УДК 616.24-006.6-08:615.849.11]-092.4

В. А. Порханов, **Н. Г. Бахмутский**, **В. Н. Бодня**

Кубанский государственный медицинский университет
ул. Седина, 4, Краснодар,350063, Россия

E-mail: bachnik@mail.ru

ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВИХРЕВОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Проведена оценка противоопухолевой эффективности вихревого магнитного поля, генерируемого установкой «Магнитотурботрон» (Россия). Моделью для исследования послужили клетки рака легкого, культивируемые в диффузионных камерах. Полученные результаты указывают на снижение сфероидообразования клетками рака легкого. Вихревое магнитное поле угнетает пролиферативную активность и индуцирует апоптоз в опухолевых клетках. При воздействии магнитного поля в культуре клеток преобладают метафазы и патологические митозы. В спектре патологических митозов отмечается превалирование грубых форм.

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

Поскольку до сих пор вопрос об этиологии опухолей окончательно не решен, терапия больных основана на знании отдельных патогенетических звеньев этого процесса и направлена прежде всего на радикальную ликвидацию первичного очага опухоли и регионарных метастазов, профилактику развития отдаленных метастазов и восстановление нарушенного гомеостаза. Представление о злокачественном новообразовании как о процессе, с самого начала потенциально генерализованном, позволяет предположить, что местное воздействие на первичный очаг не всегда является достаточным. Биологическим особенностям опухоли в большей степени отвечали бы методы общего, системного лечения на всех стадиях заболевания, которые, однако, не угнетали бы защитные реакции организма. Одной из попыток решения этой задачи является разработка в Кубанском государственном медицинском университете способа лечения злокачественных опухолей вихревым магнитным полем (ВМП) и реализующих его установок – «Магнитотурботрона» и «Магуса-1600». Новизна этого способа заключается в синхронном воздействии на все органы и системы больного вращающимся, плавно изменяющимся по амплитуде магнитным полем [1].

Магнитное поле, создаваемое в рабочей камере индуктора «Магнитотурботрона», образуется как сложная составляющая многофазного тока. Обмотка индуктора позволяет создавать в рабочей камере вращение вектора магнитного поля по или против часовой стрелки. Абсолютная величина вектора магнитной индукции изменяется циклично, при этом в начале цикла вектор магнитной индукции принимает нулевое значение, затем начинает плавно по синусоидальной зависимости увеличиваться и в определенный момент времени достигает максимального, заранее установленного уровня, после чего также плавно его значение начинает уменьшаться и достигает к концу цикла нулевого значения. Для лечебного воздействия магнитное поле имеет следующие параметры: индукция при максимальном значении – 3 мТ, частота вращения – 6 000 об./мин, длительность периода изменения индукции от нуля до максимума и обратно до нуля (1 цикл) – 120 с. Продолжительность процедуры – 50 мин (25 циклов).

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,

© В. А. Порханов, Н. Г. Бахмутский, В. Н. Бодня, 2012

Р-388) зарегистрировали высокий противоопухолевый эффект. В клинических исследованиях также подтверждено противоопухолевое действие ВМП [1–3].

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. В данной работе мы попытались оценить противоопухолевую эффективность этого способа на культуре клеток рака легкого (РЛ).

Цель исследования – в плане изучения механизмов противоопухолевого воздействия ВМП оценить его влияние на пролиферативную активность и апоптоз клеток рака легкого, используя их культивирование в диффузионных камерах.

Материал и методы

Изучение влияния ВМП на клетки РЛ провели на крысах-самках линии Wistar. В эксперименте использовали 12 животных в возрасте 16–17 нед. с массой тела 210 ± 50 г при их равном числе в контрольной и опытной группах (по 6 животных в каждой группе).

Влияние ВМП на клетки РЛ человека изучали с помощью метода культивирования в диффузионных камерах (ДК) [4; 5]. Все работы с опухолевой тканью проводили в стерильных условиях в ближайшие 3–4 ч после выделения опухоли из операционного материала больного, оперированного по поводу рака легкого (пульмонэктомия). Морфологической формой РЛ в эксперименте был немелкоклеточный (плоскоклеточный) рак легкого.

