

Деструкция клеток лимфосаркомы Плисса после воздействия на нее низкоинтенсивным лазерным излучением в диапазоне синего света

К.В. Кулакова¹, Т.Г. Щербатюк², В.В. Чернов³

¹ — Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии, Минздравсоцразвития РФ, Нижний Новгород

² — Нижегородская государственная медицинская академия, Минздравсоцразвития РФ, Нижний Новгород

³ — Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород

Контактная информация: к.б.н. Кулакова Ксения Владимировна kulakova-k@yandex.ru

В экспериментах *in vivo* на крысах продемонстрирована возможность индуцирования низкоинтенсивным лазерным излучением в диапазоне синего света (длина волны 460–475 нм) дегенеративных изменений лимфосаркомы Плисса и торможения роста опухоли.

Ключевые слова: лимфосаркома Плисса, низкоинтенсивное лазерное излучение, кариорексис.

В настоящее время в различных областях биомедицины широко применяется низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ). Этому способствуют многочисленные экспериментально-клинические данные, свидетельствующие о высокой терапевтической эффективности, отсутствии осложнений и побочных эффектов [16]. Низкоинтенсивное лазерное облучение вызывает в тканях и органах различные эффекты, связанные с непосредственным и опосредованным действием электромагнитных волн оптического диапазона. Терапевтический эффект может наблюдаться также и при облучении нелазерными источниками света на ряде длин волн в диапазоне 400–850 нм, однако лазеры, благодаря уникальным характеристикам излучения, оказываются более удобным и эффективным инструментом [12]. Основной чертой воздействия неионизирующих оптических излучений является острорезонансный характер биологического отклика организма: чем

более узким спектром осуществляется воздействие, тем более ярко выражен эффект [2]. Принятый в фотобиологии термин «ответы на синий свет» объединяет группу разнообразных по физиологическим проявлениям фоторегуляторных процессов, индуцируемых синим участком спектра [13]. В современной экспериментальной онкологии практическое использование монохроматического НИЛИ ограничено отсутствием сведений, четко определяющих механизмы действия, эффективные длины волн и режимы облучения. Имеющиеся литературные данные о воздействии лазерного излучения на опухолевый процесс недостаточны и противоречивы. В экспериментах на крысах с лимфосаркомой Плисса при облучении лазером с длиной волны 510 нм было получено торможение метастазирования, однако существенного влияния на рост опухоли это излучение не оказывало [11]. Установлено, что многократное облучение области пере-

вивки опухоли УФ-экимерным лазером (длина волны 308 нм) вызывает торможение развития лимфосаркомы Плисса. При этом авторы указывают на то, что облучение опухоли гелий-неоновым лазером (длина волны 633 нм) приводит к стимуляции опухолевого роста [4].

Данных о влиянии НИЛИ в диапазоне синего света на опухолевый рост в доступной литературе не обнаружено. Таким образом, представляет интерес исследование влияния низкоинтенсивного излучения лазерного источника, работающего в синей области спектра, на прогрессию экспериментальной опухоли.

Целью данного исследования стала разработка нового метода воздействия на опухоль низкоинтенсивным лазерным излучением в диапазоне синего света для подавления ее дальнейшего роста без использования фармацевтических средств.

В рамках поставленной цели решалась задача — исследовать влияние низкоинтенсивного лазерного излучения с длиной волны 460–475 нм на лимфосаркому Плисса в разные сроки после перевивки и определить оптимальное время воздействия НИЛИ на опухоль.

Материалы и методы

Исследование выполнено на белых нелинейных крысах-самцах, массой 200±50 г, в возрасте 3-х мес., полученных из Центрального питомника лабораторных животных РАМН («Андреевка»). Животных содержали в стандартных условиях вивария; все манипуляции проводили в соответствии с приказом Минвуза СССР № 742 от 13.11.84 «Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и № 48 от 23.01.85 «О контроле за проведением работ с использо-

ванием экспериментальных животных». В работе использована лимфосаркома (ЛФС) Плисса — экспериментальная опухоль, полученная в 1958 г. после подкожной перевивки опухоли, возникшей у крысы, получавшей 3,3-дихлорбензидин [17]. Штамм ЛФС, приобретенный в НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (г. Москва), пассировали на крысах в возрасте 3 мес. Опухолевую ткань для инокуляции крысам-реципиентам забирали на 14-е сутки после трансплантации. Гомогенат опухолевых клеток в физиологическом растворе объемом 0,5 мл вводили подкожно в область правого бедра. Перевиваемость животным опухоли составила 100%.

В работе использован светодиодный источник излучения со следующими параметрами: длина волны 460–475 нм, мощность 10 мВт.

Было выполнено 2 серии экспериментов, в которых варьировали режим воздействия лазерным излучением.

