

УДК 615.831:616-006-092.4

ВЛИЯНИЕ ДЕЙСТВИЯ ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ЗЕЛЕННОГО И ОРАНЖЕВОГО СПЕКТРА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК КУЛЬТУРЫ C45

Шейко Е.А.

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

Целью исследования было изучение влияния зеленого и оранжевого света, подаваемого в одинаковой энергетической дозе на опухолевые клетки культуры саркомы 45. Электромагнитное излучение оптического диапазона получали от лазерно-светодиодного аппарата «Спектр –ЛЦ». Изучали действие оранжевого с $\lambda=0,59$ мкм и зеленого с $\lambda=0,56$ мкм спектров. Излучение подавалось в режиме с Н-5Гц- первая группа, Н-50 Гц вторая группа, 5-50Гц- третья группа. для всех режимов одинаковой общей энергетической дозой – $W=3$ Дж/см². Затем пробы помещали в термостат на 24 часов при 37С°. Оценивали состояние клеток. Было показано, что длина волны, а не общая энергетическая доза, является значимым фактором для активации путей гибели клеток опухоли. При действии оранжевого спектра гибель клеток C45 происходит путем некроза, а при действии зеленого света путем апоптоза.

Ключевые слова: культура клеток C45, оптические излучения зеленого и оранжевого спектра, апоптоз, некроз

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

Sheiko E.A.

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

To study the influence of green and orange spectrum, the energy supplied to the same dose, on tumor cells culture of sarcoma C45 was the main aim of this study. Electromagnetic radiation in the optical range was obtained from laser-LED device «Spectrum-LC». The effects of orange spectrum with $\lambda = 0,59$ nm, green with $\lambda = 0,56$ nm on cells culture were investigated. The radiation was with the same energy for all dosage regimes – $W = 3$ J/cm² with Н=5 Gh – the first group, Н=50 Gh – the second group, 5-50 Gh –the third group. The forth group was control- tumor cells with out optical effects. Then the samples were placed in an incubator at 24 hours at a temperature of 37C°. Cytological characteristics were studied. 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. Under the action of the orange spectrum C45 cell death occurs by necrosis and the action of the green light by apoptosis.

Keywords: sarcoma cell culture, optical radiation of green and orange spectrum, apoptosis, necrosis

В настоящее время развитие передовых технологий лечения онкологических заболеваний, подтвержденных экспериментальными исследованиями последних лет, свидетельствуют об актуальности использования физических факторов, таких как электромагнитное излучение оптического диапазона, в качестве средств и методов, усиливающих эффективность базовой противоопухолевой терапии, обладающих в определенных режимах ингибирующим воздействием на опухоль, процессы метастазирования и рецидивирования и способных купировать ее возможные осложнения.

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 при нормально протекающих физиологических процессах, но и для поиска оптимальных способов воздействия на указанные клеточные функции, при возникновении патологических состояний, в частности, злокачественных

опухолей. [8, 11, 12]. В настоящий момент активно разрабатываются методы с использованием различных физических факторов с механизмами действия, направленными на активацию различных систем противоопухолевой защиты, способных блокировать процессы пролиферации и индуцировать апоптоз опухолевых клеток, стимулировать цитотоксичность естественных киллеров [2, 3, 4, 5, 6, 9]. Актуальность использования оптических излучений связана с тем, что для получения выраженной ответной реакции достаточно небольших доз таких излучений [7, 8]. С этих позиций представляется интересным исследовать прямое действие электромагнитных колебаний оптического диапазона на опухолевые клетки. Целью настоящего исследования было изучение прямого эффекта зеленого и оранжевого спектра с фиксированной одинаковой энергетической дозой на жизнеспособность опухолевых клеток культуры C45.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили опухолевые клетки саркомы C45. Для получения культуры кле-

