


# Expozice blízkému infračervenému světlu spouští ROS k downregulaci zánětlivých cytokinů indukovaných spike proteinem SARS-CoV-2 v lidské buněčné kultuře

 [mdpi.com/2076-3921/12/10/1824](https://doi.org/10.3390/antiox12101824)

Otevřený přístupČlánek

1

UMR8256, CNRS, IBPS, Univerzita Sorbonna, 75005 Paříž, Francie

2

Výzkumné centrum pro optimální zdraví, University of Westminster, Londýn W1W 6UW, UK

3

Katedra biologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Naresuan, Phitsanulok 65000, Thajsko

4

Výživa a obezita: systémové přístupy, NutriOmics, výzkumná jednotka, Univerzita Sorbonna, INSERM, 75013 Paříž, Francie

5

Laboratoire CHArt, University of Paris 8-Vincennes-Saint-Denis, 93526 Saint-Denis, Francie

6

Katedra biologie, Xavier University, 3800 Victory Parkway, Cincinnati, OH 45207, USA

\*

Autoři, kterým má být korespondence adresována.

*Antioxidanty* **2023** , 12 (10), 1824;

<https://doi.org/10.3390/antiox12101824>

Příspěvek přijat: 31. července 2023 / Upraveno: 13. září 2023 /

Přijato: 28. září 2023 / Zveřejněno: 2. října 2023

(Tento článek patří do Special Issue Cellular ROS and Antioxidants: Physiological and Patological Role )

Stáhnout keyboard arrow down

Procházet obrázky

Poznámky k verzím

## **Abstraktní**

---

Hlavní příčinou úmrtnosti na SARS-CoV-2 je přehnaná imunitní reakce hostitele, která spouští cytokinové bouře, selhání více orgánů a smrt. Současné terapie založené na lécích a vakcínách mají omezenou účinnost proti novým virovým variantám. Infračervená terapie je neinvazivní a bezpečná metoda, která se osvědčila proti zánětlivým stavům již více než 100 let. Mechanismus jeho účinku je však špatně pochopen a nebyl široce přijat. Zde zkoumáme, zda by expozice blízkému infračervenému (NIR) světlu v lidských primárních alveolárních a makrofágových buňkách mohla downregulovat zánětlivé cytokiny spouštěné SARS-CoV-2 spike (S) proteinem nebo lipopolysacharidem (LPS) a jakým základním mechanismem. Naše výsledky ukázaly dramatické snížení prozánětlivých cytokinů během několika dní po ošetření NIR světlem, zatímco protizánětlivé cytokiny byly upregulovány. Mechanicky NIR světlo stimulovalo mitochondriální metabolismus, indukovalo přechodné vzplanutí reaktivních forem kyslíku (ROS) a aktivovalo transkripci antioxidantních genů. Ty následně snižovaly ROS a zánětlivé cytokiny. Byl prokázán kauzální vztah mezi indukcí buněčných ROS expozicí NIR světlu a downregulací zánětlivých cytokinů vyvolaných SARS-CoV-2 S. Pokud by to potvrdily klinické studie, tato metoda by poskytla okamžitou obranu proti novému SARS-CoV-2 varianty a další zánětlivá infekční onemocnění.

Klíčová slova:

SARS-CoV-2 ; expozice blízkému infračervenému světlu ; zánětlivá signální dráha TLR4 ; reaktivní formy kyslíku (ROS) ; lidské primární alveolární buňky ; lidská makrofágová buněčná linie ; mitochondrie ; antioxidantní geny ; fotobiomodulační terapie

## 1. Úvod

---

Koronavirus 2 těžkého akutního respiračního syndromu (SARS-CoV-2) je vysoce patogenní  $\beta$ -koronavirus , který se nedávno objevil u lidí [ 1 ] a vedl ke globální pandemii koronavirového onemocnění-2019 (COVID-19). Úmrtnost vyplývá z nadměrné, nekontrolované zánětlivé reakce, tzv. cytokinové bouře, vedoucí k akutnímu poškození plic (ALI) a syndromu akutní respirační tísně (ARDS). To může být následováno multiorgánovým selháním a smrtí, zejména u starších osob a u jedinců s rizikovými faktory komorbidit [ 2 , 3 ]. V současné době neexistuje žádná účinná antivirová léčba a žádná účinná léčba proti pozdnímu stádiu COVID-19 a stávající vakcíny mají omezenou účinnost kvůli četným mutacím, které ukrývají nově se objevující varianty SARS-CoV-2 [ 4 , 5 ]. Stejně exacerbované imunitní reakce, charakterizované bouřemi cytokinů, ARDS a multiorgánovým selháním, jsou také charakteristické pro dva další vysoce patogenní  $\beta$ -koronaviry , které se objevily v letech 2002 a 2013: koronavirus těžkého akutního respiračního syndromu (SARS-CoV) [ 6 ] a Middle Koronavirus východního respiračního syndromu (MERS-CoV) [ 7 ], resp. SARS-CoV-2 je proto třetím  $\beta$ -koronavirem , který se objevil od počátku 21. století, což naznačuje, že  $\beta$ -koronavirus má vysoký potenciál propuknutí a pandemie a nadále představuje významnou hrozbu pro veřejné zdraví.

U pacientů se závažným onemocněním COVID-19 se začíná vyvíjet hyperzáněť v dolních cestách dýchacích. Klíčovými buněčnými typy zprostředkovávajícími tuto dysregulovanou vrozenou imunitu jsou alveolární epiteliální buňky typu II spolu s rezidentními a rekrutovanými makrofágy [ 8 , 9 ]. Minulé studie uvádějí, že hyperzánětlivá patologie spouštěná u pacientů s COVID-19 je spojena s upregulací Toll-like receptoru (TLR) 4 v mononukleárních buňkách periferní krve (PBMC) u pacientů s těžkým COVID-19 ve srovnání se zdravými kontrolami [ 10 ] . TLR jsou transmembránové proteiny exprimované v epiteliálních a imunitních buňkách a jejich normální funkcí je indukovat vrozené imunitní reakce rozpoznáním PAMP (patogenem asociované molekulární vzory) nebo DAMP

(danger-associated molekulární vzory) cirkulujících v krevním řečišti. Vazba na PAMP nebo DAMP zahajuje aktivační dráhu nukleárního faktoru  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), po níž následuje transkripce a sekrece prozánětlivých cytokinů [ 11 ]. Z 10 členů rodiny TLR v lidských buňkách je TLR4 hlavním receptorem pro rozpoznávání gramnegativních bakteriálních lipopolysacharidů (LPS) [ 12 ]. Následná signalizace TLR4/NF- $\kappa$ B je důležitým obranným mechanismem hostitele k odstranění bakteriální infekce. Nadměrná aktivace TLR4/NF- $\kappa$ B však může nastat v reakci na vysoké hladiny LPS a vést k fatálnímu septickému šoku [ 13 ]. Podobná závažná nadměrná aktivace dráhy TLR4/NF- $\kappa$ B byla implikována u kritických pacientů s COVID-19 [ 14 ]. Ukázalo se, že spike protein SARS-CoV-2 (podjednotka S1) interaguje s TLR4 [ 14 , 15 , 16 ] a spouští dysregulovaný nárůst zánětlivých cytokinů srovnatelný s nárůstem indukovaným LPS v lidských monocytových buněčných liniích [ 14 , 16 ].

Nedávno bylo navrženo použití fotobiomodulační terapie (PBM) jako možná léčba hyperzánětlivých cytokinových bouří vyvolaných u pacientů s COVID-19 [ 17 , 18 ]. PBM, která zahrnuje lékařské použití světla s nízkou intenzitou, se používá již více než 100 let jako neinvazivní, bezpečná a účinná léčba, při které je nemocná tkáň vystavena několika minutám dlouhovlnného červeného nebo infračerveného světla, opakovaně jednou nebo dvakrát denně. PBM byla prokázána klinicky účinná u osteoartrózy [ 19 ]; hojení kostí [ 20 ] a ran [ 21 ]; a pro další stavy se základním zánětem, jako je tyreoiditida [ 22 ], psoriáza a chronická bolest [ 23 ]. V souladu se svými protizánětlivými účinky bylo prokázáno, že léčba PBM potlačuje sekreci prozánětlivých cytokinů a deaktivuje inflammasom v různých buněčných kulturách a modelech onemocnění zvířat [ 19 , 23 , 24 , 25 ]. Výhodou PBM oproti jiným formám terapie je absence vedlejších účinků a možnost cíleně se zaměřit na nemocnou tkáň. Významné je, že PBM byla také hlášena jako účinná proti ALI a dalším plicním zánětlivým stavům na zvířecích modelech [ 24 , 26 , 27 ], což je v souladu s přínosy léčby patologie související s COVID-



19. Ve skutečnosti bylo na vrcholu nedávné pandemie provedeno několik kazuistik a klinických studií malého rozsahu s použitím PBM k léčbě hyperzánětlivých cytokinových bouří u hospitalizovaných pacientů s COVID-19 s povzbudivými předběžnými výsledky [ [28](#) , [29](#) , [30](#) , [31](#) ]. Konečně, s použitím lidské TLR4 reportérové modelové buněčné linie, předchozí práce našeho vlastního týmu ukázala, že expozice NIR světlu může být účinná při léčbě zánětu závislého na TLR4 typu indukovaného SARS-CoV-2, čímž se snižuje sekrece zánětlivého cytokinu IL-6 o téměř 80 % během pouhých dvou dnů léčby PBM [ [32](#) , [33](#) ].

Navzdory těmto slibným indikacím však léčba PBM obecně dosud nebyla přijata v hlavním proudu. Mechanismus účinku není pochopen a protokoly a výsledky expozice PBM jsou značně nejednotné [ [23](#) ]. V současné době panuje shoda, že červené/infrachervené světlo je absorbováno mitochondriální cytochrom C oxidázou, což vede ke zvýšení mitochondriální funkce. Výsledné zvýšení ATP, cyklického AMP, toku vápníku, oxidu dusnatého (NO) a aktivace hypoxií indukovatelného faktoru 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) a dalších transkripčních faktorů byly různě navrženy jako mediátory terapeutických účinků PBM [ [23](#) [34](#) ]. Dalším návrhem bylo, že buněčný ROS indukovaný expozicí PBM může modulovat imunitní odpověď a vysvětlit protizánětlivé účinky PBM [ [35](#) , [36](#) ]. Pro tyto hypotézy však zatím neexistují žádné přímé důkazy a současné terapeutické protokoly jsou z velké části otázkou pokusů a omylů.

Zde se zabýváme dvěma hlavními nevyřešenými problémy týkajícími se účinnosti terapie PBM při léčbě hyperzánětu vyvolaného COVID-19. Nejprve jsme ověřili, že PBM je účinný při downregulaci zánětlivé reakce závislé na TLR4 u dvou buněčných typů nejvíce přímo ovlivněných COVID 19: primárních lidských alveolárních buněk typu II (HAEC) a lidské makrofágové buněčné linie (THP-1).

Za druhé jsme zjistili, že ROS hraje ústřední roli v základním mechanismu, který se podílí na těchto protizánětlivých účincích. Ukazujeme, že NIR světlo indukuje přechodné zvýšení buněčného H

$H_2O_2$  a že exogenní aplikace  $H_2O_2$  do buněčných kultur dosahuje identické downregulace zánětlivé dráhy. Proto je modulace ROS expozicí NIR světlu nezbytná a dostatečná k vysvětlení těchto protizánětlivých účinků. Jsou diskutovány širší důsledky pro případnou léčbu zánětlivých infekčních onemocnění.

## 2. Materiály a metody

---

### 2.1. Buněčné linie a kultury

---

Lidské alveolární epitelální buňky typu II (HAEC) izolované z lidské normální plicní tkáně byly zakoupeny od AcceGen (AcceGen Biotech, Fairfield, NJ, USA) a kultivovány v HAEC medium kit podle instrukcí výrobce. Buněčná linie HEK293 lidské embryonální ledviny byla laskavě poskytnuta profesorem B. Friguetem (Sorbonne Université, Paříž, Francie) a pěstována v Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (Merck, Darmstadt, Německo), doplněná L-Alanyl-L-Glutaminem (0,4 g/l) a 10% teplem inaktivované fetální telecí sérum (FCS) (Gibco, Dublin, Irsko). HEK-BLUE-hTLR4 stabilně exprimující lidský TLR4 a indukovatelný reportérový gen SEAP (sekretovaná embryonální alkalická fosfatáza) byl zakoupen od InvivoGen (San Diego, CA, USA) a pěstován v Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) – s vysokým obsahem glukózy (Merck), doplněné 10% tepelně inaktivovaným FCS a směsí antibiotik (HEK-Blue™ Selection) pro perzistentní expresi transgenů. Buněčnou linii lidské monocytární leukémie (THP-1) laskavě poskytl Dr. S. André (Sorbonne Université, Paříž, Francie) a udržovala ji v RPMI 1640 (Gibco) doplněném 10% tepelně inaktivovaným FBS, 100 jednotkami/ml penicilinu a 100 ug/ml streptomycinu. THP-1 byl pěstován do hustoty 500 000 buněk/ml a použit pro experimenty mezi pasážemi číslo 5 a 10. Všechny buňky byly kultivovány ve zvlhčené atmosféře v inkubátoru 95% vzduch-5% CO<sub>2</sub> při 37 °C.

### 2.2. Exprese a purifikace rekombinantního spike proteinu SARS-CoV-2

---

Plazmid pCMV kódující rodový kmen Wuhan-Hu-1 SARS-CoV-2 Spike (S) glykoproteinová ektodoména, NR-52421, byl poskytnut

Davidem Veesslererem pro distribuci prostřednictvím BEI Resources, NIAID, NIH. NR-52421 byl navržen pomocí kodonové optimalizace S glykoproteinové ektodomény (zbytky 14 až 1211) pro savčí expresi, fúzovaný s N -koncovou mu-fosfatázovou signální sekvencí a C-koncovou trimerizační foldonovou doménou a okta-histidinovou značkou [ 37 ]. Glykoproteinová ektodoména SARS-CoV-2 Spike byla produkována transfekcí NR-52421 v buněčné linii HEK293 lidské embryonální ledviny, purifikována pomocí afinitní chromatografie na niklu (Ni-NTA agaróza) a napuštěna do fyziologického roztoku pufovaného fosfátem (PBS), pH 7.4.

