© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-006.484:537.612:613.648

DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14021>

ISSN – 2073-8137

ИНГИБИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ИМПУЛЬСНЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ И ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА КУЛЬТУРУ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА T98G

И. А. Попов, А. И. Шихлярова, Э. Е. Росторгуев, М. А. Гусарева,
Н. Н. Тимошкина, Д. С. Потемкин, Ю. Ю. Арапова, В. В. Стасов

Ростовский научно-исследовательский онкологический институт,
Ростов-на-Дону, Россия

INHIBITING INFLUENCE OF IMPULSE MAGNETIC FIELDS AND IONIZING RADIATION ON THE CULTURE OF HUMAN T98G GLIOBLASTOMA CELLS

Popov I. A., Shikhliarova A. I., Rostorguev E. E., Gusareva M. A.,
Timoshkina N. N., Potemkin D. S., Arapova Yu. Yu., Stasov V. V.

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

В образцах культуры клеток глиобластомы человека T98G после лучевого воздействия выявлен максимальный уровень летальности. При сочетании воздействий ионизирующего излучения и ИМП с индукцией 15 мТл значения летальности оказались столь же высоки. Монофакторные воздействия ИМП как с индукцией 15 мТл, так и с индукцией 300 мТл способствовали снижению митотического индекса в 3,6–2,4 раза соответственно, а также увеличению в 2,4–2,5 раза летальности культуры относительно контроля. Полученные результаты свидетельствуют об ингибирующем влиянии импульсных магнитных полей на жизнеспособность злокачественных глиальных клеток и перспективе сопроводительной ТМС-терапии в нейроонкологии.

Ключевые слова: глиобластома T98G, импульсное магнитное поле, ионизирующее излучение

The maximal was observed in samples of T98G human glioblastoma cell culture after radiation exposure. Combination of ionizing radiation and impulse magnetic fields (IMF) with induction of 15 mT showed similarly high lethality values. Exposure to IMF alone with induction of 15 mT and 300 mT decreased the mitotic index by 3.6 and 2.4 times, respectively, and increased the culture lethality by 2.4–2.5 times compared to the control. The results demonstrate the inhibitory effect of impulse magnetic fields on the viability of malignant glial cells and the prospects of accompanying TMS therapy in neuro-oncology.

Keywords: T98G glioblastoma, impulse magnetic field, ionizing radiation

Для цитирования: Попов И. А., Шихлярова А. И., Росторгуев Э. Е., Гусарева М. А., Потемкин Д. С., Арапова Ю. Ю., Стасов В. В. ИНГИБИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ИМПУЛЬСНЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ И ИОНИЗИРУЮЩЕГО ОБЛУЧЕНИЯ НА КУЛЬТУРУ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА T98G. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2019;14(1.2):228–231. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14021>

For citation: Popov I. A., Shikhliarova A. I., Rostorguev E. E., Gusareva M. A., Timoshkina N. N., Potemkin D. S., Arapova Yu. Yu., Stasov V. V. INHIBITING INFLUENCE OF IMPULSE MAGNETIC FIELDS AND IONIZING RADIATION ON THE CULTURE OF HUMAN T98G GLIOBLASTOMA CELLS. *Medical News of North Caucasus*. 2019;14(1.2):228–231. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14021> (In Russ.)

ИМП – импульсное магнитное поле

В последнее десятилетие ежегодно отмечается рост числа новообразований головного мозга во всем мире [1, 2]. По данным 2018 года в Российской Федерации в год появляется около 32100 вновь выявленных больных с первичными опухолями центральной нервной системы, из них глиобластомы составляют 15,6 % [3]. Особое внимание уделено перифокальной зоне очага опухоли, как источнику 80 % всех рецидивов.

