

Князев

Николай Александрович

ВЛИЯНИЕ ПОЛИХРОМАТИЧЕСКОГО ВИДИМОГО И ИНФРАКРАСНОГО  
ИЗЛУЧЕНИЯ НА РОСТ ОПУХОЛЕЙ

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2013 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт цитологии Российской академии наук

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор  
**Самойлова Кира Александровна**

кандидат биологических наук  
**Филатова Наталия Алексеевна**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
**Корнилова Елена Сергеевна**  
Институт цитологии РАН,  
Санкт-Петербург

доктор медицинских наук, профессор  
**Назаров Петр Григорьевич**  
Научно-исследовательский институт экспериментальной  
медицины СЗО РАМН,  
Санкт-Петербург

Ведущая организация: Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН

Защита состоится \_\_\_\_\_ 2013 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д002.230.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4.

Сайт института: [www.cytspb.rssi.ru](http://www.cytspb.rssi.ru)

Электронный адрес: [cellbio@mail.cytspb.rssi.ru](mailto:cellbio@mail.cytspb.rssi.ru)

Факс: 8(812)297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН

Автореферат разослан «    » ноября 2013 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат биологических наук

**Е.В. Каминская**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы.

После обоснования в 70-80-х годах прошлого века возможности иммуносупрессивного и проканцерогенного действия ультрафиолетового (УФ) излучения его применение в лечебно-оздоровительных целях резко сократилось, и основное место в светолечении заняли лазерные и, позднее, светодиодные технологии, использующие низкоинтенсивное монохроматическое или узкополосное излучение видимого (ВИД) и инфракрасного (ИК) диапазона (Kripke, 1990; Aubin, 2003). Доказана высокая эффективность излучения этой части спектра для стимуляции физиологических процессов у нефотосинтезирующих организмов и накоплен значительный опыт его использования в медицине (Karu, Kolyakov, 2005). Фототерапевтические аппараты, используемые в медицине, характеризуются более высокой мощностью генерируемого излучения с высокой степенью его поляризации, в отличие от обычного дневного света. В настоящее время физиотерапевтические аппараты, генерирующие ВИД и ИК излучение, успешно используются для стимуляции иммунной системы, ускорения заживления ран и улучшения микроциркуляции крови (Samoilova et al., 1998; Posten et al., 2005). Отношение к применению полихроматического и монохроматического излучения в медицинской практике остается сдержанным из-за опасений индукции и (или) стимуляции неопластических процессов. Подобные опасения основаны на известном биостимулирующем действии ВИД и ИК излучения (Karu et al., 1982).

Вопрос о характере влияния излучений оптического диапазона на пролиферацию опухолевых клеток в условиях *in vitro* и рост злокачественных новообразований у лабораторных животных *in vivo* далек от разрешения. Показано, что низкоинтенсивное лазерное излучение различных длин волн может как стимулировать пролиферацию трансформированных клеток (Gao et al., 2006), так и не оказывать на нее влияния (Pinheiro et al., 2002; Renno et al., 2007) и даже угнетать ее (Liu et al., 2004). Торможение скорости роста опухолей и степень их прививаемости в условиях *in vivo* могут быть также связаны с изменением их чувствительности к лизису естественными киллерными клетками (НК-клетками), являющимися эффекторами системы естественного противоопухолевого иммунитета (Lanier, 2005; Kovalenko et al., 2012). К настоящему времени получены данные о том, что монохроматическое и полихроматическое излучение обладает стимулирующим действием на иммунитет человека (Жеваго и др., 2005) и животных (Novoselova et al., 2006), однако, механизмы этого явления изучены недостаточно. Не исключено, что распознавание

опухолевых клеток клетками иммунной системы может быть связано с фенотипическими изменениями облученных трансформированных клеток, что, однако, остается недоказанным.

Таким образом, учитывая актуальность исследования проблем онкологической безопасности применения фототерапии, в медицине необходимы исследования, направленные на изучение механизмов действия ВИД и ИК излучения на опухолевые клетки, и анализ их туморогенности в модельных экспериментах на лабораторных животных.

### **Цель исследования.**

Цель настоящей работы заключалась в определении влияния полихроматического видимого излучения, сочетанного с инфракрасным (480–3400 нм), на рост опухолей МГ-22а у мышей линии СЗНА и выяснении возможных механизмов, вовлеченных в этот процесс.

### **Задачи исследования.**

1. Определить влияет ли ВИД и ВИД-ИК излучения на рост опухоли МГ-22а у мышей-опухоленосителей.
2. Оценить влияние облучения клеток МГ-22а ВИД-ИК светом в условиях *in vitro* на их прививаемость, скорость роста и выживаемость животных с опухолью.
3. Определить влияние ВИД-ИК света на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток МГ-22а.
4. Установить возможные механизмы изменения туморогенности клеток МГ-22а, облученных ВИД-ИК светом в связи с изменением их фенотипа.

### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. ВИД и ВИД-ИК излучение тормозит рост опухоли гепатомы МГ-22а у мышей-опухоленосителей и увеличивает выживаемость животных. Облучение ВИД-ИК светом клеток МГ-22а в условиях *in vitro* снижает степень их прививаемости и скорость роста опухоли после перевивки мышам СЗНА.
2. ВИД-ИК излучение не влияет на жизнеспособность клеток МГ-22а и не приводит к изменению их пролиферативной активности. Не изменяются синтез и транслокация стрессорного белка теплового шока Hsp70 на поверхность клеток.
3. Облучение клеток МГ-22а ВИД-ИК светом приводит к увеличению их чувствительности к лизису НК-клетками интактных мышей СЗНА в условиях *in vitro*. ВИД-ИК излучение вызывает структурные изменения поверхности облученных клеток МГ-22а: снижается содержание гликопротеинов и кислых мукополисахаридов и увеличивается экспрессия ламинина-1 на поверхности клеток.

**Научная новизна работы.** Впервые обнаружено противоопухолевое действие двух видов полихроматического излучения – видимого и видимого, сочетанного с инфракрасным. В модельных экспериментах на мышах СЗНА с подкожно трансплантированной сингенной гепатомой МГ-22а показано торможение роста опухолей как после 5-кратного облучения мышей-опухоленосителей, так и после облучения клеток гепатомы МГ-22а *in vitro* перед их трансплантацией интактным животным.

Впервые продемонстрирован возможный механизм противоопухолевого действия ВИД и ИК света. Показано, что торможение роста опухолей не связано с повреждением клеток и изменением их пролиферативной активности, а обусловлено повышением чувствительности этих клеток к литической активности НК-клеток, являющихся эффекторами противоопухолевой резистентности. Как оказалось, повышение чувствительности трансформированных клеток к НК-лизису является следствием структурных изменений их поверхности – снижением содержания надмембранных гликопротеинов и кислых мукополисахаридов и увеличением синтеза ламинина, распознаваемого НК-клетками мышей.

Показано, что облучение полихроматическим светом в использованных дозах не является стрессорным фактором для клеток МГ-22а, поскольку не способствует повышению содержания белка теплового шока (Hsp-70) и его транслокации на поверхность опухолевых клеток.

**Личный вклад автора.** Все экспериментальные процедуры и обработка результатов выполнены автором лично. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научными руководителями.

**Теоретическое и практическое значение работы.** Выявленное нами торможение роста опухолей у мышей СЗНА под действием ВИД-ИК излучения и продемонстрированные нами механизмы этого воздействия являются научным обоснованием онкологической безопасности ВИД и ИК излучения. Полученные нами данные позволяют применять в медицинской практике фототерапевтические аппараты Bioptron и Q-light, генерирующие излучение различных длин волн оптического диапазона для стимуляции иммунитета, улучшения кровотока в макро- и микрососудах, а также для ускорения ранозаживления без опасения индукции неопластического процесса.

