

УДК 613.168+615.849.19.03:578.311

Е. Ю. Ставицкая, С. Н. Зобова, Н. В. Сергеев, Г. Я. Шайдуров, Е. А. Савченко,
Л. Н. Сифоркина, Л. Г. Климацкая

МЕМБРАНОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ИНФРАКРАСНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И НИЗКОЧАСТОТНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ ПРИ ИЗОЛИРОВАННОМ И СОЧЕТАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ В КЛЕТКАХ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

ГОУ Красноярская медицинская академия МЗ РФ
Красноярский государственный технический университет

Исследовали особенности цитотоксического действия инфракрасного лазерного излучения с длиной волны 890 нм и низкочастотного магнитного поля с частотой 3,12 Гц в клетках асцитной карциномы Эрлиха *in vitro*. Установлено, что как лазерное излучение, так и магнитное поле вызывают блеббинг плазматической мембраны клеток асцитной карциномы Эрлиха. Установлено, что при сочетании действия этих физических факторов цитотоксический эффект усиливается.

Ключевые слова: асцитная карцинома Эрлиха, блеббинг, инфракрасное лазерное излучение, магнитные поля

Таблица 1

Динамика количества морфологически неизменных клеток (А), клеток с морфологическими признаками начального (Б), терминального блеббинга (В) и некроза (Г) при изолированном и сочетании действия низкочастотного магнитного поля и инфракрасного лазерного излучения на суспензию клеток асцитной карциномы Эрлиха ($M \pm m$)

А

Время воздействия	Контроль, %	Магнитное поле	Лазерное излучение	Магн. поле и лазер
0 мин	89,6±0,27	89,6±0,27	89,6±0,27	89,6±0,27
15	80±0,01*	81±0,21**	66,8±0,79*	71,5±0,12*
30	78±0,28**	80±0,93**	64,8±0,41**	69,1±0,14**
60	76,9±0,29**	76±0,11***	58,3±0,52***	39,2±0,12***

Б

Время воздействия	Контроль, %	Магнитное поле	Лазерное излучение	Магн. поле и лазер
0 мин	5,2±0,57	5,2±0,57	5,2±0,57	5,2±0,57
15	10±0,18*	13,1±0,25**	18,2±0,23*	17±0,21**
30	11±0,71**	14,2±0,08**	17,1±0,42**	18,2±0,25**
60	11,5±0,41***	16,3±0,58***	19,2±0,61***	24,6±0,06***

В

Время воздействия	Контроль, %	Магнитное поле	Лазерное излучение	Магн. поле и лазер
0 мин	3,8±0,77	3,8±0,77	3,8±0,77	3,8±0,77
15	5,2±0,71*	4,1±0,92*	10±0,28**	10±0,44**
30	4,3±0,18**	4,2±0,11*	11,1±0,14***	11±0,37**
60	4,5±0,27*	5±0,16*	15,3±0,16***	34,4±0,31***

Г

Время воздействия	Контроль, %	Магнитное поле	Лазерное излучение	Магн. поле и лазер
0 мин	1,4±0,36	1,4±0,36	1,4±0,36	1,4±0,36
15	4,8±0,14*	1,8±0,49*	5±0,42*	1,5±0,14
30	6,7±0,04**	1,6±0,28**	6±0,64**	1,7±0,17*
60	7,1±0,72***	2,7±0,21***	7,2±0,21***	1,8±0,28**

Примечание. * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$.

Таблица 2

Уровень ПОЛ во взвеси клеток асцитной карциномы Эрлиха при изолированном и сочетанном действии низкочастотного магнитного поля и инфракрасного лазерного излучения ($M \pm m$)

Время воздействия	Контроль, %	Магнитное поле	Лазерное излучение	Магн. поле и лазер
0 мин	$1,2825 \pm 0,26 \times 10^{-4*}$	$1,2825 \pm 0,26 \times 10^{-4}$	$1,2825 \pm 0,26 \times 10^{-4}$	$1,2825 \pm 0,26 \times 10^{-4}$
15	$1,7073 \pm 0,27 \times 10^{-4**}$	$1,7219 \pm 0,27 \times 10^{-4**}$	$1,9072 \pm 0,17 \times 10^{-4**}$	$1,7128 \pm 0,26 \times 10^{-4*}$
30	$1,7589 \pm 0,27 \times 10^{-4**}$	$1,7228 \pm 0,32 \times 10^{-4**}$	$1,9577 \pm 0,07 \times 10^{-4*}$	$1,7219 \pm 0,08 \times 10^{-4*}$
60	$1,7919 \pm 0,32 \times 10^{-4***}$	$1,7311 \pm 0,32 \times 10^{-4**}$	$1,9814 \pm 0,34 \times 10^{-4*}$	$1,7314 \pm 0,19 \times 10^{-4*}$

Примечание. * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$.

