

ФОТОБИОМОДУЛЯЦИЯ ФИОЛЕТОВО-СИНИМ СВЕТОМ ДИНАМИКИ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА И ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО БАЛАНСА В ОРГАНИЗМЕ ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ

© 2022 г. Е.С. Жукова*, Т.Г. Щербатюк*, **, И.А. Чернигина***, В.В. Чернов****, А.Б. Гапеев*****

*Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии Роспотребнадзора, 603005, Нижний Новгород, ул. Семашко, 20

**Пуцинский государственный естественно-научный институт, 142290, Пушино Московской области, просп. Науки, 3

***Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, 603005, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1

****ФИЦ «Институт прикладной физики РАН», 603950, Нижний Новгород, ул. Ульянова, 46

*****Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пуцинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушино Московской области, Институтская ул., 3

E-mail: evgenya_plekhanova@mail.ru; a_b_g@mail.ru

Поступила в редакцию 09.02.2022 г.

После доработки 25.02.2022 г.

Принята к публикации 26.02.2022 г.

С использованием модели холангиоцеллюлярной карциномы РС-1 на крысах линии Sprague Dawley исследовано действие фотобиомодуляции фиолетово-синим светом ($\lambda_1 = 400 \pm 20$ нм, 4.6 Дж/см²; $\lambda_2 = 460 \pm 20$ нм, 3.2 Дж/см²) на опухолевый рост и параметры свободнорадикальных процессов в организме-опухоленосителе. Показано, что эффективность транскутанного воздействия электромагнитного излучения со спектральными максимумами 400 нм на кровь и 460 нм на опухоль ранних сроков роста зависит от индивидуальных особенностей организма, а именно, от исходного уровня ориентировочно-исследовательской активности лабораторных животных в тесте «открытое поле» и прооксидантно-антиоксидантного баланса в организме опухоленосителей. Обнаружено, что воздействие озонированного изотонического 0.9% раствора хлорида натрия с концентрацией озона в озono-кислородной смеси 400 мкг/л модулирует действие излучения оптического диапазона, в значительной степени изменяя динамику опухолевого роста.

Ключевые слова: фотобиомодуляция, фиолетово-синий свет, тест «открытое поле», прооксидантно-антиоксидантный баланс, озон, экспериментальная холангиоцеллюлярная карцинома.

DOI: 10.31857/S0006302922030231, EDN: ASPCJR

Эпидемиологические данные по заболеваемости, смертности и инвалидизации человека по причине злокачественных новообразований [1] свидетельствуют об актуальности поиска альтернативных подходов в лечении онкопатологий, для финансовой поддержки которых в Национальном Институте рака (National Cancer Institute, США) была создана отдельная программа «Provocative Questions» (<https://provocativeques->

Сокращения: ФБМ – фотобиомодуляция, ЭМИ – электромагнитное излучение, ОИА – ориентировочно-исследовательская активность, ОФР – озонированный физиологический раствор, ДНФГ – динитрофенилгидразоны, ТБК – тиобарбитуровая кислота, ТБК-АП – ТБК-активные продукты, АСР – общая свободнорадикальная активность, СОД – супероксиддисмутаза.

[tions.nci.nih.gov](https://provocativeques-)). Фотобиомодуляция (ФБМ), ранее известная также как низкоинтенсивная лазерная или световая терапия, лазерная фототерапия, лазерная биостимуляция, холодная лазеротерапия, – нетепловое неразрушающее воздействие монохроматическим (лазерным) и квазимонохроматическим (светодиодным) излучением в оптической области от видимого до ближнего инфракрасного диапазона [2, 3]. Однако развитие ФБМ в онкологии затруднено из-за открытого вопроса о безопасном применении электромагнитного излучения (ЭМИ) данной области спектра для противоопухолевой терапии.

Большинство исследований проведены с использованием ЭМИ красного и ближнего инфракрасного диапазонов и были получены

противоречивые данные: прямое противоопухолевое действие фототерапии (635 нм, 128 и 256 Дж/см², *in vitro*; 632.8 нм, 60 Дж/см², *in vivo*) [4, 5], отсутствие влияния на рост клеток неоплазии (660 нм, 4 и 6 Дж/см², *in vitro* и *in vivo*) [6, 7], а также стимуляция пролиферации опухолевых клеток (630 нм, 2, 4, 6 и 10 Дж/см², *in vitro*) [8]. Не удалось выяснить, почему в некоторых случаях происходит стимулирование роста опухоли. Этот эффект может быть связан как с режимами ФБМ (разнообразие используемых источников излучения с различными длинами волн или спектральными максимумами, интенсивностью излучения, длительностью экспозиции и кратностью облучения при указании неполных, неточных и/или непроверенных параметров), так и с биологическими особенностями опухоли.

Высокая эффективность света в красном и ближнем ИК диапазонах может объясняться наличием терапевтического окна прозрачности в этой области. Однако процесс поглощения излучения и последующая фотодиссоциация компонентов биоткани вносит значительный вклад в механизмы действия фототерапии. Преобразование световой энергии компонентами крови происходит через фотодиссоциацию комплексов гемоглобина с лигандами [9]. Анализ литературных данных по спектрам поглощения гемоглобина и меланина показал, что наиболее высокие значения коэффициента поглощения находятся в области 400–470 нм [10]. Предположительно, воздействие ЭМИ фиолетово-синей области спектра может иметь более высокий противоопухолевый потенциал по сравнению с длинноволновым диапазоном в связи с тем, что при коротковолновом излучении уровень эндогенной генерации активных форм кислорода значительно выше [11]. Однако исследования противоопухолевого действия ЭМИ фиолетово-синей области спектра немногочисленны. Показано, что излучение в фиолетово-синем диапазоне приводит к ингибированию пролиферации и прогрессии опухолевых клеток мочевого пузыря (450 нм, 4 и 8 Дж/см², линии T24 и EJ) [12], гибели клеток глиобластомы A-172 (405 нм, 15–882 Дж/см²) [13], подавлению инвазивности CD133+ стволовых клеток колоректального рака (470 нм, 3 Дж/см²) [14], торможению роста или дистрофическим изменениям клеток лимфосаркомы Плисса (460–475 нм) [15] и регрессии ксенотрансплантата SK-BR-3 (360, 450 и 475 нм) [16]. В сравнительных исследованиях *in vitro* на линиях опухолевых клеток человека было протестировано действие низкоинтенсивного светодиодного излучения синей (455 ± 11 нм, 19 Дж/см²; 465 нм, 9.4 Дж/см²), зеленой (520 ± 20 нм, 19 Дж/см²; 525 нм, 9.4 Дж/см²) и красной (630 ± 9 нм, 19 Дж/см²; 635 нм, 4.7 Дж/см²) областей спектра и показано снижение жизнеспособ-

ности клеток злокачественной меланомы A375, карциномы легкого A549, аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231 и колоректального рака HT29 и HCT116 после воздействия синим светом по сравнению с темновым контролем. При этом не было зарегистрировано влияния на пролиферацию тестируемых опухолевых клеток ЭМИ красного (630 ± 9 нм, 19 Дж/см²; 635 нм, 4.7 Дж/см²) и зеленого (520 ± 20 нм, 19 Дж/см²; 525 нм, 9.4 Дж/см²) света [17, 18].

