

ВЛИЯНИЕ ИМПУЛЬСНОГО НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ (НИЛИ) НА КУЛЬТУРУ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

Москвин С.В.¹, Ключников Д.Ю.², Волчков С.Е.², Антипов Е.В.³, Супильников А.А.³, Киселева О.Н.³

INFLUENCE OF THE PULSE LOW-INTENSIVE LASER RADIATION ON CULTURE OF MESENCHYMAL STEM CELLS OF THE PERSON OF IN VITRO

MOSKVIN S.V., KLUCHNIKOV D.YU., VOLCHKOV S.E., ANTIPOV E.V., SUPILNIKOV A.A., KISELYOVA O.N.

¹ФГБУ «Государственный научный центр лазерной медицины» ФМБА РФ, г. Москва; ²ГБУЗ «Самарский областной центр планирования семьи и репродукции», г. Самара; ³НОУ ВПО Медицинский институт «РЕАВИЗ», г. Самара

Изучено влияние импульсного низкоинтенсивного лазерного излучения инфракрасного и красного спектров на культуру мезенхимальных стволовых клеток человека *in vitro*. Показано, что при используемых энергетических и временных параметрах воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения морфология и жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток не изменяется. Наблюдалось незначительное повышение количества клеток по сравнению с контролем. Лучший эффект после освечивания инфракрасным импульсным низкоинтенсивным лазерным излучением проявлялся с первого по третий дни культивирования.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, лазерное излучение, морфология и деление клеток.

Influence of pulse low-intensive laser radiation of infrared and red ranges on culture of mesenchymal stem cells of the person of *in vitro* is studied. It is shown that at used power and temporary parameters of influence of low-intensive laser radiation the morphology and viability of mesenchymal stem cells doesn't change. Slight increase of quantity of cages in comparison with control was observed. The best effect after radiation was shown by infrared pulse low-intensive laser radiation from the first cultivation on the third days.

Keywords: mesenchymal stem cells, laser radiation, morphology and cell fission.

Введение. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) могут использоваться для заместительной или восстановительной терапии заболеваний, генной или клеточной инженерии [10].

МСК являются мультипотентными. Они способны к дифференцировке в различные типы кле-

ток тканей – остеобласты, хондроциты, адипоциты, миоциты, гепатоциты, кардиомиоциты и др. [5, 10, 11]. Известно, что МСК человека сохраняют способность к пролиферации и дифференцировке при культивировании *in vitro*, а также при реимплантации, что обуславливает их высокую значимость в клинической практике [10]. Есть данные о возможности получения из МСК нейрональных предшественников с последующей дифференцировкой их в клетки нервной ткани (нейроны, астроциты, олигодендроциты) [7, 15, 20, 30]. МСК секретируют почти все основные провоспалительные цитокины и ростовые факторы [5].

В настоящее время актуальным является нахождение условий для расширения мультипотентности мезенхимальных стволовых клеток до плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток, что позволит в регенеративно-пластической медицине автоматически решить многие проблемы этического, морального, религиозного и юридического характера. Одним из известных способов неспецифического регулирования клеточной активности МСК на этапе предварительного культивирования *in vitro* является воздействие низкоинтенсивным лазерным излучением (НИЛИ). Для этого могут быть использованы лазерные источники с разной длиной волны, работающие, в основном, в непрерывном режиме [8, 13, 17, 18, 19, 22, 23, 24, 25, 27, 35, 36, 37, 39, 40].

Итоговая энергетическая плотность (ЭП) находится в достаточно узких пределах, характерных для эффектов, наблюдаемых в других типах клеток [3], хотя сама по себе ЭП (или, так называемая, «доза») абсолютно неинформативна, а важнейшие параметры методики воздействия часто не указываются [2, 16]. Все разнообразие получаемые эффекты являются кальций-зависимыми, поскольку первичным механизмом стимуляции клеточной активности (физиологии) является термодинамический запуск Ca^{2+} -зависимых процессов [1].

До настоящего времени не проведено ни одного исследования с применением импульсных лазеров, наиболее распространённых в

современной лазерной терапии (длительность светового импульса 10^{-7} с, импульсная мощность 5-10 Вт, длина волны 635 и 904 нм), хотя во многих публикациях показана их высокая эффективность, как *in vitro*, так и *in vivo* [3, 14]. Не изучались перспективные возможности частотной модуляции.

