

УДК 57.085.2

DOI 10.34014/2227-1848-2020-4-122-132

## ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ С ДЛИНОЙ ВОЛНЫ 1265 НМ НА УРОВЕНЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И СИСТЕМУ ПОЛ – АОЗ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК СНО-К1 И А875

А.В. Хохлова, Л.В. Полуднякова, А.Ю. Федотова,  
Д.А. Столяров, А.К. Гильмутдинова, Е.С. Погодина, Ю.В. Саенко,  
И.И. Антонеева, Е.А. Белобородов

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

*Ближнее инфракрасное лазерное излучение обладает значительно большей способностью проникать в живые ткани по сравнению с оптическим излучением видимого диапазона и нередко оказывает противоположное действие на нормальные и злокачественные клетки, являясь, таким образом, перспективным инструментом для терапии поверхностных новообразований. Однако механизмы, лежащие в основе взаимодействия лазера и биологических структур, могут иметь различную природу в силу выбранной длины волны, мощности и некоторых других параметров излучения.*

*Цель работы – исследовать влияние лазерного излучения с длиной волны 1265 нм в дозах 9,45–18,9 Дж/см<sup>2</sup> на генерацию активных форм кислорода (АФК), уровень ферментов системы антиоксидантной защиты (АОЗ) и перекисного окисления липидов (ПОЛ) в нормальных и раковых клетках на примере линий эпителия яичника китайского хомячка СНО-К1 и меланомы человека А875.*

*Материалы и методы. Эксперимент выполнен на клеточных линиях СНО-К1 и А875, которые облучались источниками лазерного излучения с длиной волны 1265 нм, мощностью 4,2–100 мВт в течение 30–60 мин. Внутриклеточная концентрация АФК изучалась с помощью флуоресцентного окрашивания DCFH-DA, обработка изображений осуществлялась в программе ImageJ. Уровень продуктов ПОЛ и активность ферментов АОЗ определялись биохимическими методами. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием U-критерия Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).*

*Результаты. В клетках линии СНО-К1 выявлено повышение уровня АФК, снижение активности супероксиддисмутазы и каталазы, а также снижение уровня малонового диальдегида. В клетках линии А875 установлено повышение активности каталазы и уровня малонового диальдегида.*

*Выводы. Лазерное излучение с длиной волны 1265 нм способствует усилению генерации АФК и угнетению системы ПОЛ – АОЗ в нераковой клеточной линии СНО-К1, в то время как в клетках меланомы А875 наблюдаются противоположные эффекты облучения.*

**Ключевые слова:** культура клеток, рак, меланома, низкоинтенсивное лазерное излучение, инфракрасное лазерное излучение, окислительный стресс, митохондрии, активные формы кислорода, перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита.

**Введение.** Меланома является самым агрессивным типом рака кожи. Показатель заболеваемости в мире растет ежегодно на 2–7 % [1]. Распространенность заболевания в России в течение 2015–2019 гг. возросла с 56,9 до 66,9 на 100 тыс. населения [2].

Медиана выживаемости пациентов с меланомой составляет всего 6–9 мес., а 5-летняя выживаемость – менее 5 % [3].

Существующие на сегодняшний день способы лечения меланомы кожи требуют высо-

котехнологичного подхода, а результаты лечения остаются сложно предсказуемыми. Это обстоятельство делает необходимым поиск новых методов системного и местного лечения. В настоящее время появляются экспериментальные исследования по использованию фотобиомодуляции в терапии меланомы [4, 5].

При поиске эффективных параметров лазерного излучения для терапии меланомы кожи важным аспектом является глубина воздействия, позволяющая максимально затронуть

новообразование. Среди спектров оптического излучения инфракрасный обладает максимальной глубиной проникновения [6]. В свою очередь внутриклеточным процессом, ассоциированным с данным диапазоном, является развитие окислительного стресса через продукцию супероксида [7, 8]. Клеточные механизмы, лежащие в основе клеточного адаптивного и/или активирующего окислительного стресса, вызываемого низкоуровневой световой или фотобиомодуляционной терапией, все еще остаются неясными для ближнего инфракрасного спектра (NIR) (750–3000 Нм), особенно для диапазона 1265–1270 Нм (самое высокое поглощение молекулярным кислородом) [9, 10].

**Цель исследования.** Изучение влияния низкоинтенсивного лазерного излучения с длиной волны 1265 нм на уровень окислительного стресса и состояние системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в клетках эпителия яичника китайского хомячка и меланомы человека.

**Материалы и методы.** Для работы были выбраны две культуры клеток эпителиального происхождения: нераковая линия эпителия яичника китайского хомячка CHO-K1 (ATCC® CCL-61™) и линия клеток меланомы человека A-875 (RRID:CVCL\_4733).

Клетки культивировали в инкубаторе Sanyo MCO-18AIC (Япония) при влажности 100 %, температуре 37 °С и концентрации CO<sub>2</sub> 5 %. До и во время проведения эксперимента клетки содержали в культуральной среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Biosera, Франция) и гентамицина в концентрации 50 мг/л («ПанЭко», Россия).

За 24 ч до эксперимента клетки сеяли в 8-луночные слайд-флаконы (SPL Lifesciences, Южная Корея) в концентрации 10<sup>5</sup> на ячейку. После прикрепления подвергали воздействию инфракрасного лазерного излучения с длиной волны 1265 нм.

