

УДК 577.344.2

ВЛИЯНИЕ КРАСНОГО СВЕТА НА СКОРОСТЬ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЛАНАРИЙ

Ермаков А.М.¹, Ермакова О.Н.¹, Манохин А.А.², Никитина Е.В.¹, Храмов Р.Н.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино,

Институтская 3, РФ

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт

биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, Институтская 3, РФ

e-mail: ao_ermakovu@rambler.ru

Резюме

Показано, что монохроматичный красный свет светодиодной матрицы ($\lambda_{\text{макс}}=635$ нм) при однократном облучении планарий способен, в зависимости от дозы, в разной степени увеличивать скорость роста головной бластемы планарий. Максимальная стимуляция регенерации обнаружена при дозах 197,1 – 219 мДж/см². При увеличении или уменьшении дозы светового воздействия величина эффекта уменьшается, вплоть до его полного отсутствия. Изменение интервала времени облучения – до или после декапитации планарий может вызывать инверсию эффекта. Вместо стимуляции происходит ингибирование этого роста бластемы. Облучение планарий широкополосным красным светом (600 – 750 нм) не влияло на скорость регенерации головы планарий.

Ключевые слова: низкоинтенсивное световое излучение, красный свет, светоизлучающий диод, планарии, регенерация.

INFLUENCE OF RED LIGHT ON THE REGENERATION RATE OF PLANARIANS

Ermakov A.M.¹, Ermakova O.N.¹, Manokhin A.A.², Nikitina E.V.¹, Khramov R.N.¹

¹*Federal State Budget Organization of Science, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, 142290, Pushchino, Russia, Institutskaya 3*

²*Federal State Budget Organization of Science, Institute of Cell Biophysics RAS, 142290, Pushchino, Russia, Institutskaya 3*

Abstract

It has been shown that a single irradiation of planarians by monochromatic red light from the LED array ($\lambda_{\text{max}} = 635 \text{ nm}$) in varying degrees increases the rate of growth of the head blastema of planarians, depending on the radiation dose. Maximum stimulation of regeneration observed at doses of 197.1 - 219 mJ / cm². By increasing or decreasing the dose of light exposure the effect size decreases, up to its total absence. After changing the exposure time interval - before or after decapitation of planarians observed inversion of light effect. Instead of the stimulation we observed an inhibition of blastema growth. Broadband red light irradiation (600 - 750 nm) had no effect on the rate of planarian head regeneration.

Keywords: low-intensity light irradiation, red light, LED, planarian, regeneration.

Введение.

В последнее десятилетие в физиотерапии сформировалось новое направление – фототерапия (или фотодиамическая терапия), которое основано на применении световых излучений разных цветов. Наиболее значимые биологические эффекты обнаружены в случае воздействия светового излучения красного и инфракрасного спектрального диапазона (Myakishev-Rempel et al., 2012). В частности, были показаны эффекты стимуляции пролиферации клеток в культуре при воздействии света красного спектрального диапазона 632,4–670 нм высокой мощности от 0,04 до 20 Дж/см² (Pinheiro et al., 2002; De Castro et al., 2005; Gao et al., 2006; Replow et al., 2011).

Установлено, что световое излучение способно модулировать большинство фаз раневого процесса (Kuffler, 2016). Облучение ожоговых ран у крыс светом красного и ближнего инфракрасного диапазонов в дозе до 5 Дж/см² непосредственно после повреждения способствует уменьшению накопления экссудации, отека, увеличивает осаждение волокон коллагена и ускоряет реваскуляризацию ткани (Meireles et al., 2008; Meirelles et al., 2006; Lan et al., 2012). Аналогичные эффекты были показаны в экспериментах на крысах с травмами мышц, Ахиллова сухожилия и ранах у адреналэктомированных животных (Aliodoust et al., 2014; Gokmenoglu et al., 2014).

