

ПРОЛИФЕРАЦИЯ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ПРИСУТСТВИИ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОСЛЕ КУРСА ФОТОТЕРАПИИ ВИДИМЫМ И БЛИЖНИМ ИНФРАКРАСНЫМ СВЕТОМ

А. А. Зимин, К. А. Самойлова, Н. А. Жеваго

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: samoilova@yandex.ru*

Низкоинтенсивное видимое (НВ) и ближнее инфракрасное (БИК) излучения от лазерных и нелазерных источников используются при лечении осложнений у онкологических больных, развивающихся после хирургического удаления опухоли, химио- и лучевой терапии. Остается, однако, открытым вопрос о характере влияния этого физиотерапевтического метода на пролиферативную активность опухолевых клеток пациентов с онкопатологией и клеток, участвующих в процессах ранозаживления — фибробластов (ФБ) и кератиноцитов (КЦ). В настоящей работе изучено влияние курса облучений больных РМЖ в послеоперационном периоде видимым и БИК светом (480—3400 нм, 95%-ная поляризация, 40 мВт/см², 12 Дж/см²) на пролиферативную активность КЦ и ФБ человека, а также нескольких видов опухолевых клеток (BT-474, HBL-100, Hs578T и A431) в присутствии сыворотки крови больных РМЖ. 1-недельный курс фототерапии видимым и БИК светом у больных РМЖ приводил к повышению пролиферации ФБ (относительно исходного уровня) и КЦ (относительно послеоперационного уровня) на 22 и 28 % соответственно. Пролиферативная активность клеток BT-474, Hs578T и A431 снижалась на 31.5, 8.97 и 6.47 % относительно дооперационного (исходного) уровня соответственно, тогда как пролиферация клеток BT-474, HBL-100, Hs578T и A431 была также ниже в сравнении с послеоперационным уровнем на 32, 16, 8.65 и 6.26 % соответственно. Полученные результаты свидетельствуют в пользу онкологической безопасности курсового облучения видимым и БИК светом больных РМЖ в период послеоперационной реабилитации.

Ключевые слова: рак молочной железы, видимый и ближний инфракрасный свет, пролиферация опухолевых клеток, фибробласты и кератиноциты.

Принятые сокращения: БИК — ближний инфракрасный, КЦ — кератиноциты, НВ — низкоинтенсивное видимое, РМЖ — рак молочной железы, ФБ — фибробласты, ЭТС — эмбриональная телячья сыворотка.

Уже многие годы НВ и БИК излучения используются в клинической практике для стимуляции репаративных процессов, гемопозеза и иммуногенеза, т. е. для активации на системном уровне пролиферативных процессов. Однако применение современных фототерапевтических методов, основанных на использовании лазерных, светодиодных и других источников этих излучений, сдерживается из-за опасения возможности стимуляции пролиферации не только нормальных, но и трансформированных клеток, которые постоянно присутствуют в организме в том или ином количестве. Опасения базируются на давно и неоднократно установленном факте, свидетельствующем о том, что излучение оптического диапазона стимулирует пролиферацию опухолевых клеток в условиях *in vitro* (Karu, Ryatibrat, 1987; Pinheiro et al., 2002; Renno et al., 2007). При этом, однако, не учитывается то обстоятельство, что в клинической онкологии накоплен многолетний опыт успешного применения низкоинтенсивной фототерапии для ускорения заживления послеоперационных ран, радиационных повреждений слизистых и кожи, восстановления гемопозеза и иммуногенеза после радикального удаления опухолей, а также химио- и лучевой тера-

пии. Как показывает проведенный нами анализ опубликованных за последние 25 лет работ в области экспериментальной и клинической онкологии (Zimin et al., 2008), различные фототерапевтические методы не только не ускоряют опухолевый рост и метастазирование, но значительно тормозят эти процессы у человека и животных. Природа ингибирования оптическим излучением пролиферации опухолевых клеток в условиях *in vivo* остается неизвестной.

Исследуя в последнее десятилетие системное действие видимого света и БИК при облучении поверхности тела (ускорение ранозаживления, противовоспалительное и иммуномодулирующее), мы доказали, что ключевая роль в его формировании принадлежит транскутанной фотомодификации небольших количеств крови пациента, которая в течение нескольких минут приводит к изменению свойств и функционального состояния клеток всех типов и многих компонентов плазмы всего объема циркулирующей крови (Samoilova et al., 1998; Жеваго и др., 2002). Фотоактивация конститутивной NO-синтазы (Samoilova et al., 2008) в клетках эндотелия и крови ведет к стимуляции синтеза оксида азота (NO), который не толь-

ко улучшает микроциркуляцию крови на локальном и системном уровнях, но обладает и противоопухолевым действием (Проскуряков и др., 2000). Существенные изменения происходят также в цитокиновой сети: в сыворотке крови снижается (исходно повышенное) содержание провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-6 и IL-12) и значительно возрастает уровень противовоспалительных факторов (IL-10 и TGF β 1); особенно резко возрастает концентрация интерферона гамма (IFN- γ) при его исходно низком и нормальном уровнях (Жеваго и др., 2002).

Ранее при изучении ростостимулирующей активности плазмы сыворотки фотомодифицированной крови человека мы культивировали клетки человека из различных тканей на питательных средах, содержащих вместо ЭТС плазму крови здоровых доноров (Белишева, Самойлова, 1984; Самойлова и др., 1984). При этом активность сыворотки выявляли по изменению скорости пролиферации различных клеток человека в условиях *in vitro*. В этих условиях клетки сохраняли высокую жизнеспособность и активно пролиферировали, а их параллельное культивирование на стандартной среде, содержащей 10 % ЭТС, позволяло оценить индивидуальные ростостимулирующие свойства крови каждого человека. В дальнейшем этот подход был использован при оценке эффективности курса фототерапии у добровольцев по уровню пролиферации КЦ и ФБ при добавлении сыворотки их крови (2.5 %) в среду культивирования (Самойлова и др., 2003; Богачева и др., 2004). Важным итогом этих двух работ были следующие факты: ростостимулирующая активность культуральной среды для ФБ и КЦ, содержащей 2.5 % плазмы крови добровольцев, не отличается от таковой среды, содержащей 10 % ЭТС; облучение небольшого участка поверхности тела человека видимым светом приводило к появлению в крови растворимых факторов, способствующих усилению пролиферации ФБ и КЦ в условиях *in vitro*.

