

УДК 613.165.6:611.018.15

Москвин С.В.¹, Ключников Д.Ю.², Антипов Е.В.³, Горина А.И.², Киселева О.Н.³**Влияние непрерывного низкоинтенсивного лазерного излучения красного (635 нм) и зеленого (525 нм) спектров на мезенхимальные стволовые клетки человека *in vitro***

Moskvin S.V., Kljuchnikov D.Yu., Antipov E.V., Gorina A.I., Kiseleva O.N.

Effects of continuous low-intensive laser irradiation with red (635 nm) and green (525 nm) light of human mesenchymal stem cells *in vitro*¹ ФГБУ «Государственный научный центр лазерной медицины ФМБА РФ», Москва; ² ГБУЗ «Самарский областной центр планирования семьи и репродукции», Самара; ³ НОУ ВПО «Медицинский институт «РЕАВИЗ», Самара

Введение. Одним из способов неспецифического регулирования клеточной активности МСК на этапе предварительного культивирования *in vitro* является воздействие низкоинтенсивным лазерным излучением (НИЛИ). В задачи исследования входило изучение предельных режимов непрерывного НИЛИ красного (635 нм) и зеленого (525 нм) спектров. *Материалы и методы.* В эксперименте использовали адгезивную культуру МСК, 4 пассажа, полученных из ткани пуповины донора, давшего информированное согласие. Для освечивания использовали лазерный терапевтический аппарат «Лазмик-ВЛОК» (РУ № РЗН 2014/1410 от 06.02.2014), лазерные излучающие головки с одним лазерным диодом КЛО-635-40 (635 нм, 4,9 мВт/см²) и КЛО-525-50 (525 нм, 5,4 мВт/см²), работающие в непрерывном режиме. Фиксация лазерных излучающих головок обеспечивалась специальной насадкой (банкой) для лазерно-вакуумного массажа из комплекта КБ-5 диаметром 35 мм. Экспозиция во всех режимах составляла 5 мин. *Выводы.* Показано, что при используемых энергетических и временных параметрах воздействия морфология и жизнеспособность МСК не меняется. Полученные нами данные демонстрируют предельный уровень выбранных энергетических параметров, при которых наблюдается не просто отсутствие положительного эффекта в отношении стимулирования пролиферации, но возможно, и ингибирование. *Ключевые слова:* мезенхимальные стволовые клетки, лазерное излучение, морфология и деление клеток.

Introduction. One of the techniques for non-specific regulation of cellular activity in mesenchymal stem cells (MSC) at the stage of preliminary cultivation *in vitro* is irradiation with low-intensive laser light (LILI). The aim of the present work was to study limiting regimes for continuous LILI of red (635 nm) and green (525 nm) spectra. *Materials and methods.* The adhesive MSC culture, 4 passages, received from the umbilical tissue of a donor who had given his informed consent was used in the study. Irradiation was done with laser therapeutic device «Lazmik-VLOK» (RU No RZN 2014/1410 dated 06.02.2014) having emitting heads with one laser diode KLO-635-40 (635 nm, 4.9 mWt/cm²) and KLO-525-50 (525 nm, 5.4 mWt/cm²) in continuous mode. The laser emitting heads were fixed with a special attachment for laser-vacuum massage taken from the set KB-5, diameter 35 mm. Exposure time in all regimes was 5 min. *Conclusion.* It has been shown that morphology and MSC vital capacity do not change under the applied energetic and time parameters. The obtained findings have defined limit values of chosen energetic parameters under which there is not only lack of positive effect as to the proliferation stimulation but, possibly, its inhibition. *Key words:* mesenchymal stem cells, laser irradiation, morphology and cell division.

Введение

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) – мультипотентные стромальные клетки, содержатся почти во всех тканях человека, способны к дифференцировке в различные типы клеток [7, 18] и давно привлекают внимание исследователей и практических врачей с точки зрения их возможного использования для заместительной или восстановительной терапии заболеваний. Есть данные о возможности получения из МСК нейрональных предшественников с последующей дифференцировкой их в клетки нервной ткани (нейроны, астроциты, олигодендроциты) [8, 23, 29, 39]. Известно также, что МСК секретируют почти все основные провоспалительные цитокины и ростовые факторы [7]. МСК человека сохраняют способность к пролиферации и дифференцировке при культивировании *in vitro*, а также при реимплантации, что обуславливает их высокую значимость в клинической практике [2, 18].

Одним из известных способов неспецифического регулирования клеточной активности МСК на этапе предварительного культивирования *in vitro* является воздействие низкоинтенсивным лазерным излучением (НИЛИ), для чего использовали лазерные источники с разной длиной волны, работающие в основном в непре-

рывном режиме (табл. 1). Ранее нами было показано, что низкоинтенсивный импульсный лазерный свет также способен эффективно стимулировать пролиферацию МСК *in vitro* [5].

Как видно из таблицы, энергетическая плотность (ЭП) находится в достаточно узких пределах, характерных для эффектов, наблюдаемых в других типах клеток [4], но важнейшие параметры методики воздействия часто не указываются, что не позволяет обеспечить воспроизводимость результатов лазерного освечивания [24]. Также не теряет своей актуальности вопрос оптимизации параметров освечивания, выбор длины волны в сочетании с оптимальными энергетическими характеристиками воздействия (мощность, плотность мощности и экспозиция) [1].

Из табл. 1 видно, насколько разнообразны получаемые в результате лазерного освечивания эффекты, но обращает на себя внимание тот факт, что все они кальций-зависимые. Поскольку первичным механизмом стимуляции клеточной активности НИЛИ является термодинамический запуск Ca²⁺-зависимых процессов [3], то это позволяет предположить возможное влияние низкоинтенсивного лазерного света на изменение физиологии регулирования на клеточном уровне. Также

