

УДК 615.47:616-085.

Шейко Е.А., Златник Е.Ю., Загора Г.И.

Монохроматическое излучение красного спектра как фактор, стимулирующий естественные механизмы гибели опухолевых клеток *in vitro*

Sheiko E.A., Zlatnic E.Yu., Zakora G.I.

Monochromatic irradiation with red light as a factor stimulating natural mechanisms of tumor cells death *in vitro*

ФГУ «Научно-исследовательский онкологический институт МЗ России», г. Ростов-на-Дону

Цель: оценка функционального состояния лимфоцитов крови онкологических больных после их облучения монохроматическим красным светом *ex vivo* и оценка их влияния на клетки культуры K562. **Материал и методы:** лимфоциты выделяли в градиенте плотности фиколл-верографина ($\rho = 1,078$) из проб периферической венозной крови 7 первичных больных местнораспространенным раком легкого до и после проведения противоопухолевого лечения. Воздействие на взвесь лимфоцитов осуществляли с помощью аппарата «Спектр ЛЦ», генерирующего лазерное монохромное светодиодное излучение (СДИ) оптического диапазона, в непрерывном режиме ($\lambda = 0,67$ мкм). Доза облучения составила $W = 0,05$ Дж/см². Затем проводили совместную инкубацию облученных лимфоцитов и K562 в культуральной среде RPMI-1640. Исследовали пролиферативную активность лимфоцитов, цитотоксическую активность естественных киллерных клеток, цитологическое состояние K562, индекс апоптоза. **Результаты:** показано возрастание процента погибших опухолевых клеток-мишеней, в частности, путем апоптоза, при действии монохромного СДИ на лимфоциты, а также усиление функциональной активности факторов клеточного иммунитета, участвующих в реализации противоопухолевого действия (Т-лимфоцитов и естественных киллеров) у онкологических больных, после их облучения *ex vivo* красным светом в указанных режимах. **Ключевые слова:** лимфоциты, культура клеток опухоли, монохроматическое излучение красного спектра.

Purpose: To evaluate a functional state of blood lymphocytes in oncologic patients after irradiating them with monochromatic red laser light *ex vivo* and to assess their impact at culture cells k562. **Material and methods:** The tested lymphocytes were isolated out of venous blood samples before oncotherapy and after that in 7 primary patients with locally-spread lung cancer. The suspension with lymphocytes was irradiated with monochromatic light-diode light $\lambda = 670$ nm. Irradiation dosage was $W = 0,05$ J/cm² in continuous mode. After this the lymphocytes were added to tumor culture K562. **Results:** The results obtained have shown that under monochromatic red light irradiation functional activity of natural cell immunity has increased as well as the percentage of tumor cells' death, cytotoxic index and apoptosis. Thus, electromagnetic oscillations of the optic range of red spectrum (in the given doses) can increase functional activity of cellular immunity factors which take part in antitumoural action (T-lymphocytes and natural killers) in oncologic patients. It is undoubtedly an important moment for adaptive medicine. **Key words:** lymphocytes, tumour cell culture, monochromatic irradiation of red light.

Введение

Одним из бурно развивающихся научных направлений экспериментальной онкологии является изучение противоопухолевого действия физических факторов [8]. В ряде исследований были представлены данные о значительном противоопухолевом эффекте воздействия электромагнитных излучений на крыс с перевивными опухолями *in vivo*, механизмы которого могут быть как непосредственными, связанными с индукцией гибели малигнизированных клеток, так и опосредованными, например, через влияние на иммунные и другие защитные факторы, участвующие в регуляции процессов пролиферации и апоптоза.

В настоящий момент исследователи разрабатывают методы воздействия физических факторов электромагнитной природы с механизмами действия, направленными на стимуляцию естественных киллеров опухоли, способных активировать различные системы противоопухолевой защиты, блокировать процессы пролиферации и индуцировать апоптоз опухолевых клеток [10–12], что является приоритетным направлением экспериментальной онкологии [1, 2]. Известно, что электромагнитное излучение оптического диапазона с $\lambda = 0,67$ мкм, т. е. монохроматическое излучение красного спектра, применяют в лечении различных соматических патологий [5].

Изучение возможности его использования в комплексном лечении злокачественных опухолей является актуальной задачей современной онкологии.

