

СВЕТОДИОДНОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ КРАСНОГО И ЗЕЛЕННОГО ДИАПАЗОНОВ УВЕЛИЧИВАЕТ МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ И МОДУЛИРУЕТ РАБОТУ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА РАННИХ ЭМБРИОНОВ МЫШЕЙ

Чернов А.С.¹, Ковалицкая Ю.А.², Василов Р.Г.¹

¹ФГБУ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

пл. Академика Курчатова, 1, Москва, 123098, Россия; e-mail: alexandrchernov1984@gmail.com

²Филиал федерального государственного бюджетного учреждения науки института биоорганической химии

им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

пр. Науки, д. 6, Пущино, 142290, Россия

Поступила в редакцию: 01.07.2018

Аннотация. Измерен уровень митохондриального потенциала у доимплантационных эмбрионов мыши на стадии зиготы, 2-х, 4-х и 8-ми бластомеров. Показано, что под воздействием светодиодного зеленого ($\lambda_{\max} = 520$ нм) и красного ($\lambda_{\max} = 635$ нм) света в 2-х клеточных эмбрионах происходят изменения, сопровождающиеся ростом экспрессии генов пролиферации, репарации ДНК и антиапоптотических маркеров. Зеленый свет увеличивает жизнеспособность 2-клеточных эмбрионов и приводит к увеличению митохондриального потенциала.

Ключевые слова: доимплантационные эмбрионы, низкоинтенсивное световое излучение, биоэлектрические сигналы, митохондриальный потенциал, экспрессия генов.

ВВЕДЕНИЕ

В физиотерапии, относительно недавно, сформировалось новое направление фотохромотерапия - лечение светодиодным светом, принцип которого основан на использовании узкополосного низкоинтенсивного излучения различных диапазонов видимого спектра, при чем механизм действия и проявляющиеся эффекты, как, оказалось, были схожи с таковыми при облучении НИЛИ [1]. Большой потенциал и перспективность использования низкоинтенсивного светового излучения в регенеративной медицине были доказаны в программной работе Ф. Лин и соавт. [2]. В настоящее время, в большинстве работ воздействие света на живые объекты описано лишь феноменологически, и не показано за счет каких внутренних механизмов реализуется стимулирующее воздействие света. Пролиферативный эффект светового воздействия (красного и ИК-спектра) описан для разных типов клеток: фибробластов [3]; кератиноцитов [4]; остеобластов и остеобластоподобных клеток [5, 6]; лимфоцитов [7]; стволовых клеток мезенхимы и кардиомиоцитоподобных стволовых клеток [8]; Шванновских клеток [9]; гладкомышечных клеток аорты [10]; эндотелиальных клеток вен [11] и артерий [12]. Ранее нами было показано, что преобразованный красный свет с дополнительной оранжево-красной компонентой (620-750 нм) способен оказывать положительное действие на жизнеспособность и функциональное состояние ранних эмбрионов мыши [13]. При этом одним из возможных механизмов воздействия света рассматривалось формирование в среде сверхмалых доз АФК (перекиси водорода и гидроксил радикала) [14] и изменение работы генетического аппарата с увеличением экспрессии генов пролиферации [15].

Рядом авторов было установлено, что дыхательная цепь митохондрий в животных клетках может активироваться светом. Так, цитохром С-оксидаза поглощает свет в красной, инфракрасной и фиолетовой областях, НАДН-дегидрогеназа поглощает свет в синей области, а цитохромы b и c1 способны поглощать свет в зеленой области спектра [16-18]. Облучение светом с длинами волн 602 нм, 632,8 нм, 650 нм и 725 нм увеличивает синтез АТФ в изолированных митохондриях [19]. Освещение светом с длиной волны 633 нм увеличивает мембранный потенциал митохондрий и протонный градиент, вызывая изменение в оптических свойствах митохондрий, увеличивает скорость обмена АДФ/АТФ, повышает продукцию АФК и NO, а также инициирует работу внутриклеточных сигнальных каскадов, ответственных за клеточную пролиферацию и цитопротекцию [20-22].

