

УДК 61.612

ВОЗДЕЙСТВИЕ ИМПУЛЬСНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ ВЫСОКОЙ НАПРЯЖЕННОСТИ НА ДЕРМАЛЬНЫЕ ФИБРОБЛАСТЫ ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ

© 2020 В.А. Глушечков^{1,3}, Л.Т. Волова², И.А.Беляева¹, В.В. Болтовская², В.В. Россинская², А.И. Игнатенко¹, И.Ф. Нефедова², Л.Н.Кулагина²

¹ Самарский национально-исследовательский университет имени академика С.П. Королёва, г. Самара, Россия

² Институт экспериментальной медицины и биотехнологий СамГМУ, Самара, Россия

³ Самарский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Самара, Россия

Статья поступила в редакцию 12.10.2020

Изучено влияние импульсных магнитных полей (ИМП) с различными значениями напряженностей магнитного поля H , частоты разрядного контура f , количества импульсов n на дермальные фибробласты *in vitro*. Созданы специализированная магнитно-импульсная установка «МИУ-Био», измерительный стенд для создания и контроля заданных параметров ИМП. Проведено четыре серии экспериментов с продольным и поперечным воздействием ИМП при напряженности магнитного поля $3,76 \cdot 10^6 - 8,7 \cdot 10^6$ А/м (500 и 1000 Дж) Установлено, что продольное воздействие ИМП в 500 Дж не приводит к гибели клеток и сохраняет их все структурные компоненты, является безопасным для первичных культур фибробластов. При использовании импульсных магнитных полей высокой напряженности (ИМП ВН) 1000 Дж как в продольном, так и в поперечном направлении приводит к нарушению адгезии клеток к культуральному пластику и изменениям в структуре дермальных фибробластов, вплоть до их гибели.

Ключевые слова: импульсное магнитное поле высокой напряженности, факторы воздействия: напряженность, частота, количество импульсов, дермальные фибробласты, морфология клеток.

DOI: 10.37313/1990-5378-2020-22-5-14-22

ПОСТАНОВКА ВОПРОСА

Современная медицина требует новых подходов к диагностике и лечению социально значимых заболеваний. При этом на первый план выдвигается использование неинвазивных технологий, что может существенно улучшить результаты лечения и повысить качество жизни пациентов. В частности, в регенеративной медицине возрастает роль неинвазивных методов, связанных с использованием магнитных

полей в лечебной практике. В настоящее время широко применяются постоянные, переменные и импульсные магнитные поля (ПМП, ПемП и ИМП) с невысокими значениями магнитной индукции (до 100 мТл) [1-5]. По мнению большинства авторов [6-10], в основе биологического и лечебного действия магнитных полей лежат изменения в состоянии клеточных мембран, ферментативных и рецепторных молекул, повышением проницаемости плазмолеммы клеток.

Магнитные поля широко применяются в технике, но их параметры значительно отличаются от используемых в медицине. В последнее время на машиностроительных предприятиях внедрены процессы магнитно-импульсной штамповки, сборки, сварки [11]. Источником импульсных магнитных полей (ИМП) в этих процессах является индуктор [12], соединённый с магнитно-импульсной установкой (МИУ) [13]. В процессе разряда батареи конденсаторов МИУ на индуктор, в образованной таким образом разрядной цепи, протекает ток, характер изменения которого показан на рисунке 1.

Из приведенных осциллограмм видно, что характер протекающего тока зависит от сопротивления разрядной цепи: периодический разряд – затухающая синусоида или аperiodический разряд.

Глушечков Владимир Александрович, кандидат технических наук, профессор кафедры обработки металлов давлением. E-mail: vgl@ssau.ru

Волова Лариса Теодоровна доктор медицинских наук, профессор. E-mail: volovalt@yandex.ru

Беляева Ирина Александровна, кандидат технических наук, доцент. E-mail: belyaeva-otmr@yandex.ru

Болтовская Виолетта Викторовна, кандидат медицинских наук. E-mail: violetta.boltovskaya@yandex

Россинская Виктория Викторовна, кандидат медицинских наук, доцент. E-mail: rossinskaya_v_v@mail.ru

Игнатенко Александр Ильич, инженер-конструктор НИЛ-41, E-mail: mc-alexandro@bk.ru

Нефедова Ирина Феликсовна, научный сотрудник Института экспериментальной медицины и биотехнологий СамГМУ. E-mail: bobrovka2012@yandex.ru

Кулагина Лариса Николаевна главный специалист биотехнологического отдела Института экспериментальной медицины и биотехнологий СамГМУ.