Известно, что опухоль состоит не только из собственно опухолевых клеток, но и канцер-ассоциированных фибробластов, эндотелиальных, иммунных и стволовых клеток, которые присутствуют во всех тканях или рекрутируются в область развития неоплазии [19]. При ФБМ нужно учитывать влияние и на эти компоненты опухолевого микроокружения. Так, после облучения красным светом (636 нм; 5, 10 и 20 Дж/см²) изолированных раковых стволовых клеток (cancer stem cells, CSCs) линии A549, для которой не было зарегистрировано действие света со спектральным максимумом 630 нм в работе [17], наблюдалась их биостимуляция и усиление пролиферации [20]. На фибробластах кролика (клеточная линия ALC) показано, что облучение красным (630 нм, 9.5 Дж/см²) и зеленым (530 нм, 9.8 Дж/см²) светодиодным светом приводит к стимуляции пролиферации клеток по сравнению с контролем, что не наблюдалось при воздействии синим (460 нм, 27 Дж/см²) светом. При этом действие ЭМИ красного и зеленого спектра вызывало значительное увеличение экспрессии инсулиноподобного фактора роста, трансформирующего фактора роста-бета (TGF-β1) и коллагена I, а действие синего света, наоборот, приводило к снижению экспрессии коллагена по сравнению с контролем. Кроме того, ЭМИ со спектральными максимумами 630 и 530 нм не влияло на экспрессию актина и интегрин, а с 460 нм снижало ее [21]. Так как фибробласты составляют большую часть микроокружения опухоли и оказывают непосредственное влияние на ее прогрессию и метастазирование, можно предположить, что стимуляция этого компонента может привести к активизации развития неоплазии. В недавней работе это было подтверждено на модели меланомы B16F10 у мышей при воздействии диодным лазером (660 нм; 150, 450 или 1050 Дж/см²). При дозе ≥450 Дж/см² было продемонстрировано увеличение содержания коллагеновых волокон в строме и опухолевом микроокружении и объема опухоли [22].

Таким образом, противоопухолевая эффективность низкоинтенсивного ЭМИ оптического диапазона зависит и от прямого влияния на опухолевые клетки, и от опосредованного действия на другие клеточные составляющие микроокру-

жения неоплазии. Вышеизложенное свидетельствует о том, что действие ЭМИ фиолетово-синего диапазона на опухолевый рост является малоисследованным, но этот биофизический подход может быть перспективным для разработки альтернативных методов противоопухолевой терапии.

Ранее в исследованиях *in vitro* в ходе комплексной оценки действия ЭМИ со спектральными максимумами 400, 460 и 660 нм на активность свободнорадикальных процессов в клетках опухолевой ткани и в крови в норме и в условиях роста экспериментального холангиоцеллюлярного рака РС-1 нами было показано, что эффект ФБМ зависит как от длины волны ЭМИ, так и от стадии развития опухолевого процесса [23]. На основании анализа литературных данных было выдвинуто предположение о том, что механизмы действия ЭМИ синего диапазона (460 ± 20 нм) могут быть связаны с фотодиссоциацией нитрозильных комплексов гемоглобина и фотодинамическим усилением оксидативных процессов в опухолевых клетках, а также показано, что ЭМИ со спектральным максимумом 400 нм в большей степени оказывает влияние на антиоксидантную систему защиты организма. Противоопухолевый эффект можно усилить за счет изменения интенсивности и направленности окислительных процессов в организме-опухоленосителя при действии озона [24]. В связи с этим цель настоящего исследования состояла в оценке совместного влияния низкоинтенсивного ЭМИ со спектральными максимумами 400 и 460 нм на динамику роста экспериментальной опухоли *in vivo* в ранние сроки развития и зависимости действия ЭМИ оптического диапазона от показателей прооксидантно-антиоксидантного баланса организма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Исследования проведены в летне-осенний период на аутбредных крысах-самцах линии Sprague Dawley (масса 250 ± 25 г, возраст 3 месяца), приобретенных в питомнике лабораторных животных «Пушино» (Пушино, Московская обл.). Животные, содержащиеся в стандартных условиях вивария с естественным освещением, получали полнорационный комбикорм («Лабораторкорм», Москва) и без ограничений питьевую водопроводную воду.

Все крысы ($n = 105$) были протестированы в тесте «открытое поле» [25] в ранее предложенной модификации [26]. Определяли горизонтальную и вертикальную двигательную активность, ориентировочно-исследовательскую активность (ОИА), эмоциональность и уровень тревожности. Полученные данные применяли при формировании репрезентативных экспериментальных групп.

В качестве модели неоплазии использовали солидную холангиоцеллюлярную карциному крыс РС-1, полученную из Банка опухолевых штаммов РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (Москва). Карцинома РС-1 — это медленно растущая неметастазирующая неоплазия с длительным латентным периодом, не превышающим 10 суток, и экспоненциальной фазой роста. Продолжительность жизни животных с опухолями, перевитыми под кожу, составляет обычно два-три месяца [27, 28]. Инокулом РС-1 вводили крысам подкожно в область левого бедра ($n = 91$).

Животные были распределены по группам: 1) «РС-1» ($n = 29$) — животные-опухоленосители без воздействия; 2) «РС-1 + ЭМИ» ($n = 33$) — животные-опухоленосители, которым проводили фотобиомодуляцию; 3) «РС-1 + ОФР + ЭМИ» ($n = 29$) — животные-опухоленосители, которым перед фотобиомодуляцией проводили процедуры введения озонированного изотонического 0.9%-го раствора хлорида натрия; 4) «Интактные» ($n = 14$) — здоровые крысы, которые не подвергались никаким воздействиям.