В связи с вышеизложенным, ключом к пониманию наблюдаемых изменений жизнеспособности и пролиферативной активности клеток при облучении светом может быть изменение профиля экспрессии генов в ответ на световое воздействие [23, 24], которое в свою очередь обусловлено изменением функционального состояния митохондрий в клетке. Целью работы было исследовать воздействие светодиодного красного ($\lambda_{\max} = 635$ нм) и зеленого ($\lambda_{\max} = 520$ нм) излучения на изменение уровня митохондриального потенциала и экспрессию ряда специфических генов в 2-клеточных эмбрионах мыши.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 2-клеточные эмбрионы, выделенные из мышей линии BALB/c SPF-категории, полученных из биоресурсной коллекции «Питомник лабораторных животных», ФИБХ РАН. Эмбрионы выделяли по стандартной методике [25]. После облучения красным (диапазон излучения 600-650 нм, $\lambda_{\max} = 635$ нм) или зеленым (диапазон излучения 500-550 нм, $\lambda_{\max} = 520$ нм) светом в течение 15 минут (доза

облучения $175,2 \text{ мДж/см}^2$) эмбрионы переносили в среду M16 (Sigma) и культивировали в течение 24 часов в стандартных условиях. Эмбрионы контрольной группы облучению не подвергались. Регистрацию митохондриального потенциала проводили с использованием флуоресцентного красителя Mitotraker Red CMXRos (MtR) (Thermo Fisher Scientific) через 2, 4, 8 и 24 ч после облучения. Электронные микрофотографии обрабатывали в программе ImageJ. Для всех изображений измеряли интегрированную плотность D (общую флуоресценцию, испускаемую от митохондрий, окрашенных MtR, выраженную в условных единицах) по формуле (1):

$$D = \sum_i^m \frac{P_i}{k}, \quad (1)$$

где m – общее число пикселей на микрофотографии для одного эмбриона; P_i – интенсивность свечения пикселей по шкале серой градации (от 0 до 255) за вычетом фона; k – коэффициент пересчета (1000) [26].

Определение уровня экспрессии генов проводили методом ПЦР-РТ. мРНК из эмбрионов выделяли через 2, 4, 8 и 24 ч после облучения используя готовые наборы реагентов фирмы «Силекс» (Россия). Определяли уровень экспрессии генов пролиферации (SOX2 - маркер плюрипотентности; регуляторов клеточного цикла (CCND1 и CDK2), репарации ДНК (GADD45A - блокатор развития и маркер повреждения ДНК; RAD52 – репарация поврежденной ДНК; ZSCAN4 - регулятор стабильности генома) и апоптотических маркеров (BCL2 - ингибитор апоптоза, CASP2 - активатор апоптоза, FLASLG - индукция апоптоза через взаимодействие с TNF), характерных для доимплантационных эмбрионов. Уровень транскрипции генов нормировали по среднему уровню экспрессии хаус-кипинг-генов β -актина и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Полученные данные по экспрессии генов анализировали с помощью программы «ExpressionSuite 1.1.». Учитывались лишь те результаты, для которых изменения уровня экспрессии генов наблюдали при $p < 0,05$. Полученные данные обрабатывали статистически с помощью SigmaPlot методом дисперсионного анализа ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Используя флуоресцентный краситель Mitotraker Red, были определены базовые значения интегрированной плотности MtR (митохондриального потенциала) для зигот 752 ± 24 ($N = 36$), для 2-клеточных 805 ± 19 ($N = 40$), для 4-клеточных 713 ± 31 ($N = 33$) и для 8-клеточных эмбрионов 840 ± 22 ($N = 35$). В результате первого деления-дробления и при переходе к многоклеточности происходит увеличение митохондриального потенциала. Учитывая тот факт, что в результате дроблений пул митохондрий в каждом бластомере уменьшается с каждым клеточным делением вдвое [27, 28], мы должны были наблюдать пропорциональное снижение и уровня общей флуоресценции, однако этого не происходило. Возможно, подобный эффект обусловлен значительным увеличением дыхательной активности имеющихся митохондрий в 2- и 8-клеточных эмбрионах.

После облучения 2-клеточных эмбрионов ($N = 40$) красным светом (рис. 1) значение уровня митохондриального потенциала оставалось неизменным на протяжении 24 часов (771 ± 30) и было сопоставимо со значениями в контрольной группе (711 ± 86). Облучение 2-клеточных эмбрионов ($N = 40$) зеленым светом (рис. 1) приводило к достоверному увеличению интегрированной плотности свечения флуоресцентного красителя (митохондриального потенциала). Спустя 24 часа после облучения уровень достиг 896 ± 59 , что было достоверно выше контрольных значений (711 ± 86) и значений в группе красного света (771 ± 30).