### **2.3. Aktivace zánětlivé signální dráhy TLR4/NF-KB a expozice blízkému infračervenému záření**

---

Buňky HEK-Blue™-hTLR4 byly nasazeny v hustotě  $1,3 \times 10^7$  buněk na  $22,1 \text{ cm}^2$  destičky a stimulovány 100 ng/ml LPS z Escherichia coli 0111:B4 (LPS-B4 Ultrapure; Sigma Aldrich, Saint-Quentin -Fallavier, Francie) k indukci zánětlivé dráhy TLR4/NF-KB. HAEC byly nasazeny v hustotě  $5 \times 10^5$  buněk na  $22,1 \text{ cm}^2$  plotny a stimulovány 1 ug/ml LPS. Lidské buňky THP-1 byly nasazeny v hustotě  $10^7$  buněk na  $22,1 \text{ cm}^2$  misky a inkubovány s 50 nM PMA (Merck) po dobu 48 hodin pro diferenciaci na fenotyp makrofágů. Po 48 hodinách bylo médium obsahující PMA nahrazeno čerstvým médiem a buňky byly ponechány v klidu v kultuře po dobu 24 hodin před stimulací pomocí 100 ng/ml LPS (100 nM) nebo 10 nM spike glykoproteinové ektodomény SARS-CoV-2. Den po aktivaci TLR4/NF-KB byly všechny buňky vystaveny blízké infračervené expozici pomocí žárovky Cool-IR 730 nm získané od Synlyte, 91300 Massy Palaiseau, FR ( [www.synlyte.com](http://www.synlyte.com) , přístupné 28. září 2023), při intenzitě  $6 \text{ W/m}^2$  v poloze článků. Infračervené ošetření bylo aplikováno po dobu 10 minut každých 12 hodin po celkovou dobu 48 hodin (pro buňky HEK-Blue™-hTLR4 a HAEC) nebo 96 hodin (pro THP-1). Aby se udržela aktivace TLR4/NF-KB během celého experimentu, bylo provedeno dodatečné posílení LPS nebo S ve dnech 2 a 3 (pro HEK-Blue™-hTLR4 a HAEC) nebo ve dnech 6, 7 a 8 (pro THP-1 ) experimentu. Kontrolní podmínky byly provedeny

stejným způsobem a vzorek byl kultivován ve tmě bez infračerveného osvětlení.

#### 2.4. Světelný zdroj a podmínky expozice

---

Expozice blízkému infračervenému (NIR) světlu bylo dosaženo pomocí 730 nm Synlyte PulseIR Custom LED lampy (<https://synlyte.com/product/synlyte-tm-pulseir-custom-led-lamp-750-e/>, přístupné dne 28. září 2023). Optimální podmínky světelné expozice byly definovány již dříve [ 32 , 33 ]. Stručně, lampa byla umístěna ve vzdálenosti 20 cm nad buňkami a nastavena na fluence  $6 \text{ W/m}^2$  na úrovni buněk pro celkovou dobu kontinuální expozice světla 10 minut.

#### 2.5. Měření kolísání teploty buňky v reálném čase během expozice NIR

---

Monitorování kolísání teploty článku v reálném čase bylo dosaženo pomocí komerčně dostupného vodotěsného digitálního teplotního senzoru DS18B20 připojeného k zakázkově vyrobenému elektronickému zařízení, které má na starosti záznam teploty každou sekundu. Zařízení je založeno na prototypové desce Lolin D32 od Wemos, založené na mikrokontroléru Espressif ESP32-WROOM-32, včetně originálního kódu implementovaného v Micro Pythonu. Kód obsahuje algoritmus časové korekce založený na době provádění zpracování, což nám umožňuje zajistit, aby byla teplota odečítána v průměru každých  $1000 \text{ ms} \pm 2 \text{ ms}$ . Uvnitř inkubátoru byl teplotní senzor ponořen do buněčného kultivačního média a záznam teploty začal 20 minut před expozicí NIR, během 10minutové expozice a pokračoval 20 minut po ukončení expozice. Data byla během experimentu uložena lokálně na SD kartu v zařízení ve formátu CSV.

#### 2.6. Kvantitativní RT-PCR analýza zánětlivých cytokinů a genů antioxidantních enzymů

---

Tři hodiny po posledním zesílení protokolu expozice NIR světlu byla z buněk HAEC nebo THP-1 extrahována celková RNA pomocí soupravy Total RNA Miniprep Kit (New England Biolabs, Evry, Francie), podle pokynů výrobce. cDNA byla syntetizována z  $1 \mu\text{g}$

celkové RNA za použití soupravy ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs, Evry, Francie). Kvantitativní RT-PCR byla provedena pomocí Luna qPCR master mix (New England Biolabs, Evry, Francie). Specifické primery jsou uvedeny v doplňkové tabulce S1. Mastercycler® RealPlex2 (Eppendorf, Evry-Courcouronnes, Francie) byl použit k provedení amplifikace za následujících podmínek tepelného cyklování: denaturace při 95 °C po dobu 1 minuty, po které následovalo 40 cyklů denaturace při 95 °C po dobu 15 s a žíhání a prodloužení při 60 °C po dobu 45 sekund. Disociační křivka pro každou jamku byla provedena spuštěním následujícího programu: 95 °C po dobu 15 s, 60 °C po dobu 15 s a 60 až 95 °C při 2 °C/min. Získané hodnoty Ct (prahová hodnota cyklu) cílových genů byly normalizovány na provozní gen NAPDH a k výpočtu násobných změn byla použita metoda  $2^{-\Delta\Delta CT}$  [38]. Pro každý gen byly provedeny tři biologické replikáty (n = 3).

## **2.7. Detekce sekrece IL-6 pomocí ELISA**

---

Šest hodin po posledním boostu protokolu expozice NIR světlu byly HAEC a buněčné supernatanty THP-1 sklizeny a IL-6 vylučovaný do média během posledních 6 hodin experimentu byl měřen pomocí soupravy Human IL-6 DuoSet ELISA, podle pokynů výrobce (R&D SYSTEMS značky Bio-Techne, San Jose, CA 95134, USA).

## **2.8. Měření mitochondriálního vápníku (Ca<sup>2+</sup>)**

---

Buňky HEK-Blue™-hTLR4 byly nasazeny na černé 96-jamkové destičky s čirým dnem v hustotě očkování 1,25 x 10<sup>4</sup> buněk na jamku, stimulovány 100 ng/ml LPS a podrobny protokolu expozice NIR světlu, jak je popsáno výše. Po ošetření byly buňky obarveny 20 uM Rhod2 (ThermoFisher, Abingdon, UK) a inkubovány po dobu 30 minut při 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a chráněny před světlem. Destičky byly odečítány při 552/581 nm em/ex (FLUOSTar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Německo). Mitochondriální hladiny Ca<sup>2+</sup> byly vyjádřeny jako procento kontroly bez LPS.

## **2.9. Měření mitochondriálního membránového potenciálu**

---

Buňky HEK-Blue™-hTLR4 byly nasazeny na černé 96-jamkové destičky s čirým dnem v hustotě očkování  $1,25 \times 10^4$  buněk na jamku, stimulovány 100 ng/ml LPS a podrobny protokolu expozice NIR světlu, jak je popsáno výše. Po ošetření byly buňky obarveny 500 nM tetramethylrhodaminem a ethyl esterem (TMRE), (Sigma, Dorset, UK) a inkubovány po dobu 30 minut při 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a chráněny před světlem. Destičky byly odečítány při 549/575 nm em/ex (FLUOSTar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Německo). Potenciály mitochondriální membrány byly vyjádřeny jako procento kontroly bez LPS.

#### **2.10. Měření mitochondriální funkce pomocí testu SeaHorse MitoStress**

---

Buňky HEK-Blue™-hTLR4 byly nasazeny na 24-jamkové destičky SeaHorse MitoStress Assay (Agilent, Wokingham, UK) s hustotou naočkování  $1,25 \times 10^4$  buněk na jamku, stimulovány 100 ng/ml LPS a podrobny NIR protokol světelné expozice, jak je popsáno výše. Po ošetření byly buňky promyty a inkubovány v médiu SeaHorse Assay doplněném glukózou (konečná koncentrace 4500 mg/l), pyruvátém sodným a l-glutaminem při pH 7,4 po dobu 1 hodiny při 37 °C.

Rychlost spotřeby kyslíku (OCR) byla měřena pomocí SeaHorse XF<sub>E</sub> Flux Analyzer za základních podmínek, po kterých následovaly sekvenční injekce oligomycinu (konečná koncentrace 2 uM), FCCP (3 uM), antimycinu (1 uM) a rotenonu (1 uM), umožňující stanovení bazální a maximální rychlosti mitochondriálního dýchání, jakož i volné kapacity, produkce ATP a nemitochondriálního dýchání. Po testu byl OCR normalizován na celkový obsah proteinu, stanoven pomocí Bradfordova testu a vyjádřen jako procento kontroly bez LPS.

#### **2.11. Intracelulární detekce a kvantifikace ROS**

---

HAEC byly nasazeny do komůrek pro pozorování buněk, stimulovány 1 ug/ml LPS a podrobny expozici NIR světlu po dobu 10 minut každých 12 hodin po celkovou dobu 48 hodin, jak je popsáno výše. V uvedených časech během protokolu expozice NIR světlu byly živé HAEC inkubovány ve 40 mM pufru fosforečnanu

draselného (pH 7) obsahujícím 12,5  $\mu\text{M}$  DCFH-DA (Molecular Probes od Thermo Fisher Scientific, Illkirch, Francie) po dobu 15 minut v 95% vzduchu. –5%  $\text{CO}_2$  inkubátor při 37 °C. Poté byly buňky opláchnuty v roztoku pufru fosforečnanu draselného a okamžitě pozorovány pomocí inverzního mikroskopu Leica TCS SP5 vybaveného termostatickou pozorovací komůrkou 5 %  $\text{CO}_2$  –37 °C a s použitím objektivu 40 $\times$ . Zelená fluorescence z DCFH-DA byla excitována při vlnových délkách 488 nm a úrovně emisní fluorescence byly detekovány pomocí fotonásobiče mezi 498 a 561 nm. Projekce řady Z a kvantifikace intenzity fluorescence byly provedeny pomocí softwaru ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij> , přístupné 28. září 2023). Byla nakreslena zájmová oblast (ROI) odpovídající buňkám a v každé ROI byla změřena průměrná intenzita fluorescence (MFI).

## 2.12. Analýza ROS z buněčného extraktu pomocí HPLC

---

Buňky HEK-Blue™-hTLR4 byly nasazeny v hustotě 10<sup>6</sup> buněk na 22,1 cm<sup>2</sup> destičky , stimulovány 100 ng/ml LPS po dobu 24 hodin a vystaveny působení světla NIR po dobu 10 minut. Ihned po expozici NIR světlu byly buňky jednou promyty 100  $\mu\text{M}$  DTPA (kyselina diethylentriaminpentaoctová) v PBS a inkubovány s 1 ml PBS–100  $\mu\text{M}$  DTPA–100  $\mu\text{M}$  DHE (dihydroethidium) po dobu 30 minut při 37 °C. Buňky byly poté sklizeny a dvakrát promyty studeným PBS–DTPA centrifugací (1000 g, 5 min, 4 °C) a buněčné pelety byly resuspendovány v 0,5 ml studeného acetonitrilu, sonikovány (10 s, 1 cyklus při 8 W) a centrifugována (12 000 x g po dobu 10 min při 4 °C). Supernatanty byly sklizeny a sušeny ve vakuu (Speed Vac Plus model SC-110A, Thermo Savant) a vysušené oxidační produkty byly udržovány při -80 °C ve tmě až do analýzy. Pro analýzu byly vzorky resuspendovány ve 200  $\mu\text{l}$  PBS/DTPA a injikovány (100  $\mu\text{l}$  na injekci vzorku) do systému HPLC (Shimadzu, Marne la Vallée, Francie). Dva hlavní oxidační produkty odvozené od DHE byly detekovány pomocí fluorescenční excitace při 396 nm/emise při 567 nm pro

detekci 2-hydroxyethidia (2-E<sup>+</sup> OH), která odrážela superoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), a excitace při 510 nm/emise při 567 nm pro detekci ethidia (E<sup>+</sup>), která odráží peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Analýza výsledků byla provedena podle protokolu popsaného v [ 39 ]. Je důležité zdůraznit, že všechny naše experimenty byly provedeny v nepřítomnosti okolního světla, aby se zabránilo interferenci světla s infračerveným ošetřením. Výsledky byly normalizovány na celkový obsah proteinů, stanoveny pomocí soupravy DC Protein Assay od Bio-Rad Laboratories (Mississauga, ON, Kanada) a vyjádřeny jako n mol EOH nebo E/μ mol DHE.

### **2.13. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versus léčba světlem NIR a kvantifikace SEAP pro monitorování zánětlivé dráhy TLR4/NF-KB v buňkách HEK-Blue™-hTLR4**

---

Buňky HEK-Blue™-hTLR4 byly nasazeny v hustotě 2 x 10<sup>4</sup> buněk na jamku na 96-jamkové destičky a stimulovány 100 ng/ml LPS pro indukci zánětlivé dráhy TLR4/NF-KB. Negativní kontrolní kultury byly získány přidáním fyziologického roztoku pufovaného fosfátem (PBS) ve stejném objemu jako LPS. Po přidání LPS byly buněčné kultury inkubovány po dobu dalších 16 hodin před zahájením příslušného ošetření (expozice NIR světlu nebo přidání 50 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Obě léčby byly opakovány jednou za 12 hodin, během 48hodinového zkušebního období. Každá podmínka byla opakována 5krát. Následující den byl měřen zánět stanovením enzymové aktivity reportérového genu sekretované alkalické fosfatázy (SEAP), jak bylo popsáno dříve [ 33 ]. Stručně řečeno, 20 ul bezbuněčných supernatantů z každého z pěti opakování bylo smícháno se 180 ul detekčního roztoku QUANTI-Blue (Invivogen), který obsahuje AP kolorimetrický substrát, a inkubováno v souladu se specifikacemi výrobce při 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, po dobu 20 minut v čerstvé 96-jamkové destičce. Hladiny secernované alkalické fosfatázy byly měřeny při absorbanci detekčního roztoku při 620 nm pomocí Epoch microplate reader (BioTek, Winooski, VT, US) a byly normalizovány na celkovou koncentraci proteinu (pomocí soupravy DC Protein Assay od Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Kanada). Hodnoty z pěti duplicitních jamek byly zprůměrovány pro získání jediného



experimentálního datového bodu. Účinky ošetření H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a NIR světlem jsou vyjádřeny jako procento zánětlivé reakce dosažené po indukci LPS v neošetřených buňkách.