Ведущее место в структуре онкологических заболеваний женщин занимает РМЖ, при этом частота возникновения этого заболевания ежегодно увеличивается на 2 % (Тарутинов и др., 1996; Тюлядин, Моисеенко, 2004). В связи с этим поиск фототерапевтических методов послеоперационной иммунореабилитации пациентов с этим заболеванием является важной задачей современной медицины. При этом необходимо знать характер влияния этих методов на пролиферацию клеток РМЖ для исключения возможности рецидивов и метастазирования в послеоперационном периоде.

Учитывая вышеизложенное, мы поставили перед собой задачу изучить влияние послеоперационного курса фототерапии видимым и БИК светом на характер изменений пролиферативной активности нормальных и опухолевых клеток у больных РМЖ.

Материал и методика

Работа выполнена на базе клинической больницы РАН (Санкт-Петербург). Этический комитет больницы рассмотрел дизайн исследования и дал разрешение на его проведение.

Больные РМЖ и исследуемые образцы крови. В исследовании приняли участие 17 больных РМЖ I—II стадии, которых лечили хирургически. Все пациенты были рандомизированно разделены на основную и контрольную группы, в которых больные были сопоста-

вимы по возрасту (54.3 ± 3.87 и 57.6 ± 2.99 года соответственно) и стадии опухолевого процесса согласно классификации TNM. Диагноз устанавливался на основании результатов маммографического, ультразвукового и цитологического исследований. Больным контрольной группы ($n = 7$) проводили стандартный курс послеоперационной реабилитации. Больным основной группы ($n = 10$) начиная с 1-х сут после операции дополнительно проводили курс фототерапии в течение 7 сут.

Образцы сыворотки крови больных выделяли за 1 сут до операции, через 1 сут и на 8-е сут после операции. Сыворотку из цельной крови выделяли центрифугированием в течение 10 мин при 1500 g. После этого образцы индивидуальных сывороток замораживали при -20 °C. Перед тестированием ростостимулирующих свойств образцы размораживали. Тепловую инактивацию сыворотки больных и ЭТС не проводили, поскольку она может привести к нарушению активности цитокинов и ростовых факторов, которые влияют на пролиферацию изучаемых в работе клеток-мишеней. Непосредственно после размораживания начинали готовить среды для культивирования клеток-мишеней с добавлением сывороток каждого больного на соответствующий срок тестирования. При приготовлении сред в каждую микропробирку вносили 15 мкл индивидуальной сыворотки и 585 мкл питательной среды, необходимой для культивирования клеток каждого типа (т. е. готовые среды содержали 2.5 % сывороток больных). Полученные среды вносили в 96-луночные планшеты с клетками вместо ЭТС.

Фототерапия. 7-дневный курс ежедневного облучения пояснично-крестцовой области больных РМЖ видимым и БИК светом производили с использованием швейцарского аппарата Bioptron-2 (480—3400 нм, 95%-ная поляризация, 40 мВт/см², доза, 12 Дж/см², время облучения 10 мин, диаметр области облучения 15 см). Методика фототерапии была разработана ранее (Samoilova et al., 1998).

Культивирование опухолевых клеток человека. Использовали три линии клеток РМЖ человека (BT-474, HBL-100, Hs578T) и клетки эпидермоидной карциномы A431. Все клетки получены из коллекции Банка клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Две линии клеток РМЖ (BT-474 и HBL-100) культивировали в питательной среде RPMI 1640 (Биолот, Россия), содержащей 10 % ЭТС (Биолот, Россия), 80 мкг/мл гентамицина (Sigma, США) и для клеток BT-474 — 10 мкг/мл бычьего инсулина (Sigma, США). Для экспериментов клетки высевали в 96-луночные планшеты с плотностью $12.5 \cdot 10^3$ клеток на лунку и культивировали в атмосфере с 5 % CO₂ при 37 °C. Через 2 ч после прикрепления клеток к пластику проводили смену питательной среды, добавляя 2.5 % сыворотки больных РМЖ (вместо 10 % ЭТС).

Опухолевые клетки двух других линий (Hs578T и A431) культивировали в питательной среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей 10 % ЭТС и 80 мкг/мл гентамицина и дополнительно 10 мкг/мл бычьего инсулина для клеток Hs578T. Культивирование клеток проводили в 96-луночных планшетах с плотностью $1 \cdot 10^4$ клеток на лунку в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °C. Смену питательной среды с добавлением сыворотки больных РМЖ проводили таким же образом, как и в предыдущем случае.

Культивирование ФБ. В работе использованы постнатальные ФБ крайней плоти человека, полученные из коллекции Банка клеточных культур Института цито-

логии РАН. Клетки культивировали в питательной среде Iscove's MDM (StemCell Technologies, США) с добавлением 10 % ЭТС. Для экспериментов клетки высевали в 96-луночные планшеты с плотностью $1 \cdot 10^4$ клеток на лунку и культивировали в атмосфере 5 % CO_2 при 37 °С. Через 2 ч после прикрепления клеток к пластику питательную среду меняли, добавляя сыворотку больных РМЖ (2.5 %).

Культивирование КЦ. Выделение и культивирование КЦ из фрагментов кожи лица практически здоровых женщин, полученных при косметических операциях, проводили по методу Рейнвальда и Грина (Rheinwald, Green, 1975) в модификации (Юдинцева и др., 1999). Изолированные из базального слоя эпидермиса клетки суспендировали в смеси питательных сред DMEM и F12 (3 : 1) с добавлением 10 % ЭТС, высевали в 96-луночные планшеты с плотностью $4 \cdot 10^4$ клеток на лунку и культивировали в атмосфере 5 % CO_2 при 37 °С. Через 2 сут проводили смену питательной среды с добавлением эпидермального фактора роста (ЭФР, 10 мг/мл), инсулина, гидрокортизона, холерного токсина, трансферрина, аденина и лиотиронина, однако вместо 10 % ЭТС вносили 2.5 % сыворотки крови необлученных или облученных больных РМЖ, которую получали за 1 сут до мастэктомии, а также через 1 и 8 сут после операции.

Продолжительность культивирования клеток каждой линии составляла для клеток РМЖ (BT-474, Hs578T и HBL-100) 72 ч, для ФБ, КЦ и A431 — 60 ч. Для оценки исходного уровня пролиферации клеток всех изучаемых линий в присутствии 2.5 % сывороток больных их параллельно культивировали на стандартной питательной среде, т. е. в присутствии 10 % ЭТС. Клетки каждой линии культивировали с сыворотками крови 7 больных, получавших стандартный курс послеоперационной реабилитации, и с сыворотками крови 10 больных, которым назначали фототерапевтический курс видимым и БИК светом. Тестирование сывороток больных проводили на трех сроках (до операции, через 1 и 8 сут после) в трех параллелях. Опыт повторяли 3 раза.