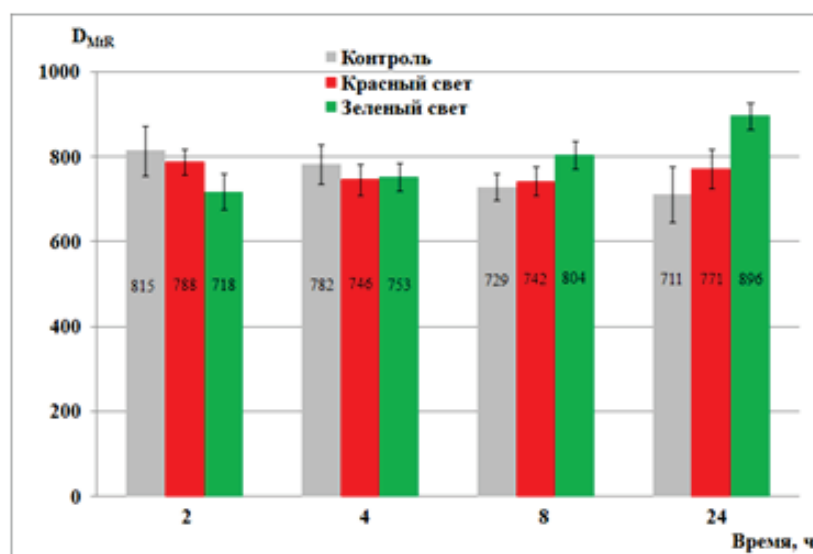


Рисунок 1. Изменение уровня митохондриального потенциала у 2-клеточных эмбрионов после облучения видимым светом

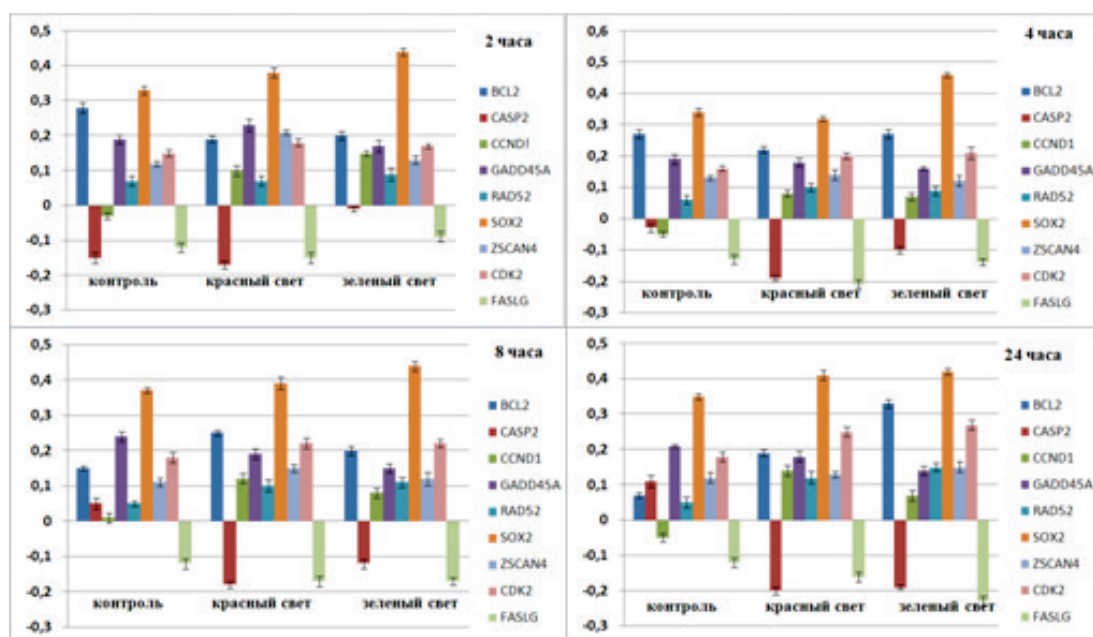


Рисунок 2. Уровень экспрессии генов в 2-клеточных эмбрионах мыши после облучения видимым светом