Таблица 1

Результаты воздействия НИЛИ различной длины волны на МСК *in vitro*

| Эффекты | Длина волны, нм | ПМ, мВт/см ² | Время, с | ЭП, Дж/см ² | Источник литературы |
|--|-----------------|--|----------------------|---|---------------------|
| Внеклеточная кальцификация | 405 | 2,5 | 180 | 9, 18, 27, 36 | [31] |
| Усиление пролиферации и увеличение мембранного потенциала митохондрий hADSCs | 532 | 153 (30 мВт, диаметр пятна 5 мм) | 30, 45, 60, 180, 300 | 4,6; 6,9; 9,2; 28; 46 | [11] |
| Пролиферация | 630 | 15 | 270 | 4 | [34] |
| Трансмембранная миграция | 630, 850 | 15 | 270 | 4 | [35] |
| Пролиферация | 633 | 3 | 10 | 0,3 | [9] |
| Пролиферация (оптимальная ЭП 0,5 Дж/см ²), дифференцировка и секреция факторов роста (оптимальная ЭП 5 Дж/см ²) | 635 | 6,61 (60 мВт на площадь 9,08 см ²) | 75–750 | 0,5–5 | [26] |
| Пролиферация, активация K ⁺ и Ca ²⁺ -каналов | 635 | 12,6 и 32,6 (89 мВт на площадь 7 и 2,7 см ²) | 26 и 10 | 0,33 | [20] |
| Пролиферация, активация генов Akt1, Ptnb, Stk17b, Ccnd1 и Pik3ca | 635 | 6,61 | 75 | 0,5 | [56] |
| Активация сигнальной РНК (miR-193) | 635 | 6,61 | 75 | 0,5 | [54] |
| Пролиферация | 635 | 5,5 | 90 | 0,5 | [43] |
| Высвобождение эпидермального фактора роста (EGF) | 635 | 12,1 | 413 | 5 | [15, 44] |
| Повышение жизнеспособности (МСК получены из жировой ткани) | 636 | 9,3 | 550 | 5 | [42] |
| Остеогенная дифференцировка (повышение уровня щелочной фосфатазы, коллагена I типа, экспрессия мРНК, остеопонтина, транскрипционного фактора Runx2 и др.) | 647 | 9,3 мВт | 10, 30 и 90 | 0,093; 0,279 и 0,836 Дж | [28] |
| Пролиферация, ослабление цитотоксического действия препаратов | 660 | 76–156 | 25–12 | 1,9 | [25] |
| Пролиферация | 660 | 30 мВт | – | 0,5 и 1 | [12] |
| Адгезия, пролиферация, экспрессия гена фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и рецепторов VEGF 2-го типа (VEGFR2) | 660 | 30 мВт | 25–300 | 0,7 Дж – усиление, а при 9 Дж – подавление пролиферации, 3–9 Дж – лучше адгезия | [14] |
| Пролиферация | 660 | 20 и 40 мВт | 6 и 3 | 3 | 17 |
| НИЛИ снижает липополисахарид-индуцированную продукцию провоспалительных цитокинов (Cox-2, IL-1 β , IL-6, IL-8) у стволовых клеток человека, полученных из жировой ткани (hADSCs), предположительно за счет увеличения внутриклеточного уровня цАМФ, ингибирующего транскрипционный фактор NF- κ B | 660 | 15,7 | 264 и 528 | 4 и 8 (лучше) | [55] |
| Высвобождение bFGF, инсулин-подобного фактора роста 1 (IGF-1) и рецептора IGF-1 (IGFBP3) | 685 | 14,3 | 140 | 2 | [48] |
| Выживаемость | 780 | 1000 | 10 | 10 | [16] |
| Пролиферация | 804 | 50 | 20, 60 | 1, 3 | [51] |
| Пролиферация | 804 | 10 | 100 | 1 | [53] |
| Управление ростом | 810 | 10 | 100 | 1 | [52] |
| Дифференцировка и распространение | 810 | – | – | 3–6 | [49] |
| Дифференцировка и пролиферация | 1064* | 15 Гц, 100–150 мДж, 1,5–2,25 Вт | – | – | [33] |
| Пролиферация | 635* | 144 нс, 1500 Гц и многочастотный режим Лазмик [®] | 300 | 0,009 и 0,036 | [5] |
| | 904* | 108 нс, 1500 Гц и многочастотный режим Лазмик [®] | 300 | 0,015 и 0,042 | |
| Продукция АФК | 405 | 100 | 60 и 120 | 6 и 12 | [32] |
| | 664 | | | | |
| | 808 | | | | |

Примечание. * – импульсный режим.

известно, что при увеличении внутриклеточного кальция снижается вероятность гибели по механизму апоптоза и повышается выживаемость эмбриональных стволовых клеток *in vitro* [6], МСК *in vivo* [19].

В отношении возможного влияния некогерентного света на МСК данные противоречивы, наша же позиция в отношении некогерентных источников однозначна – бесполезны, необходимо использовать только лазерный монохроматический свет для эффективного воздействия, получения максимального отклика биологических систем разного уровня организации [4].

Необходимо также учитывать известный факт, что после одного воздействия наблюдается лишь кратковременное повышение пролиферации (630 нм, 15 мВт/см², ЭП 4 Дж/см²), эффект усиливается после многократного освещивания и при низкой плотности клеток [36], т. е. необходимо проводить 3–5-кратное повторное освещивание с целью усиления воздействия.

В задачи нашего исследования входило изучение влияния непрерывного низкоинтенсивного лазерного излучения красного (635 нм) и зеленого (525 нм) спектров на мезенхимальные стволовые клетки человека *in vitro* на морфологию, жизнеспособность, пролиферативную активность и скорость роста МСК *in vitro*. Основной задачей стала оценка предельных режимов воздействия непрерывным лазерным светом с данными параметрами.

Материалы и методы

Культура клеток

В эксперименте использовали адгезивную культуру МСК, 4 пассажа, полученных из ткани пуповины донора, давшего информированное согласие. Забор, транспортировку и обработку материала проводили в течение 24 ч с момента родов. МСК получены методом эксплантов с последующим культивированием фрагментов. Культивирование проводили в течение 6 сут,

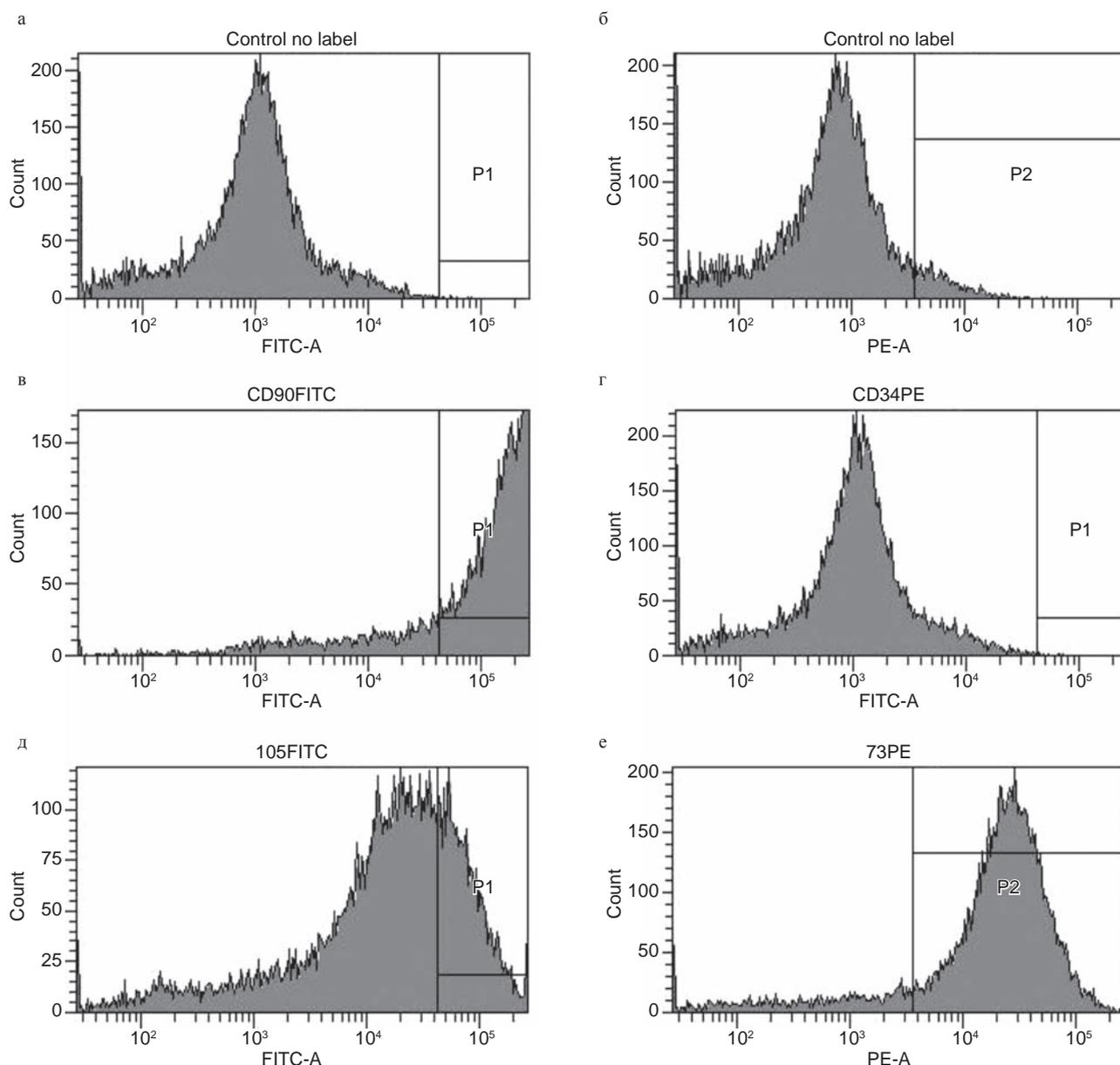


Рис. 1. Иммунофенотипический профиль культуры МСК: а – базовый (контрольный) уровень свечения клеток для канала с FITC; б – базовый (контрольный) уровень свечения клеток для канала с PE; в – уровень свечения МСК, окрашенных anti-CD90 FITC; г – уровень свечения МСК, окрашенных anti-CD34PE; д – уровень свечения клеток, окрашенных anti-CD105FITC; е – уровень свечения клеток, окрашенных anti-CD73PE

с использованием стандартных питательных сред: Minimum Essential Medium Eagle, Alpha Modification with NaHCO_3 (Sigma-Aldrich, Германия), 2mM L-глутамин (ПанЭко, Россия), 10% сыворотки плодов коровы (MSC FBS, Gibco, Австралия). Культивирование проводили на чашках Петри площадью 11,78 cm^2 (EasyGrip™, Beckton Dickinson, USA). Также использовали: 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).

