

ИЗМЕНЕНИЯ В ТКАНИ САРКОМЫ 45 БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ РЕЗОНАНСНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА

Брагина М.И.¹, Жукова Г.В.¹, Шихлярова А.И.¹, Бартенева Т.А.¹, Гудцкова Т.Н.¹, Ширнина Е.А.¹, Петросян В.И.², Триандафилиди Е.И.¹, Быкадорова О.В.¹, Мхитарян О.В.¹

¹ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов, e-mail: galya_57@mail.ru

²НПО «Телемак», Саратовский филиал ИРЭ РАН, Саратов, e-mail: vipsar1@rambler.ru

В экспериментах на белых беспородных крысах с перевивной саркомой 45 показано противоопухолевое действие двух различных факторов: низкоинтенсивного излучения СВЧ-диапазона с биоэффективной частотой 1 ГГц («резонансное излучение») и наночастиц магнетита в форме магнитной жидкости (10±2 нм). Электромагнитное воздействие было локализовано на голову животного, тогда как наночастицы магнетита вводили перитуморально. С помощью методов световой микроскопии, гистохимии и цитометрии изучены структурные изменения и особенности лейкоцитарной инфильтрации в ткани саркомы 45 под влиянием исследованных воздействий. При этом направленность системных перестроек нейроэндокринной регуляции оценивали по динамике характера и напряженности общих неспецифических адаптационных реакций организма. Показана связь выраженности противоопухолевого эффекта изученных факторов с особенностями лейкоцитарной инфильтрации ткани опухоли и характеристиками адаптационных реакций. При этом в случае использования резонансного излучения были отмечены гистохимические признаки повышения степени дифференцировки опухолевых клеток. Характерной особенностью эффективного действия НЧ магнетита явилось наличие крупных скоплений лимфоидных элементов в глубоких слоях опухоли. Полученные результаты расширяют представления о процессах в зоне опухоли при опосредованном действии слабых электромагнитных излучений и металлосодержащих наночастиц.

Ключевые слова: резонансное излучение, наночастицы магнетита, противоопухолевый эффект, ткань опухоли, лейкоцитарная инфильтрация, гистохимия, адаптационные реакции.

CHANGES IN SARCOMA 45 TISSUE OF WHITE RATS UNDER THE ACTION OF RESONANCE RADIATION AND MAGNETITE NANOPARTICLES

Bragina M.I.¹, Zhukova G.V.¹, Shikhlyarova A.I.¹, Barteneva T.A.¹, Gudtskova T.N.¹, Shirnina E.A.¹, Petrosyan V.I.², Triandafilidi E.I.¹, Bykadorova O.V.¹, Mkhitaryan O.V.¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Rostov, e-mail: galya_57@mail.ru

²RPA "Telemak", Saratov Branch of IRE RAS, Saratov, e-mail: vipsar1@rambler.ru

In experiments on white unbreed rats with transplanted sarcoma 45, antitumor effects of two different factors - low-intensity microwave radiation with a bioeffective frequency of 1 GHz ("resonance radiation") and magnetite nanoparticles in the form of a magnetic fluid (10 ± 2 nm) - was shown. The electromagnetic impact was localized on the head of the animal, while magnetite nanoparticles were introduced peritumorally. Using the methods of light microscopy, histochemistry and cytometry, structural changes and peculiarities of leukocyte infiltration in the tissue of sarcoma 45 under the influence of the studied factors were researched. At the same time, the direction of system rearrangements of neuroendocrine regulation was assessed by the dynamics of the character and tension of general nonspecific adaptational reactions of the organism. The relationship between the magnitude of the antitumor effect of the studied factors and the features of leukocyte infiltration of the tumor tissue and the characteristics of adaptational reactions was shown. In the case of using resonant radiation, histochemical signs of increasing the degree of differentiation of tumor cells were noted. A characteristic feature of the effective action of magnetite nanoparticles was the presence of large clusters of lymphoid elements in the deep layers of the tumor. The obtained results expand the of notions about the processes in the tumor zone under indirect action of weak electromagnetic radiations and metal-containing nanoparticles.

Keywords: resonance radiation, magnetite nanoparticles, antitumor effect, tumor tissue, leukocyte infiltration, histochemistry, adaptational reactions.

