

ФОТОМОДУЛЯЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ НИЗКОДОЗОВЫМ СВЕТОМ СИНЕГО ДИАПАЗОНАЗак П.П.¹, Донцов А.Е.¹, Сержникова Н.Б.^{1,2}, Погодина Л.С.², Трофимова Н.Н.¹, Гурьева Т.С.³¹ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119991, РФ

²ФГБОУМГУ им. М.В. Ломоносова

Ленинские горы, 1, г. Москва, 119234, РФ

³ФГБУН ГНЦ Институт медико-биологических проблем РАН.

Хорошевское шоссе, 76А, г. Москва, 123007, РФ

e-mail: pavelzak@mail.ru

Аннотация. Изучено действие низкодозового светодиодного облучения синим светом (450-460 нм, 0,01-1 Дж/см²) на клетки ретиального пигментного эпителия (РПЭ) японского перепела *Coturnix japonica*. С помощью биохимических методов исследования показано, что такое облучение приводит к возрастанию митохондриального мембранного потенциала клеток РПЭ, а также вызывает повышение их метаболической и антиоксидантной активности. В дополнение к этому, методами электронной микроскопии и морфометрического анализа выявлено увеличение численности и удельного объема митохондрий в клетках РПЭ в ответ на синее освещение. В целом, полученные данные свидетельствуют об активирующем действии низкодозового синего света на жизнедеятельность клеток РПЭ (прежде всего на их митохондриальную активность) и открывают перспективы использования слабого синего света как фотомодулятора клеточных процессов в терапевтической офтальмологической практике.

Ключевые слова: синий свет, ретиальный пигментный эпителий, митохондрии, метаболическая активность, антиоксидантная активность, электронная микроскопия.

PHOTOMODULATION EFFECT OF LOW-DOSE BLUE LIGHT ON MITOCHONDRIAL ACTIVITY OF RETINAL PIGMENT EPITHELIUMZak P.P.¹, Dontsov A.E.¹, Sereznikova N.B.^{1,2}, Pogodina L.S.², Trofimova N.N.¹, Gurieva T.S.³¹N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS

Kosygina St., 4, Moscow, 119991, Russia

²Moscow State University,

Leninskiye Gory, 1, Moscow, 119234, Russia

³Institute of Medical and Biological Problems RAS

Khoroshevskoye highway, 76A, Moscow, 123007, Russia

e-mail: pavelzak@mail.ru

Abstract. We investigated the effect of low-dose blue LED irradiation (450-460 nm, 0.01-1 J / cm²) on the retinal pigment epithelium (RPE) cells of Japanese quail *Coturnix japonica*. In biochemical experiments it was shown that such light exposure promoted mitochondrial activity of RPE cells as well as increased their overall metabolic and antioxidant activity. In addition, electron microscopy and morphometric analysis revealed the increase in the number and the specific volume of RPE mitochondria in response to the blue light. So, our data indicate that low-dose blue light has activation effect on the RPE metabolism (especially on their mitochondrial activity) and open prospects for the future use of weak blue light for photomodulation of cellular processes in therapeutic ophthalmology.

Key words: blue light, retinal pigment epithelium, mitochondria, metabolic activity, antioxidant activity, electron microscopy

Видимый свет является действенным физическим и физиологическим фактором, оказывающим значительное влияние на жизнедеятельность различных клеток. Интенсивное облучение светом обычно приводит к повреждению структуры и утрате функций, тогда как слабое освещение может оказывать благоприятное воздействие [1]. Так, в настоящее время в офтальмологии успешно используется облучение низкодозовым красным светом (630 нм), оказывающее положительное активирующее действие на клетки при восстановительной постоперационной терапии [2]. Согласно данным литературы [3,4], универсальный механизм фотостимуляции связан с фотоактивацией ферментов дыхательной цепи митохондрий (прежде всего, цитохром-с-оксидазы), что приводит к интенсификации окислительного метаболизма. Поскольку цитохром-с-оксидаза поглощает свет и в синей области, этот спектральный диапазон также может обладать фотомодуляционным эффектом. Однако возможности использования слабого синего освещения в качестве терапевтического инструмента при ретиальных патологиях оказались вне поля зрения офтальмологии из-за повышенной фототоксичности синего светового диапазона. Известно, что пороговые дозы фотоповреждения сетчатки синим светом в 50–100 раз выше, чем для света длинноволнового диапазона [5]. В высоких дозах (≥ 10 Дж/см²) синий свет оказывает выраженное повреждающее действие на сетчатку и РПЭ, реализуемое через фототоксичные липофусциновые гранулы [6] и повреждение митохондрий [7]. Вместе с тем, как показано для целого ряда клеточных объектов (не глазных), в низких дозах синее освещение может вызывать активацию ферментов дыхательной цепи митохондрий [1,3,8]. При этом подобных исследований офтальмологической направленности проведено не было: на настоящий момент в литературе отсутствуют какие-либо работы,

связанные с изучением возможного терпевтического действия слабого синего света на ретиальные обменные процессы. В этой связи нами исследовано влияние низкодозового синего облучения на РПЭ японского перепела *Coturnix japonica*. РПЭ является наиболее значимой структурой в поддержании гомеостаза сетчатки [9], а японский перепел служит одной из популярных моделей при изучении ретиального клеточного метаболизма [10].

