

УДК 616.5-006.81-085:615.849.19:577.17  
DOI 10.34014/2227-1848-2022-1-94-104

## КОМПЛЕКСНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И ПЕПТИДНОГО ИНГИБИТОРА КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ

Е.С. Погодина, Е.В. Расторгуева, Е.В. Юрова,  
Е.А. Белобородов, Д.Е. Сугак, Ю.В. Саенко

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

*Меланома отличается агрессивным течением и наличием большого количества метастазов уже во время установления диагноза. Для ее лечения применяют фотодинамическую терапию (ФДТ). Однако скопление фотосенсибилизаторов отмечается не только в злокачественной опухоли, но и в органах с высоким уровнем метаболической активности. Недостатки методов терапии меланомы возможно устранить, используя комплексное воздействие лазерного излучения и местного применения ингибиторов клеточных процессов.*

*Цель исследования. Изучить воздействие низкоинтенсивного лазерного излучения и биотоксина Карра-theraphotoxin-Gr1b (Карра-TRTX-Gr1b) на выживаемость опухолевых клеток меланомы A875.*

*Материалы и методы. Клетки меланомы A875 подвергали воздействию токсина Карра-TRTX-Gr1b и лазерному облучению. Изучался уровень апоптоза, некроза в клетках с использованием методов флуоресцентной микроскопии. Для оценки цитотоксического ответа клеток меланомы A875 использовали систему xCELLigence.*

*Результаты. Максимальное количество апоптотических и некротических клеток отмечено в группе, где использовали комбинацию токсина Карра-TRTX-Gr1b с последующим воздействием лазерного излучения с длиной волны 1265 нм на опухолевые клетки A875. Это обусловлено ингибированием калиевых каналов внутриклеточных мембран клеток пептидом Карра-TRTX-Gr1b, которые связаны с реализацией процесса апоптоза.*

*Выводы. Селективное ингибирование калиевых каналов при патологических процессах можно расценить как значимое дополнение к комплексной терапии поверхностных злокачественных новообразований. Совместное применение токсина и облучения позволит потенцировать действие друг друга и избежать основных недостатков, которые связаны с применением ФДТ. Такой подход сохранит все преимущества, которые обусловлены местным применением и точным воздействием на злокачественную опухоль.*

**Ключевые слова:** апоптоз, некроз, лазерное излучение, ингибитор калиевых каналов.

**Введение.** Меланома характеризуется агрессивным течением и наличием большого количества метастазов уже на момент установления диагноза. В большинстве случаев для лечения рака кожи различных локализаций и на любых стадиях используют фотодинамическую терапию (ФДТ). ФДТ вызывает накопление фотосенсибилизаторов в злокачественной опухоли. Однако их значимое количество также отмечается в коже, слизистых оболочках и органах с высоким уровнем метаболической активности [1]. В связи с этим появляется необходимость в разработке новых методов, которые позволят избежать систем-

ного действия фотосенсибилизаторов, ведущего к тяжелым побочным эффектам.

Недостатки методов терапии меланомы возможно устранить, используя комплексное воздействие лазерного излучения и местного применения ингибиторов клеточных процессов. Лазерное излучение оказывает влияние на процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях, индукции внутриклеточного окислительного стресса и увеличения синтеза АТФ. Установлено, что лазерное облучение с длиной волны 1260–1270 нм увеличивает концентрацию активных форм кислорода (АФК), которые играют ключевую роль в запуске

апоптоза опухолевых клеток [2, 3]. В свою очередь в процессе клеточной гибели существенную роль играют ионные ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ) каналы, регулирующие пролиферацию клеток. Наиболее значимыми для развития меланомы являются калиевые каналы, которые принимают активное участие в ангиогенезе и метастазировании опухоли [4]. Поэтому их ингибирование коррелирует с дефицитом питательных веществ и кислорода, поставляемых к опухолевым клеткам, что приводит к деградации последних. Кроме того, калиевые каналы контролируют гомеостатические параметры, к которым относится внутриклеточная концентрация ионов, рН в цитозоле клеток и их объем [5]. Для подавления течения физиологических и физико-химических процессов с участием калиевых каналов клеток меланомы появилась возможность использовать таргетные лекарственные препараты с последовательностью природных пептидов – токсинов членистоногих. В настоящее время именно они являются перспективным и многообещающим средством в терапии многих заболеваний, в число которых входят и онкологические [6].

Селективное ингибирование калиевых каналов при патологических процессах можно расценить как важное дополнение к комплексной терапии поверхностных злокачественных новообразований. Совместное использование токсина и облучения лазером позволит потенцировать их действие и избежать основных недостатков, сопряженных с применением ФДТ. Кроме того, такой подход сохраняет все преимущества, связанные с местным применением и точным воздействием на злокачественную опухоль.

**Цель исследования.** Изучить воздействие низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) и биотоксина *Carra-theraphotoxin-Gr1b* (*Carra-TRTX-Gr1b*) на выживаемость опухолевых клеток меланомы A875.

