



## **Relazione finale del progetto “Effect of near–infrared irradiation on cell proliferation of Human Umbelical Vein Endothelial Cells (HUVEC) cronically exposed to high glucose medium”**

### **Introduzione.**

La radiazione luminosa di lunghezza d'onda compresa fra 630 e 1000 nm (visibile fino a 700 nm e invisibile, near infrared da 700 a 1000 nm) presente nella luce solare e generata artificialmente in forma monocromatica e pulsata da sorgenti laser a bassa energia (LEL, low energy laser, luce collimata e coerente) o da sistemi a diodi (light-emitting diode, LED, luce diffusa) ha un effetto di protezione e rigenerazione cellulare in numerose condizioni sperimentali e cliniche di danno tissutale.

La fototerapia con luce NIR emessa da LED e' stata impiegata con successo in campo clinico in numerose patologie di vari organi. L'irraggiamento con sorgenti LEL o LED, noto anche con il termine di fotobiomodulazione, è attualmente uno strumento terapeutico ampiamente accettato nel trattamento di ulcere e ferite infette, ischemiche ed ipossiche (come nel caso delle ulcere diabetiche). In particolare nelle ulcere croniche e nelle ferite è stata dimostrata una rilevante efficacia antinfiammatoria e riparativa (Danno et al, 2001). Nonostante queste potenzialità, il meccanismo alla base degli effetti terapeutici della fotobiomodulazione con luce NIR non è ancora del tutto chiarito ed è oggetto di numerosi studi.

Il primo meccanismo ipotizzato nella “fotobiomodulazione” NIR a livello cellulare è l'attivazione del metabolismo mitocondriale, soprattutto nelle condizioni in cui il mitocondrio è sottoposto al danno da ischemia e da infiammazione: il fotoassorbimento della radiazione da parte di enzimi cromofori della catena respiratoria mitocondriale e particolarmente della citocromo C ossidasi (parte terminale della catena, assorbimento con picchi a 630 e 880 nm) determinerebbe uno spostamento del potenziale ossidoriduttivo mitocondriale verso l'ossidazione con aumento di ATP intracellulare, formazione di specie attive dell'ossigeno e aumentata espressione di vari geni della riparazione e della proliferazione cellulare per aumentata sintesi del relativo DNA (mitocondrio-nucleo signaling) (Eells et al, 2004; Karu et al, 2006; Karu, 2008; Gao & Xing, 2009). Recentemente è stato proposto un meccanismo alternativo (o complementare) non mitocondriale basato sulla aumentata disponibilità intracellulare di NO con meccanismi sia dipendenti che indipendenti dall'attività della NOSintasi (Zhang et al, 2009).

### **Scopo dello studio.**

In questo studio ci proponiamo di indagare gli effetti dell'irraggiamento NIR mediante LED su colture cellulari in vitro di cellule endoteliali umane da cordone ombelicale (HUVEC) cronicamente esposte a elevati livelli di glucosio e che mimano un modello di danno vascolare secondario a condizioni iperglicemiche. Colture di HUVEC esposte a concentrazioni normali di glucosio nel mezzo (glucosio 5mM) rappresentano la condizione di riferimento. Una serie di dati accumulati nel nostro laboratorio mostrano che cellule endoteliali umane (HUVEC) coltivate per 3 giorni in mezzo completo contenente glucosio

30mM proliferano circa il 20% meno di HUVEC coltivate in mezzo completo standard (contenente 5mM glucosio). Alla ridotta proliferazione è associata una riduzione della capacità sia di formare tubi su matrice (matrigel assay) sia di cicatrizzare un taglio fatto su un tappeto di cellule (wound healing assay).

Lo studio si propone di investigare l'effetto dell'irraggiamento NIR mediante LED in termini di proliferazione cellulare, risposta riparativa al test di "wound healing" e dosaggio di prodotti secretori nel soprannatante delle cellule endoteliali relativi alla risposta infiammatoria (prostaglandina E2, PGE2) e alla secrezione di composti vasoattivi (endotelina-1, ET-1).

