

На правах рукописи

РЫБАКОВ Юрий Леонидович

**ОБЩЕЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА ОРГАНИЗМ
СЛАБОГО НИЗКОЧАСТОТНОГО ВИХРЕВОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ
ПРИ РАЗВИТИИ ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА**

03.01.01 - радиобиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва, 2013 г.

Работа выполнена в Некоммерческом Учреждении Институте медицинской физики и инженерии при Российском онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина РАМН

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор

Добрынин Ярослав Васильевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор, академик РАЕН, заведующий лабораторией инженерной биофизики Института биохимической физики им. Н.М.Эммануэля РАН

Кузнецов Анатолий Александрович

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН

Белова Наталья Александровна

доктор технических наук, профессор, ведущий научный сотрудник Российского онкологического научного центра им. Н. Н.Блохина РАМН

Наркевич Борис Ярославович

Ведущая организация: Российский научный центр рентгенорадиологии, г. Москва

Защита состоится «17» октября 2013 г. в 15.00 часов на заседании Диссертационного совета Д.501.00.65 при Московском Государственном Университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп. 12, Биологический факультет, ауд. 389

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В.Ломоносова: Ломоносовский проспект, дом 27.

Отзывы просим присылать по адресу: Веселовой Т.В., 119991. Москва, Ленинские горы, МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет. Факс (495) 939-11-15 (обязательно 2 экземпляра в бумажном варианте с печатью и подписью).

Автореферат разослан «_____» _____ 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

Веселова Т.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Биологическая активность слабых низкочастотных электромагнитных полей (ЭМП) не вызывает сомнений. Данные многих исследований (Floderus et al, 1993; Miller et al, 1996; London et al, 1994; Kneifets et al, 1999; Григорьев, 2004; Евдокимов и др., 2006) показывают, что нарушение электромагнитной экологии может приводить к возникновению патологических состояний, в том числе к онкологическим заболеваниям. В тоже время ЭМП, обладая рядом полезных качеств, широко используются в медицине для лечения хронических заболеваний, нервно-психической сферы, восстановления поврежденных тканей и др. (Пономаренко, 1995; Жуков, 1986; Коротких, 1996; Вихляров и др., 1999). Учитывая возможности как позитивного, так и негативного влияния ЭМП на здоровье человека, вопросы практического использования магнитных полей определенных параметров в медицине должны основываться на результатах изучения их магнитобиологических эффектов и механизмов.

К настоящему времени высказано много гипотез в отношении интерпретации механизмов магнитобиологических эффектов, но ни одна из них не является строго доказанной и общепринятой (Бинги, 2006), и основным источником информации о реакциях биологических объектов на действие ЭМП пока являются экспериментальные исследования. Однако, несмотря на отсутствие однозначных представлений о возможных механизмах действия слабых низкочастотных ЭМП на живой организм и, в частности, на опухолевый процесс, интерес к этим полям со стороны экспериментальной и клинической онкологии неуклонно возрастает. В ряде экспериментальных исследований обнаружены эффекты противоопухолевого действия, которые открывают перспективы для применения этого физического фактора в онкологической клинике (Уколова, 1971, Квакина, 1972, Новиков, 1996, Музалевская, 1997).

Особый интерес представляет изучение эффектов и механизмов биологического действия на весь организм человека слабого низкочастотного вихревого магнитного поля (ВМП), отличающегося наиболее высоким уровнем биотропности (Бахмутский, 1991; Добрынин, 1995). Особенностью этого воздействия является сочетание комплекса статических (частота, однородность) и динамических (индукция, градиент, модуляция) параметров ВМП с общим характером воздействия на весь организм, что способно вызвать значительный биологический отклик на всех уровнях организации от молекулярно - клеточных процессов до реакций всего организма в целом (Беркутов, 2000). Очевидно, что успех любого терапевтического метода, связанного с применением факторов физического воздействия, определяется

знанием первичных механизмов их биологического действия. В этом плане роль и возможности применения ВМП-воздействия в практике лечения онкологических заболеваний остаются неопределенными.

Наряду с поиском новых средств противоопухолевой терапии, актуальной задачей является разработка подходов к оптимизации и повышению эффективности лечения онкологических больных путем включения в традиционные схемы лечения методов активационной терапии, которые позволили бы снизить послеоперационные осложнения, побочные действия противоопухолевых препаратов и ионизирующего излучения (Грушина, 2001). Одной из приоритетных задач реабилитационной медицины является восстановление и поддержание внутреннего гомеостаза, нарушенного различными патологическими влияниями. Гомеостатические процессы в организме чувствительны к различным факторам воздействия окружающей среды, в том числе физической природы. Среди них важное место занимают магнитные поля, поскольку человек сегодня находится в «магнитной паутине» увеличивающегося количества источников ЭМП. В числе гомеостатических механизмов, поддерживающих постоянство внутренней среды организма и адаптации его к различного рода воздействиям, видное место принадлежит иммунитету и связанным с ним факторам неспецифической защиты, одной из главных функций которой является обеспечение противоопухолевой резистентности. В этом плане изучение влияния слабого ВМП на состояние противоопухолевой резистентности организма может иметь принципиальное значение для понимания механизмов их действия в условиях опухолевого роста, использования этого физического фактора для коррекции нарушенного патологией гомеостаза и реабилитации организма человека.

В настоящее время развивается общесистемная ВМП-магнитотерапия на базе магнитотерапевтических установок типа «Магнитотурботрон» (Лабетский и др., 1995; Летягин и др., 1996; Лубенников и др., 1995; Родин и др., 1996; Бахмутский и др., 1999). Для эффективного применения ВМП-магнитотерапии в восстановительном и реабилитационном лечении онкологических больных необходимо изучить особенности общего воздействия слабого низкочастотного ВМП на организм человека.

В связи с выше сказанным, углубленные исследования биологических основ общего действия слабого низкочастотного ВМП, а также разработка принципов и методов технологии общесистемной ВМП-магнитотерапии представляется актуальной и своевременной задачей, способствующей применению этого физического фактора в медицинской практике.

Цель и задачи исследования

Целью работы было выяснение биологических механизмов воздействия слабого низкочастотного ВМП для разработки и внедрения в практику новой медицинской технологии – общесистемной ВМП-магнитотерапии.

В задачи работы входило:

1. Исследовать эффекты и механизмы противоопухолевого действия слабого низкочастотного ВМП на экспериментальных объектах: культивируемых опухолевых клетках и животных с перевиваемыми опухолями, дифференцировать уровни реализации противоопухолевого эффекта ВМП, оценить степень участия прямых клеточных механизмов и опосредованных через организм защитных реакций, а также установить возможные механизмы биологического действия ВМП.

2. Изучение взаимодействия ВМП с противоопухолевыми препаратами и лучевым воздействием с целью разработки рекомендаций для онкологической клиники.

3. Разработка методического и аппаратно-программного обеспечения для ВМП-магнитотерапии.

4. Выбор параметров и режимов для оптимального воздействия ВМП на организм человека, и предложение методов мониторинга состояния организма человека в процессе общесистемной ВМП-магнитотерапии.

5. Изучение особенностей влияния слабого низкочастотного ВПМ на показатели гомеостаза.

6. Исследование применения общесистемной ВМП-магнитотерапии в схемах радикального и восстановительного лечения онкологических больных.

Основные положения, выносимые на защиту

- Положительное влияние слабого низкочастотного ВМП на резистентность и гомеостаз организма в условиях развития опухолевого процесса.
- Применение общесистемной ВМП-магнитотерапии в лечении онкологических больных.

Научная новизна работы

Впервые проведено комплексное исследование действия слабого низкочастотного ВМП на опухолевые объекты *in vitro* и *in vivo*. Установлено, что воздействие ВМП может оказывать незначительное (до 30%) ингибирующее действие на синтез ДНК культивируемых опухолевых клеток, и существенно (до 70 – 80%)

тормозить развитие опухолевого процесса для некоторых видов опухолей экспериментальных животных, не вызывая нарушения метаболизма здоровых клеток и отрицательных побочных эффектов для организма. Показано, что одной из мишеней ВМП являются клетки иммунной системы (фагоциты), которые под его действием увеличивают продукцию активных форм кислорода (АФК) и повышают уровень неспецифической резистентности организма к развитию опухолевого процесса. Показано, что воздействие ВМП может послужить причиной запуска программы апоптоза, приводящей к задержке и блокированию клеточного цикла опухолевых клеток. Экспериментально установлен радиомодифицирующий эффект ВМП, проявляющийся в снижении тяжести местных лучевых реакций нормальных тканей на 20 – 25% и уменьшении тяжести лучевого поражения организма на 15%.

Разработаны подходы к исследованию особенностей общего воздействия слабого низкочастотного ВМП на организм человека и выбору параметров для нормализующего влияния на гомеостатические и адаптивные механизмы организма. Экспериментально установлена и теоретически обоснована возможность изменения гомеостаза организма человека в процессе магнитотерапевтических процедур в виде качественного перехода в новое состояние, отличающееся большей стабильностью и упорядоченностью.

Впервые на основе методов газоразрядной визуализации (ГРВ) и электропунктуры (метод Накатани) предложены и апробированы способы для оценки индивидуальной магниточувствительности человека и мониторинга динамики изменения функционального состояния организма при выполнении общесистемных магнитотерапевтических процедур слабым низкочастотным ВМП.

Практическое значение. Созданы научные основы для разработки новых биомедицинских технологий применения общесистемной ВМП-магнитотерапии в медицинской практике. Экспериментально и теоретически обоснованы принципиальные возможности применения воздействия слабого низкочастотного ВМП для коррекции нарушенного течением патологических процессов состояния организма человека. Разработаны методики наблюдения за динамикой изменения функционального состояния организма человека при общесистемной ВМП-магнитотерапии, позволяющие учитывать индивидуальную магниточувствительность и оптимизировать процесс лечения к формированию адекватной адаптивной реакции. При клинической апробации в результате включения ВМП-магнитотерапии в схемы радикального и восстановительного лечения онкологических больных получены данные об улучшении непосредственных и отдаленных показателей качества лечения. Результаты экспериментальных и клинических исследований послужили основой для

разработки и внедрения методических рекомендаций по применению ВМП-магнитотерапии для лечения онкологических и неонкологических заболеваний. На базе серийно выпускаемой установки «Магнитотурботрон» (Продукция ММЦ «МАДИН», г. Нижний Новгород) разработан проект кабинета общесистемной ВМП-магнитотерапии для практической медицины и руководство к проведению процедур ВМП-магнитотерапии.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на Всероссийских и Международных конференциях и конгрессах:

Российская конференция “Генераторы электромагнитного поля для магнитотерапии” (Саров, 1995); I и VI Международный конгресс “Слабые и сверхслабые поля и измерения в биологии и медицине” (С. Петербург, 1997, 2012); International congress of integrative medicine “Synthesis of medicine East-West and modern technologies – the way to XXI century” (Cyprus, 1997); 2th World Congress for Electricity and Magnetism in Biology and Medicine (Bologna, Italy, 1997); Российская научно-практическая конференция “Низкоэнергетическая магнитотерапия: опыт клинического применения и перспективы развития” (Москва, 1997); VIII Международный симпозиум “Эколого-физиологические проблемы адаптации” (Москва, 1998); 20th Annual the Bioelectromagnetics Society Meeting (Florida, USA, 1998); I Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии (Москва, 2001); I Международный симпозиум “Квантовая медицина и новые медицинские технологии” (Блед, Словения, 2001); 23th Annual the Bioelectromagnetics Society Meeting (St. Paul, Minnesota, USA, 2001); Российской научно-практической конференция “Новые методы диагностики и лечения лиц, подвергшихся радиационному воздействию” (Москва, 2002); 24th Annual the Bioelectromagnetics Society Meeting (Quebec, Canada, 2002).

Отдельные результаты работы докладывались на совещаниях и семинарах, организованных Ассоциацией медицинских физиков РФ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 48 научных работ, в том числе 18 статей в журналах, входящих перечень изданий, рекомендуемых ВАК для докторских диссертаций: Медицинская физика – 14, Прикладная физика – 2, Вопросы онкологии – 1, Российский онкологический журнал – 1.

Разработаны методические рекомендации по применению общесистемной магнитотерапии ВМП в схеме лечения местнораспространенного рака молочной железы III стадии. Изданы руководство для медицинских специалистов по работе с магнитотерапевтической установкой «Магнитотурботрон» и учебное пособие по физическим основам применения магнитных полей в медицине для студентов по специальности «Медицинская физика».

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения, общих выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 250 страниц машинописного текста, содержит 25 таблиц и 35 рисунков. Библиографический указатель содержит 423 ссылки на работы отечественных и иностранных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе (обзор литературы), состоящей из 4 разделов, изложены современные представления о магнитобиологии слабых низкочастотных магнитных полей, результаты исследований влияния магнитных полей на канцерогенез, а также данные об экспериментальных исследованиях противоопухолевого действия магнитных полей и применения их в онкологической клинике.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились на базе НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей и НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, а также Института медицинской физики и инженерии.

Клеточные культуры. Оценку влияния действия ВМП на пролиферацию культивируемых опухолевых клеток проводили на клеточной линии CaOv с помощью метода радиометрического анализа по включению клетками предшественника ДНК меченого тритием ^3H -тимидина (Добрынин и др., 1974). Статистическую обработку и оценку полученных данных производили на ЭВМ по программе «VARX2PC» (Басов и др., 1989). Программа предусматривала поиск и дискриминацию артефактных данных с критерием значимости менее 0,05. Исследование способности ВМП индуцировать апоптоз проводили на клетках линии Jurkat (Т-клеточный лимфобластоидный лейкоз человека) методом проточной цитофлуориметрии по критерию появления клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК (Trauth et al., 1989).

Экспериментальные животные. Действие ВМП на перевиваемые опухоли исследовали на мышах линии C₅₇BL₆ и гибридах ВДФ₁ на наборе штаммов: лимфоцитарный лейкоз Р-388, лимфоидный лейкоз L-1210, рак молочной железы Са-755, рак легких Льюис LLC, меланома В-16, рак шейки матки РШМ-5. В эксперименте с комбинированным применением ВМП и цитостатиков (сарколизин и 6-меркаптопурин) использовали мышей с перевиваемыми опухолями Са-755, В-16 и РШМ-5. Сарколизин (СК) в дозе 3 и 5 мг/кг вводили внутривентрально, а 6-

меркаптопурин (6-МП) – зондом в желудок в течение 5 дней одновременно с началом воздействия ВМП. Измерения размеров опухолей производили: 1-ое по окончании 5-ти дневного курса цитостатиков; 2-е – по окончании 10-ти дневного курса ВМП; 3-е – через неделю после 2-го; 4-ое – через неделю после 3-го.

Действие ВМП на процесс метастазирования изучали на штамме высокометастазирующего рака молочной железы мышей ВМР-F₁.

Критерий противоопухолевой активности: увеличение продолжительности жизни (УПЖ) > 25 % или торможение роста опухоли (по массе или объему) > 50 %. Процент УПЖ вычисляли по формуле:

$$[(O_1 - K_1) / K_1] \times 100\%$$

где: O₁ – средняя продолжительность жизни в опыте,

K₁ – средняя продолжительность жизни в контроле.

Процент торможения роста опухоли вычисляли по формуле:

$$[(O_2 - K_2) / K_2] \times 100\%$$

где: O₂ – средний показатель роста опухоли в контроле,

K₂ – средний показатель роста опухоли в опыте.

Влияние ВМП на фазы клеточного цикла. Исследование проводили с помощью импульсного проточного цитофлуориметра ICP-22 (фирма «Фиве», ФРГ). В качестве материала использовали ткань образцов опухолей Са-755 на высоте противоопухолевого эффекта, вызванного применением ВМП. Для интерпретации указанных кривых и пересчета данных в координатах распределения клеток по фазам цикла были применены специальные алгоритмы и программы для ЭВМ, разработанные в лаборатории фармакоцитокинетики РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН (Добрынин и др., 1974).

