ВОЗДЕЙСТВИЕ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ С ДЛИНОЙ ВОЛНЫ 1265 НМ НА КУЛЬТУРУ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА

THE INFLUENCE OF 1265 NM LASER RADIATION ON HUMAN ADENOCARCINOMA CELLS

А.В.Хохлова¹, (ORCID: 0000-0002-3976-8805), И.О.Золотовский¹, к.ф.-м.н., (ORCID: 0000-0002-1793-5211),
Е.С.Погодина¹, к.б.н., (ORCID: 0000-0001-8183-5103), Ю.В.Саенко¹, д.б.н., проф., (ORCID: 0000-0002-4402-1482),
Д.А.Столяров¹, (ORCID: 0000-0001-8635-2346), С.Н.Ворсина¹, (ORCID: 0000-0002-4154-0690), С.Г.Соколовский²,
к.б.н., (ORCID: 0000-0001-7445-720), А.А.Фотиади^{1,3,4}, к.ф.-м.н., (ORCID: 0000-0002-8086-8218), Д.А.Лямина¹,
(ORCID: 0000-0003-4952-2507), Э.У.Рафаилов^{2,5}, к.ф.-м.н., проф., (ORCID: 0000-0001-7445-720) / avhohlova@gmail.com
A.V.Khokhlova¹, (ORCID: 0000-0002-3976-8805), I.O.Zolotovskii¹, Cand. of Sc. (Physics and Mathematics),
(ORCID: 0000-0002-1793-5211), E.S.Pogodina¹, Cand. of Sc. (Biology), (ORCID: 0000-0001-8183-5103), Y.V.Saenko¹, Doct.
of Sc. (Biology), Prof., (ORCID: 0000-0002-4402-1482), D.A.Stoliarov¹ (ORCID: 0000-0001-8635-2346), S.N.Vorsina¹
(ORCID: 0000-0002-4154-0690), A.A.Fotiadi^{1,2,4}, Cand. of Sc. (Physics and Mathematics), (ORCID: 0000-0002-8086-8218),
D.A.Liamina¹ (ORCID: 0000-0003-4952-2507), S.G.Sokolovskii², Cand. of Sc. (Biology), (ORCID: 0000-0001-7445-720),
E.U.Rafailov^{3,5}, Cand. of Sc. (Physics and Mathematics), Prof., (ORCID: 0000-0001-7445-720).

DOI: 10.22184/1993-8578.2019.12.2.86.95

Получено: 22.02.2019.

Механизмы, ответственные за фотобиомодуляционный окислительный стресс, индуцированный лазером 1265 нм, в данный момент неясны, однако наиболее вероятными акцепторами лазерного излучения на этой длине волны считаются митохондрии. Мы изучили окислительный стресс, митохондриальный потенциал, уровень восстановленного глутатиона и жизнеспособность клеток аденокарциномы человека. Облучение узкополосным (высококогерентным) и широкополосным лазерами с дозами 9,45 и 66,6–400 Дж/см² соответственно вызывало клеточную гибель, повышение уровня активных форм кислорода и нарушение работы митохондрий. Таким образом, лазеры с длиной волны 1265 нм воздействуют на клетки НСТП6 через повреждение митохондрий, а увеличение дозы способствует повреждению клеток без эффекта нагревания.

To date, the mechanism responsible for photobiomodulation oxidative stress induced by 1265 nm laser light is unclear, but mitochondria are considered the most probable acceptors of laser radiation at this wavelength. We studied oxidative stress, mitochondrial potential, the level of reduced glutathione, and the viability of human adenocarcinoma cells. Narrow-band (high-coherent) and broad-band laser irradiation at the doses of 9.45 and 66.6–400 J/cm², respectively, caused cell death, an increase of reactive oxygen species intracellular concentration and a disturbance of the mitochondrial functions. Thus, lasers at the wavelength of 1265 nm affect НСТП6 cells through mitochondrial damage, and the dose increase contributes to cell damage without the heating effect.

¹ Научно-исследовательский технологический институт им. С.П. Капицы, Ульяновский государственный университет / S.P. Kapitsa Technological Research Institute, Ulyanovsk State University.

² Группа оптоэлектроники и биомедицинской фотоники, Школа инженерии и прикладной науки, Университет Астона, Бирмингем, Великобритания / Optoelectronics and Biomedical Photonics Group, School of Engineering and Applied Science, Aston University, Birmingham, U.K.

³ Астонский институт фотонных технологий, Университет Астона, Бирмингем, Великобритания / Aston Institute of Photonic Technologies, Aston University, Birmingham, U.K.

⁴ Кафедра электромагнетизма и телекоммуникаций, Университет Монса, Монс, Бельгия / Electromagnetism and Telecommunication Department, University of Mons, Mons, Belgium.

⁵ Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, Саратовский государственный университет / Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, Saratov State University.

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия область биомедицинского применения лазеров значительно увеличилась и сместилась от хирургических инструментов [1] и физиотерапевтических методик [2, 3] в сторону лечения опухолевых заболеваний [4, 5] и манипуляций в клеточной и молекулярной медицине [6], требующих более глубокого понимания механизмов взаимодействия излучения с биологическими структурами и процессами. На сегодняшний день лазерная терапия широко используется в стоматологии [7, 8], фотодинамической терапии [9, 10], лечении кожных заболеваний и косметических недостатков [11, 12] с использованием фотосенсибилизаторов и без него. Известно, что различные диапазоны длин волн могут вызывать диаметрально противоположные клеточные эффекты – от повреждения [13, 14] до регенерации [15, 16], что имеет большие перспективы как для лечения, так и для реабилитации после него.