Использовали следующие источники и параметры излучения:

1. Перестраиваемый узкополосный лазер Yenista Optics Osics T100 (Франция): длина волны – 1265 нм, мощность – 4,2 мВт, время облучения 30/60 мин, плотность энергии 9,45/18,9 Дж/см<sup>2</sup>.

2. Лазерный диод LD-1265.5-FBG-350 (Innolume, Германия): длина волны 1265 нм, мощность 10/100 мВт, время облучения 30 мин, плотность энергии 22,5/225 Дж/см<sup>2</sup>. Плотность энергии (Е, Дж/см<sup>2</sup>) лазерного излучения рассчитывали по формуле  $E=Pt/S$ , где P – средняя выходная мощность, Вт; t – время облучения, с; S – площадь облучения, см<sup>2</sup>.

Облучение проводили в камере настольного инкубатора UNO H501-T (Okolab, Италия) в условиях, идентичных условиям культивирования. В то время как одну из ячеек слайд-флакона подвергали облучению, другая (контрольная) была закрыта металлической фольгой для защиты от излучения. Все эксперименты проводили не менее чем в трех повторях.

С помощью флуоресцентной микроскопии определяли концентрацию активных форм кислорода, используя краситель 2',7'-дихлор-офлуоресцеин-диацетат (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, США), как описано ранее [11].

Результат окрашивания оценивали с использованием инвертированного микроскопа Nikon Ti-S, дополненного фотокамерой DS-Qi1MC, объективом Nikon S Plan Fluor ELWD 20×0.45 с соответствующими фильтрами и ПК с программой Nikon NIS-elements 4.0.

Обработку изображений проводили в компьютерной программе ImageJ (Национальный институт здоровья, США). Скорректированную интегральную флуоресценцию клетки (СИФК) рассчитывали по формуле СИФК = интегральная плотность – (площадь выделенной клетки × фоновое значение флуоресценции) [12].

Для определения состояния системы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной защиты (АОЗ) после облучения клетки снимали с использованием 0,25 % раствора трипсин-ЭДТА («ПанЭко», Россия), ресуспендировали в натрий-фосфатном буфере (pH 7,4) и подсчитывали количество клеток в каждом образце в камере Горяева. Далее натрий-фосфатный буфер удаляли центрифугированием, а клетки замораживали при -20 °С. Анализ продуктов ПОЛ и активности ферментов-антиоксидантов проводили в лизате клеток.

В клетках меланомы определяли уровень продуктов ПОЛ: диеновых конъюгатов (ДК),

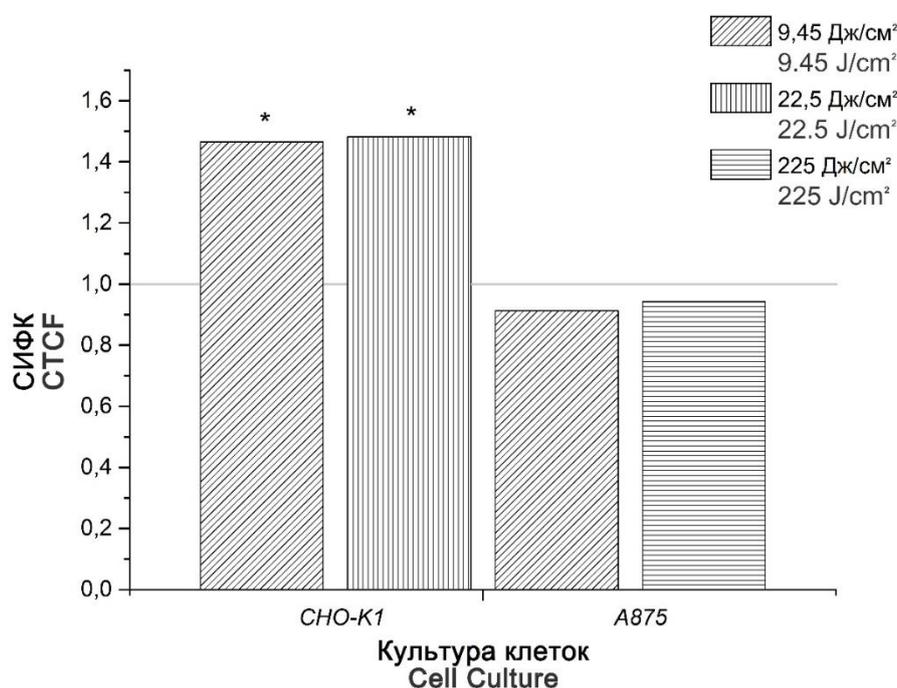
кетодиенов (КД), оснований Шиффа (ОШ), малонового диальдегида (МДА), а также активность ферментативного звена антиоксидантной системы: супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР) и восстановленного глутатиона (GSH). Уровень ДК, КД и ОШ определяли спектрофотометрически по методике И.А. Волчегорского [13]. Содержание этих продуктов рассчитывали по отношению оптических плотностей гептановой фазы E232/220 (ДК), E278/220 (КД), E400/E220 (ОШ). Уровень МДА (мкмоль/л) определяли в тесте с тибарбитуровой кислотой по методу Л.И. Андреевой и соавт. [14]; активность каталазы и уровень GSH – по методу А.И. Карпищенко [15]; активность ГР – по методу В.С. Асатиани [16]. Активность СОД оценивали по способности конкурировать с нитросиним тетразолием (НСТ) за супероксидный анион по методу М. Nishikimi [17].