Кусочки опухолей, предназначенные для трансплантации, помещали в среду 199 с добавлением 20 % бычьей сыворотки, инактивированной нагреванием. В питательную среду вносили антибиотики (пенициллин 100 ЕД/мл и стрептомицин 100 мкг/мл) и затем доставляли из операционной в лабораторию. В лаборатории сразу же опухолевую ткань разрезали лезвием безопасной бритвы на пластины толщиной 0,3 мм, а затем с помощью модифицированной иглы для взятия крови с режущей кромкой получали стандартные кусочки ткани диаметром 2 мм и объемом 0,9–1,0 мм^3 и помещали их по 2–3 элемента на фильтр большого кольца. Готовые камеры с фрагментами опухолей помещали в свежую порцию среды 199 с бычьей сывороткой, где они находились до момента имплантации животному – реципиенту. Для изготовления ДК применяли мембранные фильтры «Миллипор» (США) с диаметром пор 0,22 мкм.

Под гексеналовым наркозом (100 мг/кг массы, внутрибрюшинно) сформированные ДК (до 5 шт.) имплантировали в брюшную полость животного. Через сутки после введения ДК животных опытной группы подвергали действию ВМП, генерируемого установкой «Магнитотурботрон-2» при частоте вращения магнитного поля в рабочей камере индуктора 100 Гц и напряженностью магнитного поля 3 мТ. Продолжительность разового воздействия составляла 3 ч (180 мин) в сутки. Общая продолжительность воздействия была равна 10 суткам. Животные контрольной группы содержались в одинаковых условиях, но воздействию ВМП не подвергались.

Забой животных обеих групп производили на 11-е сутки под эфирным наркозом. 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 цитологические препараты.

Для оценки пролиферативной активности опухолевых клеток РЛ использовали такие критерии, как индекс эффективности сфероидообразования (ИЭС) и митотический индекс (МИ) [6; 7].

Расчет ИЭС (%) осуществляли по формуле ИЭС = (А – Б) / А, где А – среднее количество сфероидов в контрольной группе; Б – среднее количество сфероидов в опытной группе. Положительные значения ИЭС соответствуют ингибиции образования сфероидов, т. е. проявлению противоопухолевого действия.

Сфероиды, образуемые опухолевыми клетками в ДК, представляют собой многоклеточные трехмерные структуры, клетки которых спиралеобразно ориентированы по

часовой стрелке вокруг центра в 10–12 рядов. При этом по структуре клетки сфероидов схожи с исходными клетками опухолей, а взаимодействие клеток при трехмерном росте соответствует взаимоотношениям клеток в солидных опухолях *in vivo*. На основании этого сфероиды можно рассматривать как микромодель опухолевого процесса.

МИ определяли путем подсчета числа делящихся клеток в 30 случайно выбранных полях зрения (при увеличении × 400) к общему числу проанализированных клеток и выражали в процентах. Подсчитано общее число митозов, из которых выделены в процентном соотношении нормальные и патологические. В нормальных митозах различали 4 фазы (профазу, метафазу, телофазу, анафазу). Патологические митозы разбиты по спектру в соответствии с классификациями [6; 7].

Клетки с признаками апоптоза определяли визуально под микроскопом. Основные признаки таких клеток – это клетки округлой формы, теряющие как бы контакт с соседними, с эозинофильной цитоплазмой, с извилистой формой ядра с выпячиваниями, пузырями (блеббингами), с конденсацией и выраженным уплотнением хроматина и агрегацией его плотных масс по периферии ядра с последующей фрагментацией и образованием апоптозных телец. Подсчитывали среднее количество клеток, имеющих признаки апоптоза в 30 случайно выбранных полях зрения (при увеличении × 400). Апоптозный индекс (АИ) рассчитывали по формуле [8]: АИ = (АК / ОК) × 100 %, где АК – количество апоптозных клеток; ОК – общее количество клеток.