Исследование проводили в 4 опытных и 4 контрольных группах, при 3 чашках (повторениях) в каждой группе. Посев культуры проводили за 8–10 ч до эксперимента в количестве $9,1 \times 10^4$ кл/см² на чашки Петри площадью 11,8 cm^2 . Опытные группы 1 и 5 освещивали на режиме лазера № 1, группы 2 и 6 в режиме № 2. При этом пассирование освещенных клеток в группах 1 и 2 проводили на обедненной сывороткой среде (1% FBS), а клеток в группах 5 и 6 – на стандартной (10% FBS). Контрольные группы (3, 4, 7 и 8) не освещивали. Пассирование клеток в группах 3 и 8 (контроль 1 и 4) проводили также на обедненной сывороткой среде, а групп 4 и 7 (контроль 2 и 6) – на стандартной (10% FBS). Автоматический подсчет общего количества клеток, живых клеток и жизнеспособности проводили в группах 1–4 на 1-е, 3-и и 4-е сут. Морфологический анализ проводили в группах 5–8 на 3-и сут. Визуальное наблюдение за ростом культуры осуществляли регулярно. Культивирование проводили при 37 °C и 5% CO_2 .

Методы исследования

Световая и флуоресцентная микроскопия. Фотодокументирование проводили регулярно в каждой группе с помощью микроскопа Zeiss AxioObserver, на программном обеспечении AxioVision V 4.6.3.0.

Фиксация и окраска культуры. Для определения морфологии клеток использовали флуоресцентные красители: WheatGermAgglutinin, AlexaFluor® 647 Conjugate

(exc/em ~650/668 nm) и DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) exc/em 358/461 nm (фирма LifeTechnologies, США).

Перед окрашиванием клетки фиксировали на пластике с добавлением 4% формальдегида (Panreac, Испания), приготовленном на бифосфатном буфере (ПБС), фиксацию проводили в течение 30 мин при +4 °C. Отмывали дважды ПБС+0,1% Triton X100 (ПБСТ).

Далее последовательно окрашивали культуру WGA-Alexa (5 мкг/мл) 10 мин при комнатной температуре. Несвязавшийся краситель отмывали дважды ПБСТ по 5 мин и окрашивали клетки DAPI (1 мкг/мл) 10 мин при комнатной температуре. Не связавшийся краситель дважды отмывали ПБСТ по 5 мин. Клетки заливали ПБС. Фотодокументирование проводили в каждой группе с помощью микроскопа Zeiss AxioObserver, на программном обеспечении AxioVision V 4.6.3.0. Все процедуры по окраске клеток проводили в темноте.

Подсчет общего количества клеток, оценку жизнеспособности осуществляли на автоматическом анализаторе концентрации и жизнеспособности клеток Vi-Cell XR (BeckmanCoulter, США). Обработку данных и построение графиков проводили с помощью программного обеспечения Excel (Microsoft Office 2007, Microsoft, США). Статистическую обработку результатов выполняли с использованием программы SigmaPlot version 11.0.

Параметры лазерного воздействия

Опытные группы клеток освещивали НИЛИ (параметры представлены в табл. 2), время экспозиции 5 мин на 1 чашку. Контрольные группы не подвергали воздействию. Применяли аппарат лазерный терапевтический «Лазмик-ВЛОК» (Регистрационное удостоверение № РЗН 2014/1410 от 06.02.2014), лазерные излучающие головки, работающие в непрерывном режиме с одним лазерным диодом. Фиксацию лазерных излучающих головок, что необходимо для равномерной засветки всей чашки, обеспечивали специальной насадкой (банкой) для лазерно-вакуумного массажа из комплекта КБ-5 диаметром 35 мм (рис. 2).



Рис. 2. Расположение лазерных излучающих головок относительно чашки с культурой клетки МСК

Таблица 2
Параметры НИЛИ освечивания (лазерные излучающие головки к аппаратам серии «Лазмик»)

| Лазерная излучающая головка | | Длина волны, нм | Средняя мощность, мВт | ПМ, мВт/см ² | ЭП, Дж/см ² |
|-----------------------------|------------|-----------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|
| Шифр | Название | | | | |
| Л1 | КЛО-635-40 | 635 | 42 | 4,9 | 1,3 |
| Л2 | КЛО-525-50 | 525 | 47 | 5,4 | 1,6 |

Чашки полностью находились в световом поле, что обеспечивало поглощение ~90% всей падающей световой энергии. Исходя из этого рассчитывали плотность мощности (ПМ) и энергетическую плотность (ЭП) для каждого варианта освечивания. Требование к равномерной засветке всей поверхности чашки связано с обеспечением лучшего эффекта, чем при точечном воздействии на часть культуры клеток [38, 54].

Результаты и обсуждение

Подсчет общего количества клеток, живых клеток и определение жизнеспособности проводили в 2 повторностях в группах 1–4. Результаты средних значений представлены в табл. 3.

При подсчете общего количества клеток в культуре было показано (рис. 3), что на 3-й день после освечивания (4-й день пассирования) в контроле, растущем на полной среде, плотность была более чем в 5 раз выше, чем в опытных вариантах и контроле, растущем на низкосывороточной среде. Показатели 4-го дня после освечивания (5-го дня пассирования) незначительно отличаются от показателей 3-го дня.

Параллельно с определением плотности культуры определяли жизнеспособность клеток во всех вариантах (рис. 4).

Жизнеспособность клеток во всех вариантах варьирует в пределах 75–90% в разные дни и не коррелирует

Таблица 3

Жизнеспособность клеток до и после освечивания

| Группа клеток | 1-е сутки | | | 3-и сутки | | | 4-е сутки | | |
|---------------|-------------------------------|---------------------------|----------------------|-------------------------------|---------------------------|----------------------|-------------------------------|---------------------------|----------------------|
| | Общ. к-во (×10 ⁶) | Живых (×10 ⁶) | Жизнеспособность (%) | Общ. к-во (×10 ⁶) | Живых (×10 ⁶) | Жизнеспособность (%) | Общ. к-во (×10 ⁶) | Живых (×10 ⁶) | Жизнеспособность (%) |
| 1 | 0,1076 | 0,0977 | 89,9 | 0,1333 | 0,097 | 73,8 | 0,1639 | 0,1382 | 81,3 |
| 2 | 0,1490 | 0,1022 | 69,9 | 0,1796 | 0,12789 | 71,7 | 0,1333 | 0,0869 | 63,9 |
| 3 | 0,1027 | 0,0766 | 77,5 | 0,1333 | 0,082 | 60,7 | 0,1130 | 0,1076 | 96,7 |
| 4 | 0,3281 | 0,3025 | 92,3 | 0,7637 | 0,6715 | 87,9 | 0,7790 | 0,6715 | 86,4 |