**Апробация работы.**

Основные положения работы доложены и обсуждены на международной конференции 22th International Congress Laser Medicine with Pre-Conference Courses (Италия, 2008); на международной конференции The World Association of Laser Therapy 2008

Conference (ЮАР, 2008); на международной конференции 24th International Congress Laser Medicine & IALMS (Италия, 2010); на международной конференции 15th International Congress of European Medical Laser Association (Финляндия, 2010); на международной конференции Laser Europe 2010 (Испания, 2010); на Российской конференции по фундаментальной онкологии «Фундаментальная онкология – Петровские чтения» (Россия, 2010); на III Съезде Общества клеточной биологии, Санкт-Петербург (2012); на международной конференции «Laser Helsinki 2012 International Congress» (Финляндия, 2012); на XXXVI и XXXX научно-практических конференциях «Лазеры в медицине и биологии» (Ялта 2009, 2013).

**По материалам диссертации опубликовано** 18 работ, в том числе 3 в рецензируемых научных журналах из перечня изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

### **Структура и объём диссертации.**

Диссертационная работа изложена на \_\_\_ страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, методы, результаты, обсуждение и выводы. Материал иллюстрирован \_\_\_ рисунками и \_\_\_ таблицами. Библиографический указатель содержит \_\_\_ источников. \_\_\_

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Источники излучения.** Источником сочетанного ВИД-ИК, близкого по спектральному диапазону к солнечному свету без его ультрафиолетовой компоненты (480–3400 нм, 40 мВт/см<sup>2</sup>, 95 % поляризации), служил фототерапевтический аппарат Bioptron-2 (BioptronAG, Швейцария). Для облучения были использованы дозы 4.8 и 9.6 Дж/см<sup>2</sup>. Экспозиция в 2 мин облучения соответствует дозе 4.8 Дж/см<sup>2</sup>.

Полный спектр ВИД (380–750 нм, 40 мВт/см<sup>2</sup>, 95 % поляризации) получали от фототерапевтического аппарата Q-light (P&B AG, Швейцария). Для облучения были использованы дозы 9.6, и 38.4 Дж/см<sup>2</sup>. Одинаковые характеристики мощности излучений, генерируемых этими источниками, позволяла использовать их при одинаковых экспозициях в разных дозах (9.6 – 38.4 Дж/см<sup>2</sup>).

**Обоснование выбора доз облучения.** При выборе доз облучения ВИД и ВИД-ИК светом в первую очередь руководствовались величиной максимальной терапевтической дозы, применяемой в медицине при облучении поверхности тела пациентов. Эта доза не должна превышать значения 10 Дж/см<sup>2</sup> (AlGhamdi et al., 2012). Нами были выбраны дозы 4.8 Дж/см<sup>2</sup> и 9,6 Дж/см<sup>2</sup>. При облучении ВИД светом в дозах 4.8 и 9.6 Дж/см<sup>2</sup> влияние на скорость роста

опухолей у мышей обнаружено не было, в связи с этим в экспериментах применяли дозы, превышающие терапевтическую, до  $38.4 \text{ Дж/см}^2$ , что соответствовало экспозиции 16 мин.

**Естественная радиация Солнца.** Эксперименты проводили при минимальных значениях инсоляции естественной солнечной радиации. Эти показатели имеют наиболее низкие значения с октября по март и составляют от 0.1 до  $0.6 \text{ Дж/см}^2$  для Санкт-Петербурга (Atmospheric science data center, NASA). Эти значения в 4–24 раз ниже доз облучения, использованных в нашей работе. Использованное нами излучение в отличие от естественного поляризовано и не включает в себя ультрафиолетовую компоненту. С учетом этих данных можно предположить, что естественное излучение не может оказывать значительного влияния на экспериментальных животных и культуру клеток.

**Экспериментальные животные.** В экспериментах использовали мышей линии СЗНА обоих полов весом 18–20 г (питомник “Рапполово”, РАМН).

**Клетки гепатомы мыши.** Линейноспецифичная гепатома МГ-22а – это субштамм гепатомы 22а, индуцированной ортоаминоазотолуолом у мышей СЗНА в 1951 г. (Гельштейн, 1954). Клетки МГ-22а были получены из Банка клеточных культур ИНЦ РАН. Клетки культивировали в среде ДМЕМ (Биолот, Россия) с добавлением 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (Биолот, Россия) и 40 мкг/мл гентамицина (Sigma, США).

**Прививка клеток гепатомы МГ-22а.** Клетки гепатомы МГ-22а прививали интактным мышам СЗНА в количестве  $5 \times 10^4 - 2 \times 10^5$  клеток на 1 мыш. Время появления опухолей, их размер и сроки гибели мышей с опухолями регистрировали 1 раз в 5 суток в течение 10–45 сут после трансплантации опухолевых клеток. Объем опухолей рассчитывали по формуле (Хавинсон и др., 2001):

$$V = \frac{4}{3} \pi \left( \frac{L}{2} \right) \left( \frac{D}{2} \right)^2,$$

где L – максимальный диаметр опухоли, D – минимальный диаметр (мм). Размер опухолей оценивали до начала гибели животных-опухоленосителей (до 25-х суток). Всего было использовано 150 мышей, разделенных на соответствующие группы. Было проведено 3 серии опытов.

**Облучение мышей.** Мышей СЗНА через 10 сут после прививки клеток МГ-22а, когда у 100% мышей образовались опухоли, разделили на 5 групп. Группы 1 и 2 подвергали 5-дневному курсу облучения ВИД-ИК излучением в дозе 4.8 и  $9.6 \text{ Дж/см}^2$ , соответственно, группы 3 и 4 подвергали 5-дневному курсу облучения ВИД излучением в дозах 9.6 и  $38.4 \text{ Дж/см}^2$ , соответственно. Пятая (контрольная) группа животных облучению не подвергалась.

**Облучение клеток гепатомы МГ-22а in vitro.** Клетки гепатомы МГ-22а облучали только ВИД-ИК светом. Для облучения клетки МГ-22а рассеивали в чашки Петри по  $2 \times 10^5$  клеток на

чашку для достижения логарифмической фазы роста. Перед облучением культуральную среду заменяли на фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). После облучения PBS заменяли на среду культивирования. Через 24 ч после облучения клетки перевивали интактным мышам СЗНА. Параллельно проводили оценку клеток по критериям жизнеспособности, пролиферативной активности, чувствительности к лизису НК-клетками и параметрам изменения их клеточной поверхности.

**Оценка пролиферативной активности и жизнеспособности клеток МГ22а.** Оценка жизнеспособности и пролиферативной активности клеток проводили с помощью проточного цитометра EPICS XL (Beckman Coulter, США). Контролем служили необлученные клетки. Для подсчета количества мертвых клеток к клеточной суспензии добавляли йодид пропидия (Invitrogen, США) в концентрации 0.05 мг/мл. После инкубации в течение 5 мин при комнатной температуре пробы анализировали на проточном цитометре. Оценивали долю клеток, окрашенных йодистым пропидием, по отношению к общему числу клеток, в процентах.

Для анализа клеточного цикла к каждой пробе добавляли сапонин (Fluka, США) в концентрации 0.2 мг/мл, РНКазу (Sigma, США) в концентрации 0.25 мг/мл и йодид пропидия (Invitrogen, США) в концентрации 0.05 мг/мл. После инкубации в течение 30 мин при комнатной температуре пробы анализировали на проточном цитометре. Обработку данных проводили с помощью программы ModFit LT (Verity Software House, Topsham).

**Окраска гликопротеинов и кислых мукополисахаридов на поверхности клеток МГ22а альциановым синим (АС).** Через 24 ч после облучения ВИД-ИК излучением клетки гепатомы 22а отмывали PBS три раза. Клетки снимали скребком. Проводили подсчет клеток в камере Горяева. К 1 мл суспензии, содержащей 1 млн. клеток, добавляли 2 мл АС до конечной концентрации 0.01 %. Смесь инкубировали 30 мин, затем осаждали клетки центрифугированием (200 g, 15 мин). Экстинкцию надосадочной жидкости измеряли на спектрофотометре СФ-46 при 617 нм. Полученные данные сравнивали с результатами спектрофотометрирования исходного 0.01 %-ного раствора АС.

