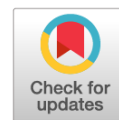


УДК [577.21+575.2.084]:[616-006+612.085.4]; 615.324:616-03
DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ112498>



АПО-ФОРМА РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА ИЗМЕНЯЕТ УРОВЕНЬ ПОЛНОГЕНОМНОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК И СТЕПЕНЬ КОМПАКТИЗАЦИИ ХРОМАТИНА В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ IMR-32

И.О. Сучкова, К.А. Шарруф, Л.К. Сасина, Н.И. Дергачева, Т.В. Баранова, Е.Л. Паткин

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Для цитирования: Сучкова И.О., Шарруф К.А., Сасина Л.К., Дергачева Н.И., Баранова Т.В., Паткин Е.Л. Апо-форма рекомбинантного лактоферрина человека изменяет уровень полногеномного метилирования ДНК и степень компактизации хроматина в клеточной линии нейробластомы IMR-32 // Медицинский академический журнал. 2022. Т. 22. № 4. С. 77–96. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ112498>

Рукопись получена: 10.11.2022

Рукопись одобрена: 18.12.2022

Опубликована: 29.12.2022

Обоснование. Нейробластома — одна из часто встречающихся экстракраниальных солидных опухолей детского возраста. На современном этапе значительную роль в развитии новообразований отводят эпигенетическим нарушениям. Поскольку процесс эпигенетических изменений в клетке достаточно динамичен и обратим, то актуально выявление экзогенных веществ, способных влиять на эпигеном и которые могут быть использованы для эпигенетической таргетной терапии различных типов опухолей. Одним из таких потенциальных молекул является лактоферрин. В настоящее время описаны противоопухолевые свойства этого белка из семейства трансферринов, однако практически не известно о его влиянии на эпигеном клеток различных типов новообразований, в том числе нейробластомы.

Цель — исследовать влияние апо-формы экзогенного рекомбинантного лактоферрина человека на жизнеспособность и эпигеномный статус клеток нейробластомы IMR-32.

Материалы и методы. В работе исследованы клетки нейробластомы человека линии IMR-32 после 72 ч воздействия 8 доз рекомбинантного аполактоферрина человека: 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50, 100 и 500 мкг/мл. Проведена количественная оценка уровня полногеномного метилирования ДНК и степени компактизации хроматина в клетках IMR-32 с использованием коммерческих наборов 5-mC DNA ELISA Kit, Global DNA Methylation — LINE-1 Kit, а также ферментативного гидролиза MspI / HpaII и DNaseI.

Результаты. Обнаружено, что рекомбинантный аполактоферрин снижает жизнеспособность IMR-32 и в зависимости от дозы дифференциально влияет на уровень полногеномного метилирования ДНК (CpG-динуклеотидов, CCGG-сайтов, LINE-1-повторов) и степень компактизации хроматина. При этом наблюдается сложная картина эпигеномного клеточного ответа на воздействие аполактоферрина (нелинейная немонотонная зависимость доза — эффект).

Заключение. Предполагается, что аполактоферрин способен модулировать активность генов через эпигенетические механизмы, в частности изменяя паттерн метилирования ДНК и влияя на структуру хроматина, что может быть одним из молекулярных механизмов его противоопухолевого действия.

Ключевые слова: аполактоферрин; нейробластома; IMR-32; жизнеспособность клеток; эпигенетические модификации; метилирование ДНК; компактизация хроматина; MspI; HpaII; DNaseI; ELISA; ImageJ.

APO-FORM OF RECOMBINANT HUMAN LACTOFERRIN CHANGES THE GENOME-WIDE DNA METHYLATION LEVEL AND THE CHROMATIN COMPACTION DEGREE IN NEUROBLASTOMA CELL LINE IMR-32

Irina O. Suchkova, Kinda A. Sharrouf, Liudmila K. Sasina, Natalia I. Dergacheva, Tatyana V. Baranova, Eugene L. Patkin

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

For citation: Suchkova IO, Sharrouf KA, Sasina LK, Dergacheva NI, Baranova TV, Patkin EL. Apo-form of recombinant human lactoferrin changes the genome-wide DNA methylation level and the chromatin compaction degree in neuroblastoma cell line IMR-32. *Medical Academic Journal*. 2022;22(4):77–96. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ112498>

Received: 10.11.2022

Accepted: 18.12.2022

Published: 29.12.2022

BACKGROUND: Neuroblastoma is one of the most common extracranial solid tumors in childhood. At present, epigenetic disorders play a significant role in neoplasms development. Since epigenetic changes in the cell are quite dynamic and reversible, epigenome-modulating exogenous agents can be used in epigenetic targeted therapy for various types of tumors. Therefore, the identification of these agents is still significant. Lactoferrin is one such potential molecule from the transferrin family. Currently, the anti-tumor properties of lactoferrin have been identified, but its effect on the epigenome of cells of various tumors types, particularly on neuroblastomas, is practically unknown.

Список сокращений

АФК — активные формы кислорода; ЛФ — лактоферрин; апо-rhLF — рекомбинантный аполактоферрин человека; DNMT — ДНК-метилтрансфераза; ER — рецептор эстрогена; HIF — фактор, индуцируемый гипоксией.

AIM: To study the effect of the exogenous recombinant human apolactoferrin on the viability and epigenomic status of IMR-32 neuroblastoma cells.

MATERIALS AND METHODS: We studied human IMR-32 neuroblastoma cells after 72 hours of exposure to 8 doses of recombinant human apolactoferrin: 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 and 500 $\mu\text{g/ml}$. The level of genome-wide DNA methylation and the degree of chromatin compaction in IMR-32 cells were quantified using commercial kits 5-mC DNA ELISA Kit, Global DNA Methylation – LINE-1 Kit, as well as enzymatic hydrolysis of MspI / HpaII and DNaseI.

RESULTS: The recombinant apolactoferrin reduces the viability of IMR-32 and, depending on the dose, differentially affects the level of genome-wide DNA methylation (CpG dinucleotides, CCGG sites, LINE-1 repeats) and the degree of chromatin compaction. At the same time, a complex picture of the epigenomic cellular response to the effect of apolactoferrin was observed (nonlinear nonmonotonic dose-effect relationship).

CONCLUSIONS: We assumed that apolactoferrin modulates gene activity through epigenetic mechanisms, in particular, by changing the DNA methylation pattern and affecting the chromatin structure, which may be one of the molecular mechanisms of its anti-tumor effect.

Keywords: apolactoferrin; neuroblastoma; IMR-32; cell viability; epigenetic modifications; DNA methylation; chromatin compaction; MspI; HpaII; DNaseI; ELISA; ImageJ.

Обоснование

Нейробластома — одна из наиболее часто встречающихся экстракраниальных солидных опухолей детского возраста, происходящая из симпатогониев (незрелых клеток-предшественников симпатической нервной системы). Она может возникнуть в любой анатомической области, где есть симпатическая нервная система: чаще всего в мозговом слое надпочечников, в симпатическом стволе на любом участке вдоль всего позвоночника (в шейной, грудной и брюшной области), реже в головном мозге и крайне редко в легких и коже. Частота нейробластомы составляет около 7–10 % из всех видов опухолей детского возраста, включая лейкозы [1].

Этиология нейробластомы до сих пор не ясна. Результаты многих исследований указывают на то, что развитие этой опухоли в большинстве случаев обусловлено не только генетическими мутациями, но и изменениями в эпигеноме [2–4]. Так, клинико-патологические особенности нейробластомы (фенотип клеток, степень агрессивности опухоли и стадия заболевания) ассоциированы с изменениями модификаций гистонов (H3K4me1, H3K4me3, H3K27Ac, H3K27me3) [5–7] и метилированием ДНК [2, 8, 9]. При этом обнаружено, что большинство нарушений метилирования ДНК происходит как в промоторах [8, 10], так и вне промоторов определенных генов [10, 11], а также по всему геному [10], в частности в LINE-1-повторах [12–14]. Причем мишенью являются как CpG-динуклеотиды [2, 10], так и не-CpG-сайты (meCpHpG и meCpHpH, где H = A, C или T) [9, 11, 15]. Необходимо подчеркнуть, что в опухолевых клетках гипометилирование LINE-1 — одна из причин геномной нестабильности, и в нейробластоме, например, оно связано с окислительным стрессом, индуцируемым активными формами кислорода (АФК) [13]. Показано, что в некоторых типах новообразований (например, при раке мочевого пузыря) гипометилирование LINE-1 при окислительном

стрессе сопровождается ремоделированием хроматина за счет увеличения уровня H3K9me3 и H3K18ac, и в зависимости от клеточной линии промоторы ретротранспозона LINE-1 становятся обогащены либо H3K4me3 и H3K18ac, либо H3K9me3 и H3K27me3 [16]. Таким образом, актуально проведение исследований, направленных на выявление эпигенетических (эпигеномных) биомаркеров (в частности метилирования CpG-динуклеотидов в различных сайтах и компактизации хроматина) в клетках разных клинико-морфогенетических типов нейробластомы [5–8, 11]. Кроме того, результаты молекулярного анализа эпигеномных изменений, возникающих в малигнизированных клетках по сравнению с нормой, а также после воздействия препаратов, используемых для химиотерапии нейробластомы, позволят лучше понять возможные причины приобретенной лекарственной устойчивости этого типа новообразований [6]. Поэтому важно исследовать вещества, влияющие на эпигеном и снижающие жизнеспособность клеток нейробластомы, что в дальнейшем может быть использовано для «эпигенетической» терапии в комплексном лечении данного типа опухолей.

В последнее время особое внимание уделяется поиску природных веществ, которые обладают противоопухолевым действием и способствуют снижению побочных эффектов и преодолению лекарственной устойчивости при обычной терапии новообразований. Например, куркумин — полифенольное соединение растительного происхождения — обладает антиоксидантными, противовоспалительными и противоопухолевыми свойствами. При этом его антиоксидантная активность обусловлена хелатированием железа, ингибированием перекисного окисления липидов и удалением АФК [17]. Однако в клетках нейробластомы куркумин индуцирует генерацию АФК. Повышение внутриклеточных уровней АФК подавляет ERK1/2-киназы и стимулирует экспрессию гипоксия-индуцибельного

фактора-1 альфа (HIF-1 α). В итоге воздействие куркумина приводит к остановке клеточного цикла и апоптозу клеток нейробластомы посредством модуляции сигнальных путей PTEN-Akt, NF- κ B, FOXO3a и p53, индукции митохондриальной дисфункции и активации каспазы [18], что и обуславливает противоопухолевый эффект этого вещества.

Другое природное соединение с подобными куркумину свойствами — лактоферрин (ЛФ) — многофункциональный гликопротеин из семейства трансферринов, который обладает несколькими ферментативными активностями: ДНКазной, РНКазной, АТФазной, фосфатазной и амилазной. Данный белок способен обратимо связывать ионы железа и может существовать свободно от Fe²⁺/Fe³⁺ (апо-форма ЛФ) или связано с ним (холо-форма ЛФ). Помимо железа он может взаимодействовать с ионами Cu²⁺, Zn²⁺ и Mn²⁺. ЛФ обладает антибактериальным, антипаразитарным, противовирусным, антиаллергическим, иммуномодулирующим и противоопухолевым действием [19–21]. Он принимает участие в клеточном росте и дифференцировке, может стабилизировать HIF-1 α /2 α и активировать различные сигнальные пути. Как транскрипционный фактор ЛФ может регулировать экспрессию генов, отвечающих за выживание клетки при гипоксии [22, 23].

ЛФ проявляет свою биологическую активность после взаимодействия со специфическими LPR-рецепторами, которые обнаружены во многих тканях и типах клеток. Установлено, что ЛФ взаимодействует с рецепторами интеллектина-1 (оментин-1), CD14 и аполипопротеина Е (белок-1, подобный рецептору ЛПНП, LDL, LRP-1/CD91), а также с Toll-подобными (TLR2, TLR4), цитокиновыми (CXCR4), лектиновыми С-типа (CLRs) рецепторами [19, 24, 25]. Наибольшие концентрации ЛФ определяются в молозиве и молоке, он также присутствует в крови, слезной жидкости, слюне, бронхолегочном лаваже, вагинальных секретах, семенной, синовиальной, спинномозговой жидкостях. Данный белок в организме преимущественно синтезируется эпителиальными клетками и в значительном количестве депонирован в гранулах нейтрофилов [20, 26].

Экспрессия гена *LTF* ЛФ зависит от типа клеток, регулируется эстрогенами и эстроген-подобными рецепторами, может активироваться ретиноевой кислотой, митогенами, факторами роста и модулироваться окислительным стрессом [26–28]. В то же время в опухолевых клетках ЛФ не экспрессируется из-за гиперметилирования ДНК и деацетилирования гистонов промотора гена *LTF* [29–31]. Помимо этого обнаружено, что генетическая изменчивость *LTF*

значительно повышает восприимчивость к развитию новообразований, а нарушения в метилировании промотора или первого экзона могут иметь тот же эффект, что и мутации различных генов-супрессоров опухолей или протоонкогенов [28]. В модельных экспериментах было выявлено, что сверхэкспрессия гена *LTF* может ингибировать пролиферацию клеток некоторых опухолей [32]. Установлено, что экзогенный ЛФ способен подавлять рост солидных опухолей, редуцировать метастазирование, индуцировать в малигнизированных клетках апоптоз и в зависимости от типа опухоли блокировать клеточный цикл на стадиях G0/G1, либо G1/S, либо G2/M [21, 26, 27, 30, 33]. Кроме того, показано, что противоопухолевый эффект экзогенного ЛФ сильнее выражен в комплексе с другими веществами, в частности с линолевой и олеиновой кислотами [34–36]. Все эти данные позволяют некоторым авторам высказывать предположения, что *LTF* может быть геном-супрессором опухолей [32], и экзогенные формы ЛФ (апо-и/или холо-) и/или его комплексы с другими веществами можно применять в таргетной терапии новообразований [28, 34, 37], в частности нейробластом и глиобластом [38, 39].

Молекулярный механизм противоопухолевого действия ЛФ в большинстве случаев пока еще не ясен, но предполагается участие эпигенетических механизмов в этом феномене [40]. Например, лактоферрин В (пептид, полученный из бычьего ЛФ) уменьшает экспрессию DNMT-1 в клетках Т-лейкемии Jurkat за счет снижения стабильности ДНК-метилтрансферазы DNMT-1 и времени полужизни мРНК *DNMT-1* [41], а комплексы ЛФ с олеиновой кислотой могут изменять структуру хроматина [42].