Цель исследования - оценка влияния импульсного НИЛИ инфракрасного (904 нм) и красного спектров (635 нм), в том числе с использованием многочастотного режима, на морфологию, жизнеспособность, пролиферативную активность и скорость роста МСК *in vitro*.

Материал и методы исследования. В эксперименте использовалась адгезивная культура мультипотентных стромальных клеток (МСК), 4 пассажа, полученных из ткани пуповины донора, давшего информированное согласие. Забор, транспортировка и обработка материала проводилась в течение 24 часов с момента родов. МСК получены методом эксплантов с последующим культивированием фрагментов.

Культивирование проводили в течение 6 суток, с использованием стандартных питательных сред: Minimum Essential Medium Eagle, Alpha Modification with NaHCO_3 (Sigma-Aldrich, Германия), 2мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия), 10% сыворотки плодов коровы (MSC FBS, Gibco, Австралия). Культивирование проводилось на чашках Петри площадью 11,78 cm^2 (EasyGrip™, Beckton Dickinson, USA). Также использовались: раствор Дальбекко (DPBS, Биолот, Россия), раствор трипсина-ЭДТА (ПанЭко, Россия), центрифужные пробирки объемом 50 мл (CentriStar™, Corning Incorporated, Мексика) и серологические пипетки объемом 25 и 10 мл (Falcon, Beckton Dickinson, США).

Жизнеспособность клеток (отношение живых к мёртвым) оценивали на автоматическом анализаторе клеток Vi-Cell XR (Beckman Coulter, USA).

Исследование проводилось в 5 группах, по 3 чашки (повторениях) в каждой группе. Опытные группы подвергались воздействию НИЛИ (параметры представлены в табл. 1). Время экспозиции составляло 5 мин на 1 чашку. Контрольные чашки не подвергались воздействию. Применяли аппарат лазерный терапевтический «Лазмик-ВЛОК» (РУ № РЗН 2014/1410 от 06.02.2014), импульсные матричные лазерные излучающие головки, имеющие 8 лазерных диодов, расположенных в два ряда, что обеспечивало относительно равномерную засветку почти эллиптической области 5×7 см на расстоянии 7 см от поверхности.

Чашки диаметром 3,5 см полностью находились в световом поле (рис. 1), и на них приходилось, соответственно $\approx 10\%$ падающей световой энергии. Исходя из этого, рассчитывалась ПМ и ЭП для каждого варианта освечивания. В режиме

многочастотной модуляции ЛАЗМИК® использовалась сложная многочастотная модуляция [3]. Требование к равномерному освечиванию всей поверхности плашки (лунки) связано с тем, что в этом случае обеспечивается лучший эффект, чем при локальном, точечном воздействии на часть культуры клеток [39].

Непосредственно перед освечиванием МСК были инокулированы в количестве $3,7 \times 10^3$ живых клеток/ cm^2 поверхности культуральной посуды в каждую чашку Петри исследуемых и контрольной групп. Дальнейшее культивирование осуществлялось при $+37^\circ\text{C}$, CO_2 5% в течение 5 дней. Визуальное наблюдение за морфологией и ростом культуры проводилось ежедневно методом инвертированной световой микроскопии до достижения монослоя в одной из групп. После этого был проведен подсчёт общего количества клеток в каждой группе.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы SigmaPlot (version 11.0).

Результаты исследования и их обсуждение. Начиная с первого дня культивирования на всех исследуемых посудах можно было наблюдать клетки, находящиеся на разных стадиях деления (рис. 2). При оценке клетки всех групп были идентичными, обладали высокой степенью адгезии к пластику, образовывали веретенообразную, треугольную и полигональные формы. При изучении морфологии отдельных клеток на первые сутки культивирования можно было заметить, что подавляющая часть клеток имела схожие признаки: цитоплазма клеток светлая, хорошо структурированная, края чёткие, ядра с 1-2-мя ядрышками, без каких-либо нетипичных включений.

При дальнейшем культивировании отмечался относительно равномерный рост культуры по всей поверхности пластика. Значимых изменений в морфологии клеток среди изучаемых и контрольной групп выявлено не было. На пятый день культивирования морфологическая картина не изменилась и являлась типичной для культуры МСК. Межклеточные контакты - плотные, клетки достигают монослоя во всех группах. Анализ диаметра клеток показал отсутствие разницы в размерах клеток в разных группах и во все дни культивирования.

Таким образом, морфологический анализ не выявил отличий в морфологии клеток между контрольной и экспериментальными группами в процессе культивирования. Жизнеспособность клеток в группах также не отличалась.