Мерой сорбции красителя клетками служил коэффициент распределения красителя между гликокаликсом и средой – Q, который рассчитывали по формуле:

$$Q = \frac{C_1 - C_2}{C_1},$$

где C<sub>1</sub> – концентрация исходного раствора АС (до окрашивания клеток), единицы оптической плотности; C<sub>2</sub> – концентрация того же раствора после окрашивания клеток и удаления их центрифугированием, единицы оптической плотности.



**Получение антиламининовой иммуносыворотки.** Поликлональную сыворотку против ламинина1 получали путем двукратной иммунизации кроликов препаратом ламинина1 в концентрации 1 мг/мл. Ламинин1 вводили подкожно в область спины в 10 различных точек в присутствии полного адьюванта Фрейндта. Через 2 нед иммунизацию повторяли. Кровь забирали через 4 нед после иммунизации. Первичную очистку антител проводили методом ионообменной хроматографии. Дальнейшую очистку проводили при помощи колонки с иммобилизованным белком G для выделения фракции IgG.

**Выявление внутриклеточного и мембранного Hsp 70 на клетках МГ-22а.** Клетки рассеивали на покровные стекла в чашках Петри так, чтобы в день опыта клетки занимали 75 % стекла. Чашки Петри помещали на лед, удаляли среду и промывали PBS 3 раза. Инкубацию с антителами против Hsp70 (3C5) проводили в течение 4 ч. Далее промывали холодным PBS 3 раза. Клетки фиксировали 4 %-ным формальдегидом в течение 40 мин. Для выявления цитоплазматического Hsp70 препараты обрабатывали Triton X-100 (Panreac, Испания). Для выявления Hsp70 на мембране Тритон не использовали. Далее проводили отмывку PBS. Препараты обрабатывали вторыми мечеными FITC антителами (GamFitc Sigma antimouse IgG F-0257 Lot 10 k 9245) и четырехкратно отмывку PBS. Препараты заключали в среду Fluoroshield (Sigma), содержащую DAPI. Препараты оценивали с помощью конфокального микроскопа AxioObserver (Zeiss). При анализе изображений использовали программу AxioVision 4,8 (Zeiss).

**Электрофорез в полиакриламидном геле.** Для выявления ламинина проводили разделение белков в 8 %-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия с учетом рекомендаций Protein electrophoresis technical manual (Amersham, Швеция). Для проявления реакции использовали диаминобензидин.

**Цитотоксический тест.** Клетки-эффекторы – NK-клетки – получали из селезенки интактных мышей СЗНА (Филатова и др., 2008). Клетками-мишенями служили культивируемые клетки гепатомы мыши линии МГ22а. Для определения NK-активности спленоцитов использовали  $H^3$ -уридиновый цитотоксический тест (Hashimoto, Sudo, 1971) в нашей модификации (Филатова и др., 2008). Каждый вариант эксперимента выполняли в 6 повторностях в пластиковых 96-луночных круглодонных планшетах для иммунологических реакций. Соотношение эффекторов и мишеней составляло 5:1–50:1. В контрольные пробы вместо спленоцитов вносили среду культивирования. Инкубацию проб проводили в течение 18 ч при 37 °С в атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>. Радиоактивность измеряли в сцинтилляционном счетчике LS8100 (Beckman, США). Уровень NK-активности оценивали с помощью цитотоксического индекса (ЦИ), отражающего долю погибших клеток в процентах.

**Статистическая обработка.** Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Вилкоксона для сравнения независимых выборок. В случае оценки статистической достоверности данных по выживаемости мышей и прививаемости клеток использовали критерий Фишера. Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы Statistica 6.0. Достоверными считали различия между группами, если  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

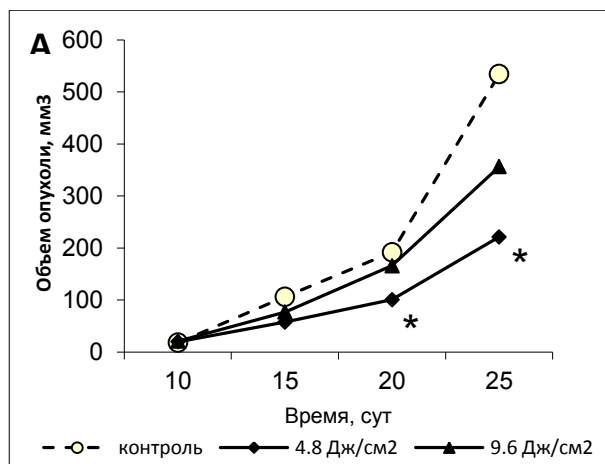
**Влияние полихроматического видимого (ВИД) и видимого сочетанного с инфракрасным (ВИД-ИК) излучения на скорость роста опухолей у мышей со сформировавшимися опухолями.** Для оценки действия ВИД и ВИД-ИК излучения на опухолевый рост *in vivo* проводили облучение мышей с уже сформировавшимися опухолями.

Выяснилось, что облучение мышей-опухоленосителей ВИД-ИК светом в дозе  $4.8 \text{ Дж/см}^2$  приводило к торможению скорости роста опухолей в 1.5–4 раза в зависимости от сроков после прививки клеток гепатомы. Облучение тем же светом в дозе  $9.6 \text{ Дж/см}^2$  на этот показатель не влияло. Облучение мышей ВИД светом в дозе  $38.4 \text{ Дж/см}^2$  достоверно тормозило рост опухолей только на 25-е сутки после прививки клеток МГ-22а, тогда как меньшая доза облучения ( $9.6 \text{ Дж/см}^2$ ) не влияла на скорость роста опухолей (рис 1А).

При облучении ВИД и ВИД-ИК светом во всех использованных нами дозах наблюдали увеличение выживаемости животных. Контрольные необлученные мыши начинали гибнуть раньше облученных (на 25-е сутки в контроле против 30-х суток после облучения) (рис. 1Б). Для обоих исследованных видов излучения количество выживших мышей было в 2 и 1.5 раза больше на 30 и 35-е сутки, соответственно.

Как следует из полученных нами данных, ВИД излучение в дозе  $38.4 \text{ Дж/см}^2$  достоверно тормозит рост опухолей только в поздние сроки после прививки. Поскольку в случаях применения ВИД-ИК света эффективная доза была значительно ниже ( $4.8 \text{ Дж/см}^2$ ), а торможение роста опухолей было более выражено, чем при использовании ВИД света, дальнейшие эксперименты проводили с использованием только этого вида излучения.