Установлено, что ЛФ вызывает повышение уровня АФК и уровни свободного железа в клетке [33], что напоминает описанные выше свойства куркумина в клетках нейробластомы [18]. Это может говорить о сходных с куркумином молекулярных механизмах противоопухолевых эффектов ЛФ в клетках нейробластомы с вовлечением HIF-1 α /2 α [43, 44] и изменениями в эпигеноме [45, 46]. Кроме того, ЛФ имеет широкий спектр эффектов на разные типы клеток, косвенно влияя на механизмы, связанные с метилированием ДНК [47]. Однако в настоящее время отсутствуют публикации, посвященные исследованию роли ЛФ в формировании эпигеномного статуса эукариотических клеток, в том числе малигнизированных, и в частности клеток нейробластомы.

Клеточные линии нейробластомы — важные и экономичные модели, используемые для изучения особенностей развития опухоли и тестирования различных противоопухолевых препаратов

[3, 7, 48–50]. Одна из таких линий — IMR-32 — была получена из нейробластомы 13-месячного мальчика европеоидной расы (из абдоминальной массы, которая имитирует большие проекции коры головного мозга) [51].

IMR-32 принадлежит к N-(нейробластному) фенотипу, характеризующемуся как незрелые нервные клетки, предшественники симпатoadrenalового клона нервного гребня [3]. Эти клетки обладают холинергическими и адренергическими свойствами. IMR-32 не экспрессирует рецептор эстрогена альфа (ER α), но имеет рецептор эстрогена бета (ER β) [52, 53]. Эта особенность клеток может быть одним из факторов для перспективного использования экзогенного ЛФ в сочетании с применением стероидных гормонов (эстрогенов) при таргетной терапии нейробластомы. В пользу этого предположения указывают несколько фактов. Во-первых, на разных клеточных линиях рака молочной железы было показано, что в ER-отрицательных клетках противоопухолевый эффект экзогенного ЛФ выражен сильнее, чем в ER-положительных [33]. Во-вторых, метилирование определенных последовательностей ДНК, в том числе LINE-1, находится под регуляцией стероидных гормонов. При этом эстроген, например, в ER α опухолевой линии T47-Kbluc рака молочной железы, индуцировал гипометилирование LINE-1 в отличие от лейкоцитов периферической крови, где не было выявлено корреляции между метилированием LINE-1 и уровнем гормонов на различных стадиях менструального цикла [54]. В третьих, под эстрогенной регуляцией находятся эпигенетические модификации (метилирование ДНК и метилирование гистона H3K4me3) гена *Trip10* (Cdc42-взаимодействующий белок-4), который участвует в регуляции клеточного цикла. При этом *Trip10* может быть онкогенным или подавляющим рост опухоли в зависимости от клеточного происхождения новообразования, наличия и количества рецепторов к эстрогену (ER α и ER β). В ER-негативных клетках *Trip10* гиперметилирован и неактивен, тогда как в ER-положительных клетках *Trip10* гипометилирован и экспрессируется. Например, сверхэкспрессия *Trip10* в клетках нейробластомы IMR-32 приводит к усилению пролиферации этих клеток [55]. Таким образом, все представленные выше данные указывают на необходимость проведения исследований по изучению влияния на эпигеном различных клеточных линий нейробластомы как собственно белка ЛФ, так и его комплексов с другими веществами, а также совместно с применением стероидных гормонов.

Цель данной работы — исследование влияния различных доз апо-формы экзогенного рекомби-

нантного ЛФ человека (apo-rhLF) на жизнеспособность и эпигеномный статус (метилирование ДНК и степень компактизации хроматина) клеток нейробластомы человека линии IMR-32.

Материалы и методы

Культивирование клеток. Линия клеток нейробластомы человека IMR-32 приобретена в Российской коллекции клеточных культур Института цитологии (PKKK, Санкт-Петербург, Россия) [51]. Сертификаты, подтверждающие соответствие этой клеточной линии, прилагались. Клетки культивировали в 25 см² культуральных вентилируемых флаконах для адгезивных культур (Orange Scientific, Бельгия) в инкубаторе при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂ в 4 мл среды DMEM с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Thermo Fischer Scientific, США), 20 ед/мл антимикотиков (Thermo Fischer Scientific, США), 100 ед/мл пенициллина (БиолоТ, Россия) и 100 мкг/мл стрептомицина (БиолоТ, Россия) в течение 24 ч до достижения 25–30 % конфлюэнтности. Затем в опытные образцы добавляли apo-rhLF до конечной концентрации 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50, 100 и 500 мкг/мл. Рекомбинантный лактоферрин человека, выделенный из молока трансгенных коз, был получен в Белорусском государственном университете и РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству». Продукт имеет официальную торговую марку и содержит около 90 % железо-ненасыщенного ЛФ (апо-ЛФ) [56]. Рабочие растворы (100^x и 1^x) apo-rhLF были приготовлены на стерильном физиологическом растворе (условия хранения 4 °C). После внесения apo-rhLF культивирование клеток проводили еще в течение 72 ч. Параллельно продолжали культивировать контрольные образцы (интактные клетки). Клетки не синхронизировали по клеточному делению. Было проведено 4 независимых эксперимента по исследованию влияния apo-rhLF на клетки IMR-32.

Определение жизнеспособности клеток. Окраску клеток трипановым синим проводили с некоторыми модификациями, опираясь на стандартный протокол [57]. Клетки снимали с флаконов с помощью раствора Трипсина — Версена, 1 : 3 (БиолоТ, Россия), переносили в пластиковые пробирки 5 мл (Axigen, США), осаждали на центрифуге и ресуспендировали в 1 мл 1×PBS. Из каждого исследуемого образца 800 мкл суспензии клеток оставляли для выделения ядер и геномной ДНК, а 200 мкл использовали для окрашивания трипановым синим (конечная концентрация 0,01 %) в течение 3 мин при комнатной температуре. Центрифугировали при 800 g в течение 1 мин, удаляли краситель.

Клетки дважды отмывали в 300 мкл 1×PBS. Осадок клеток ресуспендировали в 100 мкл 4 % раствора параформальдегида и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Центрифугировали при 800 g в течение 1 мин и удаляли фиксирующий раствор. Клетки дважды отмывали в 300 мкл 1×PBS. Подсчет окрашенных и неокрашенных клеток осуществляли в камере Горяева (в 25 больших квадратах). Жизнеспособность клеток (v), выраженную в процентах, вычисляли по формуле: $v = (100n)/N$, где n — количество неокрашенных (живых) клеток, N — всего клеток (неокрашенные и окрашенные).

Получение ядер и выделение геномной ДНК. Суспензию клеток центрифугировали при 800 g в течение 1 мин, удаляли 1×PBS, осадок ресуспендировали в 900 мкл теплого гипотонического раствора (0,5 % KCl) и инкубировали при 37 °C в течение 30 мин. Для последующего анализа эпигеномного статуса клеток каждый образец делили на две аликвоты по 450 мкл: для экспериментов на ядрах (хроматине) и для выделения ДНК. Все образцы центрифугировали при 800 g в течение 5 мин, удаляли гипотонический раствор. В аликвоты для анализа степени компактизации хроматина добавляли по 100 мкл 1×PBS. Ядра ресуспендировали в 1×PBS и определяли их концентрацию с помощью камеры Горяева. Доводили концентрацию до 10^4 ядер/мкл. Образцы ядер хранили при -20 °C.

Для выделения геномной ДНК из культур клеток использовали неферментативный метод экстракции ДНК высаливанием [58] с некоторыми модификациями. Для этого осадок ядер ресуспендировали в 600 мкл лизирующего буфера (10 ммоль/л TrisHCl, pH 7,6; 10 ммоль/л KCl; 10 ммоль/л MgCl₂ · 6H₂O; 2 ммоль/л этилен-диамин-тетрауксусной кислоты), добавляли 80 мкл 10 % SDS и инкубировали 30 мин при 37 °C. Затем добавляли 200 мкл 6 M раствора NaCl, плавно перемешивали и инкубировали 15 мин при 4 °C. Центрифугировали при 10000 g (MiniSpin) 10 мин. Супернатант переносили в новые 1,5 мл центрифужные пробирки, ДНК осаждали изопропанолом, отмывали в 70 % этаноле. Осадок ДНК высушивали и растворяли в 100 мкл 1×TE, содержащего 10 мг/мл РНКазы А (Thermo Fischer Scientific, США). Обработку РНКазой А проводили при 37 °C в течение 1 ч. ДНК осаждали этанолом, высушивали и растворяли в milliQ H₂O. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, США) при длинах волн 260 и 280 нм по стандартной методике. О степени чистоты препаратов ДНК судили по соотношению оптических плотностей D260/D280 и полученным спектрам. Отношение погло-

щения при 260 нм к поглощению при 280 нм (A260/A280), находящееся в диапазоне 1,8–1,9, свидетельствовало о достаточной степени очистки полученных препаратов ДНК от белковых примесей. Для последующей работы все исследуемые образцы стандартизировали по концентрации ДНК (50 нг/мкл). Качество выделенной ДНК оценивали в 1 % агарозном геле.

Количественная оценка полногеномного метилирования CpG динуклеотидов. Уровень полногеномного метилирования ДНК по CpG динуклеотидам определяли с помощью иммуноферментного анализа с использованием набора 5-mC DNA ELISA Kit, следуя рекомендациям фирмы-производителя (Zymo Research, США). Уровень абсорбции сигнала в стандартных и опытных образцах измеряли при длине волны 419 нм с помощью планшетного ридера CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия). Контрольные измерения оптической плотности проводили через каждые 15 мин. В качестве стандартных проб с известным уровнем полногеномного CpG метилирования были использованы образцы коммерческой неметилированной (0 % CpG) и метилированной (100 % CpG) геномной ДНК *Escherichia coli* (Negative Control and Positive Control for 5-mC ELISA Kits, Zymo Research, США). На основе неметилированной и метилированной ДНК дополнительно были сделаны стандартные образцы, моделирующие 5, 10, 12,5, 25, 37,5, 50, 75 % уровни полногеномного метилирования ДНК. Каждый стандартный и опытный образец был сделан в трех копиях. Полногеномный уровень метилирования CpG динуклеотидов в исследуемых образцах IMR-32 определяли на основе стандартной кривой, описываемой уравнением степенной регрессии: $y = 0,000004(x^{2,718})$ ($R^2 = 0,999$; $MAE = 1,5$ %; $p < 0,001$), где y — процент метилированных CpG, x — полученные значения оптической плотности, R^2 — индекс детерминации, MAE (mean approximation error) — средняя ошибка аппроксимации. Затем, как было рекомендовано в инструкции, значения уровня метилирования для исследуемых образцов IMR-32, полученные на основе стандартной кривой, умножали на 8,167 — коэффициент разницы в плотности CpG между *E. coli* и геномом человека [59].

Количественная оценка полногеномного метилирования сайтов CCGG. Уровень полногеномного метилирования ДНК по сайтам CCGG определяли с помощью метил-чувствительной рестрикции с использованием программного обеспечения ImageJ [60, 61]. В качестве стандартных проб с известным уровнем метилирования были использованы образцы коммерческой неметилированной (<5 % CpG) и метилированной

ДНК человека клеточной линии HCT116 DKO (Human methylated and non-methylated DNA Set, Zymo Research, США). На основе неметилированной и метилированной ДНК нами дополнительно были сделаны стандартные образцы, моделирующие 12,5, 37,5, 50, 62,5, 75, 87,5 % уровни полногеномного метилирования ДНК. Каждый стандартный и опытный образец был сделан в трех копиях. Ферментативный гидролиз ДНК проводили с использованием метил-чувствительных эндонуклеаз рестрикции (изошизомеров MspI и HpaII), следуя рекомендациям фирмы-производителя ферментов (Thermo Scientific, США). Денситометрические измерения полученных электрофореграмм ДНК в 1 % агарозных гелях проводили с помощью программного обеспечения ImageJ. Полногеномный уровень метилирования CCGG-сайтов в исследуемых образцах IMR-32 определяли на основе стандартной кривой, описываемой уравнением квадратичной регрессии: $y = -750,74x^2 + 2021,70x - 1248,20$ ($R^2 = 0,997$; $MAE = 5,81$ %; $p < 0,001$), где y — процент метилированных CCGG-сайтов, x — полученные значения оптической плотности, выраженные в условных единицах ImageJ, R^2 — индекс детерминации, MAE — средняя ошибка аппроксимации.

Количественная оценка полногеномного метилирования LINE-1 повторов. Уровень полногеномного метилирования CpG динуклеотидов в LINE-1 определяли с использованием набора Global DNA – Methylation LINE-1 Kit, следуя рекомендациям фирмы-производителя (Active Motif, США). Протокол включает три основных этапа: ферментативный гидролиз геномной ДНК с помощью эндонуклеазы рестрикции MseI; гибридизацию фрагментированной геномной ДНК с LINE-1 ДНК-зондом; иммуноферментный анализ с использованием первичных антител против 5-метилцитозина и вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Уровень абсорбции сигнала в стандартных и опытных образцах измеряли при длине волны 450 нм с помощью планшетного ридера CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия). Измерение оптической плотности проводили через 60 мин инкубации с антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. В качестве стандартных проб с известным уровнем полногеномного CpG метилирования были использованы образцы коммерческой неметилированной и метилированной геномной ДНК человека линии Jurkat, входящие в набор Global DNA – Methylation LINE-1 Kit (Active Motif, США). На основе неметилированной и метилированной ДНК дополнительно были сделаны стандартные образцы, моделирующие 5, 10, 25, 50, 80 % уровни полногеномного метилирования ДНК.

Каждый стандартный и опытный образец был сделан в трех копиях. Полногеномный уровень метилирования LINE-1 в исследуемых образцах IMR-32 определяли на основе стандартной кривой, описываемой уравнением линейной регрессии: $y = 0,10x - 13,33$ ($R^2 = 0,996$; $MAE = 6,05$ %; $p < 0,001$), где y — процент метилированных LINE-1, x — полученные значения оптической плотности, R^2 — коэффициент детерминации, MAE — средняя ошибка аппроксимации.