## 2.14. Statistická analýza

---

Data byla analyzována pomocí GraphPad Prism verze 7.4.2 pro Mac (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± standardní chyba průměru (SEM). Data byla analyzována na normalitu pomocí Shapiro–Wilkova testu a na rovnost skupinových rozptylů pomocí Brown–Forsythe testu. Rozdíl mezi léčenými a neléčenými stavy byl porovnáván pomocí dvoucestné analýzy ANOVA s Tukeyovým srovnávacím testem. Rozdíly byly považovány za statisticky významné s následujícími hodnotami p : \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

## 3. Výsledky

---

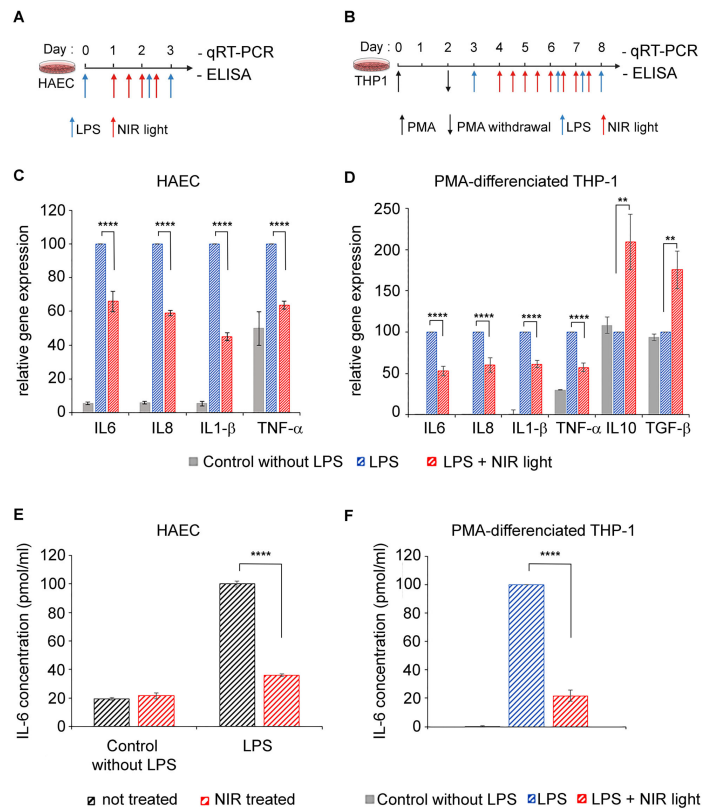
### 3.1. Vystavení světlu NIR snižuje zánět v primárních lidských alveolárních a makrofágových buňkách

---

V závažných případech COVID-19 jsou typy buněk zprostředkovávající dysregulovanou vrozenou imunitu, vedoucí k cytokinové bouři, alveolární epiteliální buňky typu II a také rezidentní a rekrutované makrofágy [ [8](#) , [9](#) ]. Proto jsme testovali protizánětlivé vlastnosti blízkého infračerveného světla na dvou fyziologicky relevantních buněčných modelech: primárních lidských alveolárních buňkách typu II (HAEC) a diferencovaných makrofágových buněčných liniích (THP-1). Zánětlivá reakce závislá na TLR4/NF-κB dráze byla indukována LPS v obou buněčných kulturách, v den 0 pro HAEC ( [obrázek 1 A](#) ) a po diferenciaci v den 3 pro buňky THP-1 ( [obrázek 1 B](#) ). Pro udržení zánětlivého stavu byl LPS opět přidán 2. den (k HAEC) a 6., 7. a 8. den (k THP-1 buňkám). Počínaje 24 hodinami po indukci LPS byly zanícené buněčné kultury vystaveny NIR světlu při proudění 6 W/m<sup>2</sup> po dobu 10 minut. Tato expozice byla opakována ve 12-hodinových intervalech během dvou dnů (pro celkem čtyři expozice) pro HAEC a po dobu čtyř dnů (pro celkem

osm expozic) pro buňky THP-1. Dvanáct hodin po poslední expozici NIR světlu byly buňky stimulovány konečným boosterem LPS a zánětlivá odpověď byla měřena pomocí analýzy exprese genu cytokinů qRT-PCR ( obrázek 1 C, D ) a také pomocí ELISA sekrece IL-6 ( Obrázek 1D ).

**Obrázek 1.** Vliv ošetření světlem NIR na polarizaci zánětlivých cytokinů a makrofágů. Schématický diagram LPS-indukované aktivace TLR4/NF-KB zánětlivé dráhy a ošetření NIR světlem v ( **A** ) HAEC a ( **B** ) PMA-diferencované THP-1 makrofágové buněčné linii. ( **A** ) HAEC byly indukovány LPS pro zánětlivou reakci a udržovány v zaníceném stavu po dvou dalších boosterech LPS (modré šipky) a podrobeny krátkým 10minutovým intervalům expozice NIR světlu (červené šipky), opakovaným jednou za 12 hodin, během 48hodinové zkušební doby. ( **B** ) PMA-diferencovaná THP-1 buněčná linie makrofágů byla LPS-indukována pro zánětlivou odpověď a udržována v zaníceném stavu po třech dalších LPS boosterech (modré šipky) a vystavena krátkým 10minutovým intervalům expozice NIR světlu (červené šipky), opakující se jednou za 12 hodin, během 96hodinového zkušební období. ( **A, B** ) Buňky kultivované bez LPS indukce byly použity jako kontroly. Pro kvantifikaci transkripce cytokinového genu prostřednictvím qRT-PCR byly všechny buňky sklizeny 3 hodiny po posledním LPS boosteru. Pro ELISA kvantifikaci sekrece IL6 byly buněčné supernatanty sklizeny 6 hodin po posledním boosteru LPS. ( **C** ) Genová exprese zánětlivých cytokinů pro kontrolní buňky



HAEC (šedé sloupce) a HAEC indukované LPS s (červené sloupce) nebo bez (modré sloupce) ošetřením NIR světlem. ( **D** ) Genová exprese zánětlivých a protizánětlivých cytokinů pro kontrolní buňky THP-1 (šedé sloupce) a THP-1 indukované LPS s (červené sloupce) nebo bez (modré sloupce) ošetřením NIR světlem. Měření uvolňování proteinu IL-6 pomocí ELISA z ( **E** ) kontrolních a LPS-indukovaných HAEC neošetřených (černé sloupce) nebo ošetřených světlem NIR (červené sloupce) a z ( **F** ) kontrolních buněk THP-1 (šedé sloupce) a LPS-indukovaný THP-1 s (červené pruhy) nebo bez (modré pruhy) ošetřením NIR světlem. Pro ( **C** , **D** ),  $n = 4$  až  $6$ . Pro ( **E** , **F** ),  $n = 3$ . Pro ( **C** – **F** ) jsou data zobrazena jako standardní chyba průměru  $\pm$  SEM; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

V kulturách HAEC a THP-1 indukoval LPS zvýšení genové exprese zánětlivých cytokinů IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$  ( obrázek 1 C, D; porovnejte genovou expresi kontroly a LPS- stimulované buňky). V makrofázích jsou tyto expresní profily charakteristické pro prozánětlivou (M1) polarizaci. Ošetření terapeutickým světlem NIR však vedlo k významnému snížení všech testovaných prozánětlivých cytokinových genových markerů ( obrázek 1 C, D; porovnejte LPS-stimulované se vzorky LPS-stimulované + NIR buněk).

Nejzajímavější je, že exprese protizánětlivých cytokinů IL10 a TGF- $\beta$  byla skutečně zvýšena po expozici NIR světlu ( obrázek 1 D). To ukazuje, že expozice NIR světlu nejenže působí proti zvýšené transkripci zánětlivých cytokinů indukované prostřednictvím vrozeného imunitního systému závislého na TLR4, ale také podporuje fenotypový přechod makrofágů z prozánětlivého M1 k protizánětlivému fenotypu M2, který se účastní řešení a opravy zánětu. [ 40 , 41 ].

Cytokin IL-6 byl identifikován jako nejhojnější zánětlivý cytokin hromadící se u pacientů s COVID-19 a nejškodlivější v progresi onemocnění [ 42 , 43 ]. Zkoumali jsme proto hladiny secernovaného IL-6 v kultivačních supernatantech buněk HAEC i THP-1 pomocí ELISA ( obrázek 1 E, F). Kontrolní HAEC, které nebyly stimulovány LPS, produkovaly pouze malou hladinu sekretovaného IL-6.

Následná expozice NIR světlu nezměnila hladiny sekrece IL-6 detekované v těchto kontrolních buňkách (viz obrázek 1E). To ukazuje, že ošetření světlem NIR neovlivňuje dráhu odezvy nezanícených buněk. Stimulace LPS indukovala významné zvýšení sekrece IL-6 (obrázek 1 E), jak se očekávalo. V tomto případě však expozice NIR světlu měla dramatický účinek na sekreci IL-6. Ve skutečnosti byly hladiny sekrece IL-6 sníženy blízko kontrolním hladinám pozadí, což ukazuje na téměř úplnou inhibici hyperzánětlivé odpovědi v těchto buňkách (obrázek 1 E). Podobné výsledky byly získány v případě makrofágových buněčných kultur THP-1, kde ošetření světlem NIR vedlo k pětinasobnému snížení hladin secernovaného IL-6 (obrázek 1 F). Významné je, že inhibice sekrece IL-6 (70–80 %) byla výraznější než inhibice exprese genu IL-6 (30–50 % – obrázek 1 C, D), což naznačuje, že světlo NIR působí proti buněčné zánětlivé dráze při více signalizačních kroků a působí během několika dní.

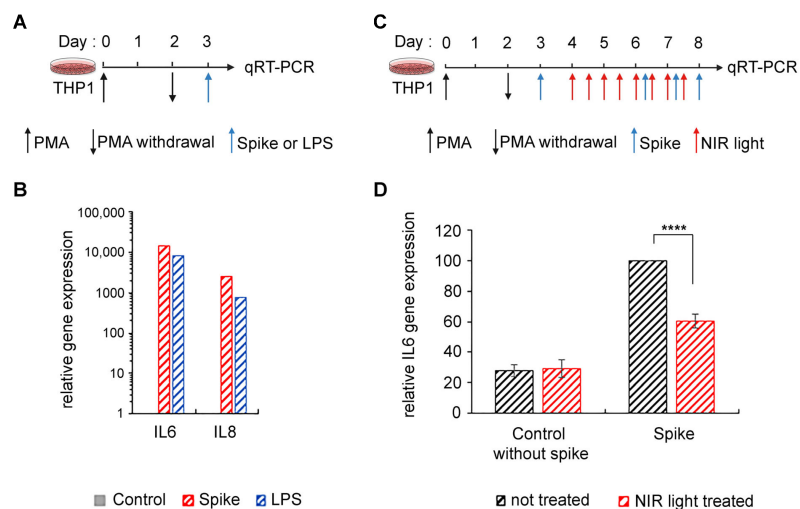
Abychom vyloučili možnost, že by efekty NIR světla mohly být způsobeny zvýšením teploty, měřili jsme kolísání teploty buněk v reálném čase jednou za sekundu během 10minutové expozice NIR světlem a také 20 minut před zapnutím NIR světla a 20 minut. min po jeho vypnutí. Výsledky popsané na doplňkovém obrázku S1 ukazují stabilní teplotu  $36,81\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,07$ , která zůstává stabilní až 20 minut po ukončení expozice NIR světlu. To jasně ukazuje, že expozice NIR nezvyšuje teplotu buněčného média. Účinky expozice NIR jsou proto výhradně způsobeny světlem.

### **3.2. Vystavení světlu NIR snižuje zánět vyvolaný Spike proteinem SARS-COV-2**

---

Z důvodů pohodlí jsme my a další použili LPS, archetypálního agonistu PAMP, pro studie in vitro nebo in vivo vyžadující stimulaci signální dráhy TLR4. To se zdá rozumné, protože v minulých studiích bylo prokázáno, že spike protein SARS-CoV-2 se váže přímo na TLR4 a spouští zánět identický se zánětem v buňkách stimulovaných jinými ligandy TLR-4 typu PAMP nebo DAMP [ 14 , 15 , 16 , 44 ]. Abychom ověřili, že náš přístup byl skutečně platný pro

léčbu zánětu vyvolaného SARS-CoV-2, zkoumali jsme, zda k protizánětlivým účinkům expozice NIR světlu na naše buněčné kultury také došlo, když byl zánět spuštěn virovým spike proteinem. Syntetizovali jsme protein SARS-CoV-2 S v eukaryotickém expresním systému, abychom dosáhli vhodné posttranslační modifikace s N -vázanými glykany, které vyčnívají z povrchu trimeru [ 45 , 46 ]. Tato metoda také vyloučila možnost kontaminace LPS. S použitím ektodomény SARS-CoV-2 S ke spuštění zánětu ( obrázek 2 A ) jsme viděli výraznou stimulaci exprese prozánětlivých cytokinů v diferencovaných makrofázích THP-1 ( obrázek 2 B ), v souladu s předchozími zprávami [ 14 , 15 ]. Navíc tato stimulace byla ekvivalentní úrovní získaným po expozici LPS ( obrázek 2 B ). Dále jsme zkoumali účinek NIR světla na zánětlivou odpověď v těchto makrofázích ( obrázek 2 C ). Účinek ošetření světlem NIR na expresi genu zánětlivého cytokinu IL-6 byl prakticky identický s výsledky získanými za použití LPS jako induktoru ( obrázek 2 D ).



**Obrázek 2.** Účinek ošetření NIR světlem na SARS-CoV-2 spike-indukovaný zánět v makrofágové THP-1 buněčné linii. ( **A** ) Schematický diagram experimentu: PMA-diferencovaná THP-1 buněčná linie makrofágů byla aktivována spike proteinem SARS-CoV-2 nebo LPS po dobu 3 hodin a sklizena pro qRT-PCR pro stanovení ( **B** ) spike (červené sloupce) a LPS (modré sloupce) indukce transkripce genů IL6 a IL8 ve srovnání s kontrolními buňkami bez aktivace (šedé sloupce). ( **C** ) Schematický diagram pro

aktivaci vyvolanou hroty a ošetření NIR světlem v PMA-diferencované THP-1 makrofágové buněčné linii. Buňky byly indukovány spike pro zánětlivou reakci a udržovány v zaníceném stavu třemi dalšími spike-boosty (modré šipky) a podrobeny krátkým 10minutovým intervalům expozice NIR (červené šipky), opakujícím se jednou za 12 hodin, po dobu 96 hodin zkušební doba. Buňky byly sklizeny 3 hodiny po posledním spike boost a podrobeny expresi genu ( **D** ) IL6 prostřednictvím qRT-PCR. Pro ( **D** )  $n = 3$  a data jsou uvedena jako standardní chyba průměru  $\pm$  SEM; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Stručně řečeno, léčba světlem NIR je účinná při downregulaci zánětlivé reakce závislé na TLR4 bez ohledu na to, jak byla indukována, ať už proteinem SARS-CoV-2 S nebo jinými induktory, které aktivují dráhu TLR4/NF- $\kappa$ B (jako je LPS ). Proto se v této studii LPS používá zaměnitelně se SARS-CoV-2 S jako elicitor ke spuštění zánětlivé reakce.

