этого метода. Количество «комет» среди клеток здорового донора как интактных, так и во все временные промежутки ССМП составляло  $3,0 \pm 2,5\%$ , а среди клеток больной АТ –  $16,0 \pm 4,7\%$ . Однако после рентгеновского облучения в дозе 2,5 Гр более 90% клеток как здорового донора, так и больной АТ демонст-

рировали разрывы ДНК. Такое наличие DDR-ответа при отсутствии самих повреждений, т.е. двунитевых разрывов ДНК, крайне интересно. Возможно, мы имеем дело с конформационными изменениями хроматина, вызываемыми ССМП, и клеточным ответом на него подобно тому, как это описано в случае клеток грызунов при действии бутирата натрия [33].

При исследовании воздействия ССМП на фибробласты здорового донора нами было показано, что белок P53 и опосредуемые им сигнальные пути активно вовлечены в адаптацию клетки к условиям слабого статического магнитного поля. Полученные в работе данные свидетельствуют о возможной роли АТМ-зависимого сигнального пути в ответе клетки на воздействие ССМП. Обнаруженный эффект по исследованным параметрам оказался сходным с клеточным ответом на повреждение ДНК, возникающим при рентгеновском облучении.

Важность анализа действия статического МП на биологические объекты обусловлена тем, что внешней средой для их генезиса является магнитное поле Земли, обладающее большой проникающей способностью. Последние работы показали, что само по себе статическое МП с индукцией, достигающей 13 Тл, не приводит к мутациям у дрожжей [34] и вплоть до значений 10 Тл не вызывает клеточную гибель или существенное нарушение клеточного цикла при нормальном культивировании клеток [35]. Однако если одновременно с действием МП клетки облучают рентгеновскими лучами или обрабатывают митомицином С, в них появляются маркеры повреждения ДНК в виде микроядер. При наличии ионов железа в культуральной среде, усиливающих окислительный стресс, в условиях статического МП возникают детектируемые методом «комет» одно- и двунитевые разрывы ДНК, количество

которых уменьшается в присутствии антиоксидантов – мелатонина и витамина Е [36,37]. Можно предположить [38], что действие радикалов кислорода, опосредованное статическим МП, приводит к описанным повреждениям ДНК. Пока нет сведений о действии ССМП на биологические объекты на уровне повреждения ДНК. Однако, по аналогии с данными о действии малых доз радиации, можно допустить, что не вызывая повреждения ДНК, в частности двухнитевых разрывов, МП может существенно влиять на ее конформацию [39] и стимулировать начальные стадии репарационных процессов, являясь основой адаптивного ответа [40]. При этом в клетках больных АТ такой механизм не выявляется [41]. В то же время развитие DDR в клетках здорового донора показывает, что возникающие при этом конформационные изменения способны запускать такие же сигнальные каскады, как и рентгеновское облучение в дозе 2,5 Гр, при котором выживает не более 30% клеток.

Можно предположить, что при экранировании ССМП механизм активации АТМ-зависимого сигнального пути в фибробластах здорового донора связан с накоплением кислородных радикалов, образующихся в клетках при аэробном дыхании. В нормальном состоянии в процессе дыхания в клетках образуются, а потом естественным образом уничтожаются кислородные радикалы. Ранее на этой модели мы наблюдали нарушение митохондриальных сетей, восстановление которых начиналось между 6 и 12 часами после начала эксперимента (неопубликованные данные), что свидетельствовало об адаптации клеток к изменившимся условиям. В настоящей работе уменьшение количества маркеров DDR мы также наблюдали через 6 ч эксперимента. При этом если через 12 ч происходит восстановление митохондриальных сетей, то DDR, напротив, усиливается. Очевидно, для установления достоверной связи между реакцией митохондриальных сетей и степенью DDR необходимы более детальные исследования с уменьшенными временными промежутками между точками измерений.