E-mail: LnKulagina07@mail.ru

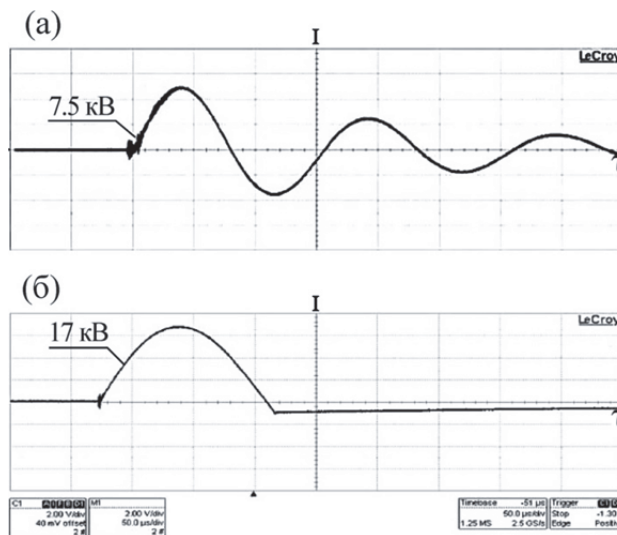


Рис. 1. Осциллограмма разрядного тока при использовании: (а) – одновиткового индуктора (б) – многовиткового индуктора

Интенсивность магнитного поля зависит от количества энергии $W = \frac{CU^2}{2}$, запасённой в батарее конденсаторов магнитно-импульсной установки, которая для используемых индукторов определяет уровень напряженности. В таблице 1 представлены значения параметров ИМП наиболее часто используемых в технике.

Видно, что параметры ИМП получаемых в технике, при токах в разрядной цепи 10-100 кА, на порядки отличаются от значений, которые используются в цитируемых выше медицинских работах.

Целью данного исследования является изучение воздействия импульсного магнитного поля высокой напряженности на культуру дермальных фибробластов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Техническая составляющая. На рисунке 2 представлены схемы воздействия ИМП на клеточную культуру дермальных фибробластов человека. С помощью датчиков Холла получены картины распределения магнитного поля «H» в двух координатах. Параметры используемой магнитно-импульсной установки приведены в таблице 2.

На рисунке 3 представлен внешний вид индукторов.

Эксперименты проводились при $W = 500$ Дж и 1000 Дж. Осциллограммы напряженности магнитного поля при $W = 1000$ Дж представлены на

рисунке 4. Частотные характеристики индуктора с замкнутым контуром и плоского индуктора составляют 18,9 кГц и 19,7 кГц соответственно, что находится в одном диапазоне частот.

Биологическая составляющая. Научное исследование воздействия магнитно-импульсной установки «МИУ-Био» было проведено на культуре дермальных фибробластов человека 7-го пассажа.

Забор первичного материала (биоптатов кожи) для выращивания культуры фибробластов производили у соматически здоровых и обследованных доноров после получения добровольного информированного согласия и одобрения Комитетом по биоэтике при СамГМУ. Фибробласты выращивали по методике первичных эксплантатов (К.Н. Гринберг и соавт., 1988) [14].

Для проведения эксперимента фибробласты снимали со дна культурального флакона стандартным методом и высевали в культуральные чашки Петри диаметром 3,5 см в дозе 1×10^4 кл./см². Культивирование проводили в условиях CO₂-инкубатора (Sanyo – Incubator, MCO-18AC, Япония) при температуре 37°C, 5% CO₂ и постоянной влажности в полной ростовой среде (среда 199 – 90%, эмбриональная телячья сыворотка – 10% (ООО «БиолоТ», РФ), гентамицин – 40 мкг/мл). Количество чашек - 40. По достижению клетками конфлуентного монослоя чашки были разделены следующим образом: 2 опытные серии (в каждой по 16 чашек) и 2 контрольные серии (в каждой по 4 чашки, на которые не было оказано воздействие магнитным полем); опытные серии делили на 2 подгруппы соответствен-

Таблица 1. Параметры импульсных магнитных полей, используемые в технике

| H, А/м | f, кГц | t, с |
|-------------------------------|--------|------------------------------------|
| (0,2- 10,0) · 10 ⁶ | 10-100 | 10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵ |

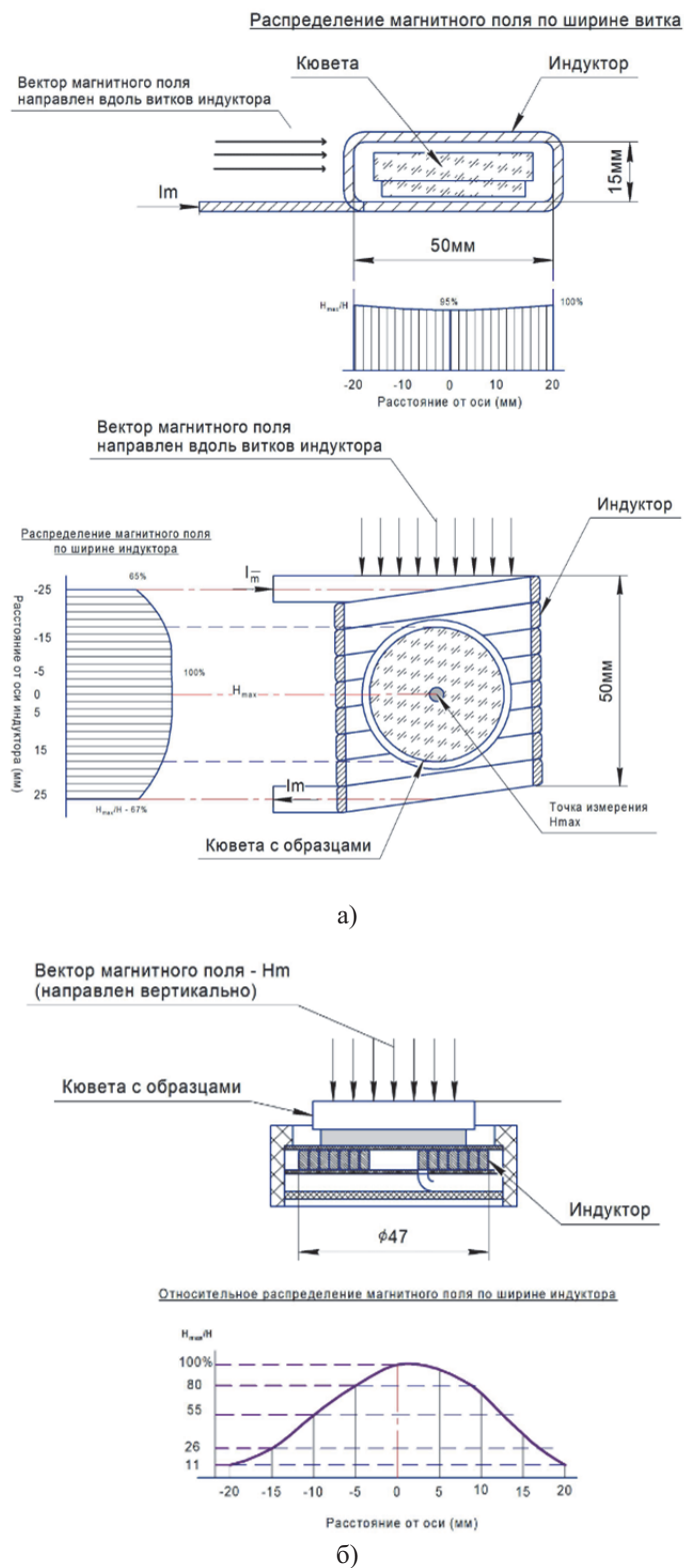


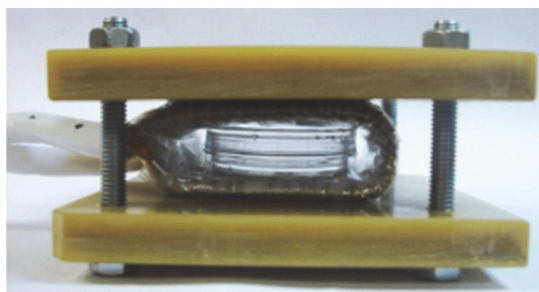
Рис. 2. Схемы воздействия ИМП на клеточную культуру дермальных фибробластов (а – индуктор с замкнутым контуром, б – плоский индуктор)

но энергии облучения. В 1 серии воздействие магнитным полем оказывали в продольном направлении, во 2 серии – в поперечном. Опытные чашки подвергали однократному облучению магнитно-импульсным полем при энергиях 500 Дж и 1000 Дж. Длительность наблюдения составляла 48 часов после воздействия ИМП ВН.

Проводили наблюдение за состоянием клеток в монослое и фотографирование их при помощи **аппаратно-программного комплекса (АПК), состоящего из** инвертированного микроскопа Olympus SKX 41 («Olympus», Япония), цветной цифровой камеры Olympus SC100 («Olympus», Корея) и стационарного компьюте-

Таблица 2. Параметры магнитно-импульсной установки «МИУ-Био»

| Запасаемая энергия W , кДж | Напряжение разряда U , кВ | Собственная частота разрядного тока f , кГц | C_0 , мкФ | L_0 , мкГн |
|------------------------------|-----------------------------|---|-------------|--------------|
| 1 | 1 – 5 | 60 | 82 | 0,09 |