Несмотря на большое количество работ по биологической активности светового излучения большинство опубликованных данных противоречиво. Очевидно, что описанные эффекты, однако, зависят от дозы, периодичности и типа облучения (непрерывное, импульсное и т.д.). Представленные в литературе исследования выполнены на трудно сопоставимых биологических объектах (Replow et al., 2010; Replow et al., 2011). Более того, зависимость биологического эффекта от спектральной ширины светового источника также является в настоящее время предметом дискуссий (Karu, 1999; Karu et al., 2005). Для решения дискуссионных проблем и получения воспроизводимых результатов необходимо было провести исследования на одном биологическом объекте при использовании стандартизированных источников света и режимов облучения. Таким объектом могут быть пресноводные плоские черви – планарии, широко используемые при изучении процессов регенерации. Эти животные обладают уникальной способностью к регенерации за счет наличия в их теле необычайно большой популяции стволовых клеток – необластов, количество которых превышает 30% от общей клеточной массы тела планарии (Aboobaker, 2011; Baguna, 2012). Регенерация планарий чувствительна к воздействию слабых физических и химических факторов, что позволяет использовать их для исследования ответных биологических реакций и механизмов воздействия ряда факторов на стволовые клетки *in vivo*, регенерацию и морфогенез (Темурьянц и др., 2008; Белова и др., 2010; Gentile et al., 2011).

Цель настоящей работы заключалась в исследовании возможности влияния низкоинтенсивного красного света светодиодов ($\lambda_{\text{макс}}=635$ нм) и широкополосного красного света (600 - 750 нм) на скорость регенерации пресноводных плоских червей планарий.

Материалы и методы.

Животные.

Использованы планарии *Schmidtea mediterranea* бесполой лабораторной расы плоских червей. Планарий содержали в «искусственной прудовой воде» (смесь водопроводной и дистиллированной воды в пропорции 2:1) при комнатной температуре, кормили раз в неделю личинками двукрылых. Для экспериментов отбирали животных длиной около 10 мм и прекращали их кормление за 7 дней до опытов. После ампутации 1/5 части тела планарий, содержащей головной нервной ганглий, регистрировали скорость регенерации отсеченной части тела.

Прижизненная компьютерная морфометрия.

Динамику роста регенерационной почки (бластемы) планарий оценивали методом прижизненной морфометрии, путем регистрации площади фотоконтраста между старыми (пигментированными) и новыми (прозрачными) частями тела. Молодая формирующаяся бластема в первые дни не покрыта пигментным эпителием, что позволяет четко выделить ее область на фоне пигментированной остаточной старой части тела (Шейман и др, 1989). Стандартные изображения регенерирующих планарий получали на 3 день после декапитации с помощью комплекса, включающего фотокамеру MRc (Carl Zeiss, Германия), смонтированную на окуляре бинокулярного микроскопа МБС-10 (ЛЗОС, Россия).

С помощью программы Plana 4.4, разработанной А. А. Деевым (ИТЭБ РАН), определяли общую площадь тела животного и площадь бластемы. Количественным критерием роста служил индекс регенерации $R=s/S$, где s - площадь бластемы, S - площадь всего тела регенеранта. Каждое из измеряемых значений R - результат усреднения измерений по 30 животным. Изменение индекса регенерации в эксперименте ($R_{\text{э}}$) по сравнению с контролем ($R_{\text{к}}$) определяли по формуле:

$$\Delta R = \left(\frac{(R_{\text{э}} - R_{\text{к}})}{R_{\text{к}}} \pm \frac{\Delta R}{R_{\text{к}}} \cdot \sqrt{\left(\frac{\sqrt{(\delta_{\text{э}}^2 + \delta_{\text{к}}^2)}}{\Delta R} \right)^2 + \left(\frac{\delta_{\text{к}}}{R_{\text{к}}} \right)^2} \right) \cdot 100\%$$

- где ΔR - разница (%) между величинами $R_{\text{э}}$ и $R_{\text{к}}$, $\delta_{\text{э,к}}$ - стандартные ошибки измерений в опыте и контроле. Стандартная ошибка ΔR не превышала 6%, при $n=60$.

Облучение планарий светом.

В экспериментах по воздействию света на регенеративные процессы планарий использовали различные источники. Полихроматическим источником света служила ксеноновая лампа устройства ЛОС 1 (СКБ АН СССР, Россия) и набор светофильтров. Это обеспечивало создание светового потока в широком диапазоне длин волн от 600 нм до 750 нм. В качестве монохроматических источников использовали красные светодиоды ($\lambda_{\text{макс}}=635$ нм). Для создания необходимой площади облучения светодиода компоновали в виде светодиодной матрицы (рис. 1). Спектральные характеристики источников света анализировали с помощью комплекта спектральной аппаратуры на базе монохроматора МДР-41 (ЗАО «ОКБ – СПЕКТР», Россия). Мощность светового потока измеряли с помощью пиранометра СМР 3 (Kipp@Zonen, Нидерланды), варьируя расстояние от детектора до источника, выравнивали мощность каждого источника света до величины 1,46 Вт/м².