Разработка методов противоопухолевой терапии, направленных на мобилизацию естественных механизмов противоопухолевой резистентности, является актуальной проблемой фундаментальной и клинической медицины. В этой связи представляют интерес воздействия, способствующие активизации нейроэндокринной и иммунной систем и стимуляции иммунных процессов в зоне опухолевого роста. Ранее было показана возможность достижения выраженных противоопухолевых эффектов (вплоть до полной регрессии экспериментальных опухолей) с помощью низкоинтенсивных факторов электромагнитной и химической природы [1-3], а также с помощью металлосодержащих наночастиц [4]. При этом остаются мало изученными структурно-функциональные изменения в зоне опухоли. Известные сведения о связи между развитием злокачественного процесса и инфильтрацией ткани опухоли клетками иммунной системы весьма противоречивы [5; 6]. Исследование местных иммунных процессов, приводящих к повреждению опухолевых клеток, является необходимым этапом выяснения механизмов опосредованного действия нетрадиционных противоопухолевых факторов.

Целью работы явилось изучение структурно-функциональных изменений в зоне опухоли при эффективном действии низкоинтенсивного резонансного излучения СВЧ-диапазона и наночастиц магнетита.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на 68 белых беспородных крысах, самцах и самках, с перевивной саркомой 45 весом 160-270 г. При этом соблюдали международные правила гуманного обращения с животными [7]. Опухоль перевивали в заднюю боковую поверхность спины по стандартной методике, используя 0.5 мл 30% взвеси опухолевых клеток в физиологическом растворе. Терапию начинали по достижении опухолью размеров 0.7-1.2 см³, при которых спонтанная регрессия саркомы 45 маловероятна. Применяли лечебные факторы, отличавшиеся модальностью и локализацией воздействия.

В экспериментах на 38 животных (18 самцах и 20 самках) было использовано *резонансное излучение (РИ)* - электромагнитное излучение (ЭМИ) СВЧ-диапазона частотой 1 ГГц. Данное ЭМИ представляло интерес в связи с явлением избирательной радиопрозрачности воды и водных растворов (СПЕ-эффект), поскольку имело ту же частоту, что и одно из собственных излучений водосодержащих сред [2]. Воздействие осуществляли на голову и переднюю часть тела животного (не затрагивая зону роста опухоли) с помощью аппарата «Акватон» (НПО «Телемак», г. Саратов). Плотность потока мощности РИ не превышала 50 мкВт/см². Применяли амплитудную модуляцию излучения сигналом с биоэффективной частотой 7,8 Гц (шумановский резонанс) [8]. Воздействия проводили в течение 3-4 недель по 4 сеанса в неделю. Во время сеанса животное находилось в

плексигласовой камере, сконструированной с учетом норкового рефлекса. Изменение экспозиции в течение курса воздействий проводили в диапазоне 3-10 мин в соответствии с алгоритмами активационной терапии, направленными на развитие антистрессорных адаптационных реакций (АР) [3].

При изучении эффектов наночастиц (НЧ) магнетита (10 ± 2 нм) на 30 крысах-самцах применяли магнитную жидкость на водной основе АМ-01 (НПП «АМ-Куб», г. Екатеринбург) с намагниченностью насыщения 20 кА/м. После разведения магнитной жидкости физиологическим раствором НЧ магнетита вводили перитуморально на расстоянии 1.5-2 см от границ опухоли в разовой дозе 17.7 мг/кг дважды в неделю в течение 3 недель.

В ходе исследований эффектов выбранных факторов и в конце экспериментов по гематологическим показателям оценивали динамику характера и напряженности общих неспецифических адаптационных реакций организма (АР), в интегральном виде отражавших активность регуляторных систем [3]. По окончании курсов воздействий животные были декапитированы под эфирным наркозом. Фрагменты ткани опухоли фиксировали в жидкости Карнуа и после проводки заключали в парафин. Изменения в ткани опухоли изучали с помощью методов гистологии и гистохимии, используя окраску по Браше для выявления нуклеопротеидов, окраску по Ван Гизону – для выявления коллагена, а также обзорную окраску гематоксилин-эозином. Для морфометрических исследований использовали комплекс «САГА» на базе ПК. В экспериментах с применением НЧ магнетита также проводили цитометрическое исследование тканей опухоли и перитуморальной зоны с количественным определением лимфоидных элементов, принадлежавших к популяциям Т- и В-лимфоцитов, а также к естественным киллерным клеткам (НК).