Действие ВМП на продукцию активных форм кислорода (АФК). Исследовали спонтанную люминол-зависимую хемилюминесценцию (ХЛ): *in vitro* (после воздействия ВМП на клетки) спленоцитов мышей (самцов А/Sn); клеток периферической крови здоровых доноров и больных новообразованиями; *in vivo* (с предварительным воздействием ВМП на организм) кровь мышей С₅₇BL с подкожно перевитой меланомой В-16 отдельно, и при комбинированном применении с цитостатиками (сарколизин и 6-меркаптопурин); кровь здоровых доноров и больных раком молочной железы. Измерения ХЛ проводили на приборе «Биолумат» (модель ЛБ 9500, фирмы Бертольд, ФРГ).

Влияние ВМП на тяжесть лучевого поражения организма животных при общем сублетальном фракционированном облучении. Мыши (гибриды F₁(СВА×С₅₇BL) в количестве 102 шт.) были разделены на 10 групп, которые в течение 10 дней подвергались ежедневному фракционированному гамма-облучению (10

фракций) в суммарных дозах от 10 Гр до 14 Гр. Опыт и контроль были облучены в 5-ти разных дозах, где дозы однократного воздействия составили: 1,0; 1,1; 1,2; 1,3 и 1,4 Гр. В дни облучения 5 групп мышей (опыт) получали дополнительное ВМП-воздействие ($B_{\max} = 3,0$ мТл, $f = 100$ Гц, $T = 1$ час) в магнитотерапевтической установке «Магнитотурботрон», начиная за 1,5 – 2 часа до облучения в гамма-установке, или спустя 0,5 – 1,5 часа после облучения. После завершения курса фракционированного гамма-облучения животных наблюдали в течение 2-х месяцев, ежедневно регистрируя число погибших.

Восстановление тканей животных после лучевых повреждений. Стопы лапок мышей линии Balb/C подвергали однократному рентгеновскому облучению на рентгеновском аппарате РУТ-25 в дозах 17 Гр., 20 Гр., 25 Гр., 30 Гр. и 36 Гр, вызывающему развитие поражения кожи до уровня сухой эпидермит – влажный эпидермит – локальный некроз. Половина животных из каждой группы (опыт) получала ВМП - воздействие ($B_{\max} = 3,0$ мТл, $f = 100$ Гц) при ежедневной экспозиции $T = 1$ час в течение месяца. Динамику процесса развития поражения кожи наблюдали в течение 40 дней. Модифицирующее действие ВМП (уменьшение тяжести развивающихся реакций и сокращение сроков заживления) оценивали по уменьшению площади под кривой, очерчивающей максимальную тяжесть поражения кожи в течение всего срока наблюдения. Для оценки эффекта использовали балльную шкалу тяжести лучевых реакций кожи конечности мышей, разработанную и применяемую при оценке радиомодификаторов в лаборатории лучевых методов лечения опухолей РОНЦ. Кривые развития процесса лучевых реакций для разных групп контроля и опыта сравнивали между собой.

Клинические исследования. Для исследований был привлечен контингент из 114 первичных больных с диагнозом местнораспространенного рака молочной железы III-ей стадии ($T_{1-3}N_{2-3}M_0$) в возрасте до 65 лет. Опытная группа (70 больных) получили комбинированное предоперационное лечение по стандартной схеме с применением воздействия ВМП с помощью установки «Магнитотурботрон». Продолжительность курса ВМП-воздействия определяли длительностью основного (химиолучевого) лечения. Оценку непосредственных результатов лечения проводили через 3 – 6 недель после начала предоперационного лечения. Оценку отдаленных результатов лечения проводили по данным наблюдения больных в течение 5-ти лет с контрольными осмотрами через каждые 6 месяцев.

Аппаратурное обеспечение. В исследованиях с клеточными культурами и экспериментальными животными были использованы специально созданные для этой цели генераторы вихревого магнитного поля (разработки ГУП ОНПК «Здоровье») с программно управляемым источником питания для формирования заданных

параметров по заданному закону сигнала ВМП с варьированием индукции магнитного поля и частоты вращения в пределах: $V_{\max} = 1.5 - 3,5 \text{ мТл}$, $f = 50 - 200 \text{ Гц}$. Для проведения клинических исследований были использованы разработанный экспериментальный образец магнитотерапевтической установки ВМП (ГУП ОНПК «Здоровье») и «Магнитотурботон-2» (разработка НПФ «Аз»). Исследование реакций организма человека на воздействие ВМП по методу Накатани осуществляли с помощью разработанного в ГУП ОНПК «ЗДОРОВЬЕ» аппаратно-программного комплекса, для метода газоразрядной визуализации (ГРВ) был применен сертифицированный Минздравом РФ программно-аппаратный комплекс «Коррекс» (разработка АОЗТ «КТИ» и НИИПТ «РАСТР», г. Санкт-Петербург).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

I. Исследование действия ВМП на экспериментальных объектах

1.1. Разработка генератора ВМП. Для проведения экспериментальных исследований с культурами клеток и экспериментальными животными была разработана и изготовлена конструкция генератора вихревого магнитного поля, представляющего протяженный индуктор с трехфазными двуполостными обмотками (катушки Гемгольца) на которые от трехфазного преобразователя через интегрирующий фильтр подается переменный ток. Программно управляемый источник питания генератора позволяет формировать заданную временную форму сигнала ВМП, которая характеризуется изменением в течение одного периода (цикла) воздействия модуля индукции $|B|$ от нуля до максимальной величины $V_{\max}$ по установленному закону с огибающей спектра $g(t)$. Полное время экспозиции $t_{\text{экс}}$ определяется количеством заданных циклов воздействия ВМП.

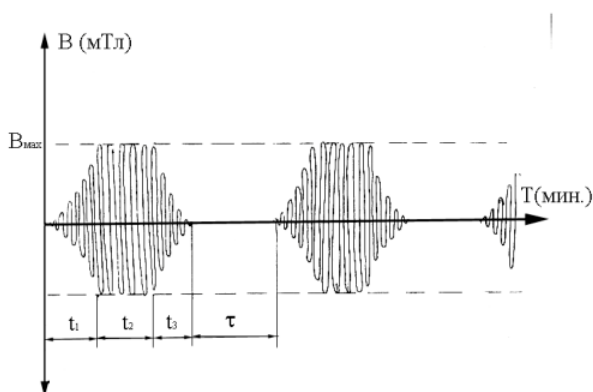


Рисунок 1. Модуляционная характеристика периодического сигнала ВМП во времени.

В результате на исследуемый объект осуществляется воздействие амплитудно-модулированного сигнала ВМП, вектор

магнитной индукции которого вращается вокруг оси с частотой f (рис. 1), а в рабочей зоне индуктора создается однородное магнитное поле.

С целью поиска наиболее выраженных реакций биологических объектов на ВМП параметры и режимы воздействия варьировали в диапазонах ($B_{\max} = 1.5 - 3.5$ мТл, $f = 50 - 200$ Гц). Продолжительность непрерывного ВМП-воздействия T (час) в разных опытах составляло от 1 до 8 часов. В некоторых случаях проводили опыты с многократным воздействием ВМП, где количество повторных экспозиций N варьировали от 2-х и более.

1.2. Действие ВМП на культивируемые клеточные культуры. Основанием для изучения биологических эффектов ВМП на культивируемых клеточных линиях послужило существующее к тому времени состояние неопределенности в понимании механизмов противоопухолевого действия слабых низкочастотных вихревых магнитных полей. При оценке действия ВМП на опухолевые клетки вне организма основное внимание было уделено вопросам его способности:

- быть источником необратимых повреждений в цепочке биосинтеза в клетках, которые приводят к суммарным клеточным эффектам, выражающимся в угнетении синтеза ДНК и торможении пролиферации;
- индуцировать эффект апоптоза.

При работе с клеточными культурами особое внимание было уделено поиску параметров ВМП, соответствующих наиболее выраженным реакциям на воздействии исследуемых объектов.

Влияние ВМП на синтез ДНК

Для изучения прямого действия ВМП на опухоль использовали опухолевые клетки линии СаОv, полученной из папиллярной карциномы яичника человека (Добрынин и др., 1974). Для приготовления образцов из культур готовили клеточную суспензию по стандартной методике, которую разливали по 2 мл в пенициллиновые флаконы (по 30 – 50 шт. для опыта и контроля). Всего было проведено 29 опытов, в которых в разных сочетаниях изменялись значения параметров воздействия ВМП: $B_{\max} = 1.5; 2.0$ и 3.0 мТл; $f = 50, 100$ и 200 Гц; время однократного воздействия $t = 2, 4, 6$ и 8 час. В ряде опытов было применено двукратное воздействие. Временной профиль импульса в разных опытах составлялся из различных комбинаций. Пауза между импульсами во всех опытах $\tau = 20$ сек. Экспозицию образцов клеток в ВМП в течение 2 – 4 часов осуществляли при комнатной температуре 20°C , опыты с более продолжительной экспозицией проводили при 36.6°C . После воздействия ВМП в культуры добавляли меченный тритием ^3H -тимидин и оставляли на 1 час в термостате для его включения в ДНК клеток, с последующим измерением уровня

радиоактивности сцинтилляционным счетчиком «Интертекник-СЛ-3000» (Франция) в импульсах/мин и пересчетом в распадах/мин. Значения радиоактивности образцов в опыте и контроле обрабатывали математически и статистически по специально разработанной программе «VARX2PC» (Басов и др., 1989). Оценку влияния ВМП на пролиферацию клеток осуществляли по включению меченого тритием ^3H -тимидина в ДНК. При выборе критерия исходили из того, что все повреждающие воздействия, вне зависимости от механизмов прямого действия, при достаточно длительной экспозиции в конечном итоге будут тормозить репродукцию клеток и синтез ДНК. Указанный критерий, будучи интегральным, рассматривался как показатель жизнедеятельности клеток и клеточной популяции в целом. Оценку достоверности различий сравниваемых величин производили общепринятым способом на основании критерия Стьюдента. При $p \leq 0,05$ разницу величин рассматривали как достоверную.

Исследования в целом показали, что во всех опытах, где под воздействием ВМП наблюдалось статистически значимое ($p < 0,05$) угнетение синтеза ДНК, абсолютные значения торможения не превышали 35%. При этом вероятность получения положительного результата (статистически значимого торможения синтеза ДНК) для разных значений ВМП в опытах составила 27,6%. Относительно поиска оптимальных параметров ВМП следует отметить, что наиболее выраженные эффекты торможения синтеза ДНК имели место для $B_{\max} = 3,0$ мТл. При этом эффект в большинстве случаев был выше при частоте ВМП 100 Гц по сравнению с 50 Гц и увеличивался с увеличением времени воздействия ВМП. Из всех временных конфигураций импульсов наиболее эффективной была формула: 20 – 20 – 20 (сек).

В табл.1 приведены результаты опыта влияния ВМП ($B_{\max} = 3,0$ мТл) на клетки СаОv, соответствующие данным параметрам воздействия.

Таблица 1.

Торможение синтеза ДНК клеток СаОv при воздействии ВМП.

Частота ВМП, (Гц)	Время воздействия ВМП, (час)	Включение ^3H -тимидина в ДНК клеток (расп./мин)		Опыт/контроль (%)	Достоверность
		Контроль	Опыт		
50	2	7332±1051	4446±414	59	$p < 0,05$
50	4	3116±358	2366±327	75,9	$p < 0,05$
100	2	7532±1051	4946±1160	65,7	$p < 0,05$
100	4	6465±649	5531±1122	86,3	$p < 0,05$

*) – Даны средние $\pm$ среднеквадратичные отклонения.

Практически во всех случаях при этих параметрах воздействия наблюдалось достоверное снижение включения ^3H -тимидина в ДНК клеток.

Изучение комбинированного действия ВМП и противоопухолевых цитостатиков (сарколизин, 6-меркаптопурин) на культуру опухолевых клеток СаОv не выявило существенного изменения цитотоксического эффекта цитостатиков.

При исследовании действия ВМП на клонообразование клеток линии СаОv было отмечено снижение показателя клонообразования на 10 – 22% (табл. 2). При этом ВМП не оказывало существенного и необратимого влияния на внешнюю клеточную мембрану, повреждения которой затрудняет прикрепление одиночных клеток к стеклу с последующим образованием колоний.

Таблица 2.

Влияние ВМП ($B_{\max} = 3,0$ мТл) на выживаемость клонообразующих клеток линии СаОv.

Контроль (количество колоний)	ОПЫТ				
	Параметры воздействия ВМП		Количество колоний	Достоверность	Опыт/контроль (%)
	f (Гц)	T (час)			
108 ± 15	50	2	90 ± 18	p<0,05	83
108 ± 15	50	4	94 ± 20	p<0,05	87
130 ± 18	100	2	102 ± 24	p<0,05	78
92 ± 7	100	4	83 ± 11	p<0,05	90

*) – Даны средние ± среднеквадратичные отклонения.

Выживаемость клоногенных клеток после воздействия ВМП также существенно не изменялась, наблюдалось много мелких колоний, что может указывать на репарируемые клетками повреждения в результате действия магнитного поля. На это также указывает замедление роста колоний, восстанавливающееся через некоторое время после воздействия ВМП.

Таким образом, полученные данные говорят о том, что возникающие после воздействия ВМП повреждения в клетках СаОv носили не глубокий, кратковременный и репарируемый характер.

Влияние ВМП на апоптоз

Опыты проводили на клетках линии Jurkat (Т - клеточный лимфобластоидный лейкоз человека, Trauth et al., 1989). Клеточные культуры, подготовленные по стандартной методике, подвергали воздействию ВМП ($B_{\max} = 3$ мТл, f = 100 Гц, T = 2 час). Анализ результатов проводили по характеристикам типичных гистограмм распределения клеток по содержанию ДНК, полученных с помощью проточного цитофлуориметра. Измерения проводили сразу после облучения, через 2, 4 и 24 часа.

Показатель индуцированного апоптоза оценивали по критерию появления клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК. Всего было проведено 9 опытов, из которых значимый эффект индукции апоптоза имел место только в 4 случаях. На рис. 2 представлены результаты одного из опытов в котором эффект индукции, оцененный по отношению $[(O - K)/K] \times 100\% = 83\%$. Гиподиплоидные клетки вследствие потери части ДНК в процессе апоптоза находятся слева от основного пика G_0 , соответствующего диплоидным клеткам.

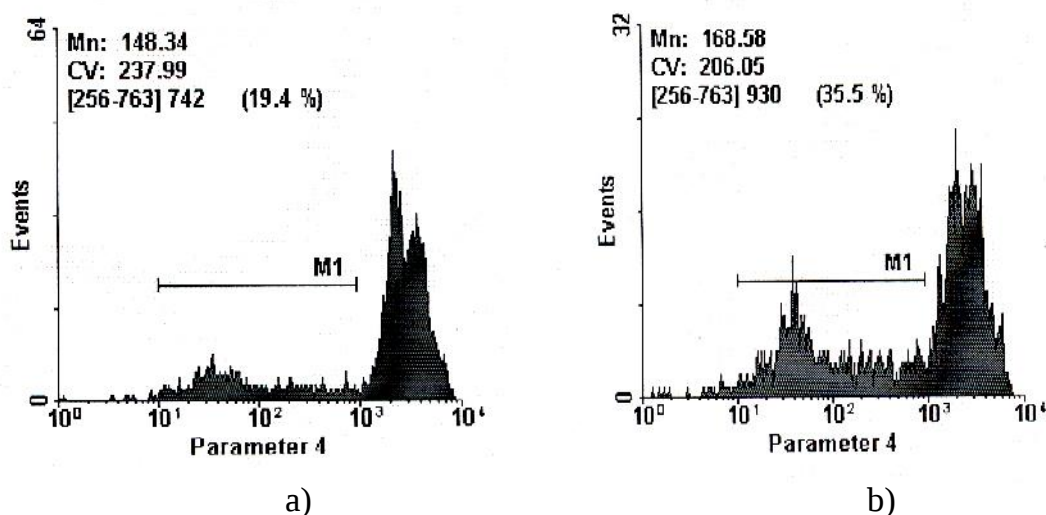


Рисунок 2. Данные проточной цитофлуометрии клеток линии Jurkat:
а) контроль, б) опыт.