Перед облучением светом планарий помещали в чашку Петри диаметром 6 см под слой прудовой воды толщиной 2 мм. Источник света помещали под чашку на расстоянии 8 см. Животных облучали однократно. Также в экспериментах использовали вариант облучения с расположением источника сверху, над чашкой с планариями. Дозу облучения

варьировали путем изменения продолжительности воздействия светового потока на планарий.



Рис. 1. Облучение планарий светом СИД.

Результаты и обсуждения.

Обнаружено, что однократное облучение регенерирующих планарий красным светом СИД непосредственно после декапитации способно активировать рост головной бластемы животных. Величина проявляющегося эффекта зависела от продолжительности (дозы) воздействия. Так, после облучения монохроматическим красным светом от светодиодного источника при $\lambda_{\text{макс}}=635$ нм (рис. 2, а) индекс регенерации возрастал по сравнению с контролем на $12\% \pm 6\%$ при освещении в течение 10 мин (доза $87,6$ мДж/см²) и на $28\% \pm 6\%$ через $22,5 \div 25$ мин облучения (доза $197,1 - 219$ мДж/см²) (рис.2). При дальнейшем увеличении длительности облучения до 30 мин и 40 мин (дозы $262,8$ и $350,4$ мДж/см²) стимуляции роста головной бластемы не наблюдалось (рис. 2, б).

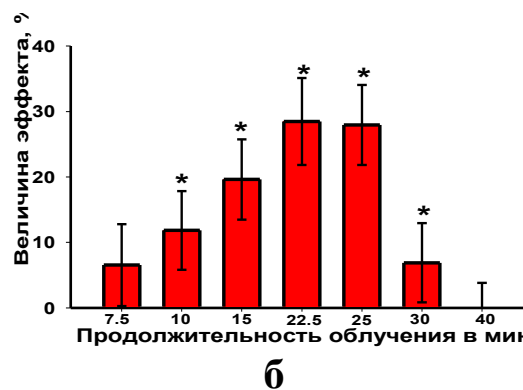
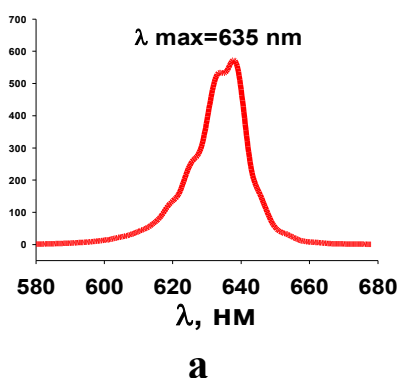


Рис. 2. Эмиссионный спектр светодиодной матрицы (а) и б - зависимость величины стимуляции роста головной бластемы планарий от продолжительности облучения красным светом светодиода (СИД) ($\lambda_{\text{макс}}=635$ нм). Интенсивность $0,146$ мВт/см², дозы от $65,7$ мДж/см² при продолжительности облучения 7,5 мин до $350,4$ мДж/см² при 40 минутном облучении. * $p < 0,001$

Далее исследовалось влияние на развитие эффекта момента декапитации животного: до и после облучения красным светом. В этом исследовании использовали

режим, приводящий к развитию максимального эффекта на уровне регенерации планарий – однократное облучение длительностью 25 минут (доза 219 мДж/см²) (рис. 3). Оказалось, что облучение планарий за 24 часа до декапитации не сказывалось на скорости последующей регенерации. Облучение за 6 и 4 часа вместо стимулирующего эффекта приводило к уменьшению скорости роста головной бластемы на $12\% \pm 5\%$ и $13\% \pm 5\%$. Воздействие за 2 часа до декапитации тормозило регенерацию на $26\% \pm 5\%$. Если планарий облучали через 30 мин после декапитации, то скорость роста бластемы возрастала на $20\% \pm 6\%$. Такой же эффект наблюдали в случае облучения непосредственно после декапитации (рис. 2, б). Отсроченное на 2 и 4 часа после декапитации облучение красным светом вновь приводило к инверсии направленности эффекта – наблюдалось ингибирование регенерации на $11\% \pm 5\%$ и $18\% \pm 5\%$ соответственно. При дальнейшем увеличении времени между операцией и облучением до 6 и 24 часов облучение не оказывало видимого воздействия на регенерацию животных.