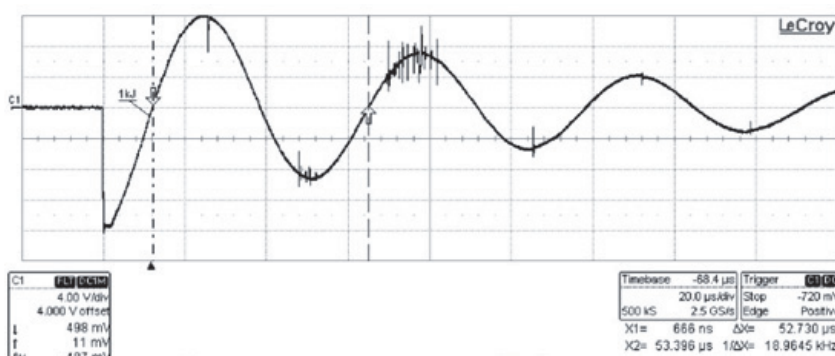


Индуктор с замкнутым контуром

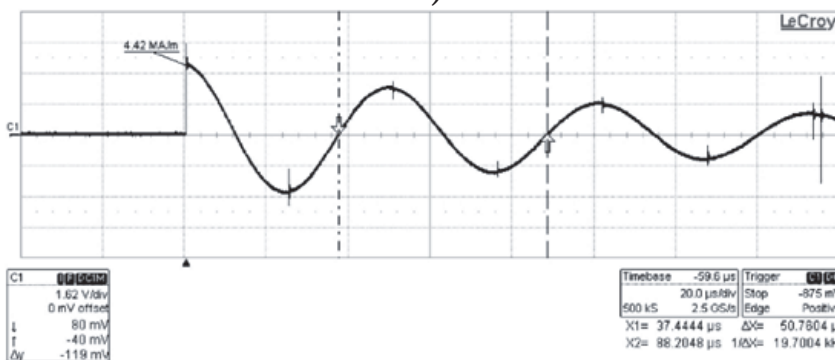


Плоский индуктор

Рис. 3. Внешний вид индукторов с размещенной чашкой Петри



а)



б)

Рис. 4. Осциллограммы напряженности магнитного поля (а – индуктор с замкнутым контуром, б – плоский индуктор)

ра. Для обработки изображений использовали программное обеспечение CellSens Standart 1.7 («Olympus Corporation», Япония). Непосредственно перед началом воздействия, а затем в конце эксперимента монослой окрашивали суданом IV и гематоксилином для общеморфологического анализа и витальными красителями для выявления жизнеспособных и поврежденных клеток (трипановый синий и флуоресцентный набор LIVE/DEAD® (Invitrogen, США)). Ана-

лиз изображений окрашенных препаратов производили с помощью системы визуализации на основе исследовательского люминесцентного микроскопа Leica DMIL LED (Германия) с флуоресцентным блоком.

РЕЗУЛЬТАТЫ

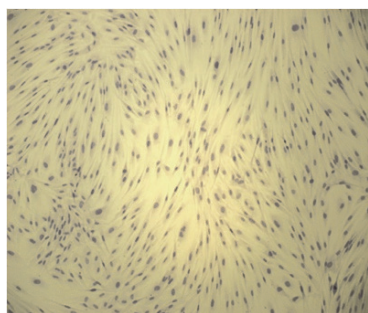
При осмотре контрольных чашек: монослой равномерный, характер роста в виде завит-

ков (рис. 5а). Клетки близко расположены друг к другу, имеют 2-3 отростка. Форма клеток веретенообразная, контуры четкие, цитоплазма гомогенная, слабо оксифильная. Ядра расположены в основном эксцентрично, содержат 2-3 ядрышка (рис. 5а), выявлены делящиеся клетки (рис. 5б). При окрашивании клеток витальным красителем трипановым синим все клетки прозрачные (жизнеспособные), окрашенных в синий цвет (поврежденных) не выявлено (рис. 5в). При обработке монослоя флуоресцентным набором LIVE/DEAD® клетки приобрели зеленое свечение, что подтверждает их жизнеспособность; клетки со светящимся красным ядром единичные (рис. 5г).

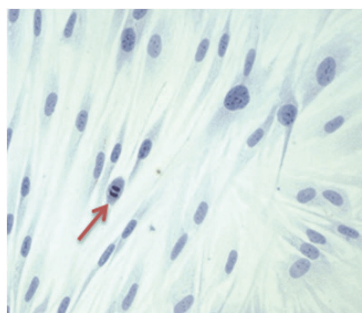
Серия 1а. Воздействие ИМП ВН, продольное направление, напряженность магнитного поля $3,76 \cdot 10^6$ А/м (500 Дж)

При однократном воздействии магнитным полем в продольном направлении с энергией 500 Дж через 48 часа отмечено, что клетки изменили свое расположение на дне культурального пластика в результате воздействия силовых линий магнитного поля (рис 6а). Клетки сохранили свои характерные морфологические особенности, но стали более вытянутыми. Контуры клеток четкие, цитоплазма гомогенная (рис. 6 б).

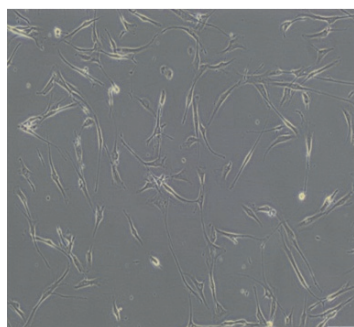
Соотношение жизнеспособных и поврежденных клеток соответствовало таковому в контрольной культуре (рис. 6в, 6г).