La scelta di testare questi due metaboliti deriva dal ruolo che essi rivestono nella funzione endoteliale. Il primo, la prostaglandina E2 è un prostanoido che ha un ruolo importante nei processi infiammatori al quale sono attribuiti diverse azioni biologiche, incluso un effetto paracrino di vasodilatazione.

Il secondo metabolita, l'endotelina-1, è un polipeptide prodotto e secreto dalle cellule endoteliali con potente azione vasocostrittiva. Il mantenimento dell'equilibrio nella produzione di sostanze vasoattive da parte dell'endotelio rappresenta una delle principali funzioni della cellule endoteliale, la cui compromissione è associata a numerose patologie cardiovascolari. Attivazione dei processi infiammatori e alterazione della regolazione del tono vasomotore endotelio-dipendente sono fenomeni associati al danno vascolare secondario a condizioni iperglicemiche.

L'esposizione a luce NIR monocromatica diffusa e pulsata a 880 nm verrà effettuata mediante strumentazione **PHYSIStech<sup>MC</sup>**, un sistema a diodi di recente costruzione (**LedWay** srl) secondo protocolli, tempi di esposizione ed energie somministrate da definire sulla base delle caratteristiche del modello di studio.

## Metodi e protocolli.

**Valutazione della dose di irraggiamento.** La dose ed il tempo di irraggiamento da impiegare nello studio proposto sono stati scelti sulla base dei risultati di una serie di esperimenti preliminari sulla proliferazione di cellule HUVEC in coltura statica incubata in mezzo standard. Le cellule HUVEC sono state seminate alla densità di 150.000 cellule in piastre da 60 mm di diametro. A distanza di 24 ore, le piastre sono state esposte a irraggiamento LED (880 nm) mediante sonda Size 28 della strumentazione **PHYSIStech<sup>MC</sup>**. Sulla base delle specifiche tecniche di energia e potenza fornite dal costruttore sono stati scelti i programmi 5, 6 e 8 per tempi di esposizione variabili in modo da fornire una energia totale di 2 J/cm<sup>2</sup> o in alternativa di 1 J/cm<sup>2</sup>.

### Sonda 28 (piccola)

Pr.	Dose	mW	J/minuto
1	L/E	1,6	0,096
2	L/D	3,2	0,192
3	L/C	6	0,36
4	M/D	6,4	0,384
5	L/B	4	0,24
6	H/E	4,8	0,288
7	M/E	1,06	0,0636
8	H/D	9,6	0,576

La scelta della dose ottimale (programma e tempo di esposizione) da utilizzare nei successivi è stata ottenuta analizzando la capacità di proliferazione delle HUVEC a seguito di irraggiamento NIR in condizione stazionaria.

## **Test della cicatrizzazione da taglio (wound healing) su colture HUVEC incubate con due concentrazioni di glucosio.**

Cellule HUVEC sono state coltivate in mezzo con concentrazioni standard di glucosio (glucosio 5mM, HUVEC-G-5) o in mezzo condizionato da elevate concentrazioni di glucosio (glucosio 30mM, HUVEC/G-30) sino a confluenza (circa 3 giorni), in due piastre da 60 mm di diametro per ciascuna condizione. Successivamente una delle due piastre di coltura per ciascuna concentrazione di glucosio è stata esposta a irraggiamento LED mediante sonda Size 28 della strumentazione **PHYSIStech<sup>MC</sup>**, programma 6 per il tempo necessario a fornire un'energia totale di 1J/cm<sup>2</sup>. Immediatamente dopo le cellule di tutte le piastre sono state staccate mediante trattamento con tripsina, sospese nel mezzo, contate ed infine seminate in camerette separate da uno spaziatore alla densità di 70000 per cameretta (Ibidi, Germania). Le condizioni di test sono così riassunte:

- HUVEC-G-5 no LED (controllo negativo)
- HUVEC-G-5 + LED
- HUVEC-G-30 no LED (controllo positivo)
- HUVEC-G-30 + LED

A distanza di 24 ore, lo spaziatore è stato rimosso e a t=0, t=8, e t=24 è stata rilevato il grado di cicatrizzazione. Per una migliore rappresentazione ottica del processo di cicatrizzazione le piastre sono state colorate con Crystal violetto.