Схема воздействия. Воздействие ЭМИ фиолетово-синего диапазона на экспериментальную опухоль проводили на тринадцатые сутки после трансплантации — начальный этап экспоненциального роста РС-1. При фотобиомодуляции использовали экспериментальные генераторы низкоинтенсивного ЭМИ ($\lambda_1 = 400 \pm 20$ нм, $\lambda_2 = 460 \pm 20$ нм), разработанные в Федеральном исследовательском центре «Институт прикладной физики РАН» (Нижний Новгород). Генераторы — портативные приборы на основе светоизлучающих диодов с номинальным током потребления 350 мА, световым потоком 20 Лм и выходной мощностью 50 мВт и 34.6 мВт для спектральных максимумов 400 и 460 нм соответственно. Мощностные характеристики используемых светоизлучающих диодов контролировались при помощи детектора 3A-IS (Calibrated Integrating Sphere LED Power Meter, Ophir, Израиль). Рабочая полоса детектора 350–1100 нм, диапазон измеряемой мощности 1 мкВт — 3 Вт, апертура 12 мм. Параметры спектров применяемых светоизлучающих диодов контролировали с помощью спектрометра «QE Pro» (Ocean Optics, США) с соответствующим программным обеспечением. Ширина входной щели спектрометра, установленной на апертуре диаметром 8 мм, составляла 5 мкм. Время интегрирования составляло 100 мс.

Облучение осуществляли транскутанно непосредственно в область растущей опухоли и на кровь посредством воздействия на проекцию кровеносных сосудов брюшка в области паха. Шерсть на этих участках кожи предварительно депилировалась. Воздействие проводили однократно, одновременно облучая опухоль ($\lambda = 460$ нм) и брюшко

($\lambda = 400$ нм) по 15 мин на каждую область (доза падающего излучения составляла 3.2 и 4.6 Дж/см² соответственно, непрерывный режим работы, площадь облучаемой поверхности 9.6 см²).

Для модуляции свободнорадикального гомеостаза в организме животных-опухоленосителей использовали медицинский озон [29]. Действие озона осуществляли трехкратным введением озонированного изотонического 0.9%-го раствора хлорида натрия (ОФР) с интервалом в 48 ч, начиная с седьмых суток после перевивки солидной опухоли. Для этого внутривенно вводили по 0.5 мл ОФР с концентрацией озона в озон-кислородной смеси 400 мкг/л [30]. Введение животным ОФР осуществляли в течение 5 мин после барботирования. Озонирование осуществляли с использованием медицинского кислорода с помощью медицинского озонатора «ТЕОЗОН» (РФЯЦ ВНИИЭФ, Саров, Нижегородская область) [31].

Методы оценки опухолевого роста. Динамику роста опухоли оценивали по изменению объема опухолевого узла V (см³), который рассчитывали по следующей формуле:

$$V = \frac{\pi}{6} \cdot \left(\frac{d_1 + d_2}{2} \right)^3, \quad (1)$$

где d_1 и d_2 — два взаимно перпендикулярных поперечных сечения опухоли (в см) [32]. После подкожной трансплантации пальпацию и измерение объема опухолевого узла начинали проводить с шестых суток. Наблюдение за ростом опухоли проводили на протяжении 150 суток.

Методы оценки параметров свободнорадикального окисления. На четырнадцатые сутки после трансплантации опухоли часть животных из каждой опытной группы ($n = 11-16$) и всех интактных животных ($n = 14$) выводили из эксперимента декапитацией под ингаляционным наркозом с последующим обескровливанием, затем проводили вскрытие с извлечением и фиксацией органов в жидком азоте [33]. Для исследований использовали кровь, плазму, эритроциты, а также гомогенаты тканей печени, которые получали механическим перетиранием в жидком азоте керамическим пестиком в ступке.

Оценку изменения параметров свободнорадикального окисления, вызванного ростом опухоли и ФБМ, проводили на уровне ДНК, белков, липидов, а также учитывали общую свободнорадикальную активность и работу ферментативного звена антиоксидантной системы.

Уровень повреждений ДНК оценивали с помощью щелочной версии метода ДНК-комет в лейкоцитах периферической крови крыс [34, 35]. Полученные препараты окрашивали флуоресцентным красителем SYBR Green I (Sigma, США)

и затем анализировали с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ni-U (Nikon Corporation, Япония), совмещенного с цифровой камерой DS-Fi2 (Nikon Corporation, Япония). Полученные изображения обрабатывали с помощью специализированного программного обеспечения, разработанного В.Н. Степановым [36]. Для каждого образца крови готовили микроскопные слайды в двух технических повторах. Получали средние значения уровня повреждений ДНК после анализа за 50 «комет». Для количественной оценки уровня повреждений ДНК использовали процентное содержание ДНК в «хвосте кометы» (%ТДНК).

Степень окислительной модификации белков плазмы крови исследовали модифицированным методом по уровню карбонильных производных, регистрируемых с помощью реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. Оптическую плотность образовавшихся альдегидных и кетонных 2,4-динитрофенилгидразонов (альдегид- и кетон-ДНФГ) при спонтанном и металл-индуцированном окислении регистрировали при длинах волн 270 и 363 нм [37]. Содержание общего белка определяли биуретовым методом с использованием коммерческого набора «Общий белок Ольвекс» (ООО «Ольвекс диагностика», Россия) согласно инструкции. Уровень окислительной модификации белков выражали в единицах оптической плотности, отнесенных к 1 мг белка.

Определение продуктов перекисного окисления липидов осуществляли по тесту с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [38]. Оптическую плотность образовавшихся ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) регистрировали при длине волны 532 нм. Содержание ТБК-АП выражали в мкМ, при расчетах использовали коэффициент молярной экстинкции хромогена, образующегося при взаимодействии малонового диальдегида с ТБК, равного $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Интенсивность общей свободнорадикальной активности (АСР) оценивали косвенно методом индуцированной перекисью водорода и сульфатом железа хемилюминесценции на биолюминометре БХЛ-06М (Россия) [39].