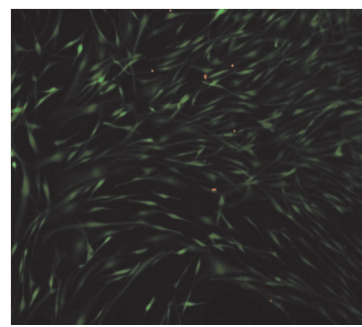
а



б



в



г

Рис. 5. Контроль. Культура дермальных фибробластов. Сформированный равномерный монослой через 48 часов после посева. Окраска суданом IV и гематоксилином:

а – характер роста фибробластов в монослое. Увеличение 100,

б – делящаяся клетка отмечена стрелкой, увеличение 400;

в – жизнеспособные клетки в монослое. Окраска трипановым синим. Увеличение 100. Инвертированный микроскоп;

г - флуоресцентное окрашивание набором LIVE/DEAD®. Люминесцентный микроскоп увеличение 100

Серия 1б. Воздействие ИМП ВН, продольное направление, напряженность магнитного поля $4,42 \cdot 10^6$ А/м (1000 Дж.)

При продольном воздействии ИМП ВН с энергией 1000 Дж через 48 часов на дне чашки зафиксировано смещение клеток в монослое по ходу воздействия магнитного поля (рис. 7а), в клетках при обзорной окраске суданом IV и гематоксилином выявлены поврежденные клетки с разрушенными ядрами (кариопикноз, кариорексис) (рис.7б). При окраске монослоя трипановым синим, были обнаружены поврежденные клетки, окрашенные в синий цвет (рис.7в). При обработке монослоя флуорофорами отмечали большое количество ядер с красной люминесценцией, что свидетельствовало об их повреждении (рис. 7г).

Серия 2а. Воздействие ИМП ВН поперечное направление, напряженность магнитного поля $7,1 \cdot 10^6$ А/м (500 Дж)

При поперечном воздействии при 500 Дж через 48 часов при осмотре клеток в монослое наблюдали изменение характера роста клеток с изменением геометрического рисунка (рис.8а). При обзорных окрасках отметили, что клетки стали более вытянутыми, отростки были длиннее, чем в контрольной серии. В некоторых клетках наблюдали зернистость цитоплазмы и просветление вокруг ядер (рис.8б). При окраске

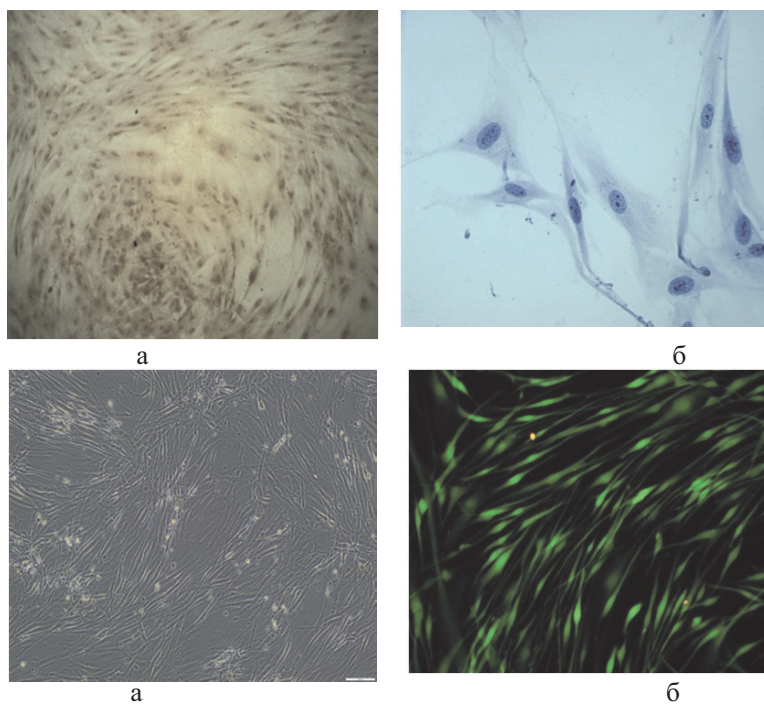


Рис. 6. Опыт. Культура дермальных фибробластов через 48 часов после продольного воздействия ИМП ВН с энергией 500 Дж. Окраска суданом IV и гематоксилином:
 а – выстраивание клеток под воздействием магнитных силовых линий, увеличение 100;
 б – морфологическая картина клеток после воздействия, увеличение 400;
 в – окраска трипановым синим, инвертированный микроскоп увеличение 100;
 г – флуоресцентное окрашивание набором LIVE/DEAD®. Люминесцентный микроскоп. увеличение 100