На этапе лучевой терапии развитие отека перифокальной зоны очага удаленной опухоли иницииру-

ет повышение внутричерепного давления, сдавление мозговых структур и может трансформироваться в болевой синдром за счет раздражения твердой мозговой оболочки [4]. В этой связи контроль перифокальной зоны в ближайшем послеоперационном периоде и при проведении лучевой терапии представляет собой актуальную проблему лечения злокачественных глиом головного мозга. Обсуждается потребность в развитии технологий вспомогательной терапии, к числу которых относится бесконтактная электромагнитотерапия [5, 6]. Особый интерес представляет

разработка алгоритмов дозирования переменного сверхнизкочастотного и постоянного магнитных полей с положительными неврологическими эффектами, возможностями их противоопухолевого, противовоспалительного и обезболивающего влияния [7, 8, 9].

В настоящее время развивается технология транскраниальной импульсной магнитотерапии как метод повышения чувствительности опухолевых клеток к ионизирующему излучению [10]. Данные о влиянии ИМП на культуру клеток глиобластомы человека в доступной литературе отсутствуют. Представляется целесообразным и перспективным изучение влияния ИМП на модели клеточной культуры глиобластомы с определением противоопухолевой эффективности ИМП в монорежиме и сочетании с лучевой терапией. Это позволит определить вероятность трансляции новых подходов для лечения злокачественных глиом мозга.

Целью исследования стало изучение противоопухолевой эффективности импульсного магнитного поля и ионизирующего излучения на модели клеточной культуры глиобластомы человека T98G.

Материал и методы. Материалом служила культура клеток глиобластомы человека T98G из коллекции КККП ИНЦ РАН. Культивирование клеток проводилось в среде RPMI-1640 (Биолот, Россия) с добавлением 10 % фетальной телячьей сыворотки (Thermo Scientific hyclone, США) и при концентрации гентамицина 50 мкг/мл (Биолот, Россия). Культуру засевали в шесть планшетов фирмы Biofil так, чтобы в каждой лунке планшета число клеток составляло не менее 800000 клеток на 3 мл питательной среды, затем инкубировали в мультигазовом инкубаторе CB 150 («Binder», Германия) в условиях контролируемых 5 % CO₂, 37 °C и 95 % влажности в течение 24 часов до достижения конfluence выше 70 %. Ионизирующее излучение проводилось на аппарате TheratronEquinox фирмы BestTheratronics, где в качестве источника излучения использовался кобальт-60. Поле излучения с размерами 12x18 см соответствовало параметрам планшета, при этом доза излучения для каждой лунки составила 10 Гр, а время воздействия 11,69 мин. Процедуру выполняли на аппарате «Нейро-МС/Д терапевтический расширенный» компании «Нейрософт» в режиме частот F=0,3 Гц (t=5 мин), F=3 Гц (t=1 мин), F=9 Гц (t=1 мин), t общее=7 мин при различных параметрах индукции – B=300 мТл и 15 мТл. Три планшета подвергали монофакторному воздействию ионизирующего излучения

(1) или ИМП в двух режимах (2), два планшета – сочетание этих воздействий. Контрольным служил планшет, который не подвергался воздействию вышеуказанных физических факторов.

После воздействия культуру помещали в мультигазовый инкубатор CB 150 с контролируемыми условиями – 5 % CO₂, 37 °C и 95 % влажности. Анализ результатов проводился в двух контрольных временных точках: через три и через двадцать четыре часа. Для снятия клеток с подложки использовался раствор DPBS и раствор Трипсин Версена в соотношении 1:1. Подсчет общего количества клеток, а также количества живых и мертвых клеток проводился в клеточном анализаторе JuLiFL NanoEntek с использованием 0,4 % раствора красителя трипанового синего в соотношении 1:1. Летальность определяли по процентному соотношению числа мертвых клеток к общему количеству клеток. Митотический индекс определяли в десяти полях зрения по процентному соотношению числа делящихся клеток к общему количеству клеток при помощи микроскопа Leica DMIL LED Fluo. Полученные данные обрабатывали на персональном компьютере с использованием пакета статистических программ «Statistica 10.0» с вычислением критерия достоверности Стьюдента (t). Статистически значимым считалось различие с вероятностью безошибочного прогноза не менее 95 %, т. е. p<0,05.