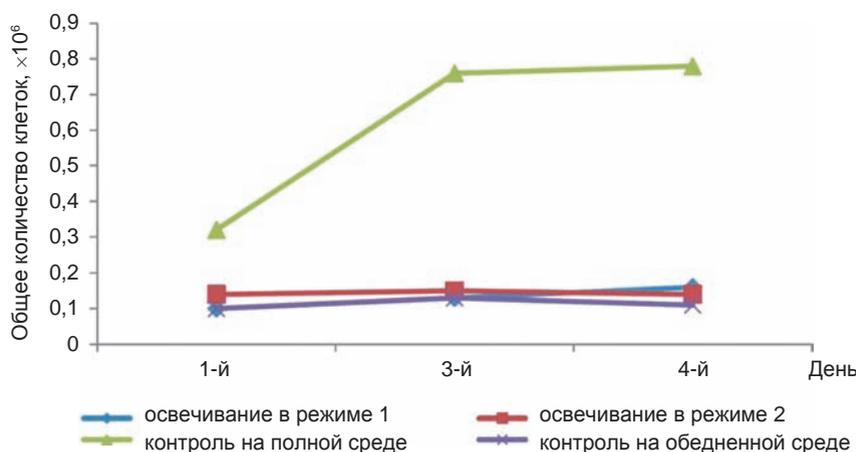


Рис. 3. Влияние НИЛИ на пролиферативную активность культуры МСК в условиях дефицита сыворотки в среде, динамика роста культуры

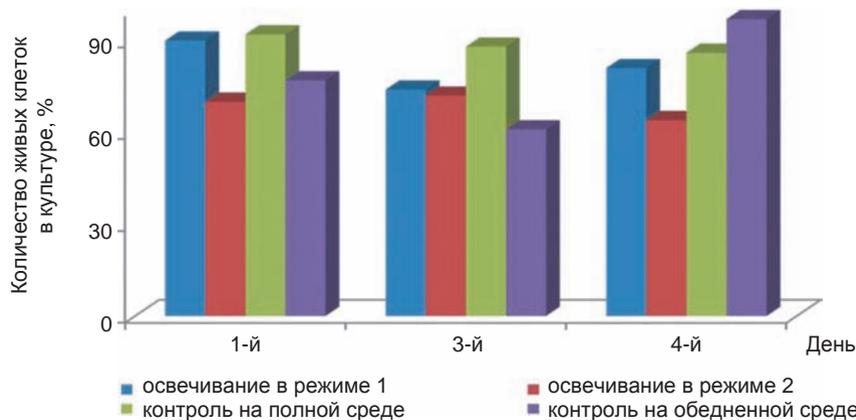


Рис. 4. Влияние НИЛИ на жизнеспособность культуры МСК в условиях дефицита сыворотки в среде

с особенностями состава среды. Однако стоит отметить, что в опытном образце, который подвергали освечиванию в режиме № 2, наблюдалась самая низкая жизнеспособность (статистически не достоверно).

Оценка морфологии клеток.

Группа 1 (режим НИЛИ № 1, красный лазер, 635 нм, 10%FBS). В данном варианте культура плотная, наблюдается наслаивание клеток (многослойная культура). Клетки веретеновидной формы, края не деформированы, ядра четкие, во многих просматриваются ядрышки. Клетки без морфологических особенностей (рис. 5).

Группа 2 (режим НИЛИ № 2, зеленый лазер, 525 нм, 10%FBS). Визуально культура плотная, наблюдается наслаивание клеток (многослойная культура). Клетки веретеновидной формы, края не деформированы, ядра четкие, во многих просматриваются ядрышки. Клетки без морфологических особенностей (рис. 6).

Группа 3 (контроль, 10%FBS). Визуально культура плотная, наблюдается наслаивание клеток (многослойная культура). Клетки веретеновидной формы, края не деформированы, ядра четкие, во многих просматриваются ядрышки. Клетки без морфологических особенностей (рис. 7).

Группа 4 (контроль, 1%FBS). Визуально наблюдается 99% монослой. Клетки веретеновидной формы, края не деформированы, ядра четкие, во многих просматриваются ядрышки. Визуально клетки в культуре имеют большие размеры в сравнении с опытными образцами, что вполне сопоставимо с условиями роста на обедненной среде (рис. 8).

Тем не менее на данном фото видно, что клетки свободно распластаны на подложке, при этом морфология не изменена. Края ровные, ядра четкие, цитоплазма чистая.

Во всех вариантах морфология клеток является типичной для мезенхимально-стромальной культуры, клетки веретенообразные фибробластоподобные, распластаные по подложке. Ядра четкие, по большей части находящиеся в интерфазе деления, структура не изменена, хорошо просматриваются ядрышки.

Культуры, представленные на снимках, образуют плотный монослой с количеством здоровых жизнеспособных клеток 99,9%, исключение составляет лишь группа 4 (контроль на 1% FBS, выращенный на среде с обедненным содержанием сыворотки), где уровень конфлюэнта достигал лишь 70%, что объяснимо низким содержанием в ростовой среде необходимых компонентов.

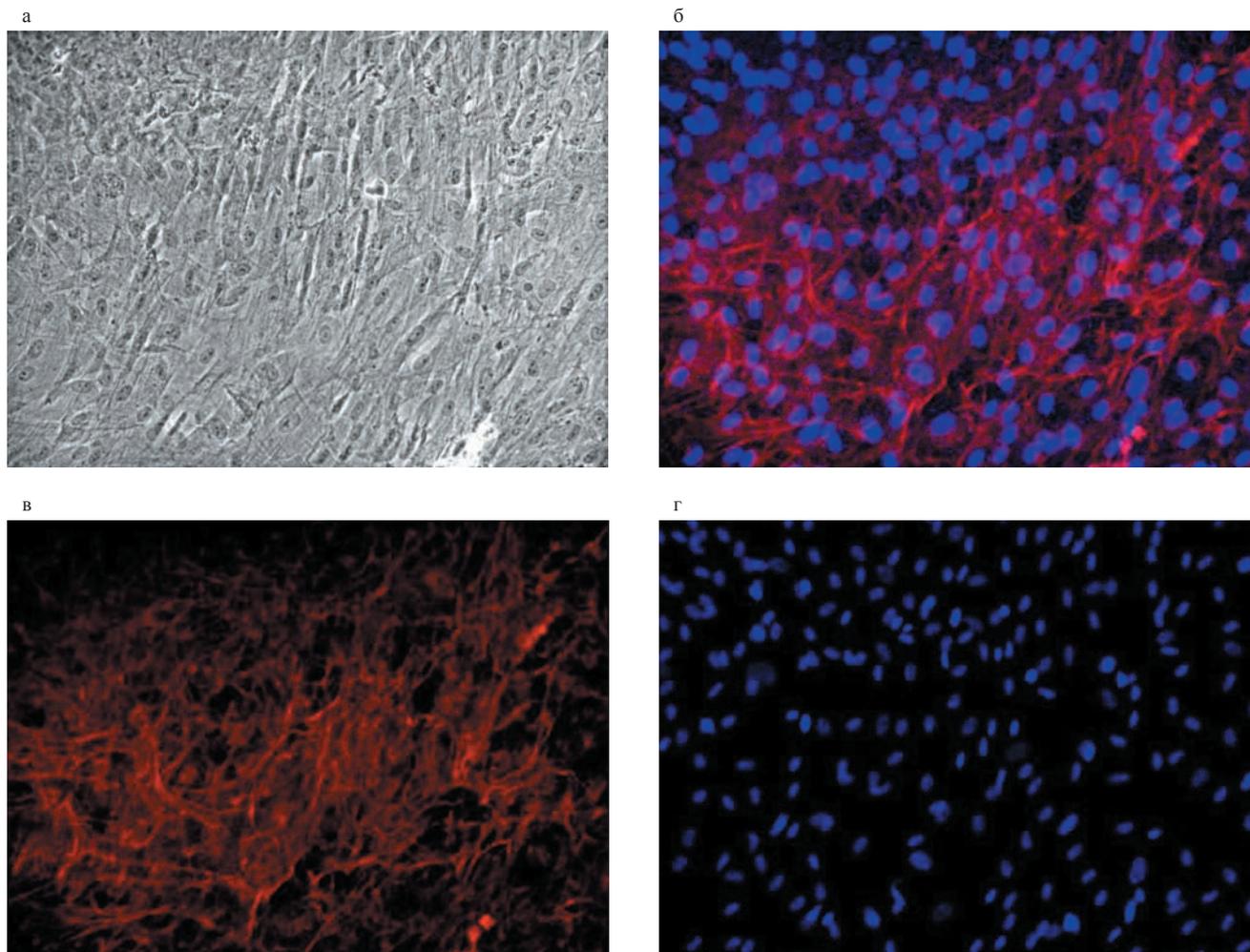


Рис. 5. Микрофотография культуры, выращенной на среде с 10% сыворотки и освещенной НИЛИ в режиме № 1 (красный лазер, 635 нм), в проходящем свете и окрашенной флуоресцентными красителями: а – фотография клеток в проходящем свете, увеличение $\times 10$; б – под флуоресцентным микроскопом, окрашенных DAPI и WGA-alexa; в – под флуоресцентным микроскопом, окрашенных WGA-alexa; г – под флуоресцентным микроскопом, окрашенных DAPI