Количественная оценка степени компактизации хроматина. Определение относительной степени компактизации хроматина (полногеномный уровень) проводили с использованием классического биохимического подхода, основанного на чувствительности ДНК к ДНКазе I [62, 63] с последующим денситометрическим анализом электрофореграмм в программе ImageJ [60, 61, 64]. Суспензию ядер ($\sim 10^4$ ядер в пробе) обрабатывали 0,009 ед/мкл ДНКазой I в 30 мкл буфера (10 ммоль/л Tris-HCl, pH 7,5 при 25 °C; 2,5 ммоль/л MgCl₂; 0,1 ммоль/л CaCl₂) (Thermo Fischer Scientific, США) в течение 5 мин при 15 °C. Ферментативный гидролиз останавливали добавлением 1/10 объема 0,5 М раствора этилен-диамин-тетрауксусной кислоты и инкубировали пробы во льду при 4 °C в течение нескольких минут. Затем выделяли геномную ДНК с помощью хлороформ-изоамиловой экстракции. Денситометрические измерения полученных электрофореграмм ДНК (1 % агарозные гели), окрашенных этидием бромидом, проводили в программе ImageJ. Для исследуемых образцов с неизвестной степенью компактизации хроматина (в %) ее устанавливали, используя коэффициенты уравнения линейной регрессии $y = 226,47x - 128,12$ ($R^2 = 0,967$, $p < 0,001$), полученные по нескольким опорным точкам для условной нулевой (значения по 18 образцам геномной ДНК) и условной 100 % степени компактизации хроматина [в данном случае это «абсолютная» (теоретическая) гетерохроматинизация, равная 1 у.е. оптической плотности в ImageJ]. Для всех исследуемых образцов эксперимент с обработкой ДНКазой I повторяли трижды.

Статистическая обработка данных. При анализе данных по жизнеспособности клеток вычисляли 95 % доверительные интервалы (95 % ДИ) для частот по методу Уилсона с помощью онлайн-калькулятора [65]. Относительный риск (Risk Ratio, RR) воздействия исследуемых доз аро-rhLF, 95 % ДИ для RR, коэффициент ассоциации ϕ , уровень значимости (p -value), определяли с помощью таблицы сопряженности 2×2 , используя критерий хи-квадрат Пирсона [65]. Уровень значимости был скорректирован на множественность сравнений ($p < 0,006$). Все выборки с результатами анализа

уровня полногеномного метилирования ДНК (CpG, CCGG, LINE-1) и степени компактизации хроматина были проверены на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро – Уилка [66]. С помощью открытого интернет-ресурса для них были вычислены средние значения, медианы, 95 % ДИ для средних, а также 25-й и 75-й процентиля (1-й и 3-й квартили, Q_1 и Q_3) для медианы [67]. Поскольку не во всех исследованных группах было нормальное распределение, то статистический анализ проводили с использованием непараметрических критериев Краскела – Уоллиса (H) и Данна (Q) для попарного сравнения с коррекцией на множественность сравнения методом Бенджамини – Хохберга [68]. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,006$ (поправка на множественность сравнений). Образцы IMR-32 после воздействия apo-rhLF сравнивали с контрольными (интактными) образцами IMR-32. Все данные в этой части исследования представлены как медиана, 25-й и 75-й процентиля (Q_1 и Q_3). Для определения тесноты (силы) связи между исследуемыми признаками и математического описания (определения характера связи) выявленных зависимостей проводили корреляционный и регрессионный анализы с помощью открытых онлайн-сервисов [65, 69–73]. Коэффициенты ранговой корреляции Кендалла (tau) и Спирмена (rho), которые не требуют нормального распределения, 95 % ДИ для tau и rho вычисляли с помощью онлайн-сервисов [65, 71, 72]. Для того чтобы выбрать наиболее адекватную математическую модель (уравнение регрессии), описывающую характер связи между исследуемыми признаками, вычисляли среднюю ошибку аппроксимации (MAE). Значимость модели регрессии проверяли с помощью F -критерия Фишера. Модель считали адекватной при $MAE < 7\%$ и $p < 0,05$. Для линейной зависимости между исследуемыми параметрами вычисляли коэффициенты корреляции (R_{xy}) и детерминации (R^2_{xy}), а для нелинейной зависимости — индексы корреляции (I_{xy}) и детерминации (I^2_{xy}).

Все диаграммы и графики построены с использованием Microsoft Excel и Power Point.

Результаты

Влияние апо-формы рекомбинантного лактоферрина человека на жизнеспособность клеток IMR-32

В настоящее время для препаратов, содержащих ЛФ, не установлено токсических доз [19]. На основе данных, представленных в ряде работ по изучению экзогенного ЛФ на культурах клеток млекопитающих и человека [74–77], нами было выбрано 8 доз apo-rhLF с целью

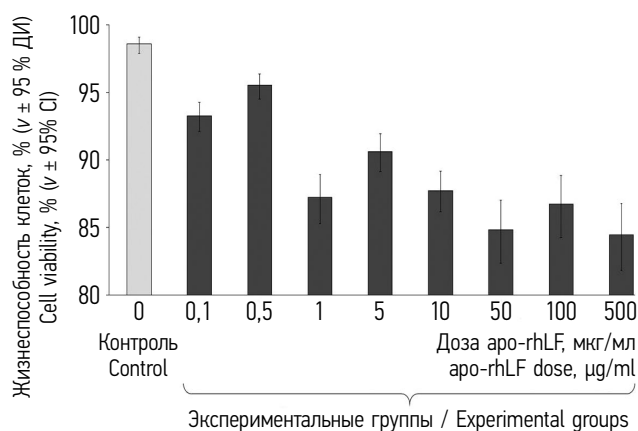


Рис. 1. Жизнеспособность клеток IMR-32 после 72 ч воздействия рекомбинантного лактоферрина человека. Статистически значимые различия с контролем выявлены для всех исследованных доз apo-rhLF ($p < 0,001$)

Fig. 1. Viability of IMR-32 cells after 72 hours of exposure to recombinant human lactoferrin. Significant differences with control were found for all studied doses of apo-rhLF ($p < 0.001$)

исследования его влияния на жизнеспособность и эпигеномный статус клеток нейробластомы IMR-32. В исследуемом концентрационном диапазоне не было выявлено летальных и полумлетальных доз apo-rhLF для IMR-32 через 72 ч воздействия. Обнаружено, что по сравнению с контролем они приводили к снижению жизнеспособности клеток от 3 до 11 раз в зависимости от дозы ($rho = -0,92$; 95 % ДИ $-0,98 \dots -0,65$; $p < 0,001$), при этом наблюдалась нелинейная немонотонная (волновая) зависимость доза – жизнеспособность (рис. 1, табл. 1, 2).

Эпигеномные изменения в IMR-32, вызванные рекомбинантным аполактоферрином человека

В связи с тем, что результаты некоторых работ указывают на участие ЛФ в метилировании ДНК (через регуляцию экспрессии DNMT-1) и изменение структуры хроматина [41, 42], то следующий этап нашего исследования заключался в количественной оценке полногеномного метилирования ДНК в различных сайтах (CpG-динуклеотиды тотально, а также CpG в составе CCGG-сайтов и LINE-1-повторов) и степени компактизации хроматина в клетках нейробластомы IMR-32, подвергшихся воздействию apo-rhLF.

Обнаружено, что воздействие apo-rhLF в течение 72 ч приводило к эпигеномным изменениям в клетках IMR-32. При этом разные дозы по-разному влияли на степень компактизации хроматина ($H = 99,91$, $v = 8$, $p < 0,001$) и полногеномное метилирование CpG динуклеотидов на тотальном уровне ($H = 80,82$, $v = 8$, $p < 0,001$), CpG в CCGG-сайтах ($H = 158,56$, $v = 8$, $p < 0,001$) и CpG в LINE-1 ($H = 73,32$, $v = 8$, $p < 0,001$) (рис. 2, табл. 3).

Таблица 1 / Table 1

Относительный риск снижения жизнеспособности клеток IMR-32 после 72 ч воздействия апо-rhLF по сравнению с контролем
Relative risk of the decrease of IMR-32 cells viability after 72 hours of exposure to apo-rhLF in comparison with control

Доза апо-rhLF, мкг/мл	RR	95 % ДИ	p-value	phi
0,1	4,84	3,08–7,62	<0,001	0,13
0,5	3,21	2,01–5,15	<0,001	0,09
1	9,17	5,86–14,36	<0,001	0,23
5	6,73	4,29–10,56	<0,001	0,17
10	8,79	5,65–13,68	<0,001	0,21
50	10,88	6,93–17,09	<0,001	0,27
100	9,52	6,02–15,05	<0,001	0,25
500	11,14	7,08–17,54	<0,001	0,28

Примечание. RR — коэффициент риска; ДИ — доверительный интервал; p-value — уровень значимости; phi — коэффициент ассоциации.

Таблица 2 / Table 2

Взаимосвязь между дозой, жизнеспособностью и эпигеномным статусом клеток IMR-32, подвергшихся воздействию апо-rhLF (результаты корреляционного анализа)
Relationship between dose, viability and epigenomic status of IMR-32 exposed to apo-rhLF (Results of correlation analysis)

Анализируемые параметры (пары сравнения)	Ранговая корреляция Кендалла (линейная зависимость)			Ранговая корреляция Спирмена (линейная, нелинейная зависимость)		
	tau (95 % ДИ)	сила связи*	p-value	tau (95 % ДИ)	сила связи*	p-value
Взаимосвязь между дозой апо-rhLF и жизнеспособностью и эпигеномными метками IMR-32						
LF – CV	-0,78 (-0,95 ... -0,23)	Высокая	0,002	-0,92 (-0,98 ... -0,65)	Весьма высокая	0,001
LF – CpG	-0,31 (-0,81–0,45)	Умеренная	0,249	-0,42 (-0,85–0,34)	Умеренная	0,262
LF – CCGG	0,14 (-0,58–0,74)	Слабая	0,600	0,18 (-0,55–0,75)	Слабая	0,651
LF – LINE-1	-0,61 (-0,91–0,09)	Заметная	0,025	-0,77 (-0,95 ... -0,21)	Высокая	0,021
LF – ChrC	-0,25 (-0,79–0,49)	Слабая	0,345	-0,46 (-0,86–0,29)	Умеренная	0,213
Взаимосвязь между жизнеспособностью клеток и эпигеномными метками IMR-32						
CV – CpG	0,09 (-0,61–0,71)	Слабая	0,753	0,23 (-0,51–0,78)	Слабая	0,544
CV – CCGG	-0,09 (-0,71–0,61)	Слабая	0,753	-0,14 (-0,74–0,58)	Слабая	0,715
CV – LINE-1	0,39 (-0,37–0,84)	Умеренная	0,180	0,52 (-0,22–0,88)	Заметная	0,162
CV – ChrC	0,48 (-0,27–0,87)	Умеренная	0,075	0,58 (-0,14–0,90)	Заметная	0,104
Взаимосвязь между компактизацией хроматина и метилированием ДНК						
ChrC – CpG	-0,34 (-0,82–0,42)	Слабая	0,206	-0,49 (-0,87–0,26)	Умеренная	0,183
ChrC – CCGG	-0,34 (-0,82–0,42)	Слабая	0,207	-0,49 (-0,87–0,25)	Умеренная	0,175
ChrC – LINE-1	-0,03 (-0,68–0,65)	Нет	0,917	-0,08 (-0,71–0,61)	Нет	0,831
Взаимосвязь метилирования ДНК в различных сайтах						
LINE-1 – CpG	0,59 (-0,11–0,90)	Заметная	0,028	0,81 (0,32–0,96)	Высокая	0,008
LINE-1 – CCGG	-0,09 (-0,71–0,61)	Нет	0,753	-0,18 (-0,75–0,55)	Слабая	0,651
CCGG – CpG	-0,06 (-0,70–0,63)	Нет	0,833	-0,06 (-0,70–0,63)	Нет	0,872

Примечание: LF — доза апо-rhLF; CV — жизнеспособность клеток; CpG — уровень полногеномного метилирования CpG; CCGG — уровень полногеномного метилирования CCGG; LINE-1 — уровень полногеномного метилирования LINE-1; ChrC — степень компактизации хроматина; * теснота связи по шкале Чеддока.

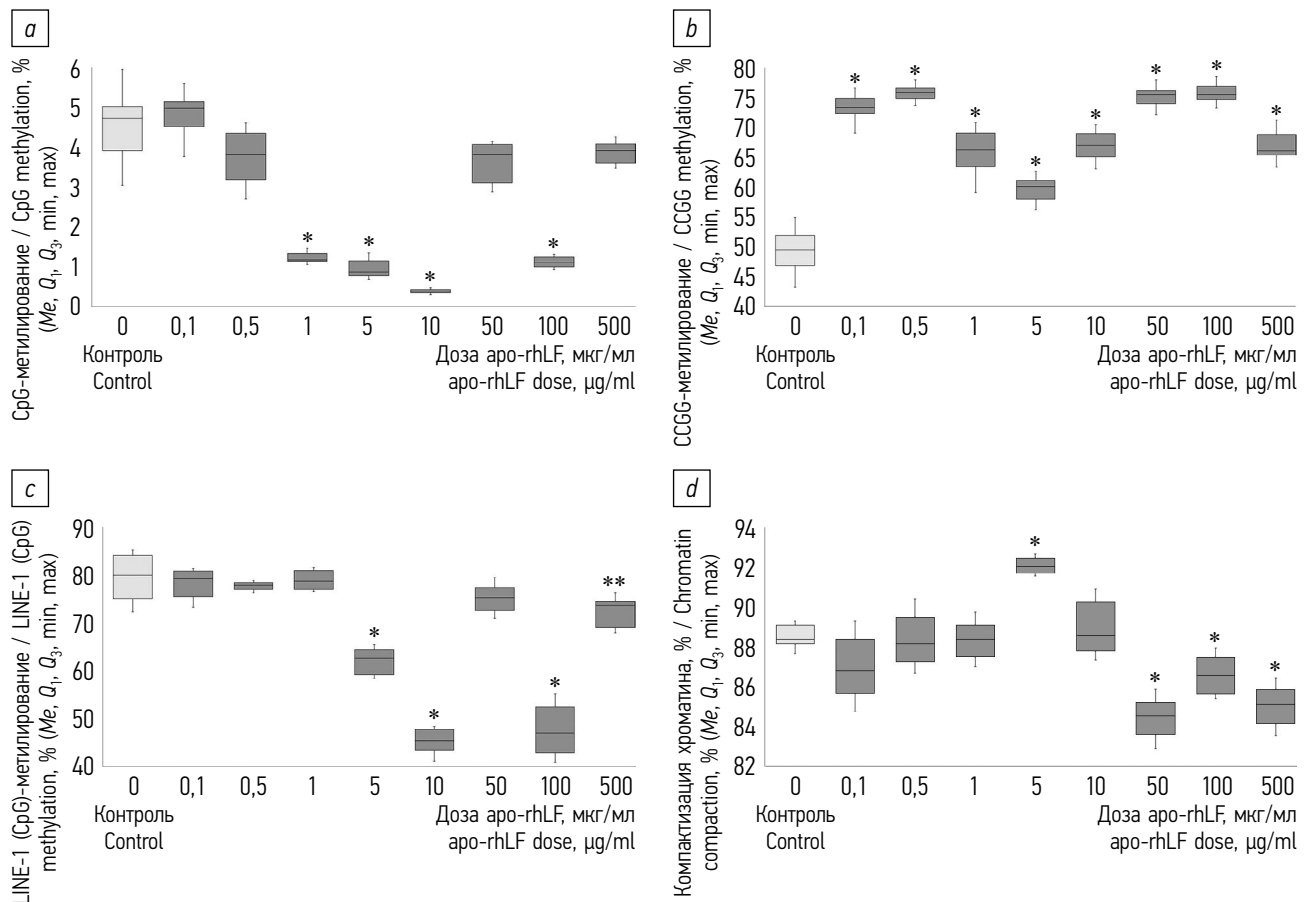


Рис. 2. Изменение уровня полногеномного метилирования ДНК (a–c) и степени компактизации хроматина (d) в клетках IMR-32 после 72 ч воздействия apo-rhLF. * $p < 0,001$, ** $p = 0,004$ — статистически значимые различия по сравнению с контролем