Статистическую обработку первичных данных проводили с использованием методов описательной вариационной статистики, *t*-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и обсуждение

В контрольной группе животных при культивировании плоскоклеточного рака легкого кусочком ткани в ДК на 11-е сутки эксплантации среди многочисленных лимфоцитоподобных клеток и макрофагов по краям эксплантата наблюдались значительные разрастания эпителиоподобных элементов в виде участков монослоя и отдельных колоний, образование множества сфероидов различной величины. Макрофаги были различного размера от крупных до мелких, овальной формы с эксцентрически расположенным ядром. В ядрах хроматин распределен равномерно, имел мелко или крупнопетлистый рисунок. Контуры ядер были четко очерчены.

Эпителиальные клетки были преимущественно крупными, но встречались также клетки среднего и мелкого размеров. Форма клеток РЛ была самой разнообразной – полигональной, вытянутой, лентовидной. Ядра в клетках крупные, чаще гиперхромные, но встречались и светлые. Иногда ядра имели неровные контуры и были разнообразны по форме – округлые, палочковидные. Хроматин в ядрах распределен неравномерно, ядрышки немногочисленны, размеры их варьировали от мелких до очень крупных, часто необычной, уродливой формы. Иногда пласты эпителиальных клеток были довольно обширными как в центре, так и по периферии фильтра. Митозы в эпителиальных клетках монослоя распределялись довольно равномерно как в эпителиальных скоплениях, так и в сфероидах. Митозы чаще регистрировались в клетках, располагающихся на периферии этих образований (рис. 1).

Рост фибробластоподобных клеток наблюдался преимущественно в центре фильтра в виде монослоя, где фибробласты образовывали небольшие островки или тяжи между эпителиальными разрастаниями и участвовали в формировании сфероидов. Сфероиды представляли собой многослойные колониеподобные структуры, состоящие преимущественно из эпителиальных клеток, ориентированных по спирали вокруг центра такой структуры. Границы этих организованных клеточных скоплений обычно были четко очерчены.

Воздействие ВМП значительно меняло морфологическую картину культивируемых эксплантатов РЛ на фильтре ДК. Среднее значение сфероидов на фильтре у животных в опытной группе было меньше, чем в контрольной: 11,42 ± 0,21 и 26,17 ± 0,42 соответственно. ИЭС был равен 56,4 ± 2,3 %, что соответствовало ингибиции образования сфероидов и свидетельствовало об угнетающем действии ВМП на сфероидообразование.

