

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ КРАСНОГО ($\lambda_{\max} = 635$ НМ) И ЗЕЛЕННОГО ($\lambda_{\max} = 520$ НМ) ДИАПАЗОНОВ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ И ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КЛЕТОК ЛИНИИ MNNG/hos И ФЕТАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2017 г. А.М. Ермаков, А.С. Чернов, Р.А. Полтавцева*, И.И. Селезнева

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пуцино Московской области, ул. Институтская, 3;*

**Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова МЗ РФ,
117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4*

E-mail: ao_ermakovy@rambler.ru

Поступила в редакцию 19.10.16 г.

Показано, что однократное низкоинтенсивное ($0,146 \text{ мВт/см}^2$) облучение светом красного светодиода ($\lambda_{\max} = 635 \text{ нм}$) в дозе $175,2 \text{ мДж/см}^2$ приводит к небольшой стимуляции роста клеточной культуры фетальных фибробластов человека, тогда как облучение светом зеленого светодиода ($\lambda_{\max} = 520 \text{ нм}$) в той же дозе не изменяет пролиферативную активность культивируемых фибробластов. Рост культуры трансформированных клеток линии MNNG/hos не изменялся при избранных режимах облучения. Оба вида облучения изменяли профиль экспрессии генов пролиферации и остеогенной дифференцировки культуры фибробластов. В трансформированных клетках MNNG/hos красный свет способствовал экспрессии генов стволовости, остеогенной дифференцировки и маркеров гибели клеток. Под влиянием зеленого света в клетках MNNG/hos увеличивалась активность транскрипции маркеров гибели клеток и чекпойнтов.

Ключевые слова: низкоинтенсивное световое излучение, фетальные и трансформированные клетки человека, пролиферативная активность, экспрессия генов.

В последнее десятилетие в физиотерапии сформировалось новое направление – фототерапия, основанное на использовании узкополосного излучения разных цветов. Наиболее изучено воздействие красного (590–627 нм), зеленого (496–566 нм) и синего (421–495 нм) оптического излучения. Наиболее значимые эффекты были зарегистрированы при облучении культивируемых клеток светом красного и инфракрасного спектрального диапазонов [1]. Стимуляция пролиферации культуры клеток человека при воздействии света красного спектрального диапазона 632,4–670 нм зависела от дозы в диапазоне от 0,04 до 20 Дж/см², периодичности и типа облучения (непрерывное, импульсное и т.д.) [2–5]. Основными эффектами светового излучения являются изменения пролиферативной активности и дифференцировки клеток [6,7]. Большое внимание при развитии методов хромотерапии и фотодинамической терапии уделяется изучению воздействия света на трансформированные и раковые клетки [8–12].

Одним из важнейших показателей и ключом к пониманию наблюдаемых изменений пролиферативной активности и дифференцировки клеток при световом облучении разного спектра может быть изменение профиля экспрессии генов в ответ на световое воздействие [12]. Современные методы молекулярно-генетического анализа позволяют установить зависимость направленности биологического ответа от режима облучения [13]

Целью настоящего исследования было определение влияния низкоинтенсивного красного и зеленого света светодиодов на жизнеспособность, пролиферативную активность и профиль экспрессии генов в нормальных и трансформированных субстрат-зависимых клетках человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты были выполнены на культурах первичных фетальных фибробластов чело-

века и трансформированных клеток линии MNNG/hos (Human Caucasian osteosarcoma). Клетки культивировали в среде DMEM/F-12 (1:1, Life technologies, США), с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone Laboratories, США), 2 mM L-глутамина, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия) при 37°C в воздушной атмосфере с содержанием CO₂ 5%.

Облучение клеток светом. Источником светового излучения служили красные ($\lambda_{\max} = 635$ нм) и зеленые ($\lambda_{\max} = 520$ нм) светодиоды. Спектральные характеристики источников света определяли спектрометром МДР-41 (ЗАО «ОКБ-СПЕКТР», Россия). Мощность светового потока измеряли пиранометром СМР 3 (Kipp@Zonen, Нидерланды). Через сутки после высева клетки однократно облучали светом в культуральном 96-луночном планшете, разделенном на две части по 48 лунок. Одну половину планшета подвергали световому воздействию, вторая служила контролем. После 25 мин облучения культуральную среду заменяли на свежую среду без телячьей сыворотки. Интенсивность светового потока составляла 0,146 мВт/см², доза облучения была равна 175,2 мДж/см².

