

14.09

Стимуляция экспрессии гена *col2a1* низкоинтенсивным лазерным излучением—инструмент для индукции образования хрящевой ткани

© М.С. Божокин,^{1,3} Д.Б. Вчерашний,² С.Г. Ястребов,^{2,¶} Л.Л. Бейлинсон,² М.Г. Хотин³

¹ Российский ордена Трудового Красного Знамени Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена,

195427 Санкт-Петербург, Россия

² Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН,

194021 Санкт-Петербург, Россия

³ Институт цитологии РАН,

194064 Санкт-Петербург, Россия

¶ e-mail: yastrebov@mail.ioffe.ru

Поступило в Редакцию 22 января 2020 г.

В окончательной редакции 22 января 2020 г.

Принято к публикации 17 февраля 2020 г.

Выявлено увеличение экспрессии гена *col2a1*, ответственного за синтез одного из основных белков внеклеточного матрикса гиалинового хряща — коллагена II типа мультитипотентными стволовыми клетками костного мозга крысы, происходящим под воздействием низкоинтенсивного лазерного излучения длиной волны $0.63 \mu\text{m}$ и мощностью 1.7 mW . Результаты исследования свидетельствуют о возможности применения данного воздействия в лечении заболеваний, развитие которых связано с повреждениями поверхности суставного хряща.

Ключевые слова: низкоинтенсивное лазерное излучение, хондрогенез, коллаген II типа, гиалиновый хрящ.

DOI: 10.21883/JTF.2020.09.49694.29-20

На сегодняшний день проблема повреждения суставной поверхности затрагивает миллионы людей по всему миру. Низкая регенеративная способность хрящевой ткани приводит к быстрому прогрессированию заболеваний, связанных с разрушением сустава. В настоящее время ведется разработка новых способов решения данной проблемы [1]. Одной из возможностей является воздействие лазерного излучения на поврежденный участок суставной поверхности с целью активации собственного регенеративного потенциала [2,3]. Данная процедура проста в исполнении, так как подразумевает возможность относительно легкого доступа, а также экономически оправдана. Например, в работе [4] приводятся результаты опытов, где показано, что воздействие лазерного излучения на область повреждения суставного хряща приводит к образованию устойчивого регенерата. При этом механизм данного эффекта до конца не изучен. Можно предположить, что лазерное излучение активирует синтез белков внеклеточного матрикса гиалинового хряща.

Экспрессия гена — это процесс, в ходе которого информация от гена (последовательности нуклеотидов ДНК) преобразуется в конечный функциональный продукт (сначала рибонуклеиновая кислота (РНК), потом — белок). В нашем случае речь идет об экспрессии гена *col2a1*, который отвечает за синтез соответствующего белка — коллагена II типа. Именно этот белок является одним из двух основных белков, составляющих каркас хрящевой ткани поверхности суставов. Ниже

экспрессия гена *col2a1* оценивается по изменению концентрации матричной РНК в исследуемых образцах.

В настоящей работе проведена оценка изменения экспрессии гена *col2a1*, ответственного за продукцию коллагена II типа. С этой целью использовались так называемые мезенхимальные мультитипотентные стромальные клетки (ММСК), выделенные из костного мозга крысы. После высеивания на адгезивный культуральный пластик чашки Петри, клетки помещали в CO_2 -инкубатор и культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в питательной среде DMEM с добавлением 10% сыворотки FBS и в присутствии антибиотика пенициллин-стрептомицина в концентрации $25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Смена среды осуществлялась через каждые трое суток. Первоначальное количество клеток на одну чашку Петри составляло $(0.5 \pm 0.1) \cdot 10^6$, подсчет клеток осуществлялся на камере Горяева.

Источником излучения являлся малогабаритный полупроводниковый лазер длиной волны 634 nm и мощностью излучения порядка 1.7 mW . При направлении излучения на шероховатую поверхность наблюдалось появление пространственного спекл-поля. Длина когерентности составила более 3 mm , что на два порядка превышает линейные размеры облучаемых клеток.

