

ВЛИЯНИЕ ОБЛУЧЕНИЯ ПОЛИХРОМАТИЧЕСКИМ ВИДИМЫМ И ИНФРАКРАСНЫМ СВЕТОМ НА ТУМОРОГЕННОСТЬ КЛЕТОК МЫШИНОЙ ГЕПАТОМЫ 22А И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ЛИЗИСУ ЕСТЕСТВЕННЫМИ КИЛЛЕРАМИ

© Н. А. Филатова, Н. А. Князев,¹ В. В. Кошеверова, А. Н. Шатрова, К. А. Самойлова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ *электронный адрес: nickolaykiz@gmail.com*

Работа посвящена анализу роли полихроматического видимого света, сочетанного с инфракрасным (ВИД-ИК, 480—3400 нм), в регуляции системы противоопухолевой защиты организма. Используемый свет близок к естественному излучению Солнца без его минорной ультрафиолетовой компоненты. В экспериментах *in vitro* исследовали влияние облучения ВИД-ИК-светом клеток мышинной гепатомы 22а на их чувствительность к лизису естественными киллерами (ЕК) мышей. Обнаружено, что после облучения ВИД-ИК-светом в дозе 4.8 Дж/см² чувствительность клеток гепатомы к лизису ЕК увеличивалась в 1.5—2.0 раза, а после облучения в дозе 9.6 Дж/см² не изменялась при всех соотношениях эффекторов и мишеней. Показано, что увеличение чувствительности клеток гепатомы к ЕК-лизису сопровождалась изменением углеводных компонентов во внешних примембранных слоях (гликокаликсе) клеток. Степень выраженности гликокаликса оценивали по количеству прижизненно сорбированного клеточной поверхностью красителя альцианового синего (АС). Оказалось, что после облучения ВИД-ИК-светом в дозе 4.8 Дж/см² коэффициент связывания АС, а значит, и объем гликокаликса клеток гепатомы снижался, а после облучения в дозе 9.6 Дж/см² не отличался от контрольного. Распределение клеток гепатомы МГ22а по фазам клеточного цикла после облучения ВИД-ИК-светом в дозах 4.8 и 9.6 Дж/см² не изменялось, а значит, облучение не действовало цитостатически. Туморогенность клеток гепатомы МГ22а после облучения ВИД-ИК-светом изучали *in vivo*. При трансплантации сингенным мышам СЗНА клеток гепатомы, облученных ВИД-ИК-светом в дозах 4.8 и 9.6 Дж/см², рост опухоли, тормозился по сравнению с контролем (после трансплантации необлученных клеток). Ежедневное (в течение 5 сут) облучение ВИД-ИК-светом в дозах 4.8 Дж/см² и 9.6 Дж/см² животных с опухолями, сформировавшимися в результате инъекции необлученных клеток МГ22а тормозило рост опухолей по сравнению с контролем (в 2.1—2.9 и 2.2 раза соответственно).

Ключевые слова: полихроматический видимый и инфракрасный свет, естественные киллеры, гепатома 22а, туморогенность.

Принятые сокращения: ВИД-ИК — видимый свет, сочетанный с инфракрасным, НИЛИ — низкоинтенсивное лазерное излучение.

В настоящее время в медицине успешно используются фототерапевтические аппараты, генерирующие полихроматическое видимое излучение, сочетанное с инфракрасным (ВИД-ИК, 480—3400 нм), для стимуляции иммунной системы, ускорения заживления ран и улучшения микроциркуляции крови. Несмотря на то что многие онкологические больные нуждаются в реабилитации после операции и химиолучевой терапии, отношение ко многим физиотерапевтическим методам остается сдержанным, поскольку до конца не выяснено их влияние на опухолевый рост. Данные из литературы о действии низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) непосредственно на культивируемые опухолевые клетки *in vitro* в основном касаются его влияния на пролиферацию этих клеток. При этом авторы использовали различные линии опухолевых клеток и различные виды излучения, широко варьируя их параметры (длину волны и дозу). Показано, что НИЛИ может стимулировать пролиферацию трансфор-

мированных клеток (Wang et al., 2005; Gao et al., 2006), не изменять ее (Pinheiro et al., 2002; Kreisler et al., 2003; Renno et al., 2007) и даже угнетать (Stroka et al., 1999; Liu et al., 2004). Большинство исследователей использовали монохроматические лазерные или узкополосные светодиодные источники излучения, в то время как влияние полного спектра видимого света, в том числе ВИД-ИК, остается неизученным.