Целью настоящей работы являлась оценка функционального состояния лимфоцитов крови онкологических больных после их облучения монохроматическим красным светом *ex vivo* и оценка их влияния на клетки культуры K562.

Материал и методы

Лимфоциты выделяли в градиенте плотности фиколл-верографина ($\rho = 1,078$) из проб периферической венозной крови 7 первичных больных местнораспространенным раком легкого и у них же после проведения противоопухолевого лечения. Воздействие на взвесь лимфоцитов осуществляли с помощью аппарата «Спектр ЛЦ», генерирующего лазерное монохромное светодиодное излучение (СДИ) оптического диапазона, в непрерывном режиме ($\lambda = 0,67$ мкм). Доза облучения составила $W = 0,05$ Дж/см². До и после облучения проводили следующие тесты.

1. Определение пролиферативной активности лимфоцитов двумя методами: в реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) [6], а также с помощью люминесцентно-спектральных исследований по методу Карнаухова [3]. Постановку РБТЛ проводили

путем 72-часового культивирования лимфоцитов в полной культуральной среде в присутствии 5 мкг Т-клеточного митогена ФГА (стимулированная проба) и без митогена (спонтанная проба), после чего в фиксированных и окрашенных по Романовскому–Гимзе мазках подсчитывали процент бласттрансформированных клеток. При проведении люминесцентно-спектральных исследований в качестве люминесцентного красителя был использован акридиновый оранжевый (АО) (фирма MB, Великобритания). Спектры люминесценции регистрировали с помощью микроспектрофлюориметра, возбуждение флуоресценции осуществляли излучением ртутно-дуговой лампы ДРШ-250-2 ($\lambda = 436$ нм). Размер фотометрируемого участка соответствовал размеру изучаемой клетки. Методика окраски отработана таким образом, что основной вклад в излучение с $\lambda = 530$ нм вносят комплексы мономеров АО с двуспиральными нуклеиновыми кислотами, а излучение в области $\lambda = 640$ нм обязано своим происхождением комплексу димеров АО с односпиральными нуклеиновыми кислотами. Спектр люминесценции каждой клетки характеризовали числовым параметром α , который определяли как отношение интенсивности полос излучения в красной области спектра к зеленой. Параметр α отражает синтетический потенциал клетки [3, 10, 11].

2. Определение цитотоксической активности естественных киллерных клеток (ЕКК) в цитотоксическом тесте (ЦТТ) при соотношении эффектор:мишень 40:1. В качестве клеток-мишеней использовали культуру клеток эритромиелобластного лейкоза человека K562 [7]. Проводили совместную инкубацию лимфоцитов (клеток-эффекторов) и K562 в культуральной среде RPMI-1640 в течение 24 ч при температуре 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, затем клеточную взвесь окрашивали трипановым синим, подсчитывали процент погибших (окрасившихся) клеток-мишеней и вычисляли индекс цитотоксичности (ИЦ) по формуле: ИЦ = (О-К)/К, где О (опыт) – % погибших клеток-мишеней в присутствии клеток-эффекторов; К (контроль) – % погибших клеток-мишеней в присутствии среды.

3. Микроскопическая оценка цитологического состояния K562 и расчет индекса апоптоза (%) из мазков инкубированных проб клеток-мишеней с клетками-эффекторами, фиксированных, окрашенных по Романовскому–Гимзе [12]. Контролем служили клетки K562 с добавлением культуральной среды вместо лимфоцитов.

Статистическую обработку проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Результаты представлены в табл., из которой видно, что облучение лимфоцитов СДИ стимулирует их пролиферативную активность. Так, после воздействия отмечено статистически достоверное повышение как спонтанной, так и ФГА-индуцированной РБТЛ, что свидетельствует как о слабом митогеноподобном действии СДИ (в случае спонтанной), так и об усилении функциональной активности Т-лимфоцитов (в случае стимулированной РБТЛ).

