УДК 001.5:612.014.426:616-006.04

ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯТЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ВЛИЯНИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНЫХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Жукова Г.В., Гаркави Л.Х., Евстратова О.Ф., Бартенева Т.А., Мащенко Н.М., Ширнина Е.А.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Минздрава России», Ростов-на-Дону, e-mail: galya_57@mail.ru

Впервые описаны количественные изменения в ткани экспериментальных опухолей и составе инфильтрирующих опухоль клеток иммунной системы при эффективных электромагнитных воздействиях без применения специальных противоопухолевых средств. В экспериментах на белых беспородных крысах с саркомой 45 использовали слабые излучения крайне высокочастотного и инфра низкочастотного диапазона, а также СКЭНАР-терапию. Воздействия применяли с локализацией на структуры ЦНС, в режимах активационной терапии. Противоопухолевый эффект заключался в торможении роста опухоли на 71-73 % или регрессии опухоли на 60–100 %. Полученные результаты указывают на иммунный механизм повреждения ткани опухоли под влиянием исследованных электромагнитных воздействий.

Ключевые слова: электромагнитные воздействия, противоопухолевый эффект, антистрессорные адаптационные реакции, клетки иммунной системы, инфильтрация опухоли

IMMUNOMORPHOLOGIC CORRELATES OF ANTITUMOR EFFECTS INDUCED BY COMBINED ELECTROMAGNETIC FACTORS OF LOW INTENSITY IN EXPERIMENT

Zhukova G.V., Garkavi L.H., Eustratova O.F., Barteneva T.A., Maschenko N.M., Shirnina E.A.

Federal State Institution «Rostov Cancer Research Institute», Rostov-on-Don, e-mail: galya_57@mail.ru

For the first time quantitative changes in tumor tissue and immune cells infiltration caused by effective electromagnetic factors of low intensity were described in experiments on rats with sarcoma 45. Special antitumor agents were not applied. The factors included radiation of extra high frequency and radiation of infra low frequency or SCENAR-therapy. The combined factors were applied in accordance with the regimes of the activation therapy aimed to development of the antistress adaptation reactions and to achievement of expressed antitumor effect. Marked antitumor effect manifested in the inhibition of growth (over 70 %) or tumor regression (by 60–100 %) in most animals. Obtained results indicate to immune effector mechanisms of systemic antitumor effect of the combined electromagnetic factors.

Keywords: electromagnetic factors, antitumor effect, antistress adaptation reactions, immune cells, tumor infiltration

В настоящее время в онкологии продолжается поиск нетоксичных воздействий, активизирующих системные и локальные защитные механизмы. Ранее было показано, что воздействия слабых электромагнитных излучений (ЭМИ) различных частотных диапазонов на структуры ЦНС белых крыс могут обеспечивать выраженный противоопухолевый эффект, обусловленный активизацией органов иммунной и нейроэндокринной систем организма [2, 4, 6]. При этом необходимым условием являлось применение режимов активационной терапии, способствующих развитию в организме животных стойких антистрессорных общих неспецифических адаптационных реакций (АР) [2, 3]. В то же время, процессы в зоне опухоли при эффективных электромагнитных воздействиях оставались мало изученными.

Целью исследования явилось сравнительное изучение микрокартины опухоли и состава инфильтрирующих опухоль элементов иммунной системы при росте опухоли и противоопухолевых эффектах низкоинтенсивных комплексных электромагнитных воздействий, применявшихся в режимах активационной терапии.