Анализ данных экспрессии основных генов показал, что по сравнению с эмбрионами контрольной группы, у эмбрионов, облученных красным и зеленым светом, через 8 часов (рис. 2) наблюдали рост экспрессии гена BCL2 (на 32 % для красного и на 65 % для зеленого), а у группы «Зеленый свет» рост продолжался вплоть до 24 часов (рис. 2). При этом в обеих опытных группах наблюдали снижение уровня экспрессии CASP2 (на 17 % для красного и на 90 % для зеленого). В контрольной группе наоборот, происходило значительное падение уровня экспрессии BCL2 и рост CASP2. BCL2 регулирует клеточную смерть путем контроля проницаемость митохондриальной мембраны. Ингибирует каспазы за счёт предотвращения выхода цитохрома С из митохондрий и/или за счёт связывания фактора, активирующего апоптоз. CASP2 кодирует белок, который активирует апоптоз и влияет на клеточный цикл. Из полученных результатов хорошо видно, что высокий процент гибели эмбрионов в контрольной группе связан с увеличением экспрессии CASP2 и подавлением экспрессии BCL2. При этом задействованные в механизме апоптоза митохондрии имеют тенденцию к снижению митохондриального потенциала (рис. 1), связанного с образованием на их мембране пор. Значение митохондриального потенциала может быть использовано, как прямой показатель жизнеспособности эмбриона при культивировании в условиях *in vitro*.

В течение 24 часов после облучения в опытных группах наблюдали также рост экспрессии RAD52 (на 90 % для красного и на 17 % для зеленого), отвечающей за репарацию поврежденной ДНК путем восстановления двунитевых разрывов ДНК за счет гомологичной рекомбинации. Как известно, повреждение ДНК может привести к возникновению мутаций, которые передадутся последующим поколениям клеток, и некоторые из таких мутаций могут обладать онкогенным потенциалом. Повреждение ДНК может также привести к запуску апоптозу [29]. В нашем случае, развивающиеся эмбрионы после облучения красным и зеленым светом меньше накапливают поврежденных ДНК, и имеют более высокий качественный генетический статус.

В результате воздействия на 2-клеточные эмбрионы зеленого света наблюдали падение экспрессии гена CCND1 на 46%, регулирующего клеточный цикл. В то время, как в группе контроля и красного света этот показатель оставался неизменным. Как показано [30], гиперэкспрессия белка и ген CCND1 рассматривают в качестве онкогена, приводящего к снятию ограничения по количеству делений у клеток и их перехода в онкогенную форму. Т.е. воздействие зеленого света на клетку способно предотвращать клеточное перерождение в онкогенные формы. Схожий эффект мы наблюдали при облучении зеленым светом раковых клеток MNNG, когда под действием света снижалась их туморогенность [15].

Еще одним основным отличием эмбрионов контрольной группы по сравнению с эмбрионами, подвергшимся облучению красным и зеленым светом, было увеличение уровня экспрессии гена SOX2, который характеризует плюрипотентное состояние эмбрионов. SOX2 управляет превращением стволовых клеток в самые разные клетки организма, от мышечных до нервных. Значимые изменения уровень экспрессии гена ZSCAN4 были обнаружены только для группы эмбрионов после воздействия красного света спустя 24 часа культивирования (рис. 2). ZSCAN4 является блокатором развития и маркером повреждения ДНК. Объяснить подобный эффект не удалось, поскольку по морфологическим показателям и значению митохондриального потенциала эмбрионы были хорошего качества. Уровень экспрессии GAD45A не изменялся во всех группах на протяжении всего времени эксперимента.

Подводя итог, можно говорить о том, что поглощение света различной длины волны, приводит к существенным изменениям в работе митохондрий. Это сопровождается каскадом вторичных реакции (рис. 3)

как в цитоплазме и ядре, так и в мембране [31], и в конечном итоге активирует транскрипционные факторы, которые приводят к росту пролиферативного потенциала клеток, увеличению подвижности и активности, синтезу ростовых факторов.

В заключении, можно говорить о том, что красный свет в диапазоне 600-650 нм и зеленый свет в диапазоне 500-550 нм способны регулировать развитие 2-клеточных эмбрионов мыши через активацию экспрессии основных генов развития, при чем зеленый свет дополнительно управляет развитием через митохондриальный потенциал, предположительно за счет активации работы комплекса III митохондрий [17].