## ВИД-ИК



## ВИД

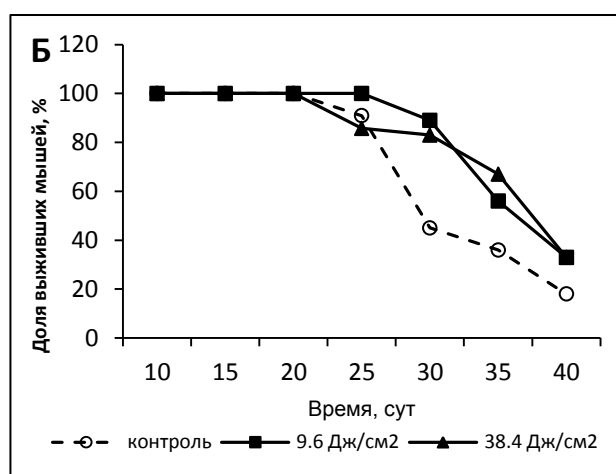
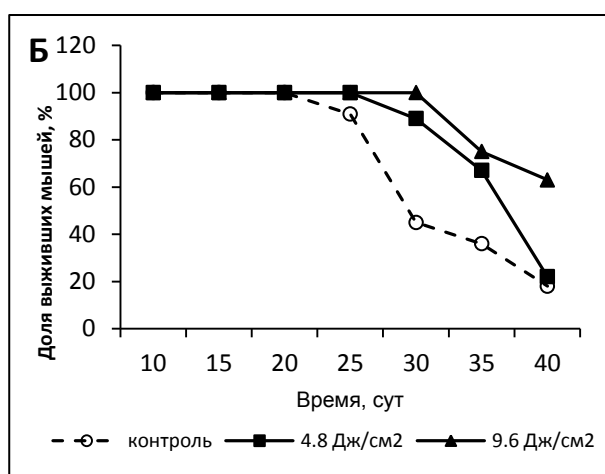
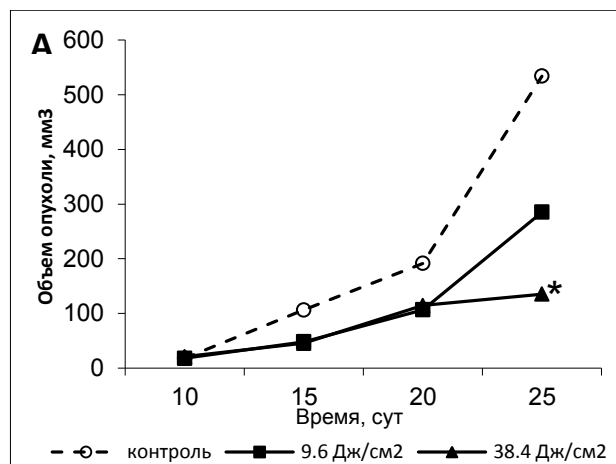


Рисунок 1. Динамика роста опухолей (А) и выживаемость мышей (Б) после облучения мышей-опухоленосителей ВИД-ИК светом в дозах 4.8 Дж/см<sup>2</sup> и 9.6 Дж/см<sup>2</sup> и ВИД светом в дозах 9.6 Дж/см<sup>2</sup> и 38.4 Дж/см<sup>2</sup>.

\*отличие от контроля достоверно,  $p \leq 0.05$ .

Из литературы известно, что излучение с длинами волн 400–650 нм способно проникать только через эпидермис и дерму (Kolari et al., 1993). На рис. 2 видно, что излучение с длинами волн от 650 до 1350 нм проникает в ткани гораздо глубже, до нескольких мм. (Brown et al., 2004), что может объяснить большую эффективность ВИД света в сочетании с ИК.

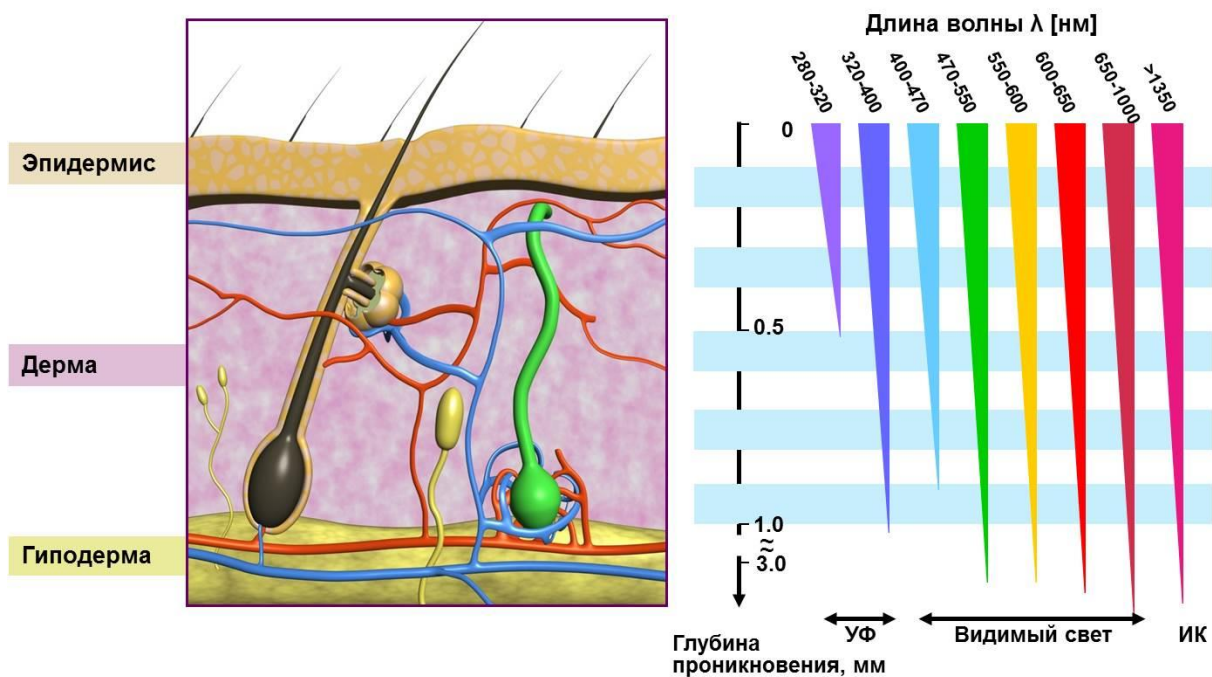


Рисунок 2. Глубина подкожного проникновения излучения различных длин волн (по: Begic-Rahic et al., 2010).

**Действие ВИД-ИК излучения на опухолевые клетки *in vitro* с последующей их прививкой интактным мышам. Оценка прививаемости облученных клеток, скорости роста опухолей и выживаемости животных.** Причины торможения роста опухолей у облученных мышей могут быть различными. С одной стороны, возможно прямое воздействие ВИД-ИК излучения на опухолевые клетки, с другой – стимулирующее действие этого излучения на иммунитет животных. Прямое действие ВИД-ИК излучения на опухолевые клетки при транскутанном облучении опухолевого узла может приводить к их повреждению, замедлению их пролиферации, либо к улучшению их распознавания клетками иммунной системы в связи с изменением их примембранных компонентов. В связи с этим, в следующих опытах моделировали действие ВИД излучения в сочетании с ИК на опухолевые клетки в условиях *in vitro*.

