

УДК [612.014.426:616-006.3.04-085.277.3]-092.9

К РЕШЕНИЮ ЗАДАЧ ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ МАГНИТНОГО ПОЛЯ

Филатова Е.В., Шихлярова А.И., Шевченко А.Н., Куркина Т.А., Селезнев С.Г.,
Хомутенко И.А., Бабиева С.М., Швырев Д.А., Тараканов М.В.

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

С учетом задач трансляционной медицины возрастает актуальность повышения эффективности химиотерапии опухолей на основе междисциплинарных подходов, позволяющих применять разномодальные воздействия. В работе изучено влияние электромагнитного поля в режиме сканирования частоты от 1 до 150Гц (СК МП), индукцией 20мТл на рост саркомы 45 у белых беспородных крыс-опухоленосителей при введении цитостатиков (циклофосфан, цисплатин) в перитуморальное пространство. Модуляция СК МП химиотерапевтического эффекта была отражена показателями уменьшения объема С-45 в 2 раза по сравнению с монохимиотерапией при исходном значении 3-4см³, а при меньшем объеме (около 1 см³) - полной регрессией опухоли в 100% случаев. Применение СК МП в самостоятельном варианте воздействия на опухоли крупных размеров способствовало выраженному торможению их роста. Инволютивная динамика роста С-45 при одновременном воздействии физическим и лекарственным факторами сопровождалась устойчивым поддержанием системных биоадаптивных процессов со стороны иммунных, эндокринных органов, антистрессорных реакций. Полученные результаты могут служить экспериментальным обоснованием для трансляции нового технологического решения химиотерапии в клинику.

Ключевые слова: магнитное поле, химиотерапия, саркома 45.

ON SOLUTION OF TRANSLATIONAL MEDICINE IN EXPERIMENTAL ANTITUMOR THERAPY USING MAGNETIC FIELDS

Filatova E.V., Shikhlyarova A.I., Shevchenko A.N., Kurkina T.A., Seleznev S.G.,
Khomutenko I.A., Babieva S.M., Shvyrev D.A., Taracanov M.V.

Rostov Research Oncologic Institute Ministry of Health of Russia, Rostov - na-Donu, e-mail: lenafeel@mail.ru

Given the challenges of translational medicine increases the relevance of increasing the efficiency of cancer chemotherapy based on interdisciplinary approaches that apply different modalities of exposure. The paper studied the influence of the electromagnetic field in the scanning mode frequency from 1 to 150Hz (UK MP), induction 20mTl growth of sarcoma in 45 white rats with tumors when administered cytostatics (cyclophosphamide, cisplatin) in the peritumoral space. Modulation SC MF chemotherapeutic effect was recorded volume reduction rate C-45 2 times in comparison with the initial value when monochemotherapy 3-4cm³, while a smaller volume (about 1 cm³) - Complete tumor regression in 100% of cases. Application independent MP in the UK version of the impact on the large size of the tumor to promote the expression inhibition of their growth. Involuntary growth dynamics of the C-45, while the impact of natural and medicinal factors accompanied by the maintenance of a stable system bioadaptive processes by the immune, endocrine organs, antistress reactions. The results can serve as a justification for the experimental broadcast of new technological solutions in the chemotherapy clinic.

Keywords: magnetic field, chemotherapy, sarcoma 45.

Одной из актуальных проблем трансляционной медицины, благодаря которой в клиническую практику внедряются наиболее значимые достижения фундаментальной науки, является разработка подходов эффективной терапии злокачественных опухолей. К числу приоритетных задач относится поиск и внедрение сочетанных методов лечебного воздействия на организм и опухоль стандартных (консервативных и оперативных) с дополнительными факторами – модификаторами терапии рака. Для ее решения

используются различные междисциплинарные подходы, включая биофизические взаимодействия на нано – и волновом уровнях в диапазонах лазерного, магнитного, ультразвукового излучений. Важной проблемой остается увеличение доставки химиопрепаратов в опухоль, поскольку существует задача повышения эффективности химиотерапии в дозировках, токсичность которых находится на пределе переносимости. В настоящее время активно разрабатываются методы применения дополнительных к химиотерапии электромагнитных воздействий, ставящих целью усилить эффект химиотерапии [1, 5].

