

Амбарцумян Р.В.

**Селективное воздействие лазерного излучения длиной волны 1268 нм на солидные опухоли. Усиление иммунного ответа физическими методами**

Ambartzumian R.V.

**Selective application of laser light with wavelength 1268  $\mu\text{m}$  for treating solid tumours. Physical methods for potentiating the immune response**

Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, г. Москва

Экспериментально, на примере меланомы В16, показано, что воздействие лазерного излучения с  $\lambda = 1268$  нм на солидные опухоли обладает высокой селективностью. Предложено объяснение наблюдаемого явления на основе рассмотрения физико-химической основы иммунного ответа, заключающегося в генерации с помощью света компонентов, вырабатываемых иммунной системой, в частности, синглетного кислорода. Предельно достижимая селективность в принципе определяется селективностью иммунного ответа на антиген. Рассмотрены и другие способы усиления иммунного ответа. *Ключевые слова:* синглетный кислород, прямое фотовозбуждение молекул кислорода, физика и химия иммунной системы, селективное воздействие, супероксидный анион.

During the experimentation with melanoma B16 it has been shown that laser light at  $\lambda = 1268 \mu\text{m}$  has a highly selective effect at solid tumours. Such a phenomenon may be explained by physical-chemical processes involved in the immune system response to antigen and comprises the generation of lacking components usually produced by the immune system, singlet oxygen in particular. Other opportunities of potentiating the immune system are also discussed. *Key words:* singlet oxygen, laser excitation of molecular oxygen, biochemistry of immune system, superoxide anion.

Целью данной работы являлось исследование возможности селективного воздействия лазерного излучения на опухоли при подавлении опухолевого роста путем прямого возбуждения молекул кислорода в синглетное состояние. Этот способ подавления опухолевого роста с помощью лазерного излучения на длине волны 1268 нм был предложен еще в 1986 году как альтернатива фотодинамическому эффекту [3]. Цитотоксическое действие указанным методом было продемонстрировано на примере облучения различных генетических линий бактерии *E-coli*, что подтверждалось полученным спектром действия, хотя и неясно, какова была при этом роль акустического воздействия [4]. В ходе реализации проекта МНТЦ<sup>1</sup> (ISTC) № 1552 «Исследование воздействия лазерного излучения различных длин волн на злокачественные опухоли» было исследовано воздействие излучения квазинепрерывного лазера на форстерите, работающего на длине волны 1268 нм, на имплантированные опухоли меланомы В-16 [5]. Было зарегистрировано существенное замедление скорости роста опухолей в зависимости от дозы облучения и, наконец, наблюдалось полное подавление опухолевого роста вплоть до полной элиминации на примере карциномы Эрлиха, что подтверждалось гистологическими исследованиями [1]. Таким образом, в цитированных работах была показана работоспособность предложенного метода. Однако метод фотодинамической терапии претендует на избирательность поражения опухолевых клеток по сравнению со здоровыми за счет большего накопления фотодинамического красителя именно в опухолевых клетках, хотя ряд экспериментальных исследований показывает, что реализуемая в экспериментах

избирательность далека от теоретической и практически отсутствует [14]. В случае прямого фотовозбуждения молекулярного кислорода в синглетное состояние селективность теоретически вообще должна отсутствовать, так как концентрация синглетного кислорода в зоне облучения должна повторять распределение невозбужденного  $\text{O}_2$  и, следовательно, должна наблюдаться обратная по знаку селективность из-за того, что в опухолевых клетках концентрация кислорода меньше, чем в здоровых, т. е. при одинаковой чувствительности по отношению к синглетному кислороду здоровые клетки должны погибать быстрее опухолевых.

Однако еще в ходе выполнения проекта ISTC № 1552 [5] было замечено, что это не так и что некоторая, довольно высокая, селективность действительно существует, особенно на начальной фазе облучения опухолей.

