

УДК.615.831:616-006-092.9

ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ВИДИМОГО И ДЛИННОВОЛНОВОГО СПЕКТРА НА КЛЕТКИ КУЛЬТУРЫ K562: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ IN VITRO

Шейко Е.А., Златник Е.Ю., Шихлярова А.И., Саркисянц Г.З., Загора Г.И.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» МЗ России, Ростов-на-Дону, e-mail: rnioi@list.ru

Целью исследования было изучение влияния различных полос видимого и длинноволнового спектра, подаваемого в одинаковой энергетической дозе на опухолевые клетки культуры эритромиелоза человека K562. Было показано, что длина волны а не общая энергетическая доза, является значимым фактором для активации путей гибели клеток опухоли.

Ключевые слова: культура клеток эритромиелоза человека K562, оптические излучения видимого и длинноволнового спектра, апоптоз

FEATURES THE IMPACT OF OPTICAL RADIATION IN THE VISIBLE AND LONG-WAVELENGTH SPECTRUM K562 CELLS CULTURE: EXPERIMENTAL STUDIES IN VITRO

Sheiko E.A., Zlatnik E.Y., Shikhliarova A.I., Sergostiantz G.Z.

Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail:rnioi@list.ru

To study the influence of the different bands of the visible spectrum and the long wavelength, the energy supplied to the same dose of tumor cells by culture of human erythremic myelosis K562 was the main aim of this study. The results obtained has shown that the total energy dose is not a significant factor in the activation of cell death pathways tumors such factor is the wavelength.

Keywords: human cell culture erythremic myelosis K562, optical radiation in the visible and longwave range, apoptosis

Проблемы регуляции важнейших клеточных функций, таких как пролиферация, дифференцировка, апоптоз, имеют значение не только для понимания фундаментальных основ жизнедеятельности организма на разных уровнях его организации, но и для поиска оптимальных способов воздействия на указанные клеточные функции при нормально протекающих физиологических процессах, либо при возникновении патологических состояний, в частности, злокачественных опухолей. [1, 4, 5]. В настоящий момент активно разрабатываются методы с использованием различных физических факторов с механизмами действия, направленных на активацию различных систем противоопухолевой защиты, способных блокировать процессы пролиферации опухолевых клеток, индуцировать апоптоз, стимулировать цитотоксичность естественных киллеров [2, 3, 8, 9]. Актуальность использование оптических излучений связана с тем, что достаточно небольших доз таких излучений для получения выраженной ответной реакции (6), с этих позиций представляется интересным исследовать прямое действие электромагнитных колебаний оптического диапазона на опухолевые клетки. Целью настоящего исследования было изучение прямого эффекта различных полос видимого и инфракрасного спектра с фиксированной одинаковой энергетической до-

зой на жизнеспособность опухолевых клеток культуры эритромиелоза человека K562.

Материалы и методы исследования

В работе использовали клетки человеческой эритромиелозной линии K562, полученной из Всероссийского банка клеточных культур, института Цитологии РАН Санкт-Петербург. Объектом исследования служили клетки культуры линии K562, которую поддерживали в полной питательной среде, приготовленной на основе RPMI-1640 («FlowLab») и дополненной 12% ЭТС (НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАН), 2 мМ глутамин и 40 мкМ/мл гентамицин («Pharmachim»), на 10мМ буфере Hesp («Serva»). Опухолевые клетки трижды отмывали средой 199, взвесь клеток разводили полной питательной средой до $4 \cdot 10^6$ и распределяли по пенициллиновым флаконам, после чего не раньше чем через два часа, осуществляли воздействия на клетки культуры опухоли. (12). Электромагнитные излучения оптического диапазона получали от лазерно-светодиодного аппарата «Спектр-ЛЦ». Исследовали: красный спектр с $\lambda=0,67$ мкм, оранжевый $\lambda=0,65$ мкм, желтый $\lambda=0,59$ мкм, зеленый $\lambda=0,56$ мкм, синий $\lambda=0,47$ мкм, фиолетовый $\lambda=0,40$ мкм, инфракрасный спектр $\lambda=0,84$ мкм. Изучение подавалось в непрерывном режиме с одинаковой для всех режимов энергетической дозой: 1опыт – $W=0,3$ Дж/см², 2опыт – $W=3$ Дж/см². Затем пробы помещали в термостат на 24 и 48 часов при 37°C. Контрольные пробы инкубировали в аналогичных условиях без облучения. Было проведено четыре серии таких экспериментов.

