

Н.А. Филатова¹, К.А. Самойлова¹, Н.А. Князев^{1,2}

Полихроматический видимый и инфракрасный свет (480-3400 нм) тормозит рост гепатомы МГ22а у мышей

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,²Санкт-Петербургский Академический университет - научно-образовательный центр нанотехнологий РАН

В экспериментах *in vivo* изучали влияние полихроматического видимого (380-750 нм) (ВИД) и видимого сочетанного с инфракрасным (480-3400 нм) (ВИД-ИК) излучения на рост гепатомы у мышей. В первой серии модельных экспериментов на мышах СЗНА с подкожно трансплантированной сингенной гепатомой МГ22а показано 1.5–4 кратное, в зависимости от сроков после прививки, торможение роста опухолей после 5-кратного облучения мышей-опухоленосителей ВИД-ИК светом в дозе 4.8 Дж/см². Облучение мышей ВИД светом в дозах 9.6 Дж/см² и 38.4 Дж/см² фактически не влияло на скорость роста опухолей. При воздействии ВИД и ВИД-ИК света во всех использованных нами дозах наблюдали увеличение выживаемости животных в 1.5 и 2 раза соответственно. Во второй серии экспериментов исследовали действие ВИД-ИК излучения на опухолевые клетки *in vitro* с последующей их прививкой intactным мышам. При имплантации мышам клеток, облученных в дозе 4.8 Дж/см² и 9.6 Дж/см² наблюдали торможение роста опухоли в течение первых 25 сут. в 3-12 раз по сравнению с контролем и увеличение выживаемости мышей в 1.5-2 раза соответственно.

Основные результаты настоящего исследования состоят в том, что ни в одной из использованных доз ВИД и ВИД-ИК излучений не было показано стимуляции роста опухоли как при облучении мышей опухоленосителей, так и при облучении клеток гепатомы МГ22а в условиях *in vitro* перед их трансплантацией intactным мышам. Более того был выявлен диапазон доз облучения ВИД-ИК светом (4.8-9.6 Дж/см²), когда скорость роста гепатомы МГ-22а снижалась, а выживаемость животных увеличивалась.

Ключевые слова: полихроматический видимый и инфракрасный свет, гепатома МГ22а, опухоленоситель

Низкоинтенсивное монохроматическое или узкополосное излучение видимого (ВИД) и инфракрасного (ИК) диапазонов солнечного спектра стало широко применяться в лечебно-

оздоровительных целях после того как в 70-80 гг. прошлого века было обосновано иммуносупрессивное и проканцерогенное действие УФ-облучения, связанное с его повреждающей способностью. По мнению некоторых авторов именно способность УФ-излучения повреждать клетки приводила к его некоторым стимулирующим эффектам за счет запуска репаративных процессов [9,20]. К настоящему времени выявлено поразительное разнообразие эффектов ВИД и ИК излучений на организменном и клеточно-тканевом уровнях и показано, что они могут быть эффективны при заболеваниях различного этиопатогенеза за счет противовоспалительного, иммуномодулирующего ранозаживляющего и анальгезирующего действия [18]. Однако отношение к применению полихроматического и монохроматического излучений, генерируемых фототерапевтическими аппаратами остается сдержанным из-за опасений индукции и (или) стимуляции неопластических процессов за счет известного биостимулирующего действия ВИД и ИК излучений [13,14].

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 [12], так и не оказывать на нее влияния [17,19] и даже угнетать ее [15].

Из литературы известно, что максимальный противоопухолевый эффект обнаруживается или после прямого облучения опухолей [7,16] или места трансплантации опухолевых клеток вскоре после их подкожного введения [2]. В этих работах использовался красный свет He-Ne или рубинового (633 и 694 нм соответственно) лазеров. Как правило, авторы применяли курс облучений различной продолжительности и варьировали дозы облучения от 40 до 70 Дж/см². В некоторых работах подчеркивается, что противоопухолевый эффект облучения регистрируется после его использования в дозах, стимулирующих пролиферативные процессы в организме

животных - заживление кожных ран и гемопоэз [1,4]. Степень подавления роста опухолей различного тканевого генеза была неодинакова и по данным разных авторов варьировала от 16 до 80 % вплоть до их полного исчезновения [1,16].

