УДК 616-006.018.1-08:57.086

ИЗМЕНЕНИЕ БИОФИЗИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КЛЕТОК САРКОМЫ 45 (С45) У КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ СВЕРХНИЗКО ЧАСТОТНЫХ ПЕРЕМЕННЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ (СНЧ ПЕМП)

Шейко Е.А., Шихлярова А.И.

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

Целью данного исследования было изучение влияния сверхнизко частотных переменных магнитных полей (СНЧ ПеМП) с резонансными частотами, соответствующими некоторым волновым параметрам мозга в диапазоне 0,03-0,3-3-9Гц на люминесцентно-спектральные характеритики С45 в процессе проведения химиотерапии циклофосфаном. Люминесцентно-спектральные исследования проводились по методу Карнаухова. Спектры люминесценции регистрировали с помощью двухволнового микроспектрофлуориметра «Радикал ДМФ-2». Измеряли интенсивность флуоресценции в полосах излучения зеленой и красной областях спектра (530нм и 640 нм). Функциональную активность синтетического аппарата клеток (синтетическую активность) определяли по параметру α, представляющему собой отношение интенсивностей флуоресценции в красной (640 нм) и зеленой (530 нм) областей спектра. Показано, что биофизические характеристики позволяют в количественной форме судить об изменении состояния клеток С45 под влиянием СНЧ ПеМП.

Ключевые слова: саркома 45, СНЧ ПеМП, люминесценция, спектральный анализ

CHANGING THE BIOPHYSICAL PARAMETERS SARCOMA CELLS 45(C45) IN RATS UNDER THE INFLUENCE ULTRALOW FREQUENCY ALTERATING MAGNETIC FIELDS (ULF AMF)

Sheiko E.A., Shikhliarova A.I.

Rostov Scientific Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail:rnioi@list.ru

The purpose of this study was to investigate the influence of super-low-frequency alternating magnetic fields (ELF VMF) with resonance frequencies corresponding to the non-wave parameters which brain range 0,03-0,3-3-9 Hz to the spectral-luminescent characteristics on tumor C45 in the process of cyclophosphamide chemotherapy. Fluorescent spectral studies were carried out according to the method Karnauhov. The luminescence spectra were recorded using a two-wave mikrospektro-fluorometer «Radical DMF-2.». Fluorescence intensity was measured in the emission band of green (λ = 0,53 mμ) and red (λ = 0,64 mμ) regions of the spectrum. The functional activity of the synthetic apparatus of cells (synthetic activity) was determined by the parameter α, which represents the ratio of fluorescence intensities in the red (640 nm) and green (530 nm) spectral regions. It is shown that the biophysical characteristics allow to quantify the changes of the state of the C45 cells under the influence of ELF VMF.

Keywords: sarcoma 45, super-low-frequency alternating magnetic fields (ELF VMF), luminescence, spectral analysis

Слабые электромагнитные поля являются значимыми факторами внешней среды, влияющими на многие биологические процессы [1]. К настоящему времени накоплен огромный экспериментальный материал, свидетельствующий о значимости этих факторов [2, 3]. Выявлена определенная зависимость развития биологических эффектов от параметров магнитного поля [9]. Однако в полном виде эти зависимости остаются неизученными. Известно, что СНЧ ПеМП в определенных параметрах обладают высокой биологической активностью, информационной значимостью и возможностью управлять адаптивной регуляцией в организме опухоленосителя, что позволяет повышать противовопухолевую резистентность и оказывать ингибирующее влияние на рост опухолей различного генеза [9,10]. В эксперименте на крысах самцах с перевивной саркомой С45 было изучено влияние сверхнизко частотных переменных магнитных полей (СНЧ ПеМП) с резонансными частотами, соответствующими некоторым параметрам электрической активности коры мозга в диапазоне 0,03-9Гц на люминесцентно-спектральные характеристики тимоцитов в процессе проведения химиотерапии циклофосфаном [8], однако состояние клеток с45 при этих условиях опыта осталось не изучено. Целью работы было изучение влияния сверхнизко частотных переменных магнитных полей (СНЧ ПеМП) в диапазоне 0,03-0,3-3-9Гц на люминесцентно-спектральные характеристики С45 в процессе проведения химиотерапии циклофосфаном.