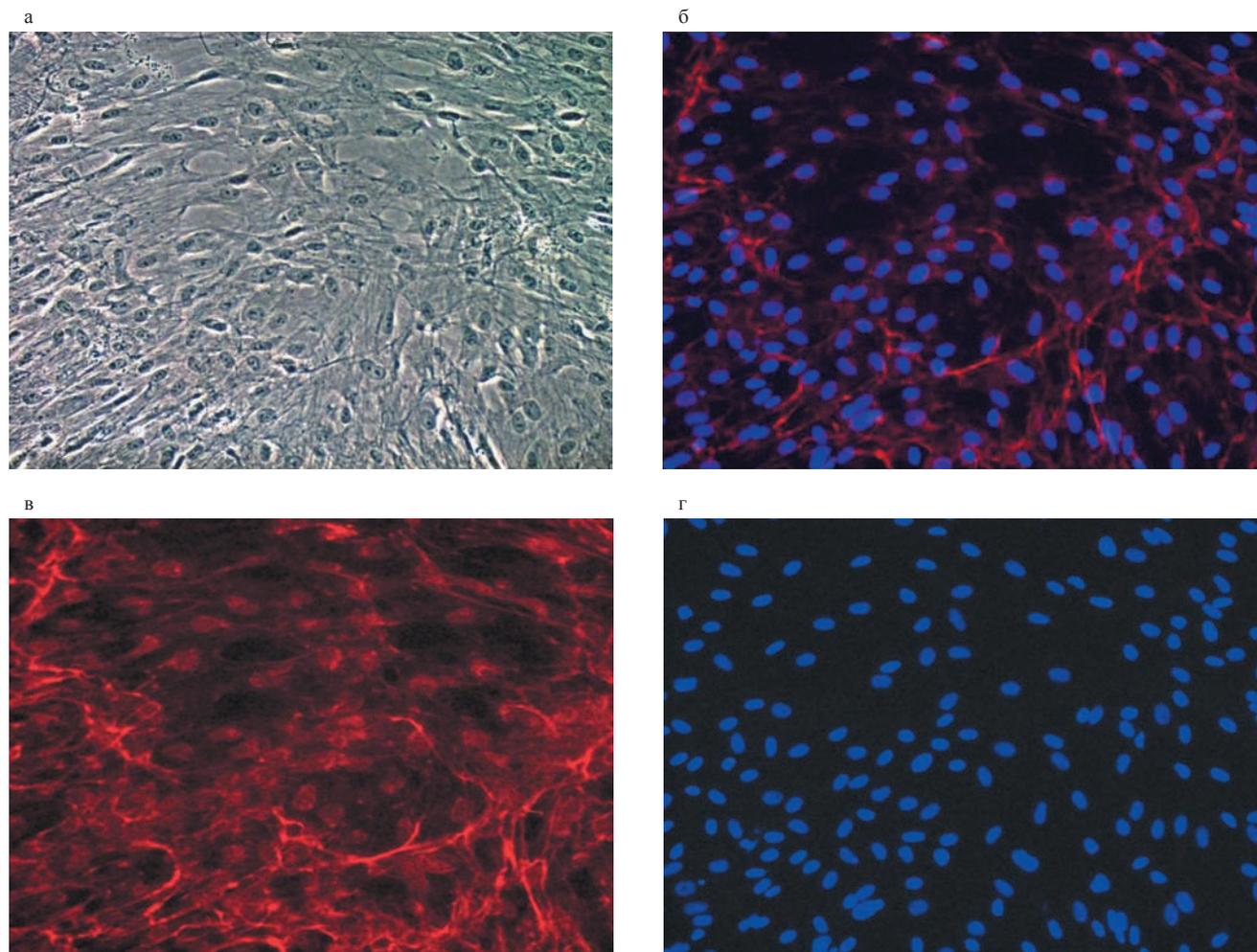


Рис. 6. Микрофотография культуры, выращенной на среде с 10% сыворотки и освещенной НИЛИ в режиме № 2 (зеленый лазер, 525 нм), в проходящем свете и окрашенной флуоресцентными красителями: а – фотография клеток в проходящем свете, увеличение $\times 10$; б – под флуоресцентным микроскопом, окрашенных DAPI и WGA-alexa; в – под флуоресцентным микроскопом, окрашенных WGA-alexa; г – под флуоресцентным микроскопом, окрашенных DAPI

В группах 1 и 2 (клетки, освещенные НИЛИ) никаких особенностей культуры не отмечено, различий между собой и контролем также не наблюдается.

Единственный отличный от нормы вариант в группе 4, которая являлась неосвещенным контролем, выращенным на низкосывороточной среде, чем можно объяснить морфологические отличия.

Полученные данные не позволяют сделать выводы в части применения НИЛИ с целью стимуляции пролиферации МСК *in vitro*, для оптимизации параметров воздействия необходима дальнейшая исследовательская работа. Однако о предельных режимах воздействия можно говорить достаточно уверенно, что дальнейшие исследования позволят ограничить диапазон варьирования параметрами освечивания и понять некоторые особенности биологического действия лазерного света именно на МСК.

Несмотря на значительный разброс энергетических параметров лазерного воздействия в исследованиях по изучению влияния НИЛИ на пролиферацию МСК, данные литературы в отношении оптимальной ЭП для непрерывного НИЛИ с длиной волны 633–635 нм находятся в достаточно узком диапазоне – 0,3–0,5 Дж/см², при

этом плотность мощности варьируется в значительно более широких пределах, от 3–6,61 мВт/см² [9, 20, 26, 43, 54, 56] до 32,6 мВт/см² [20], а экспозиция, соответственно, от 10 до 90 с (табл. 1). При этом M. Giannelli et al. [20] получили увеличение пролиферации более чем в 2 раза в первые 3 сут, что авторы связали с активацией Ca²⁺-каналов.

Необходимо заметить, что такие значения оптимальных энергетических параметров для стимулирования пролиферации МСК на порядок ниже, чем показано в исследованиях *in vitro* с другими типами клеток. Например, для различных фибробластов оптимальная ЭП НИЛИ составляет: 4,8 Дж/см² (ПМ 0,6 мВт/см²) [41], 5 Дж/см² при ПМ 2,2 мВт/см² [57] и при ПМ 3 мВт/см² [21, 22], 8 Дж/см² при плотности мощности ~ 1 мВт/см² [46].

В некоторых работах [15, 42, 44] положительные результаты воздействия НИЛИ с длиной волны 635 нм достигали при значительно большей ЭП 5 Дж/см², но касаются они стимулирования высвобождения клетками эпидермального фактора роста (EGF). Возможно, различные физиологические проявления клеточной активности имеют место при вариациях энергетических и спектральных характеристик лазерного света.