Результаты и обсуждение. При сравнении показателей летальности между исследуемыми группами было установлено, что через 3 часа минимальный процент гибели культуры клеток глиобластомы отмечался в контрольной группе. Напротив, максимальный уровень мертвых клеток был зафиксирован в образцах культуры T98G после воздействия ионизирующего излучения (18,7 % против 5,2 % в контроле, p<0,05). После сочетания ионизирующего излучения с ИМП с индукцией в 15 мТл результаты были сопоставимы с лучевым воздействием, а при индукции 300 мТл – на 20 % ниже. При этом разница с контрольными данными была существенной и наблюдаемое увеличение летальности клеток культуры T98G в 2,9 раза свидетельствовало о высоком ингибирующем влиянии используемых факторов. Применение ИМП в монорежиме с разной индукцией в 15 или 300 мТл привело к неожиданному противоопухолевому эффекту: увеличению показателей летальности клеток глиобластомы соответственно в 2,5–2,8 раза выше по сравнению с контролем (табл. 1).

Таблица 1

Количество клеток, летальность при разных условиях эксперимента через три часа после воздействия

Условия эксперимента	Число клеток		Общее число клеток	Летальность
	живые	мертвые		
Контроль	720000,0±18165,9	39850,00±4323,01	759850,0±21092,38	5,2 %
10 Гр	680000,0±19148,54	157000,0±4771,443*	837000,0±20978,56	18,7 %
15 мТл	711666,7±37004,75	104833,3±5574,163*	816500,0±42030,38	12,8 %
300 мТл	686666,7±14129,03	114833,3±5823,722*	801500,0±18769,29	14,3 %
10 Гр+15 мТл	666666,7±32312,14	152833,3±9579,734*	819500,0±41220,65	18,6 %
10 Гр+300 мТл	686666,7±12981,47*	123500,0±4504,011*	810166,7±12120,88	15,2 %

* – p<0,05 по отношению к контролю.

Через 24 часа наблюдения показатели в контрольной группе оставались на низком уровне летальности при наивысших значениях митотического индекса клеток культуры T98G. Высокую эффективность проявило сочетание ионизирующего излучения в дозе 10 Грей и ИМП с индукцией 15 мТл. Наиболее

глубокое подавление митотической активности глиальных клеток T98G наблюдалось при воздействии в монорежиме ИМП с индукцией 15 мТл: митотический индекс клеток глиобластомы по сравнению с контролем снизился в 4,7 раза, а летальность увеличилась в 2,3 раза (табл. 2).

Таблица 2

Количество клеток, летальность и митотический индекс при разных условиях эксперимента через двадцать четыре часа после воздействий

Условия эксперимента	Число клеток		Общее число клеток	Летальность	Митотический индекс
	живые	мертвые			
Контроль	961666,7±27556,3	58166,66±4342,8	1019833,3±30653,5	5,7 %	6,6 %
10 Гр	510000,0±35087,2*	116833,3±8887,2*	626833,33±42369,9*	18,6 %	4,4 %
15 мТл	975000±40875,8	153833,3±8150,3*	1128833,3±45156,3	13,6 %	1,8 %
300 мТл	1148000±31763,0	156400,0±8920,6*	1087000,0±95432,1	14,4 %	2,8 %
10 Гр+15 мТл	760000±47128,7	165500,0±6815,6*	925500,0±46752,4	17,9 %	3,5 %
10 Гр+300 мТл	813333,33±21464,9	143333,3±3873,9*	956666,7±23988,6	15 %	3,1 %

* – $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Таким образом, экспериментальные данные, полученные на культуре клеток злокачественной глиомы человека T98G, свидетельствовали о высокой значимости сочетания ионизирующего излучения с ИМП как фактором неспецифической природы, оказывающим самостоятельное ингибирующее влияние на клетки опухоли мозга. Были установлены различия при межгрупповом сравнении с контролем, на фоне которого влияние ИМП убедительно демонстрировало эффекты повышения летальности и снижения митотического индекса злокачественных клеток культуры T98G. Кроме того, было обнаружено различие в эффективности разных режимов интенсивности при

одинаковом поличастотном алгоритме ИМП, свидетельствующее о предпочтительном использовании «малых доз» воздействия, как отражение принципа нелинейности в реакциях живых систем.