Материалы и методы исследования

Опыты проведены на 30 крысах самцах, массой 180–200 г. Всем животным была перевита саркома 45. Использовали штамм опухоли, полученный из Онкологического Центра АМН России, г. Москва, который перевивался введением суспензии опухолевых клеток С45 в количестве 0,3 мл под кожу спины. В процессе роста опухолей регистрировали изменение их объемов по формуле Шрека для эллипсоида ($V=\pi/6\times а\times б\times в$). Все воздействия начинали при достижении опухоли объемом более 0,3 см^3. Животных делили на три

группы по десять особей: первая группа- контрольная, рост опухоли без воздействия; остальным 2-м группам животным вводили циклофосфан (ЦФ) внутрибрюшинно в дозе 75 мг/кг. дважды с интервалом семь дней, кроме того животным второй группы осуществляли сканирование мозга СНЧ ПеМП интенсивностью 50млТ, дискретными сигналами в алгоритме селективных частот – 0,03-0,3-3-9Гц, частично согласующимися между собой кратными соотношениями и соответствующими некоторым частотным характеристикам электрической активности корковых структур, воздействие осуществляли ежедневно всего четыре недели. Магнитные воздействия проводились с использованием магнитотерапевтического аппарата «Спектр 2», оснащенного процессором. Половину животных декапитировали через сутки после последнего воздействия СНЧ ПеМП (первая фаза эксперимента), остальных животных – спустя четыре недели (вторая фаза эксперимента). Выделяли опухоли и фиксировали в жидкости Карнуа, заливали в парафин, приготовляли срезы толщиной 5 мкм и после депарафинирования окрашивали по методу Карнаухова акридиновым оранжевым (АО) («Sigma», США). Люминесцентно-спектральные исследования проводились по методу Карнаухова [4,5]. Непосредственно после окраски АО проводили исследования отдельно для ядер и цитоплазмы опухолевых клеток методом микроспектрального флуоресцентного анализа с помощью двухволнового микрофлуориметра «Радикал ДМФ-2» (Россия) [4]. Функциональную активность синтетического аппарата опухолевых клеток (синтетическую активность) определяли по параметру α, представляющему собой отношение интенсивностей флуоресценции в красной (640 нм) области спектра, обусловленной димерами красителя, связанными с односпиральными нуклеиновыми кислотами (НК1), и в зеленой (530 нм) области спектра, обусловленной мономерами красителя, интеркалированными в двухспиральные нуклеиновые кислоты (НК2), в клетках, окрашенных АО. Было показано, что при определённых условиях окрашивания клеток АО изменения параметра α связаны с изменением количества РНК (односпиральные НК) на единицу ДНК (двухспиральные НК) в целой клетке. Определяли параметр α как отношение интенсивности полос в красной к зеленой областях спектра, что соответствует отношению в клетке односпиральных и двуспиральных нуклеиновых кислот. [4,5,6,7] Достоверность различий средних величин определяли с применением t критерия Стъюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Под влиянием СНЧ ПеМП интенсивностью 50 мТл через четыре недели ежедневных процедур в 100% случаев наблюдалось уменьшение размеров опухоли. Анализ сравнительных оценок среднего объема опухоли между выборками демонстрировал эффективность влияния СНЧ МП в сочетании с ХП – 0,78 ± 0,24 см^3, при ХП – 1,57 ± 0,98 см^3 и в контроле – 9,6 ± 1,3 (P<0,001) см^3. При использовании повышенных доз цитостатика противоопухолевая эффективность составила 92%, однако сопровождалась 30-40% гибелью животных опухоленосителей. Сочетание воздействий СНЧ МП и ХП практически не изменяло величину противоопухолевого эффекта, но летальность животных снизилась до 10-15%. При этом, частота случаев опухолевой прогрессии уменьшилась в 2 раза по сравнению с ХП. В отличие от них, в группе с введением только ХП, после окончания курса химиотерапии уже через две недели не рассосавшиеся опухоли в 35% случаев возобновляли свой рост.

При изучении характерных спектров люминесценции цитоплазмы и ядер опухолевых клеток было обнаружено, что на первой фазе эксперимента во всех группах спектры представлены двумя полосами излучения в зеленой (530 нм) и красной (640 нм) полосах спектра, примерно одинаковой интенсивности. Во второй фазе эксперимента в контрольной группе эта тенденция сохраняется. Однако, в группе ХТ, даже после возобновления роста опухоли, в спектре люминесценции ядер значительна уменьшается интенсивность второй полосы (640 нм), а в группе СНЧ ПеМП спектр люминесценции представлен практически одной полосой излучения (530 нм), аналогичная ситуация наблюдается для цитоплазмы.