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Stata v. 6.0. Достоверность различий между количественными показателями вычисляли, используя непараметрический U-критерий Манна–Уитни ( $p < 0,05$ ).

### Результаты

**Оксидативный стресс.** При облучении клеток CHO-K1 лазерным излучением с плотностью энергии 9,45 Дж/см<sup>2</sup> достоверно увеличилась концентрация АФК по сравнению с контролем (в 1,47 раза). В клетках меланомы человека A875 изменений в концентрации АФК не произошло (рис. 1).

При увеличении плотности энергии облучения до 22,5 Дж/см<sup>2</sup> в клетках линии CHO-K1 также наблюдалось достоверное повышение концентрации АФК (в 1,48 раза), при этом изменений в культуре клеток меланомы человека при плотностях энергии 22,5 и 225 Дж/см<sup>2</sup> не отмечалось.



**Рис. 1.** Внутриклеточная концентрация активных форм кислорода в культурах клеток эпителия яичника китайского хомячка CHO-K1 и меланомы человека A875 при воздействии лазерного излучения с длиной волны 1265 нм и плотностью энергии 9,45, 22,5 и 225 Дж/см<sup>2</sup>, отношение значения скорректированной интегральной флуоресценции (СИФК) эксперимента к контролю.

\* – достоверное отличие между экспериментом и контролем ( $p < 0,05$ )

**Fig. 1.** Intracellular concentration of reactive oxygen species in the Chinese hamster ovary epithelial cell line CHO-K1 and human melanoma A875 under laser therapy (1265 nm, energy density 9.45, 22.5 and 225 J/cm<sup>2</sup>), corrected total cell fluorescence (CTCF) – fold change compared to control.

\* – the difference between experimental and control groups is statistically significant ( $p < 0.05$ )

*Система ПОЛ – АОЗ.* Нами установлено, что непрерывное лазерное облучение на длине волны 1265 нм, мощностью 4,2 мВт и плотностью энергии 9,45 Дж/см<sup>2</sup> достоверно изменило (относительно контроля) содержание вторичного продукта ПОЛ – малонового диальдегида – в клетках меланомы и клетках эпителия яичника CHO-K1 (табл. 1). В клет-

ках меланомы произошел достоверный рост уровня МДА – в 1,9 раза, в клетках линии CHO-K1 уровень МДА снизился в 2 раза. Уровень продуктов перекисного окисления: диеновых конъюгатов, кетодиенов и оснований Шиффа – ни в одной из исследуемых клеточных линий достоверно не изменился.

Таблица 1  
Table 1

**Показатели системы ПОЛ – АОЗ в культурах клеток меланомы A875 (E=18,9 Дж/см<sup>2</sup>) и эпителия яичника китайского хомячка CHO-K1 (E=9,45 Дж/см<sup>2</sup>)**

**Indicators of AOD system and LPO products in A875 human melanoma cells (E=18.9 J/cm<sup>2</sup>) and Chinese hamster ovary epithelial cells CHO-K1 (E=9.45 J/cm<sup>2</sup>)**

Показатель Parameter	Клеточная линия A875 A875 cell line		Клеточная линия CHO-K1 CHO-K1 cell line	
	Контроль Control	Опыт Experiment	Контроль Control	Опыт Experiment
МДА, мкмоль/л Malondialdehyde, μmol/L	14,15±1,53	27,32±1,7*	11,81±1,4	5,86±0,3*
ДК, ед. опт. пл./мл Diene conjugates, opt. density units/ml	1,74±0,18	1,61±0,11	0,49±0,01	0,52±0,1
КД, ед. опт. пл./мл Ketodienes, opt. density units/ml	0,18±0,005	0,19±0,002	0,04±0,01	0,05±0,01
ОШ, ед. опт. пл./мл Schiff base, opt. density units/ml	0,019±0,02	0,018±0,1	0,002±0,0005	0,003±0,001
СОД, усл. ед./л Superoxide dismutase, standard units/L	1,405±0,41	1,804±0,86	2,94±0,32	0,46±0,15*
Каталаза, ммоль/мин/л Catalase, mmol/min/L	66,97±9,94	151,68±15,78*	15,61±5,22	7,11±1,77*
ГПО, ммоль/мин/л Glutathione peroxidase, mmol/min/L	116±28,97	135,10±20,48	35,76±5,78	30,79±2,86
Глутатион, мкмоль/л Glutathione, μmol/L	0,644±0,077	0,687±0,057	0,149±0,03	0,184±0,023

**Примечание.** \* – достоверные различия по сравнению с контролем (p<0,05).

**Note.** \* – the differences are significant compared with the control group (p<0.05).

Анализ активности ферментов АОЗ в клеточных линиях показал, что уровень активности СОД в клетках CHO-K1 достоверно снизился более чем в 6 раз относительно контроля, а в клетках меланомы не изменился.