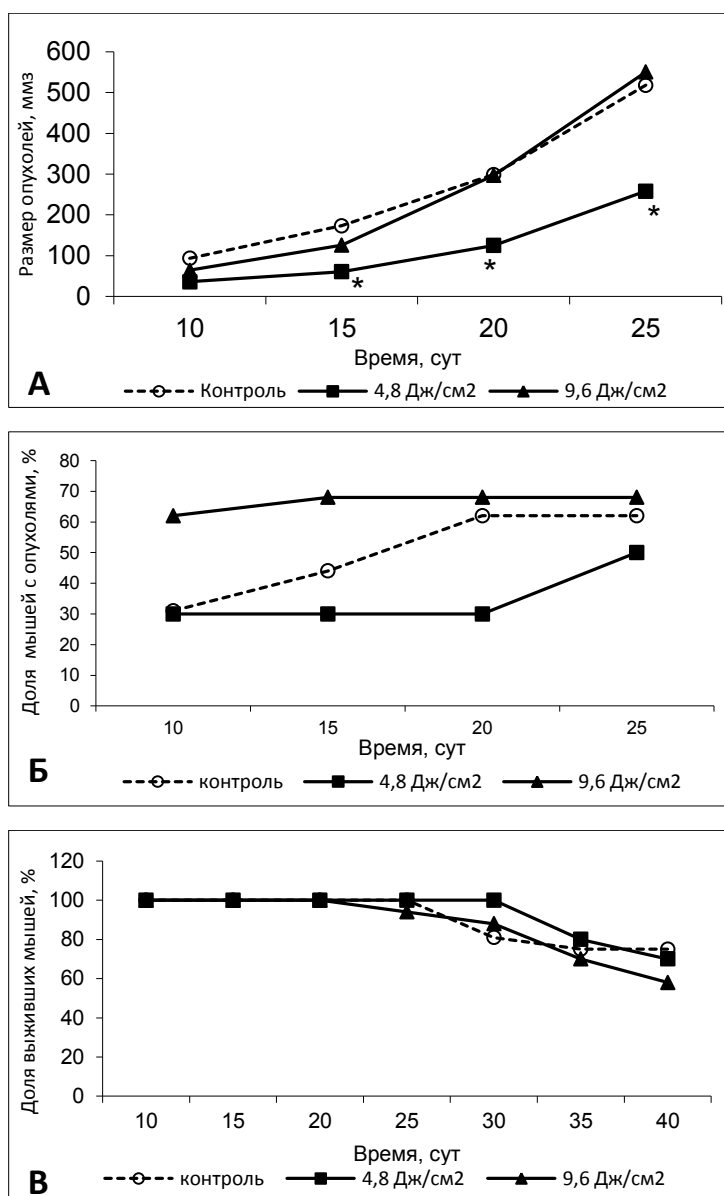


Рисунок 3. Динамика роста опухолей (А), прививаемость клеток МГ-22а (Б) и выживаемость животных (В) после инъекции мышам интактных (контроль) клеток и клеток, облученных ВИД-ИК светом в дозах 4.8 Дж/см<sup>2</sup> и 9.6 Дж/см<sup>2</sup>.

\*отличие от контроля достоверно,  $p \leq 0.05$ .

Клетки МГ-22а за 24 ч до трансплантации мышам облучали ВИД-ИК светом в дозах 4.8 и 9.6 Дж/см<sup>2</sup>. При имплантации мышам клеток, облученных в дозе 4.8 Дж/см<sup>2</sup>, наблюдали торможение роста опухоли в течение первых 25 сут в 2.5-3 раза по сравнению с контролем (рис. 3А). Облучение перед имплантацией клеток в дозе 9.6 Дж/см<sup>2</sup> не влияло на скорость роста опухолей.

Прививаемость оценивали по количеству животных с опухолями. При облучении прививаемых клеток в дозе 4.8 Дж/см<sup>2</sup> количество мышей с опухолями на 15-20-е сут составило 30 % и было в 1.5-2 раза ниже, чем в контроле, в то время как при облучении в дозе 9.6 Дж/см<sup>2</sup> количество мышей с опухолями составило 60 % уже на 10-е сут. Несмотря на

различия в прививаемости в ранние сроки, к двадцать пятым суткам различий в прививаемости облученных и необлученных клеток не наблюдали (рис. 3Б). Облучение ВИД-ИК светом клеток МГ-22а не влияло на выживаемость животных.

**Влияние ВИД-ИК излучения на жизнеспособность и пролиферацию клеток гепатомы мыши МГ-22а.** Одной из возможных причин снижения туморогенности клеток МГ-22а после их облучения ВИД-ИК светом может быть замедление пролиферации клеток. Для проверки этого предположения в экспериментах *in vitro* исследовали распределение клеток по фазам клеточного цикла в двух вариантах эксперимента и в контроле, через 24 ч после облучения в дозах 4.8 и 9.6 Дж/см<sup>2</sup>. Оказалось, что доля клеток в каждой фазе цикла остается в одних и тех же пределах (рис. 4). Облучение клеток гепатомы ВИД-ИК светом достоверно не влияет на гибель клеток МГ-22а в течение 24–72 ч после облучения.

Эти данные свидетельствуют о том, что облучение ВИД-ИК светом в исследованных дозах не обладает цитостатическим цитотоксическим действием в отношении клеток МГ-22а.

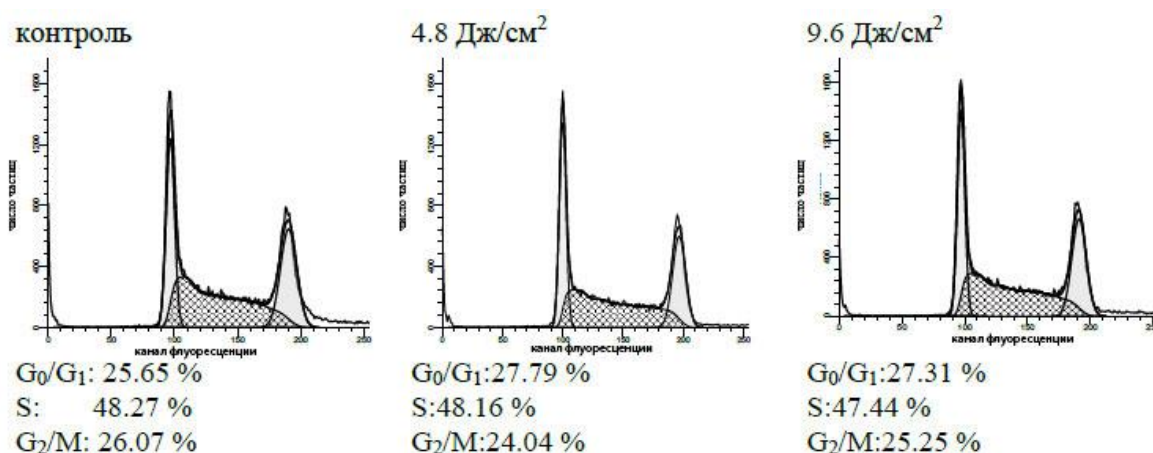


Рисунок 4. Влияние ВИД-ИК излучения на прохождение фаз клеточного цикла клетками МГ-22а через 24 ч после их облучения ВИД-ИК светом в дозах 4.8 Дж/см<sup>2</sup> и 9.6 Дж/см<sup>2</sup>.

**Влияние ВИД-ИК на чувствительность клеток гепатомы мыши МГ-22а к лизису НК-клетками.** Повышение чувствительности клеток МГ-22а к лизису клетками иммунной системы также может быть связано со снижением их туморогенности. В этой связи исследовали, как ВИД-ИК излучение в дозах 4.8 и 9.6 Дж/см<sup>2</sup> влияет на чувствительность клеток гепатомы МГ-22а к их лизису НК-клетками, являющимися эффекторами естественного противоопухолевого иммунитета.

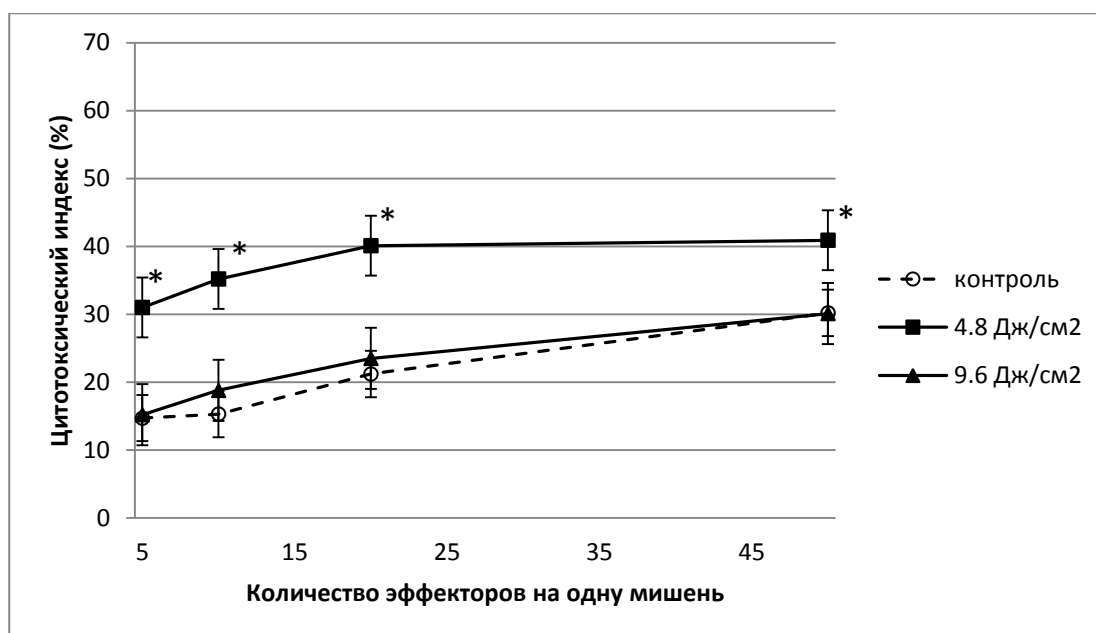


Рисунок 5. НК-активность спленоцитов мышей в отношении клеток МГ-22а, необлученных (контроль) и облученных ВИД-ИК светом в дозах 4.8 Дж/см<sup>2</sup> и 9.6 Дж/см<sup>2</sup>.