В опытной группе изменения касались и структуры самих сфероидов. Наблюдалось

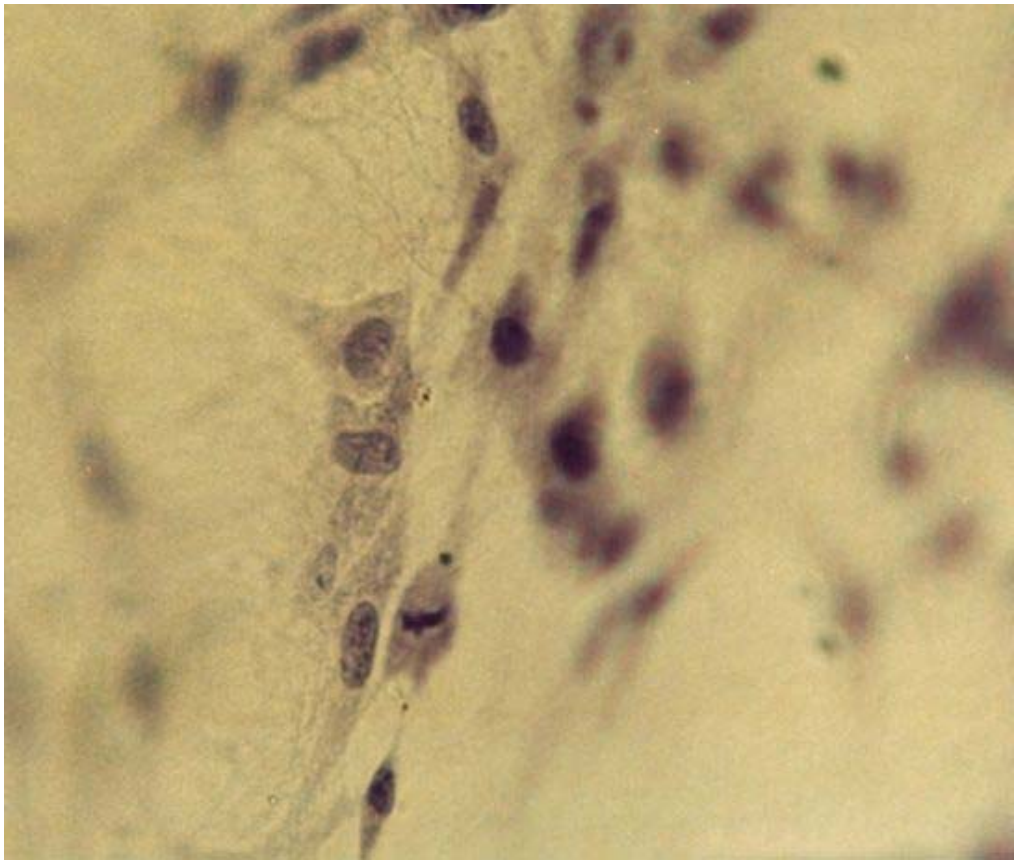

Рис. 1. Патологические митозы в сфероиде рака легкого у животных контрольной группы. Окраска гематоксилином Караччи, ув. × 400

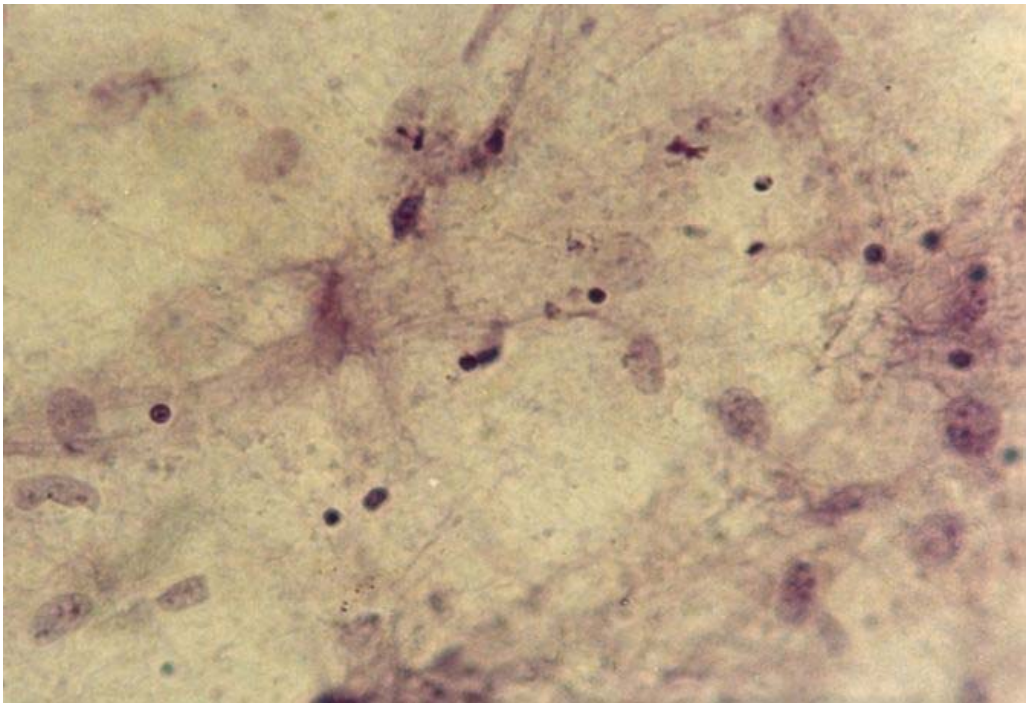

Рис. 2. Деструкция сфероида, множественный апоптоз, патологические митозы в клетках рака легкого, культивируемых в диффузионных камерах при воздействии ВМП (опытная группа). Окраска гематоксилином Караччи, ув. × 400

Показатели пролиферативной активности
и апоптоза клеток РЛ при воздействии ВМП

Группа	МИ, %	АИ, %	Нормальные митозы, абс.	Патологические митозы, абс.
Контрольная (n = 6)	24,31 ± 3,97	0,78 ± 0,11	22,08 ± 1,09	77,92 ± 1,09
Опытная (n = 6)	19,68 ± 2,59 *	4,97 ± 0,47 *	8,03 ± 0,32 *	91,97 ± 0,32 *

Примечание: * – $p < 0,05$.