С 1 по 5 день культивирования количество клеток в поле зрения оценивалось визуально, с учётом показателя % монослоя на поверхности культуральной посуды. Подсчёт клеток проводили

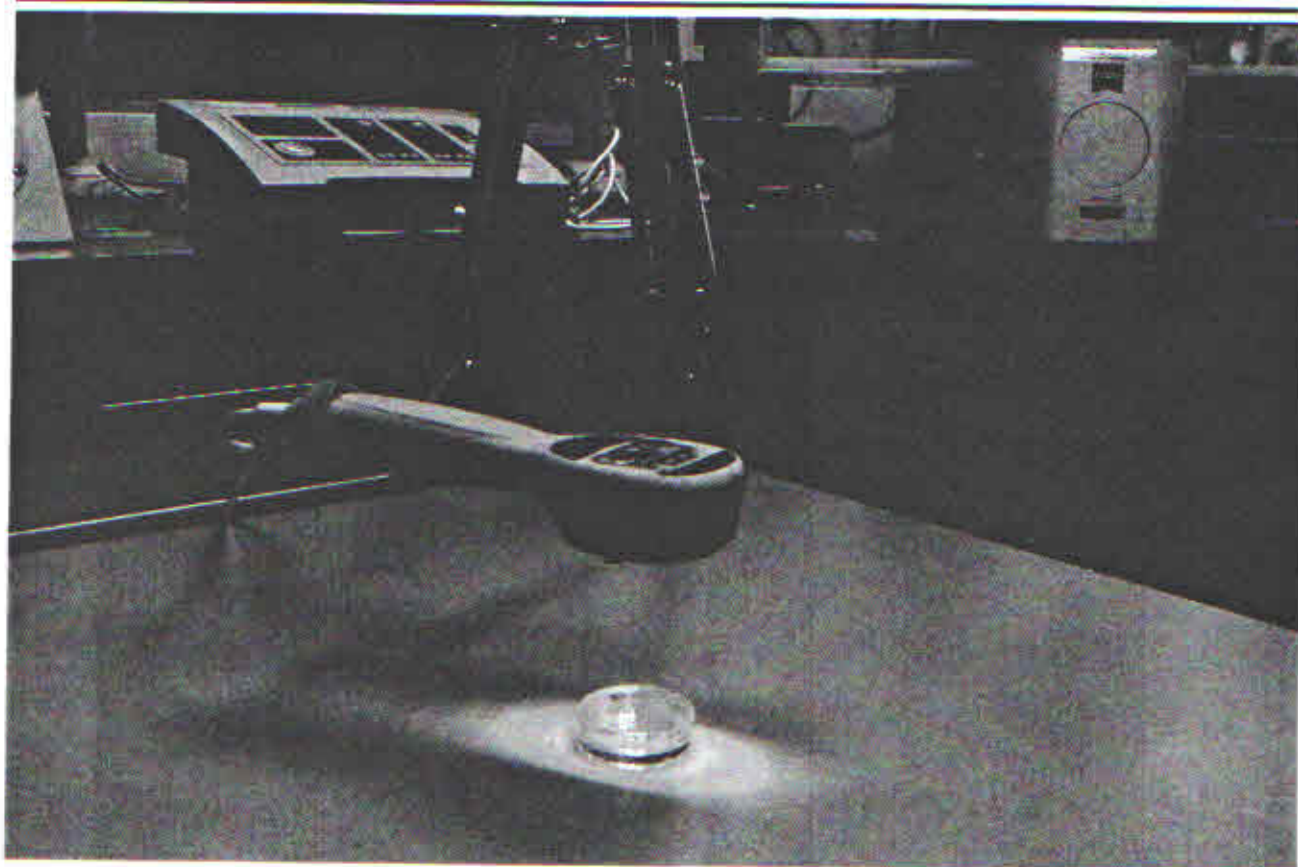


Рис. 1. Расположение лазерной излучающей головки относительно чашки с культурой клеток.

как в ручном, так и в автоматическом режиме. На рисунке 3 представлены данные о количестве клеток в поле зрения через сутки после освечивания. Во всех группах освечивания наблюдается превышение количества клеток относительно контроля, в наибольшей степени в группе ОЛ (904 нм, режим модуляции ЛАЗМИК®).

Оценка монослоя (площадь, занимаемая клетками) визуальнo проводилась в течение 5-и суток культивирования (рис. 4). Общий характер изменений был идентичен для всех клеток, но в группах, подвергшихся освечиванию, более выражен рост в первые 3 дня, что свидетельствует о стимулировании внутриклеточных процессов на первом этапе деления.