Для слежения за развитием процесса недостаточно спектров люминесценции одиночных клеток. Необходимо получить информацию о поведении целой популяции опухолевых клеток. С этой целью удобно характеризовать спектр люминесценции цитоплазмы и ядра каждой из множества клеток одним числовым параметром α, т.е. изменение спектров можно представить в количественной форме и проследить таким образом за изменениями функционального состояния целой популяции опухолевых клеток. В каждой группе были зарегистрированы спектры люминесценции ста опухолевых клеток, дана количественная.характеристика каждой их них по величине параметра α и.построены гистограммы распределения этого параметра для целой популяции с45 на этапах эксперимента.

На рис.1 и 2 представлены суммарные гистограммы распределения по параметру α цитоплазмы и ядер клеток с45 первой фазы эксперимента. При росте опухоли (контрольная группа) гистограммы имеют унимодальную форму с резким сдвигом вправо, значения параметра α,лежат в границах 4,2-7,4 у.е. На первой фазе эксперимента в контрольной группе при росте опухоли получены самые высокие средние значения параметра α: цитоплазмы α=5,28 ±0,13 у.е., для ядер α=4,47 ±0,55 у.е. .Высокие показатели параметра α свидетельствуют о высокой синтетической активности как в ци-

топлазме, так и в ядре опухолевой клетки. При ХТ гистограммы также имеют только один максимум со сдвигом влево, значения параметра α для цитоплазмы, лежат в границах 1,3-3,9 у.е., для ядер – 1,55-2,8 у.е. При воздействии СНЧ ПеМП гистограмма распределения по параметру α цитоплазмы растянута имеет бимодальную форму, значения α лежат в границах 0,77-2,6 у.е., гистограмма распределения по параметру α для ядер имеет другую форму, близкую к группе ХТ – унимодальна с резким сдвигом влево, значения параметра α,лежат в границах 1,2-2,6 у.е. Средние значения параметра при сравнении с контролем в группах ХТ и ХТ с СНЧ ПеМП для цитоплазмы достоверно ниже в 3 и 2,3 раза (α=1,75 ±0,11 у.е и α=2,30 ±0,06 у.е (P<0,001) соответственно.), эта тенденция сохраняется и для ядер. (α=1,8 ±0,11 у.е и α=2,10 ±0,09 у.е. (P<0,001) соответственно). Эти данные указывают на снижение синтетической активности клеток опухоли в опытных группах.

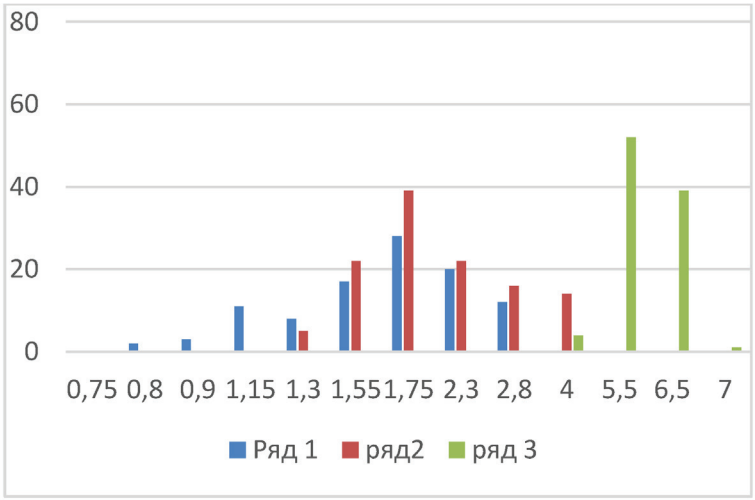

Рис. 1. Суммарные гистограммы распределения по параметру α цитоплазмы клеток С45 на первой фазе эксперимента: ряд 1 – ЦФ и СНЧ ПеМП; ряд 2 – ЦФ; ряд 3 – контроль. По оси ординат – количество клеток, по оси абцисс – величина параметра α