К настоящему времени накоплено большое количество данных о том, что монохроматический и полихроматический свет видимого и инфракрасного диапазонов положительно влияет на иммунитет человека (Samoilova et al., 1998; Жеваго и др. 2002, 2005, 2012) и животных (Novoselova et al., 2006). Однако в целом вопрос о влиянии НИЛИ на систему иммунитета вообще и естественного иммунитета в частности изучен недостаточно. Имеющиеся сообщения разрозненны, касаются различных спектров лазерного излучения и описывают в основном ситу-

ацию при конкретном заболевании (Князев и др., 2010). Известно, что эффекторами системы естественной противоопухолевой резистентности являются естественные киллеры (ЕК), способные без предварительной сенсибилизации лизировать широкий спектр опухолевых клеток-мишеней (Lanier, 2005). В противоопухолевом надзоре ЕК представляют собой первую линию врожденного иммунитета организма. За последние годы накоплены многочисленные данные об особенностях распознавания ЕК чужеродных клеток. Эти данные позволяют предположить, что, так же как и для макрофагов, молекулы клеточной адгезии служат своеобразным кодом, с помощью которого ЕК различают трансформированные клетки. Ранее нами было показано, что такая молекула клеточной адгезии, как ламинин, участвует в процессе неспецифического распознавания ЕК (Филатова и др., 2008).

Обнаружено увеличение активности ЕК после облучения интактных животных монохроматическими источниками света (Зырянов и др., 1998). Мы не нашли в литературе данных об изменении чувствительности опухолевых клеток после их облучения НИЛИ к лизису ЕК, а также данных об облучении опухолевых клеток перед их трансплантацией животным.

Для проведения собственных исследований мы выбрали экспериментальную модель, в которой культивируемые клетки гепатомы 22а трансплантировали сингенным мышам линии СЗНА (Филатова и др., 2011). Наш выбор был обусловлен тем, что линейноспецифическая гепатома 22а, являющаяся субштаммом гепатомы 22, была индуцирована ортоаминоазотолуолом именно у мышей СЗНА (Гельштейн, 1954) и поэтому является сингенной по отношению к ним, а значит, в значительной степени моделирует ситуацию, при которой возникают спонтанные опухоли у человека и животных.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния (ВИД-ИК, 480—3400 нм) на клетки гепатомы 22а в условиях *in vitro* с последующей трансплантацией облученных клеток сингенным мышам СЗНА. Задачей данного исследования было показать, как после облучения ВИД-ИК-светом в условиях *in vitro* изменяются туморогенность опухолевых клеток и их чувствительность к ЕК-лизису, а также оценить корреляцию между этими параметрами и возможные причины полученных эффектов. Для того чтобы оценить влияние ВИД-ИК-излучения на рост уже сформировавшихся опухолей, облучали мышей-опухоленосителей и оценивали скорость роста опухолей.

Материал и методика

Клетки МГ22 а были получены из Банка клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки культивировали в среде ДМЕМ (Биолот, Россия), содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (Биолот, Россия) и 40 мкг/мл гентамицина (Sigma, США). Для облучения клетки МГ22а рассеивали в 6-луночные планшеты по $2 \cdot 10^5$ клеток на 1 лунку. Перед облучением культуральную среду заменяли на PBS. После облучения PBS снова заменяли средой культивирования.

Облучение клеток. Источником сочетанного ВИД-ИК-излучения, близкого по спектральному составу и интенсивности к естественной радиации Солнца в летний безоблачный полдень в Центральной Европе (480—3400 нм, 40 мВт/см², 95 % поляризации), служил

фототерапевтический аппарат Bioptron-2 (Bioptron AG, Швейцария). Подобно излучению лазеров этой полихроматическое излучение характеризуется высокой степенью поляризации (95 %). При облучении использовали дозы 4.8 и 9.6 Дж/см². Вклад ИК-излучения составлял около 47 %.