Влияние магнитного поля (МП) на организмы, особенно в условиях развития злокачественной опухоли, носит сложный характер, приводя к тонким изменениям физиологических процессов на всех уровнях его организации. В экспериментальных и клинических исследованиях установлено, что МП усиливает транспорт веществ через мембраны клеток опухоли, увеличивает поглощение тканями кислорода, способствует образованию макроэргических соединений, в результате чего происходит активация биосинтетических и окислительно-восстановительных процессов [4].

В трудах основоположников биофизики рака Н.М. Эмануэля, Р.Е. Кавецкого, Б.Н. Тарусова, Е.П. Сидорик, Я.И. Ажипы, Г.М. Франка представлены убедительные данные о сигналах электронного парамагнитного резонанса от различных видов опухолей у животных и человека, в том числе, саркомы 45, саркомы М-1, саркомы Иенса, карциномы Герена, лимфосаркомы Плисса, рака желудка и рабдомиосаркомы человека, а также других солидных и асцитных опухолей, источником которых являются парамагнитные центры и свободные радикалы. Н.М. Эмануэль показал, что некоторые парамагнитные центры, регистрируемые в перерождающихся тканях и в развивающихся опухолях, «отсутствуют» в нормальных тканях [6]. Очевидно, альтернативой опухолевым осцилляциям и ее частотному хаосу может служить ограничение частотного разброса путем навязывания жесткого линейного режима сканирования с многократной периодичностью повторения фронта возмущения от минимума к максимуму. Это воздействие может быть эффективным в отношении нарушения частотного контура опухолей, а так же получения структурно-функциональных пробоев на их клеточном уровне, то есть возможности изменения потока заряженных частиц через мембрану опухолевых клеток, высокой variability мембранного потенциала [7,8], повышения проницаемости биомембран и клеточных барьеров к химиопрепаратам, а ,следовательно, увеличение их доставки в опухоль.

В связи с этим возникла необходимость выяснения возможности монотерапевтического влияния сканирующих магнитных полей (СК МП) на рост злокачественных новообразований, а затем выявления эффективности полимодального воздействия,

включающего лекарственный и физический факторы в эксперименте как обоснование для дальнейшего использования в клинике.

Цель исследования

Изучить влияние сканирующих электромагнитных полей на рост опухоли и возможность повышения эффективности экспериментальной химиотерапии при их сочетанном воздействии.

Материалы и методы

Опыты проводились на 78 белых беспородных крысах-самцах с перевивной саркомой 45, соблюдая международные нормы и стандарты гуманного обращения с животными[2]. Штамм клеток С-45 предоставлен институтом канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Переменное магнитное поле в сканирующем режиме частот от 1 до 150 Гц, индукцией 20 мТл (СК МП) и постоянное магнитное поле, индукцией 20 мТл создавалось магнитотерапевтическим аппаратом «Градиент-4М». Методика экспериментальной химиотерапии осуществлялось следующим образом: под капсулу краевой зоны опухоли двукратно с интервалом 5 дней производили медленное, капельное введение раствора химиопрепарата (ХП) в количестве 0,5 мл концентрацией 0,5 мг/мл и одновременно осуществляли двустороннее воздействие на опухоль магнитным полем с помощью разнополюсных индукторов. По окончании эксперимента животных декапитировали, определяли весовые параметры тимуса, надпочечников. Осуществляли идентификацию интегральных адаптационных реакций по показателям лейкограммы Шиллинга в мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимза, посчитанных на 200 клеток. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием компьютерной программы Statistika 6.0. с определением достоверности различий по t-критерию Стьюдента.

Результаты

В опыте на 30 беспородных крысах-самцах с перевитой под кожу спины опухолью С-45 по достижению объема около $3,0 \text{ см}^3$ было начато локальное воздействие СК МП экспозицией 10 минут без введения ХП. Продолжительность эксперимента составляла 3 недели — по 1 сеансу в день в течение 5 дней, двух дней перерыва с аналогичной дальнейшей последовательностью воздействий СК МП.

Как видно из табл.1, эффект сканирующего режима СК МП на рост С-45 поздних сроков развития заключался в сдерживании опухолевой прогрессии и был выражен в нелинейной динамике средних общегрупповых показателей объема.

При проведении межгруппового сопоставления показателей начального, максимального и минимального объемов С-45 были установлены количественные характеристики объективизации эффекта. Максимальная разница значений $V_{\text{оп}}$ в контроле между $F_{\text{max}}-F_{\text{исх}}$

составила 19,14 см³, в то время как в основной группе – 11,64 см³, т.е. в 1,6 раза меньше.