Оценка пролиферации ФБ, КЦ и опухолевых клеток человека. Число клеток определяли косвенно по изменению оптической плотности окрашенных ядер в 96-луночных планшетах, используя кристалл-виолет. Авторами этого метода (Mosman, 1983; Kueng et al., 1989) было установлено, что между оптической плотностью экстрагированного из ядер клеток кристалл-виолета и числом клеток существует линейная зависимость. Перед фиксированием клеток в 70%-ном этиловом спирте (5 мин) проводили двукратную отмывку клеток в лунках раствором PBS. После фиксации вносили кристалл-виолет (0.1 % на 10 мин), затем отмывали лунки с клетками дистиллированной водой. Далее краситель экстрагировали 10%-ной уксусной кислотой в течение 20 мин на шейкере при скорости вращения 150 об/мин. Измерение оптической плотности экстрагированного красителя при 570 нм проводили на планшетном спектрофотометре STATFAX 2100 (Awareness Technology, США).

Статистическая оценка результатов. Использовали компьютерную программу Statistica 6.0. Достоверность различий числа клеток, культивируемых с сывороткой крови больных до операции, через 1 и 8 сут после операции, а также через 24 ч после 7-дневного курса фототерапии, оценивали непараметрическим методом для попарно связанных результатов, используя критерий Вилкоксона U.

Результаты

Пролiferативная активность нормальных и опухолевых клеток. 1. Клетки ФБ. О пролиферации клеток судили по интенсивности окраски кристалл-виолетом, которая прямо пропорциональна числу клеток (Mosman 1983; Kueng et al., 1989). Исходные (до операции) показатели пролиферации ФБ при культивировании с образцами сыворотки крови 17 больных РМЖ в контрольной и основной группах варьировали соответственно в 3.8 и 2.9 раза и в среднем были достоверно ниже, чем при культивировании с ЭТС (110 против 206 отн. ед. в контрольной группе и 114 против 193 отн. ед. в группе больных, получавших курс фототерапии). Через 1 сут после операции пролиферативная активность клеток в контрольной и основной группах не менялась (рис. 1). У больных контрольной группы пролиферация клеток не менялась на всех сроках тестирования (т. е. за 1 сут до операции и через 1 и 8 сут после мастэктомии). Однако у пациентов основной группы, которым в течение 7 сут после операции проводили курс фототерапии, регистрировалось достоверное повышение пролиферативной активности клеток со 114 (исходный уровень) до 134 отн. ед. у 6 больных РМЖ этой группы (рис. 1).

2. Клетки КЦ. Показатели пролиферативной активности этих клеток до операции (т. е. исходные) в присутствии сыворотки крови больных варьировали в контрольной и основной группах соответственно в 2.3 и 3.7 раза и в среднем были достоверно ниже по сравнению с активностью клеток при культивировании с ЭТС (83 отн. ед. по сравнению со 129 в присутствии ЭТС в контрольной группе и 57 отн. ед. по сравнению со 125 — в основной). Однако обе группы больных (контрольная и основная) были сопоставимы по исходным значениям пролиферативной активности (83 и 57 отн. ед. соответственно, $P > 0.05$). Через 1 сут после удаления опухоли пролиферация клеток в обеих группах не изменялась (рис. 1). У больных контрольной группы пролиферативная активность клеток не менялась и через 7 сут после операции. Однако у пациентов основной группы, которым в течение 7 сут после операции проводили курс фототерапии, наблюдали повышение пролиферации с 50 отн. ед. (послеоперационный уровень) до 62 у 8 больных РМЖ ($P < 0.05$).

3. Клетки BT-474. Показатели исходной пролиферативной активности этих клеток в присутствии сыворотки крови больных РМЖ варьировали в контрольной и основной группах соответственно в 3.3 и 2.7 раза и в среднем были достоверно ниже, чем в присутствии ЭТС (219 отн. ед. против 525 при культивировании с ЭТС в контрольной группе и 259 отн. ед. против 583 — в основной). Через 1 сут после операции пролиферативная активность клеток в обеих группах не изменялась (рис. 2). Через 7 сут после операции в контрольной группе больных отмечалось повышение пролиферации клеток с 240 (исходный уровень) до 263 отн. ед. по сравнению с основной группой, в которой пролиферативная активность клеток в этот же срок тестирования относительно начального уровня снижалась с 259 до 175 отн. ед. (рис. 2). Причем это снижение наблюдалось у 6 больных. Более того, снижение пролиферации клеток с 251 до 175 отн. ед. у 7 больных относительно послеоперационного уровня было достоверным ($P < 0.05$).

4. Клетки HBL-100. Показатели исходной пролиферативной активности этих клеток при культивировании с сыворотками крови больных РМЖ варьировали в конт-

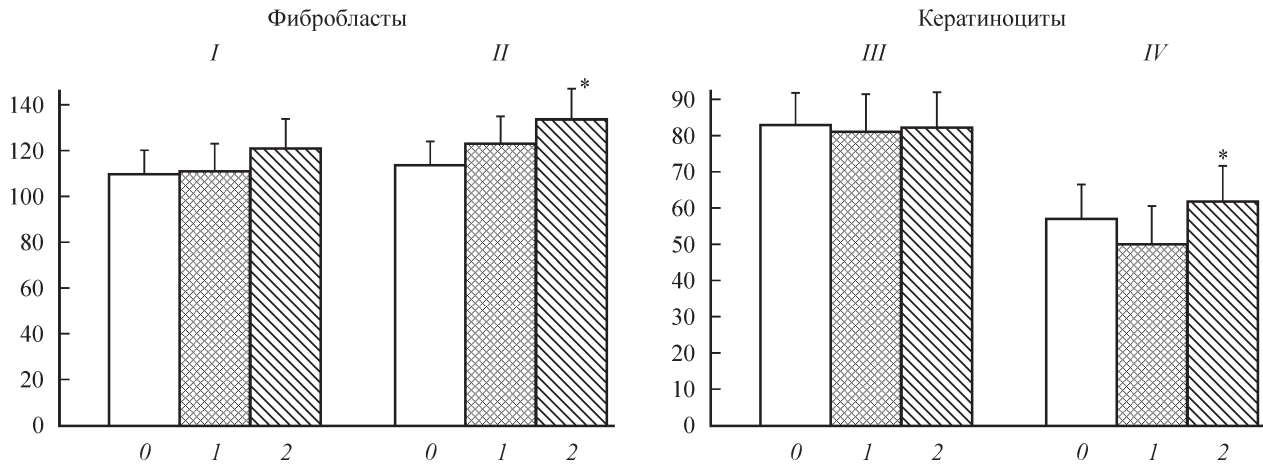


Рис. 1. Влияние сыворотки (2,5 %) больных РМЖ, не прошедших (I, III) и прошедших (II, IV) курс фототерапии, на пролиферацию кератиноцитов (КЦ) и фибробластов (ФБ).