Прохождение клетками фаз клеточного цикла оценивали с помощью проточного цитометра EPICS XL (Beckman Coulter, США). Для этого к каждой пробе добавляли 0.2 мг/мл сапонина (Fluka, США), 0.25 мг/мл РНКазы (Sigma, США) и 0.05 мг/мл иодистого пропидия (Invitrogen, США). После инкубации в течение 30 мин при комнатной температуре пробы анализировали на проточном цитометре. Контролем служили необлученные клетки. Обработку данных проводили с помощью программы ModFit LT (Verity Software House, Topsham).

Трансплантация мышам СЗНА клеток гепатомы МГ22а. Мышей СЗНА (18—20 г) получали из питомника РАМН «Рапполово» (Санкт-Петербург). Эксперименты проводили в двух вариантах. В первом мышам трансплантировали необлученные клетки МГ22а ($2 \cdot 10^5$ клеток на 1 мышь). Через 10 сут после прививки животных делили на три группы. Группы 1 и 2 подвергали 5-суточному курсу ежедневных облучений ВИД-ИК-светом в дозах 4.8 и 9.6 Дж/см² соответственно. Третью (контрольную) группу животных облучению не подвергали. Во втором варианте экспериментов облучению ВИД-ИК в тех же дозах подвергали клетки гепатомы. Через 24 ч после облучения клетки гепатомы трансплантировали мышам подкожно в область спины (10^5 клеток на 1 мышь). Мышам контрольной группы трансплантировали клетки гепатомы без облучения. Время появления опухолей у мышей и их размер регистрировали 1 раз в 5 сут в течение 10—45 сут после трансплантации опухолевых клеток. Размер опухолей оценивали до начала гибели животных-опухоленосителей. Объем опухолей рассчитывали по формуле (Хавинсон и др., 2001)

$$V = \frac{4}{3\pi} \left(\frac{L}{2} \right) \left(\frac{D}{2} \right)^2,$$

где L — максимальный диаметр опухоли, а D — минимальный (мм). Всего было использовано 150 мышей, разделенных на соответствующие группы. Были проведены 3 серии экспериментов для каждого варианта.

Окраска клеток МГ22 а альциановым синим (АС). К 1 мл суспензии, содержащей 1 млн. клеток, добавляли 2 мл АС до конечной концентрации 0.01 %. Смесь инкубировали 30 мин, затем осаждали клетки центрифугированием (200g, 15 мин при 4 °С). Надосадочную жидкость фотометрировали при 617 нм и полученные данные сравнивали с результатами спектрофотометрии исходного 0.01%-ного раствора АС. Мерой сорбции красителя клетками служил коэффициент распределения красителя (Q) между гликокаликсом и средой, который рассчитывали по формуле $Q = (C_1 - C_2) : C_1$, где C_1 — концентрация исходного раствора АС (до окрашивания клеток), C_2 — концентрация того же раствора после окрашивания клеток и удаления их центрифугированием (ед. опт. плотности).

Цитотоксический тест. Клетки-эффекторы — естественные киллеры (ЕК) — получали из селезенки интактных мышей СЗНА (Филатова и др., 2008). Клетками-мишенями служили культивируемые клетки гепатомы мыши линии МГ22а. Для определения естественной кил-