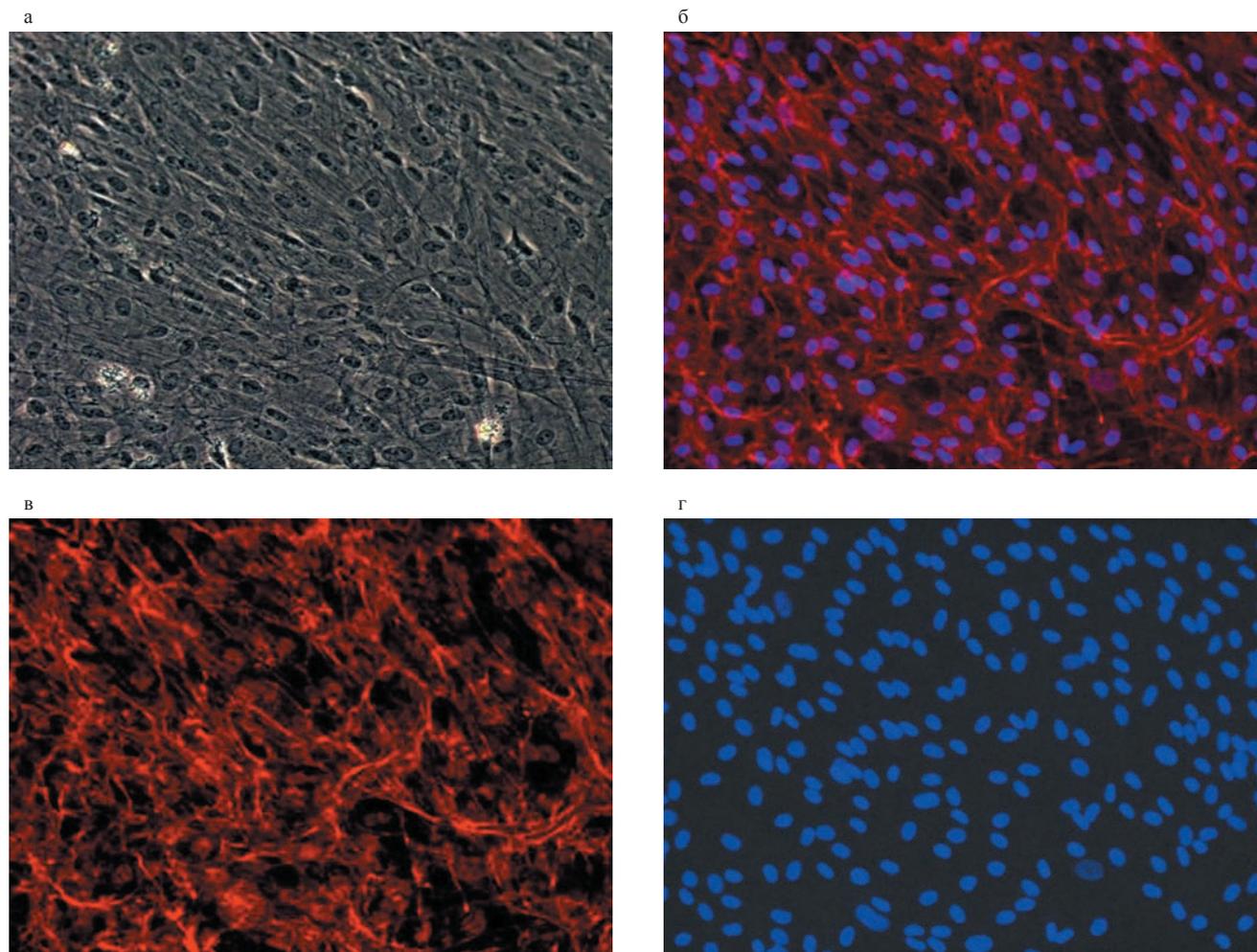


Рис. 7. Микрофотография контрольной культуры, выращенной на среде с 10% сыворотки без освещения НИЛИ в проходящем свете и окрашенной флуоресцентными красителями: а – фотография клеток в проходящем свете, увеличение $\times 10$; б – под флуоресцентным микроскопом, окрашенных DAPI и WGA-alexa; в – под флуоресцентным микроскопом, окрашенных WGA-alexa; г – под флуоресцентным микроскопом, окрашенных DAPI

Среди причин разброса энергетических параметров в зависимости от типа клеток и изучаемого параметра могут быть либо различия в спектрах поглощения клеток, соответственно, и эффективности светового воздействия, либо в механизмах и/или интенсивности регулирования разных физиологических процессов [27].

Из вышесказанного можно сделать вывод, что для длины волны 635 нм ЭП 1,3 Дж/см² при плотности мощности ~ 5 мВт/см² являются предельными, уже не вызывающими стимулирования пролиферации МСК, дальнейшее увеличение этих параметров воздействия нецелесообразно, рекомендуется ограничить экспозицию 100 с при заданной ПМ. Такой временной период определяется временем релаксации эндогенных волн Ca²⁺, регулирующих самые разнообразные внутриклеточные процессы, в том числе пролиферацию, а также участвующих во внеклеточных взаимодействиях МСК [13, 30].

К похожим выводам пришли и другие авторы, показав, что оптимальное значение ЭП составляет от 0,5 до 4,0 Дж/см² в диапазоне длин волн от 600 до 700 нм и непрерывного режима работы лазеров, превышение этого уровня может вызвать ингибирование внутриклеточных процессов [10, 37].

В спектральном диапазоне 520–525 нм исследований по изучению фотобиологического действия на культуру животных клеток пока не проводилось. Известны единичные работы, в которых использовали когерентный и некогерентный (светодиоды) свет в зеленом спектре с близкими длинами волн, но не МСК. R. Lubart et al. [40] показали, что освечивание на длине волны 544 нм (12–15 мВт/см², 300 с, 4 Дж/см²) фибробластов активизирует их пролиферацию в несколько раз. Лазерный свет на длине волны 532 нм (1 мВт, ~ 10 Дж/см²) увеличивает концентрацию Ca²⁺ в лимфоцитах и стимулирует производство ими IL-2 [47, 50]. Освечивание узким (5 мм) лучом лазера с длиной волны 532 нм, мощностью 30 мВт при ЭП 4,6–6,9 Дж/см² вызывает усиление пролиферации и рост мембранного потенциала митохондрий hADSCs, однако если светить не более 30–45 с, увеличение экспозиции приводит к ингибированию всех процессов [12].

Достаточно многочисленные работы, в которых было продемонстрировано влияние НИЛИ зеленого спектра на эритроциты и клиническое использование таких лазеров, мы не приводим, поскольку они не соответствуют теме исследования.