Таблица 1

Показатели объема опухоли после локального воздействия СК МП

	Начальный V _{оп} (см ³)	Максимальный V _{оп} (см ³)	Минимальный V _{оп} (см ³)
Основная группа, n=15	3,09±0,85	14,73±1,28*	1,43±0,30*,**
Контроль, n=15	2,96±0,76	22,1±3,43	16,97±2,82

Примечание: *-различия между показателями максимальных и минимальных значений объемов опухоли у крыс основной и контрольной групп достоверны (p<0,001); **-различия между показателями начального и минимального значения объемов опухолей у крыс основной группы достоверны(p<0,001).

Судя по показателям минимального объема С-45 можно было убедиться в том, что воздействия СК МП способствовало выраженному регрессированию опухоли, т.к. значения V_{оп} у крыс основной группы были меньше, чем в контроле в 12 раз. Кроме того были изучены некоторые интегральные показатели адаптивного статуса и неспецифической резистентности под влиянием СК МП, которые представлены в табл. 2.

Таблица 2

Интегральные показатели адаптивного статуса у крыс с саркомой 45 под влиянием СК МП

Группы животных	Масса тимуса, мг (M _т)	Масса надпочечников, мг (M _{нд})	Коэфф. M _т /M _{нд}	Общие адаптационные реакции, %		
				Тренировка	Активация	Стресс
Основная n=15	369,2±52,5*	50,4±3,8*	7,38*	40*	20	40*
Контроль n=15	123,7±13,2	68,8±2,7	1,78	20	20	60

Примечание: * - различия между показателями основной и контрольной группы достоверны, p<0,001.

О нормализации гомеостатических параметров под влиянием СК МП свидетельствовало увеличение в 3,0 раза показателей тимуса, снижение в 1,4 раза показателей массы надпочечников, что позволило ввести расчетный коэффициент их соотношения и определить косвенно межсистемные отношения эндокринного и иммунного статуса организма. Оказалось, что Коэффициент (M_т/M_{нд}) в основной группе животных превышает значения в контроле в 4,3 раза, указывая на повышение адаптивного потенциала организма. Свидетельством этому служили показатели соотношения антистрессорных

реакций и стресса: доля адаптационных реакций тренировки и активации, характеризующихся физиологическим типом изменений, в группе животных-опухоленосителей с воздействием СК МП превышала таковую в контроле в 1,5 раза. Соответственно этому доля стрессорных реакций была выше на такую же величину. Таким образом, проведение испытаний противоопухолевого влияния СК МП свидетельствовало о перспективности его использования в экспериментальной химиотерапии опухолей.

В экспериментах по изучению противоопухолевого влияния СК МП в сочетании с перитуморальным введением циклофосфана *in vivo* были получены следующие результаты.

В первой серии опытов на 21 крысе с С-45с исходными значениями объема опухоли около 1 см³ непосредственным результатом воздействия на зону опухоли у крыс (n=7) СК МП в период перитуморального введения циклофосфана (50мг/кг) явилась практически полная регрессия саркомы 45. Так, при средних значениях объема до воздействия = 0,9±0,06см³, показатели V_{оп} после сочетанного воздействия ЦФ+СК МП уменьшились до = 0,08±0,02см³, а затем окончательно регрессировали, в то время как в группе крыс (n=7) с монотерапией циклофосфаном наблюдалась колебательная динамика показателей объема С-45 от 1,3 до 1,8 см³, а в контроле (n=7) показатели были максимально высокими в среднем V_{оп} = 3,2 см³. Выявленная высокая эффективность сочетанного воздействия на рост саркомы 45 с исходными объемами около 1 см³, поддавшимися регрессии в 100% случаев, свидетельствовала о необходимости дальнейшего изучения противоопухолевого влияния СК МП в условиях экспериментальной химиотерапии опухолей больших объемов, достигших около 4 см³. Результаты представлены на рис. 1.