При статистическом анализе полученных результатов использовали критерий Стьюдента и критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

Результаты

С помощью каждого из исследованных факторов, использованного без дополнительного применения радио- и химиотерапии, удалось получить выраженный противоопухолевый эффект не менее чем у 50% животных.

В таблице 1 представлены результаты курсового воздействия РИ в двух экспериментах: на 18 самцах и на 20 самках белых беспородных крыс. Как видно из таблицы, эффект был отмечен у 50% (самцы) и 60% (самки) животных, которые составили подгруппы 1 основных групп в каждом из рассматриваемых экспериментов. У большинства животных при эффективном действии РИ наблюдалось торможение роста опухоли в 2.4-4 раза. В отдельных случаях была отмечена частичная (самцы) и полная (самки) регрессия саркомы 45. Таким образом, в подгруппах 1 основных групп животных в рассматриваемых

экспериментах средние размеры опухолей по окончании курса воздействий в 3.4 раза и более превышали значения этого показателя в контрольных группах ($p < 0.01 - 0.05$).

Таблица 1

Противоопухолевый эффект РИ у крыс разного пола

Группы		Размеры саркомы 45, см ³	Эффекты
Самцы	Основная	1, n=6	17% - регрессия на 30-40%, 33% - торможение роста на 80%
		2, n=6	
	Контроль, n=6		11.0±1.2
Самки	Основная	1, n=6	10% - полная регрессия 50% - торможение роста на 71%
		2, n=4	
	Контроль, n=10		16,2±4,2

Примечание. ● – отличается от значений в контрольной группе, $p < 0.01 - 0.05$.

Результаты морфологического изучения ткани саркомы 45 свидетельствовали о существенных изменениях микрокартины опухоли под влиянием РИ (рис. 1, табл. 2). У крыс с частичной регрессией опухоли наблюдалось значительное (в 5-6 раз) увеличение толщины соединительнотканной капсулы с сохранением её непрерывности (рис. 1). Отмечались снижение митотической активности и плотности расположения клеток опухоли, а также частичное замещение ткани опухоли участками соединительной ткани со значительным (до 3 раз) увеличением числа лимфоидных элементов (лимфоцитов и плазмочитов) в опухолевой ткани (табл. 2, рис. 1).

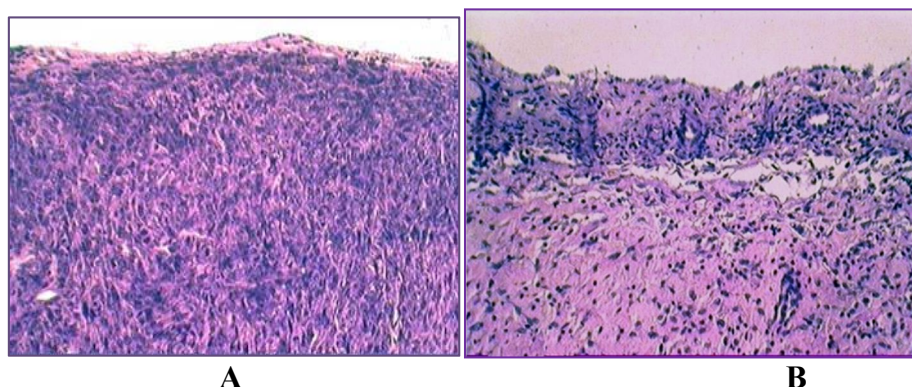


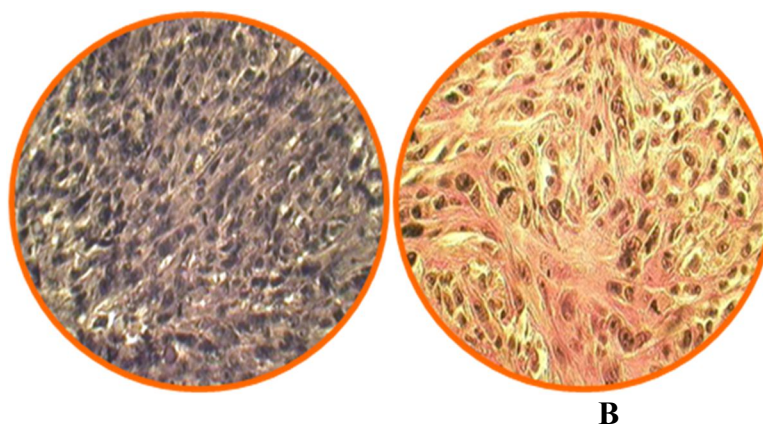
Рис. 1. Изменение микрокартины ткани саркомы 45 крыс-самцов под влиянием РИ. А. Рост опухоли в контрольной группе животных. Под тонкой капсулой (менее 45 мкм) находится сплошной массив плотно расположенных клеток веретеновидной формы. В. Частичная регрессия саркомы 45 под влиянием РИ. Утолщение капсулы (300 мкм), частичное замещение ткани опухоли участками соединительной ткани. Гематоксилин-эозин. X200