## **Test della cicatrizzazione da taglio (wound healing) su colture EA-HY incubate con due diverse concentrazioni di glucosio**

L'impiego del LED è stato esteso a cellule Ea-Hy, una linea immortalizzata di cellule endoteliali umane. Cellule Ea-Hy sono state coltivate in mezzo con concentrazioni standard di glucosio (glucosio 5mM, Ea-Hy-G-5) o in mezzo condizionato da elevate concentrazioni di glucosio (glucosio 30mM, Ea-Hy-G-30) sino a confluenza (circa 3 giorni) in due piastre da 60 mm di diametro per ciascuna condizione. Successivamente una delle due piastre di coltura per ciascuna concentrazione di glucosio è stata esposta a irraggiamento LED mediante sonda Size 28 della strumentazione **PHYSIStech<sup>MC</sup>**, programma 6 per il tempo necessario a fornire un'energia totale di 1J/cm<sup>2</sup>.

Immediatamente dopo le cellule di tutte le piastre sono state staccate mediante trattamento con tripsina, sospese nel mezzo, contate ed infine seminate ad opportune densità per il rilevamento sia della proliferazione che della cicatrizzazione del taglio. Le condizioni di test sono così riassunte:

- Ea-Hy-G-5 no LED (controllo negativo)
- Ea-Hy-G-5 + LED
- Ea-Hy-G-30 no LED (controllo positivo)
- Ea-Hy-G-30 + LED

## **Dosaggio di marker infiammatori e di sostanze vasoattive nei soprannatanti di colture HUVEC incubate con due diverse concentrazioni di glucosio**

Per valutare gli effetti dell'irraggiamento LED sulle funzioni secretorie oltre che proliferative delle cellule endoteliali, sono stati raccolti i soprannatanti di colture HUVEC coltivate con glucosio 5 mM o 30 mM dopo tre giorni dalla semina prima e a t=24, t=48 e t=72 ore dopo irraggiamento LED mediante sonda Size 28 della strumentazione **PHYSIStech<sup>MC</sup>**, programma 6 per il tempo necessario a fornire un'energia totale di 1J/cm<sup>2</sup>. I soprannatanti di colture HUVEC coltivate in presenza delle due concentrazioni di glucosio ma non sottoposte ad irraggiamento LED sono stati raccolti con le stesse modalità e agli stessi tempi e hanno rappresentato la condizione di riferimento per ciascun dosaggio.

I livelli di prostaglandina E2 e di endotelina-1 sono stati determinati mediante dosaggi ELISA specifici (AssayDesign, Stressgen) sul mezzo di coltura raccolto ai tempi descritti.

## Risultati

### Scelta della dose di irraggiamento.

I dati ottenuti hanno mostrato che la proliferazione cellulare, espressa come numero totale di cellule raccolte, era inibita da 2 J/ cm<sup>2</sup> indipendentemente dal programma usato (Fig. 1).

