

УДК 616.24-006.6-08:615.849.11] – 092.4

**ВЛИЯНИЕ ВИХРЕВОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ
НА КЛЕТКИ РАКА ЛЁГКОГО IN VITRO****Порханов В.А., Бахмутский Н.Г., Бодня В.Н., Поляков И.С.**
*ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет»,
Краснодар, e-mail: corpus@ksma.ru*

В статье приводятся оригинальные данные по изучению влияния вихревого магнитного поля, генерируемого установкой «Магнитотурботрон», на клетки рака лёгкого, культивируемые в диффузионных камерах. Установлено, что вихревое магнитное поле снижает сфероидообразование клетками рака лёгкого. Кроме того, при воздействии магнитного поля ингибируется пролиферативная активность опухолевых клеток, митотический индекс снижается, в культуре клеток преобладают патологические митозы над нормальными, а среди фаз митозов увеличивается число метафаз. В спектре патологических митозов преобладают такие формы, как рассеивание хромосом и их фрагментов в метафазе, многополюсные митозы, комковатая метафаза, асимметричные митозы. Отмечено, что на фоне ингибиции пролиферативной активности индуцируется апоптоз в клетках рака лёгкого.

Ключевые слова: вихревое магнитное поле, рак лёгкого, диффузионные камеры, митозы, апоптоз

**INFLUENCE OF THE VORTICAL MAGNETIC FIELD ON CELLS
OF THE LUNG CANCER IN VITRO****Porkhanov V.A., Bakhmutsky N.G., Bodnja V.N., Polyakov I.S.**
Kuban state medical university, Krasnodar, e-mail: corpus@ksma.ru

In article cited original influences of the vortical magnetic field generated by installation «Magnitoturbotron» on cells of a lung cancer, cultivated in diffusion chambers given on studying. It is established, that the vortical magnetic field reduces processes of spheroid formation by cells of a lung cancer. Besides at influence of a magnetic field inhibits proliferative activity of tumoral cells, the mitotic index is reduced, in culture of cells prevail pathological mitoses above normal, and among phases of mitoses increases the number of metaphases. In a spectrum pathological mitoses such forms, as dispersion of chromosomes and their fragments in a metaphase, multipolar mitoses, a lumpy metaphase, asymmetric mitoses prevail. It is marked, that on a background of inhibition of proliferative activity it is induced apoptosis in cells of a lung cancer.

Keywords: a vortical magnetic field, a lung cancer, diffusion chambers, mitoses, apoptosis

В Кубанском государственном университете в течение многих лет ведётся работа по изучению возможностей использования вихревого магнитного поля (ВМП) для лечения злокачественных опухолей. Здесь же были созданы уникальные установки, генерирующие ВМП – «Магнитотурботрон» и «Магус-1600». ВМП отличается от других видов магнитного поля тем, что воздействие осуществляется на весь организм больного вращающимся, модулированным по амплитуде магнитным полем [2].

Было установлено, что ВМП обладает противоопухолевой активностью в эксперименте. Проведенные исследования влияния ВМП на довольно широком спектре опухолевых моделей (РС-1, W-256, ЛИО-1, LL, L-1210, P-388) зарегистрировали высокий противоопухолевый эффект. В клинических исследованиях также подтверждено противоопухолевое действие ВМП [3].

Единой гипотезы о механизмах влияния как магнитных полей вообще, так и ВМП, в частности, на опухоль пока не существует. Многочисленные исследования позволили выдвинуть ряд теорий и гипотез о возможных механизмах и особенностях действия магнитных полей на живой организм, но ни

одна из них до настоящего времени не является строго доказанной и общепринятой.

Целью исследования явилось изучение возможных механизмов противоопухолевого влияния ВМП на клеточном уровне, используя культуры клеток РЛ, культивируемые в ДК. Основной задачей исследования была оценка влияния ВМП на пролиферативную активность опухолевых клеток, апоптоз.

Материал и методы исследования

Изучение влияния ВМП на опухолевые клетки РЛ провели на крысах-самках линии Wistar. В эксперименте использовали 10 животных, возрастом 16–17 недель, весом 210 ± 50 г при их равном числе в контрольной и опытной группах.

Культивирование клеток РЛ в эксперименте провели суспензией клеток, используя диффузионные камеры (ДК) [6, 8, 9]. Все работы с опухолевой тканью проводили в стерильных условиях в ближайшие 3–4 часа после выделения фрагментов опухоли из операционного материала. Морфологической формой РЛ во всех экспериментах был немелкоклеточный рак лёгкого (НМРЛ).