Активность каталазы под влиянием лазерного излучения достоверно возросла в клетках меланомы, однако в эпителиальных клетках

линии CHO-K1 произошло ее достоверное снижение.

Под влиянием лазерного излучения с плотностью энергии 9,45 Дж/см<sup>2</sup> не произошло значимых изменений в системе глутатиона ни в одной из исследуемых клеточных линий. Уровень глутатиона и активность ферментов, осуществляющих обратимое превра-

щение восстановленного глутатиона в окисленный, – глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы – не изменились.

**Обсуждение.** Увеличение концентрации активных форм кислорода и развитие окислительного стресса в ответ на воздействие лазерного излучения в диапазоне 1265–1270 нм было показано для фотобиомодуляции в разных дозах как на нормальных, так и на раковых клетках [9, 11, 18–20]. При этом наблюдались изменение мембранного потенциала митохондрий, окисление белков и ДНК, клеточная гибель и некоторые другие клеточные события. Подобная реакция клеток на облучение предположительно обусловлена вмешательством в работу митохондрий, считающихся основными акцепторами лазерного излучения в силу своей структуры и функции [21–25].

Облучение культуры меланомы человека А875 показало специфическую стойкость клеток к лазерному излучению в дозе от 9,45 до 225 Дж/см<sup>2</sup>, что выражалось в отсутствии развития окислительного стресса (рис. 1). Данный диапазон плотностей энергии излучения относится к низким и средневысоким, при которых показано разнонаправленное воздействие на пролиферацию меланомы в зависимости от дозы, интенсивности и кратности воздействия [26, 27]. Стоит отметить, что концентрация активных форм кислорода при воздействии лазерного излучения 1265 нм увеличивалась в нормальных и раковых клетках как в данной работе, так и в предыдущих исследованиях [11, 19].

В связи с этим возникает вопрос, является ли подобный эффект особенностью изученной клеточной линии, особенностями меланом в целом или обуславливается намного раньше и является отличительной особенностью клеток, контактировавших в своем онтогенезе с внешней средой и различными видами оптических излучений.

В целом можно говорить о том, что в нераковых клетках СНО-К1 свободнорадикальные процессы были репрессированы. Это подтверждалось снижением содержания МДА, происходящим на фоне нарушения в работе каскада антиокислительных ферментов [28].

Наши результаты согласуются с данными, полученными К. Khorsandi et al. [29], которые наблюдали повышение уровня МДА в клетках меланомы линии А375 под влиянием низкочастотного лазерного облучения с энергией 3 Дж/см<sup>2</sup>. Исследователи также отметили снижение активности глутатионпероксидазы в клетках А375 при облучении низкочастотным лазерным излучением. В нашем эксперименте уровень активности данного фермента не изменился.

**Заключение.** Лазерное излучение с длиной волны 1265 нм и плотностью энергии 9,45–225 Дж/см<sup>2</sup> вызывает увеличение внутриклеточной концентрации активных форм кислорода в клетках СНО-К1 и не оказывает влияния на клетки меланомы человека А875. При оценке состояния системы ПОЛ – АОЗ установлено снижение активности супероксиддисмутазы и каталазы, а также снижение концентрации малонового диальдегида в клетках СНО-К1 под влиянием лазерного излучения 1265 нм с плотностью энергии 9,45 Дж/см<sup>2</sup>. В клетках А875 наблюдалось повышение активности каталазы и уровня малонового диальдегида при облучении с плотностью энергии 18,9 Дж/см<sup>2</sup> по сравнению с необлученным контролем. Прочие компоненты системы антиоксидантной защиты (глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, глутатион) и уровень продуктов ПОЛ (кетодиены, диеновые конъюгаты, основания Шиффа) в исследованных клеточных линиях воздействием лазерного излучения затронуты не были.

*Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-415-730003 p\_a).*

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Литература

1. Gladfelter P., Darwish N.E., Mousa S.A. Current status and future direction in the management of malignant melanoma. *Melanoma Res.* 2017; 27 (5): 403–410.