Численность клеток культуры K562 определяли с использованием камеры Горяева, процент жизне-

способных клеток контрольной и опытных проб оценивали по общепринятому тесту с трипановым синим (Sigma, США). Цитотоксический индекс (ЦТИ) вычисляли по формуле $ЦТИ = (O - K / K) \times 100\%$, где O – количество погибших клеток в опытной пробе; K – в контрольной пробе. Одновременно готовили мазки, фиксировали, окрашивали по Романовскому-Гимзе, микроскопировали и проводили оценку цитологического состояния K562, рассчитывали индекс апоптоза [7]. Достоверность различий средних величин определяли с применением t критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

На контрольных цитологических препаратах культура K562 была представлена однотипными округлыми клетками, плотно прилегающими друг к другу, с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением (выше 1). Цитоплазма отчетливо базофильна. Ядро округлое, гомогенно, базофильно с наличием 2-3 ядрышек. Типичным являлось наличие значительного количества в поле зрения клеток с митотическими фигурами деления. Регистрировался низкий индекс апоптоза ($5,3 \pm 0,7\%$). В единичных клетках отмечались патологические фигуры деления. После воздействия на клетки культуры K562 оптическим излучением различного спектрального диапазона были получены изменения клеток культуры различной степени выраженности, но сходные между собой. Было отмечено остановка клеточного деления, отсутствие фигур деления в большинстве проб. 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; отсутствие ядрышек в ядрах. Наблюдались поля «го-

лых» одиночно лежащих клеток. Ядерно-цитоплазматическое отношение составляло меньше 1. Такие изменения в литературе трактуются как морфологические признаки апоптоза [10, 13].

Однако при действии оранжевого спектра (как при меньшей, так и при большей энергетической дозе) наравне с перечисленными выше морфологическими характеристиками клеток были обнаружены большие массивы некротизированных, с поврежденными мембранами, лизированных клеток K562. Значения индексов апоптоза (ИА%) были относительно низкими (при действии малой дозы: через 24 часа $19,7 \pm 9,9\%$, через 48 часов $12,4 \pm 6,6\%$ – отличия недостоверны; при большей дозе: $15,1 \pm 7,4\%$ и через 48 часов $8,1 \pm 6,8\%$ – отличия недостоверны). Эти факты могут свидетельствовать о прямом цитотоксическом, разрушительном действии этого спектра на клетки культуры [12]. В пробах после воздействия красного света (как при меньшей, так и при большей энергетической дозе) отмечались массивы изолированно лежащих друг от друга, сморщенных клеток с конденсированным хроматином, который располагался по периферии ядер. Определялись поля ядер, в которых четко дифференцировались глыбки хроматина с четкими правильными краями. Значения ИА% были высокие: при малой и большей дозе через 24 часа: $41,3 \pm 1,2$ и $22,1 \pm 3,3$ соответственно ($P < 0,01$); через 48 часов: $67,7 \pm 6,4$ и $88,8 \pm 4,1$ соответственно ($P < 0,01$).

Как видно из табл. 1, различные длины волн неодинаково влияют на гибель клеток K562. При воздействии низкой энергетической дозой во всех изученных пробах число погибших клеток по сравнению с контролем было статистически достоверно выше ($P < 0,01$).

Влияние электромагнитных колебаний оптического диапазона с различной длиной волны на гибель клеток культуры эритромиелома человека K562 (%)