Таким образом, проведенные исследования приводят к заключению, что слабое низкочастотное ВМП способно оказывать непосредственное прямое действие на ингибирование синтеза ДНК, пролиферацию, а также на индукцию апоптоза в культивируемых опухолевых клетках. В тоже время регистрируемые эффекты не велики, и наблюдаются не всегда. Поэтому эти механизмы нельзя считать непосредственно ответственными за противоопухолевый эффект ВМП.

1.3. Влияние ВМП на динамику роста перевиваемых экспериментальных опухолей. Следующим этапом исследований действия ВМП стало изучение противоопухолевого эффекта на уровне организма на моделях перевиваемых штаммов опухолей разного генезиса.

Для исследования использовали 240 мышей (самцов и самок) линии $C_{57}BL_6$ и гибридов $ВДФ_1$. Воздействие ВМП осуществляли при следующих параметрах: $V_{max} = 3,0$ мТл; $f = 50$ Гц и 100 Гц, временной профиль сигнала ВМП соответствовал формуле: $20 - 20 - 20$ сек, промежуток между импульсами $\tau = 20$ сек. Каждый опыт формировался из расчета: 10 животных в контроле и 20 – в опыте. Действие ВМП на перевиваемые опухоли животных исследовали на наборе из двух штаммов лейкозных

асцитных опухолей (P-388, L-1210) и четырех различных по гистогенезису и чувствительности к химиотерапии солидных опухолей: рак молочной железы Са-755, рак легких Льюис LLC, меланома В-16, рак шейки матки РШМ-5. Опухоли перевивали мышам подкожно взвесью опухолевых клеток в среде 199 в разведении 1:100 по 0,5 мл. Через 3-е суток проводили ежедневные воздействия ВМП, которое животные переносили без каких-либо отклонений от обычного поведения. В разных опытах продолжительность воздействия варьировалась от 1 часа до 3 часов, а количество воздействий от 10 до 30. На 7, 14 и 21 сутки после перевивки измеряли размеры опухоли и высчитывали их объемы.

Процент торможения роста опухоли вычисляли по формуле:

$$[(O - K) / K] \times 100\%$$

где: О – средний показатель роста опухоли в контроле,

К – средний показатель роста опухоли в опыте.

Объем опухоли вычисляли по формуле:

$$V = \pi/6 \times (A \times B \times C)$$

где: А, В, и С – три взаимно перпендикулярных диаметра опухоли, которые измеряли специальным циркулем на установленных сроках наблюдения.

Опыты с лимфолейкозами Р-388 и L-1210 при различных вариантах воздействия ВМП существенных различий по продолжительности жизни мышей по отношению к контролю не показали.

Опыты на мышах с солидными опухолями (кроме рака шейки матки РШМ-5) показали существенно угнетающее рост опухолей действие ВМП:

Аденокарцинома молочной железы Са-755. К первому сроку наблюдения (7-й день) было отмечено у мышей получавших воздействие ВМП замедление роста опухоли в среднем на 81,2% по отношению к контролю. К исходу 2-й недели торможение роста опухоли было 72%, и на третьем сроке наблюдения торможение роста уменьшилось до 30% по отношению к контролю. Гибель животных наступала на 22 – 24 день. Удлинение продолжительности жизни в опыте по отношению к контролю не превышало 10%. Обращает внимание значительное замедление темпа роста опухолей в начале курса лечения и последующее снижение эффекта к концу срока наблюдения.

Карцинома легкого Льюис LLC. Поставлено два опыта на 60 мышах. В первом опыте животные подвергались воздействию ВМП ($B_{\max} = 3,0$ мТл, $f = 50$ Гц) по 3 часа в течение 30 дней ($T \times N = 90$ часов). Заметное уменьшение размеров опухолей (10%) у мышей в подопытной группе по отношению к контролю стало проявляться к концу 2-й недели, и к 3-ей недели наблюдения составило 26%. Гибель подопытных и контрольных животных наступила на 34 – 36 день после перевивки.

Во втором опыте мыши были подвергнуты воздействию ВМП ($B_{\max} = 3,0$ мТл, $f = 100$ Гц) по 3 часа в течение 30 дней ($T \times N = 90$ часов). Животные переносили воздействие ВМП без признаков беспокойства. Уже через 1 неделю после начала воздействия по отношению к контролю размеры опухолей снизились на 48%, через 2 недели на 34%, через 3 недели на 50%.

Меланома В16. Было поставлено два опыта для ВМП ($B_{\max} = 3,0$ мТл, $f = 50$ Гц и 100 Гц). В первом опыте с частотой $f = 50$ Гц торможение роста опухолей, по отношению к контролю, через неделю составило – 54%, через две недели – 40% и через три недели – 63%. Во втором опыте при частоте $f = 100$ Гц были получены сходные результаты: к концу первой недели торможение роста опухолей составило – 41%, через две недели – 33%, а через три недели наблюдения – 58%.

Таким образом, для относительно медленно растущих солидных опухолей Ca755, LLC и В-16 темп роста замедлялся в среднем от 50% до 70% по отношению к контролю. Обращает внимание значительное замедление темпа роста опухолей в начале курса лечения и последующее снижение эффекта к концу срока наблюдения. Отмечено, что наиболее эффективное противоопухолевое воздействие ВМП было при $f = 100$ Гц.

Таблица 3.

Действие ВМП на опухоли Ca-755 и В-16.

Средний объем опухоли (мм ³), торможение роста опухолей (%)							
Ca-755				В-16			
	Сроки наблюдения				Сроки наблюдения		
	1	2	3		1	2	3
Контр.	534±296	2944±2195	9480±4150	Контр.	186±89	1532±921	3619±2083
Опыт	128±170	900±810	4007±2103	Опыт	76±67	432±431	2015±1254
Угнетение	77,6%	69,4%	57,7%	Угнетение	58,7%	71,8%	44,3%
	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$		$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$

*) – Даны средние $\pm$ среднеквадратичные отклонения.

Повторные опыты при $B_{\max} = 3,0$ мТл; $f = 100$ Гц и ежедневных экспозициях по 2 часа в течение 10 дней (табл. 3) на 3-х сроках наблюдения подтвердили высокую противоопухолевую эффективность ВМП для Ca-755 до 78% и для В-16 до 72% . Удлинение продолжительности жизни животных с опухолями, получавших ВМП-воздействие, не превышало 10%.

На рис. 3 приведены обобщенные результаты проведенных экспериментальных исследований, иллюстрирующие тормозящее влияние курсового воздействия ВМП на рост некоторых видов асцитных и солидных опухолей.

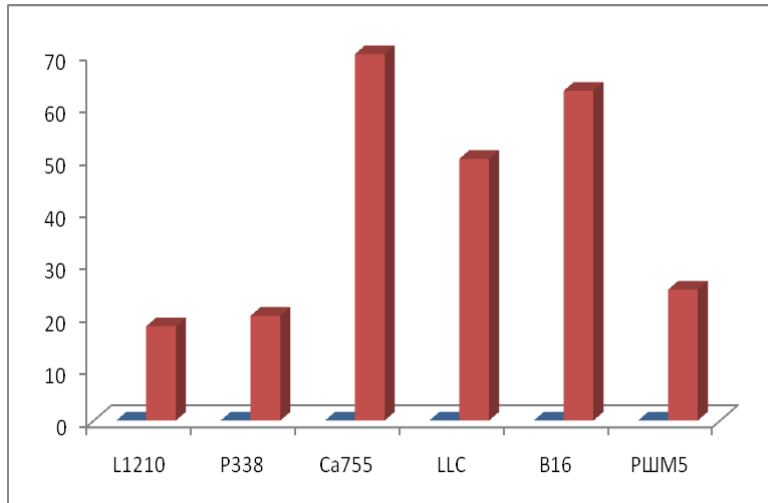


Рисунок 3. Влияние ВМП на торможение опухолевого роста пяти видов опухолей: L-1210; P-388; Ca-755; LLC, B-16 и РШМ-5.

При сочетанном применении ВМП-воздействия и противоопухолевых цитостатиков (сарколизин, 6-меркаптопурин) на перевиваемые опухоли мышей Ca-755 и B-16 отмечали незначительное (2 – 5%) суммарное увеличение общего противоопухолевого эффекта (рис. 4).

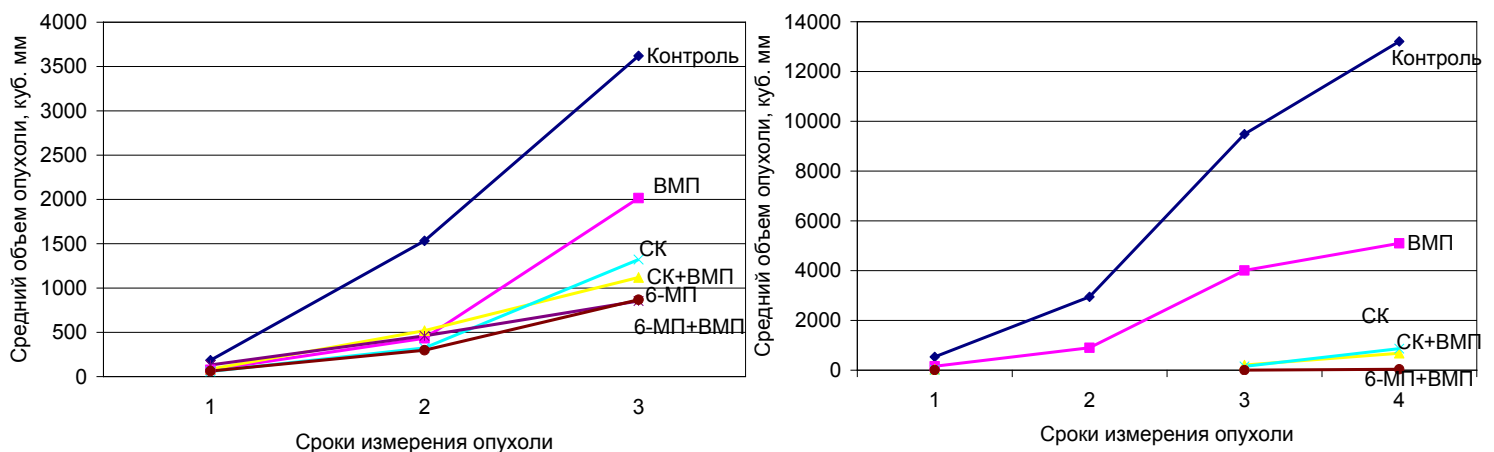


Рисунок 4. Комбинированное действие ВМП и цитостатиков на рост опухолей: B-16 (левый график) и Ca-755 (правый график).

Из опытов с перевиваемыми опухолями животных можно заключить, что ВМП обладает воспроизводимым и достоверным ($p < 0,05$) тормозящим действием на опухолевой процесс. Чувствительность к противоопухолевому действию ВМП у разных опухолей различна. Противоопухолевый эффект ВМП, составляющий для чувствительных опухолей 50 – 70% торможения, после окончания курса ВМП может

снижаться, он не антагонистичен к действию цитостатиков, что позволяет использовать воздействие ВМП в комплексе с химиопрепаратами.

1.4 Действие ВМП на процесс метастазирования. В качестве объекта исследования был взят штамм высокометастазирующего рака молочной железы мышей ВМР- F_1 . Опухоли перевивали внутримышечно материалом из лимфоузлов по $1 - 1,2 \times 10^6$ опухолевых клеток каждой мыши. В каждом опыте было по 40 животных (20 – опыт, 20 – контроль). Воздействие в подопытных группах начинали на 2 – 4 день после перевивки. Мыши получали по 10 сеансов ВМП-воздействия с экспозицией: $T = 1,5$ час и $T = 4$ час. После воздействия ВМП фиксировали УПЖ животных. К моменту гибели каждое животное с опухолью взвешивали, определяли отдельно вес опухоли и тушки, а также вес региональных лимфоузлов с метастазами или без. Фиксировали продолжительность жизни, на основании чего рассчитывали среднюю продолжительность жизни и УПЖ. Все материалы обрабатывали статистически. Результаты исследования представлены в табл. 4.

Таблица 4.

Влияние ВМП на метастазирование опухоли ВМР- F_1 .

Опыт, экспозиция (TxN)	Контроль опыт	Вес опухоли (г)	Вес лимфатических узлов с метастазами (мг)	Достоверность
1,5 час 10 сеансов	контроль	$10,4 \pm 1,7^*$	1421 ± 905	$p > 0,05$
	опыт	$10,4 \pm 1,7$	1049 ± 908	
4 час 10 сеансов	контроль	$10,9 \pm 2,4$	1817 ± 1469	$p < 0,05$
	опыт	$7,8 \pm 2,4$	1011 ± 602	

*) – Даны средние $\pm$ среднеквадратичные отклонения.

В первом опыте, где суммарное время воздействия ВМП составило 15 часов, изменение размеров опухоли не наблюдалось. В тоже время вес метастазов в лимфоузлы в опыте был на 26% ниже, чем в контроле. При этом имел место высокий разброс результатов, характерный для этой модели, вследствие чего различия между опытом и контролем при заданном 95% критерии были достоверными лишь для 67% случаев. Удлинение продолжительности жизни животных на 7% не было существенным. Во втором опыте при 40 часовой суммарной экспозиции отмечено угнетение воздействия ВМП на первичную опухоль на 28% и величину метастазов на 44%.

Таким образом, резюмируя результаты проведенных опытов можно отметить, что для 2/3 случаев наблюдалось снижение уровня лимфогенного метастазирования на 26 – 44%, что может представлять интерес для клиники.

1.5 Влияния ВМП на фазы клеточного цикла. Исследование проводили с помощью импульсного проточного цитофлуориметра ICP-22 (фирма «Фиве», ФРГ). Результаты ДНК-цитометрии представляли в виде интегральных кривых распределения клеток (ядер) по содержанию ДНК. Для интерпретации указанных кривых и пересчета данных в координатах распределения клеток по фазам цикла были применены специальные алгоритмы и программы для ЭВМ, разработанные в лаборатории фармакоцитокинетики РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН. В качестве материала для исследования использовали ткань трех образцов опухолей Са-755 на высоте противоопухолевого эффекта, вызванного применением ВМП ($B_{\max} = 3,0$ мТл, $f = 100$ Гц), после 10 ежедневных сеансов по 2 часа каждый. В качестве контроля были использованы три аналогичные опухоли одного срока перевивки из контрольной группы без ВМП-воздействия. Результаты исследования представлены в табл. 5.

Кинетические характеристики опухолей контрольной группы были следующие. Доля клеток в предсинтетической фазе ($G_{0/1}$) не превышала 1/3 популяции, в синтетической (S-фаза) была несколько больше 1/2 и в постсинтетической фазе и митозе ($G_{2/M}$) – менее 1/5 популяции. Доля пролиферирующих клеток в контроле составила 72%, что характерно для быстро растущей опухоли. В опухолевом материале подопытной группы фракция пролиферирующих клеток была ниже (63,5%).

Таблица 5.

Действие ВМП ($B_{\max} = 3,0$ мТл, 100 Гц) на распределение клеток рака молочной железы Са-755 мышей по фазам клеточного цикла.

№ опыта	КОНТРОЛЬ			ОПЫТ		
	Распределение клеток по фазам клеточного цикла в процентах					
	G _{0/1}	S	G _{2/M}	G _{0/1}	S	G _{2/M}
1	28,5	52,7	18,8	35,6	47,8	16,6
2	27,1	55,1	17,8	36,1	48,9	15,0
3	29,2	53,4	17,4	37,8	45,5	16,7
Среднее значение	28,3±1.1	53,7±1,2	18,0±0,7	36,5±1,1 p<0,005	47,4±1,7 p<0,005	16,1±0,9 p=0,05

*) – Даны средние $\pm$ среднеквадратичные отклонения.

Сравнение по фазам цикла показало, что в опыте существенно ($p < 0,05$) снижалась доля пролиферирующих клеток (S-фаза) и увеличивалась доля неделящихся клеток. Можно думать, что после воздействия ВМП клетки накапливаются в предсинтетической фазе с обеднением доли клеток в пролиферирующей фракции.