Известно, что лазерное излучение может индуцировать фотопроцессы, регулирующие изменение функциональной активности биологических структур живого организма. Механизм этих процессов окончательно не выяснен, но известно, что для реализации эффектов, индуцированных оптическим воздействием, необходимо присутствие специфических молекул, поглощающих свет и индуцирующих реакции, не происходящие в их отсутствие. Данные молекулы-фотосенсибилизаторы приходят в возбужденное состояние после поглощения света, и это обеспечивает дальнейшую реализацию фотоэффектов [2, 3].

Хромофорами лазерного излучения являются эндогенные порфирины, способные поглощать свет в красной области спектра. После поглощения света такие молекулы переходят в возбужденное состояние, что и обеспечивает дальнейшую реализацию фотоэффектов. За счет энергии электронного возбуждения молекула фотоактивного хромофора изменяет состояние своего ближайшего микроокружения в биоструктурах, и это дает начало дальнейшим структурно-функциональным перестройкам, индуцирующим биохимические процессы, которые приводят к конечному биологическому эффекту [5].

Одним из фотосенситивных гемопротеидов является цитохром Р-450. Цитохромы Р-450 осуществляют гидроксилирование липофильных соединений, образующихся в качестве побочных продуктов или попадающих в организм извне. В реакциях окисления с участием цитохрома Р-450 в качестве побочных продуктов образуются свободные радикалы, способные повреждать клеточные структуры [4].

Наряду с использованием лазеров, в последнее время идет интенсивное развитие электромагнитотерапии, основанной на использовании различных магнитных полей. Эти поля могут отличаться друг от друга по закону измерения во времени, частотному спектру, видам и пространственной геометрии. Существуют специфические физические характеристики магнитных полей, определяющие первичные, биологически

значимые механизмы действия поля, так называемые биотропные параметры. Биотропные параметры обуславливают формирование соответствующих реакций как на молекулярном уровне, так и на уровне целого организма. Механизмы действия магнитных полей на организм до сих пор окончательно не расшифрованы. Тем не менее накопленные данные свидетельствуют, что механизмы действия магнитных полей на живой организм основаны на адекватном изменении энергии химических связей в биологических процессах. Физические механизмы влияния магнитных полей связаны с вероятностью протекания элементарных химических актов, когда в результате химических превращений, вследствие распаривания электронов, появляются свободно-радикальные продукты реакции с некомпенсированными спинами [1].

Одним из проявлений токсического действия свободных радикалов на мембраны клеток является блеббинг. К настоящему времени еще не сложилось окончательное представление о механизмах блеббинга, тем не менее предполагают, что важную роль играют нарушение структуры белков цитоскелета, активность нелизосомальных ферментных систем, развитие ионного дисбаланса.

Целью данной работы явилось определение характера и механизмов мембранотоксического действия инфракрасного излучения и низкочастотного магнитного поля на клетки асцитной карциномы Эрлиха *in vitro*.

Методика. В опытах использовали белых беспородных мышей-самцов массой 20–25 г, по 5 животных в каждой серии.

Процессы блеббинга плазматической мембраны изучали методом фазово-контрастной микроскопии. Под иммерсией ($\times 900$) анализировали по 200 клеток в каждом препарате. Исследуемые образцы облучали при помощи инфракрасного лазерного излучателя АЛТ Узор $\lambda = 890$ нм. Эксперименты проводились в частотно-импульсном режиме (длительность импульса составляла 260 нс; частота модуляции 1 кГц; средняя мощность излучения – 0,3 мВт; плотность мощности – 0,4 мВт/см²) в течение 15, 30 и 60 ми-

нут при концентрации клеток 10^6 /мл в растворе Хенкса при температуре 20°C .

Воздействие магнитным полем проводилось при помощи оригинальной магнитной установки, состоящей из источника постоянного тока стабилизированного; генератора сигналов (выходная частота – 3,12 Гц); усилителя сигналов низкочастотного; излучателя, состоящего из двух катушек-колец Геймгольца и катушки переменного магнитного поля в течение 15, 30, 60 минут. В зоне эксперимента формировали постоянную составляющую магнитного поля, равную 25 мкТл, и переменную составляющую, равную 5 мкТл. Контроль величин действующих полей проводили прибором измерения магнитной индукции РШ1-10. Отмечали образование мелких пузыреподобных выпячиваний по периметру клетки (начальный блеббинг), формирование более крупных пузырей (терминальный блеббинг), наличие некроза.

В суспензии клеток костного мозга определяли содержание малонового диальдегида в реакции с тиобарбитуровой кислотой, включающей в себя инкубацию с тиобарбитуровой кислотой исследуемой пробы, экстракцию продуктов реакции бутанолом и спектрофотометрическое измерение их содержания. Оптическую плотность бутанольных экстрактов определяли на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 535 нм против бутанола. Содержание малонового диальдегида рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции.