Исследований о влиянии на рост опухолей ВИД и ИК излучений, генерируемых фототерапевтическими аппаратами ранее не проводилось. Наши исследования были выполнены на модели, в которой культивируемые клетки гепатомы МГ-22а подкожно трансплантировали сингенным мышам линии СЗНА [5]. Использование сингенной опухоли в значительной степени моделирует ситуацию, возникающую при появлении спонтанных опухолей у человека и животных. При исследовании влияния лазерного излучения на опухолевый рост, как правило, облучали животных с уже сформировавшимися опухолями. В нашем исследовании впервые проведено прямое облучение клеток с последующей их перевивкой животным. В настоящей работе была поставлена задача определить как влияет облучение полихроматическим видимым светом на туморогенность опухолевых клеток и выявить роль каждой компоненты полихроматического излучения (ВИД и ИК) в этом процессе.

Материалы и методы

Клетки гепатомы мыши 22А, полученные из банка клеточных культур ИНИЦ РАН культивировали в среде ДМЕМ (Биолот), с добавлением 10% инактивированной эмбриональной сыворотки (SusBIol, Биолот) и 40 мкг/мл содержанием гентамицина (Sigma).

Мышей СЗНА использованных в настоящей работе получали из питомника РАМН "Рапполово".

Трансплантация мышам опухолевых клеток. Мышам перевивали клетки сингенной гепатомы линии МГ22а подкожно в область спины в количестве 2×10^5 клеток на мышью. Появление опухолей, их объем и гибель мышей регистрировали на 10-40 сутки после перевивки. Объем опухолей измеряли каждые 5 сут.

Объем опухолей рассчитывали по формуле

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

L – максимальный диаметр опухоли, мм, D – минимальный диаметр, мм. [6]. Всего в работе использовано около 500 мышей разделенных на группы.

Эксперименты проводили в двух вариантах. В первом мышам трансплантировали необлученные клетки МГ22а. Через 10 сут. после прививки животных делили на пять групп. Группы 1 и 2 подвергали 5-суточному курсу облучений ВИД-светом физиотерапевтическим аппаратом Q-light (385-750 нм, 40 мВ/см²) в дозах 9,6 и 38,4 Дж/см², группы 3 и 4 аппаратом Bioptron (480-3400 нм, 40 мВ/см²) в дозах 4,8, и 9,6 Дж/см². Пятую (контрольную) группу животных облучению не подвергали. Во втором варианте экспериментов облучению ВИД и ВИД-ИК светом в тех же дозах подвергали клетки гепатомы. Через 24 часа после облучения клетки МГ22а трансплантировали мышам подкожно в область спины. Мышам контрольной группы трансплантировали клетки гепатомы без облучения. Про-

вели несколько серий экспериментов в каждом варианте опытов.

Облучение клеток гепатомы производили однократно за сутки до опыта в пластиковых чашках. Перед облучением среду культивирования клеток в чашках заменяли на фосфатно-солевой буфер. Облучение производили с расстояния 10 см в течение 2, 4 и 16 минут, что соответствовало 4,8, 9,6 и 38,4 Дж/см², соответственно. После облучения фосфатно-солевой буфер заменяли на среду ДМЕМ, содержащую гентамицин и эмбриональную сыворотку.

Статистическая обработка. Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Для оценки действия ВИД и ВИД-ИК излучения на опухолевый рост *in vivo* проводили облучение мышей с уже сформировавшимися опухолями. Облучение мышей-опухоленосителей ВИД-ИК светом в дозе 4,8 Дж/см² 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 Дж/см² на этот показатель не влияло (рис. 1А). Облучение мышей ВИД светом в дозе 38,4 Дж/см² достоверно тормозило рост опухолей только на 25 сутки после прививки клеток, тогда как меньшая доза облучения (9,6 Дж/см²) не влияла на скорость опухолевого роста (рис. 1Б).