\*отличие от контроля достоверно,  $p \leq 0.05$ .

Облучение клеток ВИД-ИК светом в дозе 4.8 Дж/см<sup>2</sup> приводило к достоверному увеличению лизиса МГ-22а при всех соотношениях эффекторов и мишеней в диапазоне 5:1-50:1. Облучение в дозе 9.6 Дж/см<sup>2</sup> не сопровождалось увеличением чувствительности клеток к лизису НК-клетками (рис. 5). Изменение чувствительности клеток МГ-22а к НК-лизису согласуется со снижением их туморогенности после облучения клеток в дозе 4.8 Дж/см<sup>2</sup>.

**Влияние ВИД-ИК излучения на сорбцию альцианового синего (АС) клетками гепатомы МГ-22а.** Изменение примембранных компонентов клеток (гликокаликса) гепатомы МГ-22а может быть причиной изменения их чувствительности к лизису НК-клетками. В современной литературе существует множество данных, указывающих на значительную роль гликозидов, представленных на клеточной поверхности, в распознавании опухолевых клеток НК-клетками. Показано как позитивное, так и негативное влияние различных гликозидов на опосредованную НК-клетками цитотоксичность. Известно, что при формировании опухолевого узла происходят изменения в структуре углеводов на поверхности клеток. Однако до сих пор не ясно, углеводные составляющие каких гликопротеинов или гликолипидов приводят к изменению чувствительности опухолевых клеток к НК-лизису (Коваленко и др., 2004).

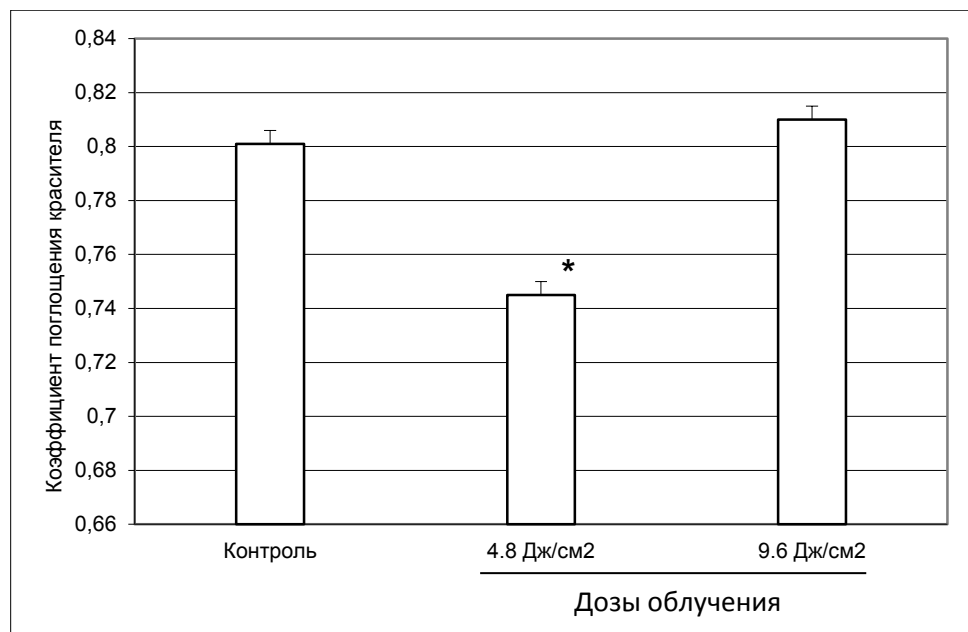


Рисунок 6. Сорбция красителя альцианового синего (АС) клетками МГ-22а интактными (контроль) и облученными ВИД-ИК светом в дозах 4.8 Дж/см<sup>2</sup> и 9.6 Дж/см<sup>2</sup>. \*отличие от контроля достоверно,  $p \leq 0.05$ .

Степень выраженности гликокаликса оценивали по количеству сорбированного клеточной поверхностью АС. Этот краситель не проникает ни в живые, ни в мертвые клетки и окрашивает только внешние примембранные компоненты клетки пропорционально содержанию в них гликопротеинов и кислых мукополисахаридов (Крыленков и др., 1977). Оказалось, что облучение клеток гепатомы МГ-22а ВИД-ИК светом в дозе 4.8 Дж/см<sup>2</sup> приводило к достоверному уменьшению поглощения АС гликокаликсом клеточной поверхности, а значит, и существенному уменьшению объема гликокаликса. При облучении опухолевых клеток в дозе 9.6 Дж/см<sup>2</sup> отличий от контроля не наблюдалось (рис. 6). Полученные данные хорошо согласуются с тем, что именно при облучении в дозе 4.8 Дж/см<sup>2</sup> наблюдалось как торможение роста опухоли, с одной стороны, так и увеличение чувствительности клеток гепатомы к литическому действию НК-клеток – с другой.

**Оценка экспрессии ламинина в клетках гепатомы МГ-22а после облучения ВИД-ИК светом.** Одной из молекул, ассоциированных с мембраной и участвующих в процессах распознавания НК-клетками клеток-мишеней, является ламинин. Наличие ламинина на поверхности клеток гепатомы, в отличие от нормальных гепатоцитов подтверждено ранее (Тюряева и др., 2005, Филатова и др., 2008). В нашей работе показано, что при облучении клеток гепатомы мыши ВИД-ИК излучением в дозе 4.8 Дж/см<sup>2</sup> происходит повышение экспрессии ламинина в клетках гепатомы МГ-22а. Облучение в дозе 9.6 Дж/см<sup>2</sup> не влияло на синтез ламинина (рис. 7). Продемонстрированное в нашей работе увеличение синтеза



ламинина в клетках МГ-22а сопровождалось улучшением их распознавания НК-клетками, снижением сорбции АС гликокаликсом этих клеток и снижением их туморогенности.

По-видимому, снижение сорбционной способности гликокаликса может быть связано с тем, что рецепторы к ламинину на поверхности опухолевых клеток становятся более “доступны”, что и способствует распознаванию клеток-мишеней НК-клетками (Филатова и др., 2008). Из литературы известно, что на поверхности НК-клеток присутствуют рецепторы к ламинину – VLA-6 и VLA-3. Увеличение экспрессии ламинина-1 на поверхности опухолевых клеток также может быть причиной лучшего распознавания клеток-мишеней НК-клетками. (Rabinowich, 1993). С другой стороны, уменьшение объема гликокаликса также может служить причиной лучшего распознавания НК-клетками клеток гепатомы. Кроме того уменьшение объема гликокаликса позволяет предположить, что происходит “демаскирование” ламинина. Полученные нами данные подтверждают участие ламинина-1 во взаимодействии киллер-мишень.

Известно также, что присутствие ламинина на поверхности опухолевых клеток может приводить к снижению их туморогенности (Sprenger et al., 2008), что подтверждается результатами нашей работы.

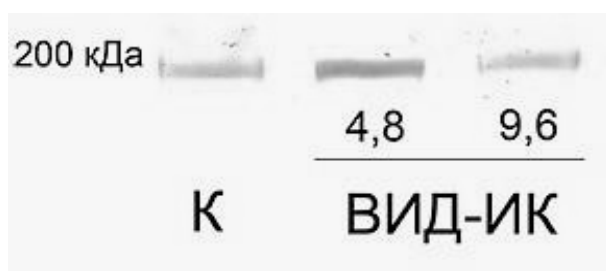


Рисунок 7. Определение содержания ламинина методом иммуноблоттинга в клетках МГ-22а через 24 ч после их облучения ВИД-ИК светом в дозах 4.8 Дж/см<sup>2</sup>, 9.6 Дж/см<sup>2</sup> и без облучения (К).