2. *Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О.* Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2020. 239.
3. *Гафтон Г.И., Анисимов В.В., Гельфонд М.Л., Семилетова Ю.В., Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Новик А.В., Мяснянкин М.Ю.* Клинико-иммунологическая оценка эффективности неoadъювантной фотодинамической терапии в хирургическом лечении первичной меланомы кожи. Сибирский онкологический журнал. 2015; 2: 31–38.
4. *Peidaee P., Almansour N.M., Pirogova E.* In vitro evaluation of low-intensity light radiation on murine melanoma (B16F10) cells. *Med. Biol. Eng. Comput.* 2016; 54 (2–3): 325–332.
5. *Chen Z., Li W., Hu X., Liu M.* Irradiance plays a significant role in photobiomodulation of B16F10 melanoma cells by increasing reactive oxygen species and inhibiting mitochondrial function. *Biomed. Opt. Express.* 2019; 11 (1): 27–39.
6. *Ash C., Dubec M., Donne K., Bashford T.* Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods. *Lasers Med. Sci.* 2017; 32 (8): 1909–1918.
7. *Costa Carvalho J.L., de Brito A.A., de Oliveira A.P., de Castro Faria Neto H.C., Pereira T.M., de Carvalho R.A., Anatriello E., Aimbire F.* The chemokines secretion and the oxidative stress are targets of low-level laser therapy in allergic lung inflammation. *J. Biophotonics.* 2016; 9 (11–12): 1208–1221.
8. *Firat E.T., Dağ A., Günay A., Kaya B., Karadede M.I., Kanay B.E., Ketani A., Evliyaoğlu O., Uysal E.* The effects of low-level laser therapy on palatal mucoperiosteal wound healing and oxidative stress status in experimental diabetic rats. *Photomed. Laser Surg.* 2013; 31 (7): 315–321.
9. *Sokolovski S.G., Zolotovskaya S.A., Goltsov A., Pourreyron C., South A.P., Rafailov E.U.* Infrared laser pulse triggers increased singlet oxygen production in tumour cells. *Sci Rep.* 2013; 3: 3484.
10. *Oliveira C.S., Turchiello R., Kowaltowski A.J., Indig G.L., Baptista M.S.* Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency. *Free Radic. Biol. Med.* 2011; 51 (4): 824–833.
11. *Khokhlova A., Zolotovskii I., Stoliarov D., Vorsina S., Liamina D., Pogodina E., Fotiadi A., Saenko Y., Sokolovski S., Rafailov E.* The Photobiomodulation of Vital Parameters of the Cancer Cell Culture by Low Dose of Near-IR Laser Irradiation. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics.* 2019; 25 (1): 1–10.
12. *McCloy R.A., Rogers S., Caldon C.E., Lorca T., Castro A., Burgess A.* Partial inhibition of Cdk1 in G2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle.* 2014; 13 (9): 1400–1412.
13. *Волчегорский В.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г.* Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропаноловых экстрактах крови. *Вопросы медицинской химии.* 1989; 1: 127–131.
14. *Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А.* Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой. *Лабораторное дело.* 1988; 11: 41–43.
15. *Карпищенко А.И., ред.* Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике. Т. 2. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013. 792.
16. *Асатиани В.С.* Ферментные методы анализа. М.; 1969: 607–610.
17. *Nishikimi M., Appa N., Yagi K.* The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenacinemethosulfate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972; 46: 849–854.
18. *Anquez F., Yazidi-Belkoura I., Randoux S., Suret P., Courtade E.* Cancerous cell death from sensitizer free photoactivation of singlet oxygen. *Photochem Photobiol.* 2012; 88 (1): 167–174.
19. *Saenko Y.V., Glushchenko E.S., Zolotovskii I.O., Sholokhov E., Kurkov A.* Mitochondrial dependent oxidative stress in cell culture induced by laser radiation at 1265 nm. *Lasers Med. Sci.* 2016; 31 (3): 405–413.
20. *Khokhlova A., Zolotovskii I., Stoliarov D., Vorsina S., Liamina D., Pogodina E., Fotiadi A., Saenko Y., Sokolovski S., Rafailov E.* Effects of high and low level 1265 nm laser irradiation on HCT116 cancer cells. *Proc. SPIE.* 2019; 10861: 108610L. DOI: 10.1117/12.2509529.
21. *Pastore D., Greco M., Passarella S.* Specific helium-neon laser sensitivity of the purified cytochrome c oxidase. *Int. J. Radiat. Biol.* 2000; 76 (6): 863–870.
22. *Eells J.T., Wong-Riley M.T., Ver Hoeve J., Henry M., Buchman E.V., Kane M.P., Gould L.J., Das R., Jett M., Hodgson B.D., Margolis D., Whelan H.T.* Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. *Mitochondrion.* 2004; 4 (5–6): 559–567.

23. Wong-Riley M.T., Liang H.L., Eells J.T., Chance B., Henry M.M., Buchmann E., Kane M., Whelan H.T. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. *J. Biol. Chem.* 2005; 280 (6): 4761–4771.
24. Gonzalez-Lima F., Auchter A. Protection against neurodegeneration with low-dose methylene blue and near-infrared light. *Front. Cell Neurosci.* 2015; 9: 179.
25. Khokhlova A., Zolotovskii I., Sokolovski S., Saenko Y., Rafailov E., Stoliarov D., Pogodina E., Svetukhin V., Sibiry V., Fotiadi A. The light-oxygen effect in biological cells enhanced by highly localized surface plasmon-polaritons. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 1269. DOI: 10.1038/s41598-020-58159-4.
26. Frigo L., Luppi J.S., Favero G.M., Durnavei A.M., Penna S.C., Bjordal J.M., Bensadoun R.J., Lopes-Martins R.A. The effect of low-level laser irradiation (In-Ga-Al-AsP – 660 nm) on melanoma in vitro and in vivo. *BMC Cancer.* 2009; 9: 404.
27. Andreeva N.V., Yegorov Y.E., Belyavsky A.V., Zotov K.V., Yusupov V.I., Bagratashvili V.N., Kalashnikova M.V. The effect of infrared laser irradiation on the growth of human melanoma cells in culture. *Biophysics.* 2016; 61 (6): 979–984.
28. Франциянц Е.М., Солдаткина Н.В., Орловская Л.А., Даишков А.В. Некоторые показатели свободно-радикальных процессов и антиокислительной системы ткани опухоли молочной железы и ее перифокальной зоны при различных вариантах течения рака. Опухоли женской репродуктивной системы. 2008; 2: 38–44.
29. Khorsandi K., Kianmehr Z., Hosseinmardi Z., Hosseinzadeh R. Anti-cancer effect of gallic acid in presence of low level laser irradiation: ROS production and induction of apoptosis and ferroptosis. *Cancer Cell Int.* 2020; 20: 18.