Таким образом, данное наблюдение согласуется с результатами опытов, показавшими угнетение роста перевиваемых опухолей мышей под воздействием ВМП.

1.6 Действие ВМП на морфологию опухолей. В опытах с аденокарциномой Са-755 после окончания 10 дневного (по 2 часа) воздействия ВМП ($B_{\max} = 3,0$ мТл, $f = 100$ Гц) на высоте максимального противоопухолевого эффекта был взят материал опухолей у трех мышей для гистологического анализа. Параллельно был взят материал опухолей у трех мышей из контроля. Опухолевая ткань была фиксирована формалином и заключена в парафин. Приготовленные гистологические срезы окрашивали гематоксилин-эозином.

На рис. 5 представлены картины срезов контроля и опыта при двух увеличениях.

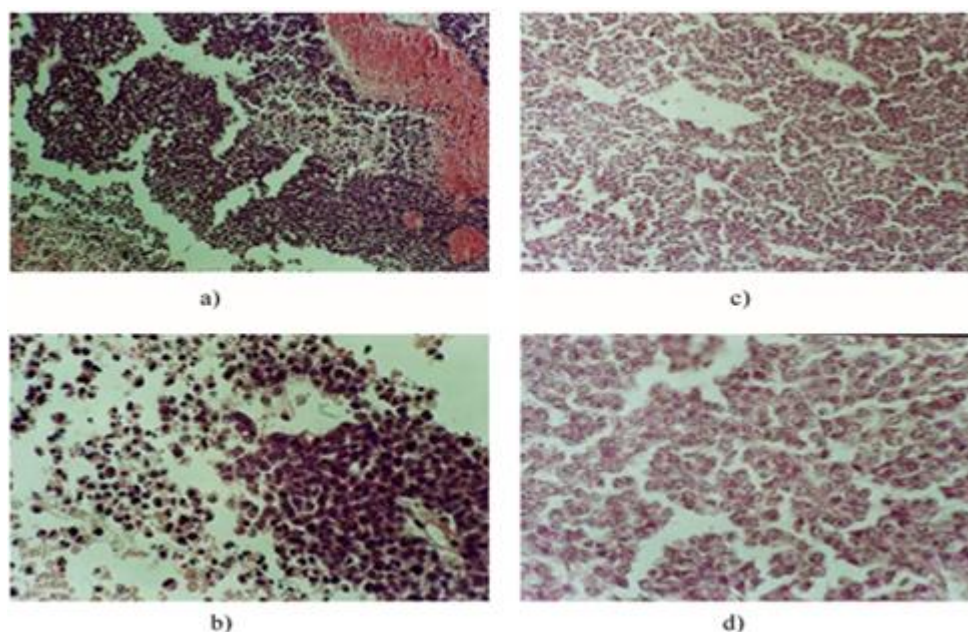


Рисунок 5. Гистологические исследования материала опухолевой ткани опухоли молочной железы Са-755 мышей.

Опыт: а) - (x160); б) – (x400); Контроль: с) - (x160); d) - (x400).

Контроль. На срезах видны обширные солидные поля опухолевых клеток с очагами некрозов. Местами наблюдаются альвеолярные структуры. В соединительнотканых прослойках среди рыхлой соединительной ткани видны

наполненные кровью мелкие сосуды и капилляры. Слабая лейкоцитарная инфильтрация.

Опыт. На срезах поля опухолевых клеток с обширными некрозами. В зоне некрозов обильная инфильтрация полинуклеарами. В прослойках рыхлой соединительной ткани растянутые переполненные кровью мелкие сосуды и лакунообразные расширенные капилляры. Разрывы стенок сосудов и капилляров с проникновением элементов крови в рыхлую соединительную ткань между ячейками опухолевых клеток.

В отличие от контроля обращает внимание наличие обширных полей некроза в полях опухолевых клеток, гиперемия мелких сосудов и капилляров с разрывами сосудистых стенок и проникновением элементов крови в ткань опухоли. Обильная инфильтрация опухолевой ткани полинуклеарами. В целом, морфологическая картина регрессии опухолевой ткани Са-755 под воздействием ВМП по данным гистологических исследований похожа на лучевой патоморфоз и представляет комплекс деструктивных изменений, свидетельствующих о гибели опухолевых клеток.

Отмеченные нами морфологические и цитологические изменения в опухолевой ткани при воздействии ВМП согласуются с данными Бахмуцкого и др. (1991), отмечавших в результате действия ВМП возникновение очагов некрозов опухолевой ткани, окруженных валом клеточной инфильтрации, снижение митотической активности, некробиоз и лизис опухолевых клеток.

Наличие в опухолях на высоте противоопухолевого эффекта обильной макрофагальной и нейтрофильной инфильтрации, регистрируемой на гистологических срезах, позволяет предположить, что действие ВМП приводит к повышению функциональной активности макрофагов и нейтрофилов. Активность последних, как известно, выражается в увеличении продукции АФК.

1.7 Влияние ВМП на функциональную активность фагоцитов.

Функциональная активность фагоцитов является одним из показателей состояния противоопухолевой резистентности и оценивается при активации интенсивностью хемилюминесценции (ХЛ), интенсивность которой коррелирует со способностью клетки вырабатывать активные формы кислорода (АФК). На ряде биологических объектов с помощью метода хемилюминесцентного анализа было проведено исследование влияния ВМП на функциональную активность фагоцитов.

Было проведено четыре серии опытов:

а) *in vitro* после воздействия ВМП на спленоциты мышей и венозную кровь здоровых доноров и больных раком молочной железы;

б) *in vivo* после воздействия ВМП на организм мышей с подкожно перевитой меланомой В-16;

в) *in vivo* после воздействия ВМП на организм мышей с перевитыми опухолями В-16 при комбинированном применении с цитостатиками;

г) *in vivo* после воздействия ВМП на организм здорового человека и больного раком молочной железы.

Измерения ХЛ проводили на приборе «Биолюмат» (модель ЛБ 9500, фирмы Бертольд, ФРГ).

В исследовании хемилюминесценции спленоцитов мышей использовали самцов А/Sp. Суспензию подготовленных по стандартной методике ядерных клеток селезенки (4×10^6 клеток/мл) разливали во флаконы по 1 мл (по 10 флаконов опыт и контроль). Опытные клетки экспонировали в ВМП ($B_{\max} = 3,0$ мТл, $f = 100$ Гц) при трех режимах экспозиции: 40 мин; 1 час 20 мин и 2 часа. Далее суспензии контрольных и облученных клеток в соотношении 1: 1: 1 смешивали с раствором люминола и средой 199 для определения спонтанной ХЛ.

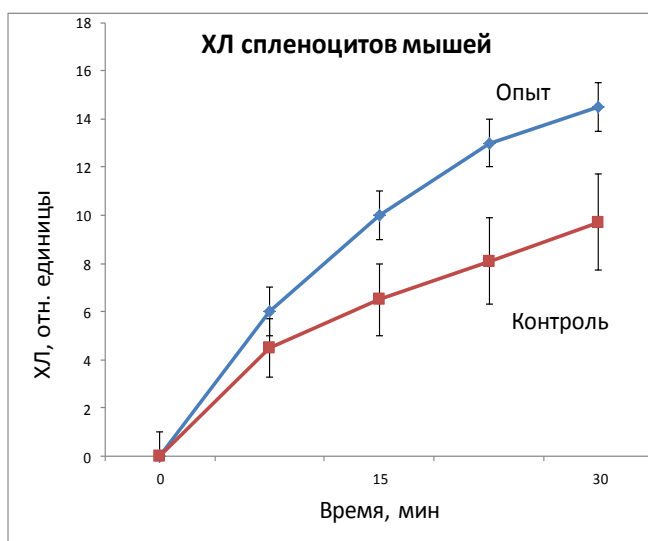


Рисунок 6. Влияние ВМП на интенсивность спонтанной ХЛ спленоцитов мышей.

Экспозиции ВМП в течение 40 мин. и 2-х часов не показали достоверных различий между опытом и контролем ($p > 0.05$). При облучении спленоцитов в течение 1 часа 20 мин. воздействие ВМП достоверно ($p < 0.05$) стимулировало увеличение ХЛ на 58% по отношению к контролю (рис. 6). Таким образом, отмечено, что ВМП способно в условиях вне организма стимулировать продукцию АФК ядерными клетками селезенки.

При исследовании крови здоровых доноров, кровь 10 доноров разводили в 10 раз средой 199 и разливали по 0,5 мл в пластиковые ампулы, которые подвергали воздействию ВМП в течение 1 часа 20 мин. После экспонирования в ВМП

разбавленную кровь смешивали с раствором люминола и средой 199 и измеряли уровень интенсивности ХЛ.

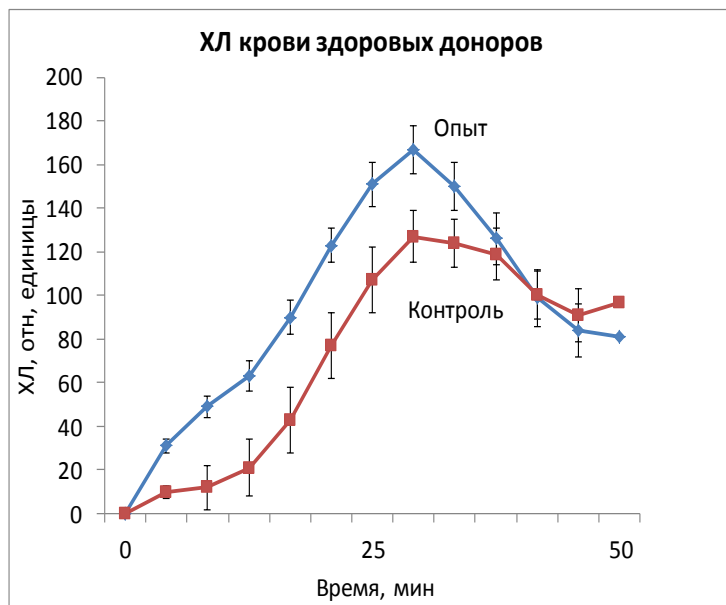


Рисунок 7. Влияние ВМП на интенсивность спонтанной ХЛ цельной крови здоровых доноров.

Максимальное статистически значимое ($p < 0.05$) отличие опыта от контроля наблюдалось (рис. 7) в течение первых 25–30 мин инкубации. После 30–40 мин уровень интенсивности ХЛ в опыте падал до уровня контроля. Можно считать, что основной мишенью для действия ВМП в цельной крови доноров являются нейтрофилы, поскольку в крови здоровых доноров моноциты присутствуют в очень малом количестве. Для макрофагов по данным (Knyszynski, 1981), максимальная интенсивность ХЛ наблюдается на более поздних сроках инкубации с люминолом (40 мин).

При исследовании хемилюминесценции крови мышей с подкожно перевитой меланомой В-16, группа подопытных животных (20 шт.), начиная с 3-го дня после перевивки, подвергалась воздействию ВМП ($B_{\max} = 3,0$ мТл, $f = 100$ Гц) в течение 10 дней с экспозицией по 2 часа. На 2-й, 7-й, 11-й и 17-й дни после перевивки опухолей у мышей из хвостовой вены брали по 10 мкл крови, которую разводили 1 : 10 средой 199 и использовали для определения уровня интенсивности ХЛ. Для определения абсолютного числа лейкоцитов брали 5 мкл крови, эритроциты лизировали 4% уксусной кислотой. Подсчет формулы крови производили на мазке. Результаты опытов представлены в табл. 6.

Из таблицы видно, что по мере роста опухоли значимого изменения общего числа лейкоцитов в контрольной и опытной группах не отмечалось. При этом доля нейтрофилов по мере роста опухолей в каждой группе примерно одинаково

нарастала. Развитие опухолевого процесса сопровождалось увеличением интенсивности ХЛ цельной крови.

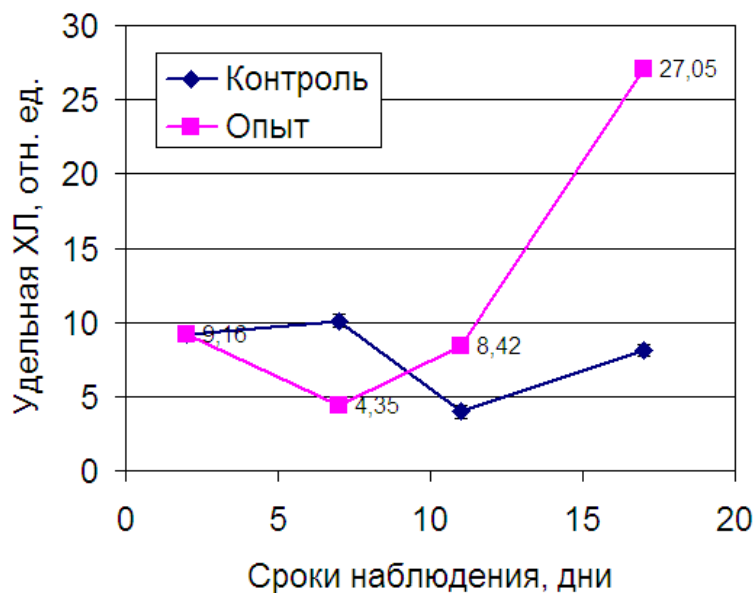
Таблица 6.

Влияние ВМП на изменение показателей функциональной активности фагоцитов у мышей с перевитой меланомой В-16.

Показатели	Сроки наблюдения (сутки)	Контроль (без ВМП)	Опыт (с ВМП)	Достоверность
Число лейкоцитов крови (тыс./мм ³)	2	7,1±2,0*)	4,9±0,6	p<0,05
	7	7,8±5,8	6,8±2,4	p>0.05
	11	9,5±2,6	5,4±2,9	p<0,05
	17	10,0±3,8	7,1±3,3	p<0,05
Процентное содержание нейтрофилов (%)	2	16,3±3	16±7	p>0.05
	7	23±6	26±4	p=0,05
	11	47±11	40±10	p<0,05
	17	38±10	38±7	p>0.05
ХЛ цельной крови (относительные единицы)	2	8,0±0,5	7,5±0,7	p<0,05
	7	18,6±5,7	7,7±0,9	p<0,05
	11	17,7±5,8	18,2±15,5	p>0.05
	17	30,8±20,4	73,0±21,7	p<0,05

*) – Даны средние ± среднеквадратичные отклонения.

Поскольку на поздней стадии развития опухоли наблюдался резкий рост ХЛ крови у ВМП-облученных животных, при малозначительных изменениях числа лейкоцитов, представляло интерес оценить удельную ХЛ нейтрофилов, которую получали путем деления ХЛ крови на число нейтрофилов в образце. Эта величина в



контроле существенно не изменялась за время наблюдения (рис. 8).

Рисунок 8. Влияние облучения ВМП на удельную ХЛ фагоцитов. мышей с перевитой меланомой В-16.

В тоже время, в опыте, (с ВМП) удельная ХЛ сначала слегка понизилась, а к концу срока наблюдения (17 день) резко (в 3 раза) возросла ($p < 0,05$) по отношению к началу наблюдения. По отношению к контролю на этом же сроке наблюдения она также была больше в 3,3 раза

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что воздействие ВМП на организм мышей с перевитой меланомой В16 увеличивает продукцию АФК фагоцитами, что говорит об усилении защитных функций клеточного звена естественного иммунитета под воздействием ВМП.

В экспериментах по изучению действия ВМП на ХЛ мышей с меланомой В-16 на фоне лечения цитостатиками были использованы мыши $C_{57}BL$ (4 группы по 20 животных в каждой) с перевитыми опухолями меланомы В-16. Группе №1, начиная с 3-х суток после перевивки, в течение 5 дней ежедневно вводили внутривенно сарколизин (СК) в дозе 3 мг/кг веса. Группе №2 также вводили СК и параллельно воздействовали ВМП ($B_{max} = 3,0$ мТл, $f = 100$ Гц, $N \times T = 10$ сеансов по 2 часа). Группе №3 с третьего дня после каждой перевивки опухолей в течение 5-ти дней через рот вводили 6-меркаптопурин (6-МП) в дозе 5 мг/кг веса. Группа №4, наряду с 6-МП, подвергалась воздействию ВМП в том же режиме, что группа №2. В табл. 7 представлены полученные данные.