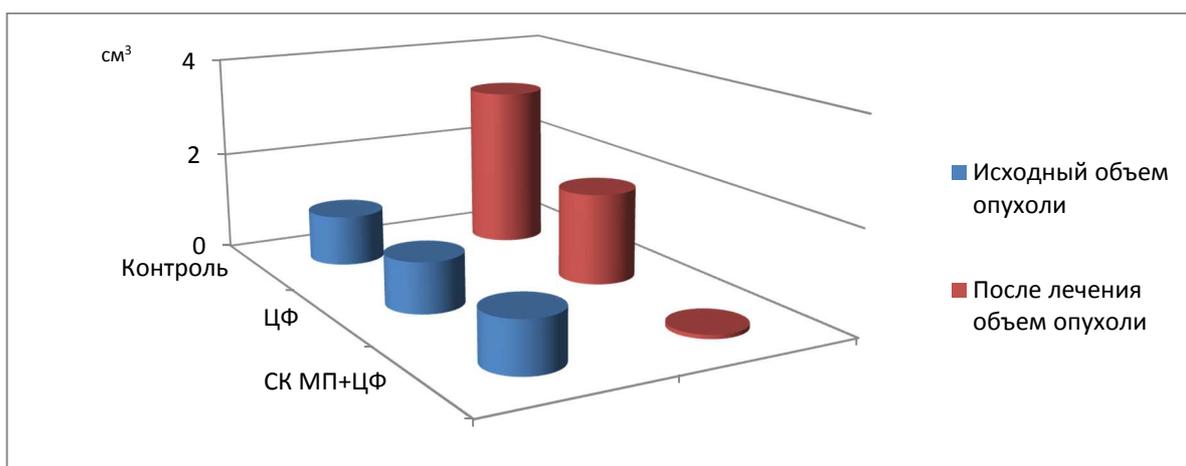


Рис.1. Динамика роста саркомы 45 у крыс с исходным объемом опухоли около 1 см³ под влиянием циклофосфана в сочетании с СК МП

В следующей серии опытов на 27 крысах с С-45 объемом более 4 см³ после 5-ти сеансов воздействия на опухоль СК МП с двумя перитуморальными введениями ЦФ (в 1 и 5-й день) можно было констатировать, что сочетание разномодальных факторов взаимно

усиливает ингибирующее влияние на крупные опухоли. Как видно из табл.3 противоопухолевый эффект полимодальных воздействий в основной группе подтверждается данными об уменьшении объема С-45 в 3,8 раза по сравнению с контролем и в 2 раза – относительно монотерапии циклофосфаном в группе сравнения (табл. 3).

Таблица 3

Значения объемов опухоли и показателей адаптивного статуса крыс с саркомой 45 под влиянием перитуморального введения циклофосфана и воздействий СК МП

Группы животных	Исходный объем С-45	Конечный объем С-45	Масса тимуса, мг (M _T)	Масса надпочечников, мг (M _{нд})	Коэфф. M _T /M _{нд}	Коэфф. АС/С
1 гр. n=9 Введение ЦФ	4,20±1,53	3,90±1,12*	48,3±3,5	51,7±4,2	0,9	0,42
2 гр. n=9 ЦФ+СК МП	3,9±1,61	1,9±0,53 ^{*,**}	83,8±10,3 ^{*,**}	44,6±6,1	1,9 ^{*,**}	1,5 ^{*,**}
3 гр. n=9 Контроль	4,05±1,49	7,2±1,58	61,5±5,12	56,8±11,4	1,07	0,67

Примечание: * - различие показателей при сравнении с контролем достоверно, p<0,001

** - различие показателей при сравнении 1-ой и 2-ой опытных групп достоверно, p<0,001.

Необходимо подчеркнуть, что инволютивная динамика С-45 больших объемов при одновременном воздействии на опухоль физическим и лекарственным агентами сопровождалось более устойчивым поддержанием гомеостатических параметров. Так, показатели массы тимуса, коэффициенты соотношения тимуса и надпочечников, а также антистрессорных реакций превышали таковые в группе с монотерапией ЦФ в 1,7, 2 и 3,6 раза соответственно. Уменьшение этих показателей в контроле было менее выраженным, чем в группе с ЦФ, однако, в целом демонстрировало динамику угнетения иммунной и эндокринной систем со снижением адаптационного потенциала.