При исследовании синтетической активности лимфоцитов крови больных до и после лечения методом люминесцентно-спектрального анализа были получены спектры одного типа, где преобладающей полосой является полоса излучения с максимумом в зеленой области спектра, красная полоса практически отсутствует. После облучения лимфоцитов монохромным СДИ их спектральные характеристики изменились, а именно, были выявлены оба максимума в красной и зеленой полосе излучения. При этом преобладающим становился максимум красной полосы спектра, что можно трактовать как увеличение синтетического потенциала у последних. Средние значения параметра α лимфоцитов представлены в табл., из которой видно, что этот показатель статистически достоверно повышался в облученных СДИ пробах по сравнению с необлученными, а также был выше у больных, перенесших курс противоопухолевого лечения по сравнению с первичными.

Данные, полученные в ЦТТ, свидетельствуют о том, что после облучения монохромным СДИ происходит увеличение процента гибели клеток-мишеней и возрастание ИЦ; значения обоих показателей

Таблица

Влияние монохромного СДИ на функциональную активность лимфоцитов больных рака легкого (M ± m)

Показатели	Пробы					
	до лечения (n = 7)			после лечения (n = 7)		
	лимфоциты + СДИ	лимфоциты	контроль	лимфоциты + СДИ	лимфоциты	контроль
	1	2	3	1	2	3
РБТЛ с ФГА, %	50 ± 4,12	38 ± 2,11	–	54 ± 4,12	36 ± 4,11	–
РБТЛ спонт., %	13 ± 0,52	9 ± 0,51	–	15 ± 0,32 *	10 ± 0,41	–
α , у. е.	1,40 ± 0,32	0,095 ± 0,0011	–	2,09 ± 0,712	0,067 ± 0,0011 *	–
Гибель K562, %	34 ± 1,12,3	27 ± 2,41,3	7,0 ± 0,91,2	40 ± 1,22,3 *	36 ± 1,11,3 *	6,4 ± 0,81,2
ИЦ, у. е.	4,7 ± 0,12	3,5 ± 0,31	–	5,4 ± 0,12 *	3,65 ± 0,11	–
Индекс апоптоза K562, %	24,3 ± 3,42,3	6,1 ± 0,91	5,0 ± 1,4	88,8 ± 4,12,3 *	11,3 ± 0,91,3 *	5,3 ± 0,72,1

Примечание. ¹ достоверно по отношению к 1 (p < 0,05), ² достоверно по отношению к 2 (p < 0,05), ³ достоверно по отношению к 3 (p < 0,05), * – достоверно по отношению к показателю до лечения (p < 0,05).

статистически достоверно выше, чем в случае необлученных клеток. Это говорит об усилении функциональной активности ЕКК, содержащихся во взвеси лимфоцитов, так как К562, не обладая способностью экспрессировать молекулы главного комплекса гистосовместимости, служит мишенью именно для этих эффекторных клеток. Следует отметить, что ИЦ облученных лимфоцитов, взятых у больных после лечения, статистически значимо повышается по сравнению с исходным.

На контрольных цитологических препаратах культура К562 была представлена округлыми клетками с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением (выше 1), отмечалась выраженная базофилия цитоплазмы и гомогенная базофилия кариоплазмы. Ядро округлое, с наличием 1–2 ядрышек. Типичным являлось наличие значительного количества клеток с митотическими фигурами деления, при этом мы регистрировали низкий индекс апоптоза. (табл.). После инкубации К562 с облученными СДИ лимфоцитами первичных больных в мазках видны обширные поля сморщенных клеток культуры. Ядерно-цитоплазматическое отношение низкое (меньше 1). В клетках К562 отчетливо определялась конденсация цитоплазмы и ядерного материала, встречались поля клеток с фрагментацией ядер, определялись компактные апоптотические тельца; индекс апоптоза статистически достоверно возрастал (табл.). В единичных клетках отмечались патологические фигуры деления. После инкубации К562 с необлученными лимфоцитами первичных больных культура была представлена полиморфными клетками атипичной формы. Усиление клеточного полиморфизма происходило за счет сморщивания и пикноза одних клеток и набухания с увеличением размеров других. Отмечалась оксифилия цитоплазмы. Ядерно-цитоплазматическое отношение составляло около 1, появлялись участки с атипичными митозами; индекс апоптоза не отличался от контрольных значений. Как видно из табл., значения индекса апоптоза К562 резко возрастали при действии облученных лимфоцитов на культуру клеток-мишеней по сравнению с действием необлученных лимфоцитов, причем этот показатель значительно повышался при постановке ЦТТ с лимфоцитами больных после лечения в сопоставлении с результатами тех же больных до лечения. Так, до лечения индекс апоптоза при действии необлученных лимфоцитов на клетки опухоли был в 1,2 раза выше данных контроля, а после лечения в 2,1 раза. Проапоптогенный потенциал облученных лимфоцитов увеличивался: до начала лечения он превышал таковой необлученных лимфоцитов в 4 раза, а после окончания лечения – в 7,86 раза.