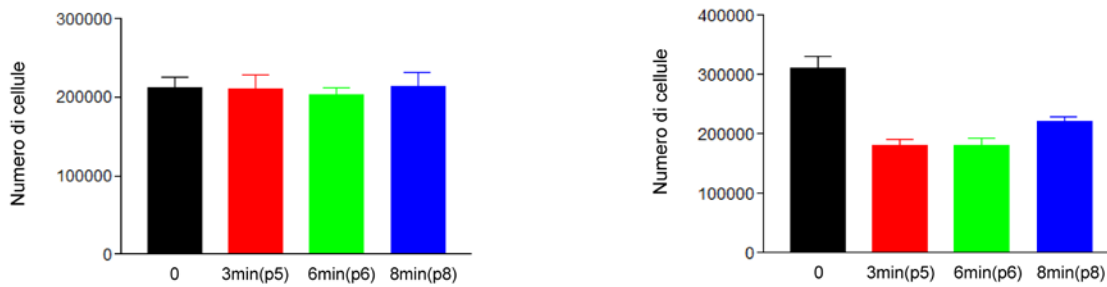


Figura 1. Effetto dell'esposizione di HUVEC a LED (2J/cm<sup>2</sup>). Proliferazione cellulare a distanza di 24 ore (*pannello a sinistra*) e 72 ore (*pannello a destra*) dall'esposizione. I programmi usati sono indicati con le sigle p5, p6, p8.

La riduzione dell'energia totale da 2J/ cm<sup>2</sup> a 1J/ cm<sup>2</sup> ha stimolato la proliferazione cellulare e il migliore effetto è stato registrato con il programma 6 (Fig. 2).

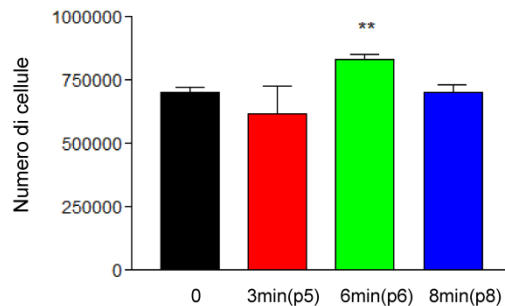


Figura 2. Effetto dell'esposizione di HUVEC a LED (1J/cm<sup>2</sup>). Proliferazione cellulare a distanza di 72 ore dall'esposizione. I programmi usati sono indicati come p5, p6, p8.

### Effetto del LED sulla cicatrizzazione del taglio.

Il test di cicatrizzazione in assenza di irraggiamento LED ha evidenziato una ridotta capacità riparativa delle cellule HUVEC condizionate da alti livelli di glucosio ed sia al tempo t=8 che t=24 (figura 3 e 4).

L'irraggiamento con LED migliora l'efficienza di cicatrizzazione sulle 24 ore e in entrambi le concentrazioni di glucosio, tuttavia l'effetto più evidente è rilevato nel caso delle HUVEC-G-30 (figura 3 e 4).