Анализ конfluenceности клеточной культуры. Скорость роста клеточной культуры оценивали по динамике изменения конfluenceности (занимаемой площади) с помощью планшетного ридера Clone Pix Imager (Molecular Devices, США) через 2, 24, 48, 72 и 96 ч инкубации. На каждую экспериментальную точку приходилось не менее четырех измерений (по 48 лункам каждое).

Определение экспрессии генов (ПЦР в реальном времени). Матричную РНК выделяли набором с магнитными частицами («Sileks», Россия), отбор клеток осуществляли через 2, 24, 48 и 96 ч после посева. Обратную транскрипцию проводили с помощью набора фирмы «Sileks» (Россия). ПЦР выполняли в реакционной смеси с SybrGreen («Syntol», Россия) с помощью амплификатора CFX-96 (BioRad, США) или ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). В клетках человека определяли экспрессию 96 генов, ответственных за 25 ключевых клеточных процессов. Уровень транскрипции генов нормировали по средним уровням экспрессии хаус-кипинг-генов β -актина, *rplp0* (ribosomal protein, large, P0) и *gapdh* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы). Ген-специфические праймеры подбирали, используя программу Primer Express (Applied Biosystems, США). Каждое измерение проводили на двух одинаковых плашках (внутренний повтор) и

усредняли по двум независимым образцам клеток. Негативным контролем служили образцы, обрабатываемые без стадии обратной транскрипции. Полученные данные по экспрессии генов анализировали с помощью онлайн-сервиса <http://www.sabiosciences.com>, программы mayday-2.14 (Center for Bioinformatics Tübingen, Германия) и Genesis (Sturn et al., 2002). Учитывались лишь те результаты, для которых изменения уровня экспрессии генов наблюдались при $p < 0,05$.

Статистическая обработка полученных результатов. Полученные данные обрабатывали статистически с помощью программы SigmaPlot 9.11 (Systat Software Inc., Германия) методом дисперсионного однофакторного анализа ANOVA. Результаты представлены на рисунках в виде средних значений \pm стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Облучение культивируемых фетальных фибробластов человека красным светом не влияло на плотность клеточной культуры в первые 48 ч (рис. 1а). Однако через трое и четверо суток после однократного облучения конfluenceность культуры возрастала по сравнению с контролем на 52 и 12,6% ($p < 0,001$) соответственно. Освещение зеленым светом не влияло на динамику роста занимаемой площади клеточной культуры фибробластов. Скорость роста клеточной культуры линии MNNG/hos после облучения клеток красным светом не изменялась, тогда как зеленый свет способствовал незначительному увеличению конfluenceности через одни и четверо суток инкубации (рис. 1б).

Однократное облучение культивируемых фибробластов человека красным светом инициировало значимые изменения транскрипции генов лишь в некоторых кластерах (рис. 2). В первые два часа после облучения светом повышался уровень мРНК генов в группах Notch-сигналинга (NOTCH 2), шести генов маркеров остеогенной дифференцировки, Wnt-сигналинга, трех генов регуляторов деления клеток и генов маркеров плюрипотентности. Напротив, уровень экспрессии генов RB1 (модуляторы хроматина и хромосом), DHH (регуляторы симметричности деления клетки) и COL3A1 (маркеры остеогенной дифференцировки) снижался. Через сутки в группе Notch-сигналинга снижался уровень мРНК всех исследуемых генов, а в группе остеогенной дифференцировки возрастал, за исключением генов TGFBR1 и VDR. При этом в группе маркеров пролиферации клеток активировалась экспрессия генов CCND1,