Участки опухоли РЛ, полученные из операционного материала больных, очищали от некроза, рассекали стерильными глазными ножницами на более мелкие фрагменты, диаметром 0,2–0,3 мм, в стерильной чашке Петри, содержащей физиологический рас-

твор с добавлением 10000 ед./мл пенициллина. Затем эти кусочки повторно измельчали с помощью стерильного гомогенизатора и инкубировали при +37°C в забуференном солевом растворе (рН – 7,2), содержащем 4 мг коллагеназы, 20 мг трипсина и 10 мг ДНК-азы на 20 мл инкубационной среды 199, при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Такая процедура повторялась 5-кратно по 15–20 минут. После окончания каждого цикла ферментативной обработки получали порции клеток, которые в дальнейшем объединяли. Действие ферментов инкубировали добавлением солевого раствора, содержащего 10% человеческой сыворотки, инактивированной нагреванием. Выделенные клетки отмывали трёхкратно центрифугированием при 456g в культуральной среде 199 и затем подсчитывали.

Подсчет концентрации клеток клеточной суспензии и их жизнеспособности осуществляли в камере Горяева после добавления раствора суправитального красителя, представляющего собой приготовленную ex tempore смесь 4 частей 0,2%-го р-ра трипанового синего и 1 части 4,25%-го раствора NaCl.

Для изготовления ДК применяли мембранные фильтры «Миллипор» (производство США) с диаметром пор 0,22 мкм. Фильтры монтировали на кольцах из тефлона большого и малого диаметра с наружными диаметрами соответственно 18 и 14 мм и шириной колец 2 мм при высоте 2 мм, пользуясь клеем БФ-6.

Клеточную суспензию, содержащую 10⁶ опухолевых клеток в объеме до 0,1 мл, наносили с помощью микродозатора на большой фильтр. После этого монтировали собственно камеры и помещали их в стерильные чашки Петри, содержащие среду 199 комнатной температуры, где они находились до момента имплантации животному – реципиенту.

Под гексеналовым наркозом (100 мг/кг массы животного, внутривенно) осуществляли имплантацию камер в асептических условиях. После обработки операционного поля 5%-м спиртовым раствором йода проводили срединную лапаротомию (длина разреза 2–2,5 см). В брюшную полость крысы имплантировали до 5 ДК. Их располагали на петлях кишечника. Брюшную полость ушивали послойно двухрядным непрерывным швом наглухо.

Через сутки после введения ДК животных подвергали воздействию ВМП, генерируемого установкой «Магнитотурботрон-2», продолжительность воздействия составляла 10 суток.

Для воздействия магнитное поле в эксперименте имело следующие параметры: индукция при максимальном значении – 3 мТ, частота вращения – 6000 об./мин, длительность периода изменения индукции от нуля до максимума и обратно до нуля (1 цикл) = 120 с. Продолжительность сеанса составляла 180 мин (90 циклов).

На 11 сутки эксперимента животных забивали под эфирным наркозом, извлекали ДК, очищали их наружную поверхность от перитонеальных клеток. Опухолевые клетки после демонтажа ДК вместе с подлежащим фильтром фиксировали в спирт – формоле в течение 20 мин, окрашивали в течение 15 мин гематоксилином Караччи, проводили через спирт возрастающей концентрации (60, 70, 80, 96, 100° по 5 мин) просветляли в ксилоле и заключали в канадский бальзам, получая тотальные цитологические препараты.

Для оценки пролиферативной активности опухолевых клеток РЛ использовали такие критерии, как

индекс эффективности сфероидообразования (ИЭС) и митотический индекс (МИ).

Расчет ИЭС, выраженного в процентах, осуществляли по формуле

$$\text{ИЭС} = \frac{A - B}{A},$$

где *A* – среднее количество сфероидов в контрольной группе, *B* – среднее количество сфероидов в опытной группе. Положительные значения ИЭС соответствуют ингибции формирования сфероидов, т.е. проявлению противоопухолевого действия, отрицательные значения индекса свидетельствуют об ускорении роста опухоли.

МИ определяли путем подсчета числа делящихся клеток в 30 случайно выбранных полях зрения при 4000-кратном увеличении к общему числу проанализированных клеток и выражали в процентах.