**Эксперимент**

Изучался рост опухолей меланомы В-16, перевитых на мышах линии *C57 black/6*, которым подкожно инокулировалось  $1 \cdot 10^6$  клеток меланомы на мышью. На 11-й день после инокуляции, когда размеры опухолей в среднем достигали размеров  $4 \times 4 \times 1$  мм<sup>3</sup>, опухоли облучались лазерным излучением на длине волны 1268 нм. Источником излучения являлся перестраиваемый по длине волны лазер на кристалле форстерита. Непосредственно перед днем облучения в области опухоли производилась эпиляция волосяного покрова. В эксперименте измерялись линейные размеры опухолей в трех взаимно перпендикулярных направлениях, и их произведение принималось за объем опухоли. Животные были разделены на 4 группы: контрольную с 16 особями, которую не облучали, и 3 экспериментальные группы по 10 особей в каждой. Животные этих трех групп облучались различными дозами. Доза варьировалась путем

<sup>1</sup> Международный научно-технический центр (International Scientific Technical Center)

изменения длительности облучения при неизменной плотности мощности в течение 3, 9 и 27 минут, что соответствовало 34,2, 102,6 и 307,8 джоулей. Величина мощности выбиралась такой, чтобы температура облучаемых тканей не поднималась выше 41 °С с целью отмежеваться от термических эффектов. Температура измерялась с помощью тонкой термпары, которая вводилась непосредственно в область опухоли. Лазерный пучок имел Гауссово распределение по интенсивности. Диаметр лазерного луча в плоскости облучаемой поверхности составлял 11 мм, что заведомо превышало размеры опухолей. Непосредственно за 2–3 минуты перед облучением животные анестезировались внутримышечной инъекцией 0,06 мг калипсола.

### Результаты

В результате облучения на месте опухолей образовывался небольшой, но уверенно регистрируемый отек, что выражалось в резком, до 2 раз, увеличении скорости роста опухолей по сравнению с необлученным контролем. Через ~3 дня после облучения размеры опухолей в облученных группах начинали отставать от необлученного контроля. Часть результатов этих экспериментов, а именно – начальной фазы развития опухолей, представлены в табл.

Таблица

Площадь опухолей в контрольной и экспериментальных группах, мм<sup>2</sup>

Дни после облучения	-1*	+1	+3	+7
Контроль необлученный	29,25	51,8 (1,77)	94,2 (1,81)	201 (2,33)
Облучение 3 мин	20,6	47,4 (2,3)	73,55 (1,55)	131 (1,76)
9 мин	20,7	64,1 (3,1)	76 (1,18)	146 (1,9)
27 мин	21	63 (3)	79,3 (1,25)	121 (1,52)

*Примечание.* В скобках показано отношение средних размеров опухолей за период между последовательными измерениями, т. е. фактически скорость роста опухолей. Ошибка измерений для контрольной группы составляет 28–30%, для экспериментальных групп – от 18 до 20%. Ошибки измерений определялись автоматически путем использования программы обработки экспериментальных данных *Miscosol Origine*®. \* – 1 днем обозначен день, предшествующий дню облучения.

Видно, что скорость роста в первый день после облучения в 2 раза превосходит таковую в необлученной группе животных. Эту разницу мы приписали возникновением отека, что характерно для воздействия на ткани синглетного кислорода [8].

Мы обратили внимание, что отек развивался лишь только в месте нахождения опухоли. В облученных областях, где опухоль отсутствовала, никакого отека не наблюдалось.

Видно, что площадь опухолей, увеличенных за счет образования отека, заметно меньше площади облучения, которая представляла круг диаметром 11 мм. Если предположить, что здоровые клетки реагировали на облучение так же, как и опухолевые, то во всех 30 случаях (количество облученных животных) мы имели бы отеки с диаметром 11 мм. При использованной методике измерения размеров опухолей (измерения в 3 вза-

имно перпендикулярных направлениях) объем таких отеков регистрировался бы как площадь 11 × 11 мм<sup>2</sup>, помноженная на толщину опухоли. Однако ни в одном из 30 случаев размер площади опухоли не превзошел величины 10 × 7 мм<sup>2</sup> (это максимально зарегистрированный размер, всего два случая). Такая ситуация, по нашему мнению, указывает на то, что *только опухолевые клетки реагируют на облучение данного типа*. Из результатов, приведенных в таблице 1, можно оценить селективность воздействия, которая здесь, по крайней мере, не ниже 10–20, судя по дозам, при которых еще нет отека в области здоровых клеток. Заметим, что при облучении на длине волны 1318,7 нм (вне резонанса поглощения молекулярного кислорода) таких эффектов не наблюдалось, хотя количество экспериментов с этой длиной волны было намного меньше.