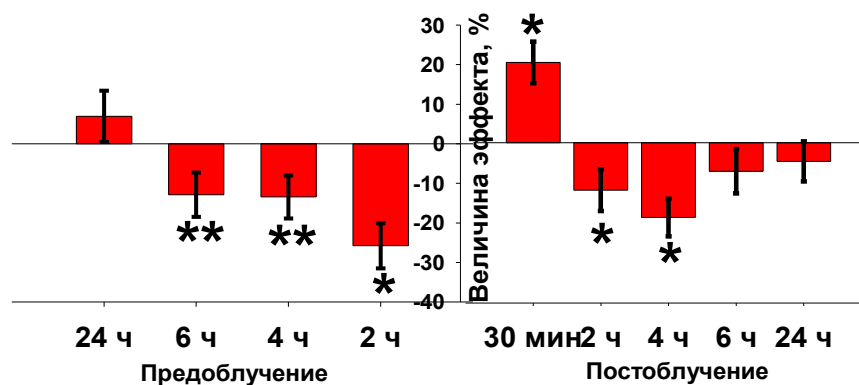


Рис. 3. Изменения скорости регенерации планарий при облучении планарий монохроматическим красным светом ($\lambda_{\text{макс}}=635$ нм) до и после декапитации. Доза облучения выбрана на уровне максимального биологического эффекта. * $p<0,001$, ** $p<0,01$

В последующих экспериментах проведено сравнительное исследование влияния монохроматического и широкополосного красного светового потока на скорость регенерации. Для этого регенерирующих планарий облучали непосредственно после декапитации светом ксеноновой лампы, пропущенным через красный широкополосный светофильтр КС10 ($\lambda=600 - 720$ нм) с дополнительным температурным фильтром, отсекающим ИК область (рис. 4, а). Мощности и дозы облучения подбирали равными таковым при работе с монохроматическими светодиодными источниками. В отличие от монохроматического красного цвета после воздействия полихроматического красного света скорость регенерации планарий не изменялась (рис. 4, б).

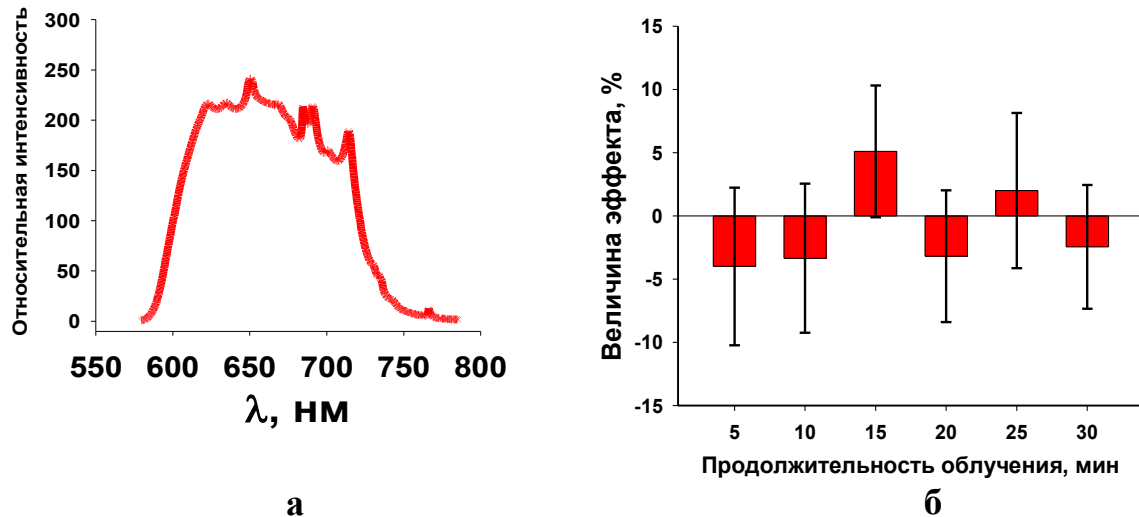


Рис. 4. Спектр пропускания фильтра KC10 (с тепловым ИК фильтром) (а) и результаты исследования воздействия полихроматического красного света, проходящего через фильтр KC10, на рост головной бластемы планарий (б). Интенсивность облучения 0,146 мВт/см², дозы 43,8 – 262,8 мДж/см² при изменении времени облучения от 5 до 30 мин.