значительное обеднение их эпителиальными клетками, замещение фибробластами, что соответствовало так называемой фибробластной селекции. Во многих участках сфероидов эпителиальные клетки были в состоянии дистрофии, митотическая активность снижалась, чаще выявляли патологические митозы. Иногда даже можно было наблюдать полную деструкцию сфероидов.

В монослое эпителиальные клетки опытной группы по своей форме не отличались от контроля, но их скомпонованность была меньшей, часто наблюдали клетки с дистрофическими изменениями. Дистрофические изменения в клетках оценивали по разрежению структуры хроматина интерфазных ядер, уплотнению, изрезанности контуров ядерной мембраны и фрагментации ядер, уменьшению количества ядрышек в ядрах. Встречались клетки с гиперхромными ядрами, наблюдали гигантские формы раковых клеток. В некоторых клетках хроматин был сконцентрирован на ядерной оболочке в виде глыбок. Митозы в эпителиальных клетках монослоя встречались нечасто, в основном они были представлены патологическими формами (рис. 2).

В некоторых препаратах зона роста эпителиальных клеток вокруг трансплантата вовсе отсутствовала. Что касается роста фибробластов в зоне трансплантата, то они образовывали разрастания, состоящие из крупных клеток с длинными переплетающимися отростками. Далее по фильтру они располагались довольно равномерно, с концентрацией вокруг сфероидов. В фибробластах наблюдали митозы, патологических форм не встречали.

Изучение пролиферативной активности в опухолевых клетках, подвергавшихся трансплантации, проведено особенно тщательно, так как это и являлось основной целью нашей работы. Установлено, что МИ клеток опухоли достоверно снижался при воздействии ВМП. Отмечено увеличение процентного содержания патологических митозов в опыте (см. таблицу). Соотношение фаз митозов клеток при воздействии ВМП показало преобладание метафаз над профазами и другими формами митозов. Так, в контрольной группе профазы составляли 25,66 ± 1,23, в опыте отмечено их снижение до 11,12 ± 1,14 % ($p < 0,05$), при нарастании процентного содержания в опыте метафаз (38,18 ± 4,11 и 62,03 ± 7,23 % в контрольной и опытной группах соответственно, $p < 0,05$). Снижалось процентное содержание анафаз и телофаз в опытной группе.

Спектр патологических митозов в клетках РЛ в контрольной группе в порядке убывания процентного соотношения представлен следующим образом: многополюсные митозы составляли 29,07 %, рассеивание хромосом и их фрагментов в метафазе – 18,47, асимметричный митоз – 17,94, трехгрупповая метафаза – 14,09, комковатая метафаза – 10,12, отставание хромосом и их фрагментов в анафазе – 4,19 %.

При воздействии ВМП спектр патологических митозов менялся, преобладала патология митоза, связанная с повреждением митотического аппарата. Спектр патологических митозов в опыте представлен следующим образом: многополюсные митозы – 27,37 %, рассеивание хромосом и их фраг-

ментов в метафазе – 26,21, комковатая метафаза – 19,54, асимметричный митоз – 4,39, моноцентрические митозы – 5,33, трехгрупповая метафаза – 4,38 %.

Отмечено, что клетки в состоянии апоптоза встречались значительно чаще в опыте и АИ достоверно увеличивался.

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 [9].

Сфероидообразование используют для изучения действия различных противоопухолевых факторов, поскольку сфероиды можно рассматривать как модель опухолевого роста *in vivo* [5]. Результаты исследований обычно оцениваются по ИЭС, положительные значения которого указывают на ингибицию образования сфероидов, т. е. проявления противоопухолевого действия лечебных факторов.

Индуцированный апоптоз (лучевой, лекарственный, гормональный и др.) является важнейшим механизмом действия различных способов и схем лечения больных с онкологическими заболеваниями, показателем его эффективности, определяющим чувствительность к лечению в каждом конкретном случае [10].