Из представленных графиков невозможно сделать однозначный вывод в пользу того или иного режима. Исследование носило предварительный, оценочный характер, а для оптимизации параметров воздействия необходима большая детализация режимов и их комбинаций.

На наш взгляд, перспективно рассматривать результаты предварительного освечивания *in vitro* как часть комплексной программы по конечному результату возможного приживления и нужной дифференцировки. Способность НИЛИ стимулировать пролиферацию клеток [34] и производство

ангиогенных факторов, таких как васкуло-эндотелиального фактора роста (VEGF) [21], предполагает возможность создания среды, которая является оптимальной для роста стволовых клеток *in vivo* [28]. Имеются работы, в которых проводили освечивание НИЛИ уже после пересадки МСК в различные ткани [31, 33, 38, 41].

В пользу необходимости последовательного варианта лазерного воздействия могут свидетельствовать положительные результаты технологии имплантации эмбриональных нервных клеток в полностью рассеченный спинной мозг с последующим освечиванием НИЛИ (780 нм, 100 мВт, 30 мин) участка регенерации. Намного лучшие результаты достигались после предварительного лазерного освечивания культуры клеток (780 нм, 50 мВт, 1 мин). По аналогии можно было бы предположить, что и с МСК лучше было бы проводить предварительное освечивание на этапе культивирования, а затем после их пересадки.

Таким образом, результаты предварительного изучения возможного влияния импульсного НИЛИ инфракрасного (904 нм) и красного спектров (635 нм), в том числе с использованием многочастотного режима ЛАЗМИК®, на морфологию, жизнеспособность, пролиферативную активность и скорость роста мезенхимальных стволовых кле-