### Обсуждение

По нашему мнению, единственная возможность обеспечения такой высокой селективности взаимодействия излучения с опухолью связана не с характеристиками поглощения тканей, а с селективными свойствами иммунной системы, так как спектры поглощения опухоли и здоровой ткани практически идентичны и избирательное поглощение излучения отсутствует.

Для того чтобы было ясно дальнейшее обсуждение полученных результатов, рассмотрим состояние иммунных клеток, находящихся в опухоли (tumor associated macrophages).

Согласно концепции иммуноредактирования, опухоли, с которыми мы имели дело, соответствуют третьей стадии развития – стадии сформировавшейся опухоли. Согласно этой концепции, в таких опухолях иммунная система вместо борьбы с опухолевыми клетками – антигенами всячески их оберегает. Конкретно, в случае макрофагов их популяция представлена в опухолях третьего уровня, в основном, фенотипом M2, который обладает иммуносупрессивными свойствами, индуцирует ангиогенез, восстанавливает повреждения в тканях. Подкласс макрофагов фенотипа M1 обладает провоспалительными свойствами, цитотоксическими свойствами и в опухолях третьей стадии развития их практически нет.

Классически, активация макрофагов M1 происходит по причине инфекции или повреждения тканей. Они активируются *in vitro* с помощью компонент стенок бактериальных клеток, таких как LPS, IFN-γ, и др. Фенотип M1 характеризуется образованием провоспалительных цитокинов, как например, TNF-α, 1β IL-1β, IL-6, IL-12 [6, 9, 10]. Мы полагаем, что существующие агенты в опухолевых клетках, которые не дают иммунной системе довести дело до конца, препятствуют образованию как супероксидных радикалов, так и синглетного кислорода и, следовательно, цитотоксических радикалов, ведущих к гибели опухолей. Иницируемый переход из фенотипа M2 в M1 сейчас рассматривается как один из перспективных способов борьбы с опухолями.

Излучение на длине волны 1268 нм, попадая в опухоль, создает в ней значительную концентрацию синглетного кислорода, определяемого дозой и концентрацией молекулярного кислорода в опухоли. Согласно обще-

принятой схеме, которая представлена ниже, начальной фазой фагоцитарного окислительного взрыва является одноэлектронная редукция молекулярного кислорода в основном триплетном состоянии с помощью NADPH-зависимого трансмембранного фагоцит-оксидазного фермента, в результате которого генерируется супероксид анион  $^{\cdot}\text{O}_2$ . Эта первичная стадия. Судя по всему, в M2-макрофагах она отсутствует. С помощью излучения иммунная система сразу переходит на следующую ступень химических реакций, которая приводит к образованию цитотоксических радикалов, ответственных к поражению антигенов.

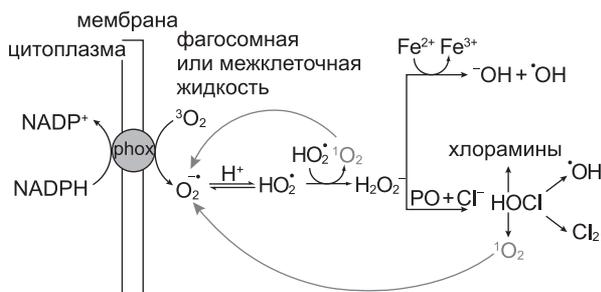


Рис. Схема химических превращений, происходящих при фагоцитозе. Здесь phox означает фагоцит-оксидазу. В макрофагах M2, по-видимому, супероксид радикал не образуется, и лазерное излучение позволяет миновать этот этап

Супероксид радикалы путем дисмутации превращаются в синглетный кислород, а тот – в перекись водорода. Перекись водорода, взаимодействуя с водой и синглетным кислородом, образует три-окси радикалы, которые намного токсичнее перекиси водорода, и именно они являются главным цитотоксическим агентом [10]. Заметим, что факт образования озонидов при работе иммунной системы установлен недостаточно достоверно [6]. Таким образом, если на этапе образования синглетного кислорода вмешивается фактор, препятствующий этому процессу, то и терминальная фаза, в которой образуются озониды типа  $\text{O}_3$ ,  $\text{HO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_3$ , хлорамины и гидроксильные радикалы, также прерывается, опухолевые клетки не уничтожаются, так как не образуется цитотоксический компонент. Еще одна из возможных причин – это прерывание цепочки реакций с самого начала (образования супероксида), т. е. не происходит одноэлектронной редукции молекулярного кислорода в основном триплетном состоянии с помощью NADPH-зависимой трансмембранной фагоцит-оксидазы или он образуется в недостаточном количестве.