ток брали кусочек опухоли саркомы 45 размером 0,5x0,5 см гомогенизировали, после чего клеточную суспензию фильтровали через тонкое стальное сито, наслаивали на фикол-верографин $\rho=1.078$ и центрифугировали при 1500 об/мин. 15 минут. Полученное «кольцо» из опухолевых клеток трижды отмывали средой 199, взвесь клеток разводили этой же средой до $2 \cdot 1,5 \cdot 10^6$ и распределяли по пенициллиновым флаконам или флаконах Карреля по 200000 в 2 мл питательной среды 199, смешанной со средой Игла (1:1) с добавлением 10% сыворотки плода коровы в присутствии гентамицина (100 ед/мл), согласно требованиям, предъявленным к работе с клеточными культурами [10]. Через два часа осуществляли изучаемые воздействия, показатели снимали на следующий день.

Всего исследовали четыре группы для каждого спектра. Опытные группы подвергались электромагнитным излучениям оптического диапазона, полученным от лазерно-светодиодного аппарата «Спектр-ЛЦ». Исследовали: оранжевый $\lambda=0,65$ мкм и зеленый $\lambda=0,56$ мкм спектр. Излучение подавалось с одинаковой для всех режимов энергетической дозой: $W=3$ Дж/см². В первой группе проб излучение подавалось с частотой 5 Гц, во второй – 50 Гц, в третьей – 5Г-50 Гц. Четвертая группа – контрольная, опухоль без воздействия. Затем пробы помещали в термостат на 24 часа при 37°C. Контрольные пробы инкубировали в аналогичных условиях без облучения. Было проведено четыре серии таких экспериментов.

Количество клеток культуры С45 определяли с использованием камеры Горяева, процент погибших 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. Цитопатический индекс вычисляли как отношение числа погибших к общему числу опухолевых клеток (ЦПИ): при 1 к 10 оценивали как низкий ЦПИ, 1 к 2(5) – как средний ЦПИ, и 1 к 1 (2:3) – как высокий ЦПИ. Одновременно готовили мазки, фиксировали, окрашивали по Романовскому-Гимзе, микроскопировали и проводили оценку цитологического состояния С45, рассчитывали индекс апоптоза [3, 5]. Достоверность различий средних величин определяли с применением t критерия Стьюдента и непараметрическими методами.

Результаты исследования и их обсуждение

На контрольных цитологических препаратах культура С45 была представлена однотипными клетками веретенообразной формы, плотно прилегающими друг к другу, с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением (выше 1). Цитоплазма отчетливо базофильна. Ядро округлое, гомогенное, базофильное с наличием 2-3 ядрышек. Типичным являлось наличие в поле зрения значительного количества клеток с митотическими фигурами деления. Регистрировался низкий индекс апоптоза ($4,8 \pm 0,1\%$). В единичных клетках отмечались патологические фигуры деления. После воздействия на клетки культуры С45 оптическим излучением различного спектрального диа-

пазона были получены однонаправленные изменения клеток культуры различной степени выраженности, но сходные между собой. Была отмечена 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 «голых» одиночно лежащих клеток. Ядерно-цитоплазматическое отношение было меньше 1. Такие изменения в литературе трактуются как морфологические признаки апоптоза [3, 8, 11, 12].

Следует отметить, что при действии оранжевого спектра наравне с перечисленными выше морфологическими характеристиками клеток были обнаружены большие массивы некротизированных, с поврежденными мембранами, лизированных клеток С45, утративших четкость формы. Было отмечено большое количество погибших клеток в виде мелкого детрита или теней. Значения индексов апоптоза (ИА%) были относительно низкие (табл. 1). Действие оранжевой части спектра приводит к повышению количества погибших клеток культуры через 24 по сравнению с действием зеленого спектра; при 5Гц в 1.7 раз, при 50Гц в 1.4 раза, при 5-50Гц в 1.3 раза. (табл. 1). Индексы ЦТИ при воздействии оранжевым спектром были высокие. Следует отметить, что при применении оранжевого света значения ИА% были достоверно ниже (при 5Гц) или достоверно не отличались от контрольных (при 50Гц), из чего можно заключить, что отмеченная гибель клеток, по-видимому, не является апоптотической. Судя по цитологическим изменениям, она происходила преимущественно за счет некроза, хотя в небольшой части клеток были обнаружены и изменения, характерные для апоптоза. Отмеченные изменения могут свидетельствовать о прямом цитотоксическом, разрушительном действии оранжевого спектра в используемой дозе на клетки культуры С45 [10].