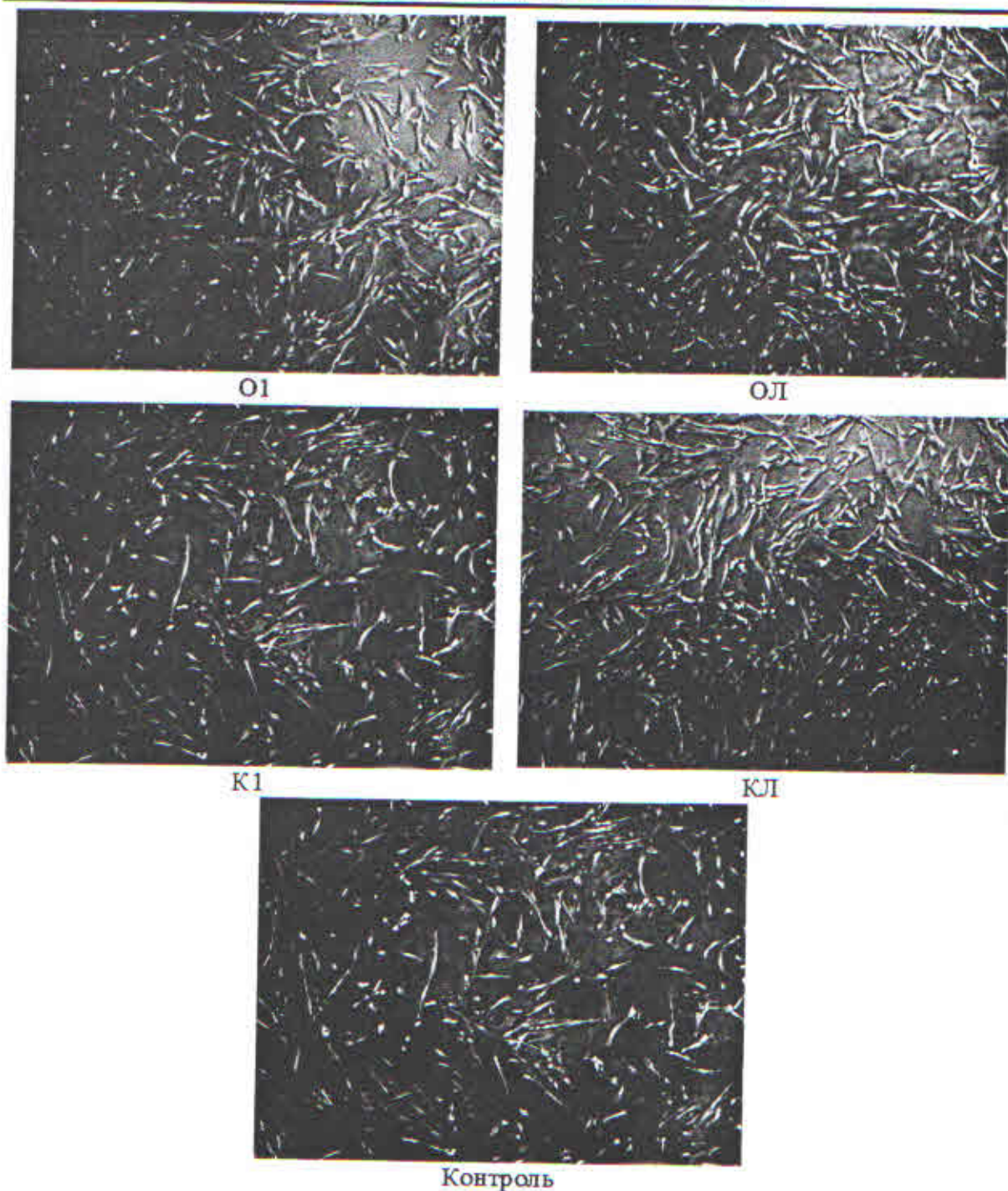


Рис. 2. Культура клеток в группах через сутки после освечивания

ток *in vitro* показали, что при используемых энергетических и временных параметрах воздействия их морфология и жизнеспособность не меняется.

В тоже время наблюдалось небольшое превышение количества клеток относительно контроля, лучший эффект после освечивания инфракрасным (904 нм) импульсным НИЛИ в режиме

многочастотной модуляции ЛАЗМИКа [3]. Эффект проявлялся в наибольшей степени в период с 1-го по 3-й день культивирования.

Необходимо проведение дополнительных исследований для оптимизации параметров воздействия (длина волны, мощность, время и пр.) с возможным расширением методики с освещива-