Рассмотрим теперь причины возникновения селективности в описываемых экспериментах. С нашей точки зрения, селективность, в данном случае выражаемая как пространственно-ограниченное возникновение отека, в своей основе имеет отнюдь не селективное воздействие самого излучения на опухолевые клетки. Происхождение селективности заложено в селективном взаимодействии иммунных клеток с опухолевыми. Роль излучения в данном случае одна: активация цитотоксичности иммунных клеток. А так как иммунный процесс является высокоселективным, его селективность автоматически переносится на воздействие излучения на опухолевые клетки.

Облучая опухоль на длине волны 1268 нанометров, мы создаем в ней дополнительное количество молекул кислорода в синглетном состоянии, тем самым усиливая действие иммунной системы путем производства одного из ключевых элементов функционирования системы. Нарботанный синглетный кислород включается в естественную цепочку химических реакций радикалов, приводящих к образованию цитотоксических компонентов, в результате которых антиген погибает (в нашем случае – опухолевые клетки). Понятно, что не все молекулы синглетного кислорода, произведенные за счет фотопоглощения, включаются в иммунный процесс, хотя бы из-за того, что образуются не в нужном месте (пространственно), однако некоторая доля произведенного синглетного кислорода включается в процесс, о чем свидетельствуют экспериментальные результаты.

Можно ли назвать это лазерной реполяризацией иммунных клеток? Об этом говорить преждевременно. Для этого необходимы совершенно другие эксперименты.

В случае здоровых клеток, в которых нет вялотекущего иммунного процесса, количество нарабатываемого синглетного кислорода намного ниже того уровня, который необходим для их прямого поражения.

Коснемся других методов интенсификации работы иммунной системы.

Как видно из приведенного выше рисунка, наряду с синглетным кислородом важнейшим компонентом является супероксидный анион-радикал. Энергетически передача электрона на кислород практически не имеет энергетического барьера, даже наоборот, сродство к электрону у кислорода равно 0,45 электронвольт, так что присоединив к себе электрон, молекула кислорода оказывается в энергетически более выгодном состоянии по сравнению со свободной молекулой  $\text{O}_2$ . Очевидно, что увеличение его концентрации приведет к усилению иммунного ответа только из-за того, что количество радикалов, участвующих в иммунном ответе, увеличивается. Скорость образования супероксида обычно ограничена спиновыми запретами на реакции молекул в триплетных состояниях (кислород) с окружающими биомолекулами в синглетном состоянии. Эти реакции обычно регулируются магнитными переходами с изменением спина. Облучение опухоли СВЧ излучением с длиной волны 5 мм и длиннее вызывает переходы между спиновыми состояниями триплетного основного состояния молекулы кислорода [9]. Вне этого диапазона аналогичные переходы в  $\text{O}_2$  имеются на длине волны 2,5 мм, а нерезонансная часть простирается в сторону увеличения длины волны и связана с наличием диагональных матричных элементов. Именно этими нерезонансными переходами воспользовались Н.Д. Девятков с соавторами [2] при изучении воздействия СВЧ на опухоли. Механизм подавления опухолевого роста в [2] детально не ясен, однако можно предположить, что увеличение частоты спиновых переходов облегчает процесс наработки супероксидных радикалов, при этом возрастает мощность иммунной системы аналогично случаю с синглетным кислородом.

Очевидно, что объединение двух типов облучения – светом с длиной волны 1268 нм и СВЧ-облучением на длине волны, проникающей достаточно глубоко в ткани,

или дополнительный нагрев на несколько градусов – будет гораздо более эффективным, чем их воздействие поодиночке.