В экспериментальной установке излучение лазера проходит через коллиматор, в фокусе которого установлен входной торец оптоволокну. На выходе оптоволокну зарегистрирована мощность излучения порядка 0.85 mW , потери в коллиматоре и оптоволокну составили около 50%. По оптоволокну лазерное излучение

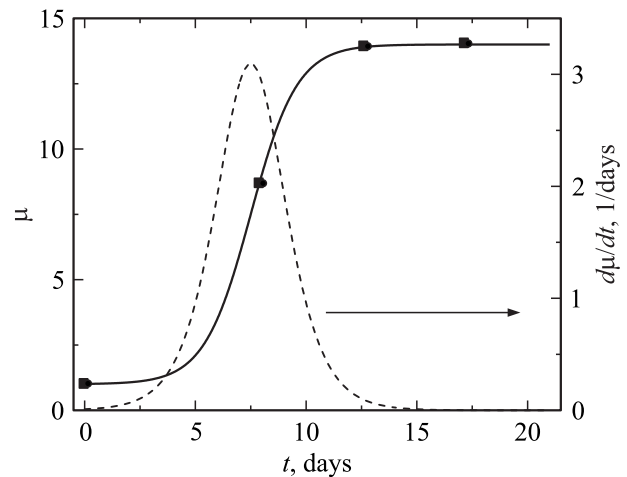
вводится в CO₂-инкубатор через герметичный шлюз и направляется на чашки Петри с опытной культурой клеток. Расходимость потока излучения на выходе волокна составила около 30°, выход волокна располагался на таком расстоянии от полки инкубатора, чтобы диаметр светового пятна составлял 80 mm. Это позволило одновременно облучать три чашки Петри с культурой клеток, последовательно выводя их из эксперимента на разных сроках. При прохождении через крышку чашки Петри потери составили еще около 50%. Итоговая расчетная плотность мощности излучения составляет порядка $2.12 \cdot 10^8 \pm 0.3 \text{ W/mm}^2$. При пересчете на количество фотонов $6.5 \cdot 10^{10}$ фотонов на mm^2/s . Через клетку диаметром около $10 \mu\text{m}$ за 1 s проходит порядка $6.5 \cdot 10^6$ фотонов. Облучение выполнялось циклически интервалами по 15 min с перерывами на 45 min после каждого включения. Управление осуществлялось в автоматическом режиме в течение всего времени эксперимента.

На сроках наблюдения 0, 7, 14 и 21 сутки культивирование клеток в соответствующих чашках прекращалось, а клетки хранили при температуре -80°C до последующего выделения матричной РНК. В качестве контроля использовали клетки, которые не подвергались облучению. После окончания всех сроков эксперимента адгезивная клеточная культура размораживалась и отделялась от пластика для дальнейших исследований. При помощи набора RNAqueous™-4PCR Total RNA IsolationKit выделяли матричную РНК. Из матрицы РНК выделялась комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота (кДНК). Получившиеся концентрации кДНК измерялись и нормировались для постановки полимеразной цепной реакции (реакции ПЦР).

Одновременно выполнялось два параллельных эксперимента в одинаковых условиях за исключением облучения: контрольные образцы культивировались без облучения. По результатам световой микроскопии был выявлен синтез белков внеклеточного матрикса в тех образцах, которые подвергались воздействию лазерного излучения.

В основе метода ПЦР лежит многократное удвоение определенного участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). В результате нарабатываются количества ДНК, достаточные для детектирования. При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в случае, если он присутствует в исследуемом образце. За один цикл ПЦР происходит удвоение числа интересующего нас ДНК в образце. Чем меньше исходная концентрация, тем больше циклов ПЦР необходимо выполнить для его обнаружения. По разности числа циклов, которые необходимы для выявления искомого гена в различных образцах, можно делать выводы об их исходном соотношении их числа в исследуемых образцах.