По горизонтали — три срока тестирования сыворотки: 0 — исходный уровень до операции, 1 — через 1 сут после операции, 2 — через 8 сут после операции; по вертикали — оптическая плотность, отн. ед. Звездочкой отмечена достоверность отличий между уровнями исходным и через 8 сут после операции (II, $P < 0.05$), а также между уровнями после операции через 1 и 8 сут (IV, $P < 0.05$). Здесь и на рис. 2: о пролиферации судили по интенсивности окрашивания клеток кристалл-виолетом. Сыворотку добавляли в среду культивирования.

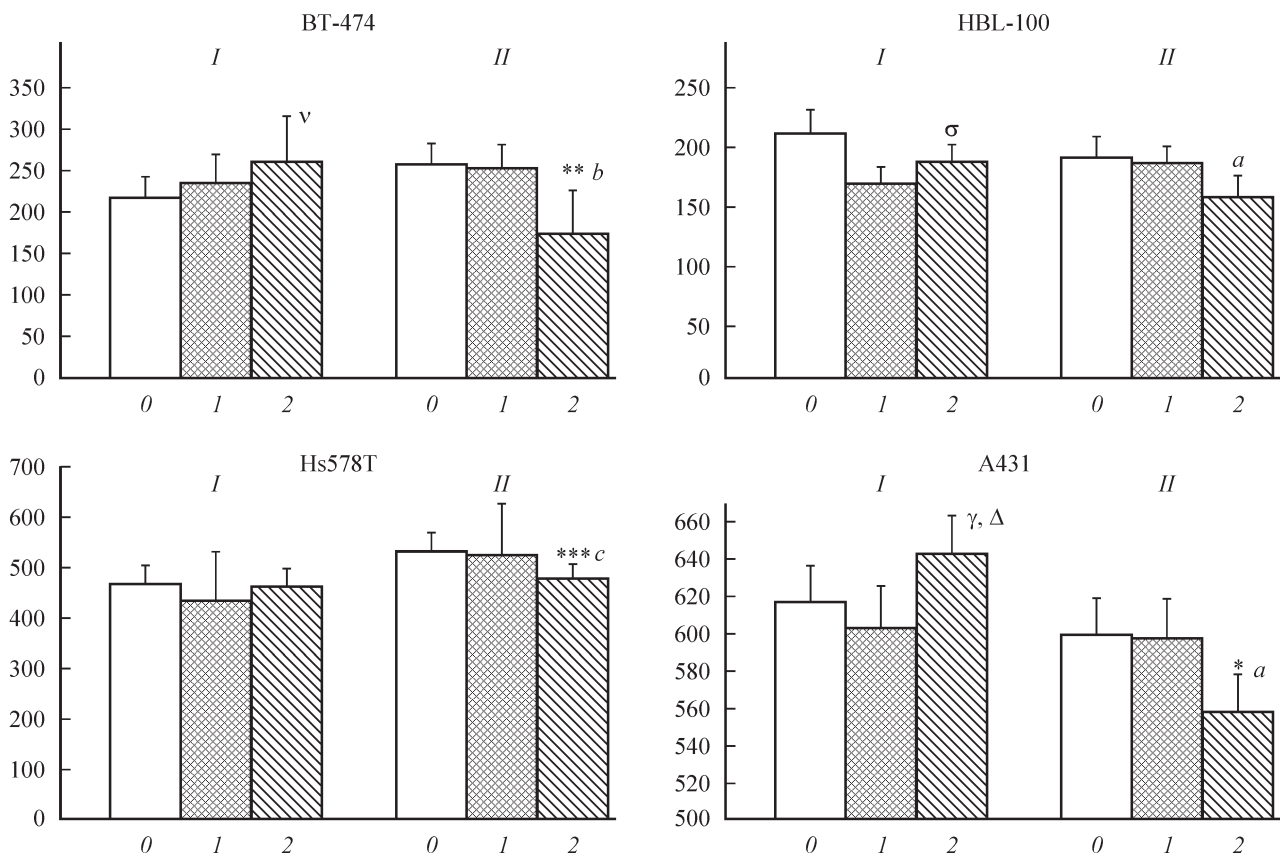


Рис. 2. Влияние сыворотки (2,5 %) больных РМЖ без курса фототерапии (I) и после курса фототерапии (II) на пролиферацию 4 опухолевых линий человека — BT-474, HBL-100, Hs578T и A431.

По осям — то же, что и на рис. 1. Звездочки указывают на достоверные отличия от исходного уровня: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Достоверные различия между уровнями через 1 и 8 сут: a — $P < 0.05$, b — $P < 0.01$, c — $P < 0.001$. γ — достоверное различие между группами относительно исходного уровня при $P < 0.05$; Δ и σ — достоверные различия между группами относительно послеоперационного уровня соответственно при $P < 0.05$ и $P < 0.01$.

рольной и основной группах соответственно в 3.4 и 3.6 раза и были достоверно ниже, чем при культивировании клеток с ЭТС (209 отн. ед. против 343 в контрольной группе и 189 отн. ед. против 370 в основной). Операция не изменяла пролиферативную активность клеток в обеих группах (рис. 2). Через 7 сут в контрольной группе больных РМЖ отмечалось повышение пролиферации клеток этой линии с 167 до 182 отн. ед. (рис. 2). Между тем в основной группе в этот же срок тестирования пролиферативная активность снизилась со 184 до 157 отн. ед. относительно уровня после операции ($P < 0.05$). Причем такое снижение наблюдалось у 7 больных. Регистрируемое изменение пролиферации клеток оказалось достоверным ($P < 0.05$) между двумя группами.