Одной из самых востребованных областей использования лазеров является фотобиомодуляционная терапия (ФБМТ), широко применяемая в современной медицине. Основной механизм действия фотобиомодуляции связан с воздействием низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) на внутриклеточные процессы путем активации внутриклеточных сигнальных путей через взаимодействие на эндогенные фотосенсибилизаторы [21, 22, 23, 24], которые могут быть представлены эндогенными порфиринами с линиями поглощения 400–900 нм и 1000–1550 нм [25–27]. Стоит отметить, что большинство внутриклеточных эндогенных фотосенсибилизаторов

локализованы в митохондриях, которые благодаря этому становятся основными акцепторами лазерного излучения [28, 29]. Кроме того, одним из диапазонов НИЛИ, индуцирующих внутриклеточный окислительный стресс, является диапазон длин волн 1264–1270 нм, являющийся линией поглощения молекулярного кислорода [17, 18, 19, 20, 30, 31, 32].

Можно предположить, что при наличии в клетке эндогенного фотосенсибилизатора, чувствительного к лазерному излучению 1264–1270 нм, местом его локализации будут митохондрии из-за их строения и функциональных особенностей. Также интересным представляется вопрос, насколько линейной будет зависимость внутриклеточных эффектов от поглощенной дозы лазерного излучения. В работе мы изучаем влияние лазерного излучения с длиной волны 1265 нм и плотностью энергии 9,45–400 Дж/см² на динамику окислительного стресса и митохондриального потенциала, а также на уровень восстановленного глутатиона и выживаемость.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Параметры лазерного излучения. В качестве источника низкоинтенсивного лазерного излучения мы использовали полупроводниковый узкополосный (высококогерентный) лазер с шириной линии излучения ~ 0,001 нм (Yenista Optics, OSICS T100 Tunable Laser Module T100 1310) [14].

Для изучения воздействия более высоких доз лазерного облучения применяли волоконный лазер с шириной линии ~ 2 нм, позволяющий использовать максимальную плотность энергии 400 Дж/см² без

INTRODUCTION

Within the last decades the sphere of biomedical application of lasers increased significantly and shifted from the surgical instruments [1] and physiotherapeutical practices [2, 3] into the direction of tumorous lesions treatment [4, 5], and manipulations in cellular and molecular medicine [6], which require deeper understanding of the mechanisms of irradiation interaction with biological structures and processes. Nowadays laser therapy is widely used in dentistry [7, 8], photodynamic therapy [9, 10], skindisease and cosmetic defects treatment

[11, 12] with the use of photosensitizers and without their use. It is known that the various range of wavelength can cause diametrically opposite cellular effects from damage [13, 14] up to regeneration [15, 16], which have great perspectives both for treatment and rehabilitation after it.

One of the most demanded spheres of laser use is photobiomodulation therapy (PBMT), that is widely used in modern medicine. The main mechanism of action of photobiomodulation is connected with the influence of low-level laser therapy (LLLT) on the intracellular

processes via activation of intracellular signaling pathways through mutual action on the endogenous photosensitizers [21, 22, 23, 24], which can be represented by endogenous porphyrins with lines of absorption 400–900 nm and 1000–1550 nm [25–27]. It should be noted that most intracellular endogenous photosensitizers are located in mitochondria, that become the main acceptors of the laser irradiation due to this fact [28, 29]. Beside that, one of the ranges of LLLT inducing intracellular oxidative stress is the range of waves of 1264–1270 nm, which is the line of absorption of

дополнительного эффекта нагревания объекта облучения [17].

Расчет дозы облучения. Поверхностная доза (плотность энергии), поглощенная биологической тканью (E , Дж/см²), рассчитывалась по формуле:

$$E = Pt/S, \quad (1)$$

где P – средняя мощность лазерного источника (Вт), t – время экспозиции (с), S – площадь облучения (см²) [17].

Культура клеток и реактивы. Эксперименты выполнены на культуре клеток рака толстого кишечника (аденокарциномы) человека HCT116 (ACST CCL-247TM), полученной из Американской коллекции типов клеточных культур (Манассас, Вайоминг, США). Клетки содержали в стандартных условиях, рекомендованных производителем.

Культуральную среду DMEM/F12 и эмбриональную сыворотку поставляли соответственно ООО "Панэко" (Россия) и PAA Laboratories (Австралия); прочие реактивы были получены от Sigma-Aldrich (США).

Облучение клеток. Клетки облучали в слайд-флаконах (SPL LifeSciences, Корея) при начальной плотности пассажа 10⁵/мл в середине экспоненциальной фазы в настольной камере микроскопа (UNO, OcoLab). Поглощенную дозу рассчитывали относительно характеристик источника и времени облучения (5–30 мин).

Каждый эксперимент повторялся не менее трех раз. В качестве контроля использовали ячейки слайд-флакона, во время облучения закрытые металлической фольгой.

Флуоресцентная микроскопия. Клеточную выживаемость определяли через сутки после облучения при дозах 9,45–400 Дж/см². Клетки окрашивали раствором йодистого пропидия, как было описано ранее [33].

Через 30 мин и 3 ч после облучения определяли внутриклеточную концентрацию активных форм кислорода (АФК), митохондриальный потенциал и уровень восстановленного глутатиона, как описано в [17].