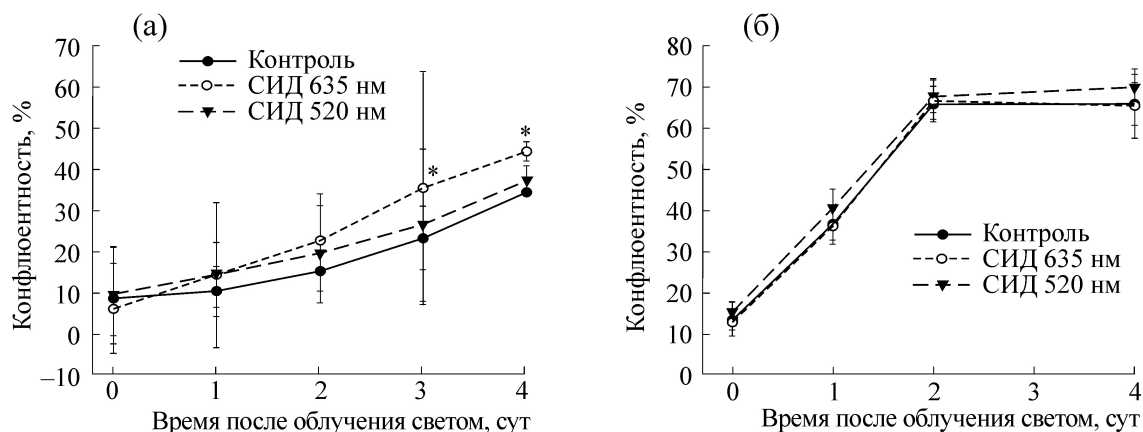


Рис. 1. Динамика изменения плотности культур клеток после облучения низкоинтенсивным световым излучением эмбриональных фибробластов человека (а) и клеток линии MNNG/hos (б) в контроле и после облучения светом светодиода разной длины волны (красным, $\lambda_{\max} = 635$ нм и зеленым, $\lambda_{\max} = 520$ нм). Данные представлены в виде $M \pm SD$. Параметры облучения: интенсивность 0,146 мВт/см², доза 175,2 мДж/см², * $p < 0,001$.

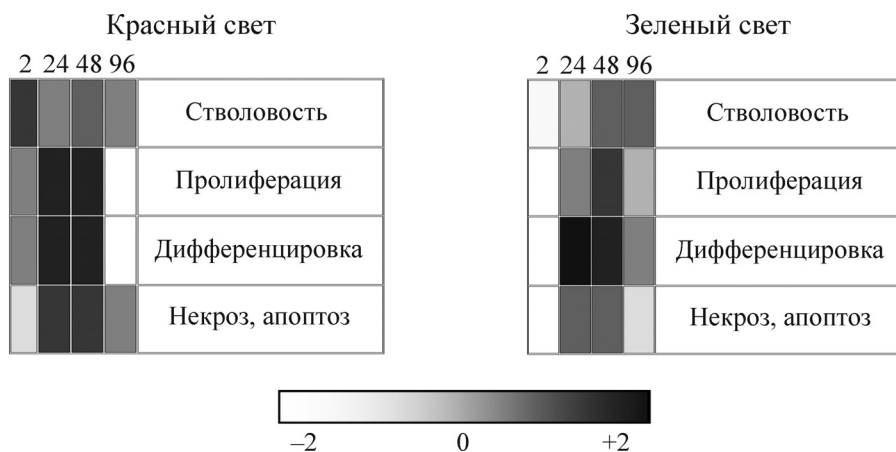


Рис. 2. Обобщенное изменение экспрессии генов в культивируемых эмбриональных фибробластах через два часа, сутки, двое и четверо суток после 25 мин облучения красным ($\lambda_{\max} = 635$ нм) или зеленым ($\lambda_{\max} = 520$ нм) светом светодиода в дозе 175,2 мДж/см². Отклонения показаны в логарифмической шкале с основанием 2. На диаграммах: серый цвет – уровень экспрессии сравним с контролем, градации цвета от серого до белого отражают степень ингибирования экспрессии генов, градации от серого до черного цвета – уровень стимуляции относительно необлученного контроля.

CDC6 и др. и сохранялась повышенная транскрипция у генов маркеров плюрипотентности и некоторых генов маркеров аутофагии, некроза и апоптоза.

Через двое–четверо суток после облучения уровень экспрессии многих ранее транскрипционно-активных генов выравнивался с контролем. Исключение составляли маркеры плюрипотентности и транскрипционная активность генов NANOG, POU5F1 и SOX2, для которых максимальное количество мРНК наблюдалось на четвертые сутки после светового облучения.