### **3.3. Vystavení světlu NIR stimuluje mitochondriální metabolickou aktivitu**

---

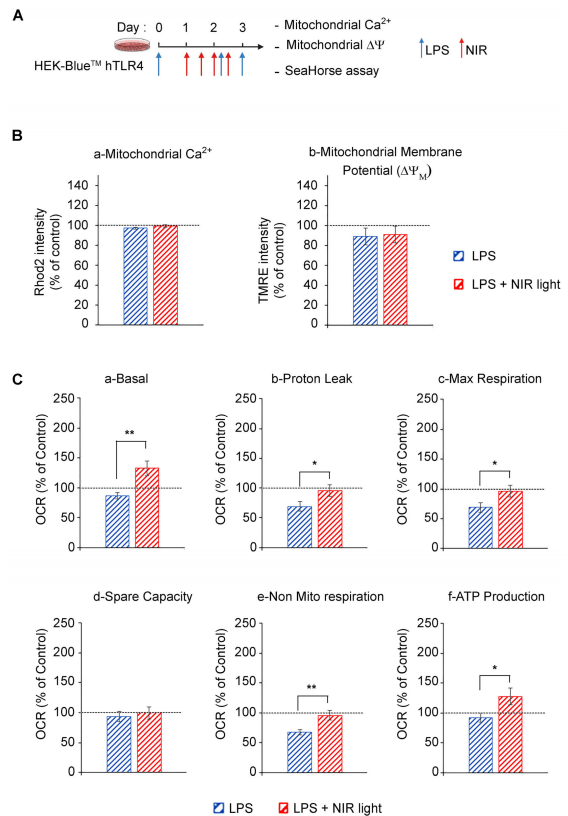
Je široce přijímáno, že mitochondriální cytochrom C oxidáza z komplexu IV elektronového transportního řetězce (ETC) je buněčným fotoakceptorem fotobiomodulačního světla (červené a NIR vlnové délky), což vede ke stimulaci mitochondriální oxidativní fosforylace (OXPHOS), zvýšené produkci ATP a přechodné zvýšení ROS v řadě experimentálních systémů [ 23 , 47 , 48 , 49 ]. V souladu s tím jsme ověřili, zda expozice NIR světlu měla vliv na mitochondriální aktivitu v buněčných kulturách indukovanou pro zánětlivou reakci závislou na TLR4 ( obrázek 3 ). V této analýze jsme použili HEK-Blue <sup>TM</sup> hTLR4 modelové buněčné kultury. Po indukci zánětlivé reakce pomocí LPS byly buňky vystaveny krátkým 10minutovým intervalům vystavení světlu NIR, které se opakovaly každých 12 hodin, během 48hodinového zkušební období (celkem čtyři ošetření vystavením světlu NIR), jak je popsáno na obrázku 3 A a dříve [ 32 , 33 ].

**Obrázek 3.** Vliv NIR světla na mitochondriální funkce. ( **A** )

Schematický diagram experimentu: Buněčné kultury HEK-Blue <sup>TM</sup>

hTLR4 byly indukovány LPS pro zánětlivou reakci (modré šipky) a podrobena krátkým 10minutovým intervalům vystavení světlu NIR (červené šipky), opakujícím se jednou za 12 hodin, během 48hodinové zkušební doby. Po posledním LPS boostu byly buňky podrobena ( **B** ) měření mitochondriálního vápníku a membránového potenciálu a také ( **C** ) měření rychlosti spotřeby kyslíku pomocí SeaHorse MitoStress Assay, za bazálních podmínek ( **a** ) a po přidání inhibitorů (oligomycin, FCCP, antimycin a rotenon) k odvození hodnot úniku protonů ( **b** ), maximálního dýchání ( **c** ), volné kapacity ( **d** ), nemitochondriálního dýchání ( **e** ) a produkce ATP ( **f** ). Pro ( **B** , **C** ),  $n = 7$ , a data jsou uvedena jako standardní chyba průměru  $\pm$  SEM; \*  $p < 0,1$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Dále jsme měřili účinek NIR světla na mitochondriální funkci pomocí testu SeaHorse, ve kterém byly měřeny rychlosti spotřeby kyslíku (OCR) před a po přidání selektivních inhibitorů komplexů dýchacího řetězce I až V. Zánět vyvolaný LPS spustil pokles bazální a maximální mitochondriální dýchání, únik protonů a produkce ATP ve srovnání s kontrolními buňkami, což ukazuje na dysfunkci OXPHOS konzistentní s aktivací signalizace TLR4/TRAF6, která indukuje rozklad ETC komplexu I [ 50 ] ( obrázek 3 C ). Naproti tomu expozice NIR světla zvýšila bazální mitochondriální dýchání, únik protonů a maximální dýchání ve srovnání s neexponovanými buňkami ( obrázek 3 C(a)–(c) ), což ukazuje na zvýšenou regulaci aktivity OXPHOS, potvrzenou zvýšenou produkcí ATP ( Obrázek 3 C(f) ). Důležité je, že nedošlo k žádné změně v mitochondriální rezervní



kapacitě, což naznačuje, že světelný efekt NIR pravděpodobně stimuloval aktivaci samotných enzymů mitochondriálního dýchacího řetězce. Stručně řečeno, expozice NIR světlu významně zlepšuje mitochondriální dýchání a produkci ATP v buňkách indukovaných pro zánětlivou odpověď závislou na TLR-4 po léčebném intervalu několika dnů. To může vést k přímým i nepřímým protizánětlivým účinkům (viz níže).

#### **3.4. Jediný záchvat NIR světelné expozice spouští zvýšenou buněčnou ROS v zanícených buněčných kulturách, ale ne v kontrolních buňkách**

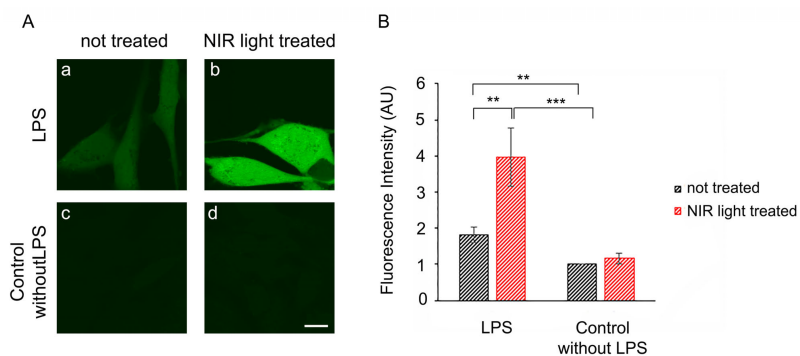
---

Vzhledem k tomu, že mitochondrie reagovaly na prodloužená období expozice NIR světlu, dále jsme hledali bezprostřednější důsledky expozice NIR světlu na mitochondrie, které by mohly vysvětlit protizánětlivé účinky. Vzhledem k tomu, že expozice NIR světlu stimuluje mitochondriální elektronový transportní řetězec, zkoumali jsme, zda by to mohlo vyvolat okamžité, přechodné zvýšení reaktivních forem kyslíku. ROS jsou vysoce reaktivní deriváty kyslíkových radikálů, které byly dlouho považovány za škodlivé pro buňky; nicméně stimulace mírnými, kontrolovanými výbuchy ROS může být pro růst buněk a přežití ve skutečnosti prospěšná. Ve skutečnosti ROS v mírných koncentracích působí jako fyziologické signální meziprodukty k indukci samotných buněčných ochranných mechanismů, které působí proti škodlivým účinkům nadměrného ROS (oxidační stres). Zejména mírná stimulace ROS se ukázala být prospěšná pro kontrolu zánětu (přehledy v [ 35 , 36 , 51 ]). Tento typ mechanismu odezvy, kdy nízké dávky potenciálního toxinu vyvolávají rezistenci k vyšší poškozující dávce, je známý jako „hormetický“ mechanismus a je typický pro mnoho toxinů a určité hormonální signální dráhy [ 52 ].

Zkoumali jsme proto, zda periodická syntéza ROS může být základní příčinou protizánětlivých účinků NIR světla. Nejprve jsme určili, zda jediná 10minutová expozice NIR světlu může vyvolat tvorbu ROS v kultivovaných buňkách. Buňky HAEC, které byly indukovány LPS po dobu 24 hodin, byly vystaveny 10 minutám NIR světlu v přítomnosti barviva DCFH-DA, které fluoreskuje v přítomnosti ROS.



Bezprostředně po světelném pulzu byla fluorescence ROS testována pomocí invertované konfokální mikroskopie živých buněk za použití zavedených metod [ 53 ]. Výsledky ukázaly, že v nezanícených kontrolních buňkách ( obrázek 4 A, panel (c)) byly pouze bazální nízké koncentrace buněčných ROS. Tyto buňky dále nevykazovaly žádnou významnou změnu v ROS po jediném exponování NIR světlu ( obrázek 4 A, srovnání panelů (c) a (d)). Naproti tomu buňky se zánětem indukovaným LPS vykazovaly zvýšené hladiny ROS ( obrázek 4 A, panel (a)) ve srovnání s kontrolními buňkami (panel (c)). Po expozici NIR tyto buňky vykazovaly dramatický a okamžitý nárůst fluorescence ( obrázek 4 A, srovnání panelů (a) a (b)), více než zdvojnásobení celkové buněčné koncentrace ROS, jak bylo potvrzeno kvantifikací ( obrázek 4 B ).



**Obrázek 4.** Okamžitý účinek NIR světla na produkci ROS. ( **A** ) Dvacet čtyři hodin po naočkování a po indukci LPS ( **a** , **b** ) nebo neindukované LPS ( **c** , **d** ) pro aktivaci zánětu byly živé HAEC značeny barvivem DCFH-DA během 10 minut NIR expozice světlu ( **b** , **d** ) nebo během 10 minut bez expozice NIR světlem ( **a** , **c** ) a pozorovány bezprostředně poté pomocí inverzního konfokálního mikroskopu Leica TCS SP5. Obrázky ( **a – d** ) ukazují jeden konfokální z řez, který protíná jádro a jsou reprezentativní pro 3 nezávislé experimenty (  $n = 3$  ). Měřítka je 10  $\mu\text{m}$ . ( **B** ) Intenzity fluorescence byly měřeny buňku po buňce na obrazech promítaných z pomocí ImageJ. Průměrné hodnoty byly získány ze 3 nezávislých experimentů (  $n = 3$  ) a jsou uvedeny jako standardní chyba průměru  $\pm$  SEM; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Stručně řečeno, jediný záchvat vystavení světlu NIR stimuloval významné, přechodné zvýšení ROS v buňkách indukovaných zánětem, ale měl zanedbatelné účinky na kontrolní buněčné kultury.

### 3.5. Vícenásobné po sobě jdoucí záchvaty expozice NIR světlu způsobují pokles intracelulárního ROS

---

Pro snížení TLR4-dependentní zánětlivé reakce je nutné vícenásobné vystavení světlu NIR po dobu 2 dnů. Proto jsme měřili hladiny buněčných ROS v následujících dnech v průběhu celého léčebného protokolu ( obrázek 1 ). Pro tento experiment byly HAEC indukovány LPS v den 0, udržovány v zaníceném stavu a podrobeny krátkým 10minutovým intervalům vystavení světlu NIR, opakujícím se jednou za 12 hodin, během 48hodinového zkušebního období ( obrázek 1 A ). Jako kontrolní stav jsme měřili ROS v buňkách, u kterých nebyl indukován zánět (bez LPS) a zanícených buňkách, které nebyly vystaveny ošetření NIR světlem (LPS) ve stejnou dobu ( obrázek 5 ). Ve dnech 1 a 2 tohoto ošetření byly HAEC testovány na hladiny buněčných ROS 6 hodin po vystavení světlu NIR pomocí fluorescenčního zobrazování DCFH-DA barvivem prostřednictvím konfokální mikroskopie v živých buňkách ( obrázek 5 ). V den 3 byly hladiny ROS testovány 18 hodin po vystavení světlu NIR a 6 po posledním boosteru LPS.

**Obrázek 5.** Vliv dlouhodobé a opakované expozice NIR světlu na produkci ROS. ( **A** ) V den 0 byly HAEC nasazeny a LPS indukovány ( **h** , **i** ) nebo neindukovány ( **a – g** ) pro aktivaci zánětu a podrobeny ( **c** , **f** , **i** ) nebo nebyly vystaveny ( **a** , **b** , **d** , **e** , **g** , **h** ) ke krátkým 10minutovým intervalům expozice NIR světlu, opakovaných jednou za 12 hodin, během 48 hodinového zkušebního období podle experimentálního postupu znázorněného na obrázku 1 A. V den 1 ( **a – c** ), den 2 ( **d – f** ) nebo den 3 ( **g – i** ) po naočkování, které odpovídají 6 h, 6 h a 18 h po poslední expozici NIR světlu, byly živé HAEC značeny barvivem DCFH-DA po dobu 10 min a pozorovány pomocí inverzního konfokálního mikroskopu Leica TCS SP5. Kontrolní buněčné kultury, které nebyly vystaveny NIR světlu, byly ošetřeny stejným způsobem. Měřítka je 10  $\mu\text{m}$ . ( **B** ) Intenzity

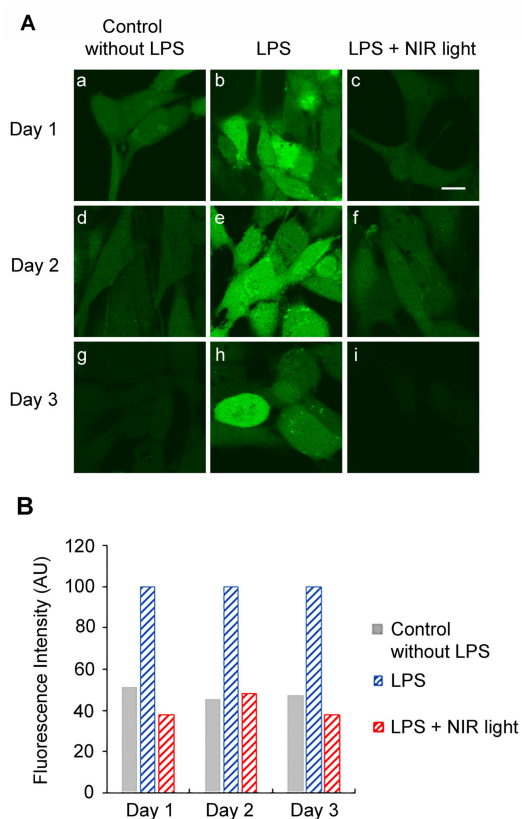
fluorescence byly měřeny buňku po buňce na obrazech promítaných z pomoci ImageJ.