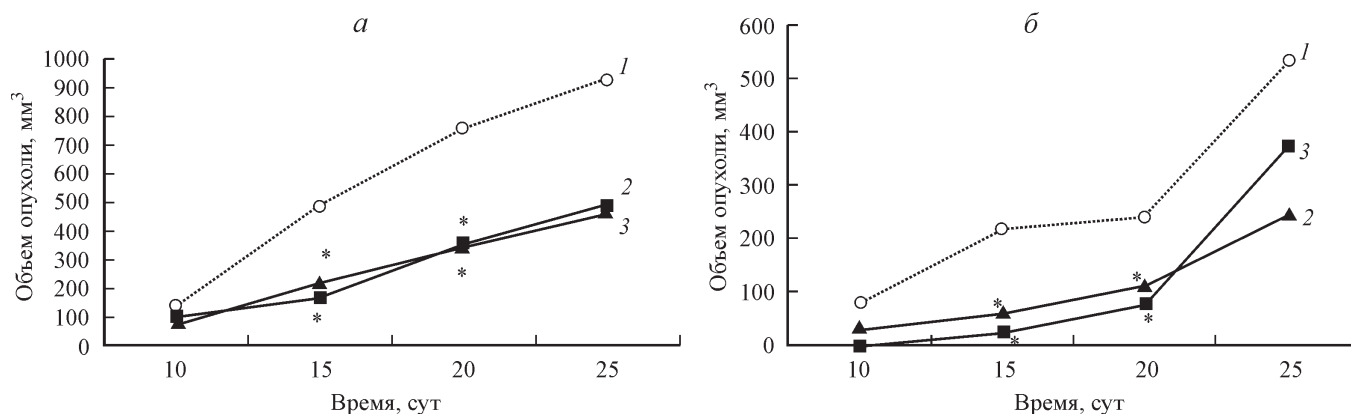


Рис. 1. Динамика роста опухолей после облучения ВИД-ИК-светом мышей-опухоленосителей (а) и после трансплантации мышам клеток гепатомы, облученных ВИД-ИК-светом (б).

Кривые: 1 — контроль, 2 — 4.8 Дж/см², 3 — 9.6 Дж/см². Здесь и на рис. 3 и 4 звездочки указывают на достоверные отличия от контроля при $P < 0.05$.

лерной активности спленоцитов использовали ³H-уридин-овый цитотоксический тест (Hashimoto, Sudo, 1971) в нашей модификации (Филатова и др., 2008). Каждый вариант эксперимента выполняли в 3—6 повторностях в пластиковых 96-луночных круглодонных планшетах для иммунологических реакций. Испытывали соотношение эффекторов и мишеней от 5 : 1 до 50 : 1. В контрольные пробы вместо спленоцитов вносили среду культивирования. Инкубацию проб проводили в течение 18 ч при 37 °С в атмосфере с 5 % CO₂. Радиоактивность измеряли в сцинтилляционном счетчике LS8100 (Beckman, США). Уровень естественной киллерной активности оценивали с помощью цитотоксического индекса (ЦИ), отражающего долю погибших клеток в %.

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Для того чтобы оценить влияние ВИД-ИК-излучения на рост уже сформировавшихся опухолей, мышам облучали после введения им клеток гепатомы 22а (2 · 10⁵ на 1 мышь). На 10-е сут после трансплантации опухоли об-

разовывались у 100 % мышей. Облучение мышей-опухоленосителей ВИД-ИК-излучением в дозах 4.8 и 9.6 Дж/см² тормозило рост опухолей по сравнению с контролем (рис. 1, а).

На следующем этапе работы определяли влияние облучения клеток гепатомы 22а ВИД-ИК-светом на динамику роста опухоли. В этом случае клетки МГ22а за 24 ч до трансплантации мышам облучали ВИД-ИК-светом. Облучение ВИД-ИК-светом клеток МГ22а до их имплантации приводило к замедлению роста опухолей в течение первых 25 сут независимо от дозы облучения (рис. 1, б). Полученные данные оказались сходными с таковыми после облучения животных с привитыми опухолями.

Одной из возможных причин изменения туморогенности клеток МГ22а после их облучения ВИД-ИК-светом может быть замедление пролиферации клеток. Для проверки этого предположения в экспериментах *in vitro* исследовали распределение клеток по фазам клеточного цикла в контроле (без облучения) и через 24 ч после облучения в дозах 4.8 и 9.6 Дж/см². Оказалось, что доля клеток в каждой фазе цикла остается в одних и тех же пределах (рис. 2). Эти данные свидетельствуют о том, что облучение ВИД-ИК-светом в исследованных дозах не обладает цитостатическим эффектом в отношении клеток МГ22а.