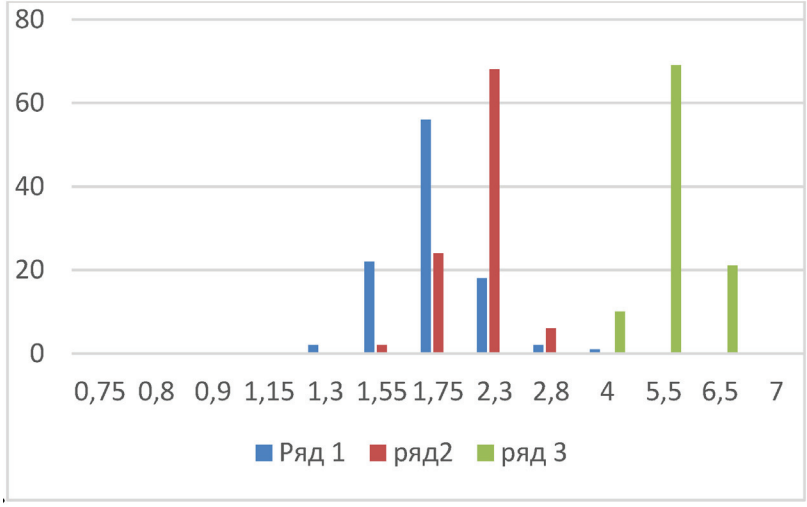

Рис. 2. Суммарные гистограммы распределения по параметру α ядер клеток С45 на первой фазе эксперимента: ряд 1 – ЦФ и СНЧ ПеМП; ряд 2 – ЦФ; ряд 3- контроль. По оси ординат – количество клеток, по оси абсцисс – величина параметра α

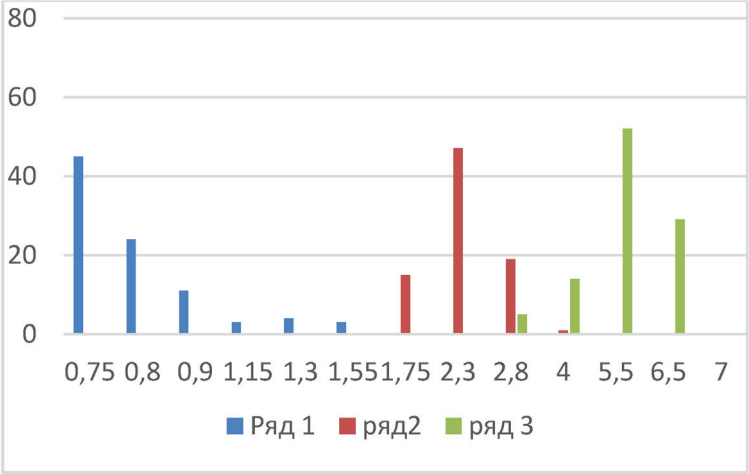

Рис. 3. Суммарные гистограммы распределения по параметру α цитоплазмы клеток С45 на второй фазе эксперимента:
ряд 1 – ЦФ и СНЧ ПеМП; ряд 2 – ЦФ; ряд 3 – контроль. По оси ординат – количество клеток, по оси абсцисс – величина параметра α

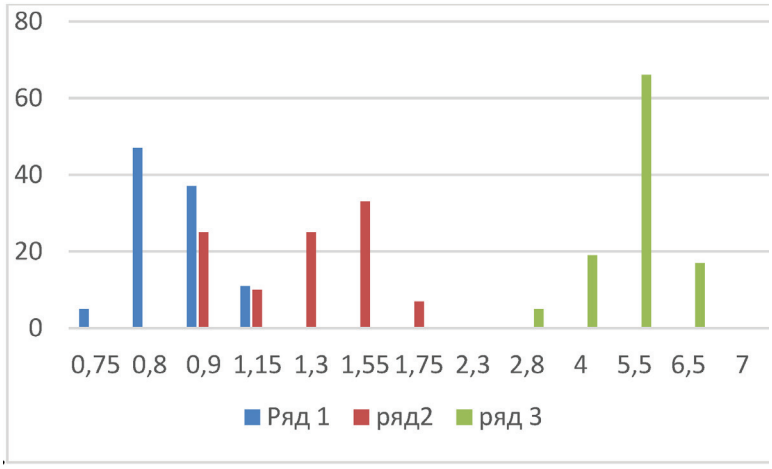

Рис. 4. Суммарные гистограммы распределения по параметру α ядер клеток С45 на втором этапе опыта:
ряд 1 – ЦФ и СНЧ ПеМП; ряд 2 – ЦФ; ряд 3 – контроль. По оси ординат – количество клеток, по оси абсцисс – величина параметра α

На рис. 3 и 4 представлены суммарные гистограммы распределения по параметру α цитоплазмы и ядер клеток с45 второй фазы эксперимента. При росте опухоли (контрольная группа) гистограммы приобретают симметричную форму с одним ярко выраженным максимумом, значения параметра α, лежат в границах 2,8-6.8 у.е. Средние значения параметра α высокие: цитоплазмы α=5,0 ±0,11 у.е., для ядер α=5,4 ±0,3 у.е. Это свидетельствует о высокой синтетической активности всей популяции опухолевых клеток. В остальных опытных группах гистограммы распределения α цитоплазмы имеют унимодальную форму, однако.в группе с СНЧ ПеМП отмечается резкий сдвиг влево, в то время как в группе с ХТ гистограмма симметрична. Значения параметра α, лежат в границах: для ХТ – 1,78-2.7 у.е., для СНЧ ПеМП-0,75-1,5 у.е. При анализе гистограмм распределения параметра α для ядер обнаружено в группе СНЧ ПеМП.резкий сдвиг влево- унимодальная форма, значения параметра α, лежат в границах 0,75-1.1 у.е., при ХТ – бимодальная растянутая форма гистограммы, значения параметра α, лежат в границах 0,9-1.78 у.е. Средние значения параметра для цитоплазмы при сравнении с контролем в группах с ХТ и.СНЧ ПеМП достоверно ниже в 2 и 4,4 (α=2,5 ±0,1 у.е и α=1,13 ±0,1 у.е соответственно(.P≤0,05), При сравнении опытных групп между собой средние значения этого параметра в группе