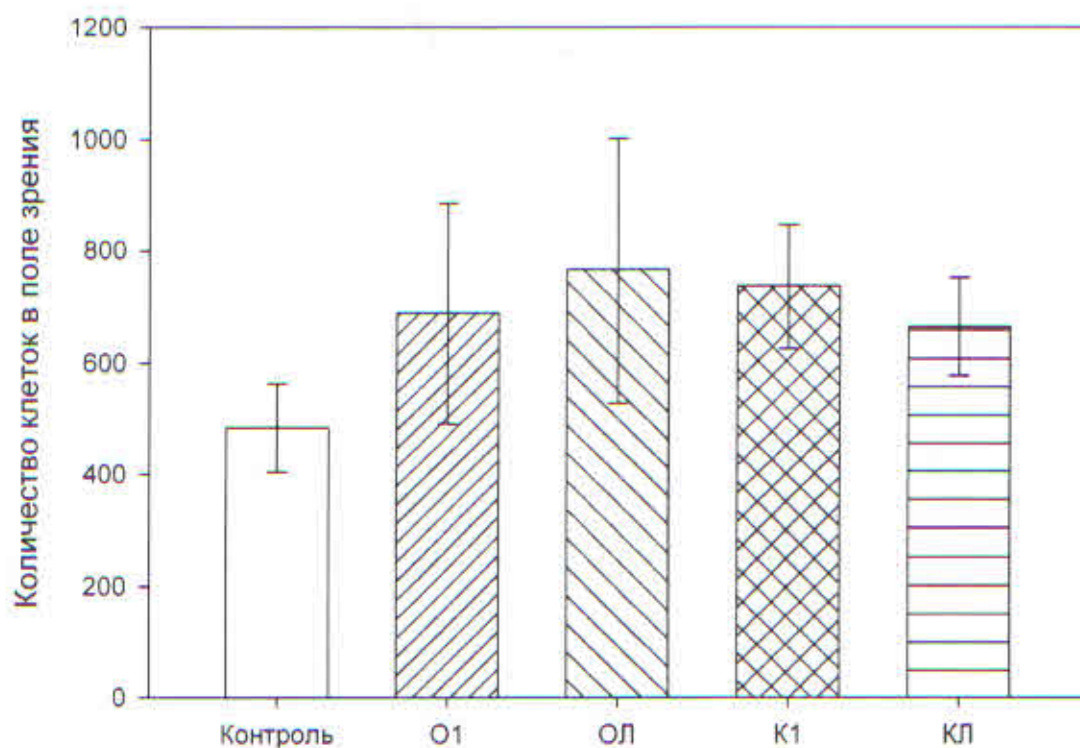


Рис. 3. Количество клеток в поле зрения через сутки после освечивания

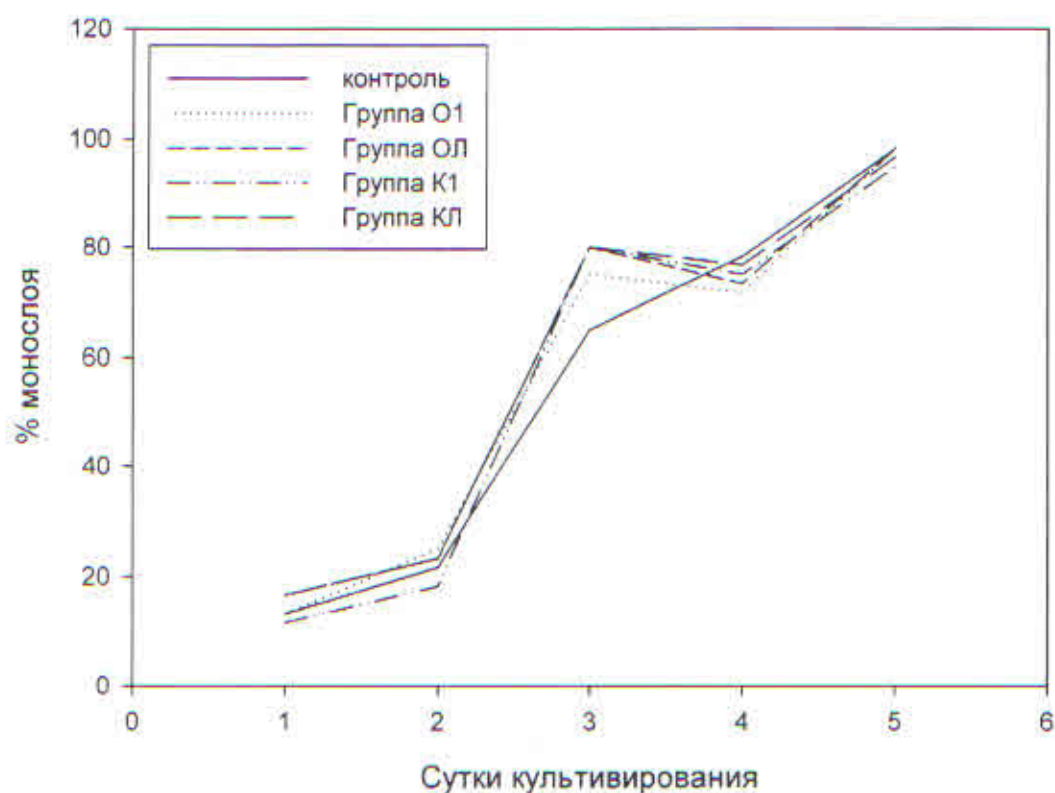


Рис. 4. Площадь, занимаемая клетками в процессе культивирования.