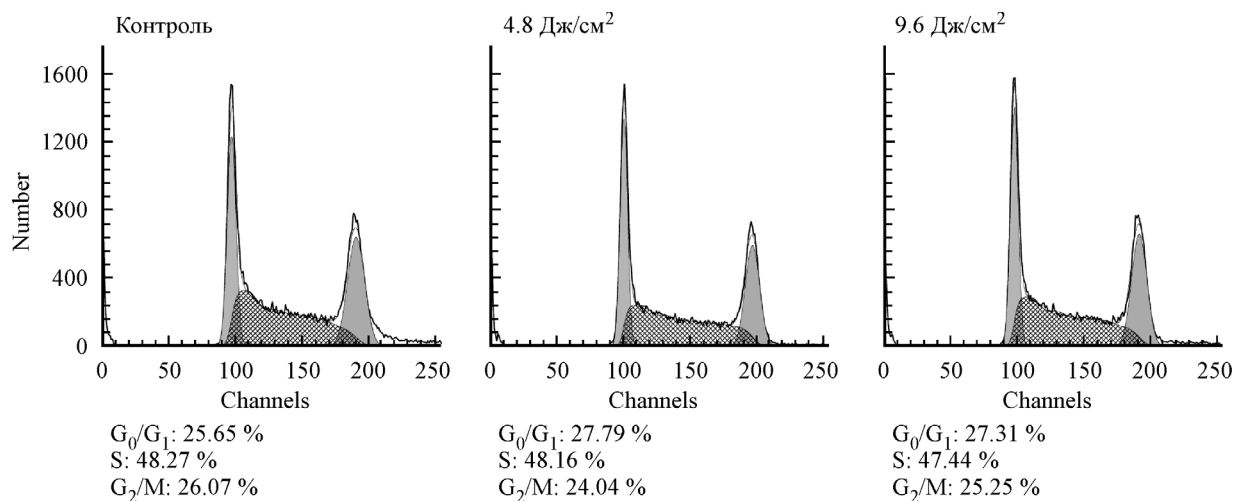


Рис. 2 Распределение клеток МГ22а по фазам клеточного цикла после облучения ВИД-ИК-светом в дозах 4.8 и 9.6 Дж/см².

По горизонтали — содержание ДНК, усл. ед.; по вертикали — число клеток.

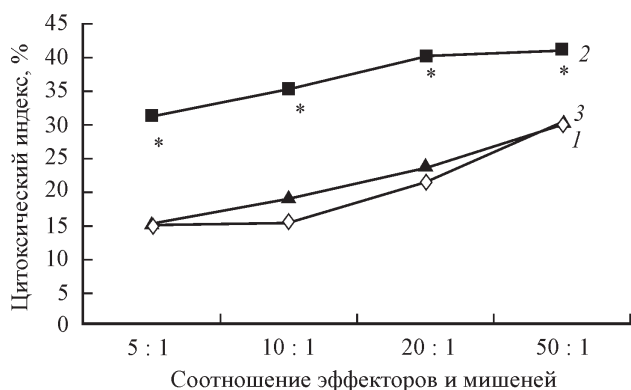


Рис. 3. Естественная киллерная активность спленцитов мышей в отношении клеток МГ22а в контроле (кривая 1) и облученных ВИД-ИК-светом в дозах 4.8 (2) и 9.6 (3) Дж/см².

Другой причиной снижения туморогенности облученных опухолевых клеток может быть возрастание их чувствительности к лизису клетками иммунной системы. В этой связи исследовали влияние ВИД-ИК-излучения в дозах 4.8 и 9.6 Дж/см² на чувствительность клеток МГ22а к их лизису ЕК клетками. Выяснилось, что после воздействия ВИД-ИК излучения в дозе 4.8 Дж/см² в 1.5—2.0 раза увеличивается количество лизированных клеток МГ22а при всех соотношениях эффекторов и мишеней. В то же время у клеток, облученных в дозе 9.6 Дж/см², повышение чувствительности к литической активности ЕК не обнаружено (рис. 3).