В пробах после воздействия зеленого света 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 по сравнению с воздействиями оранжевого спектра (см таблицу): в 8 раз выше, чем при 5 Гц; в 7,8 раз выше,

чем при 50Гц и в 2,8 раз выше в группе 5-50Гц. ($P<0,01$). Облучение той же дозой зеленого спектра вызывало повышение % погибших клеток, по сравнению с контролем, но при снижении индекса ЦТИ. Полученные данные позволяют предположить, что вклад апоптоза в общую гибель клеток оказался более существенным при действии зеленого спектра по сравнению с оранжевым

Как видно из таблицы, различные длины волн неодинаково влияют на гибель кле-

ток С45. Во всех изученных опытных пробах число погибших клеток по сравнению с контролем было статистически достоверно выше ($P<0,01$). При сравнении уровня погибших клеток в зависимости от частоты подачи сигнала, при обоих спектрах и постоянной энергетической дозе, следует отметить увеличение % гибели опухолевых клеток при нарастании частоты фактора: при сравнении 5Гц и 50Гц в среднем 1,3 раза, при 5Гц и 5-50Гц в 1,5 раз, а 50Гц и 5-50Гц в 1,2 раза. ($P<0,01$).

Влияние электромагнитных колебаний оптического диапазона с различной длиной волны на гибель клеток культуры С45

Показатели	W=3 Дж/см ²							
	Зеленый свет $\lambda=0,56\mu\text{м}$				Оранжевый свет $\lambda=0,65\mu\text{м}$			
	% гибели	ЦТИ у.е	ИА %	ЦПИ у.е	% гибели	ЦТИ у.е	ИА %	ЦПИ у.е
5Гц	42±0,3*	7,4±0,1	22,4±0,7	средний	70±0,6	13±0,3	2,8±0,8*	высокий
50Гц	63±0,7*	11,6±0,1	36,7±0,1	средний	85±1,3	16±0,3	4,6±4,1	высокий
5-50Гц	75±0,7*	4,4±0,4	42,4±3,3	высокий	97±3,1	18,4±2,1*	15,4±0,1	высокий
Контроль	5±0,1	-	4,8±0,1*	низкий-	5±0,1	-	4,8±0,1	низкий-

Примечание.* отличия достоверны по отношению к контролю при $p\leq 0,05$.

При анализе цитопатических индексов, получены следующие результаты: в контроле без воздействия – самый низкий, в остальных группах: при оранжевом спектре во всех пробах – высокий, при зеленом свете ЦПИ – средний при 5 Гц и при 50 Гц, и только в пробах 5-50 Гц – высокий (табл. 1). Степень выраженности изменений С45 зависит также от частоты подачи сигнала. Наибольшая активность гибели опухолевых клеток была зафиксирована при частоте 5-50 Гц.