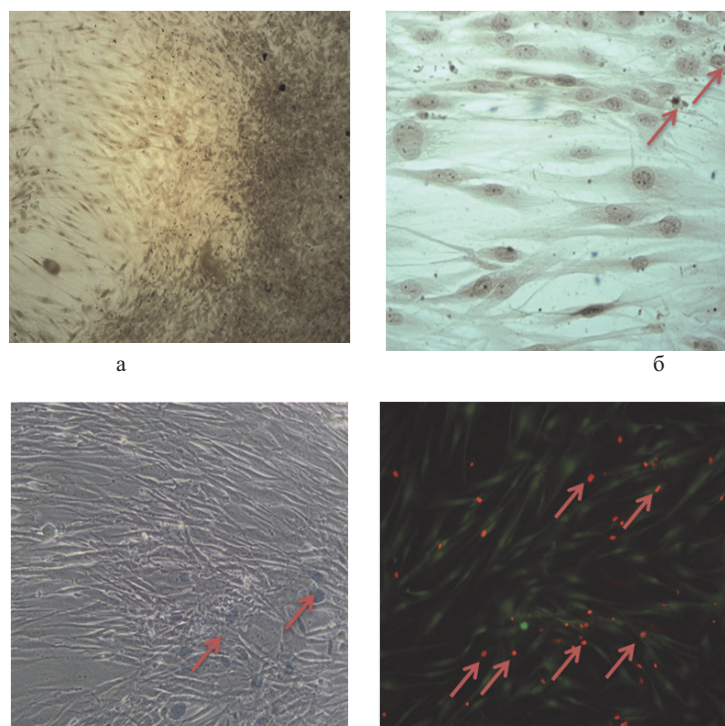


Рис. 7. Опыт. Культура дермальных фибробластов через 48 часов после продольного воздействия ИМП ВН с энергией 1000 Дж: Окраска суданом IV и гематоксилином:
 а – смещение клеток в монослой под воздействием силовых линий, увеличение 100;
 б - морфологические изменения клеток, увеличение 400;
 в – окраска трипановым синим (поврежденные клетки отмечены стрелками).
 Инвертированный микроскоп увеличение 100;
 г – флуоресцентное окрашивание набором LIVE/DEAD® (поврежденные клетки отмечены стрелками).
 Люминесцентный микроскоп, увеличение 100

трипановым синим выявляли поврежденные клетки, окрашенные в синий цвет (рис. 8в). Обработка монослоя флуоресцентным красителем позволила обнаружить выявить погибшие клетки с красной люминесценцией ядер (рис. 8г).

Серия 2б. Воздействие ИМП ВН поперечное направление, напряженность магнитного поля $8,7 \cdot 10^6$ А/м (1000 Дж)

При воздействии ИМП ВН энергией 1000 Дж в поперечном направлении в момент облучения крышка чашки Петри лопнула. Через 48 часов при окраске монослоя суданом IV и гематоксилином были обнаружены коагуляционные участки в виде темных клубков с хаотично расположенными клетками, границы которых не визуализировались (рис. 9а). Большинство фибробластов в монослое деформированы, в их цитоплазме наряду с плотными имеются разряженные участки. Контакты между клетками нарушены. Также на поверхности культурального пластика можно видеть фрагменты цито-

плазмы, лишенные ядер и обрывки отростков. В клетках ядра деформированы, визуальное плотные, структура их не однородная, ядрышки отсутствовали (рис. 9б). Получить изображения клеток с помощью витальных красителей (трипановым синим и набором LIVE/DEAD®) не удалось, так как клетки в результате пробоподготовки были смыты со дна культуральных чашек, что свидетельствовало об ослаблении адгезии клеток к культуральному пластику под действием данного режима.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данной работы были спроектированы специализированная магнитно-импульсная установка и измерительный стенд, позволившие получить ИМП с разными параметрами воздействия. Разработаны и опробованы схемы воздействия ИМП на клеточную культуру дермальных фибробластов с использованием индукторов различных конструкций, для которых была получена топология поля.