Материалы и методы исследования

Опыты проводили на 79 белых беспородных крысах-самцах (200–250 г) с перевивной саркомой 45. Условия проведения исследований соответствовали международным регламентациям экспериментов на животных [5]. Опухоль перевивали подкожно в заднюю боковую поверхность спины животного в объеме клеточной взвеси 0,3 мл. Воздействия начинали по достижении опухолями размеров 0,7-1 см^3. Применяли оригинальные методы низкоинтенсивной электромагнитотерапии, включавшие два вида комплексных электромагнитных воздействий – сочетанное и комбинированное [4]. Воздействия проводили 4–5 раз в неделю в течение 4-х недель. При сочетанном воздействии, осуществлявшемся только на голову животного, одновременно использовали модулированное излучение миллиметрового диапазона (ЭМИ КВЧ) и инфранизкочастотное магнитное поле (ИНЧ МП, 1мТл). Воздействие проводили с помощью аппарата

«Явь-1» (42,2 ГГц, 10 мВт/см^2), индукционной катушки и специально сконструированного модулятора на базе генератора сигналов специальной формы (рис.1). Частота ИНЧ МП изменялась в диапазоне 0,8–7,8 Гц в соответствии с режимом модуляции ЭМИ КВЧ [4]. При комбинированном воздействии последовательно применяли СКЭНАР-терапию и, через 30-40 мин, воздействие ЭМИ КВЧ также на голову животного (рис.1). При СКЭНАР-терапии использовали аппарат «СКЭНАР-97.1» с выносным электродом-расческой, воздействия осуществляли на голову, область позвоночника, зону опухоли и проекции печени.

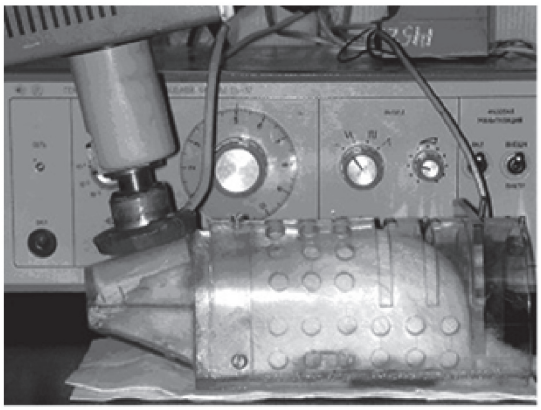

Рис. 1. Вид экспериментальной установки для осуществления воздействия ЭМИ КВЧ и сочетанного воздействия

Объем опухоли определяли 2 раза в неделю. При этом использовали формулу Шрека для эллипсоидов. Оценка характера и напряженности адаптационных реакций (АР) проводилась по показателям лейкоцитарной формулы крови, подсчитанной на 200 клеток, с учетом общего содержания лейкоцитов, 1–2 раза в неделю в соответствии с методом Гаркави-Квакиной [2, 3]. При этом в качестве сигнального показателя характера АР использовали относительное число лимфоцитов. По окончании экспериментов животных забивали путем эфирной перенаркотизации, опухоли взвешивали, образцы ткани фиксировали в 10% нейтральном формалине и жидкости Карнуа. Срезы опухоли окрашивали гематоксилин-эозином, а также по методу Браше. Морфометрия осуществлялась с помощью измерительного комплекса «САГА» на базе ПК. Определяли плотность клеточной популяции, оценивали (в промилле, ‰) митотическую активность и содержание дистрофически измененных опухолевых клеток, а также количество и состав инфильтрирующих опухоль клеток иммунной системы. При этом в периферической зоне опухоли подсчитывали количество клеток лейкоцитарного ряда в каждом 5-м поле зрения, в более глубоких слоях опухоли определяли содержание лимфоцитов и плазмоцитов (‰). При статистической обработке результатов использовали t-критерий Стьюдента, а также критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

У крыс контрольной группы наблюдался активный рост опухоли (табл. 1). Гематологические показатели свидетельствовали о развитии в организме этих животных АР стресс (относительное содержание лимфоцитов – менее 45%) или напряженных антистрессорных адаптационных реакций (содержание лимфоцитов 54-68%, моноцитоз, анэозинофилия). К концу эксперимента у части крыс были отмечены также и признаки анемии (анизоцитоз).