Изменение лимфопролиферативной активности и интенсивности лимфоидной инфильтрации в ткани саркомы 45 при эффективном действии РИ

Группы	Плотность клеток в поле зрения	Митотическая активность, ‰	Содержание лимфоидных элементов на 10^3 опухолевых клеток
Контроль	$42 \pm 6,5$	$14,4 \pm 2,1$	50.6 ± 5.3
Основная группа, п/гр.1	$22,1 \pm 2,8 \bullet$	$9,3 \pm 0,9 \bullet$	$147.0 \pm 17.6 \bullet$

Примечание. \bullet – отличается от значений в контрольной группе, $p < 0.05$; площадь одного поля зрения – 6787 мкм².

При окрашивании по Ван Гизону на препаратах ткани саркомы 45 у крыс-самцов контрольной группы наблюдались слабые следы коллагена, которые были выявлены только на отдельных участках (рис. 2А). В случаях торможения роста и частичной регрессии опухоли под влиянием РИ окраска, характерная для коллагеновых волокон, была заметно более интенсивной и наблюдалась на весьма значительных по площади участках опухолевой ткани (рис. 2В). Это позволяло предположить, что по крайней мере одним из эффекторных механизмов ингибирования роста саркомы 45 под влиянием РИ явилось повышение степени дифференцировки малигнизированных клеток [9].



А

В

Рис. 2. Изменение содержания коллагеновых волокон в ткани саркомы 45 при противоопухолевом действии РИ. А. Опухоль крысы контрольной группы. Практическое отсутствие признаков наличия коллагена в узких межклеточных пространствах. В. Частичная регрессия опухоли под влиянием РИ. Расширенные межклеточные пространства заполнены коллагеном. Ван Гизон. Х400

Введение НЧ магнетита в перитуморальную зону саркомы 45 также оказалось весьма эффективным. У 8 из 10 крыс-самцов были отмечены торможение роста более чем в 4 раза или практически полная регрессия опухоли (табл. 3).

Эффекты НЧ магнетита у крыс-самцов с саркомой 45

Группа животных	Размеры опухоли		
	Регрессия	Торможение роста	Без эффекта
МЖ, 110 мг/кг n=10	0,4±0,05●■ n=6	1,8±0,1● n=2	8,3±4,0 n=2
Контроль n=10	-	-	7,6±1,1 n=10

Примечание. ● – отличие от показателей в контрольной группе, $p < 0,05-0,01$; ■ – отличие от показателей при торможении роста опухолей, $p < 0,05$, t-критерий, критерий Манна-Уитни

Данные морфометрии клеток иммунной системы в зоне опухоли были сходны с результатами, полученными в экспериментах с использованием РИ. В случае выраженного торможения роста опухоли под влиянием НЧ магнетита было отмечено кратное увеличение числа лимфоидных элементов в пересчете на 10^3 клеток саркомы 45 – с $39,8 \pm 4,9$ до $118,3 \pm 13,7$ ($p < 0,01$). В рассматриваемом исследовании было проведено более подробное изучение клеток иммунной системы, инфильтрирующих опухоль, по сравнению с экспериментами с применением РИ. При этом в случае выраженных эффектов НЧ магнетита, помимо обширных участков клеток с дегенеративно-дистрофическими изменениями, в глубоких слоях опухоли были выявлены крупные скопления лимфоидных элементов (рис. 3).