Состояние антиоксидантной системы защиты оценивали по активности антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы в эритроцитах и гомогенатах тканей. Об активности СОД судили по реакции восстановления нитросинего тетразолия, каталазы — на основе изменения оптической плотности в области поглощения пероксида водорода [38]. Концентрацию гемоглобина в эритроцитах определяли гемоглобинцианидным методом с помощью коммерческого набора «Гемоглобин Агат» (ООО «Агат-Мед», Россия). Активность ферментов выражали в единицах активности на 1 г гемоглобина или ткани.

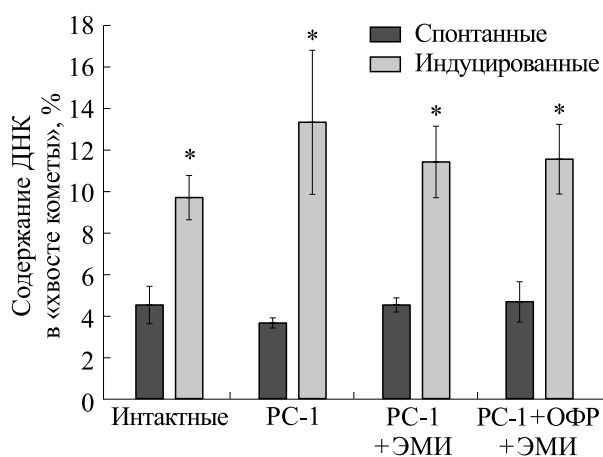


Рис. 1. Уровень спонтанных и индуцированных повреждений ДНК в лейкоцитах крови интактных животных и животных-опухоленосителей (PC-1) без и после воздействия ЭМИ фиолетово-синего диапазона; * – достоверные отличия относительно уровня спонтанных повреждений в каждой соответствующей группе по критерию Стьюдента-Ньюмена-Кейлса, $p < 0.02$.

Статистический анализ. Все эксперименты проведены по протоколу «слепого контроля», когда экспериментатор, проводивший измерения, не знал, какие воздействия были использованы. Нормальность распределения данных оценивали по тесту Колмогорова-Смирнова. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка или $Me [25\%; 75\%]$, где Me – медиана регистрируемого параметра, а 25% и 75% – интерцентильный размах. При распределении подопытных животных по типу поведенческой активности использовали кластерный анализ – метод k -средних. Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и критерия множественного сравнения Стьюдента–Ньюмена–Кейлса при нормальном распределении данных.

Для парного сравнения групп данных использовали U -критерий Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе поведенческих реакций крыс в тесте «открытое поле» среди подопытных животных ($N = 105$) были выделены три типа: 1) с активным поведением ($n = 34$); 2) со средним уровнем ориентировочно-исследовательской активности ($n = 41$); 3) с пассивным поведением ($n = 30$) (метод k -средних, $p < 0.001$). При формировании исследовательских групп крысы всех трех типов были равномерно распределены по группам.

В связи с тем, что ЭМИ фиолетово-синей области спектра находится на границе с ультрафиолетовым светом, необходимо было проконтролировать уровень повреждений ДНК в лейкоцитах крови крыс. Было показано, что спонтанные уровни повреждений ДНК на четырнадцатые сутки роста холангиоцеллюлярной карциномы как без воздействия, так и через 24 ч после действия ЭМИ не превышали значений у интактных крыс. Уровень индуцированных повреждений ДНК во всех опытных группах также не отличался от уровня у интактных животных (рис. 1). Это свидетельствует об отсутствии генотоксичности выбранных параметров ФБМ в условиях онкогенеза.

Исследование окислительной модификации белков как высокочувствительного маркера ранних этапов патологического процесса показало, что на экспоненциальной фазе роста PC-1 как без воздействий, так и после облучения ЭМИ происходило статистически значимое увеличение содержания альдегид- и кетон-ДФГ при металл-катализируемом окислении (табл. 1). Эти данные указывают на снижение устойчивости белков к деградации, что может возникать как при возрастании концентрации активных форм кислорода и азота, так и в условиях начавшегося истощения компонентов антиоксидантной системы в плазме крови [40]. Поглоще-

Таблица 1. Содержание альдегид-ДФГ и кетон-ДФГ в плазме крови крыс при спонтанном и металл-катализируемом окислении

Группа животных	Содержание альдегид-ДФГ, ед. опт. пл./1 мг белка		Содержание кетон-ДФГ, ед. опт. пл./1 мг белка	
	Спонтанное окисление	Металл-катализируемое окисление	Спонтанное окисление	Металл-катализируемое окисление
«Интактные»	0.18 \pm 0.01	0.56 \pm 0.01	0.26 \pm 0.02	0.72 \pm 0.02
«PC-1»	0.20 \pm 0.02	0.66 \pm 0.02*	0.30 \pm 0.02	0.81 \pm 0.01*
«PC-1+ЭМИ»	0.19 \pm 0.02	0.67 \pm 0.03*	0.30 \pm 0.02	0.82 \pm 0.02*
«PC-1 + ОФР + ЭМИ»	0.19 \pm 0.01	0.63 \pm 0.05	0.27 \pm 0.02	0.83 \pm 0.02*

Примечание. * – $p < 0.01$ по сравнению с интактными животными по критерию Стьюдента–Ньюмена–Кейлса.