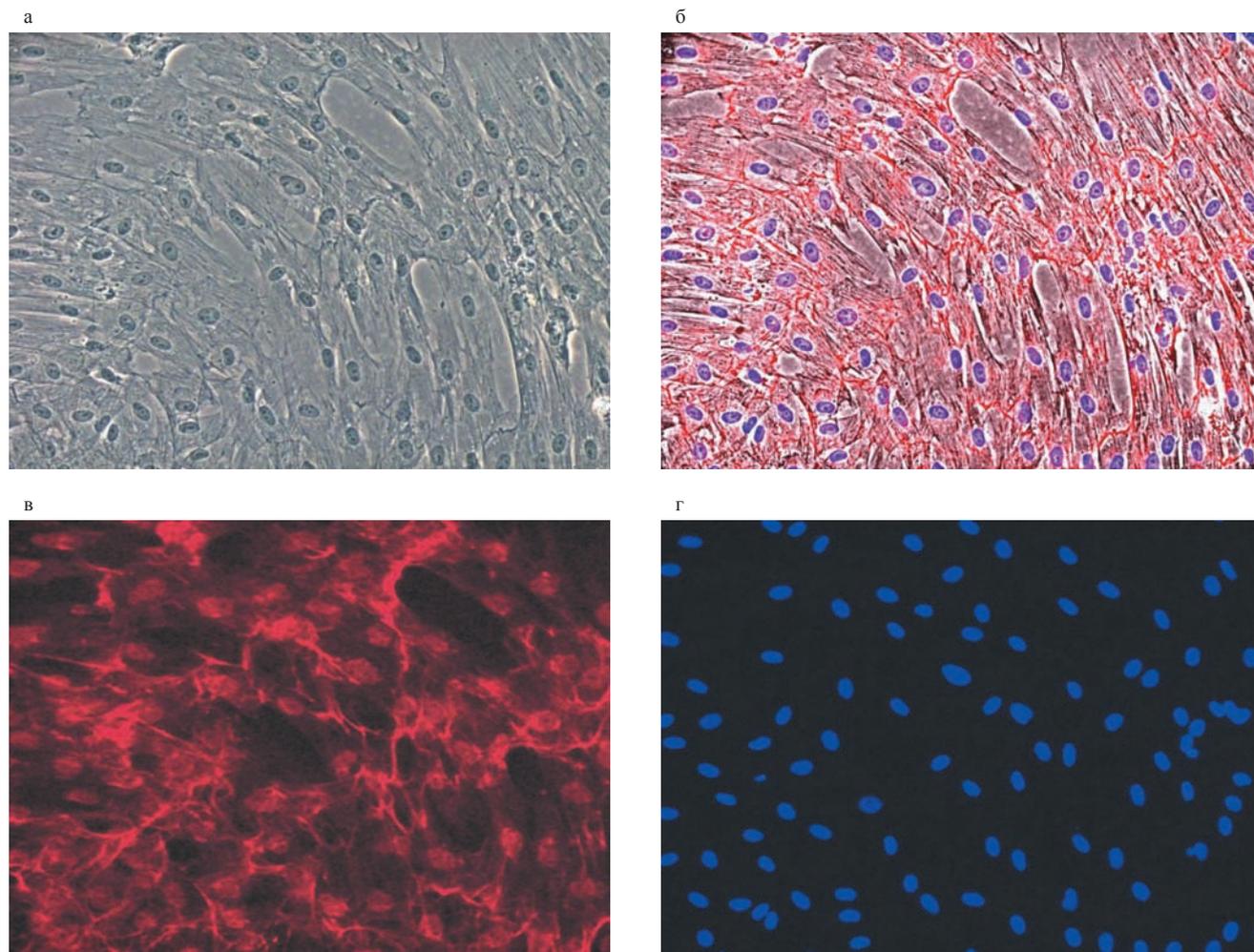


Рис. 8. Микрофотография контрольной культуры, выращенной на среде с 1% сыворотки без освечивания НИЛИ в проходящем свете и окрашенной флуоресцентными красителями: а – фотография клеток в проходящем свете, увеличение $\times 10$; б – под флуоресцентным микроскопом, окрашенных DAPI и WGA-alexa; в – под флуоресцентным микроскопом, окрашенных WGA-alexa; г – под флуоресцентным микроскопом, окрашенных DAPI

Выводы

Результаты предварительного изучения возможного влияния непрерывного НИЛИ красного (635 нм) и зеленого (525 нм) спектров на морфологию, жизнеспособность, пролиферативную активность и скорость роста мезенхимальных стволовых клеток *in vitro* показали, что при данных энергетических и временных параметрах воздействия их морфология и жизнеспособность не меняются, пролиферативная активность не стимулируется. Морфология освещенных клеток не имеет особенностей, все параметры культуры соответствуют норме.

Жизнеспособность культуры МСК, освещенных НИЛИ в режиме № 2 (зеленый спектр, 525 нм), на 15–20% ниже прочих вариантов, включая контроль. Возможно, при данном сочетании длины волны и плотности мощности может иметь место ингибирующее влияние. Однако данные статистически не достоверны, и требуется дополнительное изучение данного вопроса.

Необходимо проведение более детальных исследований для оптимизации параметров воздействия (длина волны, мощность, время и пр.) с возможным расширением методики с освечиванием МСК не только предварительно, в культуре, но также после имплантации *in vivo*.

Полученные нами данные для длины волны 525 нм, равно как и для красного лазерного света (635 нм), демонстрируют предельный уровень выбранных энергетических параметров, при которых наблюдается не просто отсутствие положительного эффекта в отношении стимулирования пролиферации, но возможно, и ингибирование. Для зеленого спектра и МСК таких данных в доступной литературе пока нет, но известно, что НИЛИ с длиной волны 410 и 420 нм значительно подавляют пролиферацию фибробластов *in vitro* при ежедневном освечивании с ЭП 5–10 Дж/см², 453 нм также обладает некоторым ингибирующим действием, но при более высоких значениях ЭП (30 Дж/см²) [45].

Сравнительная оценка оптимальных энергетических параметров возможна только после уточнения спектров поглощения культуры МСК в разных спектральных диапазонах. Предварительные выводы на основе анализа данных литературы и собственных результатов позволяют сделать прогноз в отношении оптимальных параметров НИЛИ с длиной волны 520–525 нм, при которых возможно стимулирование пролиферации МСК. Это ЭП 0,1–0,3 Дж/см² при плотности мощности ~ 1 –2 мВт/см² и экспозиции не более 100 с. При анализе литературных

данных необходимо также учитывать способ получения и другие особенности МСК.