Закключение. Полученные результаты указывают на доступность сверхнизкочастотных слабых ИМП к интимным механизмам регуляции клеточного деления и свидетельствуют об их ингибирующем влиянии на жизнеспособность культуры клеток глиобластомы человека T98G. Это указывает на перспективы применения импульсной транскраниальной магнитотерапии в качестве сопроводительного метода лечения в нейроонкологии.

Литература/References

1. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2017;67(1):7-30. <https://doi.org/10.3322/caac.21387>
2. Каприн А. Д., Старинский В. В., Петрова Г. В. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П. А. Герцена; 2018. [Kaprin A. D., Starinskij V. V., Petrova G. V. (eds.). *Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2016 godu (zabolevaemost i smernost)*. Moscow: MNI OI im. P. A. Gertsena; 2018. (In Russ.)].
3. Первичные опухоли центральной нервной системы. Клинические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации; 2018. Режим доступа: <http://cr.rosminzdrav.ru/#!/recomend/853>. Ссылка активна на 19.12.2018. [Pervichnye opukholi tsentralnoj nervnoj sistemy. Klinicheskie rekomendatsii ministerstva zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii; 2018. Available at: <http://cr.rosminzdrav.ru/#!/recomend/853>. Accessed December 19, 2018. (In Russ.)].
4. Zhu P., Zhu J. J. Tumor treating fields: a novel and effective therapy for glioblastoma: mechanism, efficacy, safety and future perspectives. *Chinese Clinical Oncology*. 2017;6(4):41. <https://doi.org/10.21037/cco.2017.06.29>
5. Улащик В. С. Магнитотерапия: современные представления о механизмах действия магнитных полей на организм. *Здравоохранение*. 2015;11:21-29. [Ulashchik V. S. Magnet therapy: current understanding of mechanisms of magnet field action on body. *Zdravookhranenie*. – *Health care*. 2015;11:21-29. (In Russ.)].
6. Куташов В. А., Шульга А. С. Транскраниальная магнитотерапия в неврологической клинике. *Центральный научный вестник*. 2016;1(12):9-11. [Kutashov V. A., Shulga A. S. Transcranial magnetic therapy in neurological clinic. *Tsentralnyj nauchnyj vestnik*. – *Central Scientific Herald*. 2016;1(12):9-11. (In Russ.)].
7. Falone S., Grossi M. R., Cinque B., D'Angelo B., Tettamaniti E. [et al.]. Fifty hertz extremely low-frequency electromagnetic field causes changes in redox and differentiative status in neuroblastoma cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;39(11):2093-2106. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.06.001>
8. Destefanis M., Viano M., Leo C., Gervino G., Ponzetto A. [et al.]. Extremely low frequency electromagnetic fields affect proliferation and mitochondrial activity of human cancer cell lines. *International Journal of Radiation Biology*. 2015;91(12):964-972. <https://doi.org/10.3109/09553002.2015.1101648>
9. Marchesi N., Osera C., Fassina L., Amadio M., Angeletti F. [et al.]. Autophagy Is Modulated in Human Neuroblastoma Cells Through Direct Exposition to Low Frequency Electromagnetic Fields. *Journal of Cellular Physiology*. 2014;229(11):1776-1786. <https://doi.org/10.1002/jcp.24631>
10. Storch K., Dickreuter E., Artati A., Adamski J., Cordes N. BEMER Electromagnetic Field Therapy Reduces Cancer Cell Radioresistance by Enhanced ROS Formation and Induced DNA Damage. *PLoS One*. 2016;11(12):e0167931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167931>

Сведения об авторах:

Попов Иван Александрович, врач-нейрохирург, аспирант;
тел.: 89515080080; e-mail: Popov_Ivan777@rambler.ru; <http://orcid.org/0000-0002-1126-3186>

Шихлярова Алла Ивановна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник испытательного лабораторного центра; e-mail: shikhliarova.a@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0003-2943-7655>

Росторгуев Эдуард Евгеньевич, кандидат медицинских наук, заведующий отделением нейроонкологии;
e-mail: ed.rost@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0003-2937-0470>