При облучении ВИД и ВИД-ИК светом во всех использованных нами дозах облучения наблюдали увеличение выживаемости животных. Контрольные необлученные мыши начинали погибать на 5 сут. раньше облученных (на 25-е сут. в контроле и на 30-е сут. после облучения). Для исследованных видов излучения количество выживших мышей было в 2 и 1,5 раза больше на 30-е и 35-е сут., соответственно (рис. 2А,Б).

Как следует из полученных нами данных, облучение мышей ВИД светом в дозе 38,4 Дж/см² достоверно тормозило рост опухолей только в поздние сроки после прививки. Из литературы известно, что терапевтическая доза как ВИД, так и ИК излучения не должна превышать 10 Дж/см² [8]. Поскольку в случае применения ВИД-ИК света эффективная доза была значительно ниже (4,8 Дж/см²), а торможение роста опухолей было более выражено, дальнейшие эксперименты проводили с использованием только этого вида излучения.

Причины торможения роста опухолей у облученных мышей могут быть различными. С одной стороны, возможно стимулирующее действие ВИД-ИК излучения на иммунитет животных, с другой прямое воздействие этого излучения на опухолевые клетки. Прямое действие ВИД-ИК излучения на опухолевые клетки при транскутанном облучении опухолевого узла может приводить к их повреждению и замедлению