Таблица 1

Противоопухолевый эффект комплексных электромагнитных воздействий и характер адаптационных реакций (АР) у крыс с саркомой 45

Группа		Вес опухоли, г	Случаи регрессии	Характер преобладавших АР
Контроль	n=31	14,5±1,5	0	Стр, напряженные антистрессорные АР
ЭМИ КВЧ +ИНЧ МП	Торможение, регрессия, n=13	3,3±1,0 ●▼	4 (20%)	ПА
	Рост, n=7	14,3±1,1	0	напряженные антистрессорные АР, Стр
СКЭНАР – ЭМИ КВЧ	Торможение, регрессия, n=28	2,1±0,8 ●	10 (36%)	СА, ПА

Обозначения: ЭМИ КВЧ+ИНЧ МП – сочетанное воздействие; СКЭНАР – ЭМИ КВЧ – комбинированное воздействие.

Примечание. Отличие от контрольных значений: ● – $p<0,05$–$0,001$; от случаев роста опухоли при сочетанном воздействии ▼ – $p<0,05$. Стр – АР стресс, ПА – АР повышенной активации, СА – АР спокойной активации.

Микрокартина саркомы 45 животных контрольных групп характеризовалась плотным расположением клеток веретенообразной формы (рис. 2 А), многочисленными фигурами митоза (табл. 2), а также локальным прорастанием опухолью соединительнотканной капсулы.

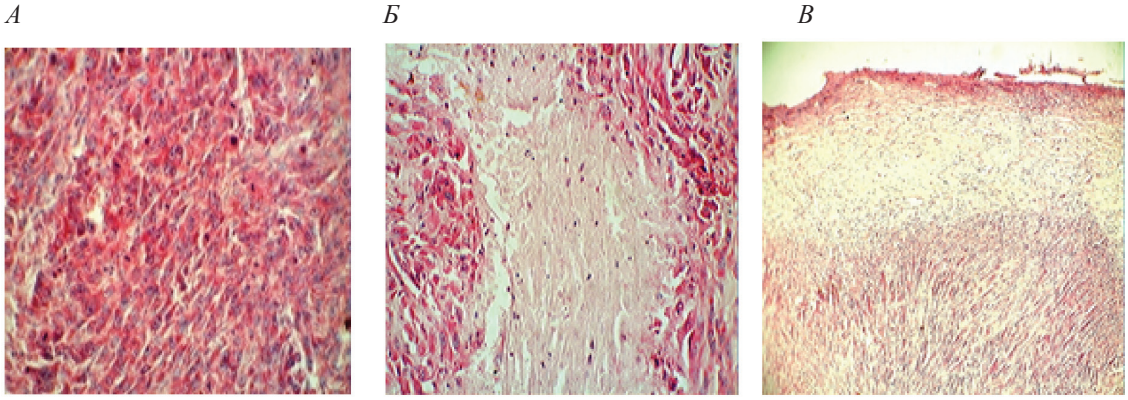

Рис. 2. Изменения в ткани саркомы 45 под влиянием комплексных электромагнитных воздействий. А. Рост опухоли в контрольной группе. Плотное расположение клеток опухоли. Браше. Ув. 400. Б. Сочетанное воздействие (ИНЧ МП + ЭМИ КВЧ). Частичная регрессия опухоли. Снижение плотности расположения клеток, наличие обширных участков некроза. Браше Ув. 400. В. Комбинированное воздействие (СКЭНАР – ЭМИ КВЧ). Полная регрессия опухоли. Замещение ткани опухоли соединительной тканью. Браше. Ув. 100

Исследованные электромагнитные факторы значительно изменяли адаптационный статус подопытных крыс и оказывали выраженное влияние на развитие опухоли у большинства животных (табл. 1). Так, при сочетанном воздействии на фоне развития стойкой АР повышенной активации у 13 из 20 животных (65 %) был отмечен противоопухолевый эффект. При этом у 4 животных (20 %) наблюдалась регрессия опухоли на 60–100 %, а в остальных случаях было отмечено торможение роста опухоли на 73 %. Комбинированное воздействие оказалось еще более эффективным – регрессия опухоли была отмечена более чем у трети животных (в 1,8 раз чаще, чем при использовании сочетанного воздействия), а у остальных крыс этой группы наблюдалось торможение роста опухоли на 71 % (табл. 1). Микрокартина саркомы 45 при частичной регрессии характеризовалась снижением плотности расположения клеток и наличием обширных участков некроза (рис.2Б). В случаях полной регрессии саркомы 45 наблюдалось замещение ткани опухоли соединительной тканью (рис.2В).