**Оценка экспрессии Hsp70 в клетках гепатомы 22а после облучения ВИД-ИК излучением.** Повышенная чувствительность клеток МГ-22а к цитотоксическому действию НК-клеток может быть связана с транслокацией Hsp70 на поверхность этих клеток. Можно предположить, что полихроматический свет является стрессовым фактором для клеток МГ-22а, приводящим к повышению экспрессии Hsp70 в цитоплазме клеток и их экспорту на поверхность, что, согласно имеющимся данным, может увеличить их распознавание НК-клетками (Kovalenko et al., 2012). Для проверки этого предположения, мы провели выявление Hsp70 в цитоплазме и на поверхности клеток МГ-22а. Удалось обнаружить, что через 24 ч после облучения клеток во всех используемых в предыдущих опытах дозах (4.8 и 9.6 Дж/см<sup>2</sup>) экспрессия Hsp 70 в цитоплазме клеток не изменялась по сравнению с контролем (клетки без

облучения) (рис. 8). На поверхности необлученных и облученных клеток Hsp70 не обнаруживался (рис. 9). Полученные данные свидетельствуют о том, что снижение туморогенности опухолевых клеток МГ-22а и улучшение их распознавания НК-клетками не связано со стрессорным воздействием ВИД-ИК излучения.

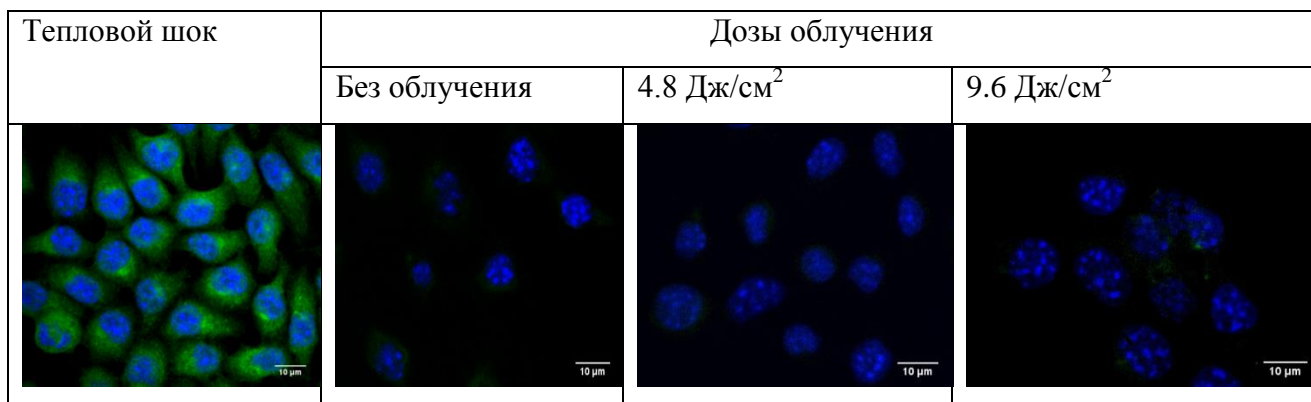


Рисунок 8 Выявление содержания Hsp70 в цитоплазме клеток МГ-22а через 24 ч после их облучения ВИД-ИК светом.

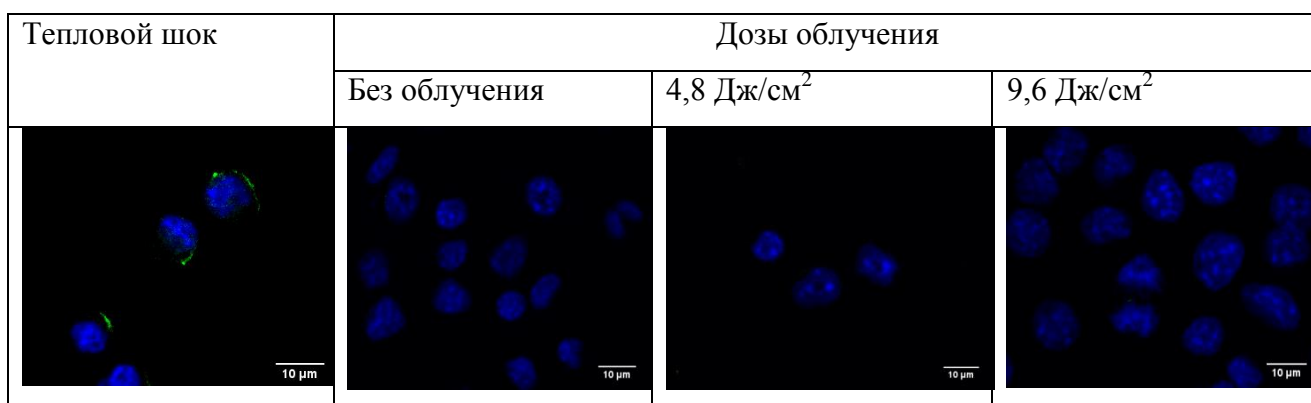


Рисунок 9 Выявление содержания Hsp70 на поверхности клеток МГ-22а через 24 ч после их облучения ВИД-ИК светом.

## ВЫВОДЫ

1. Видимое излучение и видимое излучение в сочетании с инфракрасным тормозит рост опухоли гепатомы МГ-22а у мышей-опухоленосителей.
2. Облучение клеток МГ-22а видимым светом в сочетании с инфракрасным с последующей прививкой их мышам, приводит к снижению прививаемости клеток, торможению роста опухолей и к увеличению выживаемости животных.
3. Снижение туморогенности клеток гепатомы МГ-22а, облученных видимым светом в сочетании с инфракрасным, не обусловлено изменением жизнеспособности и пролиферативной активности клеток МГ-22а.
4. Снижение туморогенности клеток МГ-22а, облученных видимым светом в сочетании с инфракрасным, коррелирует с увеличением их чувствительности к лизису НК-клетками.

5. Изменение туморогенности клеток МГ-22а, облученных видимым светом в сочетании с инфракрасным, и их чувствительность к НК-лизису обусловлены изменением состояния гликокаликса клеток гепатомы и связаны с увеличением синтеза ламинина-1.
6. Увеличение чувствительности клеток МГ-22а к НК-лизису, обуславливающее снижение их туморогенности, не связано с увеличением экспрессии стрессорного белка Hsp70 и его транслокацией на поверхность клеток.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Knyazev N.A.**, Samoiloва K.A., Filatova N.A., Galactionova A.A. Low power visible and near IR light in experimental oncology. South Africa, Johannesburg, The World Association of Laser Therapy Conference programme and abstract. 2008, p. 163.
2. **Knyazev N.A.**, Samoiloва K.A., Filatova N.A., Galactionova A.A. Low power visible and near IR light in experimental oncology. Laser in medical sciences. 2008, vol. 23, p. 33.
3. Зимин А.А., **Князев Н.А.**, Жеваго Н.А., Филатова Н.А., Самойлова К.А. Экспериментальное и клиническое обоснование применения низкоинтенсивного видимого и ближнего инфракрасного света в онкологии. Нелекарственная медицина. 2009, № 2, с. 33-34.
4. Filatova N.A., **Knyazev N.A.**, Samoiloва K.A. Exposure to visible and near ir light of tumor cells in vitro enhances their sensitivity to cytolytic activity of natural killers. Laser therapy. 2009, vol 18, № 4, p. 289.
5. Filatova N.A., **Knyazev N.A.**, Samoiloва K.A. Low power polychromatic (visible + near IR) light elevates sensitivity of tumor cells to cytolytic activity of natural killers. Laser in medical sciences. 2009, vol. 24, S27-S28.
6. **Knyazev N.A.**, , Samoiloва K.A., Filatova N.A. Low power visible and polychromatic (visible + near ir) light enchances sensitivity of tumor cells to cytolytic activity of natural killers. Abstracts of Laser Helsinki 2010 Congress. 2010, S25-S26.
7. **Knyazev N.A.**, Samoiloва K.A., Filatova N.A. Antitumor efficacy and oncological safety of low power visible and near IR light in laboratory animals with transplanted tumors. Laser Europe 2010 pr. Final. Res. 2010, p. 42.
8. Филатова Н.А., **Князев Н.А.**, Самойлова К.А. Низкоинтенсивное полихроматическое видимое и ближнее инфракрасное излучение повышают чувствительность опухолевых клеток к цитотоксической активности спленоцитов мышей. Вопросы онкологии. 2010. Приложение. 2010, с. 50.
9. Kosheverova V.V., **Knyazev N.A.**, Filatova N.A., Samoiloва K. A. Deceleration of tumor growth after irradiation of tumor-bearing mice and transplanted tumor cells with