Статистическая обработка результатов проведена с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты. Изолированное воздействие магнитного поля не приводило к достоверному снижению количества морфологически неизменных клеток. Количество же клеток с морфологическими признаками начального и терминального блеббинга достоверно увеличивалось по сравнению с контролем ($p < 0,01$). Количество клеток с морфологическими признаками некроза достоверно уменьшалось.

Изолированное действие инфракрасного лазерного облучения приводило к достоверному снижению количества морфологически неизменных клеток ($p < 0,001$). Количество клеток с морфологическими признаками начального, терминального блеббинга и некроза достоверно увеличивалось ($p < 0,001$).

Сочетанное воздействие инфракрасного лазерного излучения и магнитного поля приводило к более значительному снижению количества морфологически неизменных клеток ($p < 0,001$) по сравнению с изолированным воздействием этих факторов. Количество клеток с морфологическими признаками начального и терминального блеббинга тоже повышалось более значительно ($p < 0,001$). Количество же клеток с мор-

фологическими признаками некроза было значительно меньшим при сочетанном воздействии излучения и магнитного поля, чем при изолированном действии лазера ($p < 0,001$) (табл. 1).

Обнаруженные эффекты сопровождались повышением продукции малонового диальдегида, которое было наиболее выраженным при изолированном действии инфракрасного лазерного облучения ($p < 0,05$). При сочетанном воздействии лазера и магнитного поля повышение продукции малонового диальдегида было менее значительным, а изолированное воздействие магнитного поля приводило к достоверному снижению продукции малонового диальдегида ($p < 0,05$) (табл. 2.)

Заключение. Таким образом, изолированное действие низкочастотного магнитного поля вызывает блеббинг плазматической мембраны клеток асцитной карциномы Эрлиха *in vitro* и не сопровождается усилением процесса перекисного окисления липидов мембран. Этот эффект в значительной мере усиливается при сочетанном действии лазера и электромагнитных полей. При этом происходит снижение клеток с морфологическими признаками некроза, увеличение клеток с признаками начального и терминального блеббинга, сопровождающиеся выраженным подавлением продукции малонового диальдегида.

Известно, что диапазон частот магнитного поля в интервале 3–5 Гц соответствует циклотронным частотам ионных форм молекул полярных аминокислот, изменение конформации которых, индуцированное действием магнитного поля, может привести к развитию процессов, характерных для блеббинга плазматической мембраны [1, 4].

С другой стороны, известно, что лазерное излучение обладает прямым протеотоксическим и опосредованным свободными радикалами действием [3, 8], что дает основание предположить участие вызванных инфракрасным лазером конформационных перестроек белков мембран и цитоскелета в патогенезе блеббинга. Свободные радикалы, как показано в других клеточных системах [5–7], нарушают структуру белков цитоскелета, приводят к развитию ионного дисбаланса, активации нелизосомальных протеолитических систем. Мы предполагаем, что подвергаясь конформационным перестройкам под действием низкочастотного магнитного поля, цитохром Р-450 не способен генерировать большое количество свободных радикалов, и следовательно, выраженность последствий окислительного стресса в клетке снижается.

Таким образом, как низкочастотное магнитное поле, так и инфракрасное лазерное излучение обладают мембранотоксическим действием на клетки асцитной карциномы Эрлиха. При

этом сочетанное действие этих факторов приводит к значительной модификации мембранотоксических эффектов.

MEMBRANETOXIC EFFECT OF INFRARED LASER AND LOW-FREQUENCY MAGNETIC FIELD UNDER ISOLATED AND COMBINED ACTIONS IN EHRLICH ASCITE CARCINOMA CELLS

E. Yu. Stavitskaya, S.N. Zobova, N.V. Sergeev, G.Ya. Shaidurov, E.A. Savchenko, L.N. Siforkina, L.G. Klimatskaya

Some peculiarities of membranetoxic influence of infrared laser with wavelength 890 nm and low-frequency magnetic field in Ehrlich ascite carcinoma cells were investigated in vitro. It has been shown that both laser and low-frequency magnetic field cause blebbing of plasma membrane of Ehrlich ascite carcinoma cells. It has been shown that combined action of these factors increases cytotoxic effect.

ЛИТЕРАТУРА

1. Системы комплексной магнитотерапии /Беркутов А.М., Жулева В.И., Кугаева Г.А. и др. М., 2000.
2. Gal D., Fongen J.D., Rastegar H. et al. // *Laser Surg. Med.* 1991. Vol. 11. № 2. P. 125–132.
3. Gibson G.H. // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 254. P. 2155–2158.
4. Hampton M.B., Fadeel, Orrenius S. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1998. Vol. 854. P. 328–335.
5. Jones C.M., Henry E.R., Hu Y. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. Vol. 90. P. 11860–11864.
6. Li P., Champion P.M. // *Biophys. J.* 1994. Vol. 66. P. 430–436.
7. Lutton J.P., Levere R.D., Abraham N.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. Vol. 195. P. 260–269.
8. Nebert D.W. // *Biochem. Pharmacol.* 1995. Vol. 47. P. 25–37.