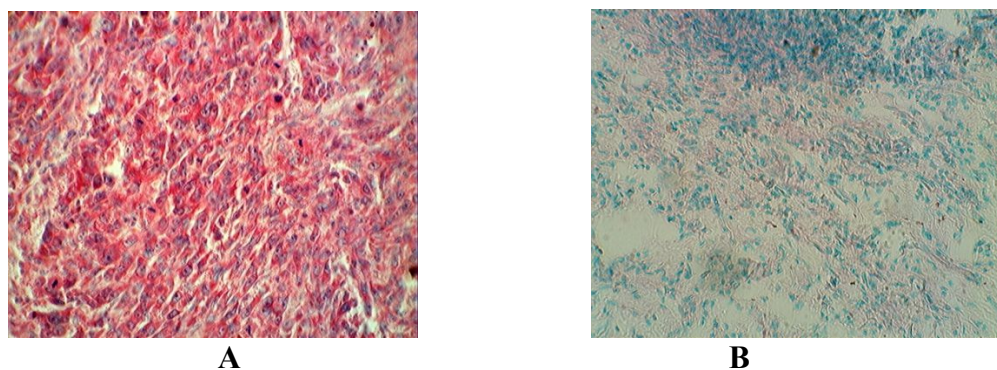


Рис. 3. Изменения микрокартины саркомы 45 под влиянием НЧ магнетита. Браше. Х400.
 А. Контрольная группа. Прогрессивный рост опухоли. Плотное расположение клеток, многочисленные фигуры митоза. В. Частичная регрессия опухоли под влиянием НЧ магнетита. Глубокие слои: дегенеративно-дистрофические изменения клеток опухоли, крупные скопления инфильтрирующих опухоль лимфоидных элементов

Также было проведено изучение состава лейкоцитарной инфильтрации в периферических участках саркомы 45 при выраженном торможении роста опухоли под влиянием НЧ магнетита (табл. 4). Было показано изменение качественного и количественного состава клеток лейкоцитарного ряда, инфильтрирующих субкапсулярную

зону опухоли. Наблюдалось появление макрофагов и тканевых базофилов, не выявленных гистохимически при росте саркомы 45, а также значительное увеличение числа лимфоцитов (в 2.4 раза), и особенно плазмоцитов (более чем в 12 раз).

Таблица 4

Содержание клеток иммунной системы в периферической зоне саркомы 45 при выраженном торможении роста опухоли под влиянием НЧ магнетита

Число иммунных клеток в поле зрения	Контроль, n=4	НЧ магнетита, n=4
Макрофаги	0	1,15±0,5●
Лимфоциты	13,1±2,4	32,2±4,3●
Плазмоциты	1,5±0,57	18,4±0,6●
Тканевые базофилы	0	0,58±0,1●

Примечание. Отличие от контрольных значений - ● – $p < 0,05-0,001$. Площадь поля зрения – 6787 мкм².

Интерес представляли результаты цитометрического изучения сдвигов в составе клеток лимфоидного ряда (Т- и В-лимфоцитов, естественных киллеров) в опухоли и перитуморальной зоне при регрессии саркомы 45 под влиянием НЧ магнетита. В обоих исследованных локусах отмечены сходные изменения – заметный сдвиг в сторону Т-лимфоцитов с увеличением относительного содержания этих клеток в 1.5 раза, с 50-55% до 77-85% (рис. 4).