Было подсчитано также общее число митозов, из которых были выделены в процентном соотношении нормальные и патологические. В нормальных митозах различали 4 фазы (профазу, метафазу, телофазу, анафазу). Патологические митозы были разбиты по спектру в соответствии с классификациями, описанными в ряде монографий [1, 4].

Клетки с признаками апоптоза определяли визуально под микроскопом. Подсчитывали среднее количество клеток, имеющих признаки апоптоза в 30 случайно выбранных полях зрения при 400-кратном увеличении. Апоптозный индекс (АИ) рассчитывали по формуле:

$$\text{АИ} = \frac{\text{количество апоптозных клеток}}{\text{общее количество клеток}} \cdot 100\%.$$

Результаты исследования и их обсуждение

На 11 сутки культивирования в контроле на поверхности миллипоровых фильтров ДК было отмечено формирование многослойных колониеподобных структур – сфероидов, состоящих из округлых или удлинённых клеток, ориентированных по спирали вокруг центра такого образования. Границы этих организованных клеточных скоплений обычно были четко очерчены. Между ними располагались относительно немногочисленные изолированные эпителиоциты в монослое и единичные фибробласты.

В монослое и сфероидах клетки РЛ были полиморфными в основном крупными округлыми или веретенообразными, ядра нередко имели продолговатую форму, встречались двуядерные варианты и «голые ядра».

Было подсчитано, что клетки РЛ на фильтре в контроле образуют $30,15 \pm 7,12$ сфероидов.

МИ в контрольной группе характеризовался высокой митотической активностью и, в среднем по группе, составил $17,24 \pm 3,05\%$, а патологические формы выявлены в $49,59 \pm 2,03\%$. Нормальные

митозы составляли $50,41 \pm 1,27\%$ от общего числа митозов.

Соотношение фаз митозов было представлено следующим образом: метафазы преобладали и составляли $67,48 \pm 1,43\%$, профазы – $16,21 \pm 2,01\%$, а анафазы и телофазы соответственно $7,89 \pm 0,62\%$ и $8,42 \pm 0,32\%$.

Наиболее часто в спектре патологических форм митозов в контрольной группе встречались: рассеивание хромосом и их фрагментов в метафазе ($25,8\%$); многополюсные митозы ($18,4\%$); асимметричные митозы ($15,3\%$); трехполюсные митозы ($11,8\%$); отставание хромосом и их фрагментов в анафазе ($8,2\%$); комковатая метафаза ($9,4\%$). Значительно реже среди патологических митозов определялись мосты, отставание хромосом и их фрагментов в метафазе, «полая» метафаза.

При воздействии ВМП на опухолевые клетки РЛ, культивируемые в ДК, общая морфологическая картина значительно отличалась. Число сфероидов снижалось, на некоторых фильтрах значительно. При их подсчете выявлено, что в среднем их количество было равно $12,32 \pm 5,12$ ($p < 0,05$), таким образом, ИЭС при воздействии ВМП был равен $59,6\%$.

В структуре сфероидов отмечалось значительное обеднение их эпителиоцитами, наблюдали дистрофические изменения в них, чаще выявляли патологические митозы и апоптоз.

МИ был достоверно ниже контрольного показателя и составлял $10,06 \pm 2,32\%$ ($p < 0,05$). Нормальные митозы были отмечены в $27,84 \pm 1,73\%$ от их общего числа митозов. Среди фаз митозов намного преобладали метафазные пластинки и составляли $74,46 \pm 1,22\%$. Профазы в исследуемом материале встречались значительно реже – в $11,59 \pm 0,05\%$, анафазы составляли $7,52 \pm 0,28\%$ в исследуемом материале, а телофазы – $6,43 \pm 1,25\%$.

Патологические митозы составляли $72,16 \pm 0,07\%$ от общего числа митозов. Формы патологических митозов распределялись следующим образом: рассеивание хромосом и их фрагментов в метафазе – $33,7\%$; многополюсные митозы – $21,1\%$; комковатая метафаза – $15,6\%$; асимметричные митозы – $7,9\%$; мосты – $6,9\%$; отставание хромосом и их фрагментов в анафазе – $5,6\%$. Другие виды в спектре патологических митозов (отставание хромосом в метафазе, трехполюсные митозы, моноцентрические митозы, «полая» метафаза) встречались значительно реже.