V den 1 byly zvýšené hladiny buněčných ROS v HAEC se zánětem indukovaným LPS ( obrázek 5 A, panel (b)) ve srovnání s nezanícenými kontrolními buňkami ( obrázek 5 A, panel (a)), v souladu s naším předchozím výsledky ( obrázek 4 ). Buňky indukované LPS však vykazovaly významný pokles buněčných ROS měřených 6 hodin po jediném ošetření NIR světlem a dosáhly úrovně srovnatelné s

hladinami v nezanícených kontrolních buňkách ( obrázek 5 A; srovnej panely (b) a (c) ). To bylo ve výrazném kontrastu s dramatickým zvýšením ROS pozorovaným bezprostředně po expozici NIR světlu ( obrázek 4 , srovnání panelů (a) a (b)). Jinými slovy, přechodné zvýšení ROS vyvolané expozicí NIR světlu bylo následováno poklesem na úroveň dokonce pod úroveň před expozicí NIR světlu.

Relevantní druhy ROS, které byly downregulovány expozicí NIR světlu, byly dále charakterizovány pomocí HPLC analýzy buněčných lyzátů, provedené podle protokolů v [ 39 ]. Ukázalo se , že tyto downregulované druhy sestávají primárně z H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> s menší složkou superoxidového radikálu O<sub>2</sub><sup>-</sup> ( doplňkový obrázek S2 ). Obě tyto hladiny byly významně vyšší v zanícených buněčných kulturách a dramaticky se snížily během 1 hodiny po vystavení světlu NIR.

Podobné výsledky byly pozorovány při použití zobrazovacích technik pro dny 2 a 3, ve kterých byly hladiny ROS testovány 6 a 18 hodin po období expozice NIR světlu. V každém případě byly hladiny ROS v buňkách ošetřených světlem NIR (panely (f) a (i)) sníženy na hladiny v kontrolních nezanícených buňkách (panely (f) a (i)). Kromě

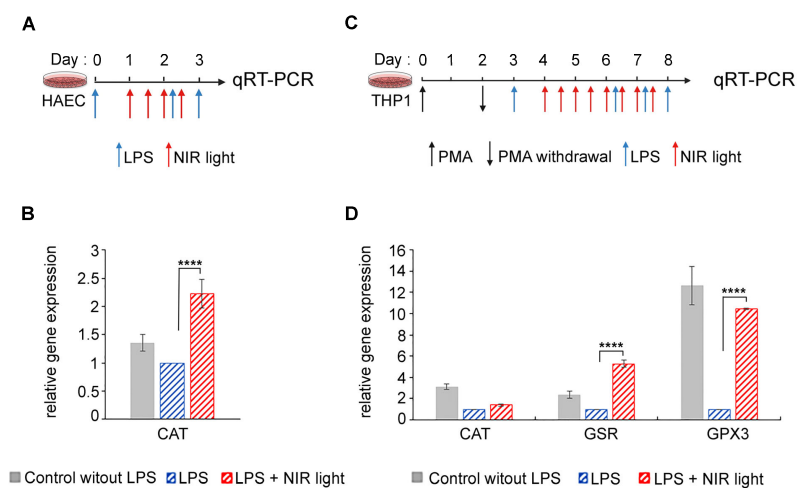


toho, v den 3, naše výsledky ukazují, že akumulace expozice NIR světlu může účinně zabránit indukci ROS po posledním, konečném zvýšení LPS.

Stručně řečeno, NIR světlo způsobuje přechodné zvýšení buněčných ROS ( obrázek 4 ), ale konečným účinkem je snížení hladin buněčných ROS v zanícených buňkách téměř na úroveň pozadí ( obrázek 5 ).

### 3.6. NIR světelná expozice moduluje expresi genů pro enzymy pohlcující ROS

Jedním z možných vysvětlení tohoto zjevného rozporu je, že zvýšení ROS indukované bezprostředně po expozici NIR světlu může naopak silně indukovat antioxidační mechanismy, což vede k dramatickému následnému snížení hladin buněčných ROS, které přetrvává po delší dobu. Abychom tuto možnost otestovali, měřili jsme expresi genů pro několik antioxidačních enzymů (GPX1, SOD2, CAT, GSR a GPX3) v buňkách HAEC a THP-1 podrobených světelným protokolům NIR popsaným na obrázku 6 A, B.



**Obrázek 6.** Vliv ošetření světlem NIR na zvýšenou expresi antioxidačních genů. Schematický diagram pro LPS-indukovanou aktivaci TLR4/NF-KB zánětlivé dráhy a ošetření světlem NIR v ( **A** ) HAEC a ( **C** ) PMA-diferencovaná THP-1 makrofágová buněčná linie. ( **A** ) HAEC byly indukovány LPS pro zánětlivou reakci a udržovány v zaníceném stavu dvěma dodatečnými boostery LPS (modré šipky) a podrobeny krátkým 10minutovým intervalům vystavení světlu NIR (červené šipky), opakujícím se jednou za 12 hodin. zkušební dobu

48 hodin. ( **B** ) Buněčná linie THP-1 makrofágů diferencovaných PMA byla indukována LPS pro zánětlivou reakci a udržována v zaníceném stavu třemi dalšími boostery LPS (modré šipky) a vystavena krátkým 10minutovým intervalům vystavení světlu NIR (červené šipky), opakovat jednou za 12 hodin, po dobu 96 hodin zkušební období. ( **A** , **B** ) Buňky kultivované bez LPS indukce byly použity jako kontroly. Pro kvantifikaci exprese antioxidantního genu prostřednictvím qRT-PCR byly všechny buňky sklizeny 3 hodiny po posledním boosteru LPS. ( **B** ) Genová exprese katalázy (CAT) pro kontrolní buňky HAEC (šedé sloupce) a HAEC indukované LPS s (červené sloupce) nebo bez (modré sloupce) ošetřením NIR světlem. ( **D** ) Genová exprese katalázy (CAT), glutathionreduktázy (GSR) a glutathionperoxidázy 3 (GPX3) pro kontrolní buňky THP-1 (šedé sloupce) a THP-1 indukované LPS s (červené sloupce) nebo bez (modré sloupce) ) NIR ošetření světlem. Pro ( **B** ),  $n = 8$  a ( **D** ),  $n = 3$  až  $6$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

V HAEC buněčných kulturách jsme pozorovali výrazné zvýšení hladin transkripce katalázy (CAT) po ošetření světlem NIR ( obrázek 6 B ). Tento enzym vychytává  $H_2O_2$  a tím snižuje buněčné koncentrace ROS. Indukce enzymů vychytávajících ROS by plně vysvětlila dramaticky snížené hladiny buněčných ROS po expozici NIR světlu v HAEC.

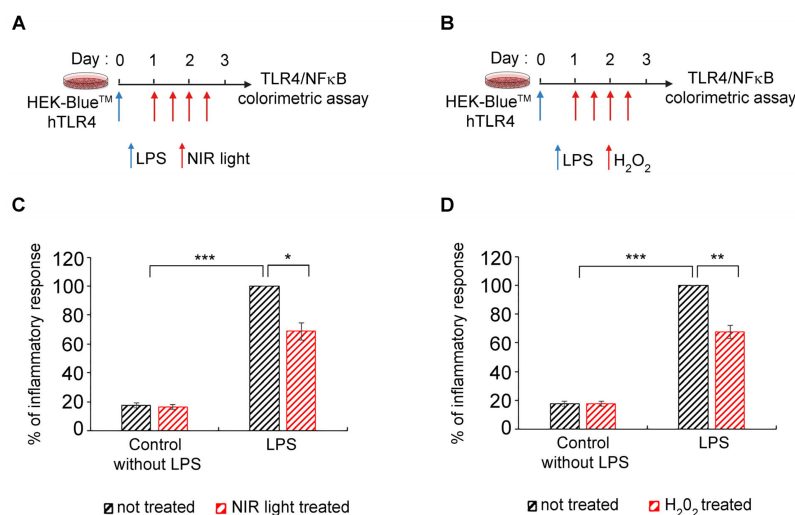
V případě diferencovaných makrofágových buněčných kultur THP-1 byly pozorovány změny v expresi antioxidantních enzymů CAT, GSR a GPX3 následně po expozici NIR světlu ( obrázek 6 D ). Je zvláštní, že všechny tyto enzymy byly ve skutečnosti downregulovány v zanícených buňkách (LPS) ve srovnání s nezanícenými kontrolními kulturami (bez LPS), což naznačuje, že zvýšené hladiny buněčných ROS v tomto typu buněk nestimulují syntézu antioxidantních genů, ale spíše naopak. Naproti tomu expozice NIR světlu způsobila zvýšení exprese enzymů vychytávajících ROS GSR i GPX3 ( obrázek 6 D ), v souladu s dramatickým snížením ROS v důsledku expozice NIR světlu.

Stručně řečeno, rychlá upregulace enzymů vychytávajících ROS nastává v reakci na přechodné zvýšení ROS spouštěné expozicí NIR světlu, což vede k celkovému čistému poklesu buněčných ROS.

### 3.7. Přechodné zvýšení buněčných ROS způsobuje protizánětlivé účinky vystavení světlu NIR

Poslední otázkou je, zda skutečně existuje kauzální vztah mezi změnami v buněčných ROS, spouštěnými NIR světlem prostřednictvím jeho účinku na mitochondriální cytochrom C oxidázu, a poklesem produkce cytokinů. Takový mechanismus by identifikoval syntézu ROS jako fyziologicky relevantní mechanismus pro protizánětlivé účinky NIR světla.

K vyřešení této otázky jsme použili HEK-Blue™-hTLR4 modelové buněčné kultury, ve kterých lze zánět detekovat pomocí jednoduchého kolorimetrického testu [ 54 , 55 ] a které vykazují protizánětlivou odpověď na expozici NIR světlu, podobně jako primární buněčné kultury [ 32 , 33 ]. Jako kontrolní podmínky byly buňky indukované LPS podrobeny protokolu ošetření světlem NIR, jak je popsáno na obrázku 7 A a v [ 32 , 33 ] – viz také obrázek 1 A. Jako testovací podmínky byly použity paralelní kultury ve stejném režimu růstu kromě toho, že místo expozice NIR světlu byl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v roztoku fyzicky přidán do kultivačního média. Načasování přidání H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bylo identické s načasováním expozice NIR světlu v kontrolních kulturách ( obrázek 7 B). Progrese zánětlivé reakce byla porovnána u těchto dvou stavů ( obrázek 7 C, D).



**Obrázek 7.** Účinek přidané  $H_{2}O_{2}$  na dráhu zánětu TLR4/NF-KB. Schématický diagram pro LPS-indukovanou aktivaci TLR4/NF-KB zánětlivé dráhy a účinek ošetření NIR světlem ( **A** ) **nebo**  $100 \mu M$   $H_{2}O_{2}$  ( **B** ) v HEK-Blue <sup>TM</sup> hTLR4 buňkách. Buňky HEK-Blue <sup>TM</sup> hTLR4 byly indukovány LPS pro zánětlivou reakci a udržovány v zaníceném stavu pomocí dvou dalších booster LPS (modré šipky) a podrobeny ( **A** ) krátkým 10minutovým intervalům expozice NIR světlu nebo ( **B** )  $100 \mu M$  ošetření  $H_{2}O_{2}$  . Obě léčby (červené šipky) byly opakovány každých 12 hodin po dobu 48 hodin. (( **C** , **D** )) Měření zánětu pomocí kolorimetrického testu u kontroly bez LPS a LPS indukované HEK-Blue <sup>TM</sup> hTLR4 neošetřené (černé sloupce) nebo ošetřené (červené sloupce) NIR světlem ( **C** ) nebo  $H_{2}O_{2}$  ( **D** ).  $n = 5$ , \*  $p < 0,1$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Tyto výsledky poskytují nezvratný důkaz o kauzálním vztahu na buněčné úrovni mezi protizánětlivým mechanismem expozice NIR světlu a indukovaným přechodným zvýšením ROS.

## 4. Diskuse

---

V této práci poskytujeme podporu pro použití fotobiomodulační terapie proti letálnímu dysregulovanému zánětu v současných a budoucích epidemiích COVID. Poskytujeme také primární mechanismus účinků PBM prostřednictvím přechodné indukce ROS.

### 4.1. Vliv PBM na modulaci ROS a mitochondriální aktivity

---

Naše výsledky ukazují konzistentně zvýšené hladiny ROS v zanícených buněčných kulturách ve srovnání s kontrolními buňkami ( obrázek 4 a obrázek 5 ). Navíc jsme pomocí HPLC analýzy identifikovali hlavní druhy, které obsahují jak ( $O_{2}^{\bullet}$ ) superoxid, tak peroxid vodíku ( $H_{2}O_{2}$ ), přičemž oba mají známé fyziologické role. Tyto hladiny se snížily během jedné hodiny po vystavení světlu NIR a dosáhly úrovně blízkého pozadí již po několika dnech ( obrázek 4 a obrázek 5 ). V důsledku léčby světlem NIR ( obrázek 3 ) došlo k současnému zlepšení mitochondriální funkce, dýchání a syntézy ATP, což je v souladu s dřívějšími zprávami [ 23 , 56 ]. Protože k



rozpadu mitochondriální funkce a exacerbaci zánětu může dojít také prostřednictvím úniku mitochondriálních faktorů působících jako DAMPS [ 57 ], zlepšená funkce mitochondrií může také podporovat protizánětlivé účinky nepřímým snížením úniku prozánětlivých faktorů.