5. Клетки Hs578T. Регистрировалась вариабельность исходных показателей пролиферативной активности клеток при культивировании с сывороткой крови больных в контрольной и основной группах соответственно в 2.2 и 2.3 раза. При этом пролиферативная активность клеток в этих группах не отличалась от таковой в присутствии ЭТС. Операция не изменяла пролиферацию клеток в обеих группах (рис. 2). Через 7 сут после операции в контрольной группе не происходило изменений показателей пролиферативной активности клеток, тогда как в основной группе в этот срок регистрировалось ее достоверное снижение с 533 до 476 отн. ед. относительно исходного уровня, а также относительно уровня после операции с 527 до 476 отн. ед. ($p < 0.01$).

6. Клетки A431. Показатели исходной пролиферативной активности клеток за 1 сут до операции (исходно) варьировали в контрольной группе в 1.8 раза, в основной — в 2 раза и были достоверно ниже, чем при культивировании с ЭТС (617 отн. ед. против 692 в присутствии ЭТС в контрольной группе и 599 отн. ед. против 702 в основной). Операция не изменяла пролиферации клеток в обеих группах (рис. 2). Через 7 сут в контрольной группе больных РМЖ отмечалось повышение пролиферативной активности клеток с 617 отн. ед. (исходный уровень) до 643 и с 603 отн. ед. (послеоперационный уровень) до 643 (рис. 2). В обоих случаях увеличение было отмечено у 7 больных. В основной группе через 7 сут регистрировалось снижение пролиферации клеток с 617 отн. ед. (исходный уровень) до 558 и с 597 отн. ед. (послеоперационный уровень) до 558. Эти разнонаправленные различия являются статистически достоверными ($P < 0.05$) в обоих случаях.

Обсуждение

В настоящем исследовании показано, что исходная (до операции) пролиферативная активность первичных культур (ФБ и КЦ) при культивировании в среде с сывороткой крови больных РМЖ была ниже, чем в присутствии ЭТС, в среднем на 44.8 %. По этому показателю больные РМЖ отличались от здоровых добровольцев, влияние сыворотки которых на пролиферацию ФБ и КЦ было сопоставимо с таковым ЭТС (Самойлова и др., 2003; Богачева и др., 2004). Можно предполагать, что особенность сыворотки крови онкологических больных является одной из причин вялого течения у них процессов заживления ран. Влияние сыворотки больных РМЖ на пролиферацию опухолевых клеток также была в среднем на 33.4 % ниже, чем влияние ЭТС. Исключение составляли клетки Hs578T, уровень пролиферации которых за 1 сут

до операции достоверно не отличался от пролиферативной активности клеток при культивировании с ЭТС.

Через 1 сут после хирургического удаления опухоли пролиферативная активность всех видов изученных в данной работе клеток (как нормальных, так и опухолевых) не изменялась. Она не менялась и в курсе стандартного послеоперационного лечения больных, тогда как через 7 сут после курса фототерапии НВ и БИК светом происходило увеличение пролиферации ФБ на 22 % относительно исходного уровня, а для КЦ — на 28 % относительно послеоперационного уровня. Вместе с тем пролиферация клеток ВТ-474, Hs578T и A431 в присутствии сыворотки крови больных снижалась относительно дооперационного (исходного) уровня на 31.5, 9 и 6.5 % соответственно, а для опухолевых клеток ВТ-474, HBL-100, Hs578T и A431 в сравнении с послеоперационным уровнем — на 32, 16, 8.6 и 6.3 % соответственно.

При обсуждении возможных механизмов таких изменений пролиферации клеток необходимо обратиться к данным, полученным нами в предыдущих исследованиях. Согласно одному из них, уже через 30 мин после облучения НВ и БИК светом добровольцев или образцов их крови *in vitro* в плазме снижается содержание провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-6 и IL-12) и возрастает уровень ростовых факторов PDGF и TGF- β 1 (Жеваго и др., 2005). Причем у добровольцев с невысоким исходным уровнем PDGF его содержание в плазме крови увеличивается на 20 %, а через 24 ч — на 24 %; в эти же сроки при исходно низком содержании возрастает и уровень TGF- β 1 на 43 и 38 % соответственно. Эти изменения коррелировали по времени с повышением пролиферативной активности ФБ.

Хотя PDGF и эпидермальный фактор роста (ЭФР), концентрация которых в крови после светового воздействия повышается прежде всего в связи с выходом из тромбоцитов (Kiaru et al., 1991), стимулируют пролиферативные процессы, в опухолевых клетках эти цитокины могут оказывать противоположный эффект и индуцировать апоптоз (Armstrong et al., 1994). В частности, ЭФР запускает процесс гибели клеток РМЖ, которые экспрессируют повышенное количество рецептора к этому цитокину. Вероятно, именно этим можно объяснить обнаруженное в данном исследовании снижение пролиферации клеток A431, так как на поверхности этих клеток также располагается огромное количество рецепторов к ЭФР.

Согласно имеющимся данным (Жеваго и др., 2005), особенностью влияния НВ и БИК света на цитокиновую сеть является почти 6-кратное увеличение содержания в плазме IFN- γ и в среднем 5-кратное возрастание уровня противовоспалительного цитокина IL-10. Повышение содержания IFN- γ при воздействии видимого лазерного света отмечается также в исследовании Леоновой с сотрудниками (1994). Поскольку ФБ человека имеют рецепторы и к IFN-, и к IL-10 (Anderson, Nagler, 1984; Ritchin, Nas-Smith, 2001), следует обсудить возможные последствия их влияния на функциональное состояние клеток соединительной ткани.

Антипролиферативные свойства IFN- γ хорошо известны, и в процессах ранозаживления этому цитокину отводится роль ингибитора пролиферации и миграции ФБ (Eisenbeiss et al., 1998). Однако имеются данные о том, что IFN- γ подавляет пролиферацию только быстро размножающихся ФБ, а покоящиеся клетки он стимулирует (Elias et al., 1987). У культивируемых ФБ конъюнктивы человека IFN- γ подавляет продукцию экстрацеллюлярно-