Гусарева Марина Александровна, кандидат медицинских наук, заведующая отделением радиологии;
e-mail: oncorad@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-9426-9662>

Тимошкина Наталья Николаевна, кандидат биологических наук, руководитель лаборатории молекулярной онкологии;
e-mail: n_timoshkina@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0001-6358-7361>

Потемкин Дмитрий Сергеевич, младший научный сотрудник; e-mail: desmonddimon@gmail.com; <http://orcid.org/0000-0002-5221-3644>

Арапова Юлия Юрьевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник испытательного лабораторного центра;
e-mail: juli.arapova@yandex.ru; <http://orcid.org/0000-0002-4300-6272>

Стасов Виталий Викторович, кандидат физико-математических наук, эксперт-физик по контролю за источниками ионизирующих и неионизирующих излучений отделения радиологии; e-mail: vityal_stasov@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-6953-5391>

© Коллектив авторов, 2019
УДК [616-005.4+616.36]:576.311.347
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14022>
ISSN – 2073-8137

ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА МИТОХОНДРИЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ИШЕМИИ И РЕПЕРФУЗИИ ПЕЧЕНИ У КРЫС

К. А. Попов, И. М. Быков, И. Ю. Цымбалюк, А. Н. Курзанов, А. П. Сторожук, Е. Е. Есауленко
Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

CHANGES IN THE MEMBRANE POTENTIAL OF MITOCHONDRIA IN DEPENDENCE ON THE CONTINUANCE OF ISCHEMIA AND REPERFUSION OF LIVER IN RATS

Popov K. A., Bykov I. M., Tsymbalyuk I. Yu., Kurzanov A. N., Storozhuk A. P., Esaulenko E. E.
Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

Проведено исследование изменений мембранного потенциала митохондрий гепатоцитов в зависимости от различной длительности ишемического и последующего реперфузионного периодов. Полученные результаты показали поэтапное снижение мембранного потенциала митохондрий, выделенных из ткани печени крыс после ишемического периода различной продолжительности. Снижение данного показателя достигало практически нулевых значений после 25-минутного пережатия аналога печеночно-двенадцатиперстной связки. В то же время была отмечена тенденция к восстановлению нормальных значений митохондриального мембранного потенциала в реперфузионный период, наиболее характерная для ткани печени после 10–15-минутной длительности ишемии (на 30–60 %, до 102–154 мВ). Таким образом, полученные данные отражают высокую лабильность функционального состояния митохондрий при ишемически-реперфузионном повреждении гепатоцитов и могут быть использованы для изучения особенностей течения различных гипохроэнергетических состояний, а также для оценки эффективности митохондриальных цитопротекторов в экспериментальной коррекции широкого спектра патологических процессов.

Ключевые слова: митохондрии, мембранный потенциал, сафранин, ишемия, реперфузия, печень

The study in the membrane potential of hepatocyte mitochondria in dependence on the various continuances of the ischemic and the following reperfusion period has been performed. The received data has demonstrated the gradual decrease in the membrane potential of mitochondria extracted from the liver tissue of rats after the ischemic periods of various continuances. The decrease in this index has practically reached the null-values after 25-minute clamping of the analogue of hepatoduodenal ligamentum. At the same time the tendency to the restoration of normal values for mitochondrial membrane potential at the reperfusion period has been revealed, most typically for the liver tissue after 10–15 minute ischemia (by 30–60 %, up to 102–154 mV). Thus, the received data demonstrate the high lability of the functional state of mitochondria at the ischemic-reperfusion disorder of hepatocytes and can be used for studies in the course peculiarities for various hypochroenergetical conditions as well as for evaluation of effectiveness of mitochondrial cytoprotectors within the experimental correction of wide range of pathological processes.

Keywords: mitochondria, membrane potential, safranin, ischemia, reperfusion, liver

Для цитирования: Попов К. А., Быков И. М., Цымбалюк И. Ю., Курзанов А. Н., Сторожук А. П., Есауленко Е. Е. ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА МИТОХОНДРИЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ИШЕМИИ И РЕПЕРФУЗИИ ПЕЧЕНИ У КРЫС. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2019;14(1.2):231–234.
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14022>