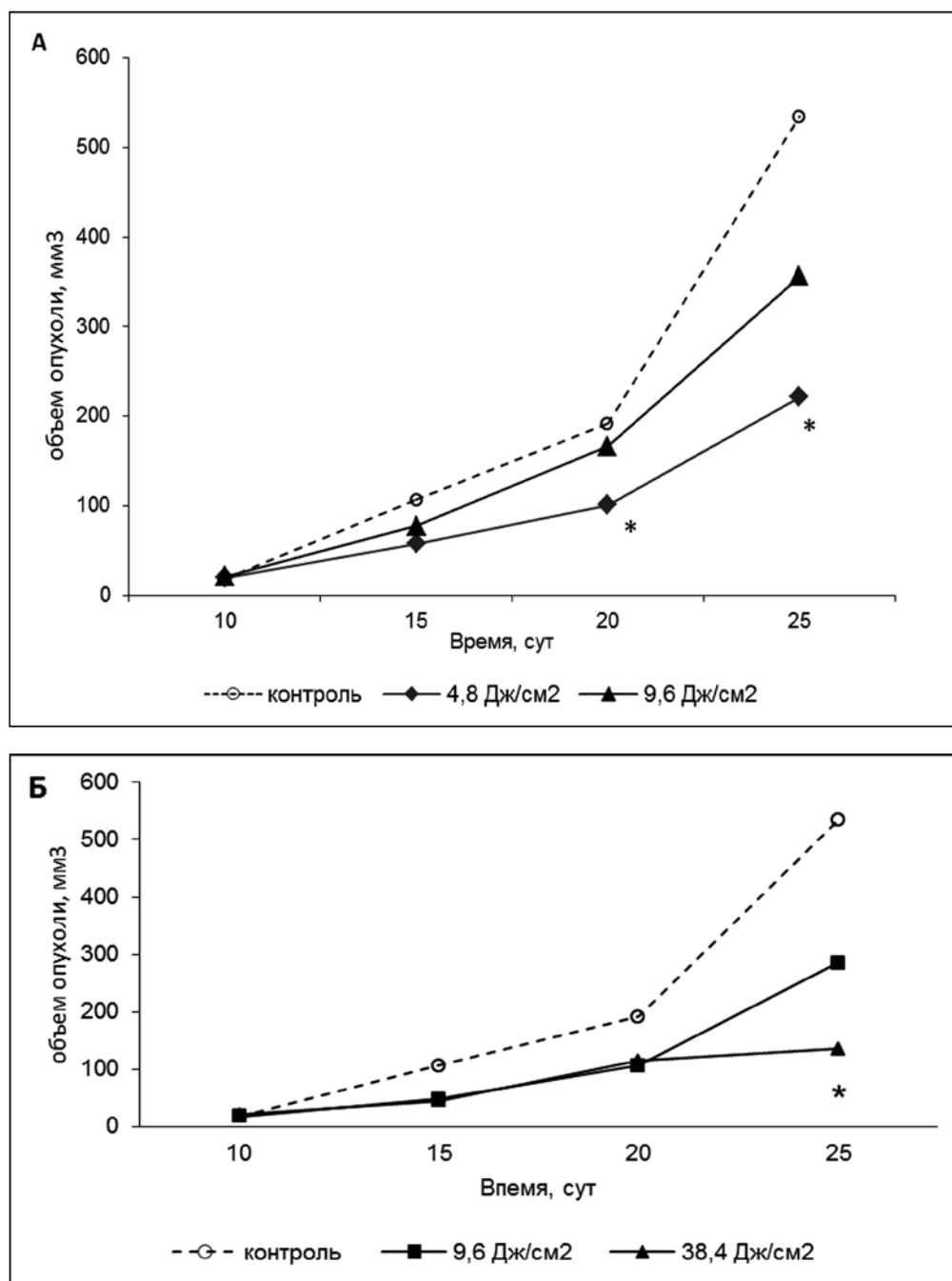


Рисунок 1. Рост опухолей, после облучения мышей опухоленосителей ВИД-ИК (А) и ВИД (Б) светом.
*отличие от контроля достоверно $p \leq 0,05$

пролиферации, и (или) к улучшению их распознавания клетками иммунной системы. Хорошо известно, что глубина проникновения лазерного излучения зависит от длины волны, интенсивности и биологических параметров ткани-мишени. Непосредственное воздействие на опухолевые клетки находящиеся под кожей возможно, так как часть длин волн, входящих в состав излучения обоих использованных источников проникает достаточно глубоко через ткани [10]. В связи с этим, в следующих опытах моделировали действие ВИД-ИК излучения на опухолевые клетки в условиях *in vitro*.

Клетки МГ-22а за 24 час. до трансплантации мышам облучали ВИД-ИК светом. При имплантации мышам опухолевых клеток, облученных в дозе 4,8 Дж/см² 9,6 Дж/см² наблюдали торможение роста опухолей в течение первых 25 сут. в 3-12 раз по сравнению с контролем (рис. 3 А).

Облучение двумя исследованными дозами ВИД-ИК света клеток МГ-22а перед их трансплантацией увеличивало выживаемость животных. Полученные данные оказались сходными с таковыми после облучения животных с привитыми опухолями. Животные начинали погибать на 5-10 сут. позже чем в контроле, а количество