го матрикса и миграцию клеток, но не влияет на их пролиферацию (Yamanaka et al., 2003). С другой стороны, этот цитокин стимулирует в дозозависимой манере пролиферацию ФБ зубной пульпы человека (Melin et al., 1989). В литературе также приводятся данные о влиянии IL-10 на пролиферацию ФБ и заживление ран. По данным некоторых авторов (Dosanjh et al., 2001), кондиционированная среда, полученная от эпителиальных клеток бронхов здорового человека, содержит большое количество IL-10 и стимулирует рост легочных ФБ. Таким же свойством обладает обычная питательная среда, к которой добавлен IL-10 в концентрациях 100, 200 и 500 пг/мл. С другой стороны, в дермальных ранах эмбрионов мышей благодаря высокому содержанию IL-10 снижаются содержание провоспалительных цитокинов и степень самого воспалительного процесса, что сдерживает гиперпродукцию клеток соединительной ткани (Liechty et al., 2000). На этом основании авторы полагают, что IL-10 необходим для безрубцовой регенерации ран. Механизм повышения пролиферативной активности КЦ у больных РМЖ может быть связан с действием света не только на кровь, но и на компоненты поверхностных отделов кожи. Значительный вклад, по-видимому, вносят сами КЦ. Эти клетки продуцируют конститутивно или под действием индукторов различные цитокины (IL 1 α , 1 β , 6, 7, 8, 10, 12, 18, 20, TNF- α , IFN α , β и γ), некоторые из которых стимулируют пролиферацию КЦ (IL-4, IL-6), индуцируют их хемотаксис (IL-1, IL-8, TNF- α и IFN- γ) и дифференцировку (IFN- γ) (Gröne, 2002). КЦ секретируют также ростовые факторы, необходимые для процессов регенерации кожи. Среди них лиганды для рецепторов EGF — EGF, TGF α , гепаринсвязывающий EGF-подобный фактор (HB-EGF) и амфигулин. Они синтезируются КЦ в мембранно-связанной форме и могут десорбироваться с поверхности под действием различных факторов (Massague, Pandiella, 1993). Можно предположить, что при воздействии на кожу оптического излучения эти ростовые факторы десорбируются с поверхности КЦ и, поступая в плазму крови, способствуют возрастанию пролиферации этих клеток. Не исключено также, что в условиях *in vivo* свет потенцирует дермально-эпидермальные взаимодействия, и ростовой фактор КЦ секретируется ФБ. Показано, например, что при раздражении и повреждении кожи эпидермальные клетки секретируют IL-1, что стимулирует секрецию фибробластами фактора роста кератиноцитов (Maas-Szabowski et al., 2000).

Повышение митогенной активности плазмы для ФБ при фотомодификации крови может быть также связано с воздействием света на тромбоциты и выходом из них веществ белковой природы (Самойлова и др., 2003; Богачева и др., 2004). Показано, что при активации кровяных пластинок в процессе свертывания крови ЭФР освобождается в виде нескольких фракций разной молекулярной массы (Kiağı et al., 1991; Hwang et al., 1992). Рядом авторов описана высокая чувствительность тромбоцитов к видимому и БИК лазерному излучению и их комбинации. Так, у облученных в малых дозах тромбоцитов резко снижается агрегационная способность (Brill et al., 1996). По данным других авторов (Olban et al., 1998), красный свет в дозе 1.8—2.0 Дж стимулирует в этих клетках образование супероксидных радикалов, секрецию белков и адениновых нуклеотидов.

Данные литературы свидетельствуют о способности IFN- γ ингибировать пролиферацию клеток всех линий РМЖ, которые изучали в настоящей работе. Рост клеток

HL-100 тормозится при добавлении IFN- γ (Tsai, Gaffney, 1987). Аналогичный эффект развивается при добавлении IFN- γ и к клеткам BT-474 (Kopreski et al., 1996). В отношении клеток Hs578T установлен механизм активации интерферонрегулирующего фактора IRF-1, который оказывает ингибирующее влияние на эту линию опухолевых клеток (Yim et al., 2003). Угнетение пролиферации этих клеток при действии IFN- γ также описывается в работе других авторов (Mueller et al., 1996). Влияние IFN- γ на пролиферацию клеток A431 сходно с эффектом на клетки РМЖ человека: происходит активация процесса клеточной гибели посредством влияния на транскрипционный фактор STAT1 (Chin et al., 1997).

В условиях *in vitro* IFN- γ способен индуцировать апоптоз клеток РМЖ в комбинации с противоопухолевыми препаратами (Ossina et al., 1997) и антиметаболитами (Koshiji et al., 1997). Противоопухолевая активность IFN- γ также отмечается и в клинических исследованиях. У больных РМЖ с метастазами в кожу местные инъекции IFN- γ приводили к их частичной или полной регрессии (Habif et al., 1995). Другие авторы приводят данные о повышении способности тамоксифена в комбинации с IFN- γ ингибировать рост опухоли у больных с диссеминированным РМЖ (Seymour, Bezwoda, 1993). Определенный прорыв в области практического использования тканевых маркеров, связанных с опосредованной рецепторами ЭФР регуляцией роста рака молочной железы, произошел после появления препарата Герцептин, представляющего собой антитела к HER2/neu — одному из рецепторов семейства ErbB, к которому принадлежит и рецептор ЭФР. Действие IFN- γ на клетки РМЖ человека линий BT-474 и MCF-7 приводит к повышению экспрессии рецептора HER2/neu и усилению связывания антител против этого рецептора, что в итоге повышает эффективность применения Герцептина (Fan et al., 2006).

Многие эффекты цитокинов зависят не только от их собственных, но также и от свойств других цитокинов и биологически активных веществ, совместно с которыми осуществляется действие на опухолевые клетки в эксперименте. Это хорошо иллюстрируется в исследовании группы авторов (Sun et al., 2000), в котором у мышей с экспериментальными опухолями РМЖ противоопухолевое действие IL-10 зависело от присутствия оксида азота (NO). Ингибирование NO-синтазы фармакологическими препаратами значительно снижает антипролиферативные свойства IL-10. Экспрессия NO-синтазы усиливалась при действии IFN- γ . Таким образом, конечный ингибирующий эффект на опухолевые клетки определялся совместным действием указанных веществ. Между тем, по нашим данным (Samoilova et al., 2008), полихроматический свет стимулирует NO-синтазу и способствует повышению уровня NO в циркуляции.

Обнаруженное в настоящем исследовании ингибирование пролиферации клеток РМЖ может служить одним из обоснований онкологической безопасности применения НВ и БИК света для лечения больных РМЖ. Усиление же после такого курса пролиферативной активности КЦ и ФБ может составлять одно из объяснений усиления процессов регенерации ран и снижения частоты осложнений после химио- и лучевой терапии у больных с этим злокачественным заболеванием.