Таблица 7.

Влияние ВМП и цитостатиков на показатели активности фагоцитов мышей с меланомой В-16 на 4-х сроках наблюдения.

Показатели активности нейтрофилов	Сроки набл. (сутки)	Гр.1 (СК)	Гр.2 (СК + ВМП)	Достоверность	Гр.3 (6-МП)	Гр.4 (6-МП + ВМП)	Достоверность
Процентное содержание нейтрофилов (%)	2	24±15*)	44±7	$p < 0,05$	12±2	21±7	$p < 0,05$
	7	24±9	45±1	$p < 0,05$	14±2	23±6	$p < 0,05$
	11	32±7	40±12	$p > 0,05$	17±4	13±5	$p < 0,05$
	17	35±7	42±15	$p = 0,05$	13±12	22±6	$p < 0,05$
ХЛ цельной крови (отн. ед.)	2	8,7±0,6	9,3±1,4	$p > 0,05$	8,1±0,3	8,6±0,6	$p < 0,05$
	7	8,0±6,9	6,6±2,2	$p > 0,05$	6,5±3,4	4,2±2,7	$p = 0,05$
	11	30,5±8,6	22,0±13	$p < 0,05$	4,3±0,9	2,3±1,6	$p < 0,05$
	17	19,5±8,2	49,0±21	$p < 0,05$	12,3±11	17,4±11	$p > 0,05$

*) – Даны средние ± среднеквадратичные отклонения.

Из табл. 7 видно, что в процессе роста опухолей в контрольных группах (№1 и №3) сарколизин и 6-меркаптопурин существенно не влияли на динамику изменения

величины доли нейтрофилов. Однако при комбинации ВМП-воздействия с применением цитостатиков (группа №2 и группа №4) почти на всех сроках наблюдения отмечалось ($p<0,05$) увеличение доли нейтрофилов по отношению к соответствующим срокам наблюдения в контроле (группа №1 и группа №3).

По-видимому, изменения популяционной структуры нейтрофилов под действием ВМП проявляли себя в динамике изменения интенсивности ХЛ цельной крови. Оказалось, что в опытных группах (ВМП + цитостатики) сначала (7-11 сутки) снижался уровень ХЛ цельной крови, а после снижения к 17 суткам возрастал. Данное наблюдение особенно демонстративно при сравнении с воздействием одного ВМП, где уровень ХЛ при каждом наблюдении возрастал, и к 17-дню превышал уровень ХЛ при первом наблюдении (2-й день) более чем в 9 раз (табл. 6).

Таким образом, воздействие ВМП в выше описанных опытах могло выражаться в усилении удельной ХЛ нейтрофилов и стимуляции ХЛ нейтрофилов при комбинированном воздействии с цитостатиками, что в сочетании с опухолевым нейтрофилезом суммарно могло повышать уровень продукции АФК.

Отдельный интерес представляет характер ХЛ ответа клеток – эффекторов у здоровых доноров и больных новообразованиями. С этой целью *in vitro* была изучена динамика ХЛ цельной крови 10-х здоровых доноров и 10-х больных раком молочной железы III стадии (рис. 9 и 10).



Рисунок 9. Динамика ХЛ цельной крови здорового донора.

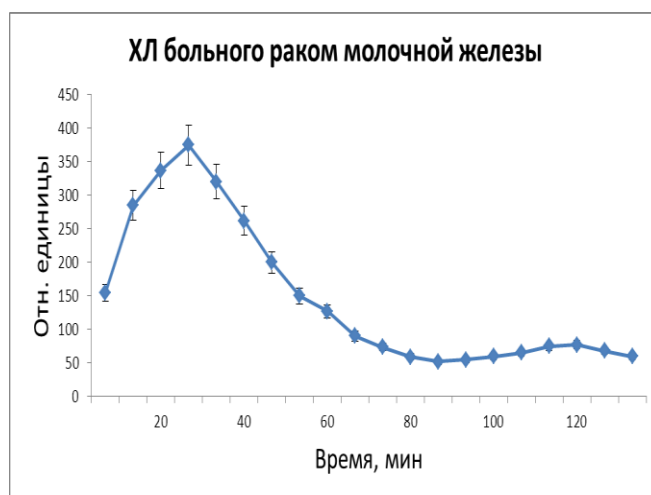


Рисунок 10. Динамика ХЛ цельной крови больной раком молочной железы.

Опыты *in vitro* с цельной кровью здоровых доноров и больных раком молочной железы показали, что имело место разная динамика изменения уровня интенсивности ХЛ. Кривые носили двухфазный характер, но соотношение фаз было разным. У доноров основное свечение развивалось к 100 минуте (рис. 9), а максимум на 30 – 40 минуте был слабо выражен. У больных раком молочной железы первый максимум на 30 – 40 минуте был основным, второй максимум был слабым и наступал позже, чем у доноров (рис. 10).

Эти отличия в форме кривых интенсивности ХЛ указывают на разную динамику повышения функциональной активности нейтрофилов: у больных раком молочной железы наблюдалось заметное активизирование защитной клеточной системы по отношению к нормальному (не активизированному) состоянию этой системы у здоровых доноров.

Были проведены опыты с воздействием ВМП на организм здоровых и больных раком молочной железы людей, кровь которых после воздействия изучалась методом хемилюминесцентного анализа. Результаты показали усиление функциональной активности нейтрофилов (рис. 11 и рис. 12) в результате ВМП-воздействия в каждой группе, но у больных раком молочной железы уровень ХЛ был значительно (в 3 раза) выше, чем у здоровых доноров. При этом, следует отметить, что пропорции подъема уровня ХЛ по сравнению с исходным были примерно одинаковые у здоровых и больных доноров.

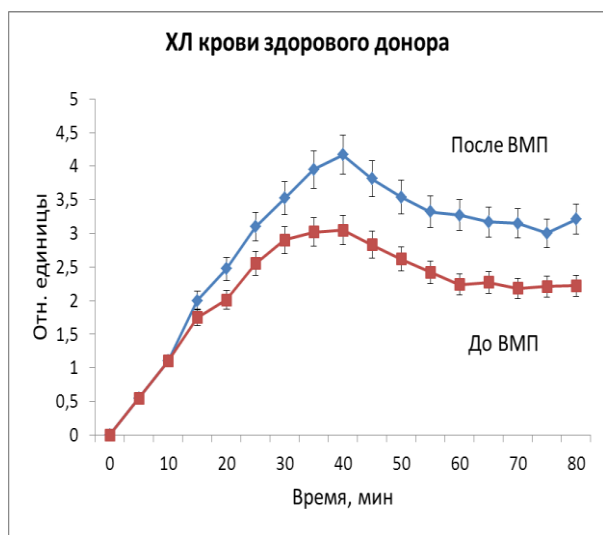


Рисунок 11. Динамика ХЛ цельной крови здорового донора.

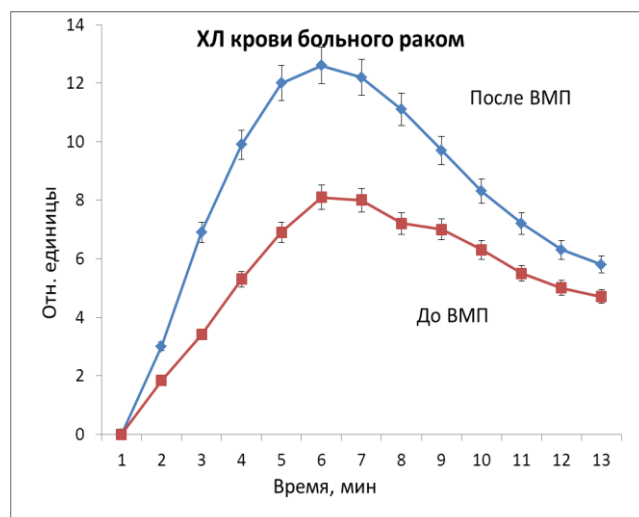


Рисунок 12. Динамика ХЛ цельной крови больной раком молочной железы.

Эти наблюдения указывают на то, что ВМП-воздействие, по-видимому, не является специфическим, а его стимулирующее действие на функциональную

активность фагоцитов одинаково и однозначно в условиях здорового и больного организма. В этом случае наблюдаемые в экспериментах и клинике эффекты влияния ВМП на торможение роста опухолей могут быть объяснены более высоким уровнем цитотоксичности фагоцитов по отношению к опухолевым клеткам.

Таким образом, приведенные выше данные позволяют сделать предположение, что одним из механизмов противоопухолевого действия ВМП может быть повышение функциональной активности фагоцитов при контакте с опухолевыми клетками.

1.8 Радиомодифицирующее действие ВМП. Изучение радиомодифицирующего действия ВМП было проведено по двум направлениям:

Влияние ВМП на тяжесть лучевого поражения организма животных при общем сублетальном фракционированном гамма-облучении.

Мыши (гибриды $F_1(\text{CBA} \times \text{C}_{57}\text{BL})$ в количестве 102 шт.) были разделены на 10 групп. Опыт и контроль на установке Стебель 3А (при мощности дозы 5,45 Гр/мин) в течение 10 дней подвергались ежедневному фракционированному гамма-облучению (10 фракций) в 5-ти разных дозах, где дозы однократного воздействия составили: 1,0; 1,1; 1,2; 1,3 и 1,4 Гр. В дни облучения 5 групп мышей (опыт) получали дополнительное ВМП-воздействие ($B_{\text{max}} = 3,0$ мТл, $f = 100$ Гц, $T = 1$ час) в магнитотерапевтической установке «Магнитотурботрон», начиная за 1,5 – 2 часа до облучения или спустя 0,5 – 1,5 часа после облучения. После завершения курса облучения животных наблюдали в течение 2-х месяцев, ежедневно регистрируя число погибших. Выраженную в процентах гибель животных соотносили с суммарной дозой гамма-облучения. Разница величин опыта и контроля в процентах характеризовала эффективность радиомодифицирующего действия.

Гибель основной части животных была отмечена в течение первого месяца наблюдения. По результатам наблюдений за продолжительностью жизни животных из контрольной и подопытной групп после окончания облучения построен график (рис. 13), где представлены кривые дозы (радиация) – эффект (гибель) в процентах. Шкала, характеризующая эффект, проградуирована в пробитном масштабе, спрямляющем S-образную в линейном масштабе кривую «доза – эффект» для подопытной и контрольной групп животных.

С помощью данного графика можно определить основной показатель эффективности лучевого воздействия – величину курсовой дозы, приводящей к гибели 50% особей, так называемую, величину $\text{ЛД}_{50/30}$, где 30 – число дней наблюдения. Для контрольных животных, получивших фракционированное гамма-облучение, величина $\text{ЛД}_{50/30}$ составила 12 Гр. Для подопытных животных, подвергнутых дополнительному ВМП-воздействию значение $\text{ЛД}_{50/30}$ было 13,75 Гр.

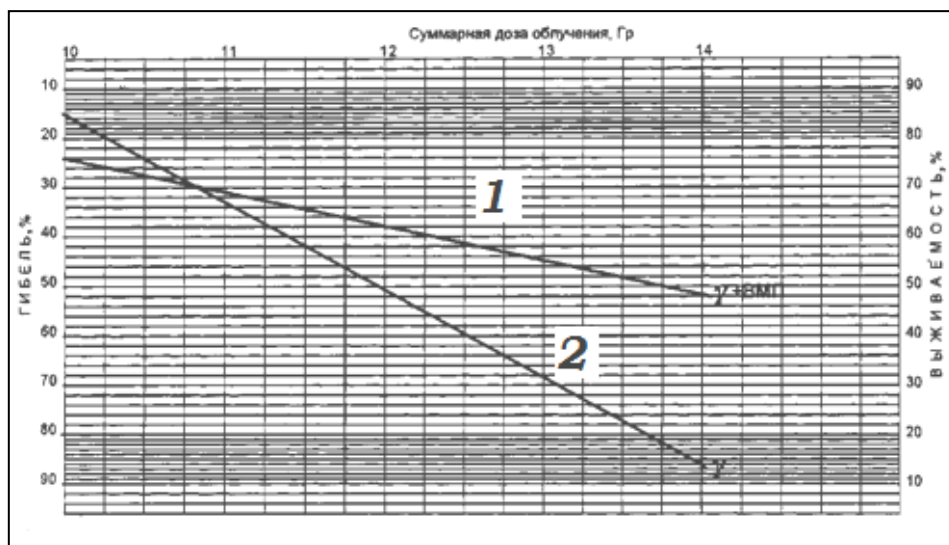


Рисунок 13. Гибель животных за два месяца наблюдения после гамма-облучения с ВМП (1) и без ВМП (2).

Различие между указанными значениями составило 15%, что характеризует величину радиозащитного эффекта применения ВМП-воздействия. Из этих данных следует вывод о том, что ВМП-воздействие в условиях сублетального фракционированного гамма-облучения животных оказывало прямое радиозащитное действие, позволяющее снизить тяжесть лучевого поражения организма.

Исследование способности ВМП стимулировать восстановление тканей животных от лучевых повреждений.

Стопы лапок мышей линии Balb/C подвергали однократному рентгеновскому облучению, вызывающему развитие поражения кожи до уровня сухой эпидермит – влажный эпидермит – локальный некроз. Облучение проводили на рентгеновском аппарате РУТ-25, мощность дозы облучения составляла 2,3 Гр/мин. Было проведено два опыта по 40 мышей в каждом.

В первом опыте (без наркоза) животные контрольной группы были облучены в дозах 30, 25 и 17 Гр. Животные опытной группы были облучены в дозах 30 и 25 Гр, после которого в течение месяца получали ВМП-воздействие ($B_{\max} = 3,0$ мТл, $f = 100$ Гц, $T = 1$ час) при ежедневной экспозиции. Во втором опыте (с применением гексеналового наркоза) из опытной партии две группы животных были облучены в дозах 30 Гр. и 36 Гр, после чего получали ежедневное ВМП-воздействие в течение месяца, а одна группа животных (ВМП + 30Гр + ВМП), получила предварительное ВМП-воздействие (5 сеансов) за неделю до начала облучения, и затем после облучения получала ВМП-воздействие наравне с другими группами. Контрольные животные были облучены в дозах 36, 30 и 25 Гр.

Динамику процесса развития поражения кожи наблюдали в течение 40 дней. Модифицирующее действие ВМП (уменьшение тяжести развивающихся реакций и сокращение сроков заживления) оценивали по уменьшению площади под кривой, очерчивающей максимальную тяжесть поражения кожи в течение всего срока наблюдения.

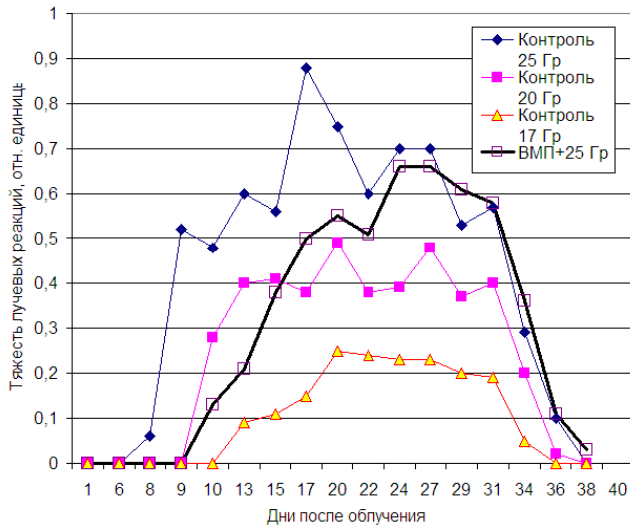


Рисунок 14. (17 Гр; 20 Гр и 25 Гр).