В биохимических исследованиях использовали суспензию клеток РПЭ японского перепела *C. japonica*. Микроскопический контроль показал, что такой гомогенат содержал только взвесь небольших кластеров из 5-10 свободноплавающих клеток РПЭ с характерной бахромой меланиновых апикальных отростков в сочетании с субмикроскопической взвесью одиночных меланиновых гранул. Образцы клеток РПЭ инкубировали в буферном растворе Хэнкса (HBSS “Sigma”), дополненным 10%-ной фетальной сывороткой теленка (“Sigma”). Световое облучение гомогената (синий светодиод 450-460 нм) производили при постоянном перемешивании при температуре 37° с временами экспозиции 4-50 мин при дозах облучения от 0,1 до 1 Дж/см². Контрольными образцами служили пробы, содержащиеся в темноте. Митохондриальный мембранный потенциал суспензии клеток РПЭ оценивали с помощью флуоресцентного специфического митохондриального потенциал-чувствительного красителя TMRE (50-300 нМ) с измерением величины флуоресценции при длине волны 575-585 нм согласно описанной методике [11]. Митохондриальную специфику накопления TMRE контролировали с использованием разобщителя окислительного фосфорилирования FCCP (20 мкМ). Метаболическая активность клеток РПЭ была количественно определена при помощи прижизненного красителя ресазурина (50 мкМ) по стандартной методике [12]. Оценку восстановления ресазурина производили по росту интенсивности флуоресценции при длине волны возбуждения 560 нм и эмиссионном максимуме 590 нм. Антиоксидантную активность суспензии клеток РПЭ измеряли при помощи хемилуминесцентной модельной системы окисления, состоящей из гемоглобина, пероксида водорода и люминола [13].

Методом трансмиссионной электронной микроскопии (JEM-1011, JEOL Ltd., Япония) [10] проведена оценка состояния митохондрий в клетках РПЭ при низкодозовом синем облучении (450-460нм, 1 Дж/см²). Было использовано 12-ти минутное синее облучение одного из глаз экспериментальных животных; контролем служили величины, полученные на парном необлученном глазу. Количественную морфометрию осуществляли на оцифрованных электронограммах с использованием программного обеспечения Adobe Photoshop CS4, на которых в пределах квадратной тестовой решетки (площадью 64 мкм²) определяли численную плотность и удельный объём митохондрий. Для измерений были использованы глаза трех птиц, от каждой птицы было исследовано не менее 25 клеток РПЭ разных участков макулярной зоны. Статистический анализ данных проводили в программе Statistical10 с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни, различия признавали значимыми при $p < 0.05$.

В работе были получены следующие результаты.

Митохондриальный мембранный потенциал. На рисунке 1 показано увеличение интенсивности флуоресценции в клетках РПЭ при облучении синим светом, более значительное в клетках, облученных в дозе 0.1 Дж/см². Полученные данные свидетельствуют о том, что низкодозовое синее облучение клеток РПЭ приводит к значительному повышению митохондриального захвата красителя, т.е. к повышению метаболической активности митохондриального аппарата. Одним из вероятных механизмов этого активирующего действия низкодозового синего света может быть, известная для других систем, активация митохондриальной цепи переноса электронов на уровне цитохром с оксидазы, содержащей хромофор в синей области видимого спектра [3,4].

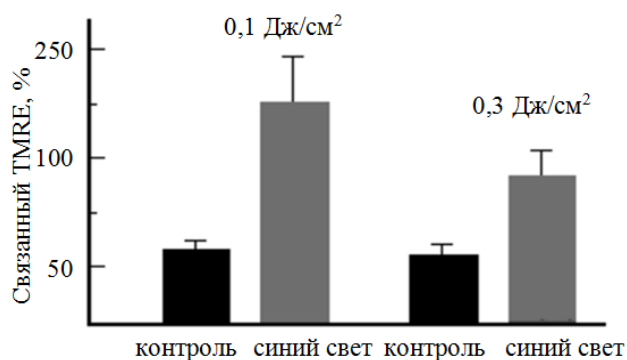


Рисунок 1 – Аккумуляция митохондриального катионного красителя TMRE клетками РПЭ глаза перепела при облучении синим светом в низких дозах