На основании полученных эффектов воздействия на опухоль и организм можно констатировать, что сочетание разномодальных факторов (ЦФ+СК МП) взаимно усиливает ингибирующее влияние на рост опухоли с одной стороны, а с другой, обеспечивает сохранение нормотипов интегральных адаптационных реакций, о чем свидетельствует коэффициент соотношения антистрессорных реакций и стресса, а так же сохраняются ключевые звенья иммунного и эндокринного статуса организма. Необходимо указать также на факт нетрадиционного применения циклофосфана, который обычно используется в эксперименте путем внутривенного введения или в брюшную полость как менее токсичные

варианты лечения. Очевидно, что в результате перитуморального введения циклофосфана СК МП могло повлиять на проникновение препарата в ткани опухоли, что, по-видимому, связано с влиянием на механизмы переноса электрического заряда мембран опухолевых клеток. При этом, токсическое влияние на организм не увеличивалось, т.к. случаев диареи, снижения веса, выявления токсической зернистости в нейтрофилах не отмечалось.

Опыты с другим цитостатиком – цисплатином свидетельствовали, что СК МП усиливает проникновение препарата через мембраны опухолевых клеток. Во-первых, это подтверждалось результатами исследования, проведенными ранее на клеточной взвеси опухоли с помощью потенциалозависимых флуоресцентных зондов: наблюдалось двукратное увеличение свечения. При этом СК МП увеличивал мембранный потенциал живых опухолевых клеток на 80%, что воспроизводилось в 100% проведенных опытов[3]. Для ускорения диффузии цисплатина воздействие СК МП было усилено постоянной составляющей. Благодаря увеличению проницаемости мембраны для цитостатика, проявлялись морфологические признаки его повреждающего влияния, а именно, изменение размеров ядра, его разбухание, гиперхромность, а также усиление вакуолизации цитоплазмы. Во-вторых, данные о повышении проникновения цисплатина внутрь клеток дополнялись рутинным биохимическим определением содержания цисплатины в ткани опухоли. Определялось суммарное количество препарата в слоях опухоли на глубине до 1 см.

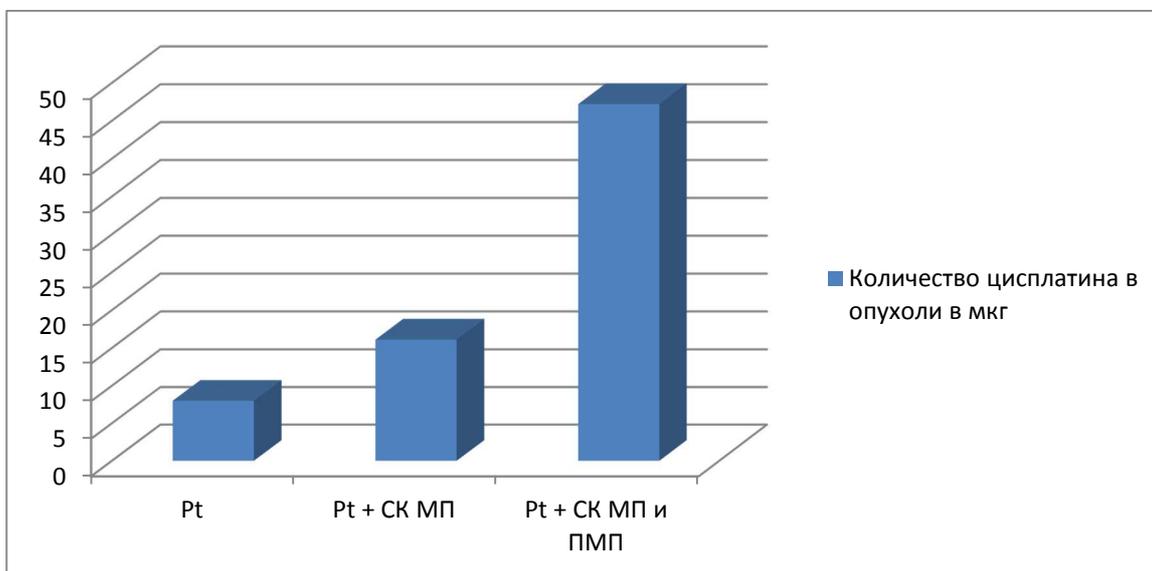


Рис.2. Накопление цисплатина в ткани опухоли под влиянием СК МП и ПМП

Из рис. 2 видно, что при введении под капсулу опухоли цисплатина и одновременном воздействии СК МП и ПМП повышается содержание ХПв тканях почти в 6 раз (47,2 мкг), при воздействии только СКМП в 2 раза по сравнению с опухолевыми тканями не получившими воздействие электромагнитных полей, содержание цисплатина в которых составляло 8 мкг. По разработанной методике был получен патент.