Список литературы

- Белишева Н. К., Самойлова К. А. 1984. Механизм клинических эффектов УФ-облученной крови: стимуляция ДНК-синтетической активности клеток человека в культуре. Бюл. эксперим. биол. мед. 12 : 675—678.
- Богачева О. Н., Самойлова К. А., Жеваго Н. А., Оболенская К. Д., Блинова М. И., Калмыкова Н. В., Кузьминых Е. В. 2004. Повышение ростостимулирующей активности крови человека для фибробластов после облучения *in vivo* (транскутанно) и *in vitro* видимым и инфракрасным поляризованным светом. Цитология. 46 (2) : 159—171.
- Жеваго Н. А., Самойлова К. А., Оболенская К. Д., Соколов Д. И. 2005. Изменение содержания цитокинов в периферической крови добровольцев после облучения полихроматическим видимым и инфракрасным светом. Цитология. 47 (5) : 450—460.
- Жеваго Н. А., Самойлова К. А., Соколов Д. И., Оболенская К. Д. 2002. Немедленные изменения соотношения про- и противовоспалительных цитокинов в крови человека после ее облучения *in vivo* и *in vitro* полихроматическим светом в терапевтических дозах. Цитокины и воспаление. 1 (2) : 87—88.
- Леонова Г. Н., Майстровская О. С., Чудновский В. М. 1994. Гелий-неоновое излучение как индуктор интерферонообразования. Вопр. вирусол. 39 (3) : 119—121.
- Проскураков С. Я., Коноплиников А. Г., Иванников А. И., Скворцов В. Г., Цыб А. Ф. 2000. Оксид азота и терапия злокачественных новообразований. Рос. онкол. журн. 3 : 41—45.
- Самойлова К. А., Белишева Н. К., Зарицкий А. Ю., Миронова А. П., Фирюлина И. И. 1984. Повышение ростостимулирующих свойств крови человека после ее облучения УФ лучами. Цитология. 26 (9) : 1088—1089.
- Самойлова К. А., Богачева О. Н., Оболенская К. Д., Блинова М. И., Калмыкова Н. В., Кузьминых Е. В. 2003. Повышение ростостимулирующей активности крови человека для кератиноцитов после ее облучения *in vivo* (транскутанно) и *in vitro* видимым и инфракрасным поляризованным светом. Цитология. 45 (6) : 596—605.
- Тарутинов В. И., Гамалея Н. Ф., Сляяр С. Ю., Букавин А. С., Рудых З. М., Стадник В. Я., Галахин К. А., Скивва Л. М., Ткачев В. А., Вербецкий В. В. 1996. Применение лазерной терапии в предоперационном периоде у больных раком молочной железы. Клин. хирургия. 1 : 31—34.
- Тотолян А. А., Фрейдлин И. С. 1999. Клетки иммунной системы. СПб.: Наука. 231 с.
- Тюляндин С. А., Моисеенко В. М. 2004. Эпидемиологические факторы риска, ранняя диагностика рака молочной железы. В кн.: Практическая онкология: избранные лекции. СПб.: Центр ТОММ. 15—22.
- Юдинцева Н. М., Горелик Ю. В., Дьяконов И. А., Калмыкова Н. В., Блинова М. И., Пинаев Г. П., Парамонов Б. А. 1999. Трансплантация аллогенных эпителиальных пластов кератиноцитов на ожоговые раны. Цитология. 41 (3/4) : 328.
- Anderson P., Nagler C. 1984. Photoaffinity labeling of an interferon-gamma receptor on the surface of cultured fibroblasts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 16 : 828—833.
- Armstrong D. K., Kaufmann S. H., Ottaviano Y. L., Furuya Y., Buckley J. A., Isaacs J. T., Davidson N. E. 1994. Epidermal growth factor-mediated apoptosis of MDA-MB-468 human breast cancer cells. Cancer Res. 54 : 5280—5283.
- Brill A. G., Kirichuk V. F., Brill G. E. 1996. Influence of He-Ne laser irradiation on platelet aggregation. Laser Therapy. 8 : 63—65.
- Chin Y. E., Kitagawa M., Kuida K., Flavell R. A., Fu X. Y. 1997. Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. Mol. Cell. Biol. 17 : 5328—5337.
- Dosanjh A., Morris R. E., Wan B. 2001. Bronchial epithelial cell-derived cytokine IL-10 and lung fibroblast proliferation. Transplant. Proc. 33 : 352—354.
- Eisenbeiss W., Peter F. W., Bakhtiari C., Frenz C. 1998. Hypertrophic scars and keloids. J. Wound Care. 7 : 255—257.
- Elias J. A., Jimenez S. A., Freundlich B. 1987. Recombinant gamma, alpha, and beta interferon regulation of human lung fibroblast proliferation. Amer. Rev. Respir. Dis. 135 : 62—65.
- Fan Y. X., Luo R. C., Fang Y. X., Yan X., Lu C. W. 2006. Effects of interferon-gamma on Her-2/neu expression and antitumor activity of 131I-Herceptin in breast cancer cell lines. Ai Zheng. 25 : 443—446.
- Grone A. 2002. Keratinocytes and cytokines. Vet. Immunol. Immunopathol. 88 : 1—12.
- Habif D., Ozello C., De la Rossa C., Cantell K., Lattes R. 1995. Regression of skin recurrences of breast cancer treated with intraleisional injections of natural interferon alpha and gamma. Cancer Invest. 13 : 165—173.
- Hwang D. L., Lev-Ran A., Yen C. F., Sniecinski I. 1992. Release of different fractions of epidermal growth factor from human platelets *in vitro*: preferential release of 140kDa fraction. Regul. Pept. 37 : 95—100.
- Karu T. J., Pyatibrat L. V. 1987. Biostimulation of HeLa cells by low-intensity visible light. V. Stimulation of cell proliferation *in vitro* by He-Ne laser irradiation. Novo Cimento. 9D. N12 : 1485—1494.
- Kiaru J., Viinikka L., Myllyla G., Pesonen K., Perheentupa J. 1991. Cytoskeleton-dependent release of human platelet epidermal growth factor. Life Sci. 49 : 1997—2003.
- Kopreski M. S., Lipton A., Harvey H. A., Kumar R. 1996. Growth inhibition of breast cancer cell lines by combinations of anti-P185HER2 monoclonal antibody and cytokines. Anticancer Res. 16 : 433—436.
- Koshiji M., Adachi Y., Taketani S., Takeuchi K., Hioki K., Ikehara S. 1997. Mechanisms underlying apoptosis induced by combination of 5-fluorouracil and interferon- γ . Biochem. Biophys. Res. Commun. 240 : 376—381.
- Kueng W., Silber E., Eppenberger U. 1989. Quantification of cells cultured on 96-well plates. Anal. Biochem. 182 : 16—19.
- Liechty K. W., Kim H. B., Adzick N. S., Crombleholme T. M. 2000. Fetal wound repair results in scar formation in interleukin-10-deficient mice in a syngeneic murine model of scarless fetal wound repair. J. Pediatr. Surg. 35 : 866—873.
- Maas-Szabowski N., Stark H., Fusenig N. E. 2000. Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1 induced keratinocyte growth factor expression in resting fibroblast. J. Invest. Dermatol. 114 : 1075—1084.
- Massague J., Pandiella A. 1993. Membrane-anchored growth factors. Annu. Rev. Biochem. 62 : 515—541.
- Melin M., Hartmann D. J., Magloire H., Falcoff E., Auriault C., Grimaud J. A. 1989. Human recombinant gamma-interferon stimulates proliferation and inhibits collagen and fibronectin production by human dental pulp fibroblasts. Cell. Mol. Biol. 35 : 97—110.
- Mosman T. 1983. Rapid colometric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Meth. 65 : 55—63.
- Mueller H., Flury N., Liu R., Scheidegger S., Eppenberger U. 1996. Tumour necrosis factor and interferon are selectively cytostatic *in vitro* for hormone-dependent and hormone-independent human breast cancer cells. Eur. J. Cancer. 32A : 2312—2318.
- Olban M., Wachowicz B., Koter M., Bryszewska M. 1998. The biostimulatory effect of red laser irradiation on pig blood platelet function. Cell Biol. Int. 22 : 245—248.
- Ossina N. K., Cannas A., Powers V. C., Fitzpatrick P. A., Knight J. D., Gilbert J. R., Shekhtman E. M., Tomei L. D., Umansky S. R., Kiefer M. C. 1997. Interferon- γ modulates a p53-independent apoptotic pathway and apoptosis-related gene expression. J. Biol. Chem. 272 : 16351—16357.
- Pinheiro A. L., Nasclento S. C., Vieira A. L., Rolim A. B., Silva P. S., Brugnera A., Jr. 2002. Does LLLT stimulate laryngeal carcinoma cells? An *in vitro* study. Braz. Dent. J. 13 : 109—112.
- Renno A. C., McDonnell P. A., Parizotto N. A., Laakso E. L. 2007. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation *in vitro*. Photomed. Laser Surg. 25 : 275—280.