В отличие от красного света, облучение зеленым светом фетальных фибробластов через два часа приводило к ингибированию транс-

крипции большинства исследуемых генов (рис. 2). Уровень транскрипции повышался лишь в группах Notch-сигналинга и маркерах остеогенной дифференцировки. Через сутки уровень ингибирования транскрипции генов был более выражен в группе Notch-сигналинга и, напротив, возрастала экспрессия генов остеогенной дифференцировки. Одновременно возрастала экспрессия генов антиапоптоза, аутофагии и некроза. На вторые сутки культивирования уровень экспрессии многих генов выравнивался до контрольных значений. При этом оставались повышенными концентрации мРНК генов маркеров остеогенной дифференцировки, некроза, аутофагии и проапоптоза и

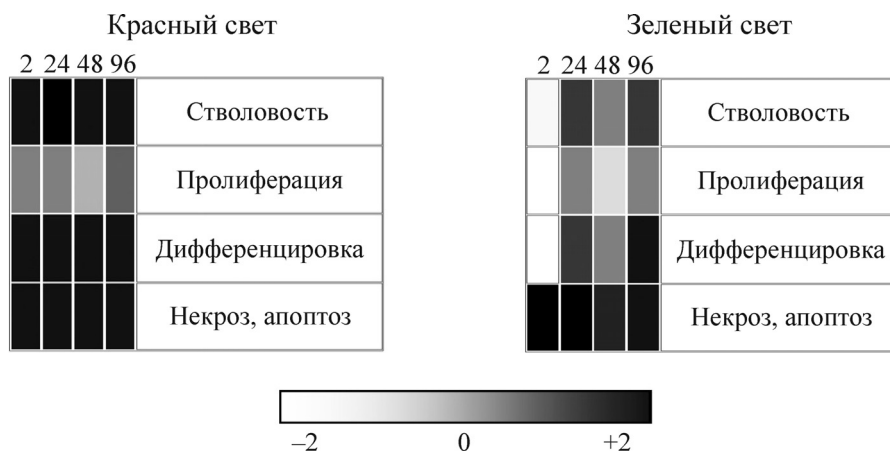


Рис. 3. Обобщенное изменение экспрессии генов в клетках MNNG/hos через два часа, сутки, двое и четверо суток после 25 мин облучения красным ($\lambda_{\text{max}} = 635$ нм) или зеленым ($\lambda_{\text{max}} = 520$ нм) светом светодиода в дозе $175,2$ мДж/см². Отклонения показаны в логарифмической шкале с основанием 2. На диаграммах: серый цвет – уровень экспрессии сравним с контролем, градации цвета от серого до белого отражают степень ингибирования экспрессии генов, градации от серого до черного цвета – уровень стимуляции относительно необлученного контроля.

активировалась транскрипция генов снижения стволовости и генов маркеров плюрипотентности. На четвертые сутки после облучения зеленым светом уровни транскрипции большинства генов выравнивались с контрольными значениями.

После облучения клеток линии MNNG/hos красным светом ко второму часу культивирования уровень экспрессии генов увеличивался в кластере регуляторов симметричности деления (DHH), Notch-сигналинга (JAG1 и NOTCH1), маркерах остеогенной дифференцировки и в особенности генов маркеров плюрипотентности и проапоптоза (CD40 и CFLAR) (рис. 3). У генов маркеров антиапоптоза (NOS2 и BCL2) повышенная транскрипционная активность сменялась снижением на первые и вторые сутки, с последующей волной приращения к четвертым суткам культивирования. Прирост уровня экспрессии генов сохранялся в процессе культивирования в кластерах регуляторов симметричности деления клеток, Notch-сигналинга, остеогенной дифференцировки, маркеров самообновления и маркеров раковых стволовых клеток. Во многих кластерах стимуляция экспрессии большого числа новых генов наблюдалась к четвертым суткам культивирования. Увеличивались концентрации мРНК семи генов остеогенной дифференцировки и восьми генов в группе регуляторов клеточного цикла. Активность группы генов маркеров миграции и метастазирования проявлялась только на четвертые сутки культивирования.

В культивируемых раковых клетках MNNG/hos после однократного облучения зе-

леным светом происходило угнетение транскрипционной активности большинства исследуемых генов через два часа после облучения (рис. 3). На этом фоне значительно увеличивалась экспрессия генов маркеров чекпойнтов, некроза и плюрипотентности, возрастал уровень экспрессии трех генов маркеров некроза, антиапоптоза и проапоптоза. В указанных группах генов и особенно маркеров некроза и проапоптоза высокий уровень экспрессии генов сохранялся вплоть до четырех суток культивирования. В остальных группах генов через одни и двое суток культивирования уровень транскрипции, как правило, не отличался от контрольных значений. К четвертым суткам культивирования лишь у 19 из 94 генов (помимо упомянутых маркеров некроза и проапоптоза) концентрации мРНК возрастали.