В предыдущем исследовании мы показали, что облучение ВИД-ИК-светом клеток МГ22а в дозах 4.8 и 9.6 Дж/см² не изменяет выживаемость этих клеток (Князев и др., 2012). Тем не менее под действием ВИД-ИК-излучения, как это уже было показано для лимфоцитов периферической крови человека (Жеваго и др., 2005), может изменяться фенотип клеток и прежде всего их поверхность. Для того чтобы доказать, что облучение опухолевых клеток ВИД-ИК-светом индуцирует структурные изменения их поверхности, применили метод прижизненной оценки состояния примембранных компонентов (гликокаликса) клетки. В основу метода положена способность катионного красителя фталоцианиновой группы альцианового синего (АС), не проникая внутрь ни живых, ни мертвых клеток, связываться с гликопротеинами и мукополисахаридами их поверхности. Оказалось,

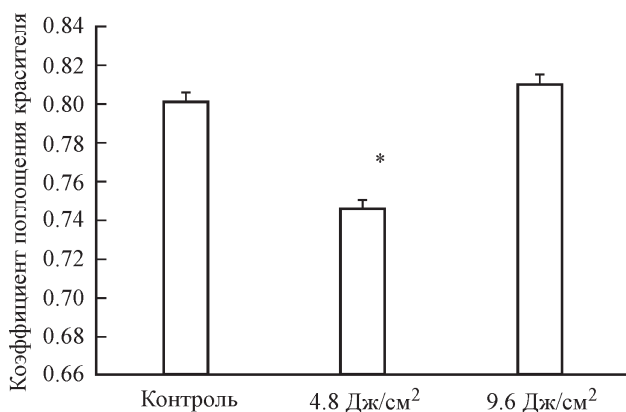


Рис. 4. Поглощение альцианового синего (АС) клетками МГ22а в контроле и после облучения ВИД-ИК-светом в разных дозах (4.8 и 9.6 Дж/см²).

что облучение клеток гепатомы 22а ВИД-ИК-светом в дозе 4.8 Дж/см² приводит к достоверному уменьшению коэффициента связывания АС с гликокаликсом, т. е. его объем существенно уменьшается. После облучения клеток в дозе 9.6 Дж/см² отличий от контроля по этому показателю не наблюдали (рис. 4). Полученные данные хорошо согласуются с тем, что именно после облучения клеток в дозе 4.8 Дж/см², возрастала их чувствительность к литическому действию ЕК. Воздействие света в дозе 9.6 Дж/см² ни структурных изменений поверхности клеток, ни возрастания их чувствительности к лизису ЕК не вызывало.

Итак, в экспериментах *in vivo* нами показано, что облучение ВИД-ИК-светом мышей с привитой гепатомой 22а замедляет рост опухолей. Обнаруженное торможение роста опухолей позволяет сделать вывод о том, что облучение ВИД-ИК-светом не только безопасно, но и обладает защитными свойствами.

Клетки гепатомы МГ22а, подвергнутые облучению ВИД-ИК-светом, уменьшают свои туморогенные свойства, что может свидетельствовать о том, что клетки, вероятно, претерпевают фенотипические изменения. При этом клетки гепатомы МГ22а лучше распознавались ЕК мышей, что, возможно, и служило одной из причин замедления опухолевого роста. Из литературы известно, что литическая активность ЕК усиливалась при изменении структуры гликокаликса клеток мишеней после их сокультивирования с кифуненизином — ингибитором процессинга липополисахаридов (Ahrens, 1993). Кроме того, показано, что видимое монохроматическое излучение повышает адгезионность клеток по отношению друг к другу (Karut et al., 1996).

В проведенном нами исследовании удалось показать, что повышение чувствительности клеток гепатомы к лизису ЕК наблюдалось только в тех дозах (4.8 Дж/см²), когда мы фиксировали изменение клеточной поверхности по способности сорбировать альциановый синий. Этот феномен, по-видимому, может быть связан с фенотипическими изменениями поверхностных гликозилированных белков, которые, по мнению некоторых авторов и нашим собственным наблюдениям, вовлечены в процесс распознавания клеток-мишеней ЕК (Шпарык, Билинский, 1991; Филатова и др., 2008). Однако факт, что подобные изменения вызывает только меньшая доза облучения (4.8, но не 9.6 Дж/см²), а также поиск гликозилированных белков-мишеней действия ВИД-ИК-излучения, на роль которых претендуют прежде всего ламинин и трансферрин, требует дальнейшего исследования.