Поступила в редакцию 10.09.2020; принята 09.10.2020.

#### Авторский коллектив

**Хохлова Анна Вячеславовна** – младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной биологии НИТИ им. С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: avhohlova@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3976-8805>.

**Полуднякова Людмила Викторовна** – кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и патофизиологии, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: ya.mila-33@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1096-444X>.

**Федотова Антонина Юрьевна** – ассистент кафедры физиологии и патофизиологии, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: tonechkatuzeeva@mail.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1027-8885>.

**Столяров Дмитрий Александрович** – кандидат физико-математических наук, научный сотрудник лаборатории квантовой электроники и оптоэлектроники НИТИ им. С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: dmitreyst@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8635-2346>.

**Гильмутдинова Айгуль Камилловна** – студент 4 курса экологического факультета, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: gilmutdinovaajgul@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9937-8000>.

**Погодина Евгения Сергеевна** – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной биологии НИТИ им. С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: janeg1411@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8183-5103>.

**Саенко Юрий Владимирович** – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной биологии НИТИ им. С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: saenko@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4402-1482>.

**Антонеева Инна Ивановна** – доктор медицинских наук, профессор кафедры онкологии и лучевой диагностики, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: antoneevaii@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1525-2070>.

**Белобородов Евгений Алексеевич** – младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной биологии НИТИ им С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: beloborodov.evgeniy.a@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5666-5154>.

#### Образец цитирования

*Хохлова А.В., Полуднякова Л.В., Федотова А.Ю., Столяров Д.А., Гильмутдинова А.К., Погодина Е.С., Саенко Ю.В., Антонеева И.И., Белобородов Е.А.* Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения с длиной волны 1265 нм на уровень активных форм кислорода и систему ПОЛ – АОЗ в культурах клеток CHO-K1 и A875. Ульяновский медико-биологический журнал. 2020; 4: 122–132. DOI: 10.34014/2227-1848-2020-4-122-132.

## EFFECT OF LOW INTENSITY LASER THERAPY (WAVELENGTH 1265 NM) ON THE LEVEL OF ACTIVE OXYGEN AND LIPID PEROXIDATION-ANTIOXIDANT SYSTEM IN CHO-K1 AND A875 CELLS

**A.V. Khokhlova, L.V. Poludnyakova, A.Yu. Fedotova, D.A. Stolyarov, A.K. Gil'mutdinova, E.S. Pogodina, Yu.V. Saenko, I.I. Antoneeva, E.A. Beloborodov**

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia

*Near-infrared laser therapy has a significantly greater ability to penetrate living tissues compared to visible range optical radiation and often has the opposite effect on normal and malignant cells, thus being a promising tool for superficial neoplasm therapy. However, the mechanisms underlying the interaction between laser and biological structures can be of a different nature due to the chosen wavelength, power, and other radiation parameters.*

*The aim of the paper is to study the efficacy of laser radiation with a wavelength of 1265 nm (9.45–18.9 J/cm<sup>2</sup>) on the generation of reactive oxygen species (ROS), the enzyme level of the antioxidant defence (AOD) and lipid peroxidation (LPO) in normal and cancer cells of Chinese hamster ovary epithelial cell line CHO-K1 and human melanoma A875.*

*Materials and Methods.* The experiment was carried out on cell lines CHO-K1 and A875, which were submitted to laser irradiation (wavelength 1265 nm, power 4.2–100 mW) for 30–60 min. Fluorescent staining with DCFH-DA was used to study intracellular ROS concentration; ImageJ software was used for image processing. The level of LPO products and the activity of AOD enzymes were determined by biochemical methods. Statistical processing of the results was carried out using the Mann–Whitney U-test ( $p < 0.05$ ).

*Results.* The authors revealed an increase in ROS level, a decrease in superoxide dismutase and catalase activity, and a decrease in malondialdehyde level in CHO-K1 cells. An increase in catalase activity and malondialdehyde level was observed in A875 cells.

*Conclusion.* Laser therapy (wavelength 1265 nm) enhances ROS generation and suppresses LPO-AOD system in the noncancerous cell line CHO-K1. However, opposite irradiation effects are observed in melanoma A875 cells.

**Keywords:** cell culture, cancer, melanoma, low level laser therapy, infrared laser therapy, oxidative stress, mitochondria, reactive oxygen species, lipid peroxidation, antioxidant defence.

*This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant № 19-415-730003 p<sub>a</sub>).*

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Gladfelter P., Darwish N.E., Mousa S.A. Current status and future direction in the management of malignant melanoma. *Melanoma Res.* 2017; 27 (5): 403–410.
2. Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Shakhzadova A.O. *Sostoyanie onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossii v 2019 godu* [Cancer care in Russia in 2019]. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU «NMITs radiologii» Minzdrava Rossii; 2020. 239 (in Russian).