### Заключение

Экспериментально наблюдалось селективное воздействие лазерного излучения длиной волны 1268 нм на солидные опухоли, приводящее к подавлению опухолевого роста. Предложено объяснение механизма возникновения наблюдавшейся селективности воздействия, связанное с активацией иммунных клеток, в частности, макрофагов, ассоциированных с опухолью. Полученные результаты позволяют переосмыслить подходы и результаты лазерной терапии с использованием лазеров с низкой интенсивностью, особенно в области хронических заболеваний. Высокая селективность лазерного воздействия позволяет рассмотреть облучение излучением на длине волны 1268 нм как профилактическую процедуру для лиц с плохой онконаследственностью.

### Литература

1. Амбарцумян Р.В., Богуш Т.А., Елисеенко В.И. Подавление опухолевого роста лазерными импульсами высокой интенсивности. Прямое фотовозбуждение молекулярного кислорода в состоянии  $^1\Delta_g$ . // Лазерная медицина. – 2014. – Т. 18. – Вып. 1. – С. 25–30.
2. Девятков Н.Д., Плетнев С.Д., Чернов З.С. и др. Воздействие низкоэнергетического импульсного КВЧ и СВЧ-излучения наносекундной длительности с большой пиковой мощностью на биологические структуры (злокачественные образования) // ДАН. – 1994. – 336. – С. 826–828.
3. Ambartzumian R.V. Lasers in Cardiology // In 1986 European Conference on Optics, Optical Systems and Applications, S. Sottini and S. Trigary Editors, Proc. – SPIE, 1987. – V. 701. – P. 341–343.
4. Ambartzumian R.V., Arutunian A.A., Voskanyan K.Sh., Melkonian A.A. Cytotoxic Effect of Laser Irradiation at 1.27 Microns // In Laser Application in Medicine and Surgery, ed. Galetty G., Bolognani L., Ussia G., Monduzzi Editore. – Bologna, 1992. – P. 247–251.
5. Investigation 3 of nonthermal destruction of malignant tumors by laser radiation at different wavelengths. Final Technical Report of ISTC 1552 // Aug. 2003. <http://www.istc.ru/istc/db/projects.nsf/All/582457BAFE4B1ACE4325691E007063F2?OpenDocument&search=1>
6. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation // Cell. – 2011. – 144. – P. 46–674.
7. Kettle I.A.J., Clark B.M., Winterbourn C.C. Superoxide converts indigo carmine to isatin sulfonic acid // The J. Biol. Chem. – 2004. – 279. – № 18. – Issue of April 30. – P. 18521–18525.
8. Leunig A., Staub F., Peters J. et al. Volume changes of A-Mel3 tumor cells induced by photodynamic treatment // In Photodynamic Therapy and Biomedical Lasers; Proceedings of International Conf. on Photodynamic Therapy and Medical Laser Applications; Milan, 24–27 June 1992, editors P. Spinelli, M. Dal Fante, R. Marchesini. – Amsterdam-London-N-Y-Tokyo: EXCERPTA-MEDICA, 1992. – P. 751–754.
9. Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P., Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes // Trends Immunol. – 2002. – 23 (11). – P. 549–555.
10. Schreiber R.D., Old L.J., Smyth M.J. Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion // Science. – 2011. – 331. – P. 1565–1570.
11. Wentworth A.D., Jones L.H., Wentworth P. et al. Antibodies have the intrinsic capacity to destroy antigens // PNAS. – 2000. – 97. – P. 10930–10935.
12. Wentworth P.J., Wentworth A.D., Xueyong Zhu et al. Evidence for the production of trioxxygen species during antibody-catalyzed chemical modification of antigen // PNAS. – 2003. – V. 100. – P. 1490–1493.
13. Van Vleck J.H. The absorption of microwaves by oxygen // Physical Review. – 1947. – V. 7. – P. 413–424.
14. Zhuravkin I.N., Kostenich G.A. and Zavrid E.A. Photodynamic activity of chlorin  $e_6$  in experiment // In Photodynamic Therapy and Biomedical Lasers; Proceedings of International Conf. on Photodynamic Therapy and Medical Laser Applications; Milan, 24–27 June 1992 / Editors P. Spinelli, M. Dal Fante, R. Marchesini. – Amsterdam-London-N-Y-Tokyo: EXCERPTA-MEDICA, 1992. – P. 535–538.

Поступила в редакцию 05.06.2015 г.

Контактное лицо: Амбарцумян Рафаэл Викторович  
Тел. 8-916-617-42-18