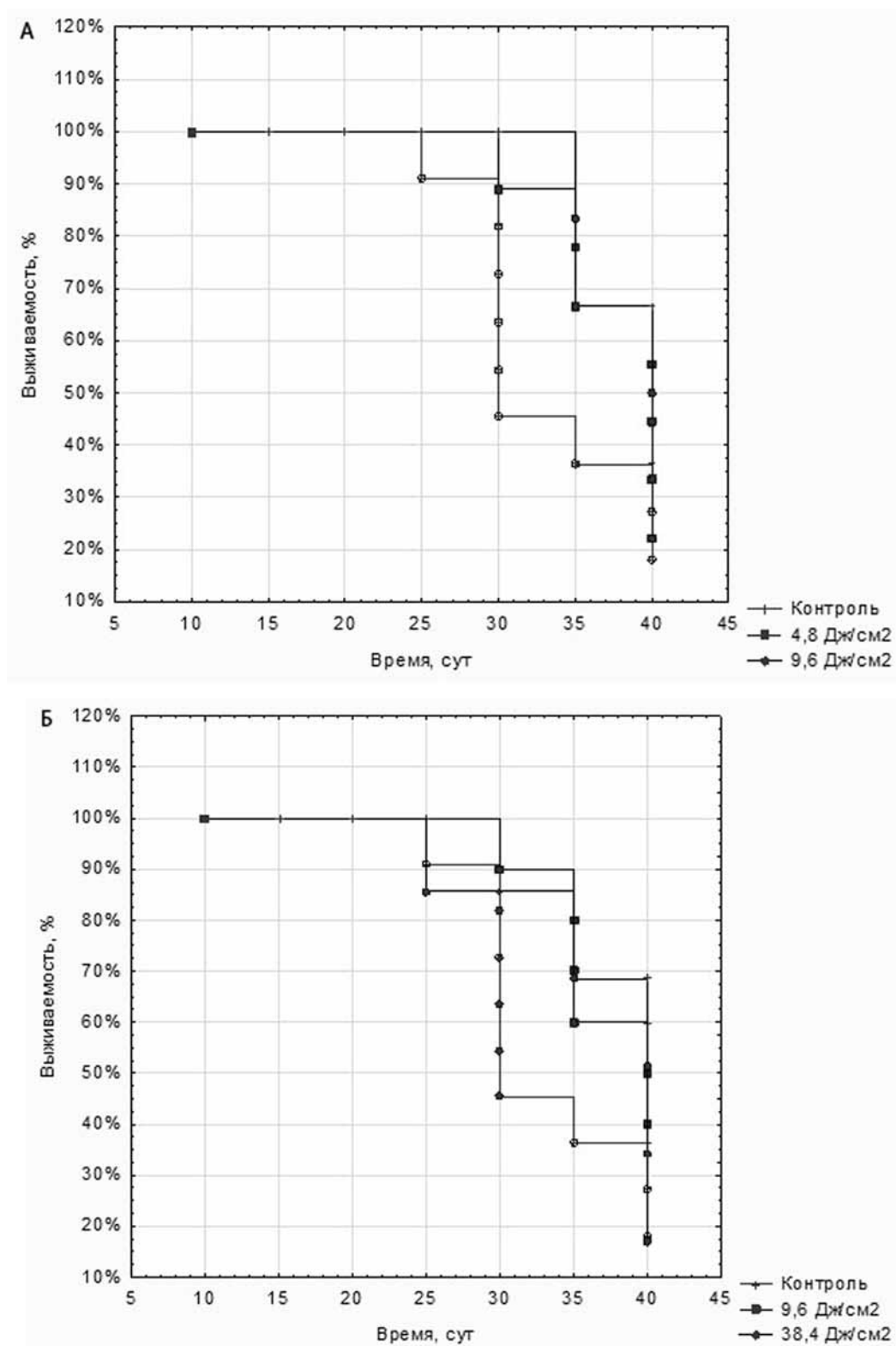


Рисунок 2. Выживаемость мышей опухоленосителей после их облучения ВИД-ИК (А) и ВИД (Б) светом.

выживших мышей было в 1,5-2 раза больше на 35-е и 40-е сут. соответственно (рис. 3 Б).

В отличие от исследователей, изучавших влияние ВИД и ИК света на опухолевый процесс в эксперименте, во второй серии опытов мы не облучали опухоли у животных *in situ*, когда, по

мнению некоторых авторов, возможны как частичная деструкция опухолевых клеток, так и реактивные изменения со стороны окружающих опухоли структурных элементов эпидермиса и дермы [3]. Цель нашего исследования состояла в изучении показателей опухолевого роста после