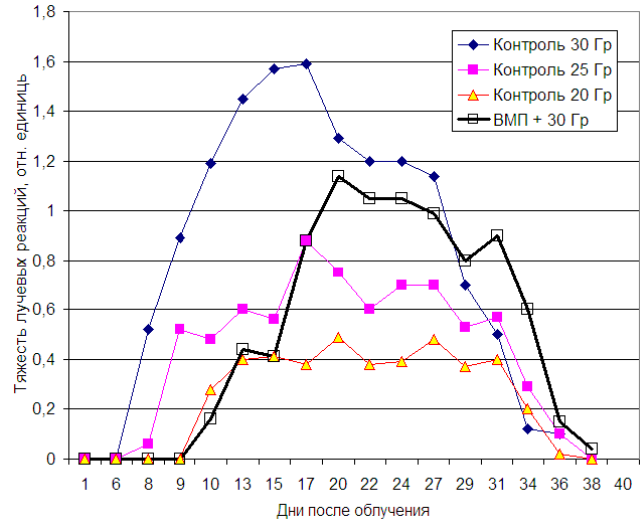


Рисунок 15. (20 Гр; 25 Гр и 30 Гр).

Для оценки эффекта использовали бальную шкалу тяжести лучевых реакций кожи конечности мышей, разработанную и применяемую при оценке радиомодификаторов в лаборатории лучевых методов лечения опухолей РОНЦ им Н.Н.Блохина РАМН. Кривые развития процесса лучевых реакций для разных групп контроля и опыта сравнивали между собой.

На рис. 14 и рис. 15 показана динамика нарастания и спада кожных лучевых реакций стопы мышей для разных режимов рентгеновского облучения для всех групп животных из первого опыта в разных для сравнения сочетаниях. Из рисунков видно, что воздействие ВМП снижало тяжесть лучевых реакций кожи (особенно заметное в период их нарастания) на 20 – 40%, и отодвигало во времени (около 1 недели) срок достижения максимума. Эффект был особенно выражен при дозе рентгеновского излучения 30 Гр. В период спада лучевой реакции, начиная с 20-го дня после облучения, различия между контрольными и опытными животными, подвергнутыми облучению в этой дозе нивелировались. Аналогичные данные были получены и в группах животных, облученных в дозе 25 Гр.

Во втором опыте (рис. 16), как и в первом, лучевые реакции начали проявляться в контрольных и опытных группах на 7– 8-й день после облучения, но закончились не к 38-му дню, как в первом опыте, а к 45-му. После облучения в дозе

36 Гр лучевые реакции у контрольных животных достигли максимума (2,3 бала) на 17 – 20-й дни после облучения. У опытных животных кривая лучевой реакции была более пологой и достигала максимума (2 бала) к 23-у дню. На уровне тяжести реакции 1,8 – 1,9 отличие во времени наступления такой реакции между опытом и контролем составило неделю.

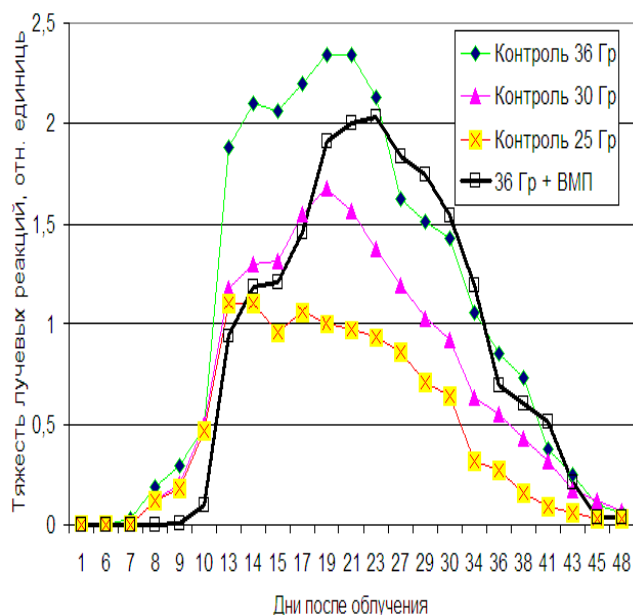


Рисунок 16. (25 Гр; 30 Гр и 36 Гр).

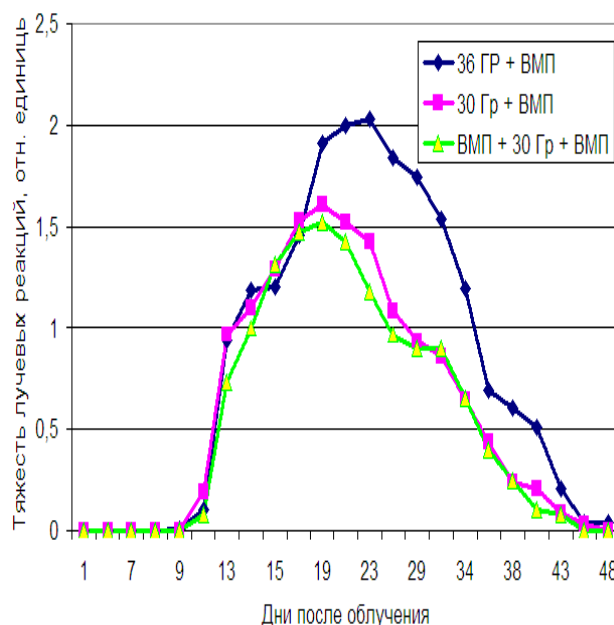


Рисунок 17. (ВМП + 30 Гр + ВМП).

В группе (ВМП + 30 Гр + ВМП) лучевые реакции достигали максимума и завершались в те же сроки, что и для аналогичного режима облучения без предварительного ВМП-воздействия (рис. 17). Однако в промежутке от максимума (19 день) до 30-го дня реакции были несколько ниже, чем без предварительного воздействия ВМП.

Обнаруженные эффекты радиомодифицирующего действия ВМП позволяют предположить, что в условиях фракционированной лучевой терапии применение ВМП-воздействия позволит подводить к опухоли большую дозу облучения до перерыва в лечении, даже если избежать перерыва не удастся. Наблюдаемые эффекты радиозащитного действия при местном облучении позволяют говорить о возможности применения ВМП-воздействия в процессе лучевого лечения для предотвращения или уменьшения радиационных повреждений кожи. Учитывая желательность уплотнения курса лучевой терапии, чему в клинической практике часто препятствует развитие лучевых поражений кожи, представляется целесообразным также применение ВМП-воздействия в клинике при фракционированной лучевой терапии злокачественных опухолей. Это может быть эффективным для уплотнения режима доз.

2. Исследование действия ВМП на организм человека

2.1. Аппаратура и методическое обеспечение

Для проведения исследований ВМП-воздействия на организм человека нами был разработан и изготовлен экспериментальный образец установки, представляющий собой аппаратно-программный комплекс, реализующей принцип дозированного воздействия ВМП на весь организм человека.



Рисунок 18. Экспериментальный образец установки для ВМП-воздействия на организм человека.

В состав комплекса входят: лечебная камера (рис. 18) с перемещаемым столом для размещения пациента в рабочей зоне индуктора, трехфазный статический преобразователь для создания вращающегося ВМП, и система формирования и управления параметрами воздействия частоты f от 40 до 160 Гц с шагом 10 Гц и амплитуды $V_{\max}$ от 0,5 мТл до 3 мТл с шагом 0,1 мТл. Система управления позволяла формировать различные виды модуляции амплитуды ВМП: косинусоидальный, синусоидальный, прямоугольный, пилообразный, экспоненциальный с разной скважностью и периодом модуляции: от 30 до 180 сек, с шагом 10 сек;

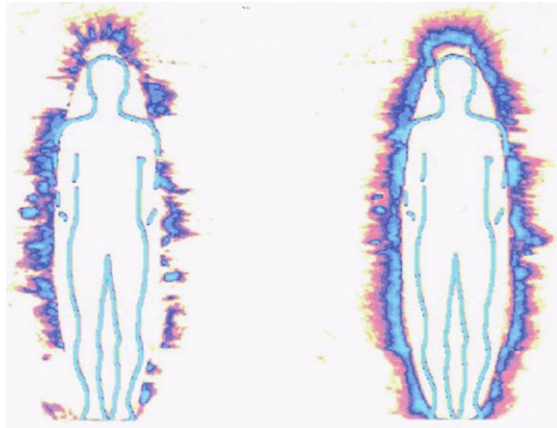
С помощью данной установки были проведены исследования воздействия ВМП на организм человека с учетом оценки индивидуальной магниточувствительности пациента. В дальнейшем клинические исследования были продолжены уже на серийно выпускаемой НПФ «Аз» установке «Магнитотурботрон».

На основании опыта работы с ВМП-воздействием на организм человека коллективов авторов (Сыркин, Добрынин, Летягин, Рыбаков, 1980) были разработаны методические рекомендации проведения магнитотерапевтических процедур.

Для оценки магниточувствительности и реакций организма человека на общее воздействие ВМП были изучены информативные возможности:

- метода газоразрядной визуализации (ГРВ) по сопоставлению расчетных показателей площади и фрактальности ГРВ-изображений, снятых у пациентов до и после проведения магнитотерапевтических процедур (рис. 19 а и б).

- метода электропунктурной диагностики Накатани по результатам измерения и математической обработке показателей значений электропроводимости в 24 репрезентативных точках акупунктуры (ТА): (рис. 20 а и б).



а)
S = 9189
Symmetry 78%

б)
S = 16298
Symmetry 98%

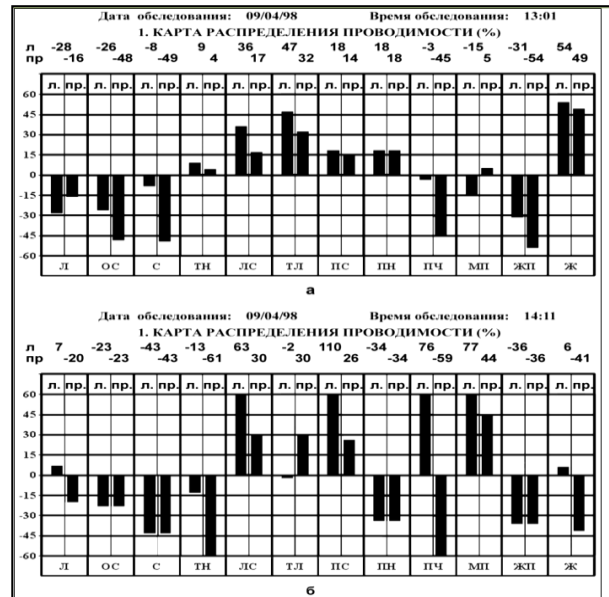


Рисунок 19. ГРВ-изображения:
а) до ВМП-воздействия;
б) после ВМП-воздействия.

Рисунок 20. Изменение электропроводимости ТА:
а) до ВМП-воздействия;
б) после ВМП-воздействия.

Для группы исследуемых пациентов разброс значений контролируемых показателей, характеризующих реакцию организма человека на воздействие ВМП, колебался в пределах от 10 до 70%, что в целом позволяет говорить о высокой чувствительности данных методов к МП, и их информативности и пригодности для оценки индивидуальной магниточувствительности.

На основании статистики полученных данных с учетом «Таблиц уровня магнитотропных реакций человека в зависимости от некоторых гелиофизических и других признаков» Боголюбов, (1983) для оценки магниточувствительности было принято, что высокой магниточувствительности пациента к воздействию ВМП соответствует изменение контрольного маркера на 40% и более. Диапазон 20 – 30% характеризовал среднюю магниточувствительность пациента. При значениях меньше 10% можно говорить о слабой чувствительности пациента к ВМП-воздействию. Разработанные экспертные шкалы в дальнейшем были использованы при проведении

магнитотерапевтических процедур для корректировки параметров воздействия ВМП с учетом индивидуальной магниточувствительности пациентов.

2.2 Исследование применения ВМП - воздействие в комплексном лечении рака молочной железы

Исследование проводилось в хирургическом отделении опухолей молочной железы РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН. К комбинированному лечению был привлечен контингент из 114 первичных больных с диагнозом местнораспространенного рака молочной железы III-ей стадии ($T_{1-3}N_{2-3}M_0$) в возрасте до 65 лет. Почти у всех больных имелись регионарные метастазы, у большинства больных (57,9%) опухоль молочной железы была с отеком кожи (T_4). Больные с отдаленными метастазами отсутствовали. Опытная группа (70 больных) получили комбинированное предоперационное лечение по стандартной схеме с применением ВМП-воздействия на установке «Магнитотурботрон». Продолжительность курса ВМП-воздействия определяли длительностью основного (химиолучевого) лечения. Контрольная группа (44 больных) получали лечение по такой же схеме, но без применения ВМП-воздействия. Оценка результатов проводили через 3 – 6 недель после начала предоперационного лечения.

Таблица 8.

Изменения в первичных опухолях.

Изменения в опухоли	Без ВМП кол-во больных, %	С ВМП кол-во больных, %
Резорбция опухоли	10 (22,7%)	17 (24,3%)
Уменьшение опухоли более 50 %	5 (11,4%)	19 (27,1%)
Уменьшение опухоли менее 50 %	21 (47,7%)	24 (34,3%)
Без динамики	5 (11,4%)	6 (8,6%)
Увеличение опухоли	3 (6,8%)	4 (5,7%)
Всего	44 (100%)	70 (100%)

Из табл. 8 следует, что эффективность предоперационного лечения с применением ВМП-воздействия составила 86,4%, а без него – 81,8%. При этом следует отметить, что если оценки эффектов по резорбции опухоли для основной и контрольной групп различаются незначительно, то уровень резорбции опухоли, оцениваемый больше чем 50%, наблюдался в два раза чаще для группы пациентов, получивших дополнительное ВМП-воздействие по отношению к контрольной группе (27,2% и 11,4%, соответственно). Эффект резорбции опухоли, оцениваемый меньше, чем 50%, был соответственно более частым в группе без ВМП, чем с ВМП-воздействия (47,7% и 34,3%, соответственно).

Принимая во внимание указанные отличия, можно считать, что по клиническим данным эффективность сочетанного воздействия химиолучевой терапии с ВМП-воздействием была более высокой, чем при одной химиолучевой терапии. Если за основу оценки эффективности предоперационного лечения взять критерий резорбции опухоли более, чем на 50%, то эффект с ВМП-воздействием составил 51,5%, а без него – 34,1%.

Таблица. 9.

Изменения в регионарных лимфоузлах.

Изменения в лимфоузлах	Без ВМП кол-во больных, %	С ВМП кол-во больных, %
Уменьшение конгломерата	13 (29,6%)	22 (31,5%)
Уменьшение лимфоузлов	4 (9,1%)	30 (42,8%)
Резорбция метастазов	6 (13,6%)	16 (22,8%)
Без динамики	17 (38,6%)	2 (2,9%)
Увеличение лимфоузлов	4 (9,1 %)	–
Всего	44 (100%)	70 (100%)

Изменения в регионарных лимфоузлах по клиническим данным после предоперационного лечения представлены в табл. 9. После комбинированной предоперационной терапии с применением ВМП-воздействия полная резорбция метастазов в регионарных лимфоузлах, или их уменьшение, а в случае наличия

конгломератов – их уменьшение и фрагментация, зафиксированы у 68 больных (97,1%). Только у 2-х больных (2,9%) лечебный эффект отсутствовал. В то же время для больных контрольной группы после химиолучевого лечения без ВМП-воздействия лечебный эффект составил 52,3% (23 больных), а отсутствие эффекта было зарегистрировано в 21 случае (47,7%). Полученные данные указывают на существенную эффективность сочетанного с ВМП-воздействием химиолучевого лечения на регионарные метастазы опухолей молочной железы.