Naproti tomu účinek NIR světla na buňky bezprostředně po expozici vyvolal skutečné zvýšení buněčného ROS. Tato změna byla značná, doslova zdvojnásobila koncentraci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v buňkách během několika minut ( obrázek 4 a obrázek 5 ). Je známo, že NIR světlo je absorbováno chromofory mitochondriálního enzymu CCO (cytochrom C oxidáza), který naopak podporuje enzymatický přenos elektronů ve vnitřní membráně mitochondrií [ 58 ]. Doprovodné uvolňování mitochondriálních reaktivních forem kyslíku tak poskytuje fyzikální vysvětlení našich výsledků přechodného oxidačního vzplanutí [ 59 ].

#### **4.2. Kauzální vztah mezi protizánětlivými účinky PBM a ROS**

---

Je známo, že ROS hraje dvojí roli v buněčném růstu a metabolismu. Na jedné straně vedou zvýšené koncentrace ROS k molekulárnímu poškození a oxidačnímu stresu; na druhé straně při nižších koncentracích hrají ústřední roli v redoxní signalizaci a odolnosti vůči stresu prostřednictvím podpory buněčné obrany a opravných mechanismů [ 60 ]. V důsledku toho se spekulovalo, že přechodné zvýšení ROS indukované PBM může zprostředkovat jeho terapeutické účinky prostřednictvím indukce buněčných protizánětlivých mechanismů [ 23 ]. Skutečnost, že vrozené imunitní signální dráhy reagují na ROS [ 61 , 62 , 63 , 64 ], tuto myšlenku podpořila.

V této práci poprvé ukazujeme, že existuje přímý kauzální vztah mezi přechodnou tvorbou ROS indukovanou NIR a protizánětlivými účinky NIR světla na vrozený imunitní systém. Když byl peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> , fyziologicky nejrelevantnější buněčný druh ROS) zaveden do lidských buněčných kultur přesně ve stejných časových intervalech jako ošetření PBM, mohl by exogenní H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plně nahradit NIR světlo při



downregulaci zánětlivá reakce. Navíc protizánětlivé účinky přidaného H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na syntézu a sekreci cytokinů byly stejného řádu jako u PBM ( obrázek 7 A). Přechodné zvýšení buněčných ROS indukované PBM je tedy nezbytné i dostatečné k tomu, aby působilo proti nadměrné hyperzánětlivé odpovědi v případě buněčné signální dráhy závislé na TLR-4. To by mohlo poskytnout chybějící fyziologický mechanismus, jak může PBM léčit zánět, s významnými terapeutickými důsledky (viz níže).

#### **4.3. Základní mechanismus fotobiomodulace: Hormesis**

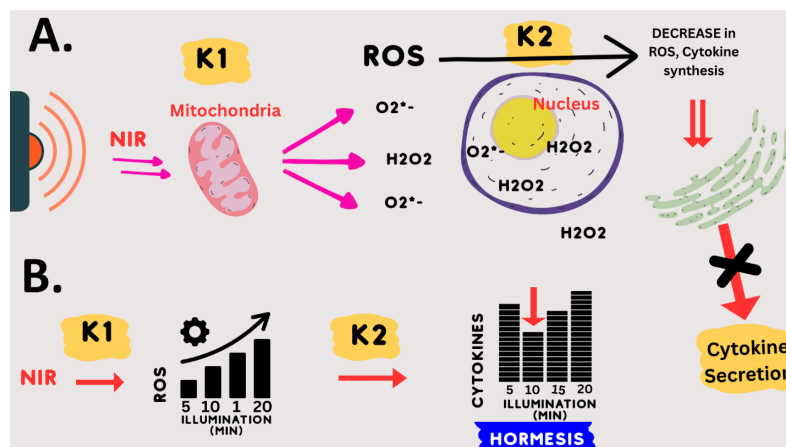
---

Existuje mnoho zpráv o zvonovitých nebo tzv. „hormetických“ křivkách dávka–odpověď pro terapii PBM (viz např. [ 23 , 65 ]). To znamená, že při velmi nízkých dávkách světla nedochází k žádnému terapeutickému účinku na biologický systém; při středních dávkách světla je optimální účinek; a při ještě vyšších dávkách světla opět nedochází k terapeutickému účinku. V některých případech, kdy je intenzita signálu zvýšena v ještě větší míře, může být biologický účinek dokonce opačný než při nízkých dávkách. Tyto takzvané „hormetické“ účinky jsou v toxikologii běžné (viz např. [ 66 ]). Jsou také pozorovány u ROS, kde jsou nízké dávky prospěšné, střední dávky nemají žádný účinek a velmi vysoké dávky jsou pro buňky škodlivé (viz např. [ 60 , 67 , 68 ]).

Tento pojem hormeze, spolu s mechanistickým požadavkem na oxidativní vzplanutí, by mohl vysvětlit parametry expozice PBM pro downregulaci dráhy zánětlivé reakce. Konkrétně jsme empiricky zjistili, že přesně 10 minut světla 730 nm o intenzitě 1–2 W/m<sup>2</sup> nebo vyšší poskytlo optimální protizánětlivý účinek [ 32 ]. I o 5 minut méně nebo o 5 minut více osvětlení bylo relativně neúčinné. Zvýšení intenzity světla nad prahovou hodnotu (1–2 W/m<sup>2</sup>) nemělo žádný další terapeutický přínos, ale ani neškodilo.

Tento protokol dávkování lze mechanicky vysvětlit následujícím modelem: (1) Expozice NIR světlu (při 730 nm) přímo stimuluje mitochondriální enzymy CCO a další k tvorbě ROS. (2) Tyto enzymatické reakce (k<sub>1</sub>) dosahují maximální rychlosti při intenzitě 2

$W/m^2$  NIR osvětlení (saturace). To vysvětluje, proč vyšší intenzity světla nezvyšují syntézu ROS. (3) Optimální koncentrace ROS se vytvoří přesně po 10 minutách aktivity saturačního enzymu (K1); (4) kratší doba expozice světlu (např. 5 minut) má za následek nedostatečné ROS, zatímco (5) delší doba expozice světlu (např. 15 minut) má za následek příliš mnoho ROS. Vzhledem k hormetickému účinku ROS na downregulaci zánětu je příliš mnoho i příliš málo ROS neúčinné při stimulaci protizánětlivé odpovědi. Tento model je shrnut na obrázku 8. Obr.



**Obrázek 8.** Model účinku expozice NIR světlu na lidské buňky. ( **A** ) NIR světlo je absorbováno mitochondriemi a indukuje enzymatickou tvorbu ROS rychlostí (K1) závislou na intenzitě světla, dokud není dosaženo saturační intenzity ( $2 W/m^2$ ). Tyto druhy ROS jsou primárně  $H_2O_2$  a  $O_2^{\bullet -}$ . Ty naopak stimulují enzymy vychytávající ROS a snižují expresi zánětlivých genů prostřednictvím mnoha buněčných mechanismů řízených modulací koncentrace ROS (K2). Následný náhlý pokles celkového buněčného ROS, stejně jako náhlý pokles biosyntézy a sekrece cytokinů, zkracuje účinek cytokinové bouře. ( **B** ) Hormetický mechanismus nastává na úrovni signalizace ROS. Ke stimulaci ROS světlem NIR dochází prostřednictvím enzymatického mechanismu (K1), který dosahuje saturace při intenzitě světla  $2 W/m^2$  (32). Při této intenzitě světla a vyšší je množství ROS vytvořené v reakci na NIR světlo přímo úměrné době osvětlení a ne intenzitě světla (Michaelis-Menten kinetika). Přechodné zvýšení ROS snižuje syntézu cytokinů prostřednictvím

hormetického mechanismu, přičemž žádný účinek není po 5 minutách, maximální účinek po 10 minutách a malý až žádný účinek po 15 nebo 20 minutách expozice. Tato inverzní křivka je typická pro hormetické mechanismy signalizace ROS a je určena citlivostí ( $k_2$ ) na koncentraci ROS.

#### 4.4. Úvahy o vlnové délce a parametrech expozice

---

Vlnová délka 730 nm použitá v této studii byla vybrána empiricky na základě optimálních protizánětlivých účinků na buněčné kultury. Není však široce používán ani široce komerčně dostupný. To může být způsobeno tím, že historicky akční spektra PBM určená pro jevy, jako je syntéza RNA nebo buněčná adheze, nevykazovala vrcholy účinnosti ve spektrálním rozsahu 700–750 nm [ 59 ]. To nepochybně odrazovalo od dalšího používání tohoto rozsahu vlnových délek. 730 nm se však nejen ukázalo jako vysoce účinné pro léčbu zánětu v kultuře [ 32 ], ale má dvě další výhody oproti jiným vlnovým délkám. Za prvé, na rozdíl od oblíbené vlnové délky červeného světla (např. 630 nebo 660 nm), které neproniká kůží, proniká vlnová délka 730 nm do těla do hloubky více než 6 cm při terapeutické minimální intenzitě potřebné pro léčbu zánět plic [ 32 , 33 ]. Může to navíc udělat, aniž by došlo k nadměrnému zahřívání pokožky nebo k nepohodlí. Při současném podání na obě strany hrudníku by tedy tato vlnová délka měla proniknout do plic. Za druhé, 730 nm je terapeuticky účinných při intenzitách světla až o dva řády nad minimální prahovou intenzitou potřebnou k dosažení protizánětlivých účinků [ 32 , 33 ]. To je kritické, protože plíce jsou objemné orgány, ve kterých bude vlivem vnějšího osvětlení vytvořen významný světelný gradient. Proto je nutné, aby jak světlo o vysoké intenzitě (dopadající na plicní tkáň v blízkosti povrchu kůže), tak světlo o nízké intenzitě (dopadající na plicní tkáň hluboko uvnitř těla) musí být stejně terapeuticky účinné.

Zdá se, že tomu tak není u jiných vlnových délek v běžném používání. Například světlo 810 nm, které má také protizánětlivé účinky v buněčné kultuře, vykazuje dvoufázovou křivku dávka–

odpověď. To znamená, že při intenzitě světla pod nebo nad určitou optimální intenzitou je světlo neúčinné při léčbě zánětu [ 23 ]. V důsledku toho by taková vlnová délka aplikovaná externě mohla účinně léčit pouze úzký plát plicní tkáně u pacienta.

#### 4.5. PBM terapie pro příští epidemii COVID

---

Výhodou PBM jako terapie epidemií COVID je, že ji lze zavést okamžitě, neinvazivně, bez negativních vedlejších účinků a bez ohrožení celého imunitního systému (zaměřuje se pouze na plíce). Proto může být kombinován s antivirovými látkami, které posilují imunitní systém a zaměřují se na patogen. PBM by navíc byl stejně účinný pro jakoukoli variantu SARS-CoV-2.

Fotobiomodulace je v současné době schválena US Food and Drug Administration pro léčbu neletálních stavů, jako je chronická bolest, hojení ran, alopecie, vrásky, hojení kostí, lupénka, lupus, pooperační edém a osteoartritida. Nikdy však nebyl schválen pro léčbu život ohrožujících stavů způsobených infekčním onemocněním.

Naše práce zde ukázala, že za podmínek optimalizované expozice a v příslušných typech buněk (primární lidské plicní a makrofágové buňky) je účinek NIR světla na downregulaci zánětlivé reakce vyvolané špičkou SARS-CoV-2 jak dramatický, tak rychlý. . Naše práce se navíc zabývala jednou ze zbývajících překážek přijetí terapie PBM tím, že prokázala základní mechanismus, který by mohl být relevantní pro vysvětlení protizánětlivých účinků PBM.

Na podporu našich výsledků nedávná pandemie COVID-19 vyvolala několik malých studií a kazuistik využívajících formy fotobiomodulační terapie k léčbě akutního zánětu plic u hospitalizovaných pacientů s COVID-19 [ 28 , 29 , 30 , 31 , 69 ]. I když se podmínky jejich expozice PBM značně lišily, prokázaly výhody pro pacienty, jak bylo prokázáno zlepšením subjektivního zdraví, snížením hladin krevních cytokinů a zlepšenou respirační kapacitou.

Budeme vyžadovat rozsáhlé, dvojité zaslepené, placebem kontrolované klinické studie, abychom potvrdili tato slibná zjištění a vyvinuli léčbu uznávanou orgány veřejného zdraví.

#### 4.6. Léčba jiných patologií

---

Naše současná práce ukazuje účinnost expozice NIR světlu při downregulaci zánětlivé dráhy TLR4/NF- $\kappa$ B, kterou kromě COVID-19 sdílejí i další virové patologie. Patří sem infekce respiračním syncytiálním virem (RSV), virem chřipky A (IAV), virem Ebola (EBOV) a virem dengue (DENV) [ 70 ], všechny spojené se závažnou morbiditou a mortalitou. Navíc během sepse způsobené gramnegativními bakteriemi může nadměrná aktivace TLR4/NF- $\kappa$ B vést k fatálnímu septickému šoku [ 13 ].

Tváří v tvář stále častějším virovým a bakteriálním vzplanutím existuje naléhavá potřeba vyvinout nové terapeutické koncepty, které jsou účinnější a mají širší spektrum než konvenční léčba. Expozice NIR světlu, spolu s pochopením jeho základního mechanismu působení, by mohla poskytnout prakticky ideální řešení tohoto problému.

#### Doplňkové materiály

---

Následující podpůrné informace lze stáhnout na adrese:

<https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox12101824/s1> , Obrázek S1: Měření kolísání teploty buněk v reálném čase během expozice NIR; Obrázek S2: HPLC analýza produktů ROS po vystavení světlu NIR; Tabulka S1: Seznam primerů použitých pro kvantitativní PCR v reálném čase.

#### Autorské příspěvky

---

Konceptualizace, MA; Metodika, MA, NJ a JDB; Validace, NJ, SA a JDB; Formální analýza, NJ a MP; Vyšetřování, BA, M.-MC, SB, RM, MP, DA a NJ; Data Curation, NJ; Psaní – příprava původního návrhu, MA a NJ; Psaní – recenze a úpravy, MA a NJ; Vizualizace,

MA a NJ; supervize, MA a NJ; Správa projektů, MA; Funding Acquisition, MA Všichni autoři si přečetli publikovanou verzi rukopisu a souhlasili s ní.

## **Financování**

---

Tato studie získala finanční prostředky od Novo Nordisk Fonden (NNF20OC0061440 pro MA) a Guy Foundation (001).