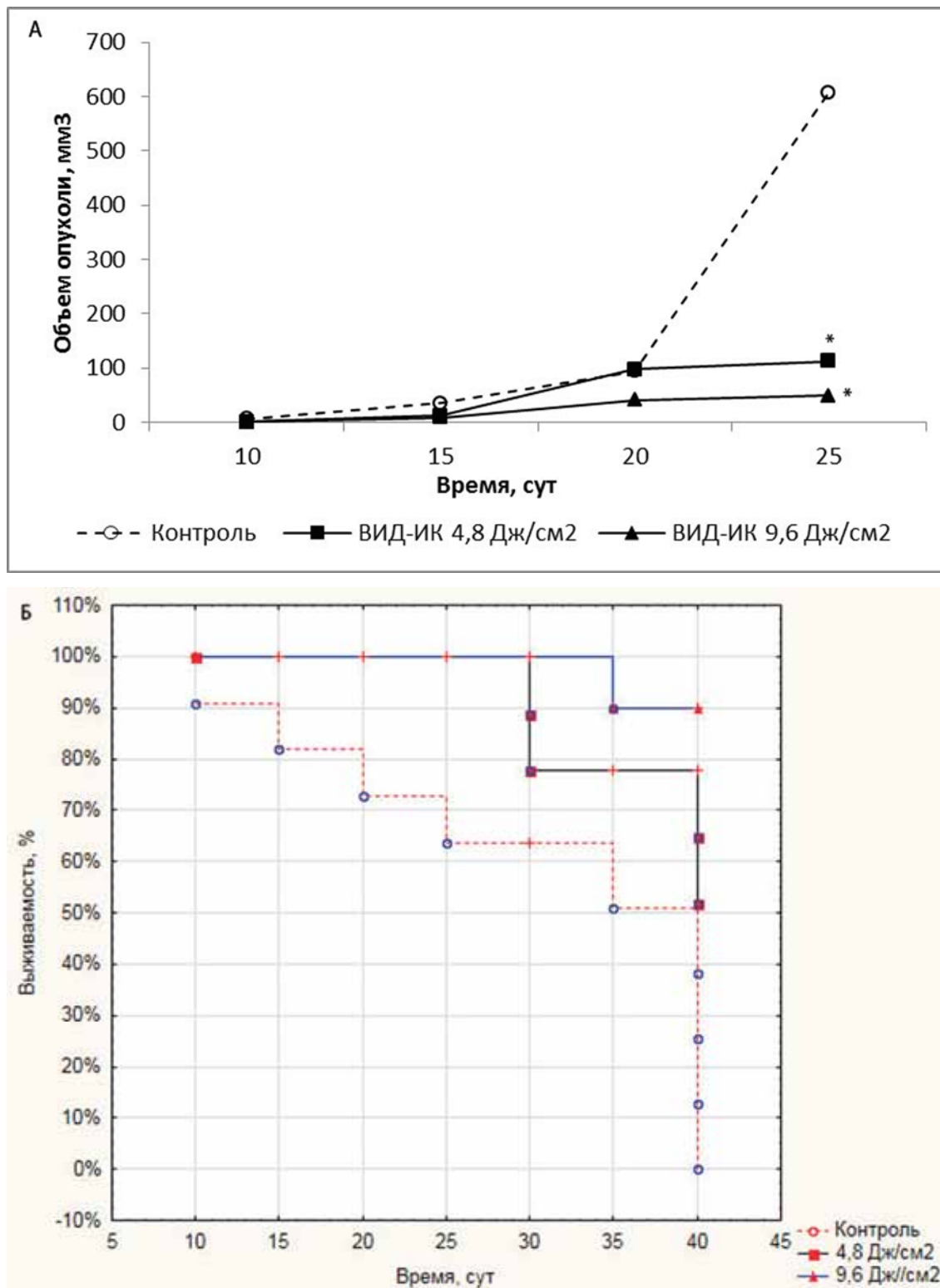


Рисунок 3. Рост опухолей (А), и выживаемость животных (Б) после инъекции мышам интактных (контроль) и облученных ВИД-ИК светом клеток МГ22а. *отличие от контроля достоверно $p \leq 0,05$

воздействия света только на сами опухолевые клетки. Полученные в нашей работе данные согласуются с рядом работ, в которых проводили облучение места трансплантации клеток сразу после их пересадки. В этих работах показано тор-

можение скорости роста опухолей в результате облучения [1,4,7,16].

Между тем в последние годы появились новые данные о стимулирующем влиянии красного лазерного излучения (660 нм) на рост экспериментальных опухолей меланомы В16. В группе

мышей облученных в дозе 1050 Дж/см² наблюдали достоверное возрастание объема опухолей и нарушение кровоснабжения опухолеассоциированных тканей. Облучение тем же лазером в дозе 150 Дж/см² не приводило к каким либо изменениям [11].