3. Gafton G.I., Anisimov V.V., Gel'fond M.L., Semiletova Yu.V., Baldueva I.A., Nekhaeva T.L., Novik A.V., Myasnyankin M.Yu. Kliniko-immunologicheskaya otsenka effektivnosti neoad'yuvantnoy fotodinamicheskoy terapii v khirurgicheskom lechenii pervichnoy melanomy kozhi [Clinical and immunological evaluation of neoadjuvant photodynamic therapy in the surgical treatment of primary skin melanoma]. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal*. 2015; 2: 31–38 (in Russian).
4. Peidaee P., Almansour N.M., Pirogova E. In vitro evaluation of low-intensity light radiation on murine melanoma (B16F10) cells. *Med. Biol. Eng. Comput.* 2016; 54 (2–3): 325–332.
5. Chen Z., Li W., Hu X., Liu M. Irradiance plays a significant role in photobiomodulation of B16F10 melanoma cells by increasing reactive oxygen species and inhibiting mitochondrial function. *Biomed. Opt. Express*. 2019; 11 (1): 27–39.
6. Ash C., Dubec M., Donne K., Bashford T. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods. *Lasers Med. Sci.* 2017; 32 (8): 1909–1918.
7. Costa Carvalho J.L., de Brito A.A., de Oliveira A.P., de Castro Faria Neto H.C., Pereira T.M., de Carvalho R.A., Anatriello E., Aimbire F. The chemokines secretion and the oxidative stress are targets of low-level laser therapy in allergic lung inflammation. *J. Biophotonics*. 2016; 9 (11–12): 1208–1221.
8. Firat E.T., Dağ A., Günay A., Kaya B., Karadede M.I., Kanay B.E., Ketani A., Evliyaoğlu O., Uysal E. The effects of low-level laser therapy on palatal mucoperiosteal wound healing and oxidative stress status in experimental diabetic rats. *Photomed. Laser Surg.* 2013; 31 (7): 315–321.
9. Sokolovski S.G., Zolotovskaya S.A., Goltsov A., Pourreyron C., South A.P., Rafailov E.U. Infrared laser pulse triggers increased singlet oxygen production in tumour cells. *Sci Rep.* 2013; 3: 3484.
10. Oliveira C.S., Turchiello R., Kowaltowski A.J., Indig G.L., Baptista M.S. Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency. *Free Radic. Biol. Med.* 2011; 51 (4): 824–833.
11. Khokhlova A., Zolotovskii I., Stoliarov D., Vorsina S., Liamina D., Pogodina E., Fotiadi A., Saenko Y., Sokolovski S., Rafailov E. The Photobiomodulation of Vital Parameters of the Cancer Cell Culture by Low Dose of Near-IR Laser Irradiation. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. 2019; 25 (1): 1–10.
12. McCloy R.A., Rogers S., Caldon C.E., Lorca T., Castro A., Burgess A. Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle*. 2014; 13 (9): 1400–1412.
13. Volchegorskiy V.A., Nalimov A.G., Yarovinskiy B.G. Sopostavlenie razlichnykh podkhodov k opredeleniyu produktov perekisnogo okisleniya lipidov v heptan-izopropanolovykh ekstraktakh krovi [Comparison of different approaches to lipid peroxidation product profile in heptane-isopropanol blood extracts]. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1989; 1: 127–131 (in Russian).
14. Andreeva L.I., Kozhemyakin L.A., Kishkun A.A. Modifikatsiya metoda opredeleniya perekisey lipidov v teste s tiobarbiturovoy kislotoy [Modification of the method for determining lipid peroxides in thiobarbituric acid test]. *Laboratornoe delo*. 1988; 11: 41–43 (in Russian).
15. Karpishchenko A.I. *Meditsinskie laboratornye tekhnologii: rukovodstvo po klinicheskoy laboratornoy diagnostike*. Vol. 2 [Medical laboratory technology: Guidelines to clinical laboratory diagnosis]. Moscow: GEOTAR-Media; 2013. 792 (in Russian).
16. Asatiani V.S. *Fermentnye metody analiza* [Enzymatic methods of analysis]. Moscow; 1969: 607–610 (in Russian).
17. Nishikimi M., Appa N., Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenacinemethosulfate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972; 46: 849–854.
18. Anquez F., Yazidi-Belkoura I., Randoux S., Suret P., Courtade E. Cancerous cell death from sensitizer free photoactivation of singlet oxygen. *Photochem Photobiol.* 2012; 88 (1): 167–174.
19. Saenko Y.V., Glushchenko E.S., Zolotovskii I.O., Sholokhov E., Kurkov A. Mitochondrial dependent oxidative stress in cell culture induced by laser radiation at 1265 nm. *Lasers Med. Sci.* 2016; 31 (3): 405–413.
20. Khokhlova A., Zolotovskii I., Stoliarov D., Vorsina S., Liamina D., Pogodina E., Fotiadi A., Saenko Y., Sokolovski S., Rafailov E. Effects of high and low level 1265 nm laser irradiation on HCT116 cancer cells. *Proc. SPIE*. 2019; 10861: 108610L. DOI: 10.1117/12.2509529.
21. Pastore D., Greco M., Passarella S. Specific helium-neon laser sensitivity of the purified cytochrome c oxidase. *Int. J. Radiat. Biol.* 2000; 76 (6): 863–870.