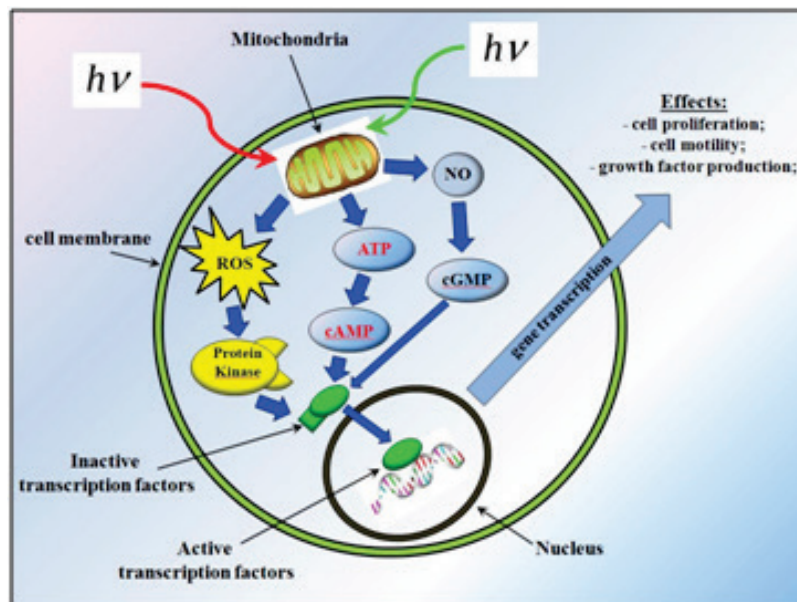


Рисунок 3. Механизм воздействия светодиодного излучения на функциональное состояние доимплантационного эмбриона мыши

Список литературы / References:

1. Karu T.I. Stimulation of Metabolic Processes by Low-Intensity Visible Light. *Laser Applications in Medicine, Biology, and Environmental Science*, 2003, vol. 5149, pp. 60-66.
2. Lin F., Josephs S.F., Alexandrescu D.T., Ramos F., Bogin V., Gammill V., Dasanu C.A., De Necochea-Campion R., Patel A.N., Carrier E., Koos D.R. Lasers, stem cells and COPD. *J. Translat. Med.*, 2010, vol. 8, pp. 16-25.
3. Sheiko E.A., Shikhlyarova A.I., Zlatnik E.Yu., Zakora G.I. Effect of monochromatic light of low intensity on L929 skin fibroblast culture. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2006, vol. 141, no. 6, pp. 738-740.
4. Grossman N, Schneid N, Reuveni H, Halevy S, Lubart R. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. *Lasers Surg Med*, 1998, vol. 22, no. 4, pp. 212-8.
5. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg.*, 2005 vol. 2, pp. 161-166.
6. Fujihara N.A., Hiraki K.R., Marques M.M. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med.*, 2006, vol. 38, no. 4, pp. 332-6.
7. Stadler I., Evans R., Kolb B., Naim J.O., Narayan V., Buehner N., Lanzafame R.J. In vitro effects of low-level laser irradiation at 660 nm on peripheral blood lymphocytes. *Lasers Surg Med.*, 2000, vol. 27, no. 3, pp. 255-61.
8. Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg Med.*, 2007, vol. 39, no. 4, pp. 373-8.
9. Van Breugel HH, Bär PR. He-Ne laser irradiation affects proliferation of cultured rat Schwann cells in a dose-dependent manner. *J Neurocytol.*, 1993, vol. 22, no. 3, pp. 185-90.
10. Gavish L., Perez L., Gertz S.D. Low-level laser irradiation modulates matrix metalloproteinase activity and gene expression in porcine aortic smooth muscle cells. *Lasers Surg Med.*, 2006, vol. 38, no. 8, pp.779-86.
11. Schindl A., Merwald H., Schindl L., Kaun C., Wojta J. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *Br J Dermatol*, 2003, vol. 148, no. 2, pp. 334-6.
12. Mirsky N., Krispel Y., Shoshany Y., Maltz L., Oron U. Promotion of angiogenesis by low energy laser irradiation. *Antioxid Redox Signal*, 2002, vol. 4, no. 5, pp. 785-90.