нием МСК не только предварительно, в культуре, но также после имплантации *in vivo*.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Москвин С.В. Системный анализ эффективности управления биологическими системами низкоэнергетическим лазерным излучением: Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. – Тула, 2008. – 38 с.
2. Москвин С.В. Подсчет дозы низкоинтенсивного лазерного излучения: необходимость или вред? // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. – 2012, №6. – С. 54-55.
3. Москвин С.В. Эффективность лазерной терапии. – М.-Тверь: Издательство «Триада», 2014. – 900 с.
4. Поповкина О.Е. Инфракрасное лазерное излучение и кардиомиобласты в лечении хронической сердечной недостаточности: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – Обнинск, 2013. – 18 с.
5. Соколова И.Б., Павличенко Н.Н. Механизмы воздействия экзогенных мезенхимных стволовых клеток на ишемизированную ткань при сердечно-сосудистых заболеваниях // Цитология. – 2010, том 52, № 11. – С. 911-917.
6. Чайлахян Р.К., Юсупов В.И., Свиридов А.П. и др. Акустическое и КВЧ-воздействия на стволовые стромальные клетки костного мозга *in vitro* // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2013, №2. – С. 36-42.
7. Шахбазов А.В., Космачева С.М., Картель Н.А., Потапнев М.П. Нейрогенная дифференцировка мезенхимных стволовых клеток: трансгенный подход // Цитология. – 2010, том 52, № 4. – С. 301-304.
8. Abramovitch-Gottlieb L., Gross T., Naveh D. et al. Low-level laser irradiation stimulates osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix // *Lasers in Medical Science*. – 2005, 20(3-4): 138–146.
9. Eduardo F.P., Bueno D.F., de Freitas P.M. et al. Stem cell proliferation under low-intensity laser irradiation: a preliminary study // *Lasers in Surgery and Medicine*. – 2008, 40(6): 433–438.
10. Freshney R.I., Stacey G.N., Auerbach J.M. Culture of human stem cells. – Hoboken, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2007. – 256 p.
11. Friedenstein A.J., Gorskaja J.F., Kulagina N.N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs // *Exp. Hematol.* – 1976, 4(5): 267-274.
12. Gärtner A., Pereira T., Armada-da-Silva P.A.S. et al. Effects of umbilical cord tissue mesenchymal stem cells (UCX®) on rat sciatic nerve regeneration after neurotmesis injuries // *JSRM*. – 2014, 10(1): P1-P13.
13. Giannelli M., Chellini F., Sassoli C. et al. Photoactivation of bone marrow mesenchymal stromal cells with diode laser: effects and mechanisms of action // *J Cell Physiol*. – 2013, 228(1): 172-181.
14. Hashmi J.T., Huang Y.Y., Osmani B.Z. et al. Role of low-level laser therapy in neurorehabilitation // *PM R*. – 2010, 2(12, Suppl. 2): S292-S305.
15. Hermann A., Gastl R., Liebau S. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells // *J. Cell Sci*. – 2004, 117(19): 4411-4422.
16. Hode L. The DOSE: a minute to learn, a lifetime to master // *World Association for Laser Therapy Conference*. – Gold Coast, 2012. – P. 50.
17. Horvát-Karajz K., Balogh Z., Kovács V. et al. In vitro effect of carboplatin, cytarabine, paclitaxel, vincristine, and low-power laser irradiation on murine mesenchymal stem cells // *Lasers in Surgery and Medicine*. – 2009, 41(6): 463–469.
18. Hou J.F., Zhang H., Yuan X. et al. In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation // *Lasers in Surgery and Medicine*. – 2008, 40(10): 726–733.
19. Kim H.K., Kim J.H., Abbas A.A. et al. Red light of 647 nm enhances osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells // *Lasers in Medical Science*. – 2009, 24(2): 214–222.
20. Kim S., Honmou O., Kato K. Neural differentiation potential of peripheral blood- and bone-marrow-derived precursor cells // *Brain Res*. – 2006, 1123(1): 27-33.
21. Kipshidze N., Nikolaychik V., Keelan M.H. et al. Low power helium: neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells *in vitro* // *Lasers in Surgery and Medicine*. – 2001, 28: 355–364.
22. Kushibiki T., Awazu K. Blue laser irradiation enhances extracellular calcification of primary mesenchymal stem cells // *Photomedicine and Laser Surgery*. – 2009, 27(3): 493–498.
23. Kushibiki T., Hirasawa T., Okawa S., Ishihara M. Blue laser irradiation generates intracellular reactive oxygen species in various types of cells // *Photomedicine and Laser Surgery*. – 2013, 31(3): 95–104.
24. Leonida A., Paiusco A., Rossi G. et al. Effects of low-level laser irradiation on proliferation and osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix: *in vitro* pilot study // *Lasers Med Sci*. – 2013, 28(1): 125-132.
25. Li W.T., Leu Y.C. Effects of low level red-light irradiation on the proliferation of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow // *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. – 2007: 5830–5833.
26. Li W.T., Leu Y.C., Wu J.L. Red-light light-emitting diode irradiation increases the proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells // *Photomedicine and Laser Surgery*. – 2010, 28(S1): S157- S165.