В первой серии эксперимента животные были распределены на группы следующим образом:

1 группа (8 крыс) — контрольная: животным была трансплантирована ЛФС Плисса, однако облучению НИЛИ впоследствии они не подвергались. Срок роста опухоли к моменту декапитации крыс под эфирным наркозом составлял 14 суток.

2 группа (8 крыс) — опытная: животные с ЛФС Плисса. Начиная с 5-ых суток после инокуляции, область ЛФС, предварительно освобожденную от шерсти, облучали НИЛИ в диапазоне синего света в течение 1 мин на протяжении 10 дней для оценки действия на опухолевую прогрессию. Срок роста опухоли к моменту декапитации крыс под эфирным нарко-

зом составлял 14 дней. Курс воздействия НИЛИ — 10 сеансов облучения общей продолжительностью 10 мин.

Животные, сформировавшие вторую серию эксперимента, были распределены на группы следующим образом:

1 группа (7 крыс) — контрольная: животным была трансплантирована ЛФС Плисса, однако облучению НИЛИ впоследствии они не подвергались. Срок роста опухоли к моменту декапитации под эфирным наркозом составлял 14 дней.

2 группа (7 крыс) — опытная: животные с ЛФС Плисса. Область растущей опухоли, начиная со вторых суток после её трансплантации животным, облучали НИЛИ в диапазоне синего света по 15 мин ежедневно общим курсом 14 сеансов. Взятие образцов опухолевой ткани для гистологического и морфометрического исследования осуществлялось на 14-е сутки после трансплантации; курс составлял 14 сеансов облучения общей продолжительностью 210 мин.

Согласно экспериментальным данным В.А. Горькова и Л.С. Васильевой (1973), кинетика развития ЛФС Плисса имеет следующие стадии: начальная нестационарная фаза начинается латентным периодом до 3 суток и продолжается до 9 суток, затем наступает линейная фаза роста опухоли [9]. Таким образом, начало воздействия НИЛИ с длиной волны 475 нм на опухоль совпадало с начальной фазой роста ЛФС Плисса, а взятие опухолевой ткани для гистологического исследования осуществляли на поздней стадии опухолевой прогрессии.

Образцы опухолевой ткани для гистологического исследования фиксировали в 10% забуференном водном растворе нейтрального формалина, проводили через спирты восходящей крепости и две порции хлороформа, затем заливали в

парафин. Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином [1, 6]. Подсчет опухолевых клеток с помощью бинокулярного микроскопа с увеличением 600х (объектив — 40, окуляр — 15) выполняли по стандартной методике с использованием сетки С.Б. Стефанова [19]. В препаратах ткани ЛФС Плисса на площади, ограниченной сеткой, подсчитывали общее количество клеток, количество активных и погибающих клеток опухоли. К погибающим относили клетки с лизирующимися ядрами, а также в состоянии кариорексиса и кариопикноза.

Степень торможения роста ЛФС Плисса определяли по окончании опыта после эвтаназии всех животных под эфирным наркозом. Вычислялась разность между средним показателем массы опухоли в контрольной и опытной группах, она делилась на средний показатель массы опухоли в контроле, и полученное значение умножалось на 100% [20].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программ Microsoft Excel и Statistica 6.0. (Windows XP). Вид распределения полученных данных не соответствовал нормальному, что оценивали по W-критерию Шапиро-Уилка. В связи с этим, результаты обрабатывали с применением непараметрической статистики: парные межгрупповые сравнения несвязанных выборок проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни; при $p < 0,05$ контрольные и опытные группы считали статистически значимо отличающимися друг от друга [8, 18].

Результаты и их обсуждение

В первой серии эксперимента была поставлена задача — изучить действие малого времени воздействия НИЛИ с длиной волны 460–475 нм на рост экс-

периментальной опухоли. В результате было установлено, что при выбранном режиме воздействия (ежедневный сеанс продолжительностью 1 мин в течение 10 дней) в опытной группе наблюдается торможение роста лимфосаркомы Плисса по сравнению с контролем: на 14 сутки эксперимента оно составило 29,6% (отличие от контроля статистически значимо; $p < 0,05$).

В связи с установленным влиянием НИЛИ на рост ЛФС Плисса, возникло предположение о возможном изменении морфологической структуры опухолевой ткани под действием облучения. Было принято решение о воздействии на опухоль в более ранние сроки (через сутки после её трансплантации животным) и увеличении времени ежедневного воздействия до 15 мин. Выбор продолжительности воздействия был основан на данных предварительных экспериментов *in vitro*, в которых методом индуцированной хемилюминесценции [15] нами было показано, что облучение образцов биологических жидкостей НИЛИ в течение 15 мин приводит к максимальному повышению в них значений свободнорадикального окисления (были проведены эксперименты со следующими экспозициями НИЛИ: 1, 5, 10, 15, 20, 25 и 30 мин).