Fig. 2. Changes of the genome-wide DNA methylation level (a–c) and chromatin compaction degree (d) in IMR-32 cells after 72 hours of apo-rhLF exposure. * $p < 0.001$, ** $p = 0.004$ — significance of differences in comparison with the control

Таблица 3 / Table 3

Эпигеномные эффекты apo-rhLF, выявленные в клетках IMR-32 после 72 ч воздействия
Apo-rhLF epigenomic effects that have been identified in IMR-32 cells after 72 hours of exposure

Доза apo-rhLF, мкг/мл	Полногеномное метилирование ДНК			Компактизация хроматина
	CpG	LINE-1	CCGG	
0,1	—	—	↑1,5*	—
0,5	—	—	↑1,5*	—
1	↓3,9*	—	↑1,3*	—
5	↓5,2*	↓1,3*	↑1,2*	↑1,1*
10	↓11,8*	↓1,8*	↑1,4*	—
50	—	—	↑1,5*	↓1,1*
100	↓4,3*	↓1,7*	↑1,5*	↓1,02*
500	—	↓1,1**	↑1,3*	↓1,04*

Примечание. ↓ и ↑ — степень снижения и повышения показателей признака по сравнению с контролем (цифрами указано, во сколько раз); * $p < 0,001$; ** $p = 0,004$; «—» — нет различий с контролем.

Следует отметить, что как для метилирования ДНК, так и для компактизации хроматина наблюдалась нелинейная немонотонная (волновая) картина связи доза — эффект. При этом доза-зави-

симый характер изменений метилирования CpG динуклеотидов totally по всему геному и CpG в составе LINE-1 повторов был практически сходным. В обоих случаях apo-rhLF не изменял

метиляции ДНК при дозах 0,1 и 0,5 мкг/мл, но приводил к снижению метилирования ДНК при дозах 5, 10 и 100 мкг/мл. Исключение составили только две дозы: 1 и 500 мкг/мл. Так, по сравнению с контролем 1 мкг/мл аро-ghLF не оказывал существенного влияния на метилирование CpG в составе LINE-1 в отличие от полногеномного метилирования CpG, уровень которого снижался. Доза в 500 мкг/мл, наоборот, приводила к снижению уровня метилирования LINE-1 в отличие от полногеномной оценки CpG-метиляции, где не было обнаружено статистически значимых различий с контролем (рис. 2, а, с).

В то же время при количественной оценке полногеномного метилирования CCGG-сайтов наблюдался абсолютно противоположный эффект влияния апо-ЛФ — аро-ghLF приводил к повышению уровня CCGG-метиляции по сравнению с контролем (рис. 2, б, табл. 3). Необходимо подчеркнуть, что в ряду исследованных доз аро-ghLF в случае CCGG-метиляции, также как для CpG и LINE-1, существует сходный концентрационный диапазон от 0,5 до 50 мкг/мл, в котором прослеживается формирование так называемой ямы по снижению уровня метилирования ДНК. Причем в этом же концентрационном диапазоне наблюдается формирование «вершины» в повышении степени компактизации хроматина.

В отличие от метилирования ДНК, где было выявлено либо снижение (для CpG и LINE-1), либо увеличение (для CCGG) уровня метилирования (по сравнению с контролем), в случае анализа состояния хроматина наблюдалось как повышение (для дозы 5 мкг/мл), так и снижение степени компактизации хроматина (для доз 50, 100 и 500 мкг/мл) по сравнению с контролем (рис. 2, д, табл. 3). При этом наблюдался интересный феномен — практически зеркальные изменения полногеномного метилирования CCGG сайтов и степени компактизации хроматина в ряду исследованных доз аро-ghLF (рис. 2, б, д).

Корреляционный анализ выявил высокую силу связи только для трех пар зависимостей: доза ЛФ — жизнеспособность клеток, доза ЛФ — метилирование LINE-1 и CpG-метиляция — LINE-1-метиляция (см. табл. 2). Полученные коэффициенты ранговой корреляции для некоторых других пар сравниваемых параметров показали заметную и умеренную силу связи по шкале Чеддока (см. табл. 2). Однако их статистическая значимость не подтвердилась, что, вероятно, объясняется немонотонными отношениями сравниваемых признаков, поскольку ранговый коэффициент Спирмена оценивает, насколько хорошо связь между двумя

переменными может быть описана с помощью монотонной функции (как линейной, так и нелинейной).

С помощью регрессионного анализа подобрать адекватную математическую модель для описания выявленных парных зависимостей, а также множественной (многофакторной) немонотонной регрессии на данном этапе исследований нам не удалось, что, по-видимому, связано со сложной (сочетанной) природой биологических эффектов воздействия апо-ЛФ на эпигеном.

Обсуждение

Проведенные исследования показали, что воздействие рекомбинантного ЛФ человека в течение 72 ч снижает жизнеспособность клеток IMR-32. При этом все исследованные дозы аро-ghLF в большей или меньшей степени оказывали влияние на эпигеном клеток нейробластомы, в частности одни дозы изменяли только метилирование ДНК, другие — метилирование и компактизацию хроматина. Кроме того, разные дозы аро-ghLF приводили к разному эффекту по степени компактизации хроматина (повышение либо снижение) при одинаковой картине полногеномного метилирования ДНК (повышенное CCGG-метиляция и сниженное CpG- и/или LINE-1-метиляция). Сравнивая наблюдаемые эффекты аро-ghLF на эпигеномный статус IMR-32, можно предположить, что его воздействие оказывало большее влияние на метилирование ДНК, чем на компактизацию хроматина (и, возможно, на модификации гистонов), поскольку степень выраженности обнаруженных эффектов по сравнению с контролем в первом случае была сильнее, чем во втором (табл. 3). Данное предположение требует проведения дальнейших исследований с использованием антител, специфичных к различным модификациям гистонов.

Особо следует отметить тот факт, что воздействие аро-ghLF на полногеномное метилирование ДНК в клетках IMR-32 имело дифференциальный характер не только в зависимости от дозы, но и от исследуемого сайта метилирования. Так, все дозы аро-ghLF влияли на полногеномный статус метилирования CCGG-сайтов, тогда как только некоторые из исследованных доз затронули LINE-1-повторы и изменили полногеномный уровень CpG-метиляции. При этом обнаруженный CpG-деметирующий эффект апо-ЛФ по пока не ясной причине, по-видимому, игнорировал CCGG-сайты, оставляя их преимущественно в метилированной форме, на что указывает обнаруженный повышенный уровень CCGG-метиляции по сравнению с контролем.

Интересно отметить, что в исследованных клетках IMR-32 степень компактизации хроматина была выше уровня полногеномного CpG-метилирования ДНК, что отличается от классического представления «чем выше уровень метилирования ДНК, тем сильнее степень компактизации хроматина». При этом мы обнаружили зеркальный характер изменений между полногеномным метилированием ДНК и компактизацией хроматина, а именно при повышении уровня метилирования наблюдалось снижение степени компактизации хроматина и наоборот. Данный феномен особенно хорошо прослеживался в случае CCGG-метилирования (рис. 2, *b*, *d*) и несколько слабее был выражен для динуклеотидов LINE-1 и CpG. Можно предположить, что в клетках IMR-32, подвергшихся воздействию аро-ghLF, в формировании структуры хроматина (степени компактизации) большая роль отводится CCGG-сайтам и, возможно, LINE-1-повторам, а не CpG-динуклеотидам как таковым. Это предположение требует дальнейших исследований, в том числе на других клеточных линиях нейробластомы.

Результаты исследования показали сложный нелинейный немонотонный характер влияния рекомбинантного ЛФ человека на жизнеспособность и эпигеномный статус IMR-32. Необходимо подчеркнуть, что чаще всего нелинейные (многофазные) зависимости доза – эффект наблюдаются для различных веществ в низких и сверхмалых дозах [78–80]. Возможным объяснением нелинейной немонотонной зависимости влияния аро-ghLF на IMR-32 является многофункциональная природа ЛФ, когда одни дозы этого белка необходимы для реализации одних биологических процессов, а другие дозы — для других. Вероятно, именно поэтому к настоящему времени не выявлено токсичных доз для ЛФ [19, 74–77]. Безусловно, для того чтобы установить конкретные математические модели рассматриваемых зависимостей, необходимо проанализировать эффекты других доз аро-ghLF в исследуемом диапазоне, а также при разной продолжительности воздействия.

Выявленное нами снижение жизнеспособности клеток IMR-32 после воздействия аро-ghLF согласуется с литературными данными о противоопухолевом эффекте ЛФ. В ряде работ было отмечено, что ЛФ способен стимулировать или ингибировать пролиферацию и миграцию клеток в зависимости от того, действует он на нормальные или на опухолевые клетки [33, 74–77]. Цитотоксичность ЛФ в отношении разных видов опухолевых клеток имеет разные молекулярные механизмы [28, 37]. Это может происходить за счет разрушения клеточной мембраны, индукции апоп-

тоза, остановки клеточного цикла и клеточной иммунореакции [28], а также через взаимодействия с отрицательно заряженными молекулами (например, фосфатидилсерин, липопротеины, O-гликоцилированные муцины и сиаловая кислота, присутствующие на наружной мембране опухолевых клеток) [81, 82]. Например, на различных клеточных линиях нейробластомы человека (Kelly, SK-N-DZ и IMR-32) было показано, что лактоферрин Lfcin B (фрагмент бычьего ЛФ) обладает цитотоксическим действием через дестабилизацию цитоплазматической мембраны и митохондрий [38]. Кроме того, остановка клеточного цикла может быть индуцирована усеченной внутриклеточной изоформой ЛФ (дельта-ЛФ), который выступает в качестве транскрипционного фактора для генов *Skp1*, *Bax*, *DcpS* и *SelH* [30]. Несмотря на недавно проведенный полногеномный анализ мутаций, для большинства первичных клеточных линий нейробластомы не установлено мутаций-драйверов опухолеобразования, что может указывать на участие эпигенетических механизмов в иницировании новообразований и поддержании их злокачественности [50]. В настоящее время эпигенетические механизмы развития некоторых видов опухолей до конца не ясны. В большинстве случаев установлена роль метилирования ДНК в регуляции экспрессии генов при развитии доброкачественных и недоброкачественных новообразований [9]. Так, одной из особенностей нейробластомы является высокий уровень метилирования ДНК предполагаемых генов-супрессоров опухоли, что может запускать онкогенный процесс, как было показано на клетках нейробластомы *in vivo* и клеточных линиях *in vitro* [4, 6, 50].

Поскольку существует большое количество работ, указывающих на противоопухолевое действие ЛФ и его комплексов с другими молекулами [28, 34–36], то наши результаты по снижению жизнеспособности клеток IMR-32 под воздействием аро-ghLF в сочетании с результатами по анализу уровня метилирования ДНК и степени компактизации хроматина могут указывать на возможный эпигенетический механизм противоопухолевого действия апо-формы ЛФ, опосредованный в частности деметилированием CpG, LINE-1 и/или метилированием CCGG-сайтов определенных генов, активирующих защитные свойства клетки от трансформации, причем в зависимости от дозы может отличаться и механизм действия ЛФ. Не исключено, что в разных генах при разных дозах и продолжительности воздействия в этот процесс могут быть вовлечены либо CpG-, либо CCGG-сайты, либо LINE-1, либо и те и другие для разных участков одного и того же гена или разных генов. Для проверки

данной гипотезы, безусловно, требуются дальнейшие исследования.

В геноме человека приблизительно 60 % всех промоторов колокализуются с CpG-островками, в противоположность «телам» генов, которые в основном содержат незначительное количество CpG [83, 84]. В отличие от CpG-динуклеотидов CCGG-сайты более равномерно распределены по геному, поэтому вероятность локализации CCGG в теле гена выше, чем в CpG-островках [85]. Так, примерно 51,05 % CCGG-сайтов приходится на мобильные элементы генома (в том числе LINE-1) и 48,16 % — на уникальные последовательности ДНК. При этом доля CpG, расположенных в CCGG-сайтах, относительно всего генома составляет 8,04 % (где 4,14 % находятся в мобильных элементах, 3,90 % локализованы в уникальных последовательностях) [86].

Поскольку метилирование промоторов генов ингибирует транскрипцию, тогда как гипометилирование последовательностей внутри гена может стимулировать транскрипцию с альтернативных промоторов и приводить к экспрессии изоформ белков, обладающих иными свойствами, чем исходный (полноразмерный) белок, или активировать дистальные тканеспецифичные регуляторные элементы [84, 87–89], то можно предположить, что апо-форма ЛФ обладает некой активностью, дифференциально действуя (прямо или опосредованно) на метилирование ДНК в различных участках генома (различая при этом CpG, CCGG и LINE-1), а также влияя на модификации гистонов, изменяя степень компактизации хроматина.