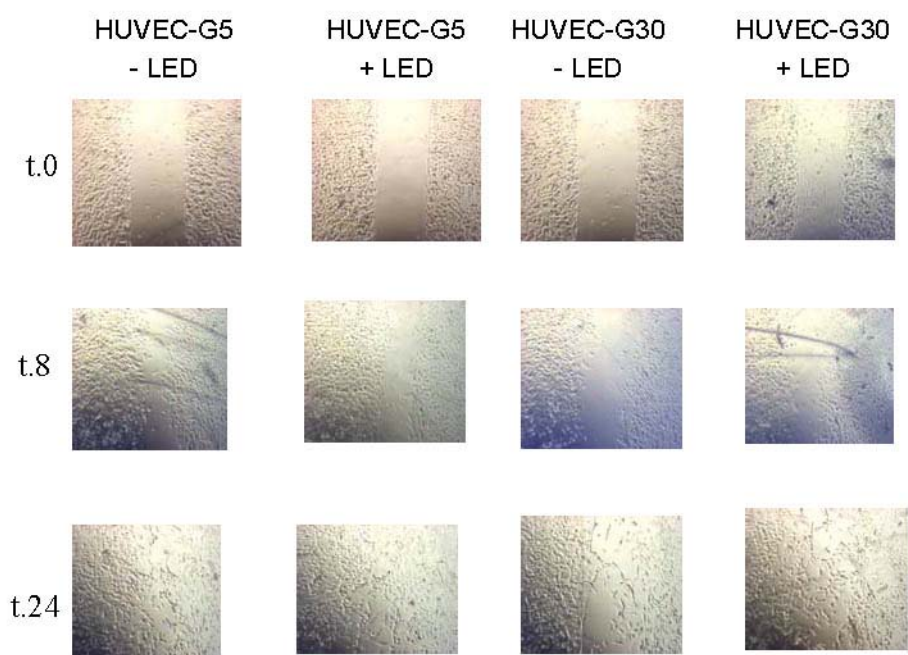


Figura 3. Cicatrizzazione del taglio. Il processo è già visibile dopo 8 ore (t.8) nelle HUVEC-G5 non esposte a LED rispetto alle esposte e nelle HUVEC-G30 esposte al LED rispetto alle non esposte. A t.24 la cicatrizzazione è maggiore nelle cellule esposte a LED e l'effetto è maggiore nelle HUVEC-G30.

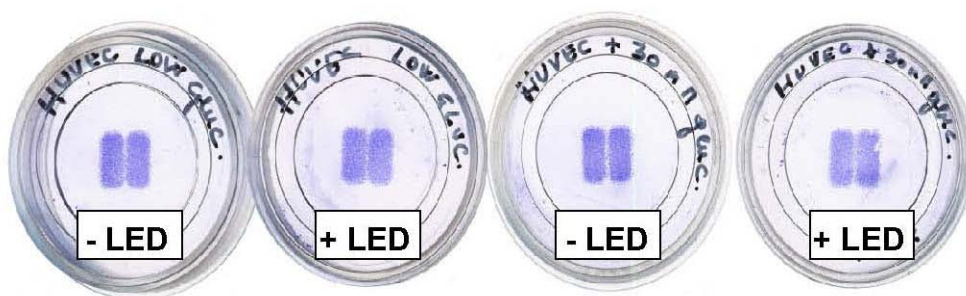


Figura 4. Rappresentazione fotografica della cicatrizzazione a 24 ore di distanza dalla rimozione dello spaziatore. La colorazione con Crystal violetto tra le due camerette è molto più intensa nelle cellule esposte al LED che in quelle non esposte e che l'effetto è più marcato nelle HUVEC-G30.

**Cicatrizzazione nelle Ea-Hy.** L'impiego del LED è stato esteso a cellule Ea-Hy, una linea immortalizzata di cellule endoteliali umane. Dopo 24 ore dall'irraggiamento e prima di operare il taglio per il test di cicatrizzazione abbiamo visto che sia le Ea-Hy/G-5 che le Ea-Hy /G-30mM-G erano più numerose di quelle non esposte al LED. Inoltre a distanza di 24 ore dal taglio abbiamo visto che la cicatrizzazione era stata molto più rapida nelle Ea-Hy /G-30 esposte al LED rispetto alle non esposte. Diversamente da quanto osservato nelle cellule HUVEC, le Ea-Hy /G-5 non sono state capaci di cicatrizzare quanto le Ea-Hy-G-30 una volta esposte al LED (Fig.5)