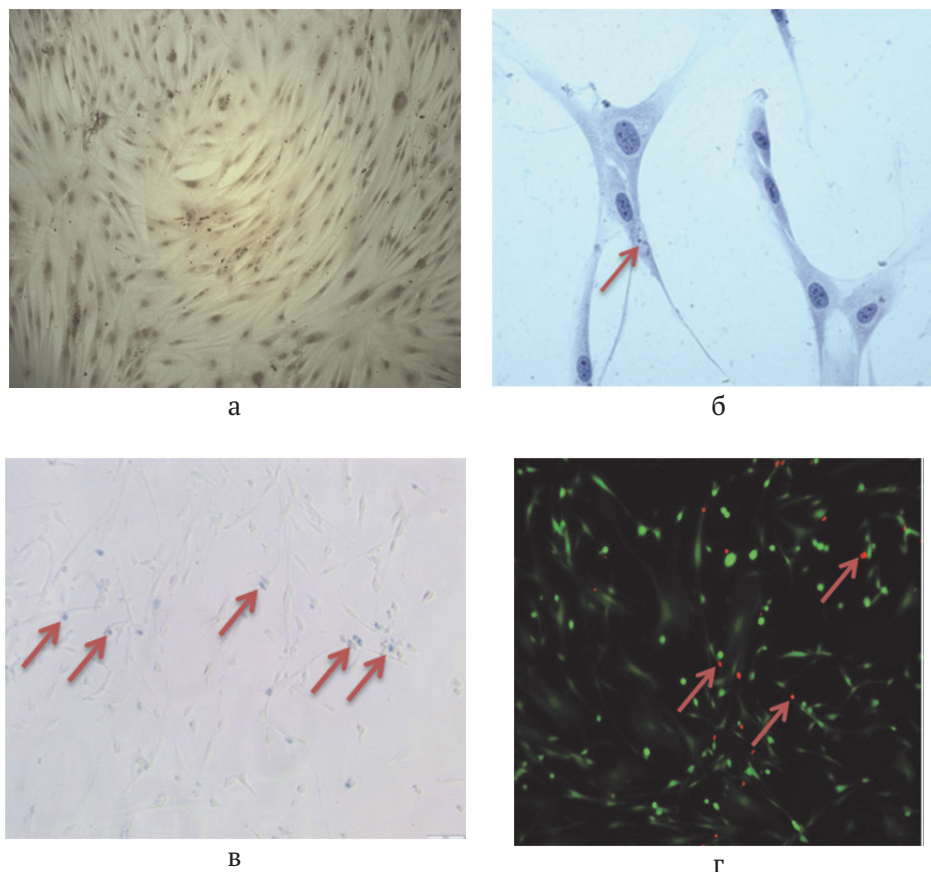


Рис. 8. Опыт. Культура дермальных фибробластов через 48 часов после поперечного воздействия ИМП ВН с энергией 500 Дж: Окраска суданом IV и гематоксилином:

а – выстраивание клеток в монослое под воздействием силовых линий магнитного поля, увеличение 100;
б – морфологические изменения клеток (участки зернистости цитоплазмы отмечены стрелкой), увеличение 400;
в – окраска трипановым синим (поврежденные клетки отмечены стрелками).

Инvertированный микроскоп, увеличение 100;

г – флуоресцентное окрашивание набором LIVE/DEAD® (поврежденные клетки отмечены стрелками).

Люминесцентный микроскоп, увеличение 100

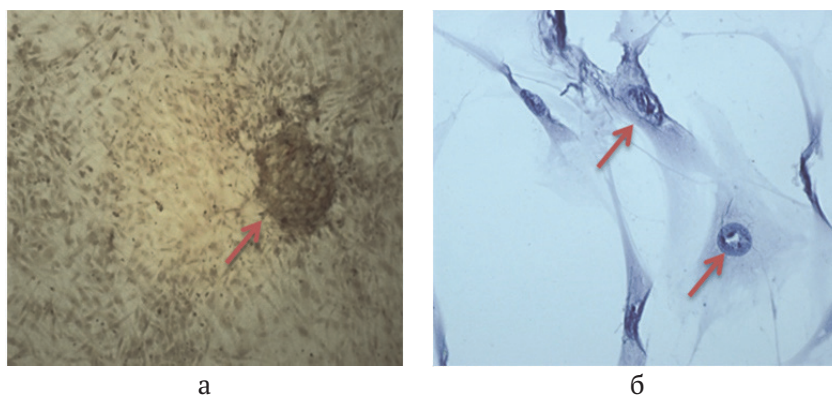


Рис. 9. Опыт. Культура дермальных фибробластов через 48 часов после поперечного воздействия ИМП ВН с энергией 1000 Дж:

а – появление коагуляционных участков монослоя (отмечен стрелкой), увеличение 100;
 б – морфофункциональные изменения клеток (разрывы цитоплазмы и ядер указаны стрелками), увеличение 400. Окраска суданом IV и гематоксилином.

По результатам экспериментов установлено:
 Факт влияния импульсного магнитного поля высокой напряженности на биологический объект, а именно культуру дермальных фибробластов;

Воздействие ИМП ВН в продольном направлении при энергии 500 Дж не вызывает повреждения структуры фибробластов в культуре. Данный режим является безопасным для здоровых первичных культур клеток;

При поперечном воздействии как при 500, так и при 1000 Дж имеет место повреждение данной популяции клеток вплоть до их гибели;

Намечены пути модернизации магнитно-импульсных установок, с целью управления параметрами воздействия ИМП на культуры клеток

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают благодарность Юсупову Р.Ю. за помощь в реализации технической составляющей данной статьи