**Материалы и методы.** В экспериментах использовали клеточную линию меланомы человека A875 (RRID:CVCL\_4733). Культивирование клеток проходило в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе MCO-18AIC  $\text{CO}_2$  (Helicon, Япония), в котором поддерживалась температура 37 °С, концентрация  $\text{CO}_2$  5 % и влажность 98 %. Для клеток использовали среду RPMI-1640 с L-глутами-

ном («ПанЭко», Россия) с 10 % эмбриональной бычьей сывороткой (Biosera, Франция) и 5 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия). За сутки до проведения эксперимента клетки сеяли в 8-луночные слайд-флаконы (SPL Lifesciences, Южная Корея) в концентрации  $4 \cdot 10^4$  на ячейку. Облучение клеток меланомы производили в логарифмической фазе роста в камере настольного инкубатора UNO H501-T (Okolab, Италия). Клетки подвергали воздействию лазерного излучения (лазер Yenista optics osics) с длиной волны 1265 нм в течение 30 мин. Мощность дозы составляла 4,2 мВт при фокусном расстоянии 1,5 см. Высота водяного столба над клетками составляла 0,5 мм.

Наличие апоптоза и некроза определяли с использованием флуоресцентного красителя YO-PRO (Thermo Fisher Scientific, США). Результат окрашивания оценивали с помощью инвертированного микроскопа Nikon Ti-S (Nikon, Япония) и ПК с программой Nikon NIS-elements 4.0. Обработку полученных изображений осуществляли в компьютерной программе ImageJ (Национальный институт здоровья, США). Скорректированную интегральную флуоресценцию клетки (СИФК) вычисляли по формуле СИФК (СТFC) = интегральная плотность – (площадь выделенной клетки × фоновое значение флуоресценции) [7].

Математическое моделирование пептида осуществляли с использованием электронного ресурса PatchDock [8]. Аминокислотные последовательности биотоксина отбирали с помощью открытой базы данных UniProt [9]. Синтез пептида выполняли на автоматическом пептидном синтезаторе ResPer SL (Intavis, Германия) на основе твердофазного синтеза с использованием защитной Fmoc-группы на смоле TentaGel в соответствии со стандартным протоколом производителя. Очистку и анализ последовательностей производили методом ВЖЭХ на хроматографе NGC Quest™ 10 Chromatography System (Bio-Rad, США). Масс-спектрометрический анализ осуществляли на программно-аппаратном комплексе MALDI-TOF MS серии FLEX (Bruker, США).

Для оценки цитотоксического ответа клеток меланомы A875 использовали Е-планшеты системы xCELLigence. Биотоксин *Carra-theraphotoxin-Gr1b* и менадион, который

использовали в качестве положительного контроля [10], добавляли после 25 ч с момента пассажа клеток. Нормализованный клеточный индекс вычисляли по формуле  $NCI_{ti} = C_{ti}/C_{Inml\_time}$ , где  $C_{ti}$  – клеточный индекс в реальном времени,  $C_{Inml\_time}$  – клеточный индекс в момент нормализации времени. Нормализованный клеточный индекс во время точки нормализации равен единице [11].

**Результаты.** Чистота раствора синтезированного пептида Карра-TRTX-Gr1b показана на хроматограмме (рис. 1). Наличие в растворе нежелательных примесей указывает на

необходимость его очистки. Как правило, она проводится, если хроматографический анализ показал, что чистота пептида составила менее 95 %.

На рис. 1 показано, что чистота пептида Карра-TRTX-Gr1b равна 95,7 %. Очистка исследуемого пептида не проводилась. Кроме того, анализ пиков хроматограммы биотоксина Карра-TRTX-Gr1b (табл. 1), в котором учитывались данные их параметров (площадь, высота, процентное соотношение площадей), также говорит об отсутствии необходимости очистки.