При изучении апоптоза установлено, что АИ в контроле ниже, чем в клетках подвер-

гавшихся воздействию ВМП ($5,17 \pm 0,60\%$ – в опыте, $2,03 \pm 0,64\%$ – в контроле, $p < 0,05$).

Заключение

Известно, что противоопухолевое влияние (как и проопухолевое) слабых магнитных полей, к которым относится ВМП, имеет опосредованный характер и реализуется, прежде всего, через изменения состояния различных регуляторных систем организма. Вопрос о возможности непосредственного влияния на опухолевые клетки остается открытым [7].

Поэтому нами была впервые предпринята попытка изучения влияния ВМП на культивируемые клетки РЛ, используя методику культивирования в ДК.

Воздействие ВМП на опухолевые клетки РЛ вызывало изменения в морфологической картине роста опухолей. Отмечалось снижение плотности клеток в монослое и в сфероидах, меньше выявлялось клеток в состоянии митозов и повышалось число апоптозных клеток. ИЭС имел положительное значение, что свидетельствовало об ингибирующем действии ВМП на процессы сфероидообразования.

Далее, нами получены данные, указывающие на индукцию апоптоза в клетках РЛ, которая проходила параллельно с ингибцией пролиферативной активности опухолевых клеток и АИ был значительно выше в клетках подвергавшихся воздействию ВМП.

Пролиферативная активность является одним из основных показателей, определяющих течение и прогноз злокачественных новообразований. Основным показателем пролиферативной активности является МИ. При воздействии ВМП на культивируемые клетки РЛ, использованные нами в эксперименте, получены данные о достоверном снижении МИ.

Изучая морфологические изменения в клетках при влиянии других лечебных факторов (химиотерапии), отмечено снижение митотической активности клеток с изменением соотношения фаз митоза в сторону преобладания метафазы [4]. В исследованиях, проведенных нами, при изучении фаз митозов в опухолевых клетках отмечено преобладание метафазы над другими фазами митозов в контроле, а при воздействии ВМП это преобладание еще увеличивалось.

Перспективным аспектом изучения митотического режима является использование его показателей для оценки степени терапевтического повреждения опухоли. Степень снижения митотической активности и нарастание относительной частоты комковатых метафаз, а также других грубых

форм патологии митоза служит одним из объективных критериев степени повреждения опухоли при проведении химиотерапии или облучения [5]. В наших исследованиях также подтверждён и этот тезис для ВМП.

Список литературы

1. Алов И.А. Цитофизиология и патология митоза. – М.: Медицина, 1972. – 263 с.
2. А.С. 721953 СССР, МКИ А61, N1/42. Способ лечения злокачественных опухолей. Д.А.Синицкий // Открытия, изобретения, товарные знаки. – 1982. – №6. – С. 286.
3. Бахмутский Н.Г. Оценка противоопухолевой эффективности вихревого магнитного поля (ВМП) в экспериментальных и клинических условиях: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2000. – 52 с.
4. Ганина К.П., Зиневич А.К., Жеро С.В. Специальные методы исследования при предопухолевых и опухолевых процессах желудка. – Киев: Наукова Думка, 1988. – 160 с.
5. Казанцева И.А. Патология митоза в опухолях человека. Изд-во «Наука», Сиб. отд., 1981 – 143с.
6. Хомяк О.Г., Сидоренко М.В. Модель сфероидообразования и её использование в онкологии // Эксперимент. онкол. – 2001. – №23. – С. 236–241.

7. Шихлярова А.И. О возможности прогнозирования эффективности влияния ПемП на живые системы // Современные проблемы изучения и сохранения биосферы. – СПб.: Гидрометиздат, 1992. – С. 179–182.

8. Algire G.H., Weaver J.M., Prehu R.T. Studies on tissue homotransplantation in mice, using diffusion chamber methods // Ann. N.Y. – 1957. – Vol.7, №5. – P. 1009–1013.

9. Evidence for differentiation of human leukemic blood cells in diffusion chamber culture / D. Hoelzer, E. Kurrle, H. Schmuker, E.B. Harris // Blood. – 1977. – 49, №5. – P. 729–744.

Рецензенты:

Шихлярова А.И., д.б.н., профессор, руководитель лаборатории биофизики рака ФГУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздравсоцразвития России, г. Ростов-на-Дону;

Белан Э.Б., д.м.н., профессор кафедры иммунологии и аллергологии Волгоградского государственного медицинского университета Минздравсоцразвития России, г. Волгоград.

Работа поступила в редакцию 26.08.2011.