Список литературы

- Гельштейн В. И. 1954 Перевиваемый штамм экспериментального рака печени (гепатома XXII). *Вопр. онкол.* 7 (1): 172—180.
- Жеваго Н. А., Самойлова К. А., Давыдова Н. И., Бычкова Н. В., Глазанова Т. В., Чубукина Ж. В., Буйнакова А. И., Зимин А. А. 2012. Эффективность полихроматического видимого и инфракрасного излучения в послеоперационной иммунореабилитации больных раком молочной железы. *Вопр. курортол. и физиотер.* 4 : 23—32.
- 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.
- Зырянов Б. Н., Евтушенко В. А., Кицманюк З. Д. 1998. Низкоинтенсивные лазеры в онкологии. Томск: 336 с.
- Князев Н. А., Самойлова К. А., Зимин А. А. 2010. Лазерное излучение видимого и ближнего инфракрасного диапазона при опухолевой патологии (анализ экспериментальных исследований). Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. 6 : 50—56.
- Князев Н. А., Филатова Н. А., Самойлова К. А. 2012. Пролиферация и туморогенность клеток гепатомы мыши, облученных полихроматическим видимым и инфракрасным светом. Цитология. 54 (10) : 774—782.
- Филатова Н. А., Кирпичникова К. М., Аксенов Н. Д., Вахромова Е. А., Гамалей И. А. 2011. Уменьшение туморогенности клеток мышечной гепатомы после действия антиоксидантов и мелатонина. Цитология. 53 (5) : 404—410.
- Филатова Н. А., Тюряева И. И., Иванов В. А. 2008. Распознавание и лизис естественными киллерами опухолевых клеток при участии ламинина. Цитология. 50 (1) : 72—78.
- Хавинсон В. Х., Южаков В. В., Кветной И. М., Малинин В. В. 2001. Влияние эпиталона на кинетику роста и функциональную морфологию саркомы М-1. Вopr. онкол. 47 (3) : 461—466.
- Шпарык Я. В., Бильский Б. Т. 1991. Природа мишеневых структур, распознаваемых естественными киллерными клетками. Экспер. онкол. 13 (1) : 8—14.
- Ahrens P. B. 1993. Role of target cell. Glycoproteins in sensitivity to natural killer cell lysis. J. Biol. Chem. 268 : 385—391.
- Gao X., Chen T., Xing D., Wang F., Pei Y., Wei X. 2006. Single cell analysis of PKC activation during proliferation and apoptosis induced by laser irradiation. J. Cell. Physiol. 206 : 441—448.
- Hashimoto Y., Sudo H. 1971. Evaluation of cell damage in immune reactions by release of radioactivity from ³H-uridine labeled cells. Gann. 62 : 139—143.
- Karu T., Pyatibrat L. V., Kalendo G. S., Esenaliev R. O. 1996. Effect of monochromatic low-intensity light and laser irradiation on adhesion of hela cells *in vitro*. Lasers Surg. Med. 18 : 171—177.
- Kreisler M., Christoffers A. B., Willershausen B., d'Hoedt B. 2003. Low-level 809 nm GaAlAs laser irradiation increases the proliferation rate of human laryngeal carcinoma cells *in vitro*. Lasers Med. Sci. 18 : 100—103.
- Lanier L. L. 2005. NK cell recognition. Annu. Rev. Immunol. 23 : 255—274.
- Liu Y. H., Cheng C. C., Ho C. C., Pei R. J., Lee K. Y., Yeh K. T., Chan Y., Lai Y. S. 2004. Effects of diode 808 nm GaAlAs low-power laser irradiation on inhibition of the proliferation of human hepatoma cells *in vitro* and their possible mechanism. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. 115 : 185—201.
- Novoselova E. G., Glushkova O. V., Cherenkov D. A., Chudnovsky V. M., Fesenko E. E. 2006. Effects of low-power laser radiation on mice immunity. Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 22 : 33—38.
- Pinheiro A. L. B., Nascimento S. C., Vieira A. L. B., Roim A. B., Silva P. S., Brugnera A. 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 effect of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation *in vitro*. Photomed. Laser Surg. 25.4 : 275—280.
- Samoilova K. A., Obolenskaya K. D., Vologdina A. V., Snopov S. A., Shevchenko E. V. 1998. Single skin exposure to visible polarized light induces modification of entire circulating blood. 1. Improvement of reologic and immune parameters. Proc. SPIE. 3569 : 90—103.
- Sroka R., Schaffer M., Fuchs C., Pongratz T., Schrader-Reichard U., Busch M., Schaffer P. M., Duhme E., Baumgartner R. 1999. Effects on the mitosis of normal and tumor cells induced by light treatment of different wavelengths. Lasers Surg. Med. 25.3 : 263—271.
- Wang F., Chen T. S., Xing D., Wang J. J., Wu Y. X. 2005. Measuring dynamics of caspase-3 activity in living cells using FRET technique during apoptosis induced by high fluence low-power laser irradiation. Lasers Surg. Med. 36 : 2—7.