Скорректированную интегральную флуоресценцию клетки (СИФК) рассчитывали после обработки данных, полученных с помощью программы Image J [34]. Значения представляли как отношение СИФК в экспериментальных и опытных группах, а статистический анализ проводили с помощью t -теста Стьюдента для парных переменных ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

А. Влияние лазерного излучения с длиной волны 1265 нм на жизнеспособность раковых клеток

Мы сравнили влияние лазера 1265 нм на жизнеспособность клеток HCT116 через 24 ч после облучения (дозы 9,45; 66,6; 200 и 400 Дж/см²). Доля погибших клеток возрастает при увеличении плотности энергии лазерного излучения (рис.1).

Б. Окислительный стресс после воздействия лазерного излучения с длиной волны 1265 нм

Для оценки динамики воздействия лазерного излучения на длине волны 1265 нм на возникновение окислительного стресса определяли

the molecular oxygen [17, 18, 19, 20, 30, 31, 32].

It may be supposed that at the presence in the cell of an endogenous photosensitizer sensitive to the laser irradiation of 1264–1270 nm, its localization will be mitochondria due to their structure and functional peculiarities. Also there exists another interesting issue which is: how linear will be the dependance of intracellular effects on the adsorption doze of the laser irradiation. In the work we study the influence of the laser irradiation at the wavelength of 1265 nm and the fluence of 9,45–400 J/cm² on

the dynamics of oxidative stress and mitochondria potential, and also the level of reduced glutathione and viability.

MATERIALS AND THE METHODS OF RESEARCH

Parameters of the laser irradiation. As the source of the low-fluence laser irradiation we used a semiconductor narrow-band (high-coherent) laser with the width of the irradiation line ~ 0,001 nm (Yenista Optics, OSICS T100 Tunable Laser Module T100 1310) [14].

For the study of the influence of the higher doses of laser irradiation a

fiberlaser with the width of line ~ 2 nm was applied, allowing using the maximum fluence of 400 J/cm² without the additional effect of heating the object of irradiation [17].

Irradiation dose calculations. The surface dose (the fluence), which is absorbed by the biological tissue (E , J/cm²) was calculated by the formula:

$$E = Pt/S, \quad (1)$$

Where P – is the medium capacity of the laser source (W), t – the exposition time (s), S – the area of irradiation (cm²) [17].

Рис.1. Влияние узкополосного и широкополосного лазерного излучения с длиной волны 1265 нм на жизнеспособность клеток НСТ116 через 24 ч после облучения. * – статистически достоверное отличие между контрольной и опытной группами, $p < 0,05$

Fig.1. The influence of the narrow-band and broad-band laser irradiation at the wavelength of 1265 nm on the viability of HCT116 cells in 24 hours after the irradiation. * – the statistically reliable difference between the control and test groups, $p < 0,05$

внутриклеточную концентрацию активных форм кислорода (АФК) через 30 мин и 3 ч после облучения (дозы 9,45 и 400 Дж/см²). Через 30 мин после облучения отмечается статистически достоверное увеличение концентрации АФК (рис.2). Через 3 ч эффект лазерного облучения при 400 Дж/см² усиливается почти в 2,5 раза (отношение CTCF 1,45 и 3,5 для низкой и высокой дозы соответственно), в то время как воздействие лазерного излучения при 9,45 Дж/см² на клетки НСТ116 в экспериментальной группе снижается до значений в контрольной группе.

В. Изменения митохондриального потенциала после воздействия лазерного излучения с длиной волны 1265 нм

Митохондриальный потенциал определяли через 30 мин и 3 ч после воздействия лазерного излучения 1265 нм (дозы 9,45 и 400 Дж/см²). Через 30 мин после облучения при минимальной дозе отмечается снижение митохондриального потенциала в экспериментальной группе (рис.3), а под воздействием максимальной дозы лазерного излучения изменений не происходит.

Рис.2. Внутриклеточная концентрация АФК в клетках НСТ116, подвергшихся воздействию лазеров низкой и относительно высокой мощности с длиной волны 1265 нм через 30 мин и 3 ч после облучения. * – статистически достоверное отличие между контрольной и опытной группами, $p < 0,05$

Fig.2. The intracellular concentration of ROS in HCT116 cells, that had been affected by lasers of low and relatively high capacity at the wavelength of 1265 nm in 30 min and 3 hours after the irradiation. * – the statistically reliable difference between the control and test groups, $p < 0,05$

Г. Влияние лазерного излучения с длиной волны 1265 нм на уровень восстановленного глутатиона

Уровень восстановленного глутатиона (GSH) оценивали через 30 мин и 3 ч после воздействия лазерного излучения (дозы 9,45 и 400 Дж/см²). Через 30 мин после облучения при дозе 9,45 Дж/см² в клетках НСТ116 не отмечается изменений GSH, однако через 3 ч наблюдается его повышение на 38% (рис.4). После облучения при дозе 400 Дж/см² наблюдаются противоположные эффекты, и уровень GSH значительно снижается.

ОБСУЖДЕНИЕ

Нами были исследованы изменения жизненных параметров раковых клеток линии НСТ116 в ответ на воздействие двух лазеров с длиной волны 1265 нм, обеспечивающих плотности энергии от 9,45 до 400 Дж/см².

Через 24 ч после облучения при дозах 9,45, 66,6, 200, 400 Дж/см² наблюдали дозозависимое увеличение относительного количества погибших клеток (рис.1), причем можно отметить, что этот процесс протекает нелинейно. Это можно объяснить как отличающимися механизмами, лежащими в основе воздействия низкоэнергетического узкополосного (высококогерентного)

Рис.3. Изменение митохондриального потенциала в клетках HCT116, подвергнутых воздействию лазерных источников малой и относительно высокой мощности 1265 нм через 30 мин и 3 ч после облучения. * – статистически достоверное отличие между контрольной и опытной группами, $p < 0,05$

Fig.3. The change of the mitochondria potential in HCT116 cells, that had been affected by lasers of low and relatively high capacity at the 1265 nm wavelength in 30 min and 3 hours after the irradiation. * – the statistically reliable difference between the control and test groups, $p < 0,05$

лазера и относительно мощного лазера, так и специфической реакцией раковых клеток на используемые дозы. Так, в [35] было показано, что при более высокой дозе, поглощенной изучаемыми культурами клеток,

наблюдалась активация апоптоза непосредственно активными формами кислорода, в то время как при более низкой дозе происходила активация каскада каспаз [35]. Ранее отмечалось, что для лазерных систем с отличающимися параметрами присутствуют различные типы и механизмы повреждения ДНК в клетке [36]. Более того, выяснилось, что полная энергия для индукции одного и того же процесса (например, фосфорилирование H2AX) варьируется между различными системами.

Изучение динамики окислительного стресса показало, что через 3 ч после лазерного облучения при дозе 9,45 Дж/см² в клетках HCT116 концентрация АФК снизилась до контрольных значений (рис.2), при этом, несмотря на отсутствие достоверных отличий между опытом и контролем, в ответ на окислительный стресс в клетках индуцируются некоторые негативные процессы: значительная их гибель через 24 ч после облучения и снижение митохондриального потенциала почти сразу после воздействия, сохраняющегося через 3 ч (рис.3). В то же время на данный момент сложно объяснить нестандартные изменения уровня восстановленного глутатиона, косвенного показателя усиления окислительных реакций в митохондриях, при облучении низкоинтенсивным (высококогерентным) лазером (рис.4).

Через 30 мин после воздействия лазерное излучение при дозе 400 Дж/см² не показывает каких-либо отличий от уровня АФК при 9,45 Дж/см², но через 3 ч это значение значительно увеличивается. Одним из вероятных механизмов усиления окислительного стресса является эффект

The culture of cells and reagents. The experiments were conducted on the culture of human colonic cancer cells (adenocarcinoma) HCT116 (ACCT CCL-247™), obtained from the American collection of cellular culture types (Manassas, Wyoming, USA) The cells were kept under standard conditions recommended by the manufacturer.

The culture medium DMEM/F12 and the embryonic serum was delivered respectively by OOO "Paneco" (Russia) and PAA Laboratories (Australia); the reagents were obtained from Sigma-Aldrich (USA).

Irradiation of the cells. The cells were exposed to the irradiation in the slide-flasks (SPLLife Sciences, Korea) with the initial fluence of passage of $10^5/\text{ml}$ in the middle of the exponential phase in the desktop chamber of the microscope (UNO, OkoLab). The absorbed dose was calculated relative to the characteristics of the source and time of irradiation (5–30 minutes).

Each experiment was repeated not less than three times. As the control samples the chambers of the slide-flasks covered with the metal foil during the irradiation were used.

Fluorescent microscopy. The cellular survival was detected in 24 hours after the irradiation at the doses of 9,45–400 J/cm². The cells were marked by the solution of propidium iodide, as it had been described before [33].

In 30 minutes and 3 hours after the irradiation the intracellular concentration of reactive oxygen species (ROS), mitochondria potential and the level of the reduced glutathione were measured as it is described in [17].

The corrected integral fluorescence of the cell (CICF) was calculated after the processing of data

"АФК-индуцированного высвобождения АФК", который хорошо описан для митохондрий как основных поставщиков АФК внутри клетки [37]. Лазерное излучение при 400 Дж/см² вызывает повреждение ядерной ДНК, в том числе в динамике [17], что не наблюдается при более низких дозах, указывая на роль этого механизма в более позднем окислительном стрессе. Кроме того, достоверно низкий уровень восстановленного глутатиона, не восстанавливающийся через 3 ч, косвенно указывает на нарушение функционирования митохондрий (рис.4) [38].

Стоит отметить, что в данном исследовании зарегистрировано отсутствие каких-либо эффектов широкополосного относительно мощного лазерного излучения с длиной волны 1265 нм при дозе 400 Дж/см² на митохондриальный потенциал раковых клеток (рис.3). В то же время в одной из наших предыдущих работ было показано, что этот тип лазерного излучения может увеличивать митохондриальный потенциал в нераковых клетках СНО-К [17]. Это может быть связано с ингибированием синтеза АТФ в раковых клетках вследствие активации гликолиза [39].

Ширина линий лазеров низкой и относительно высокой мощности соответственно равна $\Delta\lambda_l \sim 0,001$ нм и $\Delta\lambda_h \sim 2$ нм. Соотношение спектральных плотностей мощности для соответствующих источников лазерного излучения:

$$\frac{P_{\lambda l}}{P_{\lambda h}} \sim \frac{\Delta\lambda_h}{\Delta\lambda_l} \frac{E_l}{E_h} \sim 2 \times 10^3 \frac{E_l}{E_h} \quad (2)$$

received via the program Image J [34]. The values were represented as the ratio of CFC in the experimental and test groups, and the statistical analysis was conducted via Student's t-test for paired variables ($p < 0.05$).

RESULTS

A. The influence of the laser irradiation at the wavelength of 1265 nm on the viability of cancer cells

We compared the influence of the 1265 nm laser on the viability of HCT116 cells in 24 hours after the irradiation (doses 9,45, 66,6, 200 and 400 J/cm²). The part of the dead cells increases under the condition of the

increase of the fluence of the laser irradiation (Fig.1).

B. Oxidative stress after the influence of the laser irradiation at the wavelength of 1265 nm

The intracellular concentration of reactive oxygen species (ROS) was measured after 30 min and 3 hours after the irradiation (doses 9,45 and 400 J/cm²) for the evaluation of the dynamics of the influence of the laser irradiation at the wavelength of 1265 nm on the occurrence of the oxidative stress. In 30 minutes after the irradiation the statistically reliable increase of ROS concentration

was registered (Fig.2). In three hours the effect of the laser irradiation at 400 J/cm² increased almost 2.5 times (the ratio CFC 1.45 and 3.5 for low and high doses respectively), while the influence of the laser irradiation at 9.45 J/cm² on HCT116 cells in the experimental group decreased up till the values in the control group.

C. The changes of the mitochondria potential after the influence of the laser irradiation at the wavelength of 1265 nm

The mitochondria potential was measured in 30 minutes and 3 hours after the influence of the 1265 nm laser irradiation (doses 9,45 and 400

Рис.4. Изменения внутриклеточного уровня восстановленного глутатиона в клетках НСТ116, подвергшихся воздействию лазерных источников малой и относительно высокой мощности 1265 нм через 30 мин и 3 ч после облучения. * – статистически достоверное отличие между контрольной и опытной группами, $p < 0,05$

Fig.4. The change of the intracellular level of the reduced glutathione in HCT116 cells, that had been affected by lasers of low and relatively high capacity with the 1265 nm wavelength in 30 min and 3 hours after the irradiation. * – the statistically reliable difference between the control and test groups, $p < 0,05$

где $P_{\lambda l}$ – спектральная плотность мощности узкополосного источника (Вт), $P_{\lambda h}$ – спектральная плотность мощности широкополосного источника (Вт), E_l – поверхностная плотность энергии низкоомного

лазерного излучения ($\text{Дж}/\text{см}^2$), E_h – поверхностная плотность энергии относительно высокомоощного лазерного излучения ($\text{Дж}/\text{см}^2$), $\Delta\lambda_l$ – ширина линии низкомоощного (высококогерентного) лазерного источника (нм), $\Delta\lambda_h$ – ширина линии относительно высокомоощного лазерного источника (нм).

Таким образом, для настоящего исследования спектральная плотность моощности низкомоощного лазера в максимуме выше, чем соответствующая величина относительно высокомоощного лазера. Все это указывает на возможность формирования узкополосного резонанса, предположительно, на поверхности мембран митохондрий. Это предположение требует дальнейшего рассмотрения и проверки, но может пролить свет на некоторые эффекты воздействия лазерного излучения, не объясненные до настоящего времени, например, так называемый "светокислородный эффект" [40].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наше исследование продемонстрировало сравнительные эффекты воздействия узкополосного (высококогерентного) низкоинтенсивного полупроводникового лазера и широкополосного относительно высокоинтенсивного волоконного лазера при дозах 9,45 и 66,6–400 $\text{Дж}/\text{см}^2$, соответственно. Результаты экспериментов показали, что оба источника лазерного излучения с длиной волны 1265 нм вызывают окислительный стресс, приводя к гибели раковых клеток, и могут нарушать функционирование митохондрий. Однако некоторые физические характеристики лазеров, такие как поверхностная плотность энергии,

характеризующая дозу, поглощенную культурой клеток, и ширина линии излучения, могут быть важны для интерпретации полученных результатов и дальнейших исследований.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа А.В.Хохловой, И.О.Золотовского, Д.А.Столярова, А.А.Фотиади и Ю.В.Саенко была частично поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации по государственному заданию Правительства РФ № 3.3889.2017. Работа С.Г.Соколовского и Е.У.Рафаилова была частично поддержана Российским научным фондом в рамках гранта № 18-15-00172 и частично в рамках исследовательской и инновационной программы ЕС FET H2020 MESO-BRAIN, грант № 713140. Работа А.А. Фотиади была поддержана Leverhulme Trust (# VP2-2016-042, приглашенный профессор, Университет Астана, Бирмингем).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCE

1. Azadgoli B., Baker R.Y. Laser applications in surgery. *Ann Transl Med.* 2016 Dec; 4(23): 452. doi: 10.21037/atm.2016.11.51.
2. Awotidebe A.W., Inglis-Jassiem G., Young T. Low-level laser therapy and exercise for patients with shoulder disorders in physiotherapy practice (a systematic review protocol). *Syst Re.* V. 2015; 4: 60. doi: 10.1186/s13643-015-0050-2.
3. Amorim Ramos G., Gonçalves Arliani G., Costa Astur D., de Castro Pochini A., Ejnisman B., Cohen M. Rehabilitation of hamstring

J/cm^2). In 30 minutes after the irradiation at the minimum dose the decrease of the mitochondria potential was registered in the experimental group, and at the influence of the maximum dose of the laser irradiation no changes occur.

D. The influence of the laser irradiation with the wavelength of 1265 nm on the level of the reduced glutathione

The level of the reduced glutathione (GSH) was measured in 30 minutes and 3 hours after the influence of the laser irradiation (doses 9,45 and 400 J/cm^2). In 30 minutes after the irradiation at the dose of 9,45 J/cm^2 in HCT116 cells no changes of GSH

were registered, but in 3 hours its increase by 38% was observed (Fig.4). After the irradiation at the dose of 400 J/cm^2 the opposite effects were observed, and the level of GSH significantly decreased.

DISCUSSION

We have studied the changes of the life parameters of the HCT116 cancer cells in response to the influence of two lasers with the wavelength of 1265 nm, providing the fluence from 9,45 to 400 J/cm^2 .

In 24 hours after the irradiation at the doses of 9,45 J/cm^2 , 66.6 J/cm^2 , 200 J/cm^2 , 400 J/cm^2 the dose dependant increase relative

to the quantity of dead cells was observed (Fig.1), also it should be noted that the process runs nonlinearly. It can be explained by either the differing mechanisms that lie in the basis of the influence of the low capacity narrow-band (high-coherent) laser and relatively high-capacity laser or the specific reaction of cancer cells to the applied doses. Thus in [35] it was shown that at a higher dose absorbed by the studied cultures of cells, the activation of apoptosis by precisely the reactive oxygen species was observed while at a lower dose the activation of caspase cascade occurred [35]. It was noted before, that for the laser

- muscle injuries: a literature review. *Rev Bras Ortop.* 2017 Jan-Feb; 52(1): 11–16. doi: 10.1016/j.rboe.2016.12.002.
4. **Ash C., Town G., Whittall R., Tooze L., Phillips J.** Lasers and intense pulsed light (IPL) association with cancerous lesions. *Lasers Med Sci.* 2017; 32(8): 1927–1933. doi: 10.1007/s10103-017-2310-y
 5. **Błochowiak K., Andrysiak P., Sidorowicz K., Witmanowski H., Hędzielek W., Sokalski J.** Selected applications of Er:YAG and CO₂ lasers for treatment of benign neoplasms and tumorous lesions in the mouth. *Postepy Dermatol Alergol.* 2015 Oct; 32(5): 337–343. doi: 10.5114/pdia.2015.48053.
 6. **Schomaker M., Heinemann D., Kalies S., Willenbrock S., Wagner S., Nolte I., Ripken T., Murua Escobar H., Meyer H., Heisterkamp A.** Characterization of nanoparticle mediated laser transfection by femtosecond laser pulses for applications in molecular medicine. *J Nanobiotechnology.* 2015; 13: 10. doi: 10.1186/s12951-014-0057-1.
 7. **Shajahan P.A., Ranjith Kumar P., Hariprasad A., Mathew J., Shaji A.P., Fazeel Ahammed M.** Lasers: The Magic Wand in Esthetic Dentistry. *J Int Oral Health.* 2015 Jun; 7(6): 119–121. PMID: 26124614.
 8. **Nazemismalman B., Farsadeghi M., Sokhansanj M.** Types of Lasers and Their Applications in Pediatric Dentistry. *J Lasers Med Sci.* 2015 Summer; 6(3): 96–101. doi: 10.15171/jlms.2015.01.
 9. **Kim M., Jung H.Y., Park H.J.** Topical PDT in the Treatment of Benign Skin Diseases: Principles and New Applications. *Int J Mol Sci.* 2015 Oct; 16(10): 23259–23278. doi: 10.3390/ijms161023259.
 10. **Moghissi K., Dixon K., Gibbins S.** A Surgical View of Photodynamic Therapy in Oncology: A Review. *Surg J (N Y).* 2015 Dec; 1(1): e1–e15. doi: 10.1055/s-0035-1565246.
 11. **Trivedi M.K., Yang F.C., Cho B.K.** A review of laser and light therapy in melasma. *Int J Womens Dermatol.* 2017 Mar; 3(1): 11–20. doi: 10.1016/j.ijwd.2017.01.004.
 12. **Bristow I.R.** The effectiveness of lasers in the treatment of onychomycosis: a systematic review. *J Foot Ankle Res.* 2014; 7: 34. doi: 10.1186/1757-1146-7-34.
 13. **Saquilabon Mae Cruz G., Kong X., Alcaraz Silva B., Khatibzadeh N., Thai R., Berns M.W., Yokomori K.** Femtosecond near-infrared laser microirradiation reveals a crucial role for PARP signaling on factor assemblies at DNA damage sites. *Nucleic Acids Res.* 2016 Feb 18; 44(3): e27. doi: 10.1093/nar/gkv976.
 14. **Khokhlova A., Zolotovskii I., Stoliarov D., Vorsina S., Liamina D., Pogodina E., Fotiadi A.A., Sokolovski S.G., Saenko Y., Rafailov E.U.** 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*, VOL. 25, NO. 1, JANUARY/FEBRUARY 2019. doi: 10.1109/JSTQE.2018.2854539.
 15. **Sriramoju V., Alfano R.R.** In vivo studies of ultrafast near-infrared laser tissue bonding and wound healing. *J Biomed Opt.* 2015 Oct; 20(10): 108001. doi: 10.1117/1.JBO.20.10.108001.

systems with differing parameters there are different types and mechanisms of DNA damage in the cell [36]. Furthermore it was found that the full energy for the induction of one and the same process (for example, phosphorylation of H2AX) varies between different systems.

The study of the dynamics of the oxidative stress showed that in 3 hours after the laser irradiation at the dose of 9,45 J/cm² the concentration of ROS in HCT116 cells decreased to the control values (Fig.2), at the same time despite the absence of valid differences between the test and control in response to the oxidative

stress some negative processes were induced in cells: the death of the majority of them in 24 hours after irradiation and the decrease of the mitochondrial potential almost immediately after the treatment which was still preserved after 3 hours (Fig.3). At the same time to date it is difficult to give account for the nonstandard changes of the level of the reduced glutathione, the indirect indicator of intensification of the oxidative reactions in mitochondria at the irradiation of low intensity (high-coherent) laser (Fig.4).

In 30 minutes after the influence the laser irradiation at the dose of

400 J/cm² did not show any differences from the level of ROS at 9,45 J/cm², but in 3 hours this value significantly increased. One of the probable mechanisms of the intensification of the oxidative stress is the effect "ROS-induced release of ROS", which is well described for mitochondria as the main mean of ROS inside the cell [37]. The laser irradiation at 400 J/cm² causes damage to the nucleus DNA in the dynamics also [17], which is not observed at lower doses demonstrating the role of this mechanism in the later oxidative stress. Beyond that the truly low level of the reduced glutathione, that is not restored in 3 hours,

16. Hellman A.N., Vahidi B., Joon Kim H., Mis-mar W., Steward O., Li Jeon N., Venugopalan V. Examination of Axonal Injury and Regeneration in Microfluidic Neuronal Culture Using Pulsed Laser Microbeam Dissection. *Lab Chip*. 2010 Aug 21; 10(16): 2083–2092. doi: 10.1039/b927153h.
17. 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.*, vol. 31, pp. 405–413, 2016.
18. Firat E.T., Dağ A., Günay A., Kaya B., Karadede M.I., Kanay B.E., Ketani A., Evliyaoglu 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 Surgery*, vol. 31, no. 7, pp. 315–321, 2013.
19. Oliveira C.S., Turchiello R., Kowaltowski A.J., Indig G.L. and Baptista M.S. "Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 51, pp. 824–833, 2011.
20. Anquez F., El Yazidi-Belkoura I., Randoux S., Suret P., Courtade E. Cancerous cell death from sensitizer free photo activation of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.*, vol. 88, pp. 167–174, 2012.
21. Huang Y.Y., Nagata K., Tedford C.E., McCarthy T., Hamblin M.R. Low-level laser therapy (LLLT) reduces oxidative stress in primary cortical neurons in vitro. *J. Biophoton.*, vol. 6, pp. 829–838, 2013.
22. Chen A.C., Arany P.R., Huang Y.Y., Tomkinson E.M., Sharma S.K., Kharkwal G.B., Saleem T., Mooney D., Yull F.E., Blackwell T.S., Hamblin M.R. "Low-level laser therapy activates NF-κB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts," *PLoS One*, vol. 6, 2011, Art. no. e22453.
23. Chen C.H., Hung H.S., Hsu S.H. Low-energy laser irradiation increases endothelial cell proliferation, migration, and eNOS gene expression possibly via PI3K signal pathway. *Lasers Surgery Med.*, vol. 40, pp. 46–54, 2008.
24. Magrini T.D., dos Santos N.V., Milazzotto M.P., Cerchiaro G., da Silva Martinho H. Low-level laser therapy on MCF-7 cells: A micro-Fourier transform infrared spectroscopy study. *J. Biomed. Opt.*, vol. 17, 2012, Art. no. 101516.
25. Silva D.C., Czarnecki K., Ryan M.D. Visible and resonance Raman spectra of low valent iron porphyrins. *Inorg Chim Acta* 287 (1):21–26, 1999.
26. Schwaighofer A., Steininger C., Hildenbrandt D.M. Time-resolved surface-enhanced IR-absorption spectroscopy of direct electron transfer to cytochrome c oxidase from *R. sphaeroides*. *Biophys J* 105(12):2706–2713, 2013.
27. Ritter M., Anderka O., Ludwig B., Mäntele W., Hellwig P. Electrochemical and FTIR spectroscopic characterization of the cytochrome bc 1 complex from *Paracoccus denitrificans*: evidence for protonation reactions coupled to quinone binding. *Biochemistry* 42 (42):12391–12399, 2003.
28. Giuliani A., Lorenzini L., Gallamini M., Massella A., Giardino L., Calzà L. Low infra-red laser light irradiation on cultured neural cells: Effects on mitochondria and cell viability after oxidative

indirectly indicates the disturbance in the function of mitochondria (Fig.4) [38].

It should be noted that this study registers the absence of any effects of the broad-band relatively high capacity laser irradiation with the wavelength of 1265 nm at the dose of 400 J/cm² on the mitochondria potential of cancer cells (Fig.3). At the same time one of our previous works showed that this type of the laser irradiation can increase the potential of mitochondria in non-cancerous CHO-K cells [17]. It may be linked to the inhibition of the synthesis of ROS

in cancer cells due to glycolysis activation [39].

The width of the laser lines of the low and relatively high capacity, respectively, equals $\Delta\lambda_l \sim 0,001$ nm and $\Delta\lambda_h \sim 2$ nm. The ratio of the spectral fluence of capacity for the respective sources of laser irradiation:

$$\frac{P_{\lambda l}}{P_{\lambda h}} \sim \frac{\Delta\lambda_h}{\Delta\lambda_l} \frac{E_l}{E_h} \sim 2 \times 10^3 \frac{E_l}{E_h} \quad (2)$$

where $P_{\lambda l}$ – the spectral fluence of the capacity of the narrow-band source (W), $P_{\lambda h}$ – the spectral fluence of the capacity of the broad-band source (W), E_l – the surface fluence of the low capacity laser

irradiation (J/cm²), E_h – the surface fluence of the relatively high capacity laser irradiation (J/cm²), $\Delta\lambda_l$ – the width of the line of the low capacity (high-coherent) laser source (nm), $\Delta\lambda_h$ – the width of the line the relatively high capacity laser source (nm).

Thus for the present research the spectral fluency of the capacity of the low capacity laser in the maximum is higher than the corresponding value of the relatively high capacity laser. Everything indicates the possibility of formation of the narrow-band resonance, supposedly, on the surface of mitochondria membranes. This

- stress. *BMC Complement Alternative Med.*, vol. 9, pp. 1–8, 2009.
29. Karu T.I., Pyatibrat L.V., Kolyakov S.F., Afanasyeva N.I. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: Reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 81, pp. 98–106, 2005.
 30. Carvalho Costa 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*, vol. 9, pp. 1208–1221, 2016.
 31. Sokolovski S.G., Zolotovskaya S.A., Goltsov A., Pourreyaon C., South A.P., Rafailov E.U. Infra-red laser pulse triggers increased singlet oxygen production in tumor cells. *Sci. Rep.*, vol. 3, 2013, Art. no. 3484.
 32. Yusupov A.S., Yoncharov S.E., Zalevskii J.D., Paramonov V.M., and Kurkov A.S. Raman fiber laser for the drug-free photodynamic therapy. *Laser Phys.*, vol. 20, pp. 357–359, 2010.
 33. Koda S., Sugimoto K. Pressure effect on the absorption and photodissociation of O₂ near the dissociation threshold. *J. Photochem. Photobiol. C, Photochem. Rev.*, vol. 4, pp. 215–226, 2003.
 34. Gan Z., Audi S.H., Bongard R.D., Gauthier K.M., Merker M.P. Quantifying mitochondrial and plasma membrane potentials in intact pulmonary arterial endothelial cells based on extracellular disposition of rhodamine dyes. *Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, vol. 300, L762–L772, 2011.
 35. Wu S., Xing D., Wang F., Chen T., Chen W.R. Mechanistic study of apoptosis induced by high-fluence low-power laser irradiation using fluorescence imaging techniques. *J Biomed Opt.* 2007 Nov-Dec;12(6):064015.
 36. Kong X., Mohanty S.K., Stephens J., Heale J.T., Gomez-Godinez V., Shi L.Z., Kim J., Yokomori K., Berns M.W. Comparative analysis of different laser systems to study cellular responses to DNA damage in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2009 May; 37(9): e68. doi: 10.1093/nar/gkp 221.
 37. Zorov D.B., Juhaszova M., Sollott S.J. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiol Rev.* v. 2014. Jul; 94(3): 909–950. doi: 10.1152/physrev. v. 00026. 2013.
 38. Ribas V., Garcia-Ruiz C., Fernández-Checa J.C. Glutathione and mitochondria. *Frontiers Pharmacology*, vol. 5, pp. 1–19, 2014.
 39. Gatenby R.A., Gillies R.J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Rev., Cancer*, vol. 4, pp. 891–899, 2004.
 40. Захаров С.Д., Иванов А.В., Вольф Е.Б., Данилов В.П., Мурина Т.М., Нгуен К.Т., Новиков Е.Г., Панасенко Н.А., Перов С.Н., Скопинов С.А., Тимофеев Ю.П. Структурные перестройки в водной фазе клеточных суспензий и белковых растворов при светокислородном эффекте. *Квантовая электроника*, 2003, т. 33, № 2, с. 149–162. doi.org/10.1070/QE2003v033n02ABEH002376.

theory requires further research and verification, but it can shed the light on some effects of the laser irradiation influence which haven't been explained yet such as, for example, so called "light oxygen effect" [40].

CONCLUSIONS

Our research demonstrated comparative effects of the influence of the narrow-band (high-coherent) low capacity semiconductor laser and broad-band relatively high capacity fiber laser at the doses of 9,45 and 66,6–400 J/cm², respectively. The results of the experiments showed that both sources

of laser irradiation at the wavelength of 1265 nm cause oxidative stress, which results in the death of cancer cells and can disturb the function of mitochondria. Nevertheless some of physical characteristics of lasers such as surface fluence which characterizes the dose absorbed by the culture of cells, and the width of the line of the irradiation, can be important for the interpretation of the obtained results and further researches.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work of A.V.Khokhlova, I.O.Zolotovskii, D.A.Stoliarov,

A.A.Fotiadi and Y.V.Saenko was partially supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation according to the state order of the Government of the RF № 3.3889.2017. The work of S.G.Sokolovski and E.U.Rafailov was partially supported by the Russian Science Fund within the framework of the grant № 18-15-00172 and partially within the framework of the research and innovation program EC FET H2020 MESO-BRAIN, the grant № 713140. The work of A.A.Fotiadi was supported by the Leverhulme Trust (# VP2-2016-042, the invited professor, Aston University, Birmingham, U.K). ■