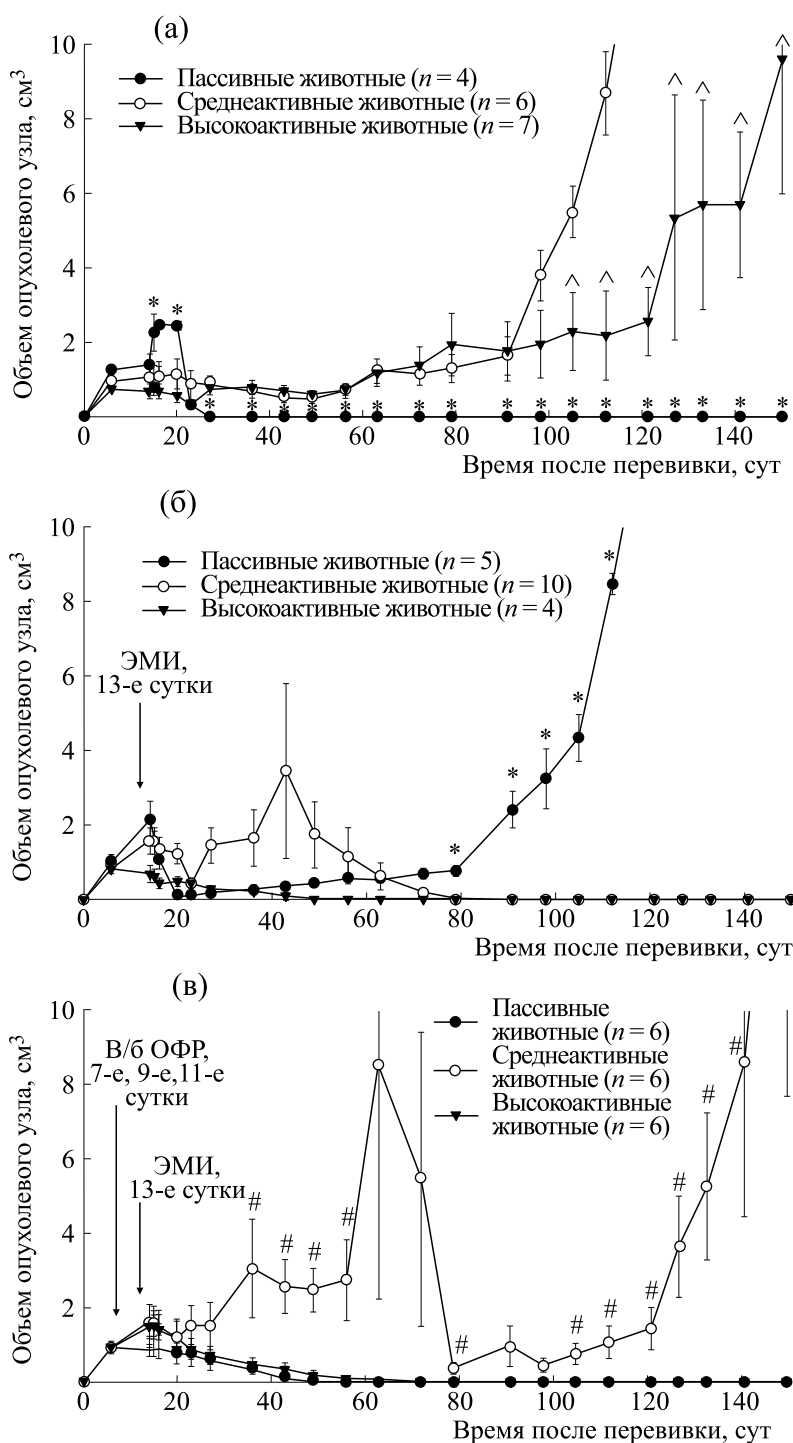


Рис. 2. Зависимость роста экспериментальной холангиоцеллюлярной карциномы РС-1 от типа поведенческой активности крыс в тесте «открытое поле» (а), изменение динамики роста опухоли после воздействия ЭМИ фиолетово-синей области спектра (б) и комбинировании этого воздействия с предварительным введением озонированного изотонического 0,9% раствора хлорида натрия (в); * и ^ – $p < 0.05$ по сравнению со среднеактивными животными, # – $p < 0.05$ по сравнению с пассивными крысами по критерию Стьюдента–Ньюмена–Кейлса.

ние антиоксидантов характерно для опухолей. При этом стоит отметить, что предварительное введение ОФР до воздействия ЭМИ снижало чувствительность белков к повреждению.

В динамике роста трансплантированной опухоли РС-1 были выявлены взаимосвязи с поведенческой активностью животных в тесте «открытое поле». Для животных с пассивным пове-

Таблица 2. Взаимосвязь поведенческих реакций с биохимическими параметрами свободнорадикального гомеостаза организма животных

Группа животных / биохимические показатели	Исходный тип поведенческой активности крыс		
	Пассивный	Среднеактивный	Высокоактивный
<i>Интактные</i>	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 6	<i>n</i> = 4
АСР плазмы крови, усл. ед.	2.32 [2.30; 2.35] ↑	1.99 [1.92; 2.04]	1.78 [1.75; 1.80] ↓
СОД эритроцитов, ед. акт. / г Нв	181 [178; 195]	138 [102; 189]	106 [100; 111]
СОД печени, ед. акт. / г ткани	13 [7; 16]	24 [17; 30]	40 [39; 45]
Каталаза печени, ед. акт. / г ткани	0.99 [0.81; 1.05] ↑	0.57 [0.49; 0.66]	0.32 [0.25; 0.40] ↓
ТБК-АП печени, мкМ	31.9 [28.3; 33.7]	27.6 [24.9; 28.1]	25.2 [22.0; 27.2]
<i>РС-1 (14 сутки роста)</i>	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 4
АСР плазмы крови, усл. ед.	2.13 [2.07; 2.18] ^	1.98 [1.72; 2.24]	1.86 [1.75; 1.94]
СОД эритроцитов, ед. акт. / г Нв	222 [198; 235] ↑ ^	140 [108; 172]	89 [43; 155]
СОД печени, ед. акт. / г ткани	6 [3; 10] ↓	21.5 [19; 24]	22 [13; 38]
Каталаза печени, ед. акт. / г ткани	0.17 [0.15; 0.20] ↓ ^	0.47 [0.30; 0.65]	0.53 [0.24; 0.69]
ТБК-АП печени, мкМ	18.8 [15.0; 20.6] ↓ ^	28.3 [25.2; 31.5]	24.7 [23.5; 33.0]
<i>РС-1 + ЭМИ</i>	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 6	<i>n</i> = 4
АСР плазмы крови, усл. ед.	1.96 [1.90; 2.00]*	1.92 [1.84; 1.95]	1.72 [1.63; 1.80] ↓
СОД эритроцитов, ед. акт. / г Нв	85 [78; 93]*	89 [67; 120]	319 [267; 330] ↑**
СОД печени, ед. акт. / г ткани	32 [26; 38]*	18 [12; 29]	29 [23; 30]
Каталаза печени, ед. акт. / г ткани	0.14 [0.10; 0.18] ↓	0.45 [0.28; 0.66]	0.65 [0.58; 0.70]
ТБК-АП печени, мкМ	37.9 [35.1; 40.6]	27.4 [24.5; 31.3]	28.1 [24.5; 29.8]
<i>РС-1 + ОФР + ЭМИ</i>	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 5
АСР плазмы крови, усл. ед.	1.96 [1.94; 1.97]	2.01 [1.85; 2.17]	1.97 [1.82; 2.14]
СОД эритроцитов, ед. акт. / г Нв	236 [191; 281]	176 [171; 184]	128 [95; 128]
СОД печени, ед. акт. / г ткани	17.5 [12; 23]	23 [19; 26]	21 [21; 23]
Каталаза печени, ед. акт. / г ткани	0.41 [0.33; 0.49]	0.64 [0.41; 0.68]	0.42 [0.37; 0.43]
ТБК-АП печени, мкМ	27.9 [25.6; 30.1]	24.5 [23.2; 25.8]	29.3 [28.0; 30.8]