Итак, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что проведенное воздействие на лимфоциты способствует повышению их пролиферативной активности, а также цитотоксичности ЕКК, что проявляется в статистически достоверном усилении

их повреждающего эффекта на культуру опухолевых клеток К562 *in vitro*, одним из механизмов реализации которого служит апоптоз [9].

В работах Кару Т.И. [4] было показано, что электромагнитные воздействия оптического диапазона можно отнести к числу ранних пусковых механизмов сложных взаимосвязанных реакций стимуляции покоящихся (G₀) клеток, заканчивающихся переходом G₀ в S-стадию, в которой опухолевая клетка становится более восприимчива. Кроме того, была показана возможность модулирования и синхронизации [10–12] синтетической активности клетки под действием таких излучений. Электромагнитные колебания оптического диапазона красного спектра способны приводить к повышению чувствительности опухолевой клетки к эндогенным [2, 5] (цитотоксической активности естественных киллеров) и экзогенным противоопухолевым воздействиям, хотя процессы первичной фотохимии пока остаются неясными. Показанное нами возрастание процента погибших опухолевых клеток-мишеней, в частности, путем апоптоза, при действии монохромного СДИ на лимфоциты свидетельствует о возможном опосредованном влиянии использованного вида и дозы облучения на естественные механизмы гибели. С другой стороны, отмеченное повышение синтетической активности лимфоцитов, функциональной активности Т-клеток в РБТЛ и ЕКК в ЦТТ говорит о том, что для них данное облучение является стимулирующим.

Заключение

На основании полученных результатов можно сделать вывод об эффективности применения электромагнитных колебаний оптического диапазона красного спектра (в заданных режимах) для усиления функциональной активности факторов клеточного иммунитета, участвующих в реализации противоопухолевого действия (Т-лимфоцитов и естественных киллеров) у онкологических больных, что является несомненно весьма существенным при решении задач, стоящих перед адаптивной медициной.

Литература

1. Волкова Т.О., Мальничева И.Е., Немова Н.Н. Процессы индукции эритроидной дифференцировки и апоптоза клеток К562 в условиях обработки 2-(4-нитростил)хинолин-1-оксидом и 4-(4-нитростил)хинолин-1-оксидом // Цитология. 2003. Т. 45. № 9. С. 859–864.
2. Волкова Т.О., Немова Н.Н. Молекулярные механизмы апоптоза лейкозной клетки. М.: Наука, 2006. 205 с.
3. Карнауход В.Н. Спектральный анализ клетки. М.: Наука, 1978. 156 с.
4. Кару Г.И. Клеточные механизмы низкоинтенсивной лазерной терапии // Успехи совр. биол. 2001. Т. 121. № 1. С. 110–120.
5. Москвин С.В., Буйлин В.А. Основы лазерной медицины. Тверь: Трида, 2006. 256 с.
6. Новиков Д.К., Новикова В.И. Клеточные методы иммунодиагностики. Минск. Беларусь, 1979. 221 с.
7. Рахмилевич А.Л., Рахимова М.С. Активация продукции цитотоксических факторов клетками селезенки мышей при

- сочетанном действии липополисахарида и глюкозаминил-липептида *in vitro* // Бюлл. экп. биол. и мед. 1988. Т. CV. № 4. С. 483–486.
8. Соколов П.В., Кабисов Р.К., Поддубный Б.К., Барук А.С. Новые физические методы в лечении злокачественных заболеваний основных локализаций // Росс. онколог. журнал. 1996. № 3. С. 35–41.
 9. Чекнев С.Б., Горожанова Е.С. Изменение протекания цитотоксической реакции в результате воздействия на мембрану клетки-мишени // БЭБиМ. 2005. Т. 139. № 3. С. 325–329.
 10. Шейко Е.А., Златник Е.Ю., Загора Г.И. Влияние низкоинтенсивного лазерного и монохроматического излучения красного спектра на цитотоксический эффект циклофосфана

в экспериментальных исследованиях *in vitro* // Лазер. мед. 2007. Т. 11. Вып. 1. С. 29–31.