22. Eells J.T., Wong-Riley M.T., Ver Hoeve J., Henry M., Buchman E.V., Kane M.P., Gould L.J., Das R., Jett M., Hodgson B.D., Margolis D., Whelan H.T. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. *Mitochondrion*. 2004; 4 (5–6): 559–567.
23. Wong-Riley M.T., Liang H.L., Eells J.T., Chance B., Henry M.M., Buchmann E., Kane M., Whelan H.T. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. *J. Biol. Chem.* 2005; 280 (6): 4761–4771.
24. Gonzalez-Lima F., Auchter A. Protection against neurodegeneration with low-dose methylene blue and near-infrared light. *Front. Cell Neurosci.* 2015; 9: 179.
25. Khokhlova A., Zolotovskii I., Sokolovski S., Saenko Y., Rafailov E., Stoliarov D., Pogodina E., Svetukhin V., Sibirny V., Fotiadi A. The light-oxygen effect in biological cells enhanced by highly localized surface plasmon-polaritons. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 1269. DOI: 10.1038/s41598-020-58159-4.
26. Frigo L., Luppi J.S., Favero G.M., Durnavei A.M., Penna S.C., Bjordal J.M., Bensadoun R.J., Lopes-Martins R.A. The effect of low-level laser irradiation (In-Ga-Al-AsP – 660 nm) on melanoma in vitro and in vivo. *BMC Cancer.* 2009; 9: 404.
27. Andreeva N.V., Yegorov Y.E., Belyavsky A.V., Zotov K.V., Yusupov V.I., Bagratashvili V.N., Kalashnikova M.V. The effect of infrared laser irradiation on the growth of human melanoma cells in culture. *Biophysics.* 2016; 61 (6): 979–984.
28. Frantsiyants E.M., Soldatkina N.V., Orlovskaya L.A., Dashkov A.V. Nekotorye pokazateli svobodnoradikal'nykh protsessov i antiokislitel'noy sistemy tkani opukholi molochnoy zhelezy i ee perifokal'noy zony pri razlichnykh variantakh techeniya raka [Some indicators of free radical processes and antioxidant system of breast tumor tissue and its perifocal zone in different types of cancer]. *Opukholi zhenskoy reproduktivnoy sistemy.* 2008; 2: 38–44 (in Russian).
29. Khorsandi K., Kianmehr Z., Hosseinmardi Z., Hosseinzadeh R. Anti-cancer effect of gallic acid in presence of low level laser irradiation: ROS production and induction of apoptosis and ferroptosis. *Cancer Cell Int.* 2020; 20: 18.

Received 10 September 2020; accepted 09 October 2020.

### Information about the authors

**Khokhlova Anna Vyacheslavovna**, Junior Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Research and Engineering Institute named after S.P. Kapitsa, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: avhohlova@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3976-8805>.

**Poludnyakova Lyudmila Viktorovna**, Candidate of Sciences (Biology), Associate Professor, Chair of Physiology and Pathophysiology, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: ya.mila-33@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1096-444X>.

**Fedotova Antonina Yur'evna**, Teaching Assistant, Chair of Physiology and Pathophysiology, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: tonechkatuzeeva@mail.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1027-8885>.

**Stolyarov Dmitriy Aleksandrovich**, Candidate of Sciences (Physics and Mathematics), Researcher, Laboratory of Quantum Electronics and Optoelectronics, Research and Engineering Institute named after S.P. Kapitsa, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: dmitreyst@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8635-2346>.

**Gil'mutdinova Aygul' Kamilovna**, 4<sup>th</sup>-year Student, Ecological Department, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: gilmutdinovaajgul@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9937-8000>.

**Pogodina Evgeniya Sergeevna**, Candidate of Sciences (Biology), Junior Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Research and Engineering Institute named after S.P. Kapitsa, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: janeg1411@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8183-5103>.

**Saenko Yuriy Vladimirovich**, Doctor of Sciences (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Research and Engineering Institute named after S.P. Kapitsa, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: saenkoyv@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4402-1482>.

**Antoneeva Inna Ivanovna**, Doctor of Sciences (Medicine), Professor, Chair of Oncology and Radiation Diagnostics, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: antoneevaii@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1525-2070>.

**Beloborodov Evgeniy Alekseevich**, Junior Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Research and Engineering Institute named after S.P. Kapitsa, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: beloborodov.evgeniy.a@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5666-5154>.

#### For citation

Khokhlova A.V., Poludnyakova L.V., Fedotova A.Yu., Stolyarov D.A., Gil'mutdinova A.K., Pogodina E.S., Saenko Yu.V., Antoneeva I.I., Beloborodov E.A. Vliyaniye nizkointensivnogo lazernogo izlucheniya s dlinoy volny 1265 nm na uroven' aktivnykh form kisloroda i sistemu POL-AOZ v kul'turakh kletok CHO-K1 i A875 [Effect of low intensity laser therapy with (wavelength 1265 nm) on the level of active oxygen and lipid peroxidation-antioxidant system in CHO-K1 and A875 cells]. *Ulyanovskiy mediko-biologicheskiy zhurnal*. 2020; 4: 122–132. DOI: 10.34014/2227-1848-2020-4-122-132 (in Russian).