Для более полного представления о процессах в ткани саркомы 45 под влиянием исследованных воздействий интерес представляло изучение изменений при выраженном торможении роста опухоли. По результатам морфометрии у таких животных в 2–3 раза по сравнению с показателями в контрольной группе крыс снижалась плотность расположения клеток опухоли и в 3–4 раза уменьшалась их митотическая активность, а содержание дистрофически измененных клеток возрастало более чем в 10 раз (табл. 2).

Таблица 2

Изменения в ткани саркомы 45 при выраженном торможении роста опухоли под влиянием комплексных электромагнитных воздействий у белых беспородных крыс-самцов

Группа		Число клеток в поле зрения	Митотическая активность (‰)	Клетки с дистрофическими изменениями (‰)
Контроль	Рост, n=31	49.4±5,5	43,9±4,4	9,2±1,3
ЭМИ КВЧ + ИНЧ МП n=16	Торможение, n=9	18,4±2,1▼	12,3±1,4 ●▼	118,2±11,4 ●▼
	Рост, n=7	35,3±3,0 ●	18,3±3,0 ●	96,8±10,8 ●
ЭМИ КВЧ–СКЭНАР Торможение, n=18		21,6+2,9 ●	11,5+2,8 ●	125,2+15,6●

Обозначения: ЭМИ КВЧ+ИНЧ МП – сочетанное воздействие; СКЭНАР – ЭМИ КВЧ – комбинированное воздействие.

Примечание. Отличие от контрольных значений: ● – $p<0,05–0,001$; от случаев роста опухоли при воздействии ▼ – $p<0,05$. Площадь поля зрения – 6787 мкм^2.

Интересно, что при использовании сочетанного воздействия даже в случаях отсутствия заметных изменений размеров и веса саркомы 45 по сравнению с показателем в контрольной группе результаты морфометрии свидетельствовали о достоверном снижении плотности расположения клеток опухоли и признаков их митотической активности (соответственно, в 1,4 и 2,4 раза), а также о значительном (в 10,5 раз) увеличении содержания дистрофически измененных клеток по сравнению с этими показателями у крыс контрольной группы (табл. 2).

Исследованные комплексные электромагнитные воздействия приводили к усилению инфильтрации ткани саркомы 45 клетками иммунной системы. В связи с необходимостью исключения из анализа изменений, обусловленных активизацией макрофагального фагоцитоза при регрессии саркомы 45, сдвиги в инфильтрации под влиянием исследованных факторов изучали только при торможении роста опухоли (табл. 3, рис. 3).

Таблица 3

Изменение инфильтрации опухоли клетками иммунной системы при выраженном торможении роста саркомы 45 под влиянием комплексных электромагнитных воздействий

Группа/показатели		Периферическая зона опухоли, число клеток в поле зрения				Глубокие слои опухоли, ‰	
		Лимфоциты	Плазмоциты	Макрофаги	Тканевые базофилы	Лимфоциты	Плазмоциты
Контроль	Рост, n=31	3,2±0,3	0	0	0,15±0,06	34,7±4,1	0,68±0,5
ЭМИ КВЧ + ИНЧ МП n=16	Торможение, n=9	26,9 ± 1,3 ●▼	6,5±0,2 ●▼	5,9±0,9●	0,49±0,06 ●▼	131±13 ●	4,9±1,0 ●
	Рост, n=7	21,9±1,2●	5,1±0,3 ●	5,0±1,0●	0,22±0,04	111±18 ●	3,0±1,0 ●
ЭМИ КВЧ-СКЭНАР Торможение, n=18	21,4±1,3 ●	11,3±2,9 ● $T_▼$	4,4±0,8 ●	0,56±0,07 ●▼	143+23 ●	6,9+1,3 ●	

Обозначения: ЭМИ КВЧ+ИНЧ МП – сочетанное воздействие; СКЭНАР – ЭМИ КВЧ – комбинированное воздействие/

Примечание. Отличия от контрольных значений ● – $p<0,05–0,001$; от случаев роста опухоли при сочетанном воздействии ▼ – $p<0,05$, $T_▼$ – $p<0,1$. Площадь поля зрения – 6787 мкм^2.