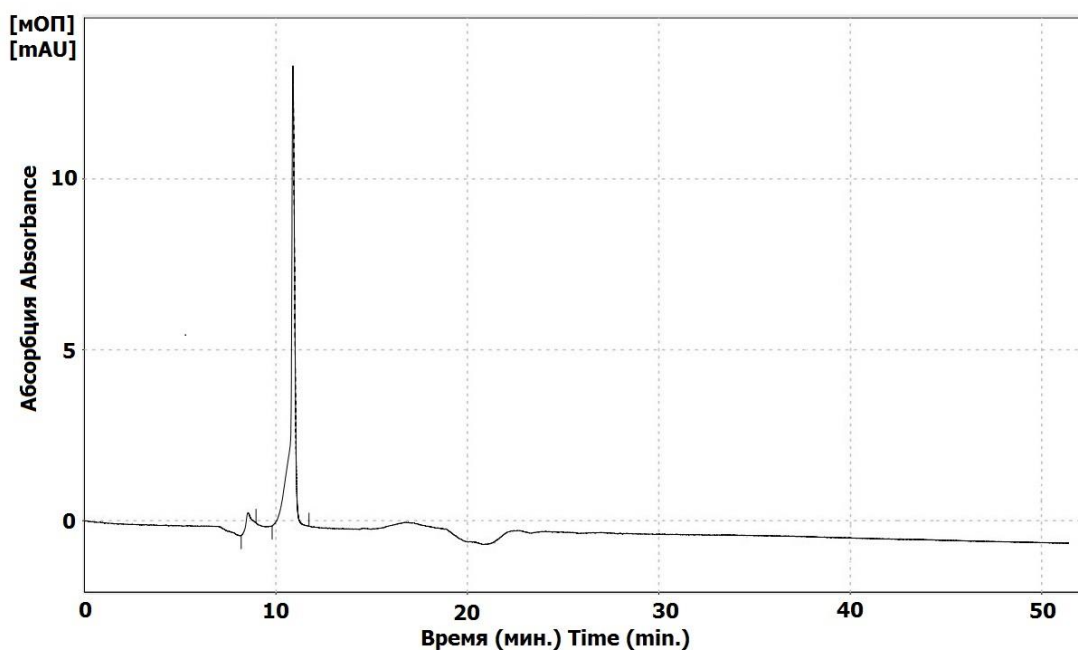


Рис. 1. Хроматограмма синтезированного токсина Карра-TRTX-Gr1b

Fig. 1. Synthesized toxin Kappa-TRTX-Gr1b chromatogram

Таблица 1  
Table 1

Параметры пиков токсина Карра-TRTX-Gr1b  
Kappa-TRTX-Gr1b toxin peak parameters

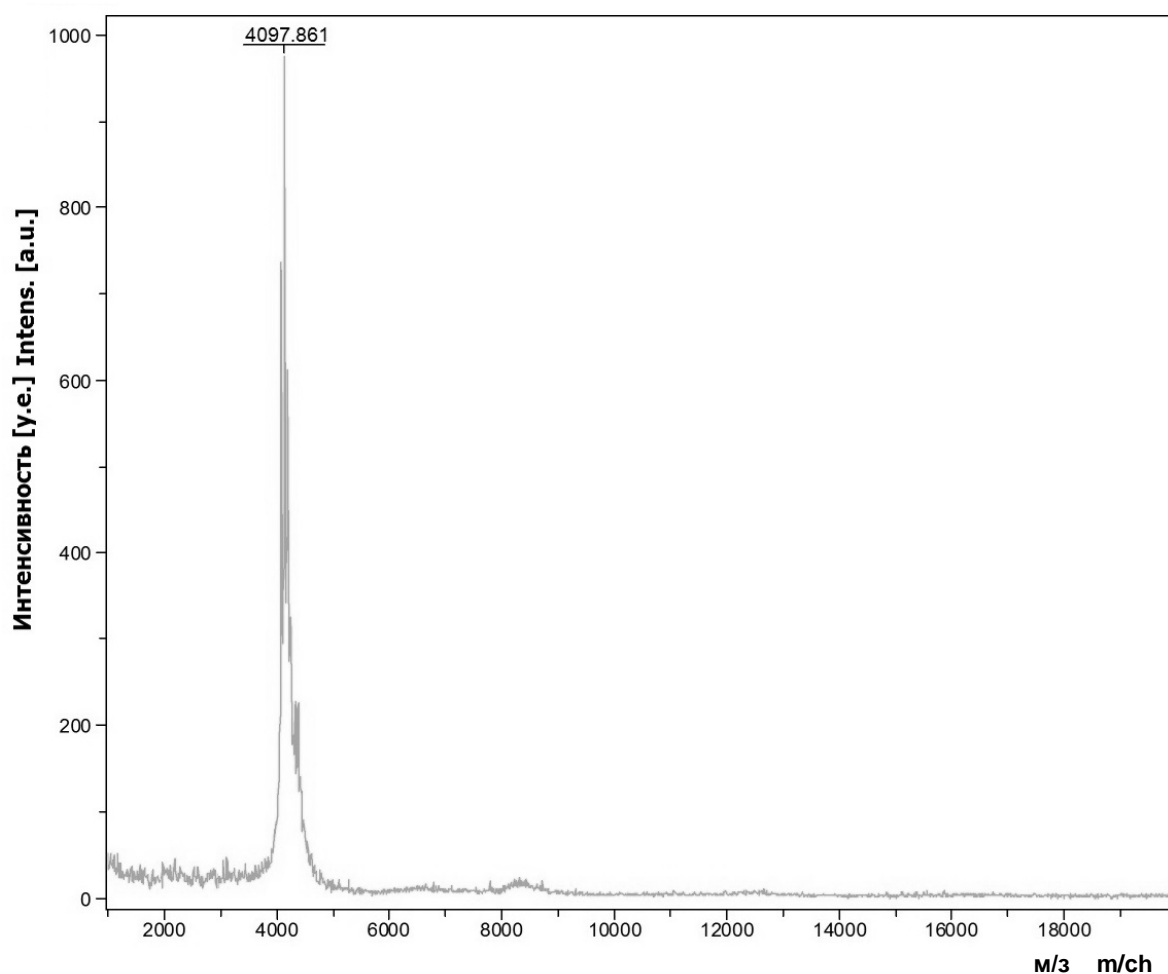
№	Время уд. (мин) Retention time (min.)	Момент начала (мин) Beginning (min.)	Момент завершения (мин) Ending (min.)	Площадь (мОП с) Area (mAU sec.)	Высота (мОП) Height (mAU sec.)	Площадь (%) Area (%)
11	8,538	8,183	8,957	8,643	0,490	4,3
22	10,887	9800	11,727	190,512	13,468	95,7
	Суммарное значение Total value			199,155	13,958	100

Масс-спектрограмма синтезированного токсина Карра-TRTX-Gr1b представлена на рис. 2. Показано, что молекулярная масса исходного пептида меньше теоретической массы на 6 ДА.

Такая разница в массе указывает на правильную конформацию пептида, которая заключается в образовании трех дисульфидных

мостиков. Таким образом, данные, полученные при анализе синтезированного токсина Карра-TRTX-Gr1b, подтверждают его высокий уровень стабильности и чистоты.