Таким образом, после проведения воздействия оптическим излучением в одних и тех же энергетических дозах, но различными полосами спектра на клетки культуры С45 были получены различные результаты. Оранжевый спектр вызывал непосредственную гибель клеток путем 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* [11]. Апоптотическая гибель может быть вызвана самыми разнообразными физическими, химическими и биоло-

гическими факторами, но финальные фазы процесса протекают сходным образом независимо от индуктора гибели и типа клеток [9, 12]. Нами установлено, что механизмы апоптоза были запущены с помощью некоторых электромагнитных воздействий оптического диапазона. Апоптотические клетки культуры опухоли С45 претерпевают определенные морфологические изменения, отражающие происходящие в них биохимические процессы. Морфологически апоптоз проявлялся гибелью единичных, беспорядочно расположенных клеток, что сопровождалось формированием округлых, окруженных мембраной телец, получивших название апоптотические тельца [3, 8, 12]. Апоптоз – форма гибели клетки, проявляющаяся в уменьшении ее размера, конденсации и фрагментации хроматина, уплотнении наружной и цитоплазматических мембран без выхода содержимого клетки в окружающую среду [3]. Подобные изменения, в разной степени выраженности, были нами зафиксированы на культурах К562, L 929, лимфосаркомы Плисса и др. при действии различных оптических излучений [4, 5, 6, 7, 8, 9]. Наблюдаемые нами в этом исследовании морфологические изменения опухолевых клеток культуры С45, носят сходный характер: клетки сморщенные, выглядят как овальные или округлые скопления эозинфильной конденсирован-

ной цитоплазмы с плотными фрагментами ядерного хроматина, причем такие морфологические признаки в культуре С45 были более выражены при действии зеленого света. При действии оранжевого света гибель клеток опухоли осуществляется преимущественно путем некроза.

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. Карандашов В.И., Петухов Е.Б., Зродников В.С. Фототерапия. – М.: Медицина, 2001. – 340 с.
2. Москвин С.В., Буйлин В.А. Основы лазерной медицины. – Тверь: Изд-во «Триада», 2006. – 256 с.
3. Манских В.Н. Морфологические методы верификации и количественной оценки апоптоза // Бюл. Сиб. Медицины. – 2004. – Т.1. – С. 63-70.
4. Шейко Е.А., Златник Е.Ю., Загора Г.И. Влияние электромагнитных излучений оптического диапазона на клетки лимосаркомы Плисса *in vitro* // сб. Совр. подходы к терапии больных распространенным раком отдельных локализаций. – М., 2005. – С. 662-664.
5. Шейко Е.А., Шихлярова А.И., Златник Е.Ю. и др. Воздействие низкоинтенсивного монохроматического света на клетки культуры фибробластов L929 // БЭБиМ. – 2006. – Т.141, в.6. – С.689-691.
6. Шейко Е.А., Златник Е.Ю., Загора Г.И. Монохроматическое излучение красного света как фактор стимулирующий естественные механизмы гибели опухолевых клеток *in vitro* // Лазерная медицина. – 2008. – Т.12, №1. – С. 15-18.
7. Шейко Е.А., Белан О.С. Влияние монохромного светодиодного излучения красной и синей полос света на кровь больных раком легкого в экспериментальных исследованиях *in vitro* // Лазерная медицина. – 2009. – Т.13, №2. – С. 35-38.
8. Шейко Е.А., Златник Е.Ю., Шихлярова А.И. и др. Особенности действия оптического излучения видимого и длинноволнового спектра на клетки культуры к562 : экспериментальные исследования *in vitro* // Межд. Журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. – №8(3). – С.86-90.
9. Шихлярова А.И., Шейко Е.А., Марьяновская Г.Я. и др. Влияние сверхнизкочастотного МП со сканированием частоты на жизнеспособность клеток С45 в опытах *in vitro* // Акад.Журнал Запад. Сибири. – 2013. – Т.9. – С.18.
10. Dendy P.P. Human tumors in short term culture.- London: Acad Press, 1976.- P.24-27.
11. Friis M.B., Friborg C.R., Shneider L. et al Cell Shrinkage as the signal to apoptosis in NIH 3T3 fibroblasts // J. Physiol. – 2005. – Vol. 567. – P. 427-443.
12. Vermeulen K., Bockstaele D.R., Berneman Z.N. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer // Ann. Hematol. – 2005. – Vol.84. – P.627-639.