Показатели	Энергетическая доза							
	W=0,3 Дж/см ²				W=3 Дж/см ²			
	24 час		48 час		24 часа		48 час	
	% гибели	ЦТИ, %	% гибели	ЦТИ, %	% гибели	ЦТИ	% гибели	ЦТИ, %
Красный	37±0,8	6,4±0,3	50±0,6	3,6±0,1	47±0,3	8,4±0,4	90±2,2	7,2±0,1
Оранже-вый	54±0,7	9,8±0,1	100±6,4	8,1±0,4	95±1,3	18±0,3	96±4,1	7,7±0,5
Желтый	40±0,8	7,0±0,3	42±3,3	2,8±0,4	74±3,7	13,8±2,4	36±7,1	2,3±0,1
Зеленый	42±0,4	7,4±0,1	68±0,7	5,2±0,1	70±0,6	13±0,3	34±0,8	2,1±0,2
Синий	28±0,2	4,0±1,2	98±11,3	7,9±2,5	36±4,3	6,2±0,9	82±6,1	6,5±0,3
Фиолетовый	47±5,3	8,4±2,1	85±11,7	6,7±2,3	39±12,3	6,8±0,8	92±23,3	7,4±0,7
Инфракрасный	35±0,8	6,0±2,3	56±3,6	4,1±0,3	52±12,1	9,4±2,4	52±7,8	3,7±0,1
Контроль	5±0,1	-	11±0,4	-	5±0,1	-	11±0,4	-

Примечание. Отличия достоверны по отношению к контролю при $p < 0,05$.

Действие малой дозы видимой части спектра приводит к повышению количества погибших клеток культуры через 24 и 48 часов, наиболее выраженной при облучении оранжевым спектром; в этом случае гибель клеток достигала 100%. Судя по цитологическим изменениям, она происходила преимущественно за счет некроза, хотя в части клеток были обнаружены и изменения, характерные для апоптоза; ИА% после 24-часовой экспозиции составлял $19,7 \pm 9,0\%$, после 48-часовой – $12,4 \pm 6,6\%$ (различия статистически недостоверны между собой, но достоверно выше контроля). Интересно, что после воздействия красным спектром ИА% был выше, составляя через 24 часа $41,3 \pm 1,2\%$, а через 48 час $67,7 \pm 6,4\%$ (различия достоверны $P < 0,01$ как между собой, так и по сравнению с контролем, а также с ИА% оранжевого спектра). Полученные данные позволяют предположить, что вклад апоптоза в общую гибель клеток оказался более существенным при действии красного спектра по сравнению с оранжевым, несмотря на близость их спектральных характеристик.

После воздействия малыми дозами облучения желтым, зеленым, синим и фиолетовым и инфракрасным спектром показатели ИА% через 24 часа не имели статистически достоверных отличий от контрольных проб. При действии низкой дозы желтого спектра не происходит увеличения % погибших клеток по мере повышения экспозиции, а ЦТИ снижается видимо за счет повышения гибели клеток в контрольной пробе через 48 час по сравнению в 24-часовой экспозицией. Облучение той же дозой зеленого спектра вызывает повышение % погибших клеток через 48 часов при снижении ЦТИ, возможно, по той же причине. Следует отметить, что при применении малой дозы желтого и зеленого спектра ИА% не меняется по сравнению с контролем ни через 24 часа, ни через 48 часов экспозиции, из чего можно заключить, что отмеченная гибель клеток, по-видимому, не является апоптотической.

Действие малой дозы синего и фиолетового спектра демонстрирует выраженные отличия от описанных выше и индуцирует максимальную гибель клеток через 48 часов. Судя по показателям ИА%, в ее реализации задействованы апоптотические механизмы, т.к. в этот срок исследования он был статистически достоверно выше контрольных значений, составляя для синего и фиолетового спектра $9,4 \pm 0,7\%$ и $22,1 \pm 3,6\%$ соответственно, (в обоих случаях $P < 0,01$).

При воздействии большей энергетической дозы число погибших клеток также было достоверно выше, чем в контроле. Большая энергетическая доза, по сравне-

нию с малой дозой, через 24 часа вызывает в пробах достоверное повышение числа погибших клеток, за исключением фиолетового спектра, где эти значения достоверно не отличаются от контроля. При межгрупповом сравнении: меньше всего клеток погибает при воздействии синего и фиолетового света, больше всего при действии оранжевого. При действии оранжевого света получены самые высокие значения ЦТИ. Через 48 часов число погибших клеток после действия синего и фиолетового света увеличивается в 2,4 раза, а при действии оранжевого и инфракрасного спектра не меняется. Самые низкие значения ЦТИ получены при действии желтого и зеленого спектра.