11. Шейко Е.А., Шихлярова А.И. Влияние сверхнизкочастотных электромагнитных излучений на тимоциты и лимфоциты крови крыс с опухолями при химиотерапии // Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине. СПб.: Политехника, 2006. С. 134.
12. Шейко Е.А., Шихлярова А.И., Златник Е.Ю., Загора Г.И., Иваненко Е.С. Воздействие низкоинтенсивного монохроматического света на клетки культуры фибробластов кожи L929 // БЭБиМ. 2006. Т. 141. № 6. С. 689–691.

Поступила в редакцию 13.06.2007 г.

УДК 616.127-08:615.849.19

Гиниатуллин Р.У., Козель А.И., Фокин А.А., Евдокимов С.В.

Результаты применения трансмиокардиальной лазерной реваскуляризации у больных рефрактерной стенокардией

Giniatullin R.U., Kozel A.I., Fokin A.A., Yevdokimov S.V. (Cheljabinsk, Russia)

Results of transmiocardial laser revascularization in patients with refractory angina pectoris

Челябинский государственный институт лазерной хирургии, Челябинск

Цель, материал и методы: оценка эффективности трансмиокардиальной лазерной реваскуляризации у 112 больных с рефрактерной стенокардией через 6, 12, 24 и 36 месяцев после операции в Челябинском государственном институте лазерной хирургии. **Результаты:** в ближайшие и отдаленные сроки после оперативного вмешательства у больных достоверно уменьшается функциональный класс стенокардии и объем принимаемых антиангинальных препаратов, значительно повышается толерантность к физической нагрузке, существенно улучшается сократимость миокарда левого желудочка. **Ключевые слова:** трансмиокардиальная лазерная реваскуляризация, рефрактерная стенокардия.

Purpose: To evaluate the effectiveness of transmiocardial laser revascularization in patients with refractory angina pectoris. **Material and methods:** In the study there were 112 patients 6, 12, 24 and 36 months after the surgery. During the surgery Nd:YAG and diode lasers were used. Before and after the intervention a functional class of angina pectoris, an average number of nitroglycerin tablets, motor activity, electrocardiographic data with loading, indexes of contractility of the left ventricle and perfusion scintigraphy of the myocardium have been assessed. **Results:** It has been shown that at the immediate and remote periods after the surgery the patients had reliable decrease in functional class, they took less number of tablets, had better tolerance to physical exertion and better contractility of the left ventricle. **Key words:** transmiocardial laser revascularization, refractory angina pectoris.

Введение

Коренной перелом в терапии ишемической болезни сердца внесли различные разработанные в последние десятилетия методы коронарного шунтирования и транслюминальной баллонной ангиопластики, включая стентирование. Однако кандидатами на хирургическое лечение становятся все более тяжело больные с множественными поражениями сосудов, старших возрастных групп, имеющих большее количество факторов риска, а также пациенты, перенесшие ранее одну, две, а то и три операции на сердце. Таким больным невозможно выполнить ангиопластику или коронарное шунтирование, равно как и обеспечить их адекватно необходимой медикаментозной терапией. Поэтому появление метода трансмиокардиальной лазерной реваскуляризации (ТМЛР), направленной именно на помощь подобным больным с неоперабельными коронарными артериями, сразу привлекло внимание клиницистов.

В доступной нам литературе мы не нашли данных о состоянии коронарного и миокардиального резерва у больных рефрактерной стенокардией после перенесенной трансмиокардиальной реваскуляризации с использованием Nd:YAG и диодного лазера. Изучение указанных аспектов этой проблемы представляется важным для суждения об эффективности относительно нового хирургического метода коррекции коронарной недостаточности в ближайшем и отдаленном периодах после операции.

Материал и методы исследования

Нами обследованы 112 пациентов с рефрактерной стенокардией (основная группа), которым была проведена изолированная ТМЛР (табл.). Группа сравнения состояла из 54 больных, которые принимали антиангинальные препараты и отказались от выполнения ТМЛР.

Данные таблицы демонстрируют факт того, что больные основной группы и группы сравнения были