Литература

1. Емельянов А.Н., Кирьянова В.В. Стволовые клетки и свет в регенеративной медицине (часть 1) // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. 2015. № 1. С. 51–62.
2. Климовицкий В.Г., Гринь В.К., Оксимерц В.М. и др. Механизмы влияния мезенхимальных стволовых клеток на репаративный остеогенез // Травма. 2009. Т. 10. № 2: <http://www.mif-ua.com/archive/article/20108>.
3. Москвин С.В. Системный анализ эффективности управления биологическими системами низкоэнергетическим лазерным излучением: Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. Тула, 2008. 38 с.
4. Москвин С.В. Эффективность лазерной терапии. Серия «Эффективная лазерная терапия». М.–Тверь: Триада, 2014. Т. 2. 896 с.
5. Москвин С.В., Ключников Д.Ю., Антипов Е.В. et al. Изменения в культуре мезенхимальных стволовых клеток человека под влиянием импульсного низкоинтенсивного лазерного излучения красного и инфракрасного спектров // Лазерная медицина. 2014. Т. 18. Вып. 2. С. 30–36.
6. Осипенко М.А., Жерелова О.М., Петрова П.П. и др. Влияние ионов свободного кальция на пролиферативную активность и жизнеспособность эмбриональных стволовых клеток // Доклады Академии наук. 2007. № 412 (1). Р. 123–125.
7. Соколова И.Б., Павличенко Н.Н. Механизмы воздействия экзогенных мезенхимных стволовых клеток на ишемизированную ткань при сердечно-сосудистых заболеваниях // Цитология. 2010. Т. 52. № 11. С. 911–917.
8. Шахбазов А.В., Космачева С.М., Картель Н.А., Потаннев М.П. Нейрогенная дифференцировка мезенхимных стволовых клеток: трансгенный подход // Цитология. 2010. Т. 52. № 4. С. 301–304.
9. 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). Р. 138–146.
10. AlGhamdi K.M., Kumar A., Moussa N.A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells // Lasers Med Sci. 2012. Vol. 27 (1). P. 237–249.
11. Anwer A.G., Gosnell M.E., Perincheri S.M. et al. Visible 532 nm laser irradiation of human adipose tissue-derived stem cells: effect on proliferation rates, mitochondria membrane potential and autofluorescence // Lasers Surg Med. 2012. Vol. 44 (9). P. 769–778.
12. Barboza C.A.G., Ginani F., Soares D.M. et al. Low-level laser irradiation induces *in vitro* proliferation of mesenchymal stem cells // Einstein (Sao Paulo). 2014. Vol. 12 (1). P. 75–81.
13. Chen Y., Bai B., Zhang S. et al. Effects of parathyroid hormone on calcium ions in rat bone marrow mesenchymal stem cells // BioMed Research International. 2014. Article ID 258409: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/258409>.
14. de Oliveira T.S., Serra A.J., Manchini M.T. et al. Effects of low level laser therapy on attachment, proliferation, and gene expression of VEGF and VEGF receptor 2 of adipocyte-derived mesenchymal stem cells cultivated under nutritional deficiency // Lasers Med Sci. 2015. Vol. 30 (1). P. 217–223.
15. de Villiers J.A., Houreld N.N., Abrahamse H. Influence of low intensity laser irradiation on isolated human adipose derived stem cells over 72 hours and their differentiation potential into smooth muscle cells using retinoic acid // Stem Cell Rev. 2011. Vol. 7 (4). P. 869–882.
16. Diniz I.M.A., Matos A.B., Marques M.M. Laser phototherapy enhances mesenchymal stem cells survival in response to the dental adhesives // The Scientific World Journal. 2014. Article ID 671789: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/aa/671789/>.
17. 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. Vol. 40 (6). P. 433–438.
18. Freshney R.I., Stacey G.N., Auerbach J.M. Culture of human stem cells. Hoboken, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2007. 256 p.
19. 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. Vol. 10 (1). P1-P13.
20. 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. Vol. 228 (1). P. 172–181.
21. Hawkins D., Abrahamse H. Biological effects of helium-neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts // Photomedicine and Laser Surgery. 2005. Vol. 23 (3). P. 251–259.
22. Hawkins D., Abrahamse H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts // Photomedicine and Laser Surgery. 2006. Vol. 24 (6). P. 705–714.
23. 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. Vol. 117 (19). P. 4411–4422.
24. Hode L. The DOSE: a minute to learn, a lifetime to master // World Association for Laser Therapy Conference // Gold Coast. 2012. P. 50.
25. 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. Vol. 41 (6). P. 463–469.
26. 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. Vol. 40 (10). P. 726–733.
27. Karu T. Activation of metabolism of nonphotosensitizing microorganisms with monochromatic visible (laser) light: A critical review // Lasers in the Life Sciences. 1996. Vol. 7 (1). P. 11–33.
28. 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. Vol. 24 (2). P. 214–222.
29. Kim S., Honmou O., Kato K. Neural differentiation potential of peripheral blood- and bone-marrow-derived precursor cells // Brain Res. 2006. Vol. 1123 (1). P. 27–33.
30. Kim T.J., Joo C., Seong J. et al. Distinct mechanisms regulating mechanical force-induced Ca(2+) signals at the plasma membrane and the ER in human MSCs // eLife. 2015. Vol. 4. P. 04876.
31. Kushibiki T., Awazu K. Blue laser irradiation enhances extracellular calcification of primary mesenchymal stem cells // Photomedicine and Laser Surgery. 2009. Vol. 27 (3). P. 493–498.
32. 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. Vol. 31 (3). P. 95–104.
33. 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. Vol. 28 (1). P. 125–132.
34. 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. P. 5830–5833.
35. 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. P. 4121–4124.
36. 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. Vol. 28 (S1). P. S157–S165.
37. Lin F., Josephs S.F., Alexandrescu D.T. et al. Lasers, stem cells, and COPD // Journal of Translational Medicine. 2010. Vol. 8 (16): <http://www.translational-medicine.com/content/8/1/16>.
38. Lins E.C., Oliveira C.F., Guimaraes O.C. et al. A novel 785-nm laser diode-based system for standardization of cell culture irradiation // Photomed Laser Surg. 2013. Vol. 31 (10). P. 466–473.

39. Long X., Olszewski M., Huang W. Neural cell differentiation *in vitro* from adult human bone marrow mesenchymal stem cells // *Stem Cells Develop.* 2005. Vol. 14 (1). P. 65–69.
40. Lubart R., Friedmann H., Peled I., Grossman N. Light effect on fibroblast proliferation // *Laser Therapy.* 1993. Vol. 5 (2). P. 55–57.
41. Mirzaei M., Bayat M., Mosafa N. et al. Effect of low-level laser therapy on skin fibroblasts of streptozotocin-diabetic rats // *Photomed. Laser Surg.* 2007. Vol. 25 (6). P. 519–525.
42. Mvula B., Abrahamse H. Low Intensity Laser Irradiation and Growth Factors Influence Differentiation of Adipose Derived Stem Cells into Smooth Muscle Cells in a Coculture Environment over a Period of 72 Hours // *International Journal of Photoenergy.* 2014. Article ID 598793: <http://www.hindawi.com/journals/ijp/2014/598793/>.
43. Mvula B., Mathope T., Moore T., Abrahamse H. The effect of low-level laser irradiation on adult human adipose-derived stem cells // *Lasers Med Sci.* 2008. Vol. 23 (3). P. 277–282.
44. Mvula B., Moore T.J., Abrahamse H. Effect of low-level laser irradiation and epidermal growth factor on adult human adipose-derived stem cells // *Lasers in Medical Science.* 2010. Vol. 25 (1). P. 33–39.
45. Opländer C., Hidding S., Werners F.B. et al. Effects of blue light irradiation on human dermal fibroblasts // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 2011. Vol. 103 (2). P. 118–125.
46. Pal G., Dutta A., Mitra K. et al. Effect of low intensity laser interaction with human skin fibroblast cells using fiber-optic nanoprobes // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 2007. Vol. 86 (3). P. 252–261.
47. Poon V.K.M., Huang L., Burd A. Biostimulation of dermal fibroblast by sublethal Q-switched Nd:YAG 532 nm laser: Collagen remodeling and pigmentation // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 2005. Vol. 81 (1). P. 1–8.
48. 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. Vol. 30 (3). P. 149–154.
49. 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. Vol. 27 (2). P. 423–430.
50. Tong M., Liu Y.F., Zhao X.N. et al. Effects of different wavelengths of low level laser irradiation on murine immunological activity and intracellular Ca²⁺ in human lymphocytes and cultured cortical neuroglial cells // *Lasers Med. Sci.* 2000. Vol. 15 (3). P. 201–206.
51. Tuby H., Maltz L., Oron U. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture // *Laser in Surgery and Medicine.* 2007. Vol. 39 (4). P. 373–378.
52. 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. Vol. 27 (2). P. 227–233.
53. Tuby H., Hertzberg E., Maltz L., Oron U. Long-term safety of low-level laser therapy at different power densities and single or multiple applications to the bone marrow in mice // *Photomed Laser Surg.* 2013. Vol. 31 (6). P. 269–273.
54. 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. Vol. 21 (1). P. 2508–2519.
55. Wu J.Y., Chen C.H., Wang C.Z. et al. Low-power laser irradiation suppresses inflammatory response of human adipose-derived stem cells by modulating intracellular cyclic AMP level and NF-κB activity // *PLoS One.* 2013. Vol. 8 (1). P. e54067: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3546978/>.
56. 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. Vol. 27 (2). P. 509–519.
57. Zungu I.L., Mbene A.B., Hawkins-Evans D.H. et al. Phototherapy promotes cell migration in the presence of hydroxyurea // *Lasers Med. Sci.* 2009. Vol. 24 (2). P. 144–150.

Поступила в редакцию 01.04.2015 г.

Для контактов: Москвин Сергей Владимирович
E-mail: 7652612@mail.ru

Съезды, конференции, выставки по лазерной медицине в 2015 году

| № п/п | Название мероприятия | Время проведения | Место проведения | Источник информации/ контакты |
|-------|--|------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| 1 | Научно-практическая конференция врачей России (Успенские чтения) по вопросам истории и современного состояния хирургии | 25–26 сентября 2015 г. | г. Тверь, Россия | uspenskie2015@yandex.ru |
| 2 | IV Всероссийская конференция «Актуальные вопросы фотодинамической терапии и фотодиагностики» | 25–26 сентября 2015 г. | г. Санкт-Петербург, Россия | pdt-association@mail.ru |

Материал подготовлен старшим научным сотрудником
отдела научного прогнозирования использования лазеров в медицине
ФГБУ «ГНЦ ЛМ ФМБА России»
к. т. н. Вяльцевой Н.И.