Известно, что на первом этапе нормального процесса уничтожения активных радикалов работает супероксиддисмутаза. Катализируя по ион-радикальному механизму реакцию дисмутации супероксидных радикалов, супероксиддисмутаза участвует в регуляции свободно-радикальных процессов в живых клетках на начальной стадии. В работе [4], в которой рассматриваются магнитозависимые молекулярные и химические процессы в биохимии, генетике и медицине, показано, что слабые магнитные

поля активно воздействуют на протекание ион-радикальных реакций. Очевидно, МП должно влиять и на функционирование супероксиддисмутазы, приводя к накоплению активных форм кислорода. В связи с этим перспективным представляется исследование динамики активности супероксиддисмутазы с использованием описанной в настоящей работе экспериментальной модели с целью уточнения механизма развития DDR в фибробластах человека в ответ на экранирование геомагнитного поля.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-15-00943).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. Aarholt, E. Flinn, and C. Smith, *Phys. Med. Biol.* **27**, 603 (1982).
2. C. Blackman, in : *Interaction Mechanisms of Low-Level Electromagnetic Fields in Living Systems*, Ed. by B. Norden and C. Ramel (Oxford University Press, Oxford, 1992), pp. 107–129.
3. S. Ghodbane, A. Lahbib, M. Sakly, and H. Abdelmelek, *Biomed. Res. Int.* 602987 (2013). DOI: 10.1155/2013/602987.
4. А. Л. Бучаченко, *Успехи химии* **83**, 1 (2014).
5. C. F. Arlett and A. Priestley, *Kroc. Found.* **19**, 101 (1985).
6. И. М. Спивак, *Цитология* **41**, 338 (1999).
7. Y. Shilon, *Nat. Rev. Cancer* **3**, 155 (2003).
8. M. F. Lavin, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 759 (2008).
9. И. М. Спивак, Н. В. Смирнова, Н. М. Плескач и др., *Цитология* **49**, 55 (2007)
10. И. М. Спивак, Н. М. Плескач, Н. В. Смирнова и др., *Технологии живых систем* **4** (5–6), 39 (2007)
11. Е. А. Полуботко, Н. В. Смирнова, Н. М. Плескач и др., *Цитология* **51**, 712 (2009).
12. М. Л. Куранова, А. Е. Павлов, И. М. Спивак и др., *Вестн. СПбГУ, сер. 3, № 4*, 99 (2010).
13. J. Nygren, B. Cedervall, M. Ericksson, et al., *Envir. Mol. Mutagen.* **24**, 161 (1994).
14. A. Kolman, I. Spivak, M. Naslund, et al., *Envir. Mol. Mutagen.* **30**, 40 (1997).
15. П. А. Кузнецов, Б. В. Фармаковский, А. Ю. Аскинази и др., Патент РФ № 2324989 «Композиционный материал для защиты от электромагнитного излучения», (Россия) – № 2006121842/28(023712); заявл. 19.06.06, положительное решение от 20.05.08.
16. E. P. Rogakou, D. R. Pilch, A. H. Orr, et al., *J. Biol. Chem.* **273**, 5858 (1998).
17. I. M. Ward and J. Chen, *J. Biol. Chem.* **276**, 47759 (2001).
18. K. H. Karlsson and B. Stenerlöw, *Radiat. Res.* **161**, 517 (2004).
19. T. Tanaka, H. D. Halicka, X. Huang, et al., *Cell Cycle* **5**, 1940 (2006).