Анализ массы опухолей у животных контрольной и опытной групп не оправдал предположения, что увеличение экспозиции НИЛИ и начало воздействия в более ранние сроки после её трансплантации крысам могут привести к более значительному влиянию на опухолевую прогрессию, по сравнению с предыдущей серией. Тем не менее, сам факт влияния на опухоль НИЛИ подтвердился — при выбранном режиме воздействия в опытной группе животных с ЛФС наблюдалось торможение роста опухоли на 18%

(отличие от контроля статистически значимо; $p < 0,05$).

В результате исследования препаратов ЛФС животных контрольной группы методом световой микроскопии было установлено, что гистологическая картина опухолевой ткани представляет собой скопления клеток округлой формы, большая часть которых занята крупным ядром. Хроматин располагается главным образом в периферической зоне ядра. Ядрышки крупные, гиперхромные. Цитоплазма опухолевых клеток отличается умеренной базофилией. Строма опухоли скудная, с наличием полнокровия, отека, кровоизлияний. В некоторых участках опухолевой ткани имеются очаги некроза. Опухоль обладает выраженным инфильтративным ростом в мышечные слои и подкожно-жировую клетчатку.

Морфологическое исследование опухолевой ткани животных опытной группы, подверженной действию НИЛИ с длиной волны 460–475 нм, выявило значительные дистрофические и некротические изменения клеток ЛФС Плисса. Морфометрический анализ показал, что доля таких клеток в препарате опухоли, подверженной воздействию НИЛИ, составляет 55,9% от общего числа клеток, а в опухолевой ткани без воздействия — 7,1%. При этом 90% от числа клеток опухоли, находящихся в состоянии дистрофии и некроза, составляют клетки с кариорексисом. Среднее количество клеток с кариорексисом по 10 измерениям составляет $8,1 \pm 1,2$, в то время как в опухолевой ткани животных контрольной группы результаты подсчета клеток с кариорексисом соответствуют значениям $0,1 \pm 0,24$.

Представляется возможным использовать феномен кариорексиса, сопровождающийся разрушением ядерной обо-

лочки и выходом нуклеиновых кислот в виде отдельных глыбок в цитоплазму, в качестве одного из критериев оценки некротических изменений в клетках опухоли. В связи с этим, увеличение количества клеток с разрушенными ядрами целесообразно считать показателем повреждающего действия исследуемого излучения на опухоль. Так, в работе Gitelman D.S. [21] дистрофические изменения в опухолевой ткани приводятся в качестве критерия оценки противоопухолевой эффективности препарата ЭВР-А на мышцах линии BALB/C (штамм аденокарциномы тонкого кишечника). Авторами показано, что по состоянию хроматина ядер опухолевых клеток опытной группы можно судить о дистрофических и некротических изменениях, приводящих к гибели клеток. В исследовании Галоян А.А. с соавт. [7] уровень кариорексиса рассматривается в качестве показателя повреждающего действия на опухолевую ткань пролин-богатых полипептидов, выделенных из нейросекреторных гранул гипоталамуса.

Брилль Г.Е. и Панина Н.П. указывают на то, что молекулярные механизмы, определяющие отклик организма на НИЛИ, весьма сложны и включают первичную активацию нескольких фоточувствительных молекул с последующей передачей фотосигнала по цепям внутриклеточного сопряжения [3]. Весьма существенно, что фотосигнал в той или иной форме поступает в клеточное ядро и достигает генетического аппарата.

Мы полагаем, что деструкция опухолевых клеток связана с тем, что под воздействием НИЛИ с длиной волны 460–475 нм происходит повышенное образование активных форм кислорода, которые стимулируют процессы пероксидации непосредственно в опухолевой

ткани, нарушая условия опухолевой прогрессии [5, 14, 22]. В итоге опухоль оказывается не в состоянии сдерживать усиленное свободнорадикальное окисление, продукты которого, повреждая митотическое веретено деления, не только затормаживают клеточную пролиферацию, но и приводят к очаговому некрозу опухолевой ткани.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных, можно сделать вывод о том, что низкоинтенсивное лазерное излучение в диапазоне синего света в выбранных режимах воздействия способно влиять на прогрессию лимфосаркомы Плисса, стимулируя дистрофические и некротические изменения в опухолевых клетках. Преимуществом данного метода является его неинвазивность. Кроме того, данный способ воздействия на опухоль представляет собой монотерапию и не предполагает введения в организм экспериментальных животных каких-либо дополнительных веществ, что позволяет сделать вывод о возможности расширения с помощью данного способа арсенала действующих средств. Низкоинтенсивное лазерное излучение в диапазоне синего света, несомненно, представляет интерес не только в плане разработки новых подходов в экспериментальной онкологии, но и в качестве возможного дополнения к существующим методам лечения онкологических заболеваний.