Пролиферативная активность является одним из основных показателей, определяющих течение и прогноз злокачественных новообразований. Для многих опухолей пролиферативная активность – эффективный фактор прогноза безрецидивной и общей выживаемости. Основным показателем пролиферативной активности является МИ [7].

Проведенное исследование свидетельствует об ингибирующем действии ВМП на процессы сфероидообразования клетками РЛ в ДК. При воздействии ВМП на культивируемые клетки РЛ, использованные нами в эксперименте, получены данные о достоверном снижении МИ как показателя пролиферативной активности. Таким образом, снижение МИ, нарастание в митотическом режиме метафаз, патологических митозов и изменение спектра патологических митозов в сторону нарастания относительной частоты комковатых метафаз и других грубых форм патологии митоза может служить одним из объективных критериев степени повреждения клеток при воздействии ВМП.

Используя ВМП для воздействия на культивируемые клетки РЛ в ДК, мы получили также результаты, указывающие на индукцию апоптоза в этих клетках.

Эти данные свидетельствуют о том, что в механизмах влияния ВМП на опухолевые клетки основным моментом является все же непосредственное воздействие, что в конечном счете проявляется снижением пролиферативной активности и индукцией апоптоза в них.

Список литературы

1. *Бахмутский Н. Г.* Оценка противоопухолевой эффективности вихревого магнитного поля (ВМП) в экспериментальных и клинических условиях: Автореф. дис. … д-ра мед. наук. М., 2000.

2. *Бахмутский Н. Г.* Лечение генерализованной формы меланомы кожи вихревым магнитным полем // Рос. онкол. журн. 2000. № 6. С. 32–35.

3. *Бахмутский Н. Г.* Лечение метастазирующего рака молочной железы вихревым магнитным полем // Рос. онкол. журн. 2000. № 4. С. 35–37.

4. *Algire G. H., Weawer J. M., Prehu R. T.* Studies on Tissue Homotransplantations in Mace, Using Diffusion Chamber Methods // Ann. N. Y. 1957. Vol. 7, № 5. P. 1009–1013.

5. *Hamilton G.* Multicellular Spheroids as an *in vitro* Tumor Model // Cancer Lett. 1998. Vol. 131. P. 29–34.

6. *Алов И. А.* Цитофизиология и патология митоза. М., 1972.

7. *Казанцева И. А.* Патология митоза в опухолях человека. Новосибирск, 1981.

8. *Лушников Е. Ф., Абросимов А. Ю.* Гибель клетки (апоптоз). М., 2001.

9. *Шихлярова А. И., Шейко Е. А., Пиль Э. А.* Оценка противоопухолевого эффекта и анализ активности дегидрогеназ лимфоцитов периферической крови крыс с опухолью С-45 при воздействии слабых инфранизко-

частотных магнитных полей // Вопр. онкол. 1999. Т. 45, № 3. С. 287–291.

10. *Петухов В. И.* Роль Fas-опосредованного апоптоза в реализации противоопухолевого эффекта α-интерферона при хроническом миелолейкозе // Гематол. трансфузиол. 2000. № 4. С. 29–33.

Материал поступил в редколлегию 18.01.2012

V. A. Porkhanov, N. G. Bakhmutsky, V. N. Bodnya

ASSESSMENT ANTITUMOR EFFICACY OF THE VORTICAL MAGNETIC FIELD IN THE EXPERIMENT

We evaluated the effectiveness of antitumor efficacy of the vortical magnetic field generated by the installation «Magnitoturbotron» (Russia). Model for investigation of lung cancer cells cultured in diffusion chambers. The results obtained indicate a decrease spheroid formation in lung cancer cells. Vortical magnetic field inhibits the proliferative activity and induces apoptosis in tumor cells. When exposed to a magnetic field in the cell culture is dominated by metaphase and abnormal mitosis. The spectrum of pathological mitoses indicated the prevalence of serious forms.

Keywords: vortical magnetic field, lung cancer, the diffusion chamber, mitosis, apoptosis.