В случаях торможения роста опухоли под влиянием исследованных воздействий в периферической зоне саркомы 45 наблюдалось увеличение содержания лимфоцитов в 7–8 раз, а тканевых базофилов – более чем в 3 раза по сравнению с этими показателями в контрольной группе. Кроме того, было отмечено появление макрофагов и плазмоцитов, не выявленных при анализе микропрепаратов, полученных у крыс контрольной группы (табл. 3, рис. 3). При этом для случаев торможения роста саркомы 45 было характерно наиболее выраженное увеличение числа плазмоцитов и тканевых базофилов. Усиление инфильтрации клетками иммунной системы под влиянием электромагнитных воздействий наблюдалось и в более глубоких слоях опухоли. Было отмечено значительное увеличение числа лимфоцитов (примерно, в 4 раза), а также количества плазмоцитов – в 6,6 и 10,9 раза, соответственно, при сочетанном и комбинированном воздействии (табл. 3).

Таким образом, при использовании комплексных электромагнитных воздействий, оказывавших выраженный антистрессорный эффект, имело место непрямое повреждающее влияние на клетки саркомы 45. При этом дистрофические изменения и некроз клеток опухоли наблюдались на фоне усиления инфильтрации клетками иммунной системы периферических и более глубоких слоев ткани опухоли.

Заключение

Представленные результаты соответствуют ранее полученным сведениям о высокой противоопухолевой эффективности комплексных электромагнитных воздействий в эксперименте при их использовании в режимах активационной терапии [2, 4, 6]. Параметры действующих факторов – низкая интенсивность и преимущественная локализация воздействий на структуры ЦНС – исключают возможность их прямого повреждающего влияния на клетки опухолей. Таким образом, противоопухолевая эффективность исследованных электромагнитных факторов была связана с их системным антистрессорным действием – развитием стойких адаптационных реакций спокойной и повышенной активации, способствующих выраженной активизации механизмов противоопухолевой резистентности. Более высокая эффективность комбинированного электромагнитного воздействия по сравнению с сочетанным воздействием, очевидно, была обусловлена дополнительным влиянием на спинной мозг,

зону проекции печени и перитуморальную зону с помощью СКЭНАР-терапии, обеспечившим более значительную активизацию центральных и периферических звеньев многоуровневых регуляторных механизмов противоопухолевой резистентности.