Общая метаболическая активность клеток РПЭ. Из рисунка 2 видно, что синее облучение в дозах 0.3 Дж/см² приводит к небольшому усилению процесса восстановления ресазурина по сравнению с контролем через 6 ч инкубации. Доза облучения в 1 Дж/см² давала значительно больший эффект стимуляции. Похожий результат был получен и в экспериментах, в которых инкубация клеток с ресазурином после облучения проводилась в течение двух и четырех часов. Ни в одном из экспериментов не было зарегистрировано уменьшения интенсивности процесса восстановления ресазурина после облучения клеток РПЭ синим светом.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в использованных дозах синее облучение повышало метаболическую активность клеток РПЭ.

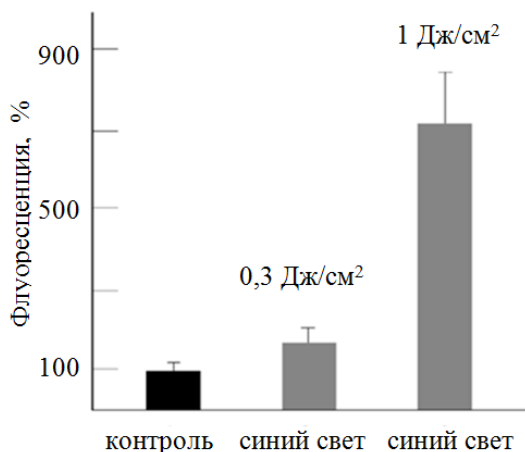


Рисунок 2 – Восстановление ресазурина клетками РПЭ после их облучения синим светом в дозах 0,3 Дж/см² и 1 Дж/см² (после 6-часовой инкубации)

Антиоксидантная активность клеток РПЭ. Антиоксидантная активность в хемилюминесцентной системе, содержащей люминол и пероксид водорода, характеризуется степенью уменьшения интенсивности свечения ($I_0/I - 1$) при добавлении в систему определенного количества суспензии клеток. Рисунок 3 демонстрирует достоверное увеличение антиоксидантной активности суспензии клеток РПЭ перепела после их облучения синим светом в дозе 1 Дж/см² по сравнению с суспензией клеток, находившихся в темноте. Усиление метаболизма клеток РПЭ может объяснить наблюдаемое нами повышение антиоксидантной активности этих клеток, облученных синим светом. Известно, что облучение РПЭ в относительно небольших дозах (3 Дж/см²) приводит к усилению продукции активных форм кислорода [14], что в свою очередь активирует системы антиоксидантной защиты [15], чему способствует повышение метаболической активности клеток в ответ на облучение. Такой эффект объясняет обнаруженный нами факт повышения антиоксидантной активности клеток РПЭ в ответ на облучение синим светом.

1

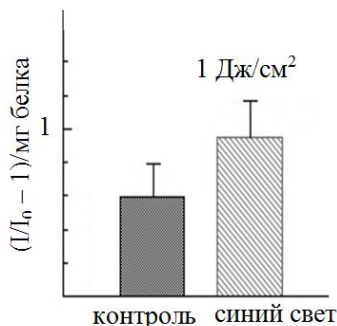


Рисунок 3 – Антиоксидантная активность клеток РПЭ после их облучения синим светом

Морфологические изменения митохондрий РПЭ. Согласно нашим данным (см. рис. 4), однократное кратковременное облучение глаз животных синим светом с энергией 1 Дж/см² приводило к небольшому (15-30 %), но достоверному увеличению численности и удельного объема всех митохондрий. Такой рост возможно был вызван делением митохондрий. В литературе также есть данные о повышении (на 20 %) численности митохондрий после низкодозового облучения светом красного диапазона [4].

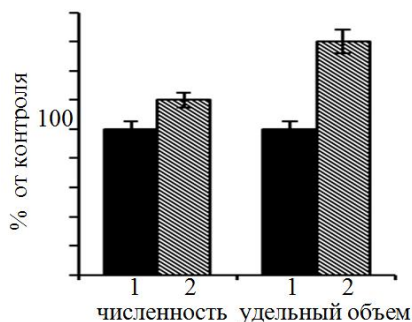


Рисунок 4 – Изменения в содержании митохондрий РПЭ при низкодозовом синем облучении. 1 – контроль, 2 – синий свет

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что облучение синим светом 450 нм в дозах менее 1 Дж/см² оказывает благотворное воздействие на метаболизм клеток РПЭ, усиливая их метаболическую и антиоксидантную активность, повышая содержание митохондрий и их мембранный потенциал.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 15-29-03865.