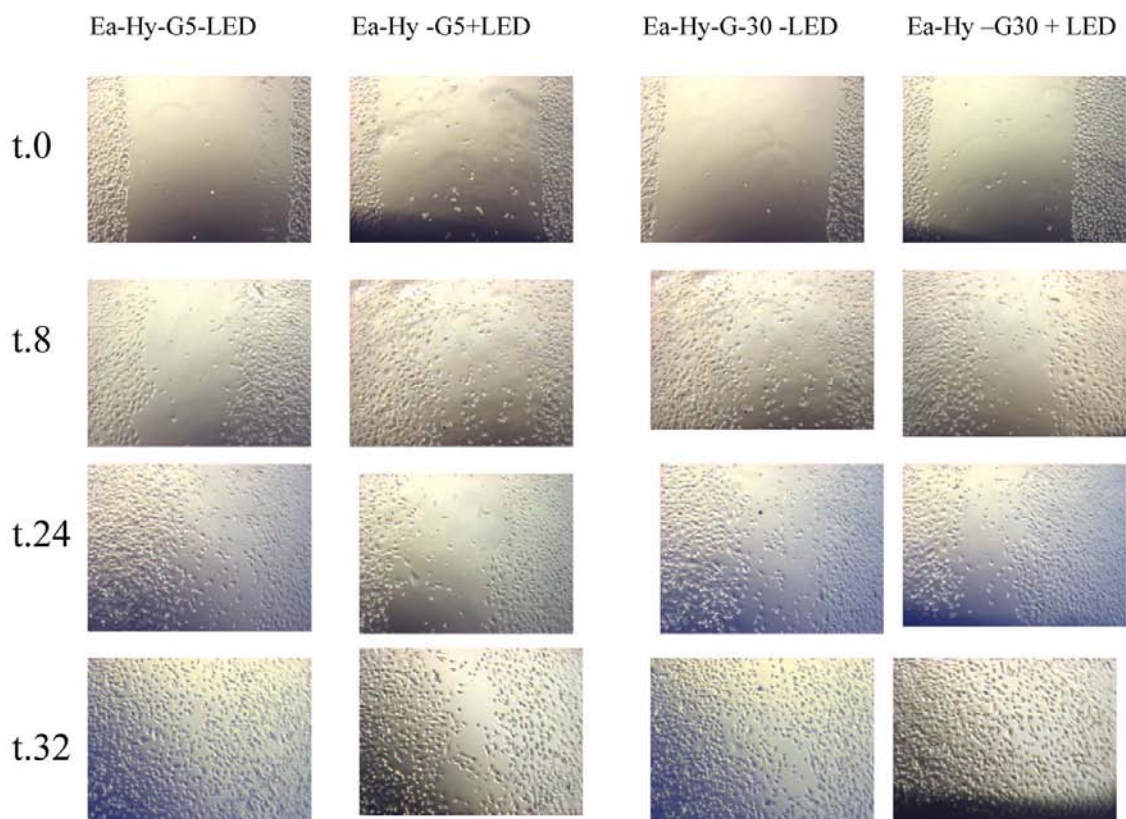


Figura 5. Cicatrizzazione del taglio. Le Ea-Hy-G5-LED hanno completato il processo di cicatrizzazione entro 32 ore mentre le Ea-Hy-G5+LED non sono state capaci di completare il processo. Le Ea-Hy-G30+LED alle 32 ore sono risultate più efficienti delle Ea-Hy-G30-LED nel processo di cicatrizzazione.

**Rilascio di Prostaglandina E2.** Per valutare gli effetti dell'irraggiamento LED sulle funzioni secretorie di prostaglandina E2 (PGE2), un marker infiammatorio delle cellule endoteliali, abbiamo raccolto i perfusati di colture HUVEC/G-5 e HUVEC/G-30, in assenza o in presenza di esposizione LED a 1 J/cm<sup>2</sup> (programma 6), ai tempi t=0 (prima), t=24 (24 h), t=48 (48 h) e t=72 (72 h) dall'irraggiamento e agli stessi tempi in assenza di irraggiamento.