А *Б* *В*

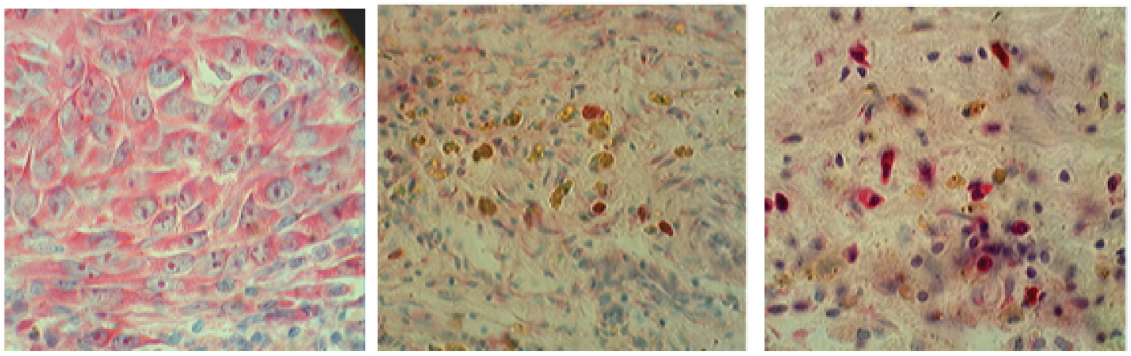

Рис. 3. Инфильтрация субкапсулярной зоны саркомы 45 клетками иммунной системы при торможении роста опухоли под влиянием комплексных электромагнитных воздействий. Браше: А – Рост опухоли в контрольной группе. Плотное расположение опухолевых клеток, инфильтрированных единичными лимфоцитами. Ув. 1000; Б – Сочетанное воздействие (ЭМИ КВЧ + ИНЧ МП). Торможение роста опухоли. Обширные участки инфильтрации клетками иммунной системы – макрофагами, лимфоцитами и плазмоцитами. Ув. 400; В – Комбинированное воздействие (ЭМИ КВЧ – СКЭНАР). Торможение роста опухоли. Выраженная инфильтрация различными клетками иммунной системы с заметными группами плазмоцитов. Ув. 1000.

В литературе имеются противоречивые сведения о диагностическом и прогностическом значении инфильтрации ткани опухоли клетками лейкоцитарного ряда [1,7]. Это связано с возможностью ремоделирования опухолью активности клеток иммунной системы, развития иммуносупрессивных реакций и стимуляции опухолевого роста. Полученные нами результаты свидетельствуют об определенном параллелизме между выраженностью противоопухолевого действия изученных факторов и изменениями в качественном и количественном составе лейкоцитов, инфильтрировавших ткань саркомы 45. Это позволяет рассматривать значительное усиление инфильтрации ткани опухолей клетками лейкоцитарного ряда как отражение мобилизации местных иммунных механизмов под влиянием электромагнитных воздействий. Сочетанное и комбинированное воздействия в целом вызывали сходные по характеру и выраженности изменения состава иммунокомпетентных клеток, инфильтрировавших опухоль. В первую очередь, значительно увеличивалось количество лимфоцитов. При этом количественное преобладание лимфоцитов над плазмоцитами, особенно выраженное в глубоких слоях опухоли, в сочетании с увеличением количества макрофагов, могло указывать на преимущественную активизацию клеточного звена иммунитета. В то же время, то обстоятельство, что при торможении роста саркомы 45 показатели содержания плазмоцитов и тканевых базофилов были выше, чем при росте опухоли, могло отражать важную роль и антителозависимых иммунных механизмов в реализации противоопухолевых эффектов сочетанного и комбинированного электромагнитных воздействий.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования исследованных воздействий в клинической практике и расширяют современные представления о механизмах, реализующих опосредованное противоопухолевое действие низкоинтенсивных факторов электромагнитной природы.

Список литературы

1. Бережная Н.М. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. I. Клетки и цитокины – участники воспаления // Онкология – 2009. – Т.11 – № 1 – С. 6-17

2. Гаркави Л.Х. Активационная терапия: Антистрессорные реакции активации и тренировки и их использование для оздоровления, профилактики и лечения. – Ростов н/Д: Изд-во Рост. Ун-та. –2006. – 256 с.

3. Гаркави Л.Х., Уколова М.А., Квакина Е.Б. Закономерность развития качественно отличающихся общих неспецифических адаптационных реакций организма /Диплом на открытие № 158 Комитета Совета Министров СССР по делам изобретений и открытий //Открытия в СССР. М., 1975. № 3. С. 56–61.

4. Жукова Г.В., Гаркави Л.Х., Евстратова О.Ф. и др. Состояние некоторых структур иммунной системы при реализаци противоопухолевого эффекта комбинированного воздействия, включающего СКЭНАР-терапию и сложномодулированное ЭМИ КВЧ // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2005 . – N 8. – С. 10-17

5. Копаладзе Р.А. Биоэтика. Эксперименты на животных – история, состояние, перспективы. – М.: Компания Спутник+.–2003. –66 с.

6. Шихлярова А.И., Барсукова Л.П., Марьяновская Г.Я. и др. Электромагнитное поле как биотропный управляющий фактор в терапии экспериментальных опухолей // Междунар. журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2012. –№ 11. –С. 24–25.

7. Jochems C., Schlom J. Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential link between conventional cancer therapy and immunity // Exp. Biol. Med. 2011. Vol. 236. № 5. P. 567-579/