Стимуляция роста бластемы планарий красным светом может быть обусловлена воздействием данного фактора на пролиферацию и миграцию стволовых клеток, за счет которых и обеспечивается рост новой ткани (Reddien, Sanchez Alvarado, 2004; Sanchez Alvarado, 2007; Baguna, 2012). Наблюдаемые нами эффекты хорошо согласуются с результатами исследования влияния когерентного красного света с длиной волны 685 нм на процесс регенерации. Показано, что после многократного, ежедневного облучения планарий таким светом к 4-му дню происходит увеличение количества митотических клеток в теле регенерирующих планарий (de Souza et al., 2005). Лопес с соавторами обнаружили, что многократное облучение регенерирующих животных лазером с длиной волны 660 нм стимулирует органогенез у планарий (Lopes et al., 2009).

Изменение скорости регенерации при воздействии красного света и при изменении способов облучения – до или после декапитации может быть обусловлено изменениями транскрипции рана-индуцируемых генов, контролирующих пролиферацию необластов и регенерацию (Wenemoser et al., 2012). Изменение транскрипции этих генов способно влиять на динамику процессов регенерации. Можно предположить, что отсроченное (до декапитации или после) стимулирующее воздействие красного света на планарий может нарушать ход транскрипционной активности генов и приводить к наблюдаемой инверсии направленности эффектов.

Отсутствие эффектов полихроматического света может быть обусловлено наложением разнонаправленных воздействий света различных спектральных линий на

молекулы – мишени (Kagu, 1999). Можно предположить, что при монохромном облучении при 635 нм отсекаются те линии спектра, которые влияют противоположным образом. Увеличение спектральной ширины действующего красного света, вероятно, приводит к одновременной активации множества процессов, в том числе тех, которые нивелируют стимулирующее действия света с длиной волны 635 нм.

Таким образом, нами установлено, что низкоинтенсивный красный свет светодиодов с достаточно узкой шириной волны (± 15 нм) способен при дозах облучения порядка 87,6 - 219 мДж/см² увеличивать скорость роста головной бластемы планарий. Максимальный эффект наблюдался при облучении животных непосредственно после декапитации в дозе 197,1 мДж/см², тогда как облучение животных до декапитации или после нее приводит, напротив, к торможению роста головной бластемы. Полихроматический красный свет в диапазоне 600 – 750 нм не влияет на регенерацию планарий. Можно полагать, что наблюдаемые эффекты обусловлены изменением экспрессии рана-индуцируемых генов, процессов миграции и пролиферации необластов.

Работа была выполнена при поддержке РФФИ (Грант № 14-44-03672 р_центр_а и № 14-04-01517 а)

Литература.

1. Белова Н.А., Ермаков А.М., А.В. Знобищева, Сребницкая Л.К., Леднев В.В. (2010) Влияние крайне слабых переменных магнитных полей на регенерацию планарий и гравитационную реакцию растений. Биофизика., Т. 55(4):704-709.
2. Темурьянц Н.А., Демцун Н.А., Мартынюк В.С. (2008) Особенности регенерации планарий *Dugesia tigrina* при их электромагнитном экранировании в различные сезоны года. Физика живого. №2: 85-91.
3. Шейман И. М., Тирас Х. П., Балобанова Э. Ф. (1989) Морфогенетическая функция нейропептидов. Физиол Ж СССР. 75:619-626.
4. Aboobaker A.A. (2011) Planarian stem cells: a simple paradigm for regeneration. Trends in cell biology. 21(5):304-311.
5. Aliodoust M., Bayat M., Jalili M.R., Sharifian Z., Dadpay M., Akbari M., Bayat M., Khoshvaghti A., Bayat H. (2014) Evaluating the effect of low-level laser therapy on healing of tentomized Achilles tendon in streptozotocin-induced diabetic rats by light microscopical and gene expression examinations. Lasers in medical science. 29(4):1495-1503.
6. Baguna J. (2012) The planarian neoblast: the rambling history of its origin and some current black boxes. The International journal of developmental biology. 56(1-3):19-37.