Список литературы / References :

1. Векшин Н.Л. Светозависимое фосфорилирование в митохондриях. *Молекулярная биология*, 1991, т. 25, № 1, с. 54-59. [Vekshin N.L. Light-dependent phosphorylation in the mitochondria. *Molecular biology*, 1991, vol. 25, no. 1, pp. 54-59. (In Russ.)]
2. Кораев С.Ю. Клинико-экспериментальное обоснование комбинированного использования неодимового ИАГ 1,44 мкм и гелий-неонового 0,63 мкм лазеров в хирургии катаракты. Дисс. ... д-ра наук. Москва, 2014. [Кораев С.Ю. *Clinical and experimental study of the combined use of a neodymium YAG of 1.44 microns and a helium-neon 0,63 μm lasers in cataract surgery*. Doctoral thesis. Moscow. 2014. (In Russ.)]
3. Кару Т.И. Универсальный клеточный механизм лазерной биостимуляции: фотоактивация фермента дыхательной цепи цитохром-с-оксидазы. *Современные лазерно-информационные и лазерные технологии: сб. трудов ИПЛИТ РАН*. М: Интерконтакт Наука, 2005, с. 131-143. [Karu T.Y. Universal cellular mechanism of laser biostimulation: photoactivation of the respiratory chain enzyme cytochrome c oxidase. *Modern laser-information and laser technologies: collected works of IPLIT RAN*. М: Interkontakt Nauka, 2005, pp. 131-143. (In Russ.)]
4. Passarella S., Karu T. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. *Photochem. Photobiol.*, 2014, vol. 140, pp. 344-358.
5. Van Norren D., Gorgels T.G. The action spectrum of photochemical to the retina: a review of monochromatical threshold data. *Photochem. Photobiol.*, 2011, vol. 87, pp. 747-753.
6. Boulton M., Dontsov A., Ostrovsky M., Jarvis-Evans J., Svistunencko D. Lipofuscin is a photoinducible free radical generator. *Photochem. Photobiol.*, 1993, vol. 19, pp. 201-204.
7. Cai S.J., Yan M., Mao Y.Q., Zhou Y. [et al.] Relationship between blue light-induced apoptosis and mitochondrial membrane potential and cytochrome C in cultured human retinal pigment epithelium cells. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.*, 2006, vol. 42, no. 12, pp. 1095-1102.
8. Buravlev E.A., Zhidkova T.V., Osipov A.N., Vladimirov Y.A. Are the mitochondrial respiratory complexes blocked by NO the targets for the laser and LED therapy? *Lasers Med. Sci.* 2015, vol. 30, no. 1, pp. 173-180.
9. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.*, 2005, vol. 85, pp. 845-881.
10. Зак П.П., Сережникова Н.Б., Погодина Л.С., Трофимова Н.Н., Гурьева Т.С., Дадашева О.А. Фотоиндуцированные изменения субклеточных структур ретинального пигментного эпителия перепела Coturnix japonica. *Биохимия*, 2015, т. 80, № 6, с. 931-936. [Zak P.P., Serezhnikova N.B., Pogodina L.S., Trofimova N.N., Gur'eva T.S., Dadasheva O.A. Photoinduced changes in subcellular structures of the retinal pigment epithelium from the Japanese quail Coturnix japonica. *Biochemistry (Mosc)*, 2015, vol. 80, no. 6, pp. 931-936. (In Russ.)]
11. Gan Z., Audi S.H., Bongar R.D., Gauthier K.M., Merker M.P. Quantifying mitochondrial and plasma membrane potentials in intact pulmonary arterial endothelial cells based on extracellular deposition of rhodamine dyes. *Am. J. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2011, vol. 300, pp. 762-772.
12. Gonzalez R.J., Tarloff J.B. Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicol. In Vitro*, 2001, vol. 15, pp. 257-259.
13. Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любицкий О.Б., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. Измерение антиоксидантной активности сыворотки крови с помощью системы гемоглобин-пероксид водорода-люминол. *Вопросы Мед. Химии*, 1998, т. 44, с. 70-76. [Teselkin Y.O., Babenkova I.V., Lyubitsky O.B., Klebanov G.I., Vladimirov Y.A. Measurement of antioxidant activity of blood serum using the hemoglobin-hydrogen peroxide-luminol system. *Voprosy Med. Chemistry*, 1998, vol. 44, pp. 70-76. (In Russ.)]
14. Roehlecke C., Schaller A., Knels L., Funk R.H.W. The influence of sublethal blue light exposure on human RPE cells. *Molecular Vision*, 2009, vol. 15, pp. 1929-1938.
15. Roehlecke C., Schumann U., Ader M., Brunssen C., Bramke S., Morawietz H., Funk R.H.W. Stress reaction in outer segments of photoreceptors after blue light irradiation. *PLOS ONE*, 2013, vol. 8, pp. 1-12.