Применение высокой дозы облучения исследованными длинами волн приводит к ряду отличий от действия малой дозы, что укладывается в представления о дозо-зависимости эффекта различных воздействий. Так, в отличие от результата применения малой дозы, гибель клеток при 24-часовой экспозиции высокой дозы инфракрасного, оранжевого, желтого, зеленого спектра оказалась максимальной. При 48-часовой экспозиции уровни погибших клеток при действии инфракрасного и оранжевого спектра сохраняются на высоких значениях, а при действии желтого и зеленого спектра снижаются в 2 раза.

При этом значения ИА% не совпадают с общим количеством погибших клеток: для оранжевого спектра они составляют $15,1 \pm 7,4\%$ через 24 часа и $8,1 \pm 6,8\%$ через 48 часов, не имея статистически значимых различий; а для желтого и зеленого статистически достоверно возрастают с $17,3 \pm 2,2$ до $27,4 \pm 0,5\%$ и с $18,1$ до $36,1 \pm 0,6\%$ соответственно (в обоих случаях $P < 0,01$). Результаты позволяют предположить значимое развитие апоптотического механизма гибели клеток после более длительной экспозиции, но, поскольку он мало задействован при действии желтой и зеленой частей спектра, то гибель клеток происходит менее интенсивно, чем после 24-часовой экспозиции, когда, по-видимому, она осуществляется путем некроза.

Отмеченная дозо-зависимость оказалась нехарактерна для действия синего и фиолетового спектра, которые оказывают сходный эффект как при высокой, так и при низкой дозе; при этом процент погибших клеток связан скорее со свойствами длины волны, чем с дозой. При применении этих частей спектра также происходят нарастание значений ИА% по мере увеличения экспозиции: для синего спектра с $15,8 \pm 3,7$ до $31,3 \pm 2,4\%$, для фиолетового – с $16,3 \pm 2,5$ до $23,7 \pm 1,7\%$ соответственно (в обоих случаях $P < 0,01$).

При воздействии больших доз вне зависимости от сроков (24 и 48 часов) показатели ИА% были статистически значимо

выше по сравнению с контролем. Так, облучение желтым спектром привело к повышению ИА % в 3,3 и 5,2 раза, зеленым – в 3,4 и 6,8 раза, синим в 2,9 и 5,9 раза, фиолетовым в 3,1 и 4,5 раза, а инфракрасным в 10,1 и 14,7 раза соответственно.

Выявлена особенность эффекта красного спектра: через 24 часа после применения высокой дозы ИА % составляет $22,1 \pm 3,3\%$, а через 48 часов он возрастает до $88,8 \pm 4,1\%$, что находится в соответствии с выраженным повышением общей гибели клеток K562 через 48 часов после облучения высокой дозой (таблица).

Значения ИА%, полученные в пробах, подвергавшихся действию больших доз, через 48 часов были достоверно выше по сравнению со значениями ИА%, полученными через 24 часа после воздействий. Для желтого спектра показатели составили $27,4 \pm 0,5$ против $17,3 \pm 2,2$ ($P < 0,01$); для зеленого – $36,1 \pm 0,6$ против $18,1$ ($P < 0,01$); для синего – $31,3 \pm 2,4$ против $15,8 \pm 3,7$ ($P < 0,01$), для фиолетового – $23,7 \pm 1,7$ против $16,3 \pm 2,5$ ($P < 0,01$); для инфракрасного – $78,3 \pm 12$ против $53,3 \pm 13,3$ ($P < 0,5$).

Таким образом, после проведения воздействия оптическим излучением в одних и тех же энергетических дозах, но различными полосами спектра на клетки культуры K562 были получены различные результаты. Оранжевый спектр вызывал непосредственную гибель клеток посредством некроза, в других случаях, как видно из полученных данных, были запущены механизмы апоптоза. Апоптоз или запрограммированная клеточная гибель является генетически детерминированным процессом, который может протекать в нормальных клетках и тканях организма на определенных стадиях его развития, либо может быть индуцирован в тех же самых клетках и тканях организма *in vivo* и полученных из них клеток и клеточных линий *in vitro* [13]. Апоптотическая гибель может быть вызвана самыми разнообразными физическими, химическими и биологическими факторами, но финальные фазы процесса протекают сходным образом независимо от индуктора гибели и типа клеток [10,14]. В нашем случае механизмы апоптоза были запущены с помощью электромагнитных воздействий оптического диапазона. Клетки культуры опухоли K562 претерпевают определенные морфологические изменения, отражающие происходящие в них биохимические процессы. Морфологически апоптоз проявляется гибелью единичных, беспорядочно расположенных клеток, что сопровождалось формированием округлых, окруженных мембраной телец, получивших название апоптотических телец [3,14]. Клетки сморщенные, выгля-