Цитотоксический ответ клеток А875 после воздействия на них биотоксина Карра-TRTX-Gr1b и менадиона представлен на рис. 3.



**Рис. 2.** Масс-спектрограмма биотоксина Карра-theraphotoxin-Gr1b  
( $m/z$  – отношение массы к заряду; интенсивность – интенсивность сигнала ионов)

**Fig. 2.** Mass spectrogram of Kappa-theraphotoxin-Gr1b biotoxin  
( $m/ch$  – mass-to-charge ratio; intensity – ion signal intensity)

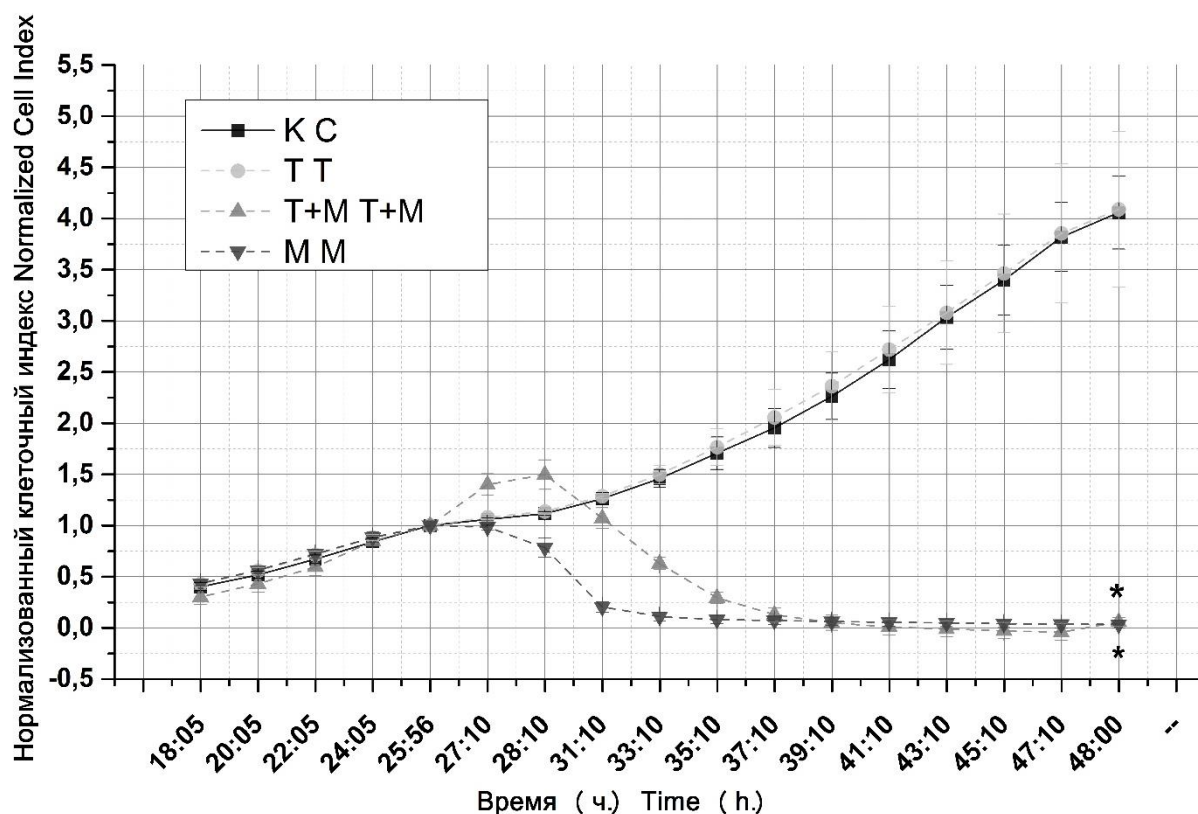


Рис. 3. Цитотоксический ответ клеток меланомы А875 на воздействие токсина Каппа-TRTX-Gr1b и менадиона

(К – контрольная группа; Т – токсин Каппа-TRTX-Gr1b; Т+М – комплекс токсина Каппа-TRTX-Gr1b и менадиона; М – менадион, \* – достоверное отличие между экспериментом и контролем ( $p < 0,05$ ))

Fig. 3. Cytotoxic response of A875 melanoma cells to Kappa-TRTX-Gr1b toxin and menadione (C – control group; T – Kappa-TRTX-Gr1b toxin; T+M – complex of Kappa-TRTX-Gr1b toxin and menadione; M – menadione, \* – the difference is significant between experiment and control groups ( $p < 0.05$ ))