Примечание. ↑, ↓ – Статистически значимые отличия показателей при сравнении значений со среднеактивными животными ($p < 0.05$, U -критерий Манна–Уитни); ^ – статистически значимые отличия показателей опухоленосителей по сравнению с интактными крысами с пассивным типом поведения ($p < 0.05$, U -критерий Манна–Уитни); * – статистически значимые отличия показателей по сравнению с опухоленосителями с пассивным типом поведения ($p < 0.05$, U -критерий Манна–Уитни); ** – статистически значимые отличия показателей по сравнению с опухоленосителями с высокоактивным типом поведения ($p < 0.05$, U -критерий Манна–Уитни).

днем была характерна высокая скорость увеличения опухолевого узла до шестнадцатых суток роста РС-1: среднее значение объема опухоли составило $2.46 \pm 0.11 \text{ см}^3$ по сравнению с 1.05 ± 0.42 и $0.68 \pm 0.20 \text{ см}^3$ у средне- и высокоактивных крыс соответственно ($p < 0.007$ по критерию Стьюдента–Ньюмена–Кейлса). Далее наблюдалось торможение в развитии холангиоцеллюлярной карциномы на двадцатые сутки и спонтанная регрессия опухоли к 23-м суткам после трансплантации. При наблюдении за этими животными в течение 150-ти суток после перевивки рецидива не было зафиксировано. У средне- и высокоактивных крыс карцинома РС-1 медленно развивалась до 91-х и 121-х суток соответственно с последующей интенсификацией роста неоплазии (рис. 2а).

Анализируя значения АСР, активности антиоксидантных ферментов и перекисного окисле-

ния липидов в крови и гомогенатах тканей, мы выявили особенности, связанные с поведенческими характеристиками животных (табл. 2). Пассивные интактные крысы по сравнению со здоровыми животными среднего поведенческого типа отличались более высокими значениями АСР в плазме крови (на 16.5%) ($p < 0.02$, U -критерий Манна–Уитни) и активности каталазы в печени (в 1.7 раза) ($p < 0.02$, U -критерий Манна–Уитни). Стоит также отметить тенденции более высоких показателей активности эритроцитарной СОД и содержания ТБК-активных продуктов перекисного окисления липидов в печени, но низкой активности СОД в тканях этого органа. Для высокоактивных животных, наоборот, были характерны более низкие значения общей АСР в плазме крови (на 10.5%, $p < 0.04$, U -критерий Манна–Уитни) и активности каталазы в печени (в 1.8 раза, $p < 0.02$, U -критерий Манна–Уитни), а также тенденции более низкой активности СОД в

эритроцитах, но высокой – в печени по сравнению со среднеактивными крысами (табл. 2).

Пассивные животные были более чувствительными к сдвигу свободнорадикального гомеостаза при опухолевом росте. На четырнадцатые сутки после трансплантации РС-1 у этих животных произошло снижение общей АСР плазмы крови, повышение активности СОД в эритроцитах, но снижение активности СОД и каталазы в печени на фоне снижения содержания ТБК-активных продуктов перекисного окисления липидов (табл. 2).

Полученные данные свидетельствуют о том, что каждому типу поведенческой активности животных соответствует свой тип про/антиоксидантного баланса в организме. Стоит отметить, что выделение различных типов свободнорадикального баланса в организме скорее всего является общебиологическим свойством для млекопитающих в целом, что подтверждается результатами работы, в которой было показано распределение показателей общей оксидантной активности у людей на низкий, средний и высокий уровни [41]. Нами установлено, что для крыс с низким уровнем ОИА характерна более высокая интенсивность окислительных процессов в организме, для высокоактивных, наоборот, – низкая. Это впоследствии и определяет динамику роста перевивной опухоли. Высокие уровни оксидантной активности в организме способствуют активации клеточных процессов в трансплантированных опухолевых клетках на начальных этапах формирования опухоли [42]. Вместе с тем в этих клетках по сравнению с нормальными формируются высокие или очень высокие уровни генерации активных форм кислорода [43] и для дальнейшего развития солидной неоплазии необходим приток из организма-хозяина ферментативных и неферментативных компонентов антиоксидантной системы [44]. Однако в организме пассивных крыс наблюдается относительный дефицит в отношении содержания антиоксидантных ферментов в тканях (табл. 2), что, видимо, является неблагоприятным фактором для прогрессии опухоли и объясняет спонтанный регресс неоплазии. Низкий уровень прооксидантных процессов у животных с высокой ОИА менее благоприятен для активации трансплантированных опухолевых клеток и является тормозящим фактором опухолевой прогрессии.

Таким образом, динамика роста подкожно трансплантированной опухоли зависит от индивидуальных особенностей крыс: исходного уровня ОИА, которая по данным литературы взаимосвязана с иммунной реактивностью [45], и установившегося прооксидантно-антиоксидантного баланса в организме. Если особенности поведения – генетически обусловленный признак, то

свободнорадикальные процессы на локальном и/или системном уровнях можно корректировать за счет внешнего воздействия [46], что в перспективе можно использовать для управления опухолем ростом.

Наши исследования показали, что однократная транскутанная ФБМ со спектральными максимумами 400 нм на кровь и 460 нм на опухоль в экспоненциальную фазу роста может стимулировать пролиферацию клеток опухолевого очага у крыс с пассивной ОИА (рис. 2б). При этом в организме животных происходит снижение общей АСР плазмы и активности СОД в эритроцитах крови на фоне возрастания активности СОД и низкой активности каталазы в печени (табл. 2). Вероятно, ЭМИ фиолетово-синего диапазона за счет стимулирования активности СОД в тканях способствует дальнейшему развитию РС-1 у пассивных животных. Воздействие ЭМИ на животных с высокоактивным типом поведения способствовало регрессированию карциномы РС-1. При этом на фоне сниженной общей АРС в плазме происходила активация СОД в эритроцитах крови.