20. O. A. Sedelnikova, I. Horikawa, D. B. Zimonjic, et al., *Nat. Cell Biol.* **6**, 168 (2004).
21. T. Stiff, M. O'Driscoll, N. Rief, et al., *Cancer Res.* **64**, 2390 (2004).
22. A. Takahashi, H. Matsumoto, K. Nagayama, et al., *Cancer Res.* **64**, 8839 (2004).
23. L. Y. Hao, M. A. Strong, and C. W. Greider, *J. Biol. Chem.* **279**, 148 (2004).
24. K. A. Wilson and D. F. Stern, *Cell Cycle* **7**, 3584 (2008).
25. H. Lee, H. Kwak, I. T. Cho, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **378**, 32 (2008).
26. K. Iwabuchi, T. Matsui, M. Hashimoto, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **376**, 509 (2008).
27. Y. Eliezer, L. Argaman, A. Rhie, et al., *J. Biol. Chem.* **284**, 426 (2009).
28. Q. Shi, X. Wang, and J. Ren, *Biophys. Chem.* **138**, 138 (2008).
29. Б. П. Копнин, *Биохимия* **65**, 5 (2000).
30. S. K. Radhakrishnan, J. Gierut, and A. L. Gartel, *Oncogene* **25**, 1812 (2006).
31. R. Hill, E. Bodzak, M. D. Blough, and P. W. Lee, *Cell Cycle* **7**, 2535 (2008).
32. И. М. Спивак, Н. В. Смирнова, Н. М. Плескач, и др., *Цитология* **47**, 898 (2005).
33. V. S. Romanov, A. A. Bardin, S. G. Zubova, et al., *Biochimie* **93**, 1408 (2011).
34. M. Ikehata, S. Yoshie, N. Hirota, and T. Hayakawa, *J. Phys.: Conf. Ser.* **156**, 012015 (2009). DOI:10.1088/1742-6596/156/1/012015.
35. J. Miyakoshi, *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **87**, 213 (2005).
36. J. Jajte, M. Zmyslony, J. Palus, et al., *Mutat. Res.* **483**, 57 (2001).
37. J. Jajte, J. Grzegorzczak, M. Zmyslony, and E. Rajkowska, *Bioelectrochemistry* **57**, 107 (2002).
38. H. Lai and N. P. Singh, *Environ Health Perspect.* **112**, 687 (2004).
39. I. Ya. Belayev, I. M. Spivak, A. Kolman, and M. Harms-Ringdahl, *Mutat. Res.* **358**, 223 (1996).
40. А. Бернадотт, В. М. Михельсон и И. М. Спивак, *Цитология* **55** (10), 749 (2013).
41. А. Бернадотт, В. М. Михельсон, И. М. Спивак и Г. А. Рыжак, *Успехи геронтологии* **26** (4), 614 (2013).

## Cell Response to the Impact of Extremely Weak Static Magnetic Field

I.M. Spivak\* \*\* \*\*\*, M.L. Kuranova\*, G.R. Mavropulo-Stolyarenko\*\*, S.V. Surma\*\*\*\*, B.F. Shchegolev\*\*\*\* \*\*\*, and V.E. Stefanov\*\*

\**Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretskiy prosp. 4, St. Petersburg, 194064 Russia*

\*\**St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia*

\*\*\**St. Petersburg Polytechnic University, Polytechnicheskaya 29, St. Petersburg, 195251 Russia*

\*\*\*\**Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, St. Petersburg, 199034 Russia*

\*\*\*\*\**Federal Almazov North-West Medical Research Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Akkuratova 2, St. Petersburg, 197341 Russia*

The impact of extremely weak static magnetic field on the cells from patients with ataxia-telangiectasia was studied. We investigated diploid fibroblast strains from a healthy donor and patient with ataxia-telangiectasia. P53, 53BP1 and P21 proteins were studied by the method of indirect immunofluorescence. Exposed to the impact of extremely weak static magnetic field, cells from the healthy donor demonstrated a pattern similar to that one which had been seen at DNR damage, i.e. increased P53 and P21 protein levels and 53BP1 focus formation, while no discernible changes in the primary fibroblasts from patients with ataxia-telangiectasia were observed. The obtained data suggest a possible role of ATM-dependent signal pathway in the fibroblasts response to the impact of extremely weak static magnetic field.

*Key words: ataxia-telangiectasia, ATM, P53, 53BP1, P21, extremely weak static magnetic fields*