Гораздо более однозначные результаты были получены при изучении влияния ближнего ИК излучения (750–1500 нм) на показатели опухолевого роста у лабораторных животных. Во всех известных нам работах сообщается о выраженном противоопухолевом действии различных длин волн этой части спектра, применяемой преимущественно в импульсном режиме во избежание нагрева тканей. Однонаправленность действия этого излучения регистрировалась на опухолях различного гистогенеза как при высоких суммарных дозах облучения (400–1000 Дж/см²), так и при очень низких (0,3–0,46 Дж/см²), причем и при однократном, и при многократном применении. После облучения неодимовым лазером (1060 нм) рост опухоли Эрлиха у мышей тормозился на 18 %, а рост пигментированных опухолей (меланом В-16 и Гардинг-Пасси) - на 65-70 %. Согласно данным Теплова с сотрудниками [4], противоопухолевое действие 5-дневного курса облучения ближним ИК-светом (890 нм) трансплантированных опухолей у мышей было гораздо более значительным, чем действие такого же курса красного света HeNe-лазера, применяемого в терапевтических дозах. Максимальное противоопухолевое действие этого излучения достигалось при облучении места трансплантации опухолевых клеток в самые ранние сроки после их введения.

Итак, в свете приведенных выше данных литературы можно предполагать, что противоопухолевое действие примененного в нашей работе сочетанного полихроматического ВИД-ИК света может быть индуцировано красным и зеленым ВИД светом, но не синим, поскольку коротковолновая компонента ВИД-спектра в использованном нами ВИД-ИК излучении (480-3400 нм) отсутствовала. Описанный в ряде работ значительный противоопухолевый потенциал ближнего ИК-излучения позволяет понять, почему торможение роста опухолей достигается в случае сочетанного ВИД-ИК излучения при использовании гораздо меньших доз, чем при воздействии одного лишь ВИД-излучения.

ЛИТЕРАТУРА

- Бондарь П.М., Лазарев И.Р., Киндзельский Л.П. Применение методов и средств лазерной техники в биологии и медицине: Труды Всесоюз. конф. – Киев: «Наукова думка», – 1981 – С. 67 – 68.
- Зырянов Б.Н. Евтушенко В.А., Кицманюк З.Д. Низкоинтенсивные лазеры в онкологии. – Томск. - 1998. – С. 123-215.
- Плетнев С.Д. Влияние низкоэнергетического лазерного излучения на нормальную кожу и некоторые опухолевые ткани // Изв. АН СССР. - 1985. - № 1 – С. 134-136.
- Теплов Л.А., Соколов В.В., Морозов Н.Б. Сборник научных трудов «Новое в онкологии», вып.1. – Москва. - 1995. – С.82 – 85.
- Филатова Н. А., Тюреева И. И., Иванов В. А. Распознавание и лизис естественными киллерами опухолевых клеток при участии ламинина // Цитология. - 2008. – Т. 50 (1). – С. 72-78.
- Хавинсон В.Х., Южаков В.В., Кветной И.М., Малинин В.В. Влияние эпителиона на кинетику роста и функциональную морфологию саркомы М-1 // Вопр. онкол. - 2001. – Т. 47 (3). – С. 461-466.
- Abe M., Fujisawa K., Suzuki H. et al. Role of 830 nm low reactive level laser on the growth of an implanted glioma in mice // Keio J. Med. - 1993. - Vol. 42. – P. 177-179.
- AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. 2012 Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells // Lasers Med Sci. – 2012. – Vol. 27 (1). – P. 237-249
- Aubin F. Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression // Eur J. Dermatol. – 2003. — Vol. 13 – N. 6 – P. 515-523.
- Begic-Rahic J Vranic S The Application of Bioptron Light Therapy in Dermatology and Wound Healing // European Dermatology – 2010. – Vol. 5 – P. 57-60.
- Frigo L., Luppi J., Favero G.M. et al. The effect of low-level laser irradiation (In-Ga-Al-AsP - 660 nm) on melanoma in vitro and in vivo // BMC Cancer – 2009. - Vol. 9 – P. 404-411.
- Gao X., Chen T., Xing D. et al. Single cell analysis of PKC activation during proliferation and apoptosis induced by laser irradiation // J. Cell Physiol. – 2006. - Vol. 206. - P. 441- 448.
- Karu T. I., Kalendo G. S., Letokhov V. S., Lobko V. V. Biostimulation of HeLa cells by low-intensity visible light // Il Novo Cimento – 1982. - Vol. 1D – N. 6 - P. 828-840.
- Karu T. I., Kalendo G. S., Letokhov V. S., Lobko V. V. Biostimulation of HeLa cells by low-intensity visible light III. Stimulation of nucleic acid synthesis in plateau phase cells. Novo Cimento – 1982. - Vol. 3D – N. 2 - P. 319-324.
- Liu Y.H., Cheng C.C., Ho C.C. et al. Effects of diode 808 nm GaAlAs low-power laser irradiation on inhibition of the proliferation of human hepatoma cells in vitro and their possible mechanism // Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. – 2004. – Vol. 115. – P. 185-201.
- McGuff P.E., Deterling R.A., Gottlieb L.S. et al. The laser treatment of experimental malignant tumors // Canad. Med. Ass. J. - 1964. – Vol. 91 – P. 1089-1095.
- Pinheiro A. L. B., Nascimento S. C., Vieira A. L. B. et al. Does LLLT stimulate laryngeal carcinoma cells? An in vitro study // Braz. Dent. J. – 2002. – Vol. 13 – P. 109-112.
- Posten W., Wrona D.A., Dover J.S. et al. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy // Dermatol Surg. Mar. – 2005. – Vol. 31 – N. 3 – P. 334-340.
- Renno A.C., McDonnell P.A., Parizotto N.A., Laakso E.L. The effect of laser irradiation on osteoblast and osteo-