Предварительное внутрибрюшинное введение ОФР модифицировало эффект ФБМ (рис. 2в). У животных с пассивным типом поведения воздействие ЭМИ способствовало остановке пролиферации клеток в опухолевом очаге и последующей его регрессии. У крыс с высокой ОИА наблюдался выраженный противоопухолевый эффект, а у животных со средним уровнем поведенческой активности происходило краткосрочное торможение роста карциномы РС-1. При этом нивелировались различия по параметрам свободнорадикального окисления между животными разных типов поведения, что обусловлено действием ОФР (табл. 2). Это подтверждает зависимость биологического эффекта ФБМ от уровня свободнорадикальных процессов в организме-опухоленосителей. Системное действие озона в выбранном режиме и дозировке способно корректировать резистентность холангиоцеллюлярной карциномы ранних сроков развития к фототерапии. Однако для прогнозирования отклика неоплазии на воздействие предварительно нужно проводить комплексную оценку состояния прооксидантно-антиоксидантного баланса в организме. Для разработки персонифицированной противоопухолевой терапии на основе комбинирования ФБМ и озона важны дальнейшие неклинические исследования на разнообразных опухолевых штаммах, так как разные по происхождению опухолевые клетки в разной степени подвержены влиянию как ФБМ [17, 18], так и озона [47]. При этом для определения широты оптимального дозирования фото- и озонотерапии требуется тестирование различных доз воздействий.

ВЫВОДЫ

Таким образом, методом ДНК-комет показано, что используемые параметры ФБМ фиолетово-синей частью спектра безопасны в отношении потенциальных генотоксических эффектов. Транскутанное воздействие ЭМИ со спектральными максимумами 400 нм на кровь и 460 нм на опухоль ранних сроков роста зависит от индивидуальных особенностей организма, а именно, от исходного уровня поведенческой активности, которая, в свою очередь, взаимосвязана с прооксидантно-антиоксидантным балансом в организме животных-опухоленосителей. Выявлены потенциальные риски стимулирования при ФБМ опухолевой прогрессии у животных с пассивным типом ориентировочно-исследовательской активности по тесту «открытое поле» и, соответственно, с высоким уровнем прооксидантных процессов в организме. Наиболее выражен противоопухолевый эффект ФБМ фиолетово-синей частью спектра у животных с высоким уровнем поведенческой активности и, соответственно, с низким уровнем оксидантных процессов в организме. Воздействие ЭМИ в исследуемом режиме на ранних этапах развития опухоли у животных со средним уровнем ориентировочно-исследовательского поведения приводит к торможению опухолевого роста. Мы применили озон для изменения интенсивности и направленности окислительных процессов в организме-опухоленосителя и показали, что курсовое введение озонированного физиологического раствора с концентрацией озона в озono-кислородной смеси 400 мкг/л может модулировать свободнорадикальный гомеостаз организма опухоленосителя, что способствует повышению эффективности противоопухолевого действия ФБМ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках проекта 19-02-00667а.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными проводили согласно принципам и рекомендациям, установленным Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. Mattiuzzi and G. Lippi, *J. Epidemiol. Glob. Health* **9** (4), 217 (2019). DOI: 10.2991/jegh.k.191008.001
2. T. I. Karu, *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* **20** (2), 143 (2014). DOI: 10.1109/JSTQE.2013.2273411
3. J. J. Anders, R. J. Lanzafame, and P. R. Arany, *Photomedicine and Laser Surgery* **33** (4), 183 (2015). DOI: 10.1089/pho.2015.9848
4. Y. Tian, H. Kim and H. W. Kang, *Lasers Med Sci.* **36** (3), 513 (2021). DOI: 10.1007/s10103-020-03050-x
5. C. Lu, F. Zhou, S. Wu, et al., *Antioxid. Redox Signal.* **24** (5), 249 (2016). DOI: 10.1089/ars.2015.6334
6. M. D. Martins, F. M. Silveira, L. P. Webber, et al., *J. Photochem. Photobiol. B* **209**, 111924 (2020). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111924
7. F. M. Silveira, T. R. Schmidt, B. Neumann, et al., *Oral Dis.* **2021**, 13967 (2021). DOI: 10.1111/odi.13967
8. H. Saghaei Bagheri, S. H. Rasta, S. M. Mohammadi, et al., *J. Lasers Med. Sci.* **11** (2), 174 (2020). DOI: 10.34172/jlms.2020.29
9. Г. А. Залеская, *Биофизика* **62** (3), 604 (2017).
10. В. П. Минаев и К. М. Жилин, *Современные лазерные аппараты для хирургии и силовой терапии на основе полупроводниковых и волоконных лазеров* (И. В. Балабанов, М., 2009).
11. T. Kushibiki, T. Hirasawa, S. Okawa, et al., *Photomed. Laser Surg.* **31** (3), 95 (2013). DOI: 10.1089/pho.2012.3361
12. Y. Xia, W. Yu, F. Cheng, et al., *Front. Oncol.* **11**, 701122 (2021). DOI: 10.3389/fonc.2021.701122
13. F. Y. Ang, Y. Fukuzaki, B. Yamanoha, et al., *Lasers Med. Sci.* **27** (5), 935 (2012). DOI: 10.1007/s10103-011-1009-8
14. S. Mo, H. J. Ku, S. H. Choi, et al., *Anticancer Res.* **41** (3), 1407 (2021). DOI: 10.21873/anticancer.14898
15. К. В. Кулакова, Т. Г. Щербатюк и В. В. Чернов, *Биомедицина* **2**, 68 (2012).
16. E. V. Khaydukov, K. E. Mironova, V. A. Semchishen, et al., *Sci. Rep.* **6**, 35103 (2016). DOI: 10.1038/srep35103
17. S. L. Hopkins, B. Siewert, S. H. Askes, et al., *Photochem. Photobiol. Sci.* **15** (5), 644 (2016). DOI: 10.1039/c5pp00424a
18. N. Matsumoto, K. Yoshikawa, M. Shimada, et al., *Anticancer Res.* **34** (9), 4709 (2014).
19. S. Manan and I. P. Witz, *Nat. Rev. Cancer* **18** (6), 359 (2018). DOI: 10.1038/s41568-018-0006-7
20. A. Crous and H. Abrahamse, *Photomed. Laser Surg.* **34** (11), 525 (2016). DOI: 10.1089/pho.2015.3979
21. Y. K. Seo, J. K. Park, C. Song, et al., *Lasers Med. Sci.* **29** (1), 245 (2014). DOI: 10.1007/s10103-013-1322-5
22. L. Frigo, J. M. Cordeiro, G. M. Favero, et al., *Lasers Med. Sci.* **33**, 1215 (2018). DOI: 10.1007/s10103-018-2461-5
23. Е. С. Жукова, Т. Г. Щербатюк, А. Л. Потапов и др., *Медицина труда и промышленная экология* **60** (9), 618 (2020). DOI: 10.31089/1026-9428-2020-60-9-618-623
24. А. Б. Гапеев и Т. Г. Щербатюк, *Биологические мембраны* **37** (3), 163 (2020). DOI 10.31857/S023347552002005X.