Необходимо отметить, что многие противоопухолевые препараты способны изменять структуру хроматина, дестабилизируя нуклеосомы [90]. Например, в модельных экспериментах на изолированных ядрах HeLa после воздействия комплекса ЛФ с олеиновой кислотой в дозе 500 мкг/мл в течение 15 мин наблюдались некоторые изменения на уровне мелкомасштабной фрактальной организации нуклеосом ($0,04–0,08 \text{ \AA}^{-1}$), а также в крупномасштабных фрактальных характеристиках структур хроматина, что, как предполагают авторы работы [42], может приводить к уплотнению хроматина и, как следствие, к снижению экспрессии генов, отвечающих за опухолеобразование. Мы выявили увеличение степени компактизации хроматина в клетках нейробластомы IMR-32 только при дозе 5 мкг/мл и после 72 ч воздействия, тогда как другие дозы либо снижали степень компактизации хроматина, либо компактизация хроматина оставалась на уровне значений контрольных образцов. Не исключено, что ЛФ может по-разному влиять на структуру хроматина не только в зависимости от дозы,

но и от продолжительности воздействия. Причем разный биологический эффект ЛФ может наблюдаться также в зависимости от изоформы ЛФ, степени гликозилирования, третичной структуры (холо- или апо-форма), от степени олигомеризации и его способности образовывать комплексы с другими молекулами [91]. Эти предположения требуют дальнейших исследований.

Установлено, что к замедлению роста нейробластомы приводит снижение экспрессии генов клеточного цикла, вызванное высокими уровнями HIF-2 α [43, 44], тогда как в большинстве солидных опухолей сверхэкспрессия HIF-1 α , наоборот, необходима для эффективной инвазии, поддержания их роста, прогрессии и метастазирования [92, 93]. При этом было показано, что в клетках головного мозга у мышей [22, 94] и нейрональных клетках сетчатки [95] ЛФ стабилизирует HIF-1 α /2 α , что может иметь существенное значение при таргетной терапии. Кроме того, обнаружено, что противоопухолевые эффекты ЛФ более выражены в ER-негативных клеточных линиях рака молочной железы MDA-MB-231 и MDA-MB-468, и его можно использовать в качестве экзогенного модификатора таких характеристик рака как оксидантно-антиоксидантный баланс, скорость апоптоза и прогрессирование клеточного цикла [33]. Таким образом, с учетом этих данных и результатов нашей экспериментальной работы, проведенной на клетках нейробластомы человека линии IMR-32, которые не экспрессируют рецептор ER α , но имеют рецептор ER β [52, 53], экзогенную апо-форму рекомбинантного ЛФ человека можно рассматривать в качестве перспективного дополнительного агента при лечении нейробластомы. Использование рекомбинантного ЛФ человека при таргетной терапии различных типов нейробластомы, безусловно, требует дальнейших исследований *in vivo*.

Заключение

Результаты проведенного исследования показали, что аро-ghLF снижает жизнеспособность клеточной линии нейробластомы IMR-32. Обнаружена сложная картина эпигеномного клеточного ответа IMR-32 на воздействие апо-ЛФ (нелинейная немонотонная зависимость доза – эффект). Это, по-видимому, связано со сменой молекулярных механизмов действия аро-ghLF в том или ином концентрационном интервале, что может объясняться многофункциональной природой ЛФ, который принимает участие в различных биологических процессах. При этом апо-форма рекомбинантного ЛФ человека способна «дифференциально» изменять эпигеномный статус клеток

IMR-32 в зависимости от дозы, причем этот эффект, скорее всего, в большей степени затрагивает метилирование ДНК, а не степень компактизации хроматина. Apo-rhLF (прямо или опосредованно) «различает» CpG в составе CCGG-сайтов и LINE-1- от CpG-динуклеотидов в других участках генома (механизм этого феномена пока не ясен), и в зависимости от дозы вызывает их метилирование/деметиляцию, что в свою очередь, вероятно, модулирует экспрессию генов, отвечающих за клеточную пролиферацию и/или апоптоз, и тем самым снижает жизнеспособность IMR-32. Полученные результаты доказывают необходимость проведения комплексного эпигенетического/эпигеномного анализа в различных потенциальных сайтах метилирования ДНК с одновременным анализом модификаций гистонов и оценкой структуры хроматина у исследуемых биологических объектов с целью выявления биомаркеров, ассоциированных с конкретными биологическими процессами и/или патологиями.

Дополнительная информация

Благодарность. Авторы выражают свою признательность зав. кафедры биохимии, науч. рук. НИЛ биохимии и фармакологии биологически активных веществ биологического факультета Белорусского государственного университета, канд. биол. наук Игорю Викторовичу Семаку и зам. ген. директора по научной работе Республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», канд. с.-х. наук Александру Ивановичу Будевичу за безвозмездно предоставленный образец рекомбинантного лактоферрина человека. Авторы особо благодарны научному сотруднику отдела молекулярной генетики ФГБНУ «ИЭМ» Анне Юрьевне Елизаровой за помощь в проведении иммуноферментного анализа.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственных заданий Министерства науки и высшего образования РФ: НИР № 0557-2019-0008 (рег. № НИОКТР АААА-А19-119021290134-5) и НИР № FGWG-2022-0012 (рег. № НИОКТР 122020300196-4).

Соблюдение этических норм. Проведение исследования не связано с работой с животными и клиническим материалом.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с подготовкой и публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию

перед публикацией. Наибольший вклад распределен следующим образом: *И.О. Сучкова* — разработка концепции, планирование экспериментов, выделение ДНК (ядер), определение жизнеспособности клеток, ImageJ-анализ, статистический анализ, подбор литературы, написание рукописи, создание рисунков и таблиц; *К.А. Шарруф* — ферментативный гидролиз (MspI/HpaII, DNaseI), агарозный электрофорез, ImageJ-анализ, иммуноферментный анализ, подбор литературы, написание черновой версии рукописи; *Л.К. Сасина* — культивирование клеток; *Н.И. Дергачева* — иммуноферментный анализ; *Т.В. Баранова* — подготовка образцов ДНК (ядер) для анализа; *Е.Л. Паткин* — идея, дизайн исследования, редактирование рукописи.

Additional information

Acknowledgment. The authors would like to express their deepest gratitude to the Head of the Department of Biochemistry, Scientific Supervisor of the Research Laboratory of the Biochemistry and Pharmacology of Biologically Active Substances of the Faculty of Biology of the Belarusian State University, PhD *I.V. Semak* and to General Director for Research of the RUE “Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Animal Husbandry” PhD *A.I. Budevich*, for the donating a sample of recombinant human apo-lactoferrin. The authors are especially grateful to *A.Yu. Elizarova*, a researcher of the Department of Molecular Genetics of the FSBS “IEM”, for her help in conducting ELISA.

Funding source. The work was carried out within the framework of the state task.

Ethical approval. The study is not related to work on animals and clinical material.

Conflict of interest. The authors have no conflicts of interest regarding the publication of this article.

Authors' contribution. All authors made significant contributions to concept development, research and paper preparation, read and approved the final version before publication. The largest contribution is distributed as follows: *I.O. Suchkova* — development of the concept, planning of the experiments, DNA (nucleus) extraction, determination of the cell viability, ImageJ analysis, statistical analysis, selection of literature, writing a manuscript, creating figures and tables; *K.A. Sharrouf* — enzymatic hydrolysis (MspI/HpaII, DNaseI), agarose electrophoresis, ImageJ analysis, ELISA, literature selection, writing a draft manuscript; *L.K. Sasina* — cultivation of cell line; *N.I. Dergacheva* — ELISA; *T.V. Baranova* — preparation of DNA (nuclei) samples for analysis; *E.L. Patkin* — idea, study design, editing the manuscript.

Список литературы

1. Строганова А.М., Карселадзе А.И. Нейробластома: морфологическая структура, молекулярно-генетические особенности и прогностические факторы // Успехи молекулярной онкологии. 2016. Т. 3, № 1. С. 32–43. DOI: 10.17650/2313-805X.2016.3.1.32-43
2. Gómez S., Castellano G., Mayol G. et al. DNA methylation fingerprint of neuroblastoma reveals new biological and clinical insights // Genome Data. 2015. Vol. 5. P. 360–363. DOI: 10.1016/j.gdata.2015.07.016
3. Campos Cogo S., Gradowski Farias da Costa do Nascimento T., de Almeida Brehm Pinhatti F. et al. An overview of neuroblastoma cell lineage phenotypes and *in vitro* models // Exp. Biol. Med. (Maywood). 2020. Vol. 245, No. 18. P. 1637–1647. DOI: 10.1177/1535370220949237
4. Fetahu I.S., Taschner-Mandl S. Neuroblastoma and the epigenome // Cancer Metastasis Rev. 2021. Vol. 40, No. 1. P. 173–189. DOI: 10.1007/s10555-020-09946-y
5. Yang Q., Tian Y., Ostler K.R. et al. Epigenetic alterations differ in phenotypically distinct human neuroblastoma cell lines // BMC Cancer. 2010. Vol. 10. P. 286. DOI: 10.1186/1471-2407-10-286
6. Jubierre L., Jiménez C., Rovira E. et al. Targeting of epigenetic regulators in neuroblastoma // Exp. Mol. Med. 2018. Vol. 50, No. 4. P. 1–12. DOI: 10.1038/s12276-018-0077-2
7. Upton K., Modi A., Patel K. et al. Epigenomic profiling of neuroblastoma cell lines // Sci. Data. 2020. Vol. 7, No. 1. P. 116. DOI: 10.1038/s41597-020-0458-y
8. Yáñez Y., Grau E., Rodríguez-Cortez V.C. et al. Two independent epigenetic biomarkers predict survival in neuroblastoma // Clin. Epigenetics. 2015. Vol. 7, No. 1. P. 16. DOI: 10.1186/s13148-015-0054-8
9. Olsson M., Beck S., Kogner P. et al. Genome-wide methylation profiling identifies novel methylated genes in neuroblastoma tumors // Epigenetics. 2016. Vol. 11, No. 1. P. 74–84. DOI: 10.1080/15592294.2016.1138195
10. Kiss N.B., Kogner P., Johnsen J.I. et al. Quantitative global and gene-specific promoter methylation in relation to biological properties of neuroblastomas // BMC Med. Genet. 2012. Vol. 13. P. 83. DOI: 10.1186/1471-2350-13-83
11. Gómez S., Castellano G., Mayol G. et al. DNA methylation fingerprint of neuroblastoma reveals new biological and clinical insights // Epigenomics. 2015. Vol. 7, No. 7. P. 1137–1153. DOI: 10.2217/epi.15.49
12. Muotri A.R., Marchetto M.C., Coufal N.G. et al. L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2 // Nature. 2010. Vol. 468, No. 7322. P. 443–446. DOI: 10.1038/nature09544
13. Giorgi G., Marcantonio P., Del Re B. LINE-1 retrotransposition in human neuroblastoma cells is affected by oxidative stress // Cell Tissue Res. 2011. Vol. 346, No. 3. P. 383–391. DOI: 10.1007/s00441-011-1289-0
14. Jönsson M.E., Ludvik Brattås P., Gustafsson C. et al. Activation of neuronal genes via LINE-1 elements upon global DNA demethylation in human neural progenitors // Nat. Commun. 2019. Vol. 10, No. 1. P. 3182. DOI: 10.1038/s41467-019-11150-8
15. Dyachenko O.V., Schevchuk T.V., Kretzner L. et al. Human non-CG methylation: are human stem cells plant-like? // Epigenetics. 2010. Vol. 5, No. 7. P. 569–572. DOI: 10.4161/epi.5.7.12702
16. Whongsiri P., Pimratana C., Wijitsettakul U. et al. Oxidative stress and LINE-1 reactivation in bladder cancer are epigenetically linked through active chromatin formation // Free Radic. Biol. Med. 2019. Vol. 134. P. 419–428. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.031
17. Ak T., Gülçin I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin // Chem. Biol. Interact. 2008. Vol. 174, No. 1. P. 27–37. DOI: 10.1016/j.cbi.2008.05.003
18. Zhai K., Brockmüller A., Kubatka P. Curcumin's beneficial effects on neuroblastoma: Mechanisms, challenges, and potential solutions // Biomolecules. 2020. Vol. 10, No. 11. P. 1469. DOI: 10.3390/biom10111469
19. Борзенкова Н.В., Балабушевич Н.Г., Ларионова Н.И. Лактоферрин: физико-химические свойства, биологические функции, системы доставки, лекарственные препараты и биологически активные добавки (обзор) // Биофармацевтический журнал. 2010. Т. 2, № 3. С. 3–19.
20. Hao L., Shan Q., Wei J. et al. Lactoferrin: major physiological functions and applications // Curr. Protein Pept. Sci. 2019. Vol. 20, No. 2. P. 139–144. DOI: 10.2174/1389203719666180514150921
21. Алешина Г.М. Лактоферрин — эндогенный регулятор защитных функций организма // Медицинский академический журнал. 2019. Т. 19, № 1. С. 35–44. DOI: 10.17816/MAJ19135-44
22. Zakharova E.T., Kostevich V.A., Sokolov A.V., Vasilyev V.B. Human apo-lactoferrin as a physiological mimetic of hypoxia stabilizes hypoxia-inducible factor-1 alpha // Biometals. 2012. Vol. 25, No. 6. P. 1247–1259. DOI: 10.1007/s10534-012-9586-y
23. Sokolov A.V., Dubrovskaya N.M., Kostevich V.A. et al. Lactoferrin induces erythropoietin synthesis and rescues cognitive functions in the offspring of rats subjected to prenatal hypoxia // Nutrients. 2022. Vol. 14, No. 7. P. 1399. DOI: 10.3390/nu14071399
24. Suzuki Y.A., Lopez V., Lönnedal B. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function // Cell Mol. Life Sci. 2005. Vol. 62, No. 22. P. 2560–2575. DOI: 10.1007/s00018-005-5371-1
25. Li Y.Q., Guo C. A review on lactoferrin and central nervous system diseases // Cells. 2021. Vol. 10, No. 7. P. 1810. DOI: 10.3390/cells10071810
26. García-Montoya I.A., Cendón T.S., Arévalo-Gallegos S., Rascón-Cruz Q. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview // Biochim. Biophys. Acta. 2012. Vol. 1820, No. 3. P. 226–236. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.06.018
27. Gibbons J.A., Kanwar R.K., Kanwar J.R. Lactoferrin and cancer in different cancer models // Front. Biosci. (Schol Ed). 2011. Vol. 3, No. 3. P. 1080–1088. DOI: 10.2741/212
28. Zhang Y., Lima C.F., Rodrigues L.R. Anticancer effects of lactoferrin: underlying mechanisms and future trends in cancer therapy // Nutr. Rev. 2014. Vol. 72, No. 12. P. 763–773. DOI: 10.1111/nure.12155
29. Iijima H., Tomizawa Y., Iwasaki Y. et al. Genetic and epigenetic inactivation of LTF gene at 3p21.3 in lung cancers // Int. J. Cancer. 2006. Vol. 118, No. 4. P. 797–801. DOI: 10.1002/ijc.21462
30. Mariller C., Hardivillé S., Hoedt E. et al. Delta-lactoferrin, an intracellular lactoferrin isoform that acts as a transcription factor // Biochem. Cell Biol. 2012. Vol. 90, No. 3. P. 307–319. DOI: 10.1139/o11-070
31. Porter C.M., Haffner M.C., Kulac I. et al. Lactoferrin CpG island hypermethylation and decoupling of mRNA and protein expression in the early stages of prostate carcinogenesis // Am. J. Pathol. 2019. Vol. 189, No. 11. P. 2311–2322. DOI: 10.1016/j.ajpath.2019.07.016
32. Zhou Y., Zeng Z., Zhang W. et al. Lactotransferrin: a candidate tumor suppressor-deficient expression in human nasopharyngeal