В основной группе у 58 больных были проведены первичная маммография и повторные контрольные исследования после предоперационного лечения. По данным первичного исследования у большинства больных (82,4%) выявлена отечно-инфильтративная форма новообразований, в остальных случаях – узловая форма рака молочной железы. В результате сочетанного химиолучевого лечения с ВМП-воздействием при повторном рентгенологическом контроле было отмечено, что в 42,3% случаев рентгенологически определяемая опухоль исчезла, в 46,2% случаев было отмечено уменьшение размеров новообразования с сохранением остаточных опухолей. В 11,5% случаев новообразования не изменились в размерах или увеличились. Исчезновение или уменьшение в размерах метастазов в регионарных лимфоузлах отмечено в 89,6% случаев. Суммарный эффект воздействия химиолучевой терапии в сочетании с ВМП-воздействием на опухоли молочной железы по рентгенологическим данным оказался высоким. Эффективность предоперационного лечения первичных опухолей и регионарных метастазов составила около 90%.

Материал опухолей молочной железы и регионарных лимфоузлов (метастазов), полученных при оперативном вмешательстве, подвергался морфологическому исследованию. Были рассмотрены данные о лечебном патоморфозе в опухолях молочной железы у больных основной и контрольной групп. Анализ частоты и глубины лечебного патоморфоза показал, что если при одном химиолучевом лечении 3-я и 4-я степени патоморфоза в первичных опухолях наблюдались в 47,5% случаев, то в сочетании с ВМП-воздействием указанные показатели составили 55,9%. Наиболее эффективной формой ответа на комбинированную предоперационную терапию с ВМП-воздействием были 2 – 4 степени патоморфоза, что соответствовало примерно 90% эффективности лечения по клиническим и рентгенологическим данным.

Отдаленные результаты лечения

Была проведена работа по изучению результатов отдаленного лечения больных раком молочной железы III-ей стадии с применением в предоперационной терапии ВМП-воздействия. В разработку вошло 44 больных из основной группы (с

применением ВМП-воздействия) и 41 из контрольной. Оценку отдаленных результатов лечения проводили по данным наблюдения больных в течение 5 лет с контрольными осмотрами через каждые 6 месяцев. В каждой группе учитывали количество и сроки возникновения возвратов (рецидивов) заболевания, а также количество и сроки наступления смертельных исходов в результате прогрессирования опухолевого процесса. На основании фактических данных по рекомендованной ВОЗ методике (Двойриным и Клеменковым, 1985) были построены кумулятивные кривые выживаемости и рецидивирования. Вероятность различия кривых высчитывалась методом Хи-квадрат по Манта-Ханзелю. Необходимо заметить, что полученные кумулятивные кривые, опираясь на не полные (с учетом отсутствия данных по некоторым больным) реальные данные, выражают вероятность события в реальной шкале времени.

На рис. 20 представлены кумулятивные кривые выживаемости для групп больных, лечившихся в предоперационном периоде с применением ВМП-воздействия, и без него. Из графиков видно, что на всех сроках наблюдения доверительные интервалы, учитывающие уровень ошибок исходных данных, перекрываются. Поэтому, несмотря на некоторое намечившееся расхождение кривых на интервале 2,5 – 3,5 года (вероятность выживания к сроку 30 месяцев примерно на 1/3 выше для группы ВМП-воздействием), а также учитывая недостаточность выборки данных, не представляется возможным говорить о преимуществах включения воздействия ВМП в схему лечения с целью улучшения отдаленных результатов по показателям 5-ти летней выживаемости.

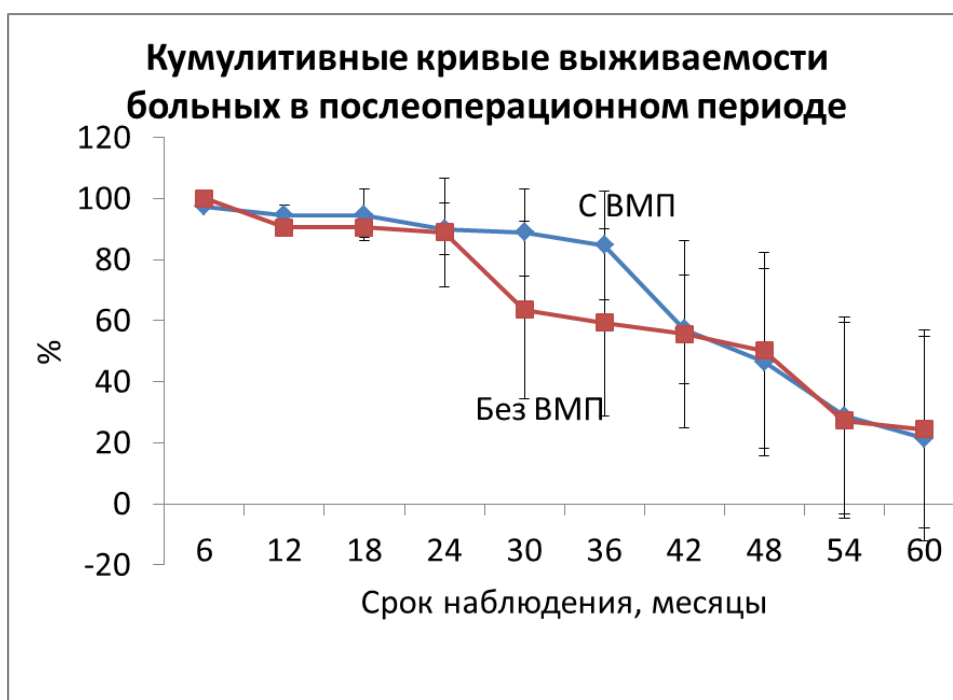


Рисунок 20. Кумулятивные кривые выживаемости в послеоперационном периоде.

Кумулятивные кривые рецидивирования (возврата заболевания) (рис. 21) с учетом уровня ошибок имеют временной промежуток, на котором доверительные интервалы не перекрываются, и поэтому представляют интерес для анализа.

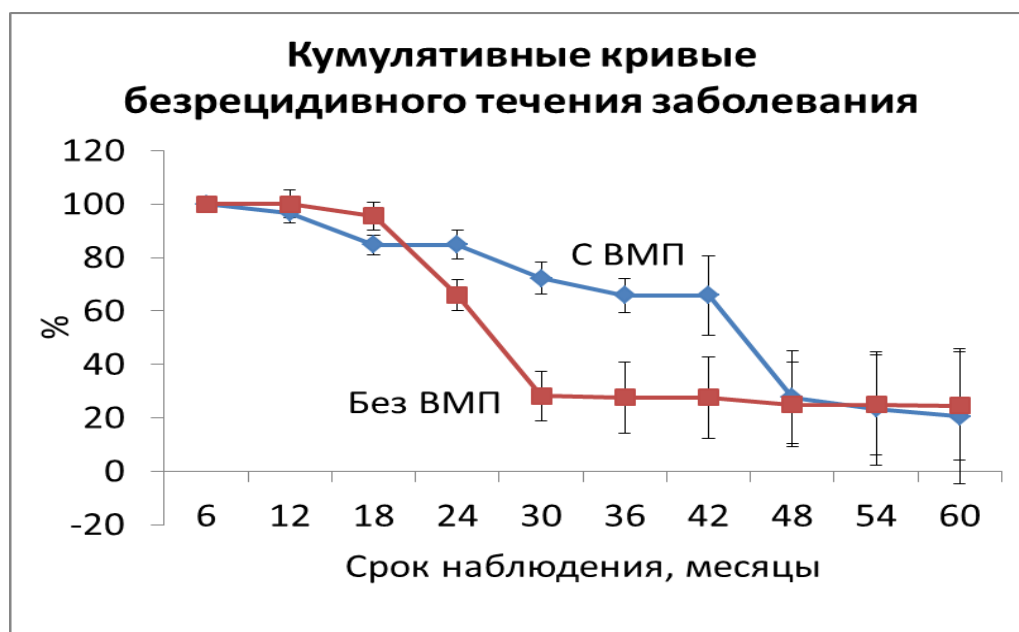


Рисунок 21. Кумулятивные кривые безрецидивного послеоперационного периода.

Из графиков видно, что на сроках наблюдения 2,5 – 3,5 г.г. вероятность не иметь рецидива заболевания для группы больных с ВМП-воздействием в предоперационном периоде составила 72,3%, а для группы без ВМП-воздействия – только 28,2%. Эти данные с учетом возможных ошибок можно считать достоверными. Дальнейшее наблюдение показывает, что к сроку 4 года кривые сближаются.

Таким образом, можно предположить наличие определенного временного периода после оперативного лечения, в течение которого для больных, получивших в предоперационном лечении ВМП-воздействие, сохраняется более высокая степень защиты организма от дальнейшего прогрессирования заболевания. Из этого следует, что, целесообразно для снижения вероятности возможного рецидива заболевания проведение в послеоперационном периоде повторных периодических курсов ВМП-воздействия для больных, оперированных по поводу рака молочной железы.

Лечение послеоперационных лимфоррей

Было проведено исследование эффективности применения ВМП - воздействия для снижения послеоперационной лимфорреи у больных раком молочной железы. Всего было исследовано 106 больных разного возраста (32 – 68 лет) с местно-

распространенным раком молочной железы III-ей стадии. Из них в основной группе (с ВМП-воздействием) было 50 больных, в контрольной группе – 56 больных. Больные из основной группы получали по 5 – 12 сеансов ежедневных сеансов ВМП-воздействий продолжительностью 40 – 60 мин.

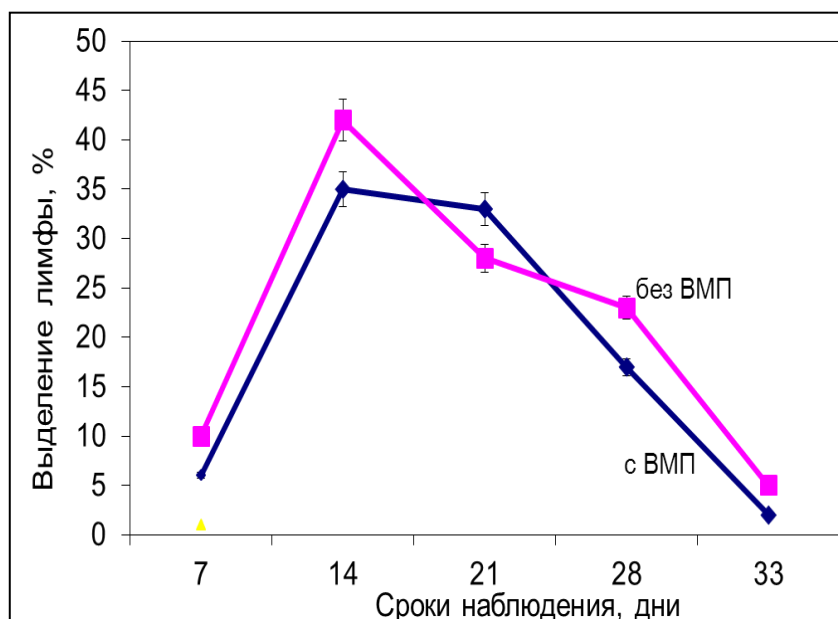


Рисунок 22. Длительность и объемы послеоперационной лимфорреи для двух групп больных раком молочной железы:
с ВМП-воздействием;
без ВМП.

Было отмечено, что общая продолжительность лимфорреи в этой группе колебалась от 3 до 33 дней, что в среднем составило 8 ± 4 дней (рис. 22). При этом у большинства больных лимфоррея уменьшалась с 200 – 300 мл за сутки до 50 мл или совсем прекратилась за время пребывания в стационаре (2 недели). У 8 больных после 5 – 6 сеансов ВМП-воздействия лимфоррея с 600 мл за сутки прекратилась полностью. В контрольной группе продолжительность послеоперационной лимфорреи (от удаления дренажа до прекращения подкожного накопления жидкости) была в пределах от 6 до 34 дней. Средняя продолжительность лимфорреи в контрольной группе составила 13 ± 5 дней.

Проведенные исследования показали определенную эффективность и полезность применения ВМП-воздействия с целью уменьшения объемов и сроков послеоперационной лимфорреи после обширных операций на молочных железах.

2.3 Влияние ВМП-воздействия на состояние гомеостаза организма человека

Применение теста Накатани для наблюдения за изменением функционального состояния организма пациентов, проходящих курс общесистемной магнитотерапии на установке «Магнитотурботрон», выявило следующий эффект. Было обнаружено, что после 3 – 4 процедуры у многих пациентов происходят качественные изменения в общей картине начального состояния. Эти изменения проявляются в нормализации

показателей отдельных меридиан, активность которых ранее находилась за пределами коридора физиологической нормы. Дальнейшие процедуры стабилизируют и частично улучшают достигнутый воздействием ВМП результат.

Для анализа и интерпретации данного эффекта нами была применена математическая модель динамической автоколебательной системы, моделирующей реакции организма человека на общее воздействие слабого низкочастотного ВМП. В данной модели устойчивому состоянию (гомеостазу) соответствует некая область притяжения (аттрактор), к которому после внешнего воздействия релаксируют все колебательные в системе процессы. Параметры динамической системы задаются набором величин $x_1, x_2, \dots, x_{24}$, представляющих данные акупунктурной диагностики по Накатани, измеренные, соответственно, для 12 левых и 12 правых меридианов. Величины $x_1, x_2, \dots, x_{24}$ в каждый момент времени характеризует строго определенное состояние динамической системы. Изменению состояния данной системы во времени отвечает движение точки $P(t_i)$ в фазовом пространстве по некоторой фазовой траектории $P(t_{i+1}) = g(\lambda, \mu) \cdot P(t_i)$, где $g(\lambda, \mu)$ – гладкая функция, параметры которой μ и λ могут перестраиваться и характеризуют фазовый портрет системы, дающий качественное представление о возможном ее поведении.

Для описания состояния подобных динамических систем используются обыкновенные дифференциальные уравнения. В нашей модели при размерности фазового пространства $n = 24$ система дифференциальных уравнений имеет вид:

$$dx_n/dt = F_n(x_n, \lambda, \mu) \quad \text{где } n = 1, 2, \dots, 24$$

Данную систему уравнений после понижения ее размерности путем использования обобщенного показателя функциональной активности – $z(t_i) = F_1(x_1, x_2, \dots, x_{24})$, и задания ВМП-воздействия в виде гармонической функции: $\Phi(t) = B \sin(\Omega t + \varphi_0)$, с амплитудой B , и частотой Ω , которая не связана с частотой периодических колебаний самой системы, и имеет по отношению к ней сдвиг по фазе, можно свести к известному уравнению Дуффинга, описывающему вынужденные колебания нелинейного осциллятора для одной переменной:

$$d^2z/dt^2 + \lambda dz/dt + z(1 + \mu z^2) = B \sin(\Omega t - \varphi_0)$$

В левой части уравнения параметры μ и λ характеризуют устойчивость функционирования системы, а правая часть задает периодическую модуляцию с частотой Ω . Данное уравнение может иметь два устойчивых (аттракторы) и одно неустойчивое решение, которые при определенном соотношении параметров μ и λ показывают прохождение системы через точки бифуркации (Фейгин, 2001).

Из графика (рис. 23 а) видно, что в интервале частот, прилегающих к частотам срыва (справа от ω_2 и слева от ω_1), происходит изменение устойчивости системы, и переход к новому стационарному состоянию с другой амплитудой колебаний. Следовательно, в исследуемой нами модели при $\omega > \omega_2$ может существовать устойчивый режим вынужденных колебаний со значительно меньшей амплитудой (рис. 23 б).

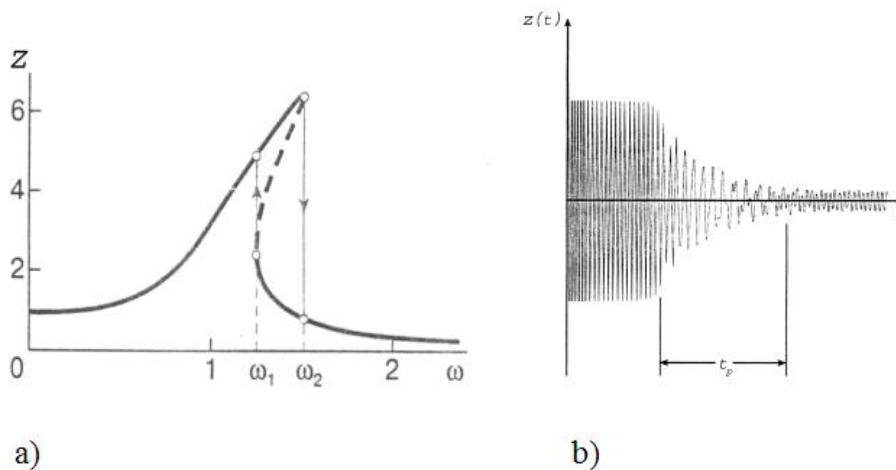


Рисунок 23. Эффект бифуркационной ситуации в динамической системе: а) скачок на резонансной кривой, б) изменение режима колебаний (t_p – время фазового перехода).