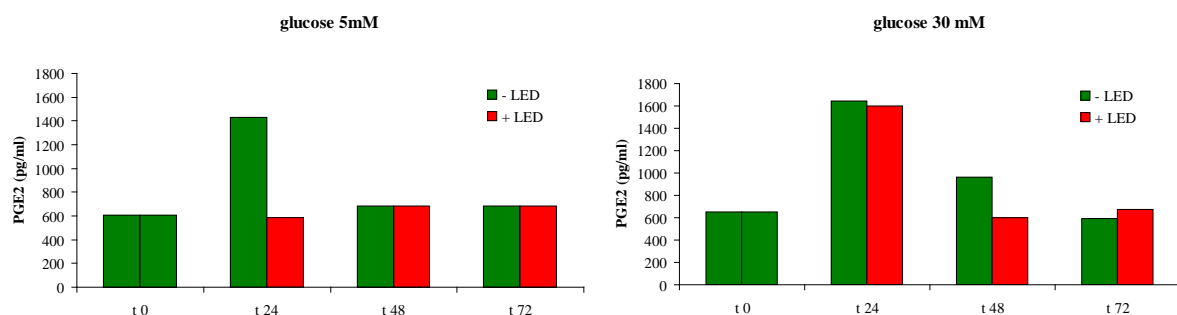


Figura 6. Determinazione dei livelli di PGE2 rilasciata nel mezzo di coltura prima (t=0) o in assenza (istogrammi verdi) e in presenza (istogrammi rossi) di esposizione a LED.

Per le cellule endoteliali il distacco dalla piastra di coltura mediante tripsina e successiva nuova semina rappresenta uno stimolo per il rilascio di PGE2 entro le 24 ore successive, probabilmente associato a fenomeni di riarrangiamento del citoscheletro (Sawyer et al, 2001), in maniera indipendente dalla concentrazione del glucosio nel mezzo. In assenza di irraggiamento LED, nella condizione HUVEC-G-5 il rilascio di PGE2 ritorna ai valori basali (circa 600 pg/ml) a 48 e 72 ore. Per concentrazioni elevate di glucosio il rilascio è più consistente rispetto a HUVEC-G-5 (1646 vs 1428 pg/ml) e rimane elevato sino a 48 ore dalla semina rispetto ai valori basali (962 e 654 pg/ml, rispettivamente) e ritorna ai valori basali a 72 ore.

L'irraggiamento con LED è in grado di inibire il rilascio di PGE2 a t=24 in condizioni normoglicemiche (584 vs 1428 pg/ml, rispettivamente in presenza o in assenza di esposizione LED). Nelle colture condizionate da alti livelli di glucosio, invece, l'irraggiamento LED non è efficace nel contrastare significativamente il rilascio di PGE2 a t=24 (1600 e 1646 pg/ml, rispettivamente in presenza o in assenza di esposizione LED), tuttavia in queste condizioni particolarmente sfavorevoli un effetto positivo è evidente a t=48 (600 vs 962 pg/ml rispettivamente in presenza o in assenza di esposizione LED).

**Rilascio di endotelina-1.** Per valutare gli effetti dell'irraggiamento LED sulle funzioni secretorie di endotelina-1, prodotto vasoattivo con proprietà vasocostrittorie, abbiamo raccolto i perfusati di colture HUVEC/G-5 e HUVEC/G-30, in assenza o in presenza di esposizione LED a 1 J/cm<sup>2</sup> (programma 6), ai tempi t=0 (prima), t=24 (24 h), t=48 (48 h) e t=72 (72 h) dall'irraggiamento e agli stessi tempi in assenza di irraggiamento.

In assenza di irraggiamento e in entrambe le concentrazioni di glucosio nel mezzo, i livelli di ET-1 nel soprannatante sono rimasti costanti per tutti i tempi analizzati, ad eccezione di t=48, dove si è registrato un ridotto livello di ET-1 nel mezzo (circa 40% vs 100% misurato a t=0).

L'irraggiamento con LED è in grado di inibire il rilascio di ET-1 a t=24 in condizioni normoglicemiche (44% vs 100% rispettivamente in presenza o in assenza di esposizione LED). Nelle colture condizionate da alti livelli di glucosio, invece, l'irraggiamento LED non è efficace nel contrastare significativamente il rilascio di ET-1. Come per le colture non irraggiate, al tempo t=48 sono stati dosati livelli ridotti di ET-1 rispetto a quelli basali, ma non significativamente diversi di quelli dosati nelle colture non irraggiate (46% vs 39%).