13. Chernov A.S., Reshetnikov D.A., Fakhranyrova L.I., Manokhin A.A., Davydova G.A., Selezneva I.I., Khramov R.N. Stimulation of development of early mice embryos by the artificial sunlight supplemented with fluorescent orange-red component. *Medline.ru.*, 2013, vol.14, no. 2, pp. 295-312.
14. Chernov A.S., Reshetnikov D.A., Manokhin A.A., Gudkov S.V., Khramov R.N. Influence of the artificial transformed sunlight on the preimplantation mouse embryos development in vitro. *Vestnik biotekhnologii i phisiko-khimicheskoi biologii im. Yu.A. Ovchinnikova.*, 2017, vol. 13, no. 1, pp. 42-49.
15. Ermakov A.M., Chernov A.S., Selezneva I.I., Poltavtseva R.A. A study of the impacts of low-intensity light irradiation in the red ($\lambda_{\max} = 635$ nm) and green ($\lambda_{\max} = 520$ nm) ranges on the proliferative activity and gene expression profiles of MNNG/hos cells and human fetal fibroblasts. *Biophysics*, 2017, vol. 62. no. 1, pp. 63-67.
16. Karu T.I. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J. Photochem Photobiol B.*, 1999, vol. 49, no. 1, pp. 1-17.
17. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. *Biochemistry. 5th edition. Section 18.5.* New York, 2002, 321 p.
18. Buravlev E.A., Zhidkova T.V., Vladimirov Y.A., Osipov A.N. *Lasers Med Sci.*, 2014, vol. 28, no. 3, pp. 785-790.
19. Passarella S., Casamassima F., Molinari S. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by He-Ne-laser. *FEBS Lett.*, 1994, vol. 175, pp. 95-99.
20. Karu T.I. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochem. Photobiol.*, 2008, no. 84, pp. 1091-1099.
21. Lavi R., Shainberg A., Friedmann H. Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, no. 42, pp. 40917-40922.
22. Passarella S., Perlino E., Quagliariello E. Evidence of changes induced by He-Ne-laser irradiation in the biochemical properties of rat liver mitochondria. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1993, no. 10, pp. 185-198.
23. Chen A.CH., Hamblin M. [et al.] Low-level laser therapy: an emerging clinical paradigm. *SPIE Newsroom*, 2009, no. 9, pp.1-3.
24. Houreld N.N. Shedding light on a new treatment for diabetic wound healing: a review on phototherapy. *ScientificWorldJournal*, 2014, vol. 2014: p398412, DOI: 10.1155/2014/398412.
25. Chernov A.S., Davidova G.A., Kovalitskaya Y.A. Investigation of beta-endorphin reception in preimplantation development of a mouse embryo in vitro. *Rus. J. of bioorganic chemistry*, 2012, vol. 38, no. 2, pp. 177-183.
26. Romek M., Gajda B., Krzysztofowicz E., Kucia M., Uzarowska A. *Theriogenology*, 2017, no. 102, pp. 1-9.
27. Chen H., Detmer S.A., Ewald A.J., Griffin E.E., Fraser S.E., Chan D.C. *J. Cell Biol.*, 2003, no. 160, pp. 189-200.
28. Roos W.P., Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med.*, 2006, vol. 12, no. 9, pp. 440-50.
29. Poot M., Gibson L.L., Singer V.L. Detection of Apoptosis in Live Cells by MitoTrackery Red CMXRos and SYTO Dye Flow Cytometry. *Cytometry*, 1997, no. 27, pp. 358-364.
30. Mazyrenko N.N. Gene Genetic features and markers of a melanoma of skin. *Yspechi molekylarnoi onkologii*, 2014, vol. 2, pp. 26-35.
31. Chernov A.S., Teplov I.U., Vasilov R.G. Role of the transmembrane potential in preimplantation mammalian embryos. *Actual'nye voprosy biologicheskoi phisiki i khimii*, 2017, vol.2, no. 1, pp. 96-99.

RED AND GREEN RANGE OF LED IRRADIATION OF INFLUENCE ON MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL AND WORK OF GENETIC APPARATUS IN EARLY MICE EMBRYOS**Chernov A.S.¹, Kovalitskaya Yu.A.², Vasilov R.G.¹**¹National Research Center «Kurchatov Institute»,*Ac. Kurchatov sq., 1, Moscow, 123098, Russia; e-mail: alexandrchernov1984@gmail.com*²Branch of Shemyakin and Ovchinnikov institute of bioorganic chemistry RAS*Nauki dis., 6, Pushchino, 142290, Russia*

Abstract. Level of mitochondrial potential for the preimplantation mice embryos at a zygote stage, the 2-cell, the 4-cell and 8-cell was established. Our data indicate that the green light increase viability of 2-cell embryos and contributed to increase of mitochondrial potential. Under the influence of green ($\lambda_{\max} = 520\text{nm}$) and red ($\lambda_{\max} = 635\text{nm}$) light from light-emitting diodes contributed to increase of an expression of genes of a proliferation, reparation of DNA and anti-apoptotic markers in 2-cell mice embryos.

Key words: *pre-implantation embryos, low-intensity light radiation, bioelectric signals, mitochondrial potential, gene expression.*