Заключение

Подводя итоги результатам исследований, выполненных на клеточном и организменном уровнях с применением СК МП на этапах проведения химиотерапии, можно прийти к следующему заключению. Проведение экспериментальной химиотерапии в монорежиме введения цитостатика циклофосфана в околоопухолевое пространство С-45 в опытах *in vivo* сопровождалось слабо выраженным эффектом торможения роста опухоли: минимальные объемы С-45 отличались от максимальных всего в 1,3 раза. При одинаковых исходных объемах С-45 в контрольной и опытной группах включением в схему противоопухолевой терапии СК МП различие показателей их минимальных и максимальных значений возросло в 10 раз. Это свидетельствовало о высокой эффективности бимодального воздействия на опухоль. Подтверждением этого стало биохимическое определение элементного содержания платины в ткани опухоли на примере перитуморального введения цисплатина с одновременным воздействием СК МП. При этом, содержание Pt на глубине около 1 см двукратно превышало контрольные значения, а при усложнении пространственной конфигурации поля с помощью постоянной составляющей, эффект проникновения цитостатика увеличился в 6 раз.

Очевидно, реализация одного из важных механизмов формирования локального отклика живых клеточных систем связана с изменением электрической активности мембран, а именно, величины мембранного потенциала. Сама единая электромагнитная природа внешнего сканирующего воздействия и электрически заряженной мембраны живой клетки обеспечивает биофизические условия перехода в иное функциональное состояние – гиперполяризации плазматической, митохондриальной, ядерной мембран на основе работы калиевых и натриевых каналов. Это способствует повышению проникновения цитостатиков вглубь опухолевой ткани путем мембранных механизмов трансформации сигнала опухолевых.

Кроме того, благодаря проводниковой роли СК МП, создание высокой концентрации цитостатика в перитуморальном пространстве, а затем в опухоли, не только оказало выраженное противоопухолевое влияние, но и смягчило токсический эффект на гомеостатические системы организма, что способствовало сохранению иммунно-гормональных регуляторных отношений. Показатели соотношения массы тимуса и надпочечников, а также соотношение клеточных элементов крови у крыс основной группы, включая содержание лимфоцитов, указывало на ограничение повреждающего влияния стресса и доминирование антистрессовых интегральных реакций организма.

Полученные результаты могут служить экспериментальным обоснованием для трансляции нового технологического решения химиотерапии в клинику.

Список литературы

1. Островская Л.А. Противоопухолевая эффективность совместного воздействия низкоинтенсивного электромагнитного поля и сверхмалых доз доксорубина / Л.А. Островская, М.И. Будник, Д.Б. Корман, Н.В. Блюхтерова, М.М. Фомина, В.А. Рыкова, Е.Б. Бурлакова // Радиационная биология. Радиоэкология. - 2003.- Т. 43. № 3. - С. 351–354.
2. Объединение специалистов по работе с лабораторными животными. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях - Санкт-Петербург 2012г. - 48с.
3. Тарнопольская О.В. Возможность определения цисплатина в клетках опухоли по флуоресценции АНС и ДСМ// Клиническая и экспериментальная морфология - 2013г. - т.6, №2 – С.117-118.
4. Шихлярова А.И. Роль биотропных параметров электромагнитных полей в повышении неспецифической противоопухолевой резистентности - Р-н-Д., 2001- С.50-51.
5. Шихлярова А.И. Регуляторное влияние сверхнизкочастотных магнитных полей на энергетический метаболизм мозга и печени крыс-опухоленосителей (на модели саркомы 45 и химического канцерогенеза) / А.И. Шихлярова, Г.К. Макаимов, Л.П. Барсукова, Г.Я. Марьяновская, А.А. Алаухова // Вестник Южного научного центра РАН – 2006г.- Т. 2. № 2. - С. 96–103.
6. Эмануэль Н.М. Биофизика рака - Киев, Наукова Думка, 1976.
7. Toshitaka Ikehara, Hisao Yamaguchi, and Hiroshi Miyamoto Effects of electromagnetic fields on membrane ion transport of cultured cells// The journal of medical investigation-1998 Vol.45, №1, P.47-56.
8. Bauréus Kochet Interaction between weak low frequency magnetic fields and cell membranes.// Bioelectromagnetics- 2003 Vol 24, №6, P.395-402.

Рецензенты:

Каймакчи О.Ю., д.м.н., ассистент кафедры онкологии ГОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону;

Горошинская И.А., д.б.н., лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону.