

УДК 615.849.19, 544.773.432

ФОТОБИОМОДУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА В 3D-КУЛЬТУРАХ**П.Ю. Бикмулина¹, Н.В. Кошелева^{2,3,4}, А.И. Шпичка^{1,5}, В.И. Юсупов⁶, Ю.А. Рочев^{1,7},
П.С. Тимашев^{1,5,6,8}**¹ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия² Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия³ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия⁴ Российская Медицинская Академия Непрерывного Профессионального Образования Минздрава РФ, Москва, Россия⁵ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия⁶ Институт фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия⁷ National University of Ireland, Galway (NUI Galway), Galway, Ireland⁸ Институт химической физики имени Н.Н. Семенова, Москва, Россия**ВВЕДЕНИЕ**

Фотобиомодуляция (ФБМ) – это метод, основанный на нетепловом воздействии света определенной длины волны и низкой интенсивности на клетки и ткани (1). ФБМ повсеместно применяют для терапии и профилактики широкого круга заболеваний. Воздействие ФБМ направлено в основном на подавление воспалительных реакций и ускорение регенеративных процессов. Наиболее выраженные эффекты такого характера показаны для излучения красной и инфракрасной областей спектра (2). Механизмы воздействия ФБМ на различные типы клеток в разных условиях могут отличаться и до конца не изучены. Так, одни и те же параметры облучения могут приводить как к стимулированию пролиферации, так и к активации дифференцировки клеток (3). Предполагается, что излучение может воздействовать на клетки несколькими путями – через фотореактивацию ферментов (супероксиддисмутазы) в очагах воспаления, фотолиз комплексов оксида азота (NO), ингибирующих комплексы дыхательной цепи митохондрий, а также с помощью воздействия на порфирины мембран митохондрий (4). Известно, что основной мишенью красного и инфракрасного излучения в клетке является комплекс IV (цитохром с-оксидаза) митохондрий (5). При поглощении света компонентами дыхательной цепи митохондрий происходит фотодиссоциация комплекса NO-цитохром с-оксидаза, что ведет, с одной стороны, к увеличению активности дыхательной цепи, скорости переноса электронов, продукции АТФ и небольших количеств активных форм кислорода (АФК), а с другой стороны – к высвобождению NO, который может выступать в качестве сигнальной молекулы (в частности, в процессах дифференцировки). АФК также являются медиаторами множества сигнальных путей в клетке, в том числе противовоспалительных и антиапоптотических. Вследствие увеличенной продукции АТФ изменяются уровни pH и ионов Ca^{2+} , что зачастую является митогенным сигналом. Таким образом, после воздействия ФБМ происходит повышение метаболической активности и клеточного дыхания, усиление пролиферации и снижение числа апоптотических клеток (6). Такие свойства ФБМ позволяют предположить, что данный метод обладает большим потенциалом для применения в области тканевой инженерии и регенеративной медицины. В настоящее время внимание этих областей сосредоточено на создании 3D-систем культивирования клеток, повторяющих условия нативной ткани *in vivo*. Так, скаффолды из различных биоматериалов способны имитировать внеклеточный матрикс, что позволяет воссоздать трехмерное микроокружение для клеток. Однако зачастую такие методы сталкиваются с проблемами, например, ограниченной диффузией кислорода и питательных веществ, недостаточной васкуляризацией, и как следствие, стрессом и гибелью клеток внутри объемных конструкций. Целью данной работы стало изучение механизмов и эффектов ФБМ, а также исследование потенциальных возможностей ФБМ стимулировать физиологическую активность клеток в 3D-условиях.

МЕТОДЫ

В исследовании использовали культуры клеток с различными типами метаболизма – мезенхимные стромальные клетки человека (МСК) и линию клеток нейробластомы человека SK-N-BE(2). Клетки культивировали на ростовой среде ДМЕМ/Ф12 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Для подтверждения фенотипа первичной культуры МСК клетки анализировали на наличие специфичных поверхностных белков на проточном цитофлуориметре Sony SH800S (Sony Biotechnology, USA).

Для ингибиторного анализа клеточного дыхания использовали различные токсические вещества-ингибиторы комплексов дыхательной цепи митохондрий: ротенон в концентрациях от 0,001 до 150 мкМ, нитропруссид натрия от 20 до 100 мкМ, азид натрия от 1 до 50 мМ. В качестве трёхмерной системы культивирования клеток были выбраны гидрогелевые скаффолды из модифицированного фибрина. Культивирование проводили в разных вариантах (высота гидрогеля – 1,5 или 3 мм, концентрация фибрина – 25 или 50 мг/мл) в течение 3–7 дней в инкубаторе при температуре 37° С и 5 % CO₂. ФБМ клеток производилась с помощью LED-установки при 2 режимах: 633 нм, 1200 секунд, 2,2 Дж/м² и 840 нм, 600 секунд, 2,2 Дж/м² (см. табл. 1). Внешний вид и схема установки для ФБМ представлены на рис. 1. Облучение производилось однократно либо за 2 часа до воздействия ингибиторов на клетки, либо одновременно с добавлением ингибитора / полимеризацией фибринового гидрогеля. Так как было необходимо подобрать параметры ФБМ не только для стандартных монослойных культур, но и для условий трехмерных гидрогелей, были проведены спектрофотометрические исследования гидрогелей различных модификаций на предмет прозрачности геля для длин волн 633 и 840 нм.

Таблица 1. Технические параметры матричных LED-установок для ФБМ

Длина волны, нм	633±8	840±18
Мощность, мВ	160±20	320±40
Плотность потока, мВ/см ²	1.8±0.2	3.6±0.4
Интенсивность, Дж/см ²	2.2±0.2	2.2±0.2
Энергия, Дж	96±10	96±10
Время, сек	1200	600
Число сессий	1	1

Анализ эффектов ФБМ на физиологическую активность клеток проводили различными методами. Долю апоптотических клеток в популяции оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии и флуоресцентных красителей пропидий йодида и Аннексина-7, общую жизнеспособность и метаболическую активность – колориметрическими тестами на цитотоксичность (МТТ, аламаровый синий), действие которых основано на неспецифическом восстановлении реагента в детектируемую форму различными внутриклеточными ферментами. Темпы пролиферации анализировали количественно спектрофлуориметрическим методом определения количества ДНК в образце (PicoGreen). Жизнеспособность клеток была визуализирована, для этого использовали тест Live/Dead и лазерный сканирующий конфокальный микроскоп (Olympus, Japan). Также была проведена оценка активности митохондрий. С использованием цейтраферной микроскопии (CellInsight CX7, ThermoFisher, USA) было исследовано количество активных митохондрий, окрашенных MitoTracker Green, в динамике в течение 8 часов после ФБМ. Количественную оценку активности клеточного дыхания по уровню потребления кислорода проводили с помощью прибора Seahorse (Agilent, USA), принцип действия которого основан на анализе потребления кислорода каждым отдельным комплексом (I–IV) при последовательном разрушении дыхательной цепи специфическими ингибиторами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе методами проточной цитофлуориметрии апоптотической гибели клеток после облучения при выбранных режимах выявлено не было, что говорит об отсутствии негативных эффектов ФБМ для интактных клеток. Фибриновый гидрогель толщиной 10 мм (что значительно превышает толщины гелей, используемых в клеточных экспериментах) оказался оптически прозрачным как для красного (633 нм), так и для ближнего инфракрасного (840 нм) света. При воздействии на культуры клеток ингибиторов дыхания (в частности, ротенона) жизнеспособность снижалась пропорционально концентрации токсина, при этом клетки линии SK-N-BE(2) оказались менее устойчивы к воздействию ротенона, чем МСК. Однако ФБМ была способна нейтрализовать этот эффект при концентрациях ротенона до полулетальной, и эффективность двух типов облучения для данных клеток с разным метаболизмом различается. Так, МСК оказались более чувствительны к ФБМ красной области спектра, а клетки нейробластомы – к инфракрасному облучению, и в обоих случаях происходило увеличение общей метаболической активности клеток на 10–15 % по сравнению с необлученными контролями. Трёхмерные условия гидрогеля также оказывали неблагоприятное действие на клетки, в частности, происходило значительное ингибирование пролиферации. Повышенная концентрация, и особенно толщина гидрогеля значительно снижали активность клеток, по-видимому, вследствие ограничения диффузии. ФБМ, особенно при длине волны 840 нм, была способна нейтрализовать этот эффект, активируя пролиферативную активность клеток и приводя к увеличению числа ДНК в образцах в среднем на 15 % через 3 суток культивирования (рис. 2 в).

Параллельно наблюдали эффекты, отмеченные и в монослойных культурах – увеличение жизнеспособности и метаболической активности (рис. 2 г, д). Число активных митохондрий клеток, помещенных в условия гидрогеля, в течение нескольких часов после ФБМ было несколько выше. Данный эффект подтверждается данными Seahorse: повышение уровня потребления кислорода после облучения для обоих типов клеток достигает 20 %. При этом наиболее выраженные изменения в клеточном дыхании наблюдаются в течение 2 часов от момента ФБМ.

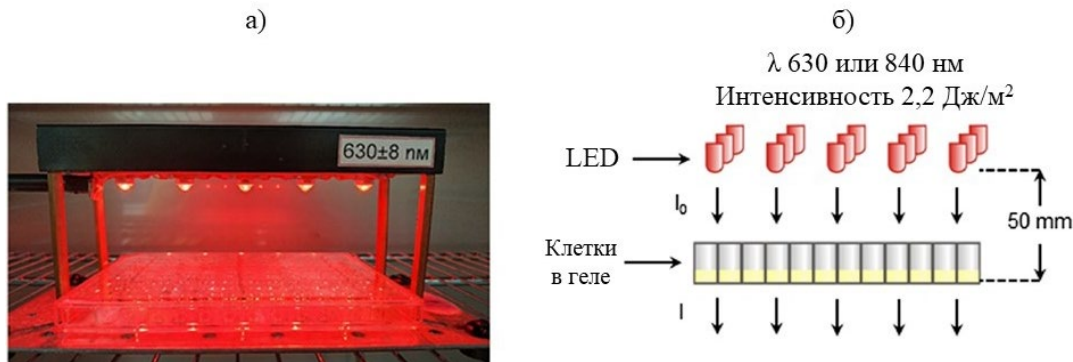


Рисунок 1. Внешний вид матричной LED-установки для ФБМ (а); схема матричной LED-установки (б); на подставке находится культуральный планшет с лунками, заполненными фибриновым гидрогелем с клетками; LED-матрица располагается на расстоянии 50 мм от верхнего края планшета

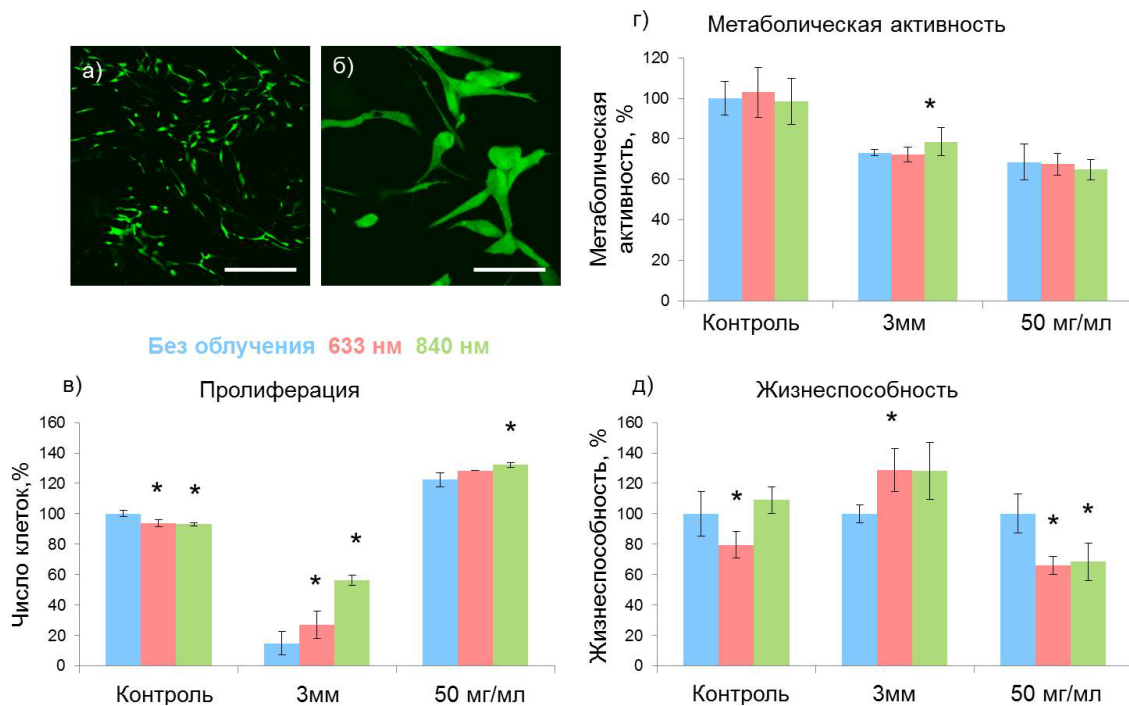


Рисунок 2. Визуализация жизнеспособных МСК, культивируемых в модифицированном фибриновом гидрогеле, полученная с помощью теста Live/Dead; зеленые клетки – живые, окрашенные кальцеином; масштабный отрезок составляет 100 и 20 мкм, соответственно (а, б). Количество ДНК МСК, культивируемых в течение 3 дней в контрольных образцах (фибриновый гидрогель высоты 1,5 мм и концентрации 25 мг/мл – контроль), более толстых (фибриновый гидрогель высоты 3 мм и концентрации 25 мг/мл – 3 мм), и более концентрированных (фибриновый гидрогель высоты 1,5 мм и концентрации 50 мг/мл – 50 мг/мл) (в). Метаболическая активность клеток, оцененная с помощью метода аламарового синего, для тех же образцов (г). Количественная оценка теста Live/Dead для тех же образцов (д)

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Таким образом, было показано, что ФБМ красной и ближней инфракрасной области спектра приводит к увеличению их метаболической активности клеток за счет активации дыхательной цепи митохондрий, стимулирует пролиферацию и обладает антиапоптотическими эффектами. Используемые в работе режимы ФБМ по-разному воздействуют на клетки с разным типом метаболизма. Инфракрасное облучение имеет более выраженные эффекты в трехмерных системах. Результаты данного исследования демонстрируют высокий потенциал метода ФБМ для применения в области тканевой инженерии за счет его способности стимулировать физиологическую активность клеток в неблагоприятных условиях затрудненной диффузии кислорода и питательных веществ в трехмерном конструкте, а также удобства в использовании и неинвазивности. Дальнейшее изучение молекулярных механизмов облучения у разных типов клеток и в разных условиях культивирования поспособствует выяснению его роли в процессах дифференцировки и регенерации, а также более грамотному и эффективному применению ФБМ в терапии.

Данное исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований грант № 20-04-60063 (выделение первичных культур МСК) и грант 18-29-06059 (создание биоматериалов).

ЛИТЕРАТУРА

1. George S, Hamblin MR, Abrahamse H. Effect of red light and near infrared laser on the generation of reactive oxygen species in primary dermal fibroblasts. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2018 Nov; 188:60–8.
2. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang Y-Y, Carroll JD, Hamblin MR. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. *Ann Biomed Eng.* 2012; 40(2):516–33.
3. Fekrazad R, Asefi S, Eslaminejad MB, Taghiar L, Bordbar S, Hamblin MR. Photobiomodulation with single and combination laser wavelengths on bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation and differentiation to bone or cartilage. *Lasers Med Sci.* 2019 Feb 27; 34(1):115–26.
4. Владимиров ЮА. Лазерная терапия: настоящее и будущее. *Соровский образовательный журнал.* 1999; (12):2–8.
5. Karu TI. Molecular mechanisms of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Lasers life Sci.* 1988; 2(1):53–74.
6. Wong-Riley MTT, Liang HL, Eells JT, Chance B, Henry MM, Buchmann E, et al. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: Role of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem.* 2005 Feb 11; 280(6):4761–71.