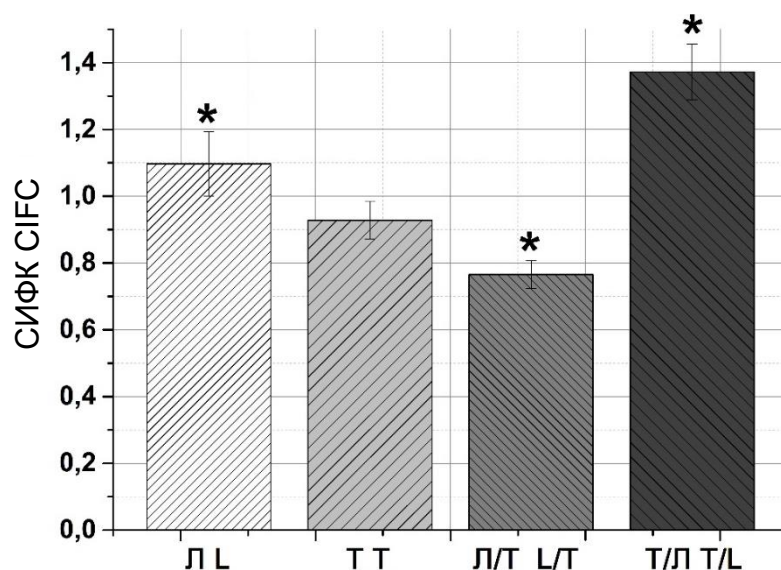
В ходе эксперимента отмечено, что комплексное воздействие токсина Каппа-TRTX-Gr1b и менадиона на клетки А875 провоцирует рост, а через 3 ч инкубации спад нормализованного клеточного индекса. Полученные данные говорят о том, что данный комплекс вызывает гибель клеток путем некроза, так как рост нормализованного клеточного индекса (НКИ) свидетельствует об увеличении объема клеток. Инкубация с одним менадином уменьшала объем клеток и вызывала снижение НКИ. Следовательно, клеточная гибель была реализована путем апоптоза. Значимых различий между клетками контрольной группы и клетками, к которым добавлен токсин Каппа-TRTX-Gr1b, не обнаружено. Таким образом, воздействие токсина Каппа-TRTX-Gr1b на опухолевые клетки, которое запускает процесс клеточной гибели, можно усилить, ис-

пользуя дополнительные стимулы. В качестве таких стимулов для опухолевых клеток меланомы целесообразнее применять лазерное излучение.

Оценка апоптоза в культуре клеток меланомы человека А875 после воздействия на них токсина Каппа-TRTX-Gr1b и лазерного излучения показана на рис. 4.

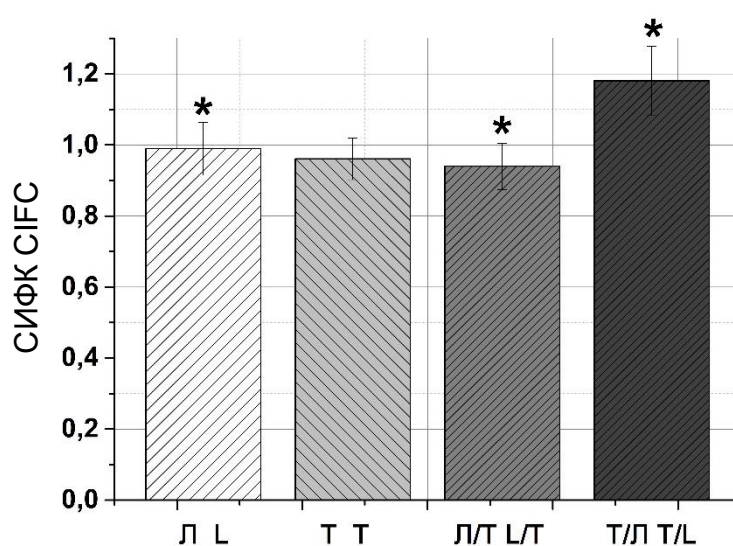
При применении лазерного излучения с длиной волны 1265 нм наибольшее количество клеток с признаками апоптоза отмечено в группах Т/Л, Л и Т (рис. 4). В группе, в которой клетки сначала облучены лазером, а затем проинкубированы с токсином Каппа-TRTX-Gr1b, отмечен низкий уровень апоптоза.

Оценка некроза в культуре клеток меланомы человека А875 после воздействия на них токсина Каппа-TRTX-Gr1b и лазерного излучения показана на рис. 5.



**Рис. 4.** Оценка апоптоза в культуре клеток меланомы человека А875 после воздействия токсина Карра-TRTX-Gr1b и лазерного излучения с длиной волны 1265 нм (Л (лазер) – клетки, которые облучены лазером, Т (токсин) – клетки, которые подвергались воздействию токсина Карра-TRTX-Gr1b, Л/Т (лазер/токсин) – клетки, которые облучены лазером, а затем инкубировались с токсином Карра-TRTX-Gr1b, Т/Л (токсин/лазер) – клетки, которые подвергались воздействию токсина Карра-TRTX-Gr1b, а затем облучению лазером; СИФК – отношение значения скорректированной интегральной флуоресценции эксперимента к контролю, \* – достоверное отличие между экспериментом и контролем ( $p < 0,05$ ). На рис. 5 обозначения те же)

**Fig. 4.** Evaluation of apoptosis in A875 human melanoma cell culture after exposure to Kappa-TRTX-Gr1b toxin and 1265 nm laser radiation (L (laser) – laser-irradiated cells, T (toxin) – Kappa-TRTX-Gr1b toxin-exposed cells, L/T (laser / toxin) – cells initially irradiated with laser and then incubated with Kappa-toxin TRTX-Gr1b, T/L (toxin/laser) – cells exposed to Kappa-TRTX-Gr1b toxin and then laser irradiation; CИFC – ratio of corrected integral fluorescence (in the experiment) to the control, \* – the difference is significant between experiment and the control groups ( $p < 0.05$ ). In Fig. 5 designations are the same)