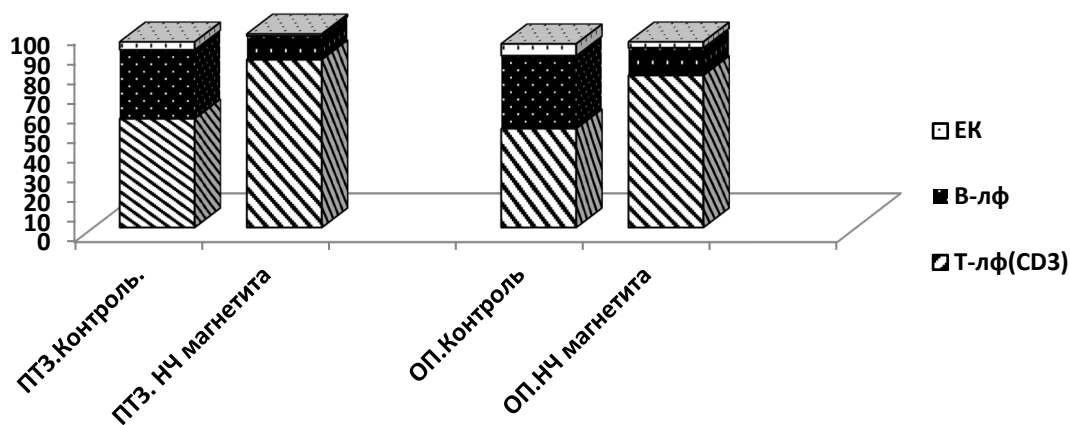


Рис. 4. Процентный состав лимфоцитов в перитуморальной зоне (ПТЗ) и ткани опухоли (ОП) при регрессии саркомы 45 под влиянием НЧ магнетита. Т-лф – Т-лимфоциты, В-лф – В-лимфоциты, ЕК – естественные киллерные клетки

Через две недели после начала курса воздействий с использованием исследованных факторов у животных контрольной группы, где отмечался прогрессивный рост саркомы 45, значительно снижалась частота развития антистрессорных без выраженных признаков напряженности АР. Преобладали АР стресс (не менее 50% случаев) и напряженные

антистрессорные АР (30% и более). Противоопухолевый эффект РИ и НЧ магнетита в большинстве случаев сопровождался развитием АР спокойной и повышенной активации [9]. Так, в экспериментах с использованием РИ у самцов и самок в случаях регрессии саркомы 45 было отмечено развитие стойкой АР повышенной активации. При эффективном воздействии НЧ магнетита в большинстве случаев наблюдалось развитие АР спокойной или повышенной активации.

Заключение

В результате проведенных исследований была получена морфофункциональная характеристика изменений в опухоли и лейкоцитарной инфильтрации ткани опухоли при опосредованном противоопухолевом действии резонансного излучения и наночастиц магнетита. При этом в случае резонансного излучения были отмечены признаки повышения дифференцировки опухолевых клеток, которая могла быть обусловлена активизацией регуляторных функций Т-лимфоцитов. Характерной особенностью влияния НЧ магнетита явилось наличие крупных скоплений лимфоидных клеток в глубоких слоях опухоли. Нуждается в выяснении вопрос о причинно-следственной связи локальных и системных изменений, обусловленных действием НЧ магнетита. Для дальнейшего изучения эффекторных механизмов противоопухолевого влияния резонансного излучения и НЧ магнетита необходимо иммуногистохимическое исследование процессов в зоне опухоли.

Список литературы

1. Tatarov I., Panda A., Petkov D. et al. Effect of magnetic fields on tumor growth and viability // *Comp Med.* – 2011. – V. 61, № 4. – P. 339-45.
2. Петросян В.И., Чесноков Б.П., Бриль Г.Е. и др. Онко-радиоволны биосферы: аквафазоволновая модель развития злокачественных новообразований. Ч. 1. Радиофизические основы модели // *Биомедицинская радиоэлектроника.* – 2014. – № 1. – С. 3-13.
3. Kit O.I., Shikhlyarova A.I., Zhukova G.V. et al. Activation therapy: theoretical and applied aspects // *Cardiometry.* – 2015. – № 7. – P. 22-29.
4. Шалашная Е.В., Горошинская И.А., Качесова П.С. и др. Структурно-функциональные и биохимические изменения в органах иммунной системы при противоопухолевом действии наночастиц меди в эксперименте // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2011. – Т. 152, № 11. – С. 552-556.
5. Бережная Н.М. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. I. Клетки и цитокины – участники воспаления // *Онкология.* – 2009. – Т. 11, № 1. – С. 6-17.
6. 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.

7. Kivinen T. The ethics of international animal law. Helsinki, 2014. <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/136413/tero%20kivinen%20the%20ethics%20of%20international%20animal%20law.pdf?sequence=1> (дата обращения: 04.09.2017).

8. Mulligan B.P., Persinger M.A. Experimental Simulation of the Effects of Sudden Increases in Geomagnetic Activity upon Quantitative Measures of Human Brain Activity: Validation of Correlational Studies // *Neuroscience Letters*. – 2012. – Vol. 516, №1. – P. 54-56. doi:10.1016/j.neulet.2012.03.054.

9. Jogi A., Vaapil M., Johansson M., Pahlman S. Cancer cell differentiation heterogeneity and aggressive behavior in solid tumors // *Ups. J. Med. Sci.* – 2012. – V. 117, № 2. – P. 217–224. doi: 10.3109/03009734.2012.659294.