## Conclusioni e prospettive

I risultati di questo studio dimostrano che:

1. l'energia ottimale per ottenere effetti biologici nel nostro modello sperimentale di coltura cellulare (proliferazione di HUVEC e wound healing test su HUVEC e Ea-HY) è 1 J/cm<sup>2</sup> ottenuta mediante sonda Size 28 della strumentazione **Physis tech<sup>MC</sup>**, programma 6.
2. l'esposizione di colture HUVEC condizionate da elevate concentrazioni di glucosio (30mM) alla dose ottimale ha stimolato sia la proliferazione cellulare che la cicatrizzazione del taglio, entrambe compromesse dall'alto glucosio, normalizzando i processi riparativi.

3. l'esposizione di colture Ea-Hy alla dose ottimale ha dato risultati simili a quelli osservati con le HUVEC ma il maggior effetto riparativo è stato osservato proprio in condizioni di glucosio sfavorevoli ai processi riparativi
4. gli effetti benefici dell'esposizione a LED sono associati a una riduzione di rilascio di citochine pro-infiammatorie (PGE2) dalle HUVEC. L'effetto è evidente alle 24 ore successive alla semina in condizioni di glucosio 5 mM e a 48 ore in condizioni 30mM. I risultati preliminari sulla funzione endoteliale (ET-1) sembrano indicare una analoga riduzione del rilascio del mediatore vasocostrittivo in condizioni di glucosio 5 mM, mentre nessun effetto è risultato visibile nelle concentrazioni di glucosio 30 mM.

Da queste prime analisi si può concludere che l'impiego della luce NIR a 880 nm, ad energie molto più basse di quelle correntemente impiegate in vivo per applicazioni cliniche in dermatologia, è in grado di proteggere le cellule endoteliali umane anche in condizioni particolarmente sfavorevoli (alti livelli di glucosio, che mimano un modello di danno vascolare secondario a condizioni iperglicemiche) per la riparazione, la proliferazione e la funzione del microcircolo.

I risultati raggiunti aprono prospettive interessanti per l'applicazione NIR mediante strumentazione **PHYSIStech<sup>MC</sup>** in ambito applicativo clinico e per l'impiego dell'irraggiamento NIR nella modulazione dei meccanismi genici alla base dei processi proliferativi e riparativi dell'angiogenesi.

## Bibliografia

Danno K, Mori N, Toda K, Kobayashi T, Utani A. Near-infrared irradiation stimulates cutaneous wound repair: laboratory experiments on possible mechanisms. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **17**: 261–265, 2001.

Eells, J, Wong-Riley MT, VerHoeve J, Henry M, Buchman EV, Kane MP, Gould LJ, Das R, Jett M, Hodgson BD, Margolis D, Whelan HT Mitochondrial signal introduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. *Mitochondrion* **4**, 559–567, 2004.

Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci* **16**:4, 2009.

Karu TI. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by Red and Near-IR Radiation. *Photochem and Photobiol* **84**:1091-1099, 2008.

Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *Photochem. Photobiol. Sci.* **3**, 211–216, 2004.

Zhang R, Mio Y, Pratt PF, Lohr N, Warltier DC, Whelan HT, Zhu D, Jacobs ER, Medhora M, Bienengraeber M. Near infrared light protects cardiomyocytes from hypoxia and reoxygenation injury by a nitric oxide dependent mechanism. *J Mol Cell Cardiol* **46**: 4-14, 2009.

Sawyer Sj, Noevell SM, Ponik SM, Pavalko FM. Regulation of PGE2 and PGI2 release from human umbilical vein endothelial cells by actin cytoskeleton. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**: C1038-1045, 2001

Personale dell' Istituto di Fisiologia Clinica del CNR che ha condotto gli esperimenti:

**Monica Evangelista** e **Giuseppe Rainaldi**, Laboratorio di Terapia Genica e Molecolare – CNR Pisa  
**Claudia Kusmic** e **Gualtiero Pelosi**, Laboratorio di Fisiologia del Microcircolo – CNR Pisa