Поступила 11 IV 2013

EFFECT OF POLYCHROMATIC VISIBLE LIGHT COMBINED WITH INFRARED RADIATION
ON TUMORIGENICITY OF MURINE HEPATOMA CELLS AND THEIR SENSITIVITY
TO LYTIC ACTIVITY OF NATURAL KILLERS

N. A. Filatova, N. A. Knyazev,¹ V. V. Kosheverova, A. N. Shatrova, K. A. Samoilova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: nickolayknz@gmail.com

Tumorigenicity of murine hepatoma cells (MH22a) and their sensitivity to lysis by natural killers (NKs) have been studied after exposure to polychromatic visible and infrared light (VIS-IR, 480—3400 nm, 40 mW/cm²), similar to the terrestrial solar spectrum without its minor UV component, in order to elucidate the involvement of this important environmental and physiotherapeutic factor in regulation of the anti-tumor defense system. The MH22 cells were *in vitro* exposed to VIS-IR light and their sensitivity to lytic activity of NKs was evaluated. We found that sensitivity of MH22a cells to lysis by NKs after exposure to VIS-IR light at a dose of 4.8 J/cm² increased 1.5—2 times, while it did not change after exposure to a dose of 9.6 J/cm² at all ratios (1 : 5—1 : 50) of the number of NKs (effectors) to that of hepatoma cells (targets). The increase in the sensitivity of hepatoma cells to NKs was accompanied by structural changes of cell surface: the capability of supra-membraneous glycoproteins (glycocalix) to sorb the vital dye alcian blue (AB) was significantly lower as compared with the unexposed cells of control group. However, no changes in AB sorption was revealed in hepatoma cells exposed to the light at a dose 9.6 J/cm². Tumorigenicity of photo-irradiated MH22a cells has been studied in the *in vivo* experiments. Light-exposed (4.8 and 9.6 J/cm²) and intact hepatoma cells were transplanted into syngenic mice C3HA. Tumor volumes 25 days after transplantation proved to be smaller after exposure to the light at both doses than in the control group (4—4.5 times and 2.5—4 times, respectively), which correla-

ted with the increase in the sensitivity to lysis by NKs and decrease in the AB sorption only after light exposure at dose 4.8 J/cm². Using the flow cytometry method we could show that VIS-IR light at the applied doses did not interfere with the distribution of hepatoma cells over the cycle phases and thus deceleration of the tumor growth was not associated with cytostatic effect of VIS-IR light. To evaluate effect of polychromatic light on the growth of the preformed tumors, the 5-day course of daily light exposures of tumor bearing mice C3HA was carried out in 10 days after subcutaneous transplantation of $2 \cdot 10^5$ cells of syngene hepatoma when the tumors had developed in 100 % animals. Like in the case of transplantation of the light-exposed cells, irradiation of the tumor bearing mice at doses 4.8—9.6 J/cm² resulted in deceleration of tumor growth (2.1—2.9 and 2.2 times respectively) for 4 weeks as compared with non-irradiated mice.

Key words: visible and infrared radiation, murine hepatoma 22a, natural killer cells, tumorogenity.