дят как овальные или округлые скопления эозинофильной конденсированной цитоплазмы с плотными фрагментами ядерного хроматина, что мы и наблюдали.

Поскольку энергетические дозы при всех воздействиях были одинаковы (либо малая $W=0,3$ Дж/см², либо в десять раз большая $W=3$ Дж/см²), а результаты в пробах получены разные, мы склонны прийти к заключению, что действенным фактором, обусловившим эти различия, была длина волны оптического излучения. Каждый спектр находится в опухолевой клетке свой участок воздействия свой акцептор, возбуждение которого и приводит к запуску механизмов апоптоза опухолевой клетки. Сроки проявления такого воздействия также различны, при действии $W=3$ Дж/см² апоптоз проявляется как через 24 так и через 48 часов, тогда как при дозе $W=0,3$ Дж/см² только через 48 часов.

Заключение

Полученные данные представляют собой научный интерес и могут быть использованы с целью выбора оптимальных параметров оптического излучения для достижения эффекта моделирования путей гибели опухолевых клеток.

Список литературы

1. Новоселова Е.Т., Фесенко Е.Е. Стимуляция продукции фактора некроза опухолей макрофагами мышей в условиях воздействия *in vivo* и *in vitro* слабых электромагнитных волн сантиметрового диапазона // Биофизика. – 1998. – Т.43, в.6. – С.1132-1134.
2. Карандашов В.И., Петухов Е.Б., Зродников В.С. Фототерапия. – М.: Медицина, 2001. – 340 с.
3. Кару Т.И. Воздействие низкоинтенсивного монохроматического света в видимой области на жизнедеятельность клетки // Применение лазеров в биологии, Всесоюзное совещание, октябрь 1983г. – М., 1983. – С.5-19.
4. Кару Г.И. Клеточные механизмы низкоинтенсивной лазерной терапии // Успехи современной биологии. – 2001. – Т.121, №1. – С.110-120.
5. Москвин С.В., Буйлин В.А. Основы лазерной медицины. – Тверь, 2006. – 256 с.
6. Прикладная лазерная медицина: Учебное и справочное пособие / Под ред. Х.П. Берлиена, Г.И. Мюллера. – М.: Интерэкспорт, 1997. – 234 с.
7. Фролов В.В., Дроздова Г.А., Риегер П., Благоданов М.Л. Начальные механизмы формирования «гипертонического сердца» // БЭБиМ. – 2004. – Т.137, №6. – С.249-252.
8. Шейко Е.А., Мордань Т.А. Модуляция НИЛО биосинтетической активности лимфоцитов периферической крови // Прикладная оптика-98. – СПб., 1998. – С.118.
9. Шейко Е.А., Шихлярова А.И., Куркина Т.А. Применения низкоинтенсивного лазерного излучения в целях повышения противоопухолевой эффективности циклофосфана // Вопросы онкологии. – 2004. – Т.50, №5. – С.576-579.
10. Широкова А.В. Апоптоз. Сигнальные пути и изменение ионного и водного баланса клетки // Цитология. – 2007, Т.40, №5. С.385-394.
11. Информационный подход к процессам повышения противоопухолевой резистентности / Шихлярова А.И. и др. III Международный Конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине». – СПб., 2003. – С.81-82.
12. Dendy P.P. Human tumors in short term culture. – London, e.a., Acad Press, 1976. – P.24-27.
13. Friis M.B., Friberg C.R., Shneider L. et al Cell Shrinkage as the signal to apoptosis in NIH 3T3 fibroblasts // J.Physiol. – 2005, v.567. – P.427-443.
14. Vermeulen k., Bockstaele D.R., Berneman Z.N. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer // Ann. Hematol. – 2005. – v.84. – P.627-639.