- carcinoma and inhibition of NPC cell proliferation by modulating the mitogen-activated protein kinase pathway // *Int. J. Cancer*. 2008. Vol. 123, No. 9. P. 2065–2072. DOI: 10.1002/ijc.23727
33. Zalutskii I.V., Lukianova N.Y., Storchai D.M. et al. Influence of exogenous lactoferrin on the oxidant/antioxidant balance and molecular profile of hormone receptor-positive and -negative human breast cancer cells *in vitro* // *Exp. Oncol.* 2017. Vol. 39, No. 2. P. 106–111.
 34. Li H.Y., Li P., Yang H.G. et al. Investigation and comparison of the anti-tumor activities of lactoferrin, α -lactalbumin, and β -lactoglobulin in A549, HT29, HepG2, and MDA231-LM2 tumor models // *J. Dairy Sci.* 2019. Vol. 102, No. 11. P. 9586–9597. DOI: 10.3168/jds.2019-16429
 35. Li H., Yao Q., Min L. et al. The combination of two bioactive constituents, lactoferrin and linolenic acid, inhibits mouse xenograft esophageal tumor growth by downregulating lithocholytaurine and inhibiting the JAK2/STAT3-related pathway // *ACS Omega*. 2020. Vol. 5, No. 33. P. 20755–20764. DOI: 10.1021/acsomega.0c01132
 36. Elizarova A., Sokolov A., Kostevich V. et al. Interaction of lactoferrin with unsaturated fatty acids: *in vitro* and *in vivo* study of human lactoferrin/oleic acid complex cytotoxicity // *Materials (Basel)*. 2021. Vol. 14, No. 7. P. 1602. DOI: 10.3390/ma14071602
 37. Cutone A., Rosa L., Ianiro G. et al. Lactoferrin's anti-cancer properties: safety, selectivity, and wide range of action // *Biomolecules*. 2020. Vol. 10, No. 3. P. 456. DOI: 10.3390/biom10030456
 38. Eliassen L.T., Berge G., Leknessund A. et al. The antimicrobial peptide, lactoferricin B, is cytotoxic to neuroblastoma cells *in vitro* and inhibits xenograft growth *in vivo* // *Int. J. Cancer*. 2006. Vol. 119, No. 3. P. 493–500. DOI: 10.1002/ijc.21886
 39. Arcella A., Oliva M.A., Staffieri S. et al. *In vitro* and *in vivo* effect of human lactoferrin on glioblastoma growth // *J. Neurosurg.* 2015. Vol. 123, No. 4. P. 1026–1035. DOI: 10.3171/2014.12.JNS14512
 40. Verduci E., Banderali G., Barberi S. et al. Epigenetic effects of human breast milk // *Nutrients*. 2014. Vol. 6, No. 4. P. 1711–1724. DOI: 10.3390/nu6041711
 41. Zhang T.N., Liu N. Effect of bovine lactoferricin on DNA methyltransferase 1 levels in Jurkat T-leukemia cells // *J. Dairy Sci.* 2010. Vol. 93, No. 9. P. 3925–3930. DOI: 10.3168/jds.2009-3024
 42. Lebedev D.V., Zabrodskaya Y.A., Pipich V. et al. Effect of α -lactalbumin and lactoferrin oleic acid complexes on chromatin structural organization // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019. Vol. 520, No. 1. P. 136–139. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.09.116
 43. Jögi A., Øra I., Nilsson H. et al. Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. Vol. 99, No. 10. P. 7021–7026. DOI: 10.1073/pnas.102660199
 44. Westerlund I., Shi Y., Toskasa K. et al. Combined epigenetic and differentiation-based treatment inhibits neuroblastoma tumor growth and links HIF2 α to tumor suppression // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. Vol. 114, No. 30. P. e6137–e6146. DOI: 10.1073/pnas.1700655114
 45. Camuzi D., de Amorim Í., Ribeiro Pinto L.F. et al. Regulation is in the air: the relationship between hypoxia and epigenetics in cancer // *Cells*. 2019. Vol. 8, No. 4. P. 300. DOI: 10.3390/cells8040300
 46. D'Anna F., Van Dyck L., Xiong J. et al. DNA methylation repels binding of hypoxia-inducible transcription factors to maintain tumor immunotolerance // *Genome Biol.* 2020. Vol. 21, No. 1. P. 182. DOI: 10.1186/s13059-020-02087-z
 47. Шаруф К.А., Сучкова И.О. Влияние лактоферрина на эпигенетические характеристики клеток млекопитающих разного типа // *Медицинский академический журнал*. 2021. Т. 21. № 1. С. 85–95. DOI: 10.17816/MAJ6410
 48. Лебедев Т.Д., Спиринов П.В., Орлова Н.Н. и др. Сравнительный анализ экспрессии генов-мишеней противоопухолевой терапии, в клеточных линиях нейробластомы // *Молекулярная биология*. 2015. Т. 49, № 6. С. 1048–1051. DOI: 10.7868/S0026898415050225
 49. Harenza J.L., Diamond M.A., Adams R.N. et al. Transcriptomic profiling of 39 commonly-used neuroblastoma cell lines // *Sci. Data*. 2017. Vol. 4. P. 170033. DOI: 10.1038/sdata.2017.33
 50. Ram Kumar R.M., Schor N.F. Methylation of DNA and chromatin as a mechanism of oncogenesis and therapeutic target in neuroblastoma // *Oncotarget*. 2018. Vol. 9, No. 31. P. 22184–22193. DOI: 10.18632/oncotarget.25084
 51. Полянская Г.Г., Сакута Г.А., Еропкин М.Ю. и др. Каталог российской коллекции клеточных культур позвоночных (РККК П) [Электронный ресурс]. Санкт-Петербург, 2018. Режим доступа: https://incras.ru/wp-content/uploads/2022/05/katalog_rccc_v_2018_rus.pdf. Дата обращения 10.02.2022.
 52. Lee J.-M., Anderson P.C., Padgett J.K. et al. Nrf2, not the estrogen receptor, mediates catechol estrogen-induced activation of the antioxidant responsive element // *Biochim. Biophys. Acta*. 2003. Vol. 1629, No. 1–3. P. 92–101. DOI: 10.1016/j.bbexp.2003.08.006
 53. Su C., Rybalchenko N., Schreihöfer D.A. et al. Cell models for the study of sex steroid hormone neurobiology // *J. Steroids Horm. Sci.* 2012. Vol. S2. P. 003. DOI: 10.4172/2157-7536.s2-003
 54. El-Maari O., Walier M., Behne F. et al. Methylation at global LINE-1 repeats in human blood are affected by gender but not by age or natural hormone cycles // *PLoS One*. 2011. Vol. 6, No. 1. P. e16252. DOI: 10.1371/journal.pone.0016252
 55. Hsu C.C., Leu Y.W., Tseng M.J. et al. Functional characterization of Trip10 in cancer cell growth and survival // *J. Biomed. Sci.* 2011. Vol. 18. P. 12. DOI: 10.1186/1423-0127-18-12
 56. Semak I., Budzevich A., Maliushkova E. et al. Development of dairy herd of transgenic goats as biofactory for large-scale production of biologically active recombinant human lactoferrin // *Transgenic Res.* 2019. Vol. 28, No. 5–6. P. 465–478. DOI: 10.1007/s11248-019-00165-y
 57. Митрошина Е.В., Мищенко Т.А., Ведунова М.В. Определение жизнеспособности клеточных культур: учебно-методическое пособие. Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского, 2015.
 58. Suguna S., Nandal D.H., Kamble S. et al. Genomic DNA isolation from human whole blood samples by non-enzymatic salting out method // *Int. J. Pharm. Pharmac. Sci.* 2014. Vol. 6, No. 6. P. 198–199.
 59. zymoresearch.com [Электронный ресурс] 5-mC DNA ELISA Kit. Режим доступа: <https://www.zymoresearch.com/products/5-mc-dna-elisa-kit>. Дата обращения: 04.05.2022.
 60. Suchkova I.O., Sasina L.K., Dergacheva N.I. et al. The influence of low dose bisphenol A on whole genome DNA methylation and chromatin compaction in different human cell lines // *Toxicol in Vitro*. 2019. Vol. 58. P. 26–34. DOI: 10.1016/j.tiv.2019.03.010

61. Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // *Nat. Methods*. 2012. Vol. 9, No. 7. P. 671–675. DOI: 10.1038/nmeth.2089
62. Ling G., Waxman D.J. DNase I digestion of isolated nuclei for genome-wide mapping of DNase hypersensitivity sites in chromatin // *Methods Mol. Biol.* 2013. Vol. 977. P. 21–33. DOI: 10.1007/978-1-62703-284-1_3
63. Lu Q., Richardson B. DNase I hypersensitivity analysis of chromatin structure // *Methods Mol. Biol.* 2004. Vol. 287. P. 77–86. DOI: 10.1385/1-59259-828-5:077
64. Keuser B., Khobta A., Galle K. et al. Influences of histone deacetylase inhibitors and resveratrol on DNA repair and chromatin compaction // *Mutagenesis*. 2013. Vol. 28, No. 5. P. 569–576. DOI: 10.1093/mutage/get034
65. VassarStats. Website for statistical computation [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://vassarstats.net>. Дата обращения: 08.03.2022.
66. Statistics Kingdom [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.statskingdom.com>. Дата обращения: 08.03.2022.
67. VoxPlot online [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.physics.csbsju.edu/stats/bulk.stats.n.plot_NGROUP_form.html. Дата обращения: 15.12.2020.
68. Navendu Vasavada. Online web statistical calculators. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://astatsa.com>. Дата обращения: 05.04.2022.
69. МНК и регрессионный анализ Онлайн [Электронный ресурс] // Математический форум Math Help Planet. Режим доступа: <http://mathhelpplanet.com/static.php?p=onlayn-mnki-regressionniy-analiz>. Дата обращения: 05.04.2022.
70. Уравнение нелинейной регрессии онлайн [Электронный ресурс] // ООУ Новый семестр. Режим доступа: <https://math.semestr.ru/corel/noncorel.php>. Дата обращения: 05.04.2022.
71. Wessa P. Free Statistics Software. Office for Research Development and Education. version 1.2.1 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.wessa.net>. Дата обращения: 05.04.2022.
72. Wessa P. Multivariate Correlation Matrix (v1.0.11) in Free Statistics Software (v1.2.1), Office for Research Development and Education. 2016. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.wessa.net/rwasp_pairs.wasp. Дата обращения: 05.04.2022.
73. Polynomial Regression Calculator [Электронный ресурс] // Stats Blue. Режим доступа: https://stats.blue/Stats_Suite/polynomial_regression_calculator.html. Дата обращения: 13.10.2022.
74. Yanaihara A., Toma Y., Saito H., Yanaihara T. Cell proliferation effect of lactoferrin in human endometrial stroma cells // *Mol. Hum. Reprod.* 2000. Vol. 6, No. 5. P. 469–473. DOI: 10.1093/molehr/6.5.469
75. Lorget F., Clough J., Oliveira M. et al. Lactoferrin reduces *in vitro* osteoclast differentiation and resorbing activity // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. Vol. 296, No. 2. P. 261–266. DOI: 10.1016/S0006-291X(02)00849-5
76. Buccigrossi V., de Marco G., Bruzzese E. et al. Lactoferrin induces concentration-dependent functional modulation of intestinal proliferation and differentiation // *Pediatr. Res.* 2007. Vol. 61, No. 4. P. 410–414. DOI: 10.1203/pdr.0b013e3180332c8d
77. Jiang R., Lopez V., Kelleher S.L., Lönnnerdal B. Apo- and holo-lactoferrin are both internalized by lactoferrin receptor via clathrin-mediated endocytosis but differentially affect ERK-signaling and cell proliferation in Caco-2 cells // *J. Cell Physiol.* 2011. Vol. 226, No. 11. P. 3022–3031. DOI: 10.1002/jcp.2265
78. Бабушкина Н.А., Островская Л.А., Рыкова В.А. и др. Моделирование эффективности действия противоопухолевых препаратов в сверхмалых дозах для оптимизации режимов введения // *Проблемы управления*. 2005. Т. 4. С. 47–54.
79. Генераленко Н.Ю., Крюкова Л.Ю., Пушкин И.А. Эффекты малых и сверхмалых доз биологически активных веществ // *Научные и образовательные проблемы гражданской защиты*. 2010. № 3. С. 6–7.
80. Bellavite P., Ortolani R., Pontarollo F. et al. Immunology and homeopathy. 5. The rationale of the 'Simile' // *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2007. Vol. 4, No. 2. P. 149–163. DOI: 10.1093/ecam/nel117
81. Utsugi T., Schroit A.J., Connor J. et al. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes // *Cancer Res.* 1991. Vol. 51, No. 11. P. 3062–3066.
82. Damiens E., El Yazidi I., Mazurier J. et al. Role of heparan sulphate proteoglycans in the regulation of human lactoferrin binding and activity in the MDA-MB-231 breast cancer cell line // *Eur. J. Cell Biol.* 1998. Vol. 77, No. 4. P. 344–351. DOI: 10.1016/S0171-9335(98)80093-9
83. Antequera F. Structure, function and evolution of CpG island promoters // *Cell Mol. Life Sci.* 2003. Vol. 60, No. 8. P. 1647–1658. DOI: 10.1007/s00018-003-3088-6
84. Lakshminarasimhan R., Liang G. The role of DNA methylation in cancer // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016. Vol. 945. P. 151–172. DOI: 10.1007/978-3-319-43624-1_7
85. Ball M.P., Li J.B., Gao Y. et al. Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells // *Nat. Biotechnol.* 2009. Vol. 27, No. 4. P. 361–368. DOI: 10.1038/nbt.1533
86. Fazzari M.J., Greally J.M. Epigenomics: beyond CpG islands // *Nat. Rev. Genet.* 2004. Vol. 5, No. 6. P. 446–455. DOI: 10.1038/nrg1349
87. Kulis M., Queirós A.C., Beekman R., Martín-Subero J.I. Intragenic DNA methylation in transcriptional regulation, normal differentiation and cancer // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. Vol. 1829, No. 11. P. 1161–1174. DOI: 10.1016/j.bbtagm.2013.08.001
88. Lou S., Lee H.M., Qin H. et al. Whole-genome bisulfite sequencing of multiple individuals reveals complementary roles of promoter and gene body methylation in transcriptional regulation // *Genome Biol.* 2014. Vol. 15, No. 7. P. 408. DOI: 10.1186/s13059-014-0408-0
89. Nagarajan R.P., Zhang B., Bell R.J. et al. Recurrent epimutations activate gene body promoters in primary glioblastoma // *Genome Res.* 2014. Vol. 24, No. 5. P. 761–774. DOI: 10.1101/gr.164707.113
90. Gurova K.V. Chromatin stability as a target for cancer treatment // *Bioessays*. 2019. Vol. 41, No. 1. P. e1800141. DOI: 10.1002/bies.201800141
91. Furmanski P., Li Z.P., Fortuna M.B. et al. Multiple molecular forms of human lactoferrin. Identification of a class of lactoferrins that possess ribonuclease activity and lack iron-binding capacity // *J. Exp. Med.* 1989. Vol. 170, No. 2. P. 415–429. DOI: 10.1084/jem.170.2.415
92. Talks K.L., Turley H., Gatter K.C. et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha

- pha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages // *Am. J. Pathol.* 2000. Vol. 157, No. 2. P. 411–421. DOI: 10.1016/s0002-9440(10)64554-3
93. Zhong H., De Marzo A.M., Laughner E. et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases // *Cancer Res.* 1999. Vol. 59, No. 22. P. 5830–5835.
 94. Kostevich V.A., Sokolov A.V., Kozlov S.O. et al. Functional link between ferroxidase activity of ceruloplasmin and protective effect of apo-lactoferrin: studying rats kept on a silver chloride diet // *Biomaterials.* 2016. Vol. 29, No. 4. P. 691–704. DOI: 10.1007/s10534-016-9944-2
 95. Ibuki M., Shoda C., Miwa Y. et al. Lactoferrin has a therapeutic effect // *Front. Pharmacol.* 2020. Vol. 11. P. 174. DOI: 10.3389/fphar.2020.00174
- ## References
1. Stroganova AM, Karseladze AI. Neuroblastoma: morphological pattern, molecular genetic features, and prognostic factors. *Advances in Molecular Oncology.* 2016;3(1):32–43. (In Russ.) DOI: 10.17650/2313-805X.2016.3.1.32–43
 2. Gómez S, Castellano G, Mayol G, et al. DNA methylation fingerprint of neuroblastoma reveals new biological and clinical insights. *Genome Data.* 2015;5:360–363. DOI: 10.1016/j.gdata.2015.07.016
 3. Campos Cogo S, Gradowski Farias da Costa do Nascimento T, de Almeida Brehm Pinhatti F, et al. An overview of neuroblastoma cell lineage phenotypes and *in vitro* models. *Exp Biol Med (Maywood).* 2020;245(18):1637–1647. DOI: 10.1177/1535370220949237
 4. Fetahu IS, Taschner-Mandl S. Neuroblastoma and the epigenome. *Cancer Metastasis Rev.* 2021;40(1):173–189. DOI: 10.1007/s10555-020-09946-y
 5. Yang Q, Tian Y, Ostler KR, et al. Epigenetic alterations differ in phenotypically distinct human neuroblastoma cell lines. *BMC Cancer.* 2010;10:286. DOI: 10.1186/1471-2407-10-286
 6. Jubierre L, Jiménez C, Rovira E, et al. Targeting of epigenetic regulators in neuroblastoma. *Exp Mol Med.* 2018;50(4):1–12. DOI: 10.1038/s12276-018-0077-2
 7. Upton K, Modi A, Patel K, et al. Epigenomic profiling of neuroblastoma cell lines. *Sci Data.* 2020;7(1):116. DOI: 10.1038/s41597-020-0458-y
 8. Yáñez Y, Grau E, Rodríguez-Cortez VC, et al. Two independent epigenetic biomarkers predict survival in neuroblastoma. *Clin Epigenetics.* 2015;7(1):16. DOI: 10.1186/s13148-015-0054-8
 9. Olsson M, Beck S, Kogner P, et al. Genome-wide methylation profiling identifies novel methylated genes in neuroblastoma tumors. *Epigenetics.* 2016;11(1):74–84. DOI: 10.1080/15592294.2016.1138195
 10. Kiss NB, Kogner P, Johnsen JI, et al. Quantitative global and gene-specific promoter methylation in relation to biological properties of neuroblastomas. *BMC Med Genet.* 2012;13:83. DOI: 10.1186/1471-2350-13-83
 11. Gómez S, Castellano G, Mayol G, et al. DNA methylation fingerprint of neuroblastoma reveals new biological and clinical insights. *Epigenomics.* 2015;7(7):1137–1153. DOI: 10.2217/epi.15.49
 12. Muotri AR, Marchetto MC, Coufal NG, et al. L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. *Nature.* 2010;468(7322):443–446. DOI: 10.1038/nature09544
 13. Giorgi G, Marcantonio P, Del Re B. LINE-1 retrotransposition in human neuroblastoma cells is affected by oxidative stress. *Cell Tissue Res.* 2011;346(3):383–391. DOI: 10.1007/s00441-011-1289-0
 14. Jönsson ME, Ludvik Brattås P, Gustafsson C, et al. Activation of neuronal genes via LINE-1 elements upon global DNA demethylation in human neural progenitors. *Nat Commun.* 2019;10(1):3182. DOI: 10.1038/s41467-019-11150-8
 15. Dyachenko OV, Schevchuk TV, Kretzner L, et al. Human non-CG methylation: are human stem cells plant-like? *Epigenetics.* 2010;5(7):569–572. DOI: 10.4161/epi.5.7.12702
 16. Whongsiri P, Pimratana C, Wijitsettakul U, et al. Oxidative stress and LINE-1 reactivation in bladder cancer are epigenetically linked through active chromatin formation. *Free Radic Biol Med.* 2019;134:419–428. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.031
 17. Ak T, Gülçin I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact.* 2008;174(1):27–37. DOI: 10.1016/j.cbi.2008.05.003
 18. Zhai K, Brockmüller A, Kubatka P, et al. Curcumin's beneficial effects on neuroblastoma: mechanisms, challenges, and potential solutions. *Biomolecules.* 2020;10(11):1469. DOI: 10.3390/biom10111469
 19. Borzenkova NV, Balabushevich NG, Larionova NI. Lactoferrin: physical and chemical properties, biological functions, delivery systems, pharmaceutical and nutraceutical preparations (review). *Biopharmaceutical Journal.* 2010;2(3):3–19. (In Russ.)
 20. Hao L, Shan Q, Wei J, et al. Lactoferrin: Major physiological functions and applications. *Curr Protein Pept Sci.* 2019;20(2):139–144. DOI: 10.2174/1389203719666180514150921
 21. Aleshina G.M. Lactoferrin — an endogenous regulator of the protective functions of the organism. *Medical Academic Journal.* 2019;19(1):35–44. (In Russ.) DOI: 10.17816/MAJ19135-44
 22. Zakhharova ET, Kostevich VA, Sokolov AV, Vasilyev VB. Human apo-lactoferrin as a physiological mimetic of hypoxia stabilizes hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Biomaterials.* 2012;25(6):1247–1259. DOI: 10.1007/s10534-012-9586-y
 23. Sokolov AV, Dubrovskaya NM, Kostevich VA, et al. Lactoferrin induces erythropoietins and rescues cognitive functions in the offspring of rats subjected to prenatal hypoxia. *Nutrients.* 2022;14(7):1399. DOI: 10.3390/nu14071399
 24. Suzuki YA, Lopez V, Lönnerdal B. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(22):2560–2575. DOI: 10.1007/s00018-005-5371-1
 25. Li YQ, Guo C. A review on lactoferrin and central system diseases. *Cells.* 2021;10(7):1810. DOI: 10.3390/cells10071810
 26. García-Montoya IA, Cendón TS, Arévalo-Gallegos S, et al. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820(3):226–236. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.06.018
 27. Gibbons JA, Kanwar RK, Kanwar JR. Lactoferrin and cancer in different cancer models. *Front Biosci (Schol Ed).* 2011;3(3):1080–1088. DOI: 10.2741/212
 28. Zhang Y, Lima CF, Rodrigues LR. Anticancer effects of lactoferrin: underlying mechanisms and future trends in cancer therapy. *Nutr Rev.* 2014;72(12):763–773. DOI: 10.1111/nure.12155
 29. Iijima H, Tomizawa Y, Iwasaki Y, et al. Genetic and epigenetic inactivation of *LTF* gene at 3p21.3 in lung cancers. *Int J Cancer.* 2006;118(4):797–801. DOI: 10.1002/ijc.21462
 30. Mariller C, Hardivillé S, Hoedt E, et al. Delta-lactoferrin, an intracellular lactoferrin isoform that acts as a transcription factor. *Biochem Cell Biol.* 2012;90(3):307–319. DOI: 10.1139/o11-070

31. Porter CM, Haffner MC, Kulac I, et al. Lactoferrin CpG island hypermethylation and decoupling of mRNA and protein expression in the early stages of prostate carcinogenesis. *Am J Pathol.* 2019;189(11):2311–2322. DOI: 10.1016/j.ajpath.2019.07.016
32. Zhou Y, Zeng Z, Zhang W, et al. Lactotransferrin: a candidate tumor suppressor—Deficient expression in human nasopharyngeal carcinoma and inhibition of NPC cell proliferation by modulating the mitogen-activated protein kinase pathway. *Int J Cancer.* 2008;123(9):2065–2072. DOI: 10.1002/ijc.23727
33. Zalutskii IV, Lukianova NY, Storchai DM, et al. Influence of exogenous lactoferrin on the oxidant/antioxidant balance and molecular profile of hormone receptor-positive and -negative human breast cancer cells *in vitro*. *Exp Oncol.* 2017;39(2):106–111.
34. Li HY, Li P, Yang HG, et al. Investigation and comparison of the anti-tumor activities of lactoferrin, α -lactalbumin, and β -lactoglobulin in A549, HT29, HepG2, and MDA231-LM2 tumor models. *J Dairy Sci.* 2019;102(11):9586–9597. DOI: 10.3168/jds.2019-16429
35. Li H, Yao Q, Min L, et al. The Combination of two bioactive constituents, lactoferrin and linolenic acid, inhibits mouse xenograft esophageal tumor growth by downregulating lithocholytaurine and inhibiting the JAK2/STAT3-related pathway. *ACS Omega.* 2020;5(33):20755–20764. DOI: 10.1021/acsomega.0c01132
36. Elizarova A, Sokolov A, Kostevich V, et al. Interaction of lactoferrin with unsaturated fatty acids: *In vitro* and *in vivo* study of human lactoferrin/oleic acid complex cytotoxicity. *Materials (Basel).* 2021;14(7):1602. DOI: 10.3390/ma14071602
37. Cutone A, Rosa L, Ianiro G, et al. Lactoferrin's anti-cancer properties: safety, selectivity, and wide range of action. *Biomolecules.* 2020;10(3):456. DOI: 10.3390/biom10030456
38. Eliassen LT, Berge G, Leknessund A, et al. The antimicrobial peptide, lactoferricin B, is cytotoxic to neuroblastoma cells *in vitro* and inhibits xenograft growth *in vivo*. *Int J Cancer.* 2006;119(3):493–500. DOI: 10.1002/ijc.21886
39. Arcella A, Oliva MA, Staffieri S, et al. *In vitro* and *in vivo* effect of human lactoferrin on glioblastoma growth. *J Neurosurg.* 2015;123(4):1026–1035. DOI: 10.3171/2014.12.JNS14512
40. Verduci E, Banderali G, Barberi S, et al. Epigenetic effects of human breast milk. *Nutrients.* 2014;6(4):1711–1724. DOI: 10.3390/nu6041711
41. Zhang TN, Liu N. Effect of bovine lactoferricin on DNA methyltransferase 1 levels in Jurkat T-leukemia cells. *J Dairy Sci.* 2010;93(9):3925–3930. DOI: 10.3168/jds.2009-3024
42. Lebedev DV, Zabrodskaya YA, Pipich V, et al. Effect of alpha-lactalbumin and lactoferrin oleic acid complexes on chromatin structural organization. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;520(1):136–139. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.09.116
43. Jögi A, Øra I, Nilsson H, et al. Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(10):7021–7026. DOI: 10.1073/pnas.102660199
44. Westerlund I, Shi Y, Toskasa K, et al. Combined epigenetic and differentiation-based treatment inhibits neuroblastoma tumor growth and links HIF2 α to tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017;114(30):E6137–E6146. DOI: 10.1073/pnas.1700655114
45. Camuzi D, de Amorim Í, Ribeiro Pinto LF, et al. Regulation in the air: the relationship between hypoxia and epigenetics in cancer. *Cells.* 2019;8(4):300. DOI: 10.3390/cells8040300
46. D'Anna F, Van Dyck L, Xiong J, et al. DNA methylation repels binding of hypoxia-inducible transcription factors to maintain tumor immunotolerance. *Genome Biol.* 2020;21(1):182. DOI: 10.1186/s13059-020-02087-z
47. Sharrouf KA, Suchkova IO. The influence of lactoferrin on the epigenetic characteristics of mammalian cells of different types. *Medical Academic Journal.* 2021;21(1):85–95. DOI: 10.17816/MAJ64106
48. Lebedev TD, Spirin PV, Orlova NN, et al. Comparative analysis of gene expression: Targeted antitumor therapy in neuroblastoma cell lines. *Mol Biol (Mosk).* 2015;49(6):1048–1051. (In Russ.) DOI: 10.1134/S0026893315050225
49. Harenza JL, Diamond MA, Adams RN, et al. Transcriptomic profiling of 39 commonly-used neuroblastoma cell lines. *Sci Data.* 2017;4:170033. DOI: 10.1038/sdata.2017.33
50. Ram Kumar RM, Schor NF. Methylation of DNA and chromatin as a mechanism of oncogenesis and therapeutic target in neuroblastoma. *Oncotarget.* 2018;9(31):22184–22193. DOI: 10.18632/oncotarget.25084
51. Polyanskaya GG, Sakuta GA, Yeropkin MY, et al. Katalog rossiy-skoy kolleksii kletochnykh kul'tur pozvonochnykh (RKKK P). Saint Petersburg; 2018. [Internet]. Available from: https://incras.ru/wp-content/uploads/2022/05/katalog_rccc_v_2018_rus.pdf. Accessed: Feb 10, 2022. (In Russ.)
52. Lee J-M, Anderson PC, Padgitt JK, et al. Nrf2, not the estrogen receptor, mediates catechol estrogen-induced activation of the antioxidant responsive element. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1629(1–3):92–101. DOI: 10.1016/j.bb-exp.2003.08.006
53. Su C, Rybalchenko N, Schreihofer DA, et al. Cell models for the study of sex steroid hormone Neurobiology. *J Steroids Horm Sci.* 2012;S2:003. DOI: 10.4172/2157-7536.s2-003
54. El-Maari O, Walier M, Behne F, et al. Methylation at global LINE-1 repeats in human blood are affected by gender but not by age or natural hormone cycles. *PLoS One.* 2011;6(1):e16252. DOI: 10.1371/journal.pone.0016252
55. Hsu CC, Leu YW, Tseng MJ, et al. Functional characterization of Trip10 in cancer cell growth and survival. *J Biomed Sci.* 2011;18:12. DOI: 10.1186/1423-0127-18-12
56. Semak I, Budzevich A, Maliushkova E, et al. Development of dairy herd of transgenic goats as biofactory for large-scale production of biologically active recombinant human lactoferrin. *Transgenic Res.* 2019;28(5–6):465–478. DOI: 10.1007/s11248-019-00165-y
57. Mitroshina EV, Mishchenko TA, Vedunova MV. Opredeleeniye zhiznesposobnosti kletochnykh kul'tur: uchebno-metodicheskoye posobiye. Nizhniy Novgorod: Nizhegorodskiy gosuniversitet im. N.I. Lobachevskogo; 2015. (In Russ.)
58. Suguna S, Nandal DH, Kamble S, et al. Genomic DNA isolation from human whole blood samples by non-enzymatic salting out method. *Int J Pharm Pharmac Sci.* 2014;6(6):198–199.
59. zymoresearch.com [Internet]. 5-mC DNA ELISA Kit. Available from: <https://www.zymoresearch.com/products/5-mc-dna-elisa-kit>. Accessed: Apr 05, 2022.
60. Suchkova IO, Sasina LK, Dergacheva NI, et al. The influence of low dose bisphenol A on whole genome DNA methylation and chromatin compaction in different human cell lines. *Toxicol In Vitro.* 2019;58:26–34. DOI: 10.1016/j.tiv.2019.03.010

61. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671–675. DOI: 10.1038/nmeth.2089
62. Ling G, Waxman DJ. DNase I digestion of isolated nuclei for genome-wide mapping of DNase hypersensitivity sites in chromatin. *Methods Mol Biol*. 2013;977:21–33. DOI: 10.1007/978-1-62703-284-1_3
63. Lu Q, Richardson B. DNaseI hypersensitivity analysis of chromatin structure. *Methods Mol Biol*. 2004;287:77–86. DOI: 10.1385/1-59259-828-5-077
64. Keuser B, Khobta A, Galle K, et al. Influences of histone deacetylase inhibitors and resveratrol on DNA repair and chromatin compaction. *Mutagenesis*. 2013;28(5):569–576. DOI: 10.1093/mutage/get034
65. VassarStats: Website for statistical computation [Internet]. Available from: <http://vassarstats.net>. Accessed: March 8, 2022.
66. Statistics Kingdom [Internet]. Available from: <http://www.statskingdom.com>. Accessed: March 8, 2022.
67. BoxPlot online [Internet]. Available from: http://www.physics.cs-bsju.edu/stats/bulk.stats.n.plot_NGROUP_form.html. Accessed: Dec 15, 2020.
68. Navendu Vasavada. Online web statistical calculators [Internet]. Available from: <http://astatsa.com>. Accessed: Apr 05, 2022.
69. MNK i regressionnyi analiz Onlain [Internet]. *Matematicheskii forum Math Help Planet*. Available from: <http://mathhelpplanet.com/static.php?p=onlayn-mnk-i-regressionniy-analiz>. Accessed: Apr 05, 2022. (In Russ.)
70. Uravnenie nelineinoi regressii onlain [Internet]. *000 Novyi semestr*. Available from: <https://math.semestr.ru/corel/noncorel.php>. Accessed: Apr 05, 2022. (In Russ.)
71. Wessa P. Free Statistics Software. Office for Research Development and Education. version 1.2.1 [Internet]. Available from: <https://www.wessa.net>. Accessed: Apr 05, 2022.
72. Wessa P. Multivariate Correlation Matrix (v1.0.11) in Free Statistics Software (v1.2.1), Office for Research Development and Education. 2016 [Internet]. Available from: https://www.wessa.net/rwasp_pairs.wasp. Accessed: Apr 05, 2022.
73. Polynomial Regression Calculator [Internet]. *Stats Blue*. Available from: https://stats.blue/Stats_Suite/polynomial_regression_calculator.html. Accessed: Oct 13, 2022.
74. Yanaihara A, Toma Y, Saito H, et al. Cell proliferation effect of lactoferrin in human endometrial stroma cells. *Mol Hum Reprod*. 2000;6(5):469–473. DOI: 10.1093/molehr/6.5.469
75. Lorget F, Clough J, Oliveira M, et al. Lactoferrin reduces *in vitro* osteoclast differentiation and resorbing activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;296(2):261–266. DOI: 10.1016/S0006-291X(02)00849-5
76. Buccigrossi V, de Marco G, Bruzzese E, et al. Lactoferrin induces concentration-dependent functional modulation of intestinal proliferation and differentiation. *Pediatr Res*. 2007;61(4):410–414. DOI: 10.1203/pdr.0b013e3180332c8d
77. Jiang R, Lopez V, Kelleher SL, et al. Apo- and holo-lactoferrin are both internalized by lactoferrin receptor via clathrin-mediated endocytosis but differentially affect ERK-signaling and cell proliferation in Caco-2 cells. *J Cell Physiol*. 2011;226(11):3022–3031. DOI: 10.1002/jcp.22650
78. Babushkina NA, Ostrovskaya LA, Rykova VA, et al. Modelirovaniye effektivnosti deystviya protivopukhkovykh preparatov v sverkhmalykh dozakh dlya optimizatsii rezhimov vvedeniya. *Control Sciences*. 2005;4:47–54. (In Russ.)
79. Generalenko NYu, Kryukova LYu, Pushkin IA. Effects of small and micro doses biologically active substances. *Nauchnyye i obrazovatel'nyye problemy grazhdanskoy zashchity*. 2010;3:6–7. (In Russ.)
80. Bellavite P, Ortolani R, Pontarollo F, et al. Immunology and homeopathy. 5. The rationale of the 'Simile'. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2007;4(2):149–163. DOI: 10.1093/ecam/nel117
81. Utsugi T, Schroit AJ, Connor J, et al. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer Res*. 1991;51(11):3062–3066.
82. Damiens E, El Yazidi I, Mazurier J, et al. Role of heparan sulphate proteoglycans in the regulation of human lactoferrin binding and activity in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. *Eur J Cell Biol*. 1998;77(4):344–351. DOI: 10.1016/S0171-9335(98)80093-9
83. Antequera F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60(8):1647–1658. DOI: 10.1007/s00018-003-3088-6
84. Lakshminarasimhan R, Liang G. The role of DNA methylation in cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2016;945:151–172. DOI: 10.1007/978-3-319-43624-1_7
85. Ball MP, Li JB, Gao Y, et al. Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nat Biotechnol*. 2009;27(4):361–368. DOI: 10.1038/nbt.1533
86. Fazzari MJ, Grealley JM. Epigenomics: beyond CpG islands. *Nat Rev Genet*. 2004;5(6):446–455. DOI: 10.1038/nrg1349
87. Kulis M, Queirós AC, Beekman R, et al. Intragenic DNA methylation in transcriptional regulation, normal differentiation and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1829(11):1161–1174. DOI: 10.1016/j.bbagr.2013.08.001
88. Lou S, Lee HM, Qin H, et al. Whole-genome bisulfite sequencing of multiple individuals reveals complementary roles of promoter and gene body methylation in transcriptional regulation. *Genome Biol*. 2014;15(7):408. DOI: 10.1186/s13059-014-0408-0
89. Nagarajan RP, Zhang B, Bell RJ, et al. Recurrent epimutations activate gene body promoters in primary glioblastoma. *Genome Res*. 2014;24(5):761–774. DOI: 10.1101/gr.164707.113
90. Gurova KV. Chromatin stability as a target for cancer treatment. *Bioessays*. 2019;41(1):e1800141. DOI: 10.1002/bies.201800141
91. Furmanski P, Li ZP, Fortuna MB, et al. Multiple molecular forms of human lactoferrin. Identification of a class of lactoferrins that possess ribonuclease activity and lack iron-binding capacity. *J Exp Med*. 1989;170(2):415–429. DOI: 10.1084/jem.170.2.415
92. Talks KL, Turley H, Gatter KC, et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol*. 2000;157(2):411–421. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64554-3
93. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res*. 1999;59(22):5830–5835.
94. Kostevich VA, Sokolov AV, Kozlov SO, et al. Functional link between ferroxidase activity of ceruloplasmin and protective effect of apo-lactoferrin: studying rats kept on a silver chloride diet. *Biomaterials*. 2016;29(4):691–704. DOI: 10.1007/s10534-016-9944-2
95. Ibuki M, Shoda C, Miwa Y, et al. Lactoferrin has a therapeutic effect. *Front Pharmacol*. 2020;11:174. DOI: 10.3389/fphar.2020.00174

Информация об авторах / Information about the authors

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
 Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

Ирина Олеговна Сучкова — канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной цитогенетики развития млекопитающих отдела молекулярной генетики.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2127-0459>;
 ResearcherID: H-4484-2014;
 Scopus Author ID: 6602838276;
 eLibrary SPIN: 4155-7314; e-mail: irsuchkova@mail.ru

Кинда Али Шарруф — магистр биологии, аспирант лаборатории молекулярной цитогенетики развития млекопитающих отдела молекулярной генетики.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0926-0549>;
 e-mail: kinda996@yahoo.com

Людмила Константиновна Сасина — канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной цитогенетики развития млекопитающих отдела молекулярной генетики.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5848-5544>;
 ResearcherID: J-8619-2018;
 Scopus Author ID: 6602092195;
 eLibrary SPIN: 6374-1649;
 e-mail: sassinal@googlegmail.com

Наталья Игоревна Дергачева — магистр биологии, научный сотрудник лаборатории молекулярной цитогенетики развития млекопитающих отдела молекулярной генетики.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1643-9558>;
 ResearcherID: J-8543-2018;
 Scopus Author ID: 57198516110;
 eLibrary SPIN: 3343-2970; e-mail: natalia-9999@mail.ru

Татьяна Валерьевна Баранова — канд. биол. наук, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной цитогенетики развития млекопитающих отдела молекулярной генетики.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8269-8881>;
 Scopus Author ID: 57205972796;
 eLibrary SPIN: 1356-1402; e-mail: tanjabaranova@mail.ru

Евгений Львович Паткин — д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной цитогенетики развития млекопитающих отдела молекулярной генетики.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6292-4167>;
 ResearcherID: J-7779-2013;
 Scopus Author ID: 7003713993;
 eLibrary SPIN: 4929-4630; e-mail: elp44@mail.ru

Irina O. Suchkova — Cand. Sci. (Biol.), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular cytogenetics of mammalian development, Department of Molecular genetics.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2127-0459>;
 ResearcherID: H-4484-2014;
 Scopus Author ID: 6602838276;
 eLibrary SPIN: 4155-7314; e-mail: irsuchkova@mail.ru

Kinda Ali Sharrouf — Master of Biology, PhD student, Laboratory of Molecular cytogenetics of mammalian development, Department of Molecular genetics.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0926-0549>;
 e-mail: kinda996@yahoo.com

Liudmila K. Sasina — Cand. Sci. (Biol.), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Cytogenetics of Mammalian Development, Department of Molecular Genetics.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5848-5544>;
 ResearcherID: J-8619-2018;
 Scopus Author ID: 6602092195;
 eLibrary SPIN: 6374-1649;
 e-mail: sassinal@googlegmail.com

Natalia I. Dergacheva — Master of Biology, Research Associate, Laboratory of Molecular Cytogenetics of Mammalian Development, Department of Molecular Genetics.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1643-9558>;
 ResearcherID: J-8543-2018;
 Scopus Author ID: 57198516110;
 eLibrary SPIN: 3343-2970; e-mail: natalia-9999@mail.ru

Tatyana V. Baranova — Cand. Sci. (Biol.), Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Cytogenetics of Mammalian Development, Department of Molecular Genetics.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8269-8881>;
 Scopus Author ID: 57205972796;
 eLibrary SPIN: 1356-1402; e-mail: tanjabaranova@mail.ru

Eugene L. Patkin — Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head of Laboratory of Molecular Cytogenetics of Mammalian Development, Department of Molecular Genetics.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6292-4167>;
 ResearcherID: J-7779-2013;
 Scopus Author ID: 7003713993;
 eLibrary SPIN: 4929-4630; e-mail: elp44@mail.ru

✉ Контактное лицо / Corresponding author

Ирина Олеговна Сучкова / Irina O. Suchkova
 Адрес: Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12
 Address: 12 Academician Pavlov St., Saint Petersburg, 197022, Russia
 E-mail: irsuchkova@mail.ru