После выделения РНК и постановки обратной транскрипции, была успешно выделена кДНК в концентрации не ниже $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, пригодной для постановки реакции



Временная зависимость экспрессии гена *col2a1* под действием лазерного излучения: по левой вертикальной оси отложен фактор размножения матричной РНК, по правой — скорость изменения этого фактора, по горизонтальной оси отложено время эксперимента. Точки на кривой — эксперимент, сплошная линия — аппроксимация логистической функцией Больцмана: $\mu = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \exp\left(\frac{t - t_0}{dt}\right)}$. Подгоночные параметры: $A_1 = 1$, $A_2 = 14$, $t_0 = 7.5$, $dt = 1.05$ дней.

РВ-ПЦР. После нормировки данных было обнаружено увеличение концентрации кДНК тех образцов, которые подвергались воздействию лазерного излучения по сравнению с контролем, что представлено на рисунке. Можно предположить, что это связано с увеличением продукции матричной РНК опытной культурой мезенхимальных стволовых клеток (МСК) под воздействием низкоинтенсивного лазерного излучения.

Исходя из вышесказанного, можно предположить, что низкоинтенсивное лазерное излучение длиной волны $0.63 \mu\text{m}$ стимулирует процесс экспрессии гена *col2a1*. Из рисунка видно, что фактор умножения возрастает в соответствии с логистической кривой Больцмана, однако примерно к 12 дню эксперимента зависимость выходит на насыщение, т.е. наступает адаптация системы клеток к воздействию электромагнитного излучения данной длины волны.

Как известно, ген *col2a1* отвечает за продукцию коллагена II типа и, следовательно, является индуктором образования хрящевой ткани (хондрогенеза). Этот белок синтезируется в клетке и секретируется в межклеточное пространство. Коллаген II типа является одним из двух важнейших белков внеклеточного матрикса гиалинового хряща [5,6] наряду с агреканом. Нами показано, что воздействие на МСК низкоинтенсивным лазерным излучением увеличивает экспрессию гена *col2a1* в культуре клеток. В работе Jones с соавторами [3] было показано, что облучение поврежденной области хряща *in vivo* способно приводить к значительному увеличению числа клеток-индукторов образования хрящевой ткани. Вероятно, в наблюдаемый нами эффект вносят вклад два

фактора — активация экспрессии конкретного гена или группы генов и стимуляция пролиферации клеток. Рассмотренный нами *in vitro* пример клеточной культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) может быть успешно применен для объяснения эффекта восстановления поврежденного хряща *in vivo*, наблюдавшегося в работе [7], происходящего под воздействием низкоинтенсивного лазерного излучения: облучение поврежденной области хряща *in vivo* способно приводить к значительному увеличению числа клеток-индукторов образования хрящевой ткани так же, как это имеет место при облучении ММСК *in vitro*.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Божокин М.С., Божкова С.А., Нетьлько Г.И., Наконечный Д.Г., Блинова М.И., Нащкина Ю.А. // Труды Карельского НЦ РАН. 2018. № 4. С. 13–22.
- [2] Bjordal J.M., Couppe C., Chow R.T., Ljunggren E.A. // Australian J. Physiotherapy. 2003. Vol. 49. N 2. P. 107–122.
- [3] Jones N., Sviridov A., Sobol E., Omelchenko A., Lowe J. // Lasers Med. Sci. 2001. Vol. 16. N 4. P. 284–290.
- [4] Sobol E., Shekhter A., Guller A., Baum O., Baskov A. // J. Biomed. 2011. Vol. 16. N 8. P. 080902.
- [5] Goessler U.R., Bugert P., Bieback K., Deml M., Sadick H., Hormann K., Riedel F. // Cell. Mol. Biol. Lett. 2005. Vol. 10. N 2. P. 345–362.
- [6] Nazempour A., Quisenberry C.R., Van Wie B.J., Abu-Lail N.I. // J. Nanosci. Nanotechnol. 2016. Vol. 16. N 3. P. 3136–3145.
- [7] Kushibiki T., Tajiri T., Ninomiya Y., Awazu K. // J. Photochem. Photobiol. B. 2010. Vol. 98. N 3. P. 211–5. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2010.01.008. Epub 2010 Jan. 25.