- sarcoma cell proliferation and differentiation in vitro // Photomed Laser Surg. – 2007. – Vol. 25 – P. 275-280.
20. Sinha R.P., H der D.P. UV-induced DNA damage and repair: a review // Photochem Photobiol Sci. – 2002. – Vol. 1. – N. 4 – P. 225-236.

Поступила в редакцию 23.09.2015 г.

N.A.Filatova¹, K.A.Samoilova¹, N.A.Knyazev^{1,2}

**Polychromatic visible and infrared light
(480-3400 nm) downregulates the growth of
hepatoma MH22a in mice**

¹Institute of Cytology RAS

²St. Petersburg Academic University – Nanotechnology
Research and Education Centre RAS
St. Petersburg

We studied the effect of polychromatic visible (380-750 nm) (VIS) and combined with the visible infrared (480-3400 nm) (VIS-IR) radiation on the growth of hepatoma in mice. In the first series of experiments on C3HA mice with subcutaneously transplanted syngeneic hepatoma MH22a it was shown 1.5-4 times inhibition of tumor volume after irradiation of tumor-bearing mice with VIS-infrared light at a dose 4.8 J/cm². Mice irradiation at doses of 9.6 J/cm² and 38.4 J/cm² had no effect on the rate of tumor growth. Exposition to VIS and IR-light in all doses we used an increase of the survivence of animals in the 1.5 and 2 times respectively was observed. In a second series of experiments we investigated the effect VIS-IR radiation on tumor cells in vitro with subsequent inoculation to intact mice. After implantation in mice irradiated cells at a dose of 4.8 J/cm² 9.6 J/cm² inhibition of tumor growth during the first 25 days at 3-12 times as compared to control and increased survival in mice 1.5-2 respectively was observed. The main results of this study consists in the fact that none of the doses used VIS and a IR-radiation has not been shown to stimulate tumor growth both in irradiated mice with tumors, and the irradiation of MH22a hepatoma cells under in vitro conditions prior to transplantation of intact mice. Furthermore it was detected dose range VIS-IR light (4.8-9.6 Joules/cm²) when the rate of growth of hepatoma MH22a decreased and increased survivence of animals.

Key words: polychromatic visible and infrared light, hepatoma MH22a, tumorigenicity.