**Рис. 5.** Оценка некроза в культуре клеток меланомы человека А875 после воздействия токсина Карра-TRTX-Gr1b и лазерного излучения с длиной волны 1265 нм

**Fig. 5.** Evaluation of necrosis in A875 human melanoma cell culture after Kappa-TRTX-Gr1b toxin exposure and laser radiation (wavelength 1265 nm)

Максимальное количество клеток с признаками некроза выявлено в группе, в которой клетки подвергались воздействию токсина Карра-TRTX-Gr1b, а затем лазерного излучения (рис. 5). Незначительная разница в количестве некротических клеток имела место в группах, где клетки подвергались только облучению или действию токсина Карра-TRTX-Gr1b. Самый низкий уровень некроза отмечен в группе, в которой клетки после облучения инкубировали с токсином Карра-TRTX-Gr1b. Таким образом, проведенные эксперименты показали, что на жизнеспособность клеток меланомы A875 значительный эффект оказывает комбинация пептида Карра-TRTX-Gr1b с последующим воздействием лазерного излучения.

**Обсуждение.** Увеличение числа апоптотических и некротических клеток отмечено во всех экспериментальных группах. Однако их максимальное количество было зафиксировано в группе, где использовали комбинацию токсина Карра-TRTX-Gr1b с последующим облучением лазером опухолевых клеток A875. Данные, полученные в работе L. Leanza et al., показали, что ингибирование калиевых каналов митохондрий с использованием фармакологических препаратов индуцирует апоптоз в опухолевых клетках, что способствует сокращению объема опухоли меланомы на 90 % [12]. Калиевые каналы называют новой онкологической мишенью, так как их ингибирование вызывает апоптоз [13]. Это связано с гиперполяризацией мембранного потенциала митохондрий, высвобождением цитохрома С и продукцией активных форм кислорода, что приводит к гибели опухолевых клеток [14]. Эти данные подтверждают наше предположение о том, что высокий процент апоптотических и некротических клеток в группе, которая подвергалась комплексному воздействию, обусловлен ингибированием калиевых каналов внутриклеточных мембран клеток пептидом Карра-TRTX-Gr1b.

Поскольку цитохром-с-оксидаза является основным клеточным хромофором, который располагается во внутренней мембране митохондрий, то последующее облучение лазером также вызывает каскад реакций, влияющих на функционирование клеток. Возбуждение цитохром-с-оксидазы лазерным излучением способствует росту электрохимического протонного градиента, который приводит к усиленному синтезу АТФ [15]. Образование комплекса цитохрома С с оксидом азота подавляет клеточное дыхание за счет вытеснения кислорода в состоянии стресса. Maegawa et al. показали, что облучение лазером меняет кластерную структуру воды, которая является одним из фотоакцепторов клетки [16]. Это приводит к изменениям гидрофобных взаимодействий белков и процессов, в которых они участвуют. Chung et al. продемонстрировали, что молекулярный кислород, который также является фотоакцептором клетки, под воздействием облучения переходит в синглетный кислород  $^1\text{O}_2$  и вносит значительный вклад в биоэффекты [17]. Следственно, воздействие лазерного излучения с длиной волны 1265 нм приводит к изменению мембранного потенциала митохондрий, окислению белков и ДНК, что в конечном итоге провоцирует гибель опухолевых клеток [18, 19].

**Заключение.** Таким образом, корректно подобранный диапазон волн [20] и аминокислотные последовательности токсина Карра-TRTX-Gr1b оказывали негативное влияние на жизнеспособность опухолевых клеток меланомы. В рамках работы показано, что использование указанной комбинации оказывало более значимое воздействие, чем раздельное применение этих факторов. Полученные данные могут стать основой для создания нового подхода в терапии, который сохранит все преимущества, связанные с местным применением и точным воздействием на злокачественную опухоль.

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

### Литература

1. Park J., Lee Y.-K., Park I.-K., Hwang S.R. Current Limitations and Recent Progress in Nanomedicine for Clinically Available Photodynamic Therapy. *Biomedicines*. 2021; 9 (1): 85.