7. De Castro J.L.F., Pinheiro A.L.B., Werneck C.E., Soares C.P. (2005) The Effect of Laser Therapy on the Proliferation of Oral KB Carcinoma Cells: An in Vitro Study. *Photomedicine and laser surgery*. Vol 23, N 6.:586-589.
8. de Souza S.C., Munin E., Alves L.P., Salgado M.A., Pacheco M.T. (2005) Low power laser radiation at 685 nm stimulates stem-cell proliferation rate in *Dugesia tigrina* during regeneration. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 80(3):203-207.
9. Gao X., Chen T., Xing D., Wang F., Pei Y., Wei X. (2006) Single cell analysis of PKC activation during proliferation and apoptosis induced by laser irradiation. *Journal of cellular physiology*. Vol 206, N 2.: 441-448.
10. Gentile L., Cebria F., Bartscherer K. (2011) The planarian flatworm: an in vivo model for stem cell biology and nervous system regeneration. *Disease models & mechanisms*. 4(1):12-19.
11. Gokmenoglu C., Ozmeric N., Erguder I., Elgun S. (2014) The effect of light-emitting diode photobiomodulation on implant stability and biochemical markers in peri-implant crevicular fluid. *Photomedicine and laser surgery*. 32(3):138-145.
12. Karu T. (1999) Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 49(1):1-17.
13. Karu T.I., Pyatibrat L.V., Kolyakov S.F., Afanasyeva N.I. (2005) Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 81(2):98-106.
14. Kuffler D.P. (2016) Photobiomodulation in promoting wound healing: a review. *Regenerative medicine*. 11(1):107-122.
15. Lan C.C., Wu S.B., Wu C.S., Shen Y.C., Chiang T.Y., Wei Y.H., Yu H.S. (2012) Induction of primitive pigment cell differentiation by visible light (helium-neon laser): a photoacceptor-specific response not replicable by UVB irradiation. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 90(3):321-330.
16. Lopes K.A., Campos Velho N.M., Munin E. (2009) A study of low power laser on the regenerative process of *Girardia tigrina* (Girard,1850) (Turbellaria; Tricladida; Dugesiidae). *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia*. 69(2):327-332.
17. Meireles G.C., Santos J.N., Chagas P.O., Moura A.P., Pinheiro A.L. (2008) Effectiveness of laser photobiomodulation at 660 or 780 nanometers on the repair of third-degree burns in diabetic rats. *Photomedicine and laser surgery*. 26(1):47-54.
18. Meirelles L.d.S., Chagastelles P.C., Nardi N.B. (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science*. 119(11):2204-2213.

19. Myakishev-Rempel M., Stadler I., Brondon P., Axe D.R., Friedman M., Nardia F.B., Lanzafame R. A preliminary study of the safety of red light phototherapy of tissues harboring cancer // Photomedicine and laser surgery. 2012. Vol 30, N 9. P. 551-558.
20. Peplow P.V., Chung T.Y., Baxter G.D. (2010) Laser photobiomodulation of wound healing: a review of experimental studies in mouse and rat animal models. Photomedicine and laser surgery. 28(3):291-325.
21. Peplow P.V., Chung T.Y., Ryan B., Baxter G.D. (2011) Laser photobiomodulation of gene expression and release of growth factors and cytokines from cells in culture: a review of human and animal studies. Photomedicine and laser surgery. 29(5):285-304.
22. Pinheiro A.L., Carneiro N.S., Vieira A.L., Brugnera A., Jr., Zanin F.A., Barros R.A., Silva P.S. (2002) Effects of low-level laser therapy on malignant cells: in vitro study. Journal of clinical laser medicine & surgery. Vol 20, N 1.: 23-26.
23. Reddien P.W., Sanchez Alvarado A. (2004) Fundamentals of planarian regeneration. Annual review of cell and developmental biology. 20, 725-757.
24. Sanchez Alvarado A. (2007) Stem cells and the Planarian Schmidtea mediterranea. Comptes rendus biologies. 330(6-7):498-503.
25. Wenemoser D., Reddien P.W. (2010) Planarian regeneration involves distinct stem cell responses to wounds and tissue absence. Developmental biology. 344(2):979-991.