Список литературы

1. *Автандилов Г.Г.* Введение в количественную патологическую морфологию. М.: Медицина. 1980. 216 с.
2. *Байбеков И.М., Касымов А.Х., Козлов В.И.* Морфологические основы низкоинтенсивной лазеротерапии. Ташкент. 1991. 223 с.

3. **Брилль Г.Е., Панина Н.П.** Влияние низкоинтенсивного лазерного облучения на генетический аппарат клетки: учебное пособие. Саратов. 2000. 86 с.
4. **Васильев Н.В., Тарасенко Т.И., Богдашин И.В., Полушина О.А.** Влияние лазерного излучения на некоторые показатели противоопухолевой резистентности и общего иммунитета // Лазеры в онкологии: Сборник научных трудов. 1987. 17 с.
5. **Владимиров Ю.А., Шерстнев М.П.** Хемиллюминесценция клеток животных. М.: ВИНТИ. 1989. 170 с.
6. **Волкова О.В., Елецкий Ю.К.** Основы гистологии с гистологической техникой. М.: Медицина. 1971. 272 с.
7. **Галоян А.А., Шахламов В.А., Кондакова Л.И. и др.** Анализ влияния нового нейросекреторного пролин-богатого полипептида гипоталамуса на морфологию и митотическую активность опухолевых клеток невриноом Гассерова узла крысы (электронно-микроскопические исследования). — URL: http://elib.sci.am/2001_3/12/12r.htm
8. **Гланц С.** Медико-биологическая статистика. М.: Практика. 1998. 459 с.
9. **Горьков В.А., Васильева Л.С.** Кинетический анализ роста лимфосаркомы Плисса // Вопросы онкологии. 1973. Том 19. № 7. С. 91–93.
10. **Димант И.Н., Ботвинников И.Я.** Энзиматические реакции в биомеханизме антибластического действия гелий-неонового лазера // Лазеры в онкологии: Сборник научных трудов. 1987. 8 с.
11. **Зарянов Б.Н., Цукерман И.Я., Гаман А.В. и др.** Использование излучения неповреждающей интенсивности лазера на парах меди в клинической онкологии и эксперименте // Лазеры в онкологии: Сборник научных трудов. 1987. 3 с.
12. **Инюшин В.М., Чекуров П.Р.** Биостимуляция лучом лазера и биоплазма. — Алма-Ата: Казахстан. 1975. 120 с.
13. **Карандашов В.И., Петухов Е.Б., Корнеев А.А. и др.** Ответы на синий свет у человека // Бюллетень экспериментальной биологии. 2000. № 2. С. 217–221.
14. **Козлов Ю.П.** Свободные радикалы и их роль в нормальных и патологических процессах. М.: МГУ. 1973. 175 с.
15. **Кузьмина Е.И., Нелюбин А.С., Щенникова М.К.** Применение индуцированной хемиллюминесценции для оценки свободнорадикальных реакций в биологических субстратах // Межвузовский сборник биохимии и биофизики микроорганизмов. Горький. 1983. С. 179–183.
16. **Москвин С.В.** Лазерная терапия как современный этап развития гелиотерапии // Лазерная медицина. 1997. Т. 1. вып. 1. С. 45–49.
17. **Плисс Г.Б.** Онкологическая характеристика нового штамма лимфосаркомы крысы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1961. № 2. С. 95–99.
18. **Реброва О.Ю.** Статистический анализ медицинских данных. Применение прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера. 2002. 312 с.
19. **Стефанов С.Б.** Окулярная вставка для полных стереологических измерений микроскопических объектов // Цитология. 1974. Т. 16. № 11. С. 1439–1442.
20. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в России и США / Под ред. **З.П. Софьиной, А.Б.**

Сыркина, А.Голдина и др. М.: Медицина. 1980. 295 с.

21. *Gitelman D.S.* Экспериментальные исследования противоопухолевой активности электроактивированно-

го раствора анолита (ЭВР-А). URL: <http://ikar.udm.ru/sb36-1.htm>

22. *Karu T.I.* Photobiology of low power laser therapy. Chur, L.: Harwood Acad. Publ. 1989.

Destruction of Pliss's lymphosarcoma cells after being treated by low intensity laser radiation in the range of dark blue light

K.V. Kulakova, T.G. Sherbatyuk, V.V. Chernov

In vivo experiments, carried out on rats, demonstrated a possibility of degenerative changes in Pliss's lymphosarcoma and tumor growth decrease under the influence of low-intensity laser radiation in the blue light range (460-475 nm wavelength).

Key words: Pliss's lymphosarcoma, low intensity laser radiation, karyorhexis.