2. Хохлова А.В., Золотовский И.О., Погодина Е.С., Саенко Ю.В., Столяров Д.А., Ворсина С.Н., Соколовский С.Г., Фотиади А.А., Лямина Д.А., Рафаилов Э.У. Воздействие лазерного излучения с длиной волны 1265 нм на культуру клеток аденокарциномы человека. *Наноиндустрия*. 2019; 12 (2): 86–95.
3. Khokhlova A., Zolotovskii I., Sokolovski S. The light-oxygen effect in biological cells enhanced by highly localized surface plasmon-polaritons. *Sci. Rep.* 2019; 9: 18435.
4. Böhme I., Schönherr R., Eberle J., Bosserhoff A.K. Membrane Transporters and Channels in Melanoma. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2021; 181: 269–374.
5. Capatina A.L., Lagos D., Brackenbury W.J. Targeting Ion Channels for Cancer Treatment: Current Progress and Future Challenges. In: *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2020: 1–43.
6. Yavari B., Mahjub R., Saidijam M., Raigani M., Soleimani M. The Potential Use of Peptides in Cancer Treatment. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2018; 19 (8): 759–770.
7. McCloy R.A., Rogers S., Caldron 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.
8. PatchDock Server: Molecular Docking Algorithm Based on Shape Complementarity Principles. URL: <https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/> (дата обращения: 04.02.2022). DOI: 10.1093/nar/gki481.
9. UniProt: Открытая база данных последовательностей белков. URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P56853> (дата обращения: 04.02.2022).
10. Hegazy M.F., Fukaya M., Dawood M. Vitamin K3 thio-derivative: a novel specific apoptotic inducer in the doxorubicin-sensitive and -resistant cancer cells. *Invest. New Drugs*. 2020; 38 (3): 650–661.
11. RTCA Software Manual – Software Version 2.1.0, ACEA Biosciences. USA; 2017.
12. Leanza L., Henry B., Sassi N. Inhibitors of mitochondrial Kv1.3 channels induce Bax/Bak-independent death of cancer cells. *EMBO Mol. Med.* 2012; 4 (7): 577–593.
13. Checchetto V., Prosdocimi E., Leanza L. Mitochondrial Kv1.3: A New Target in Cancer Biology? *Cell Physiol. Biochem.* 2019; 53 (S1): 52–62.
14. Bortner C.D., Cidlowski J.A. Ion channels and apoptosis in cancer. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2014; 369: 1638.
15. Hamblin M.R. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. *Photochem. Photobiol.* 2018; 94 (2): 199–212.
16. Maegawa Y., Itoh T., Hosokawa T., Yaegashi K., Nishi M. Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation. *Lasers Surg. Med.* 2000; 27 (5): 427–437.
17. Chung H., Dai T., Sharma S.K., Huang Y.Y., Carroll J.D., Hamblin M.R. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann. Biomed. Eng.* 2012; 40 (2): 516–533.
18. Eells J.T., Wong-Riley M.T., VerHoeve J. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. *Mitochondrion*. 2004; 4 (5–6): 559–567.
19. 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.
20. Tam S.Y., Tam V.C.W., Ramkumar S., Khaw M.L., Law H.K.W., Lee S.W.Y. Review on the Cellular Mechanisms of Low-Level Laser Therapy Use in Oncology. *Front. Oncol.* 2020; 10: 1255.

Поступила в редакцию 10.01.2022; принята 28.02.2022.

#### Авторский коллектив

**Погодина Евгения Сергеевна** – кандидат биологических наук, научный сотрудник 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>.

**Расторгуева Евгения Владимировна** – старший преподаватель кафедры общей и клинической фармакологии с курсом микробиологии, младший научный сотрудник НИТИ им. С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: rastorgueva.e.v@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1518-4677>.

**Юрова Елена Валерьевна** – аспирант, младший научный сотрудник НИТИ им. С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: urovaev523@gmail.com, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-7484-2671>.



**Белобородов Евгений Алексеевич** – аспирант, младший научный сотрудник 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>.

**Сугак Дмитрий Евгеньевич** – инженер-исследователь НИТИ им. С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: dmitriysugak@mail.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3276-8976>.

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

### Образец цитирования

Погодина Е.С., Расторгуева Е.В., Юрова Е.В., Белобородов Е.А., Сугак Д.Е., Саенко Ю.В. Комплексное воздействие низкоинтенсивного лазерного излучения и пептидного ингибитора калиевых каналов на выживаемость клеток меланомы. Ульяновский медико-биологический журнал. 2022; 1: 94–104. DOI: 10.34014/2227-1848-2022-1-94-104.

## COMPLEX EFFECT OF LOW-INTENSITY LASER RADIATION AND POTASSIUM CHANNEL PEPTIDE INHIBITOR ON MELANOMA CELL SURVIVAL

E.S. Pogodina, E.V. Rastorgueva, E.V. Yurova, E.A. Beloborodov,  
D.E. Sugak, Yu.V. Saenko

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia

*Melanoma is characterized by an aggressive development and a large number of metastases during diagnostics. Photodynamic therapy (PDT) is used to treat this type of cancer. However, the accumulation of photosensitizers is observed not only in malignant tumors, but also in high metabolic rate organs. Shortcomings of melanoma therapy can be eliminated using the complex effect of laser radiation and local administration of inhibitors of cellular processes.*

*The goal. To study the complex effect of low-intensity laser radiation and potassium channel peptide inhibitor on melanoma cell survival.*

*Materials and Methods. A875 melanoma cells were exposed to Kappa-theraphotoxin-Gr1b toxin and laser irradiation. The authors examined the level of apoptosis and necrosis in cells using fluorescence microscopy techniques. The xCELLigence system was used to assess the cytotoxic response of A875 melanoma cells.*

*Results. The maximum number of apoptotic and necrotic cells was observed in the group of patients with A875 tumor cells exposed to a combination of Kappa-TRTX-Gr1b toxin and laser radiation (wavelength=1265 nm). This is due to the inhibition of potassium channels of intracellular cell membranes by Kappa-TRTX-Gr1b peptide, which are associated with the apoptosis.*

*Conclusion. Selective potassium channel inhibition under pathological processes can be regarded as a significant supplement to the superficial malignant neoplasm complex therapy. The combination of toxin and irradiation will make it possible to potentiate their action and avoid the main PDT disadvantages. This approach unites the benefits of the local administration and precise exposure on the malignant tumor.*

*Key words: apoptosis, necrosis, laser radiation, potassium channel inhibitor.*

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

### References

1. Park J., Lee Y.-K., Park I.-K., Hwang S.R. Current Limitations and Recent Progress in Nanomedicine for Clinically Available Photodynamic Therapy. *Biomedicines*. 2021; 9 (1): 85.
2. Khokhlova A.V., Zolotovskiy I.O., Pogodina E.S., Saenko Yu.V., Stolyarov D.A., Vorsina S.N., Sokolovskiy S.G., Fotiadi A.A., Lyamina D.A., Rafailov E.U. Vozdeystvie lazernogo izlucheniya s dlinoy volny 1265 nm na kul'turu kletok adenokartsinomy cheloveka [The influence of 1265 nm laser radiation on human adenocarcinoma cells]. *Nanoindustriya*. 2019; 12 (2): 86–95 (in Russian).