Таким образом, несмотря на отсутствие или слабые изменения скорости роста клеточных культур после однократного облучения низкоинтенсивным светом мы обнаружили значимые изменения экспрессию генов. Причем свет с одинаковой длиной волны по-разному влияет на транскрипционную активность различных типов клеток. Так, красный свет активировал процессы дифференцировки фетальных фибробластов человека, а зеленый свет ингибировал транскрипционную активность на ранних сроках культивирования, но в более поздние сроки увеличивал остеогенный потенциал клеток. В трансформированных клетках под воздействием красного света наблюдалась иная динамика транскрипции генов. На фоне активации остеогенеза значительно возрастала активность мар-

керо́в гибели клеток. Зеленый свет ингибировал транскрипционную активность большинства исследуемых генов, но стимулировал экспрессию маркеров гибели клеток и чекпойнтов; в результате этого в целом онкогенный потенциал раковой клеточной популяции снижался.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-44-03672р_центр_а) и частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №14-25-00055).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Myakishev-Rempel, I. Stadler, P. Brondon, et al., *Photomedicine and Laser Surgery* **30** (9), 551 (2012).
2. P. V. Peplow, T.Y. Chung, B. Ryan, et al., *Photomedicine and Laser Surgery* **29** (5), 285 (2011).
3. X. Gao, T. Chen, D. Xing, et al., *J. Cell. Physiol.* **206** (2), 441 (2006).
4. A. L. Pinheiro, N. S. Carneiro, A. L. Vieira, et al., *J. Clin. Laser Medicine & Surgery* **20** (1), 23 (2002).
5. J. L. F. De Castro, A. L. B. Pinheiro, C. E. Werneck, et al., *Photomedicine and Laser Surgery* **23** (6), 586 (2005).
6. P. V. Peplow, T. Y. Chung, and G. D. Baxter, *Photomedicine and Laser Surgery* **28** (Suppl. 1), S3 (2010).
7. J. F. Hou, H. Zhang, X. Yuan, et al., *Lasers in Surgery and Medicine* **40** (10), 726 (2008).
8. J. Saczko, J. Kulbacka, A. Chwilkowska, et al., *Folia Histochem. Cytobiol.* **43** (3), 129 (2005).
9. S. Verma, G. M. Watt, Z. Mai, et al., *Photochem. Photobiol.* **83** (5), 996 (2007).
10. R. J. Lanzafame, *Photomedicine and Laser Surgery* **29** (1), 3 (2011).
11. L. Santana-Blank, E. Rodriguez-Santana, and K. E. Santana Rodriguez, *Photomedicine and Laser Surgery* **30** (11), 615 (2012).
12. N. N. Houreld, S. M. Ayuk, and H. Abrahamse, *J. Photochem. Photobiol. B, Biology* **130**, 146 (2014).
13. A. Sturn, J. Quackenbush, and Z. Trajanoski, *Bioinformatics* **18** (1), 207 (2002).

Study of the Effects of Low Intensity Light Radiation in Red ($\lambda_{\max} = 635$ nm) and Green ($\lambda_{\max} = 520$ nm) Ranges on Proliferative Activity and Gene Expression Profiles of MNNG/hos and Fetal Human Fibroblasts Cell Lines

A.M. Ermakov*, A.S. Chernov*, R.A. Poltavtseva**, and I.I. Selezneva*

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Kulakov Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Akademika Oparina 4, Moscow, 117997 Russia*

It has been shown that a single exposure at low intensity (0.146 mW/cm²) with the red light ($\lambda_{\max} = 635$ nm) in a dose equal to 175.2 mJ/cm² resulted in a slight stimulation of the fetal human fibroblasts cell culture growth and there has been no change in the proliferative activity of cultured fibroblasts upon irradiation by green light ($\lambda_{\max} = 520$ nm) with the same dose. The growth pattern of the transformed cells from MNNG/hos cell line remained unchanged under selected exposure modes. Both exposure modes altered gene expression profile in proliferation and osteogenic differentiation of fibroblast culture. In the transformed cells from MNNG/hos cells red light irradiation contributed to stemness gene expression, gene expression during osteogenic differentiation and the expression of cell death markers. The green light increased the transcriptional activity around cell death markers and checkpoints.

Key words: low-intensity light radiation, fetal and transformed human cells, proliferative activity, gene expression