27. Li W.T., Chen C.W., Huang P.Y. Effects of low level light irradiation on the migration of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow // *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* – 2013; 4121-4124.
28. Lin F., Josephs S.F., Alexandrescu D.T. et al. Lasers, stem cells, and COPD // *Journal of Translational Medicine.* – 2010, 8(16): <http://www.translational-medicine.com/content/8/1/16>
29. Lipovsky A., Oron U., Gedanken A., Lubart R. Low-level visible light (LLVL) irradiation promotes proliferation of mesenchymal stem cells // *Lasers Med Sci.* – 2013, 28(4): 1113-1117.
30. Long X., Olszewski M., Huang W. Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells // *Stem Cells Develop.* – 2005, 14(1): 65-69.
31. Oron U., Maltz L., Tuby H. Enhanced liver regeneration following acute hepatectomy by low-level laser therapy // *Photomed Laser Surg.* – 2010, 28(5): 675-678.
32. Peng F., Wu H., Zheng Y. et al. The effect of noncoherent red light irradiation on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells // *Lasers Med Sci.* – 2012, 27(3): 645-653.
33. Saygun I., Nizam N., Ural A.U. et al. Low-level laser irradiation affects the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor-I (IGF-I), and receptor of IGF-I (IGFBP3) from osteoblasts // *Photomed Laser Surg.* – 2012, 30(3): 149-154.
34. Schindl A., Merwald H., Schindl L. et al. Direct stimulatory effect of low-intensity 670-nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation // *Br J Dermatol.* – 2003, 148(2): 334-336.
35. Soleimani M., Abbasnia E., Fathi M. The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neurons and osteoblasts: an in vitro study // *Lasers Med Sci.* – 2012, 27(2): 423-430.
36. Tuby H., Maltz L., Oron U. Low-level laser irradiation (LLL) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture // *Laser in Surgery and Medicine.* – 2007, 39(4): 373-378.
37. Tuby H., Maltz L., Oron U. Implantation of low-level laser irradiated mesenchymal stem cells into the infarcted rat heart is associated with reduction in infarct size and enhanced angiogenesis // *Photomedicine and Laser Surgery.* – 2009, 27(2): 227-233.
38. Tuby H., Maltz L., Oron U. Induction of autologous mesenchymal stem cells in the bone marrow by low-level laser therapy has profound beneficial effects on the infarcted rat heart // *Lasers Surg Med.* – 2011, 43(5): 401-409.
39. Wang J., Huang W., Wu Y. et al. MicroRNA-193 pro-proliferation effects for bone mesenchymal stem cells after low-level laser irradiation treatment through inhibitor of growth family, member 5 // *Stem Cells Develop.* – 2012, 21(1): 2508-2519.
40. Wu Y.H., Wang J., Gong D.X. et al. Effects of low-level laser irradiation on mesenchymal stem cell proliferation: a microarray analysis // *Lasers Med Sci.* – 2012, 27(2): 509-519.
41. Yang C.C., Wang J., Chen S.C., Hsieh Y.L. Synergistic effects of low-level laser and mesenchymal stem cells on functional recovery in rats with crushed sciatic nerves // *J Tissue Eng Regen Med.* – 2013 Mar 7. doi: 10.1002/term.1714.

Авторская справка

1. Москвин Сергей Владимирович, к.т.н., д.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ «Государственный научный центр лазерной медицины ФМБА РФ», 121165, Россия, г. Москва, ул. Студенческая, д. 40 стр. 1, тел.: +7-916-987-9095, e-mail: 7652612@mail.ru.

2. Ключников Дмитрий Юрьевич, биолог лаборатории ГБУЗ «Самарский областной центр планирования семьи и репродукции», 443095, Россия, г. Самара, ул. Ташкентская, д. 159, тел.: +7-917-117-8203, e-mail: dklyuchnikov@cordbank.ru.

3. Антипов Евгений Валерьевич, ассистент каф. естественно-научных дисциплин НОУ ВПО Медицинский институт «РЕАВИЗ», Россия, 443001, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 227, тел.: +7-927-752-3936, e-mail: eugantipov@gmail.com.

4. Волчков Станислав Евгеньевич, к.м.н., зам. директора по контролю качества ГБУЗ «Самарский областной центр планирования семьи и репродукции», 443095, Россия, г. Самара, ул. Ташкентская, д. 159, тел.: +7-960-815-9408, e-mail: quality@cordbank.ru

5. Супильников Алексей Александрович, к.м.н., проректор по научной деятельности и организационным вопросам НОУ ВПО Медицинский институт «РЕАВИЗ», 443001, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 227, тел.: +7-917-110-88-11, e-mail: a_supilnikov@mail.ru.

6. Киселева Ольга Николаевна, старший преподаватель НОУ ВПО Медицинский институт «РЕАВИЗ», 443001, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 227, тел.: +7-927-720-08-28, e-mail: olenka.kiseleva@bk.ru.

7. Брусенцева Лидия Юрьевна старший преподаватель НОУ ВПО Медицинский институт «РЕАВИЗ», 443001, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 227, тел.: +7-917-118-77-62, e-mail: brusencevalidia@mail.ru.