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пономаренко Г.Н. Общая физиотерапия: Учебник. // Москва издат. Группа «ГЭОТАР-Медиа», 2012. - 368 с.
2. Улащик В.С. Общая физиотерапия: Учебник. 3-е изд. - Мн.: Книжный дом, 2008. - 512 с.
3. Улащик В.С. Магнитотерапия. теоретические основы и практическое применение. Минск: Белорусская наука, 2015. – 379 с.
4. Куликов А.Г. Применение общей магнитотерапии в клинической практике: учебное пособие. ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования». – М.: ФГБОУ ДПО РМАНПО, 2017 – 48 с.
5. Общесистемная магнитотерапия в онкологии // Ю.Л. Рыбаков, Е.В. Кижкаев, В.П. Летагин, Т.Г. Николаева // Медицинская физика. – 2005. – №2. – С.70-76.
6. Электромагнитное поле и его влияние на физиологические процессы в организме человека / О.А. Рудыкина, Р.А. Грехов, Г.П. Сулейманова, Е.И. Адамович // Вести. Волгоград. Гос. Унив-та. Сер. 11. Естественные науки. 2016. № 3(17).
7. Перов С.Ю. Исследование функционального состояния отдельных систем организма при воздействии низкоинтенсивного радиочастотного электромагнитного поля // Вестник новых медицинских технологий. 2015. Т.9. № 3.
8. Плетнев А.С. Магнитные поля в экспериментальной и клинической онкологии. Минск: Белорусская наука, 2016. 229 с.
9. Франциянц Е.М. Противоопухолевое действие магнитных полей и их влияние на боль в экспериментальной и клинической онкологии // Исследования и практика в медицине. 2019. Т.6. № 2 С. 86-89.
10. Лечебное применение магнитных полей / Максимов А.В., Кирьянова В.В., Максимова М.А. // Физиотерапия, Бальнеология и реабилитация. 2013. № 3. С. 34-39.
11. Глуценков В.А. Технология магнитно-импульсной обработки материалов. Самара: Издательский дом «Федоров». – 2014. – 208 с.
12. Глуценков В.А. Энергетические установки для магнитно-импульсной обработки материалов»: монография. Самара: Издательский дом «Федоров», 2013. 128 с.
13. Глуценков В.А. Индукторы для магнитно-импульсной обработки материалов»: учебное пособие. Самара : Учебная литература, 2013. – 148 с.
14. Гринберг К.Н. Культивирование фибробластов человека для диагностики наследственных болезней // Методы культивирования клеток: Сборник научных трудов. - Л.: Наука, 1988. – С. 250-257.

**ACTION OF A HIGH-INTENSITY PULSED MAGNETIC FIELD
ON A HUMAN DERMAL FIBROBLASTS IN CULTURE**

© 2020 V.A. Glushchenkov^{1,3}, L.T. Volova², I.A. Belyaeva¹, V.V. Boltovskaya²,
V.V. Rossinskaya², A.I. Ignatenko¹, I.F. Nefedova², L.N. Kulagina²

¹Samara National Research University named after Academician S.P. Korolyov, Samara, Russia

²Institute of Experimental Medicine and Biotechnology of Samara State Medical University, Samara, Russia

³Samara Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Samara, Russia

The influence of pulsed magnetic fields (PMF) with different values of field intensity H , discharge current frequency f and a number of pulses n on dermal fibroblasts was studied in vitro. A specialized pulse-magnetic installation «PMI-Bio» and a measuring stand for creating and monitoring the specified parameters of the PMF were created. Four series of experiments with longitudinal and transverse action of the PMF at a field intensity of $3.76 \cdot 10^6 - 8.7 \cdot 10^6$ A/m (500 and 1000 J) were carried out. It was found that the longitudinal action of the PMF at 500 J does not lead to cell death, preserves all their structural components, and is safe for primary fibroblast cultures. The use of high-intensity pulsed magnetic fields (HI PMF) at 1000 J in both longitudinal and transverse directions leads to a violation of cell adhesion to the culture plastic and changes in the structure of dermal fibroblasts, up to their death.

Key words: high-intensity pulsed magnetic field; impact factors: intensity, frequency, f number of pulses; dermal fibroblasts; morphology of cells.

DOI: 10.37313/1990-5378-2020-22-5-14-22

*Vladimir Glushchenkov, Candidate of Technical Sciences,
Professor of the Department of Metal Forming by Pressure.
E-mail: vgl@ssau.ru*

*Larisa Volova Doctor of Medical Sciences, Professor.
E-mail: volovalt@yandex.ru*

*Violetta Boltovskaya, Candidate of Medical Sciences.
E-mail: violetta.boltovskaya@yandex*

*Victoria Rossinskaya, Candidate of Medical Sciences,
Associate Professor. E-mail: rossinskaya_v_v@mail.ru*

*Irina Belyaeva, Candidate of Technical Sciences, Associate
Professor. E-mail: belyaeva-ommr@yandex.ru*

*Alexander Ignatenko, Design Engineer SRL-41.
E-mail: mc-alexandro@bk.ru*

*Irina Nefedova, Researcher, Institute of Experimental Medicine
and Biotechnology, Samara State Medical University. E-mail:
bobrovka2012@yandex.ru*

*Larisa Kulagina Chief Specialist of the Biotechnology
Department. Institute of Experimental Medicine and
Biotechnology, Samara State Medical University.
E-mail: LnKulagina07@mail.ru*