- polychromatic visible and infrared light Abstracts of Laser Helsinki 2012 International Congress. 2012, S5.
10. **Князев Н.А.**, Кошеверова В.В., Самойлова К.А., Филатова Н.А. Влияние полихроматического видимого и инфракрасного света на пролиферацию и туморогенность клеток мышинной гепатомы 22А. III Съезд общества клеточной биологии. Санкт-Петербург. Цитология. 2012, Т. 54, № 9, с. 685.
  11. Филатова Н.А., **Князев Н.А.**, Кладиев А. А, Иванов В. А. Экспериментальная проверка противоопухолевой активности проспидина в модельных экспериментах на мышах. III Съезд общества клеточной биологии. Санкт-Петербург. 2012 Цитология. Т. 54, № 9, с. 712.
  12. **Knyazev N.A.**, Samoilova K.A., Filatova N.A., Galactionova A.A. Effect of polychromatic visible light on proliferation of tumor cells under conditions in vitro and in vivo - after implantation to experimental animals. American Institute of physics. Proc. 2009, vol. 1142, p. 79-86.
  13. Самойлова К.А., **Князев Н.А.**, Зимин А.А., Филатова Н.А., Галактионова А.А. Влияние низкоинтенсивного видимого и ближнего инфракрасного излучения на имплантированные опухоли у лабораторных животных. Фотобіологія та фотомедицина. 2009, № 4 с. 6-18.
  14. **Князев Н.А.**, Самойлова К.А., Зимин А.А. Лазерное излучение видимого и ближнего инфракрасного диапазона при опухолевой патологии (анализ экспериментальных исследований) Физиотерапия, бальнеология и реабилитация 2010, № 6. с. 50-56.
  15. **Князев Н.А.**, Самойлова К.А., Филатова Н.А. Пролиферация и туморогенность клеток гепатомы мыши, облученных полихроматическим видимым и инфракрасным светом. Цитология. 2012, Т. 54, № 10, с. 767-773.
  16. Филатова Н.А, **Князев Н. А.**, Кошеверова В. В., Шатрова А. Н. Самойлова К.А. Влияние облучения полихроматическим видимым и инфракрасным светом на туморогенность клеток мышинной гепатомы 22а и их чувствительность к лизису естественными киллерами. Цитология. 2013, Т. 55, № 7, с. 501-506.
  17. Самойлова К. А., Филатова Н. А., **Князев Н.А.** Полихроматический видимый и инфракрасный свет, близкий к солнечному (480-3400 нм), тормозит рост злокачественных опухолей у мышей: эффекты и некоторые механизмы. Материалы XXXX международной научно-практической конференции “Применение лазеров в медицине и биологии”. 2013, с.156-157.
  18. Зимин А.А., **Князев Н.А.**, Жеваго Н.А., Филатова Н.А., Самойлова К.А. Экспериментальное и клиническое обоснование применения низкоинтенсивного

видимого и ближнего инфракрасного излучения в онкологии. Материалы XXXIV международной научно-практической конференции “Применение лазеров в медицине и биологии”. 2009, с. 23-24.

## СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. AlGhamdi K.M., Kumar A., Moussa N.A. 2012. *Lasers Med. Sci.* 27(1):237-49.
2. Aubin F., 2003. *Eur. J. Dermatol.* 13(6):515-23.
3. Begic-Rahic J., Vranic S. 2010. *European Dermatology* 5:57–60.
4. Gao X., Chen T., Xing D., Wang F., Pei Y., Wei X. 2006. *J. Cell Physiol.* 206:441-448
5. Hashimoto Y., Sudo H. 1971. *Gann.* 62:139-143.
6. Karu T.I., Kalendo G.S., Letokhov V.S., Lobko V.V. 1982. *Novo Cimento, Vol. 3D(2):*319-324.
7. Karu T.I., Kolyakov S.F. 2005. *Photomed and laser surgery* 23:355-361.
8. Kolari P. J., Airaksinen O. 1993. *Acupunct. Electrother. Res.* 18:17.
9. Kovalenko E., Kanevskiy L., Klinkova A., Kuchukova A., Streltsova M., Telford W., Sapozhnikov A. 2012. *Cell Interaction, Dr. Sivakumar Gowder (Ed.)* 322.
10. Kripke M.L., 1990. *J. Natl. Cancer Inst.* 82(17):1392-6.
11. Lanier L.L. 2005. *Annu. Rev. Immunol.* 23:255-274.
12. Liu Y.H., Cheng C.C., Ho C.C., Pei R.J., Lee K.Y., Yeh K.T., Chan Y., Lai Y.S. 2004. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 115:185-201.
13. Novoselova E G., Glushkova O.V., Cherenkov D.A., Chudnovsky V.M., Fesenko E.E. 2006. *Photodermatol. photoimmunol. photomed.* 22:33-38.
14. Pinheiro A.L.B., Nascimento S.C., Vieira A.L.B., Rolim A.B., Silva P.S., Brugnera A. 2002. *Braz. Dent. J.* 13:109-112.
15. Posten W., Wrone D.A., Dover J.S., Arndt K.A., Silapunt S., Alam M. 2005. *Dermatol. Surg.* Mar. 31(3):334-40.
16. Rabinowich H., Sedlmayr P., Herberman R.B., Whiteside T. 1993. *J. of immun.* 150(11):4844-4855.
17. Renno A.C., McDonnell P.A., Parizotto N.A., Laakso E.L. 2007. *Photomed. Laser Surg.* 25:275-280.
18. Samoiloва K.A., Zhevago N.A., Menshutina M.A., Grigorieva N.B. 2008. *Photomed. and laser surgery.* 26(5):433-442.
19. Sprenger C.C.T., Drivdahl R. H., Woodke L.B., Eymann D., Reed M.J., Carter W.G., Plymate S.R. 2008. *Neoplasia.* 10(12):1350-1361.
20. Гельштейн В.И. 1954 *Вопр. Онкологии* 7(1):172-180.
21. Жеваго Н.А., Самойлова К.А., Оболенская К.Д., Соколов Д.И. 2005. *Цитология.* 47(5):450–460.
22. Коваленко Е. И, Хирова Е. В., Молотковская И. М., Овчинникова Т. В., Саблина М. А., Сапожников А. М., Хайдуков С. В., Бовин Н. В. 2004. *М.* 30(3):281-292.
23. Крыленков В. А., Левин В.С., Самойлова К.А. 1979. *Цитология.* 21(2):157-163
24. Тюряева И.И., Миргородская О.А., Черепанова О.А., Подольская Е.П., Серебрякова М.В., Иванов В.А. 2005. *Цитология.* 47(12):1039-1047.
25. Филатова Н. А., Тюряева И. И., Иванов В. А. 2008. *Цитология.* 50 (1):72-78.
26. Хавинсон В.Х., Южаков В.В., Кветной И.М., Малинин В.В. 2001. *Вопросы онкологии.* 47(3):461-466.