3. Khokhlova A., Zolotovskii I., Sokolovski S. The light-oxygen effect in biological cells enhanced by highly localized surface plasmon-polaritons. *Sci. Rep.* 2019; 9: 18435.
4. Böhme I., Schönherr R., Eberle J., Bosserhoff A.K. Membrane Transporters and Channels in Melanoma. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2021; 181: 269–374.
5. Capatina A.L., Lagos D., Brackenbury W.J. Targeting Ion Channels for Cancer Treatment: Current Progress and Future Challenges. In: *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2020: 1–43.
6. Yavari B., Mahjub R., Saidijam M., Raigani M., Soleimani M. The Potential Use of Peptides in Cancer Treatment. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2018; 19 (8): 759–770.
7. 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.
8. PatchDock Server: *Molecular Docking Algorithm Based on Shape Complementarity Principles*. Available at: <https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/> (accessed: February 04, 2022). DOI: 10.1093/nar/gki481.
9. UniProt: *Open protein sequence database*. Available at: <https://www.uniprot.org/uniprot/P56853> (accessed: February 04, 2022).
10. Hegazy M.F., Fukaya M., Dawood M. Vitamin K3 thio-derivative: a novel specific apoptotic inducer in the doxorubicin-sensitive and -resistant cancer cells. *Invest. New Drugs*. 2020; 38 (3): 650–661.
11. *RTCA Software Manual – Software Version 2.1.0, ACEA Biosciences*. USA; 2017.
12. Leanza L., Henry B., Sassi N. Inhibitors of mitochondrial Kv1.3 channels induce Bax/Bak-independent death of cancer cells. *EMBO Mol. Med.* 2012; 4 (7): 577–593.
13. Checchetto V., Prosdocimi E., Leanza L. Mitochondrial Kv1.3: A New Target in Cancer Biology? *Cell Physiol. Biochem.* 2019; 53 (S1): 52–62.
14. Bortner C.D., Cidlowski J.A. Ion channels and apoptosis in cancer. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2014; 369: 1638.
15. Hamblin M.R. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. *Photochem. Photobiol.* 2018; 94 (2): 199–212.
16. Maegawa Y., Itoh T., Hosokawa T., Yaegashi K., Nishi M. Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation. *Lasers Surg. Med.* 2000; 27 (5): 427–437.
17. Chung H., Dai T., Sharma S.K., Huang Y.Y., Carroll J.D., Hamblin M.R. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann. Biomed. Eng.* 2012; 40 (2): 516–533.
18. Eells J.T., Wong-Riley M.T., VerHoeve J. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. *Mitochondrion*. 2004; 4 (5–6): 559–567.
19. 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.
20. Tam S.Y., Tam V.C.W., Ramkumar S., Khaw M.L., Law H.K.W., Lee S.W.Y. Review on the Cellular Mechanisms of Low-Level Laser Therapy Use in Oncology. *Front. Oncol.* 2020; 10: 1255.

Received 10 January 2022; accepted 28 February 2022.

#### Information about the authors

**Pogodina Evgeniya Sergeevna**, Candidate of Sciences (Biology), Researcher, Research Technological 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>.

**Rastorgueva Evgeniya Vladimirovna**, Senior Lecturer, Chair of General and Clinical Pharmacology with a Course in Microbiology, Junior Researcher Research Technological Institute named after S.P. Kapitsa, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: rastorgueva.e.v@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1518-4677>.

**Yurova Elena Valer'evna**, Post-graduate Student, Junior Researcher, Research Technological Institute named after S.P. Kapitsa, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: urovaev523@gmail.com, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-7484-2671>.

**Beloborodov Evgeniy Alekseevich**, Post-graduate Student, Junior Researcher, Research Technological 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>.

**Sugak Dmitriy Evgen'evich**, Research Engineer, Research Technological Institute named after S.P. Kapitsa, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: dmitriysugak@mail.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3276-8976>.

**Saenko Yuriy Vladimirovich**, Doctor of Sciences (Biology), Professor, Leading Researcher, Research Technological 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>.

#### For citation

Pogodina E.S., Rastorgueva E.V., Yurova E.V., Beloborodov E.A., Sugak D.E., Saenko Yu.V. Kompleksnoe vozdeystvie nizkointensivnogo lazernogo izlucheniya i peptidnogo inhibitora kalievyykh kanalov na vyzhivayemost' kletok melanomy [Complex effect of low-intensity laser radiation and potassium channel peptide inhibitor on melanoma cell survival]. *Ulyanovskiy mediko-biologicheskij zhurnal*. 2022; 1: 94–104. DOI: 10.34014/2227-1848-2022-1-94-104 (in Russian).