25. Я. Буреш, О. Бурешова и Д. П. Хьюстон, *Методика и основные эксперименты по изучению мозга и поведения* (Высшая школа, М., 1991).
26. Н. В. Вдовина, Е. С. Клинцева и Т. Г. Щербатюк, *Современные технологии в медицине* **2**, 12 (2010).
27. Л. Л. Малюгина, *Вопросы онкологии* **4** (5), 600 (1958).
28. N. Treshalina, V. Kobliakov, N. Raikhlin, et al., *Exp. Oncol.* **23** (2), 126 (2001).
29. Е. С. Жукова, А. Ю. Кашина и А. М. Иркаева, *Медицина труда и промышленная экология* **60** (11), 767 (2020). DOI: 10.31089/1026-9428-2020-60-11-767-770
30. Т. Г. Щербатюк, Е. С. Жукова (Плеханова), Ю. В. Никитина и др., *Биофизика* **65** (2), 367 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920020209
31. С. Н. Буранов, В. И. Карелин, О. А. Пименов и др., *Мед. альманах* **3** (27), 26 (2013).
32. Е. В. Ярославцева-Исаева, М. А. Каплан, Ю. С. Романко и др., *Рос. биотерапевтич. журн.* **2** (4), 19 (2003).
33. К. Е. Коптяева, А. А. Мужикян, Я. А. Гушин и др., *Лабораторные животные для научных исследований* **2**, 71 (2018). DOI: 10.29296/2618723X-2018-02-08
34. Н. П. Сирота и Е. А. Кузнецова, *Радиационная биология. Радиозэкология* **50** (3), 329 (2010).
35. A. V. Gapeyev, N. A. Lukyanova, and S. V. Gudkov, *Central Eur. J. Biol.* **9** (10), 915 (2014). DOI: 10.2478/s11535-014-0326-x
36. В. Н. Степанов Дис. ... канд. техн. наук (Институт проблем управления им. В. А. Трапезникова, М., 2005).
37. О. В. Занозина, Н. Н. Боровков и Т. Г. Щербатюк, *Современные технологии в медицине* **2**, 72 (2009).
38. А. В. Арутюнян, Е. Е. Дубинина и Н. Н. Зыбина, *Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма* (ИКФ «Фолиант», СПб., 2000).
39. Е. И. Кузьмина, С. В. Ермолин и А. Ф. Учугина, *Нижегородский мед. журн.* **1**, 8 (1993).
40. М. А. Фомина и Ю. В. Абаленихина, *Окислительная модификация белков тканей при изменении синтеза оксида азота* (ООО Издательская группа "ГЭОТАР-Медиа", М., 2018).
41. Л. А. Страхова, Т. В. Блинова, В. В. Трошин и др., *Медицина труда и экология человека* **2** (14), 61 (2018).
42. J. E. Le Belle, N. M. Orozco, A. A. Paucar, et al., *Cell Stem Cell* **8** (1), 59 (2011). DOI: 10.1016/j.stem.2010.11.028
43. Y. Ikeda, N. Nagase, A. Tsuji, et al., *Oxygen* **1** (1), 22 (2021). DOI: 10.3390/oxygen1010004
44. Л. П. Смирнова и И. В. Кондакова, *Биомедицинская химия* **50** (6), 566 (2004).
45. Е. В. Маркова, *Поведение и иммунитет* (НГПУ, Новосибирск, 2013).
46. А. Б. Гапеев, В. С. Якушина, Н. К. Чемерис и др., *Биофизика* **42** (5), 1125 (1997).
47. J. Baeza-Noci and R. Pinto-Bonilla, *Int. J. Mol. Sci.* **22** (21), 11796 (2021). doi: 10.3390/ijms222111796

Violet-Blue Photobiomodulation of the Dynamics of Tumor Growth and Prooxidant-Antioxidant Balance in the Body of Tumor Carriers

E.S. Zhukova*, T.G. Shcherbatyuk*, **, I.A. Chernigina***,
V.V. Chernov****, and A.B. Gapeyev*****

*Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Hygiene and Professional Pathology,
Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare,
ul. Semashko 20, Nizhny Novgorod, 603005 Russia

**Pushchino State Institute of Natural Sciences, prosp. Nauki 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

***Privolzhsky Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation,
pl. Minina i Pozharskogo 10/1, Nizhny Novgorod, 603005 Russia

****Institute of Applied Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Ul'yanova 46, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

*****Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

Using the model of cholangiocellular carcinoma PC-1 on Sprague Dawley rats, this study aimed at exploring the effects of photobiomodulation mediated by violet-blue light ($\lambda_1 = 400 \pm 20$ nm, 4.6 J/cm^2 ; $\lambda_2 = 460 \pm 20$ nm, 3.2 J/cm^2) on tumor growth and parameters of free radical processes in the tumor-bearing organism. It was shown that the efficacy of transcutaneous exposure to electromagnetic radiation with spectral maxima of 400 nm on blood and 460 nm on a tumor node at early growth depends on the individual characteristics of the organism, namely, on the initial level of exploratory activity of laboratory animals in the "open field" test and prooxidant-antioxidant balance in the body of tumor carriers. It was found that the treatment with ozonized isotonic 0.9% sodium chloride solution with concentration of ozone in the ozone-oxygen mixture of $400 \mu\text{g/l}$ modulates the effect of optical radiation, significantly changing the dynamics of tumor growth.

Keywords: photobiomodulation, violet-blue light, open field test, prooxidant-antioxidant balance, ozone, experimental cholangiocellular carcinoma