Таким образом, в рамках рассмотренной модели, можно говорить о возможности существования реакции организма человека на воздействие слабого низкочастотного ВМП в виде перехода через точки бифуркации, и смену одного состояния гомеостаза на другой, более близкий к коридору нормальной функциональной активности организма.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что воздействие ВМП ($B_{\max} = 3,0$ мТл, $f = 100$ Гц) способно оказывать ингибирующее действие (до 30%) на синтез ДНК и пролиферацию культивируемых опухолевых клеток, существенно (до 80%) для некоторых видов опухолей экспериментальных животных тормозит развитие опухолевого процесса, а также оказывает влияние на снижение уровня (до 45%) лимфогенного метастазирования.
2. Установлено, что одной из мишеней ВМП являются клетки иммунной системы (фагоциты), которые под его действием увеличивают продукцию активных форм кислорода (АФК), что повышает уровень неспецифической резистентности организма к развитию опухолевого процесса.

3. Показано, что сочетанное применение воздействия ВМП и противоопухолевых препаратов не антагонистично, и умеренно увеличивает общий противоопухолевый эффект.
4. Установлен радиомодифицирующий эффект ВМП, проявляющийся в снижении тяжести местных лучевых реакций нормальных тканей и уменьшении тяжести лучевого поражения организма.
5. Предложены и апробированы аппаратные методы измерения индивидуальной магниточувствительности к общему воздействию слабого низкочастотного ВМП и мониторинга динамики изменения функционального состояния организма человека в процессе магнитотерапевтических процедур.
6. Показана эффективность курсового ВМП-воздействия для восстановления и поддержания гомеостаза организма человека, нарушенного различными патологическими влияниями.
7. Показано, что применение ВМП-воздействия в схеме предоперационного лечения больных раком молочной железы с учетом индивидуальной магниточувствительности приводит к достижению более высоких показателей эффективности непосредственных и отдаленных результатов лечения.
8. Совокупность полученных экспериментальных, теоретических и клинических результатов послужила основой для разработки и внедрения в РОНЦ им Н.Н.Блохина РАМН технологии общесистемной ВМП-магнитотерапии.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в журналах из списка ВАК

1. Летягин В.П., Добрынин Я.В., **Рыбаков Ю.Л.**, Ермилова В.Д., Протченко Н.В. Место магнитотерапии в комплексном лечении распространенных форм рака молочной железы. // **Российский онкологический журнал**. 1996. №2. С. 16–18.
2. Васичев Б.Н., **Рыбаков Ю.Л.** Эвристические модели влияния слабого нестационарного магнитного поля на конденсированные системы и медико-биологические объекты. // **Прикладная физика**. 1998. №2. С. 100–112.
3. Васичев Б.Н., **Рыбаков Ю.Л.** Развитие метода визуализации анализа локализованной микроплазмы при диагностике медико-биологических объектов. // **Прикладная физика**. №4. 2000. с. 79-83.
4. Добрынин Я.В., Летягин В.П., **Рыбаков Ю.Л.**, Казанов А.Н., Герасименко В.Н. Исследование эффективности вихревого магнитного поля (ВМП) в комбинированной терапии опухолей молочных желез человека. // Материалы I Евразийского Конгресса

- по медицинской физике и инженерии. Москва 2001. **Медицинская физика.** Ч.1. №. 11. 2001. с. 47.
5. **Рыбаков Ю.Л.** Магнитные поля в экспериментальной и клинической онкологии. // **Медицинская физика.** 2002. №4 (16). С. 66–83.
6. **Рыбаков Ю.Л.** Противоопухолевая эффективность вихревого магнитного поля (ВМП). Часть I. Модельное представление магнитной стимуляции окислительного метаболизма фагоцитов. // **Медицинская физика.** 2003. № 1 (17). С. 28–33.
7. **Рыбаков Ю.Л.,** Рябых Т.П., Николаева Т.Г. Противоопухолевая эффективность вихревого магнитного поля (ВМП). Часть II. Экспериментальное исследование влияния ВМП на продуцирование активных форм кислорода (АФК) фагоцитов. // **Медицинская физика.** 2003. № 1 (17). С. 34–39.
8. **Рыбаков Ю.Л.,** Рябых Т.П., Николаева Т.Г. Противоопухолевая эффективность вихревого магнитного поля (ВМП). Часть III. Исследование радиомодифицирующего действия ВМП на экспериментальных животных. // **Медицинская физика.** 2003. № 2 (18). С. 28–32.
9. **Рыбаков Ю.Л.,** Летягин В.П., Протченко Н.В. . Противоопухолевая эффективность вихревого магнитного поля (ВМП). Часть IV. Применение ВМП - воздействия в лечении рака молочной железы человека. // **Медицинская физика.** 2003. № 2 (18). С. 33–38.
10. **Рыбаков Ю.Л.,** Седакова А.А., Николаева Т.Г., Мещерикова В.В., Добрынин Я.В. Изучение противоопухолевого действия вихревого магнитного поля (ВМП) в экспериментальных тест-системах in vitro и in vivo. // **Медицинская физика.** 2003. №3. С. 42-50.
11. **Рыбаков Ю.Л.** Магниточувствительность организма человека при общем воздействии вихревого магнитного поля (ВМП). // **Медицинская физика.** 2003. №4. С.42-47.
12. Летягин В.П., Протченко Н.В., **Рыбаков Ю.Л.,** Добрынин Я.В. Опыт применения вихревого магнитного поля в лечении рака молочной железы. // **Вопросы онкологии.** 2003.Том 49. №6. С.
13. **Рыбаков Ю.Л.** Принципы формирования сигнала слабого низкочастотного вихревого магнитного поля (ВМП) для общего воздействия на организм человека. // **Медицинская физика.** 2004. №2. С. 52-59.
14. **Рыбаков Ю.Л.** Математическая модель для исследования общего воздействия вихревого магнитного поля (ВМП) на организм человека. // **Медицинская физика.** 2004. №3. С.26-33.

15. **Рыбаков Ю.Л.** Вероятностная модель прямого действия на клетки слабого низкочастотного вихревого магнитного поля (ВМП). // **Медицинская физика.** 2005. №1. С. 40-45.
16. **Рыбаков Ю.Л.,** Кижаяев Е.В, Летягин В.П., Николаева Т.Г. Общесистемная магнитотерапия в онкологии. // **Медицинская физика.** 2005. №2. С. 70-76.
17. **Рыбаков Ю.Л.** Математическая модель для исследования противоопухолевого воздействия слабого низкочастотного вихревого магнитного поля. // **Медицинская физика.** 2006. №3. С. 26-31.
18. **Рыбаков Ю.Л.** Биофизические механизмы радиомодифицирующего действия слабого низкочастотного вихревого магнитного поля. // **Медицинская физика.** 2007. №2. С. 60-66.

Статьи в реферируемых журналах и сборниках, учебные и методические пособия

1. Летягин В.П., Добрынин Я.В., Лабеецкий И.И., **Рыбаков Ю.Л.,** Иванов В.М., Протченко М.В. Комплексное лечение местно-распространенного рака молочной железы с использованием вихревого магнитного поля. // **Магнитология.** 1994. №1. С. 65–66.
2. Сыркин А.Б., Добрынин Я.В., Летягин В.П., **Рыбаков Ю.Л.** Магнитотерапевтическая установка “Магнитотурботрон-2”. // Руководство для медицинских специалистов. М. 1998. 36 с.
3. Летягин В.П., Добрынин Я.В., **Рыбаков Ю.Л.** Рекомендации женщинам после операции на молочной железе. // Методическое пособие. Москва. 2000. 17 с.
4. **Рыбаков Ю.Л.,** Костылев В.А. Физические основы применения магнитных полей в медицине. // Учебное пособие. Москва. АМФ-Пресс. 2004. 88 с.
5. **Рыбаков Ю.Л.,** Кижаяев Е.В., Летягин В.П., Николаева Т.Г. Общесистемная магнитотерапия в онкологии. // Сб. трудов. Высокотехнологичные онкорadiологические центры. Научные разработки и методические аспекты. Москва. 2007. С. 103-108.
6. **Рыбаков Ю.Л.** Общесистемная магнитотерапия в онкологии. // **Медицина и высокие технологии.** 2012. №1. С.78-83.
7. **Рыбаков Ю.Л.,** Козлов Ю.П. Влияния слабого низкочастотного вихревого магнитного поля (ВМП) на гомеостатические показатели организма человека. // **Медицина и высокие технологии.** 2012. №2. С.29-34.

Тезисы конференций

1. Добрынин Я.В., Николаева Т.Г., **Рыбаков Ю.Л.** Противоопухолевое действие вихревого магнитного поля (ВМП) в эксперименте. // Генераторы электромагнитного

поля для магнитотерапии. Материалы научно-практической конференции. Саров, 1995. С.24.

2. **Рыбаков Ю.Л.** Биологические предпосылки и возможные механизмы действия переменных магнитных полей. // Генераторы электромагнитного поля для магнитотерапии. Материалы научно-практической конференции. Саров, 1995. С.37.

3. Добрынин Я.В., Николаева Т.Г., Седакова Л.А., Рябых Т.П., **Рыбаков Ю.Л.** Экспериментальное изучение противоопухолевого действия вихревого магнитного поля. // Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине. Тезисы докладов Первого международного конгресса. Санкт-Петербург, 1997. С. 96–97.

4. Рябых Т.П., Николаева Т.Г., **Рыбаков Ю.Л.**, Добрынин Я.В. Один из возможных механизмов противоопухолевого действия вихревого магнитного поля. // Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине. Тезисы докладов Первого международного конгресса. Санкт-Петербург, 1997.

5. Рябых Т.П., Добрынин Я.В., Николаева Т.Г., **Рыбаков Ю.Л.** Применение вихревого магнитного поля (ВМП) для лечения злокачественных новообразований. Synthesis of medicine East-West and modern technologies – the way to XXI century. International congress of integrative medicine. Cyprus. 1997. p. 134.

6. Dobrynin Y.V., Nikolaeva T.G., Sedakova L.A., Ryabykh T.P., **Rybakov Y.L.** Antitumor effect of turbulent magnetic field (TMF) in experimental system. // In Abstract Book of the Second World Congress for Electricity and Magnetism in Biology and Medicine, Bologna, Italy. 1997. P. 328.

7. Ryabykh T.P., Nikolaeva T.G., **Rybakov Y.L.**, Dobrynin Y.V. Some biological mechanisms of antitumor effect of turbulent magnetic field. // In Abstract Book of the Second World Congress for Electricity and Magnetism in Biology and Medicine, Bologna, Italy. 1997. P. 328.

8. Добрынин Я.В., Мещерякова В.В., Николаева Т.Г., **Рыбаков Ю.Л.**, Вайнсон А.А. Радиозащитное действие вихревого магнитного поля “Магнитотурботрона”. // Низкоэнергетическая магнитотерапия: опыт клинического применения и перспективы развития. Материалы научно-практической конференции. М., 1997. С. 5–6.

9. Летягин В.П., Добрынин Я.В., Протченко Н.Б., **Рыбаков Ю.Л.**, Герасименко В.Н. Применение “Магнитотурботрона” для снижения лимфореи после хирургического лечения рака молочной железы. // Низкоэнергетическая магнитотерапия: опыт клинического применения и перспективы развития. Материалы научно-практической конференции. М., 1997. С. 21–23.

10. Рябых Т.П., Николаева Т.Г., Седакова Л.А., **Рыбаков Ю.Л.**, Добрынин Я.В. Изучение влияния вихревого магнитного поля (ВМП) на пролиферацию опухолевых

клеток в культуре и рост опухолей у мышей. // Эколого-физиологические проблемы адаптации. Материалы VIII международного симпозиума. Москва. 1998. с. 326.

11. Dobrynin Y.V., Mescherikova V.V., Nikolaeva T.G., **Rybakov Y.L.**, Wainson A.A. Radioprotective effect of the turbulent magnetic field generation by Magnitoturbotron. // In Abstract Book of the Twentieth Annual Meeting of BEMS. St. Pete Beach, Florida, USA. 1998. P. 267-268.

12. Dobrynin Y.V., Nikolaeva T.G., Sedakova L.A., Ryabykh T.P., **Rybakov Y.L.** Antitumor effect of turbulent magnetic field (TMF) in experimental system and possible biological mechanisms for its action. // In Abstract Book of the Twentieth Annual Meeting of BEMS. St. Pete Beach, Florida, USA. 1998. P. 266–267.

13. Добрынин Я.В., Николаева Т.Г., Рябых Т.П., **Рыбаков Ю.Л.** Экспериментальное изучение противоопухолевого действия вихревого магнитного поля и его клинический эффект. // Квантовая медицина и новые медицинские технологии. Материалы I международного симпозиума. Блед. Словения. 2001. с. 99-100.

14. Dobrynin Y.V., Letiagin V.P., **Rybakov Y.L.**, Kazanov V.N. The effect of the turbulent magnetic field (TMF) in the preoperative combined therapy of human breast cancer. // In Abstract Book of the Twenty-Third Annual Meeting of BEMS. St. Paul, Minnesota, USA. 2001. P.164–165.

15. **Рыбаков Ю.Л.**, Вайнсон А.А., Мещерякова В.В., Николаева Т.Г., Рябых Т.П. Исследование радиомодифицирующего действия вихревого магнитного поля (ВМП) в эксперименте. // Новые методы диагностики и лечения лиц, подвергнутых радиационному воздействию. Материалы научно-практической конференции. Москва. 2002. с. 89-90.

16. **Rybakov Y.L.**, Dobrynin Y.V., Letiagin V.P., Protchenko N.V. Application of the turbulent magnetic field (TMF) influence for decrease of the postoperative lymphorrhea after surgical treatment of the locally spread breast cancer. // In Abstract Book of the Twenty-Four Annual Meeting of BEMS. Quebec. Canada. 2002.

17. **Rybakov Y.L.**, Dobrynin Y.V., Wainson A.A., Mescherikova V.V. Radioprotective action of the turbulent magnetic field (TMF) at a local X-ray irradiation of a skin stops of mice. // In Abstract Book of the Twenty-Five Annual Meeting of BEMS. Haway. USA. 2003.

18. Ахундов А.А., Николаева Т.Г., **Рыбаков Ю.Л.**, Казанов А.Н. Предварительные результаты применения магнитотерапии при комбинированном лечении рака орофарингиальной области. // Материалы II Евразийского Конгресса по медицинской физике и инженерии. Москва 2005. С. 5-6.

19. **Рыбаков Ю.Л.** Комплекс магнитотерапии и магнитотметрии для физической модификации лучевого лечения онкологических больных. // Материалы II Евразийского Конгресса по медицинской физике и инженерии. Москва 2005. С. 19-20.
20. Ахундов А.А., Николаева Т.Г., **Рыбаков Ю.Л.** Применение магнитотерапии при комбинированном лечении рака орофарингиальной области (предварительные результаты). // Материалы III Конгресса онкологов закавказских государств. Ереван, Армения, 2004. С. 55-56.
21. **Рыбаков Ю.Л.**, Кижаяев Е.П., Летягин В.П., Николаева Т.Г. Общесистемная магнитотерапия в онкологии. // Материалы научной конференции «Новые медико-физические проекты в онкологии». РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Москва, 2005. С. 49-56.
22. **Рыбаков Ю.Л.**, Козлов Ю.П. Применение слабого низкочастного вихревого магнитного поля в эндоекологии. // Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине. Тезисы докладов VI международного конгресса. Санкт-Петербург. 2012. С. 246