Rheinwald J. G., Green H. 1975. Serial cultivation of a strain of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 6 : 331—334.

Ritchlin C., Haas-Smith S. A. 2001. Expression of interleukin 10 mRNA and protein by synovial fibroblastoid cells. *J. Rheumatol.* 28 : 698—705.

Samoilova K. A., Obolenskaya K. D., Vologdina A. V., Snopov S. A., Shevchenko E. V. 1998. Single skin exposure to visible polarized light induces rapid modification of entire circulating blood. I. Improvement of rheologic and immune parameters. *SPIE Proc.* 3569 : 90—103.

Samoilova K. A., Zhevago N. A., Petrishchev N. N., Zimin A. A. 2008. Role of nitric oxide in the visible light-induced rapid increase of human skin microcirculation at the local and systemic levels. II. Healthy volunteers. *Photomed. Laser Surg.* 25 : 275—280.

Seymour L., Bezwoda W. 1993. Interferon plus tamoxifen treatment for advanced breast cancer: *in vivo* biological effects of two growth modulator. *Br. J. Cancer.* 68 : 352—356.

Sun H., Gutierrez P., Jackson M. J., Kundu N., Fulton A. M. 2000. Essential role of nitric oxide and interferon-gamma for tumor immunotherapy with interleukin-10. *J. Immunother.* 23 : 208—214.

Tsai S. C., Gaffney E. V. 1987. Modulation of cell proliferation by human recombinant interleukin-1 and immune interferon. *J. Nat. Cancer Inst.* 79 : 77—81.

Yamanaka O., Saika S., Okada Y., Ooshima A., Ohnishi Y. 2003. Effects of interferon-gamma on human subconjunctival fibroblasts in the presence of TGF beta 1: reversal of TGF beta-stimulated collagen production. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 241 : 116—124.

Yim J. H., Ro S. H., Lowney J. K., Wu S. J., Connett J., Doherty G. M. 2003. The role of interferon regulatory factor-1 and interferon regulatory factor-2 in IFN-gamma growth inhibition of human breast carcinoma cell lines. *J. Interferon Cytokine Res.* 23 : 501—511.

Zimin A. A., Zhevago N. A., Samoilova K. A. 2008. Low power visible and near IR light in clinical oncology. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 5 : 37—38.

Поступила 15 III 2010

PROLIFERATION OF NORMAL AND TUMOR CELLS AT THE PRESENCE
OF SERUM FROM PATIENTS WITH BREAST CANCER AFTER PHOTOTHERAPY
WITH VISIBLE AND NEAR INFRARED LIGHT

A. A. Zimin, K. A. Samoilova, N. A. Zhevago

Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg;
e-mail: samoilova@yandex.ru

Simultaneous low-intensity visible (VIS) and near infrared (nIR) irradiation from laser and non-laser sources was used for treatment of complications developing in cancer patients after surgical tumor resection, chemo- and radiation therapy. However, the question remains about the impact of this physiotherapeutic method on proliferative activity of the patients' tumor cells and cells involved in wound healing, fibroblasts (FB) and keratinocytes (KC). In this paper, we studied the effect blood serum obtained from the patients with breast cancer after the course of irradiation with visible and NI light (480—3400 nm, 95 % polarization, 40 mW/cm², 12 J/cm²) in postoperative period on the proliferative activity of primary cultures of human FB and KC, and of several human tumor cell lines (BT-474, HBL-100, Hs578T and A431). Seven-day course of phototherapy increase proliferation of FB (as compared to the initial level) and KC (as compared to postoperative level) by 22 and 28 %, respectively. The tumor cells BT-474, Hs578T and A431 showed statistically significant decrease in proliferative activity compared with the preoperative (initial) level by 31.5, 8.97 and 6.47 %, respectively, whereas the cells BT-474, HBL-100, Hs578T and A431 also reduced their proliferative activity by 32, 16, 8.65 and 6.26 %, respectively, as compared with postoperative level. The results obtained demonstrate the safety of the phototherapy with the visible and NI light for BC patients in the postoperative period.

Key words: breast cancer, blood growth factors of cancer patients, phototherapy, polychromatic visible and infrared irradiation, proliferation of tumor cells, proliferation of fibroblasts and keratinocyte primary cultures.