## **Prohlášení institucionální revizní komise**

---

Nelze použít.

## **Prohlášení o informovaném souhlasu**

---

Nelze použít.

## **Prohlášení o dostupnosti dat**

---

Všechny údaje jsou dostupné v hlavním textu nebo v doplňkových materiálech .

## **Poděkování**

---

Děkujeme zobrazovací platformě „Imagerie Paris Seine“ za to, že nám umožnila provádět analýzy konfokální mikroskopii. Plazmid pCMV kódující spike glykoprotein ektodoménu Wuhan-Hu-1 SARS-CoV-2, NR-52421, byl poskytnut Davidem Veesslererem a získán prostřednictvím BEI Resources, NIAID, NIH. Děkujeme společnosti Synlyte SAS ( [www.synlyte.com](http://www.synlyte.com) (vstup 28. září 2023)) za laskavý dar LED diod použitých v této studii a Olivieru Albaglimu za pečlivé přečtení rukopisu.

## **Střet zájmů**

---

Autoři prohlašují, že nemají žádné konkurenční zájmy.

## **Reference**

---

1. Zhou, P.; Yang, X.-L.; Wang, X.-G.; Hu, B.; Zhang, L.; Zhang, W.; Si, H.-R.; Zhu, Y.; Li, B.; Huang, C.-L.; a kol. Propuknutí pneumonie spojené s novým koronavirem s pravděpodobným netopýřím původem. *Příroda* **2020** , 579 , 270–273. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]
2. Blanco-Melo, D.; Nilsson-Payant, BE; Liu, W.-C.; Uhl, S.; Hoagland, D.; Møller, R.; Jordan, TX; Oishi, K.; Panis, M.; Sachs, D.; a kol. Nevyvážená reakce hostitelů na SARS-CoV-2 podněcuje rozvoj COVID-19. *Cell* **2020** , 181 , 1036–1045.e9. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
3. Huang, C.; Wang, Y.; Li, X.; Ren, L.; Zhao, J.; Hu, Y.; Zhang, L.; Fan, G.; Xu, J.; Gu, X.; a kol. Klinické rysy pacientů infikovaných novým koronavirem z roku 2019 v čínském Wuhanu. *Lancet* **2020** , 395 , 497–506. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
4. Tamura, T.; Ito, J.; Uriu, K.; Zahradník, J.; Kida, I.; Anraku, Y.; Nasser, H.; Shofa, M.; Oda, Y.; Lytras, S.; a kol. Virologické charakteristiky varianty SARS-CoV-2 XBB odvozené z rekombinace dvou omikronových subvariant. *Nat. Commun.* **2023** , 14 , 2800. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]
5. Ito, J.; Suzuki, R.; Uriu, K.; Itakura, Y.; Zahradník, J.; Kimura, KT; Deguchi, S.; Wang, L.; Lytras, S.; Tamura, T.; a kol. Konvergentní vývoj SARS-CoV-2 omikronových subvariant vedoucí ke vzniku varianty BQ.1.1. *Nat. Commun.* **2023** , 14 , 2671. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
6. Drosten, C.; Günther, S.; Preiser, W.; van der Werf, S.; Brodt, H.-R.; Becker, S.; Rabenau, H.; Rýžováním, M.; Kolesníková, L.; Fouchier, RAM; a kol. Identifikace nového koronaviru u pacientů s těžkým akutním respiračním syndromem. *N. Engl. J. Med.* **2003** , 348 , 1967–1976. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]

7. Assiri, A.; Al-Tawfiq, JA; Al-Rabeeah, AA; Al-Rabiah, FA; Al-Hajjar, S.; Al-Barrak, A.; Flemban, H.; Al-Nassir, WN; Balkhy, HH; Al-Hakeem, RF; a kol. Epidemiologické, demografické a klinické charakteristiky 47 případů blízko-východního respiračního syndromu Onemocnění koronavirem ze Saúdské Arábie: popisná studie. *Lancet Infect. Dis.* **2013** , 13 , 752–761. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]
8. Thompson, BT; Chambers, RC; Liu, KD Syndrom akutní respirační tísně. *N. Engl. J. Med.* **2017** , 377 , 562–572. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]
9. Rahman, M.; Irmiler, M.; Keshavan, S.; Introna, M.; Beckers, J.; Palmberg, L.; Johanson, G.; Ganguly, K.; Upadhyay, S. Diferenciální účinek vrcholového glykoproteinu 1 SARS-CoV-2 na modely lidské bronchiální a alveolární plicní sliznice: Důsledky pro patogenitu. *Viruses* **2021** , 13 , 2537. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]
10. Sohn, KM; Lee, S.-G.; Kim, HJ; Cheon, S.; Jeong, H.; Lee, J.; Kim, IS; Silwal, P.; Kim, YJ; Paik, S.; a kol. Pacienti s COVID-19 upregulují zánětlivou signalizaci zprostředkovanou Toll-like receptorem 4, která napodobuje bakteriální sepsi. *J. Korean Med. Sci.* **2020** , 35 , e343. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
11. Li, D.; Wu, M. Receptory pro rozpoznávání vzorů ve zdraví a nemocech. Převod signálu. *Cíl. Ther.* **2021** , 6 , 291. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
12. Beutler, B.; Du, X.; Poltorak, A. Identifikace Toll-like Receptor 4 (Tlr4) jako jediného vedení pro přenos signálu LPS: Genetické a evoluční studie. *J. Endotoxin Res.* **2001** , 7 , 277-280. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]
13. Singer, M.; Deutschman, CS; Seymour, CW; Shankar-Hari, M.; Annane, D.; Bauer, M.; Bellomo, R.; Bernard, GR; Chiche, J.-D.; Bednář, CM; a kol. Definice třetího mezinárodního konsenzu pro sepsi a septický šok (Sepse-3). *JAMA* **2016** , 315 , 801–810. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]



14. Zhao, Y.; Kuang, M.; Li, J.; Zhu, L.; Jia, Z.; Guo, X.; Hu, Y.; Kong, J.; Yin, H.; Wang, X.; a kol. Spike protein SARS-CoV-2 interaguje a aktivuje TLR4. *Cell Res.* **2021** , 31 , 818–820. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]
15. Zhao, Y.; Kuang, M.; Li, J.; Zhu, L.; Jia, Z.; Guo, X.; Hu, Y.; Kong, J.; Yin, H.; Wang, X.; a kol. Oprava vydavatele: Spike Protein SARS-CoV-2 interaguje a aktivuje TLR4. *Cell Res.* **2021** , 31 , 825. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
16. Shirato, K.; Kizaki, T. Podjednotka Spike Protein S1 SARS-CoV-2 indukuje prozánětlivé reakce prostřednictvím signalizace Toll-like receptor 4 v myších a lidských makrofázích. *Heliyon* **2021** , 7 , e06187. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
17. Enwemeka, CS; Bumah, VV; Masson-Meyers, DS Light jako potenciální léčba pandemických koronavirových infekcí: Perspektiva. *J. Photochem. Photobiol. B* **2020** , 207 , 111891. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]
18. Fekrazad, R. Fotobiomodulace a antivirová fotodynamická terapie jako možný nový přístup v léčbě COVID-19. *Fotobiomodulace Photomed. Laserová operace.* **2020** , 38 , 255–257. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
19. Ryu, JH; Park, J.; Kim, B.-Y.; Kim, Y.; Kim, NG; Shin, Y.-I. Fotobiomodulace zlepšuje zánětlivé parametry ve fibroblastech podobných synoviocytech a experimentálních zvířecích modelech revmatoidní artritidy. *Přední. Immunol.* **2023** , 14 , 1122581. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
20. Berni, M.; Brancato, AM; Torriani, C.; Bina, V.; Annunziata, S.; Cornella, E.; Trucchi, M.; Jannelli, E.; Mosconi, M.; Gastaldi, G.; a kol. Role nízkourovňové laserové terapie při hojení kostí: Systematický přehled. *Int. J. Mol. Sci.* **2023** , 24 , 7094. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]

21. Lamaro-Cardoso, A.; Bachion, MM; Morais, JM; Fantinati, MS; Milhomem, AC; Almeida, VL; Vinaud, MC; Lino-Júnior, RS Fotobiomodulace spojená s buněčnou terapií Zlepšuje hojení ran experimentálních popálenin v plné tloušťce u potkanů. J. Photochem. Photobiol. B Biol. **2019** , 194 , 174–182. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
22. Hossein-Khannazer, N.; Kazem Arki, M.; Keramatinia, L.; Rezaei-Tavirani, M. Nízkoúrovňová laserová terapie v léčbě autoimunitní tyreoiditidy. J. Lasers Med. Sci. **2022** , 13 , e34. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
23. Hamblin, MR Mechanismy a aplikace protizánětlivých účinků fotobiomodulace. CÍLE Biophys. **2017** , 4 , 337–361. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]
24. Lu, Y.-S.; Chen, Y.-J.; Lee, C.-L.; Kuo, F.-Y.; Tseng, Y.-H.; Chen, C.-H. Účinky fotobiomodulace jako doplňkové léčby u chronické obstrukční plicní nemoci: narativní přehled. Lasers Med. Sci. **2023** , 38 , 56. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]
25. Mo, S.; Kim, EY; Kwon, Y.-S.; Lee, MY; Ahn, JC NF-KB-zprostředkované protizánětlivé účinky zařízení s organickou světelnou diodou (OLED) v modelech zánětu indukovaného lipopolysacharidem (LPS) in vitro a in vivo. Přední. Immunol. **2022** , 13 , 1050908. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]
26. de Lima, FM; Vitoretti, L.; Coelho, F.; Albertini, R.; Breithaupt-Faloppa, AC; de Lima, WT; Aimbire, F. Supresivní účinek nízkoúrovňové laserové terapie na tracheální hyperreaktivitu a zánět plic u potkanů vystavených střevní ischemii a reperfuzi. Lasers Med. Sci. **2013** , 28 , 551–564. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
27. de Lima, FM; Albertini, R.; Dantas, Y.; Maia-Filho, AL; de Loura Santana, C.; Castro-Faria-Neto, HC; França, C.; Villaverde, AB; Aimbire, F. Nízkoúrovňová laserová terapie obnovuje rovnováhu oxidačního stresu u akutního plicního poranění vyvolaného ischemií střeva a reperfuzí. Photochem. Photobiol. **2013** , 89 , 179–188. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]

28. Marashian, SM; Hashemian, M.; Pourabdollah, M.; Nasser, M.; Mahmoudian, S.; Reinhart, F.; Eslaminejad, A. Fotobiomodulace zlepšuje odpověď sérových cytokinů u mírné až středně závažné COVID-19: První randomizovaná, dvojitě zaslepená, placebem kontrolovaná, pilotní studie. Přední. Immunol. **2022** , 13 , 929837. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
29. Sigman, SA; Mokmeli, S.; Vetrici, MA Příkladná nízkourovňová laserová terapie (LLLT) u morbidně obézního pacienta s těžkou pneumonií COVID-19: případová zpráva. Může. J. Respir. Ther. **2020** , 56 , 52–56. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
30. Sigman, SA; Mokmeli, S.; Monici, M.; Vetrici, MA 57letý Afroameričan s těžkou pneumonií COVID-19, který reagoval na podpůrnou fotobiomodulační terapii (PBMT): První použití PBMT u COVID-19. Dopolnedne. J. Case Rep. **2020** , 21 , e926779. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
31. Vetrici, MA; Mokmeli, S.; Bohm, AR; Monici, M.; Sigman, SA Hodnocení přídatné fotobiomodulace (PBMT) pro pneumonii COVID-19 prostřednictvím klinického stavu a indexů plicní závažnosti v předběžné studii. J. Inflamm. Res. **2021** , 14 , 965–979. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
32. Pooam, M.; Aguida, B.; Drahý, S.; Jourdan, N.; Ahmad, M. Terapeutická aplikace světla a elektromagnetických polí ke snížení hyperzánětu vyvolaného COVID-19. Commun. Integrovat. Biol. **2021** , 14 , 66–77. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
33. Aguida, B.; Pooam, M.; Ahmad, M.; Jourdan, N. Terapie infračerveným světlem zmírňuje TLR-4 závislý hyperzánět typu vyvolaného COVID-19. Commun. Integrovat. Biol. **2021** , 14 , 200–211. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]
34. Dompe, C.; Moncrieff, L.; Matys, J.; Grzech-Leśniak, K.; Kocherová, I.; Bryja, A.; Bruška, M.; Dominik, M.; Mozdziak, P.; Skiba, TH; a kol. Fotobiomodulace – základní mechanismus a klinické aplikace. J. Clin. Med. **2020** , 9 , 1724. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]

35. Mittal, M.; Siddiqui, MR; Tran, K.; Reddy, SP; Malik, AB Druhy reaktivního kyslíku při zánětech a poraněních tkání. *Antioxid. Redoxní signál* **2014** , 20 , 1126–1167. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
36. Rajendran, NK; George, BP; Chandran, R.; Tynga, IM; Houreld, N.; Abrahamse, H. Vliv světla na reaktivní druhy kyslíku a NF-KB v progresi onemocnění. *Antioxidanty* **2019** , 8 , 640. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]
37. Stěny, AC; Park, Y.-J.; Tortorici, MA; Wall, A.; McGuire, AT; Veessler, D. Struktura, funkce a antigenicita vrcholového glykoproteinu SARS-CoV-2. *Cell* **2020** , 181 , 281–292.e6. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
38. Livák, KJ; Schmittgen, TD Analýza dat relativní genové exprese pomocí kvantitativní PCR v reálném čase a metody  $2^{-\Delta\Delta CT}$  . *Methods* **2001** , 25 , 402-408. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
39. Fernandes, DC; Gonçalves, RC; Laurindo, FRM Měření produkce superoxidu a aktivity NADPH oxidázy pomocí HPLC analýzy oxidace dihydroethidia. *Metody Mol. Biol.* **2017** , 1527 , 233–249. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
40. Ginhoux, F.; Schultze, JL; Murray, PJ; Ochando, J.; Biswas, SK Nové pohledy do multidimenzionálního konceptu ontogeneze, aktivace a funkce makrofágů. *Nat. Immunol.* **2016** , 17 , 34–40. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]
41. Shapouri-Moghaddam, A.; Mohammadian, S.; Vazini, H.; Taghadosi, M.; Esmaeili, S.-A.; Mardani, F.; Seifi, B.; Mohammadi, A.; Afshari, JT; Sahebkar, A. Plasticita, polarizace a funkce makrofágů ve zdraví a nemoci. *J. Cell. Physiol.* **2018** , 233 , 6425–6440. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]
42. Del Valle, DM; Kim-Schulze, S.; Huang, H.-H.; Beckmann, ND; Nirenberg, S.; Wang, B.; Lavin, Y.; Swartz, TH; Madduri, D.; Stock, A.; a kol. Podpis zánětlivého cytokinu předpovídá závažnost a přežití COVID-19. *Nat. Med.* **2020** , 26 , 1636–1643. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]