с СНЧ ПеМП в 2,2 раза ниже, чем при ХТ (P≤0,05.) В группе с ХТ для ядер выделяется два пула клеток со средними.α=1,56 ±0,3у.е. и α=0,92 ±0,1у.е, что в 3,5 и 5.9 раз ниже значений контроля.(P≤0,05).). В группе СНЧ ПеМП- средние α=0,77 ±0,01 у.е, что.в 7 раз ниже контроля и в в 2 раза ниже значений в группе ХТ. (P<0,001).

Таким образом, нами было зафиксировано достоверное уменьшение показателя синтетической активности клеток опухоли в опытных группах на всех этапах эксперимента. Причем, на заключительных этапах эксперимента, при действии СНЧ ПеМП в сочетании с ХТ синтетическая активность была самая низкая у всего пула опухолевых клеток исследованной популяции, в то время как при действии только ХТ, снижение синтетической активности наступает неравномерно, особенно в ядрах клеток с45, о чем свидетельствует.биполярная форма гистограммы распределения параметра α. Очевидно, СНЧ ПеМП режиме селективных частот – 0,03-0,3-3-9Гц способно оказывать опосредованное синхронизирующее влияние на состояние опухоли в результате чего, сочетание этого фактора с ХТ способствовало подавлению синтетической активности большинства клеток опухоли С45.

Заключение

Полученные данные представляют собой научный интерес и могут быть использованы с целью выбора оптимальных параметров СНЧ ПеМП для моделирования путей снижения синтетической активности опухолевых клеток и усиления противоопухолевой эффективности химиотерапии.

Список литературы

1. Бинги В.Н. Магнитобиология: эксперименты и модели. – М: Изд-во «МИЛТА», 2002. – 592.

2. Гудков А.Б., Карпин В.А., Кострюкова Н.К., Ловкина Е.С.Биологические эффекты сверхслабого магнитного поля. – М: Изд-во «Экология человека», 2004. – 5 с.

3. Илларионов В.Е. Магнитотерапия.-М: Изд-во «ЛИБРОКОМ», 2009. – 136 с.

4. Карнаухов В.Н. Спектральный анализ в клеточном мониторенге состояния окружающей среды.-М: Изд-во «Наука», 2001. – 186.

5. Карнаухов В.Н. Люминесцентный анализ клетки.-Пущино, 2004. – 178 с.

6. Шейко Е.А., Мордань Т.А., Пиль Э.А. Влияние НИЛО на флуоресцентные характеристики лимфоцитов крови в эксперименте//Вопросы онкологии. – 1999. – №3. – С.283-286.

7. Шейко Е.А. Использование флуоресцентных характеристик для контроля и ценки эффективности лазерной терапии в эксперименте // Перспективы развития научных исследований в следующим столетии: сборник. – Ростов-на-Дону, 2001. – С.261-271.

8. Шейко Е.А., Шихлярова А.И. Влияние сверхнизкочастотных магнитных излучений на на тимоциты и лимфоциты крови крыс с опухолями при химиотерапии // Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине: тезисы докл. Междун. конгр.(С-Петербург, 03-07.07.2006). – СПб., 2006. – С.134.

9. Шихлярова А.И. Роль биотропных параметров электромагнитных полей в повышении неспецифической противоопухолевой резистентности: Автореф. … дис. докт. биол. наук. – Ростов н/Д, 2001. – 50 с.

10. Шихлярова А.И., Шейко Е.А., Марьяновская Г.Я. и др. Влияние сверхнизкочастотного машнитного поля со сканированием частоты на жизнеспособность опухолевых клеток саркомы 45 в опытах in vitro // Медицина:новое в теории и клинической практике:тезисы докл.3й междун.конф. (Дубай (ОАЭ), 24-26 апр.2013 г.). – Акад.журнал Запад.Сибири. – 2013. – 32(45), Т.9. – С.18.