43. Xu, X.; Han, M.; Li, T.; Sun, W.; Wang, D.; Fu, B.; Zhou, Y.; Zheng, X.; Yang, Y.; Li, X.; a kol. Účinná léčba těžkých pacientů s COVID-19 tocilizumabem. *Proč. Natl. Akad. Sci. USA* **2020** , 117 , 10970–10975. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]
44. Negron, SG; Kessinger, CW; Xu, B.; Pu, WT; Lin, Z. Selektivní exprese SARS-CoV-2 Spike Protein S1 Subunit v kardiomyocytech indukuje srdeční hypertrofii u myší. *bioRxiv* **2021** , arXiv:2021.06.20.448993. [ [Google Scholar](#) ]
45. Zhang, Y.; Zhao, W.; Mao, Y.; Chen, Y.; Wang, S.; Zhong, Y.; Su, T.; Gong, M.; Du, D.; Lu, X.; a kol. Charakterizace místně specifické N-glykosylace rekombinantních spike proteinů SARS-CoV-2. *Mol. Cell Proteom.* **2021** , 20 , 100058. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]
46. Baboo, S.; Diedrich, JK; Torres, JL; Copps, J.; Singh, B.; Garrett, PT; Ward, AB; Paulson, JC; Yates, JR Evolving Spike-Protein N-Glycosylation in SARS-CoV-2 Variants. *bioRxiv* **2023** , arXiv:2023.05.08.539897. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
47. Eells, JT; Henry, MM; Summerfelt, P.; Wong-Riley, MTT; Buchmann, EV; Kane, M.; Whelan, NT; Whelan, HT  
Terapeutická fotobiomodulace pro retinální toxicitu vyvolanou metanolem. *Proč. Natl. Akad. Sci. USA* **2003** , 100 , 3439–3444. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
48. Wong-Riley, MTT; Liang, HL; Eells, JT; Šance, B.; Henry, MM; Buchmann, E.; Kane, M.; Whelan, HT Fotobiomodulace přímo prospívá primárním neuronům funkčně inaktivovaným toxiny: ÚLOHA CYTOCHROM c OXIDÁZY\*. *J. Biol. Chem.* **2005** , 280 , 4761-4771. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
49. Yu, W.; Naim, JO; McGowan, M.; Ippolito, K.; Lanzafame, RJ  
Fotomodulace oxidačního metabolismu a enzymů elektronového řetězce v mitochondriích jater krys. *Photochem. Photobiol.* **1997** , 66 , 866-871. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]

50. West, AP; Brodsky, IE; Rahner, C.; Woo, DK; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Walsh, MC; Choi, Y.; Shadel, GS; Ghosh, S. Signalizace TLR zvyšuje baktericidní aktivitu makrofágů prostřednictvím mitochondriálního ROS. *Příroda* **2011** , 472 , 476–480. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
51. Mullen, L.; Mengozzi, M.; Hanschmann, E.-M.; Alberts, B.; Ghezzi, P. Jak redoxní stát reguluje imunitu. *Uvolnit. Radic. Biol. Med.* **2020** , 157 , 3–14. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
52. Calabrese, EJ; Baldwin, LA Definování hormeze. *Hučení. Exp. Toxicol.* **2002** , 21 , 91-97. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
53. Sherrard, RM; Morellini, N.; Jourdan, N.; El-Esawi, M.; Arthaut, L.-D.; Niessner, C.; Rouyer, F.; Klarsfeld, A.; Doulazmi, M.; Witczak, J.; a kol. Elektromagnetická pole nízké intenzity indukují lidský kryptochrom k modulaci intracelulárních reaktivních druhů kyslíku. *PLoS Biol.* **2018** , 16 , e2006229. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
54. Wang, L.; Shen, J.; Xu, L.; Gao, J.; Zhang, C.; Wang, Y.; Chen, F. Metabolite of Endophytic Fungus *Cadophora Orchidicola* z *Kalimeris Indica* Slouží jako potenciální fungicid a agonista TLR4. *J. Appl. Microbiol.* **2019** , 126 , 1383–1390. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]
55. Chu, M.; Zhou, M.; Jiang, C.; Chen, X.; Guo, L.; Zhang, M.; Chu, Z.; Wang, Y. *Staphylococcus Aureus* moduliny rozpustné ve fenolu A1–A3 působí jako nový Toll-like receptor (TLR) 4 antagonisté k inhibici signální dráhy HMGB1/TLR4/NF-KB. *Přední. Immunol.* **2018** , 9 , 862. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]
56. de Oliveira Martins, LP; dos Santos, FF; Costa, TED; Lacerda, AČR; dos Santos, JM; Costa, KB; Santos, AP; Gaiad, TP; Pinfildi, CE; Rocha-Vieira, E.; a kol. Fotobiomodulační terapie (Light-Emitting Diode 630 Nm) podporovala oxidační stres a zachování artikulární chrupavky u modelu indukované kolenní osteoartrózy. *Fotobiomodulace Photomed. Laserová operace.* **2021** , 39 , 272–279. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]

57. Marchi, S.; Guilbaud, E.; Tait, SWG; Yamazaki, T.; Galluzzi, L. Mitochondriální kontrola zánětu. *Nat. Rev. Immunol.* **2023** , 23 , 159–173. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
58. Karu, T.; Pyatibrat, L.; Kalendo, G. Ozáření He-Ne laserem zvyšuje hladinu ATP v buňkách kultivovaných in vitro. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1995** , 27 , 219-223. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
59. Karu, TI; Pyatibrat, LV; Koljakov, SF; Afanasyeva, NI Absorpční měření buněčné monovrstvy relevantní pro fototerapii: Snížení cytochrom c oxidázy pod blízkým IR zářením. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2005** , 81 , 98-106. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
60. Sies, H.; Jones, DP Druhy reaktivního kyslíku (ROS) jako pleiotropní fyziologické signalizační látky. *Nat. Mol. Cell Biol.* **2020** , 21 , 363–383. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]
61. Gill, R.; Tsung, A.; Billiar, TR Spojení oxidačního stresu se zánětem: Toll-like receptory. *Volný Radic. Biol. Med.* **2010** , 48 , 1121–1132. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
62. Park, HS; Jung, HY; Park, EY; Kim, J.; Lee, WJ; Bae, YS Cutting Edge: Přímá interakce TLR4 s izozymem NAD(P)H oxidázy 4 je nezbytná pro lipopolysacharidy indukovanou produkci reaktivních druhů kyslíku a aktivaci NF-KB1. *J. Immunol.* **2004** , 173 , 3589-3593. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]
63. Asehnune, K.; Strassheim, D.; Mitra, S.; Kim, JY; Abraham, E. Involvement of Reactive Oxygen Species in Toll-like Receptor 4-dependent Activation of NF-KB 1. *J. Immunol.* **2004** , 172 , 2522–2529. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
64. Al-Shehri, SS druhy reaktivního kyslíku a dusíku a vrozená imunitní reakce. *Biochimie* **2021** , 181 , 52–64. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]
65. Nie, F.; Hao, S.; Ji, Y.; Zhang, Y.; Sun, H.; Will, M.; Han, W.; Ding, Y. Biphasic Dose Response in the Anti-Inflammation Experiment of PBM. *Lasers Med. Sci.* **2023** , 38 , 66. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]

66. Calabrese, EJ; Calabrese, V.; Giordano, J. Role hormeze ve funkční výkonnosti a ochraně nervových systémů. *Brain Circ.* **2017** , 3 , 1–13. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
67. Huang, X.; Li, J.; Song, S.; Wang, L.; Lin, Z.; Ouyang, Z.; Yu, R. Hormesis Effect of Hydrogen Peroxide on the Promoter Activity of Neuropeptide Receptor PAC1-R. *J. Food Biochem.* **2019** , 43 , e12877. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
68. Iwakami, S.; Misu, H.; Takeda, T.; Sugimori, M.; Matsugo, S.; Kaneko, S.; Takamura, T. Duální účinky peroxidu vodíku závislé na koncentraci na transdukcii inzulínového signálu v hepatocytech H4IIEC. *PLoS ONE* **2011** , 6 , e27401. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]
69. Moskvina, S.; Askhadulin, E.; Kochetkov, A. Nízkoúrovňová laserová terapie v prevenci rozvoje endoteliální dysfunkce a klinické zkušenosti s léčbou a rehabilitací pacientů s COVID-19. *Rehabil. Res. Praxe.* **2021** , 2021 , 6626932. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ]
70. Halajian, EA; LeBlanc, EV; Gee, K.; Colpitts, CC Aktivace TLR4 virovými glykoproteiny: Dvojsečný meč? *Přední. Microbiol.* **2022** , 13 , 1007081. [ [Google Scholar](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [PubMed](#) ]

**Upozornění/Poznámka vydavatele:** Prohlášení, názory a údaje obsažené ve všech publikacích jsou výhradně výroky jednotlivých autorů a přispěvatelů, nikoli MDPI a/nebo editorů. MDPI a/nebo redaktori se zřikají odpovědnosti za jakékoli zranění osob nebo majetku vyplývající z jakýchkoli nápadů, metod, pokynů nebo produktů uvedených v obsahu.

© 2023 od autorů. Držitel licence MDPI, Basilej, Švýcarsko. Tento článek je otevřeným článkem distribuovaným za podmínek licence Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> ).

**Sdílejte a citujte**

---

**Styl MDPI a ACS**



Aguida, B.; Chabi, M.-M.; Baouz, S.; Mould, R.; Bell, JD; Pooam, M.; André, S.; Archambault, D.; Ahmad, M.; Jourdan, N. Expozice blízkému infračervenému světlu spouští ROS k downregulaci zánětlivých cytokinů indukovaných spike proteinem SARS-CoV-2 v lidské buněčné kultuře. *Antioxidanty* **2023** , 12 , 1824.

<https://doi.org/10.3390/antiox12101824>

### **Styl AMA**

Aguida B, Chabi MM, Baouz S, Mold R, Bell JD, Pooam M, André S, Archambault D, Ahmad M, Jourdan N. Expozice blízkému infračervenému světlu spouští ROS k downregulaci zánětlivých cytokinů indukovaných spike proteinem SARS-CoV-2 v kultuře lidských buněk. *Antioxidanty* . 2023; 12(10):1824.

<https://doi.org/10.3390/antiox12101824>

### **Chicago/Turabian styl**

Aguida, Blanche, Marie-Marthe Chabi, Soria Baouz, Rhys Mould, Jimmy D. Bell, Marootpong Pooam, Sebastien André, Dominique Archambault, Margaret Ahmad a Nathalie Jourdan. 2023. "Vystavení blízkému infračervenému světlu spouští ROS k downregulaci zánětlivých cytokinů indukovaných spike proteinem SARS-CoV-2 v lidské buněčné kultuře" *Antioxidanty* 12, no. 10: 1824.

<https://doi.org/10.3390/antiox12101824>

Všimněte si, že od prvního čísla roku 2016 tento časopis používá čísla článků místo čísel stránek. Další podrobnosti naleznete [zde](#) .

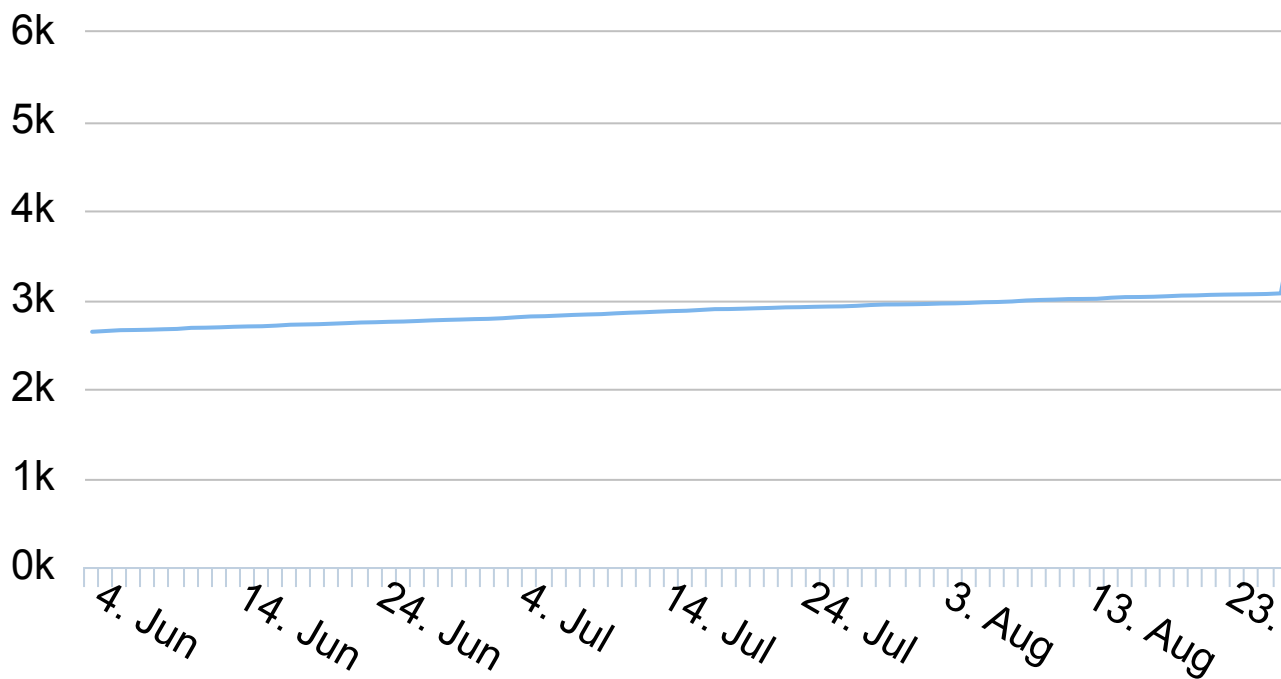
### **Metriky článku**

---

#### **Statistika přístupu k článku**

---

## Article access statistics



Pro více informací o statistikách časopisu klikněte [zde](#) .

Více požadavků ze stejné IP adresy se počítá jako jeden pohled.