

Стволовые клетки и свет в регенеративной медицине (часть 2)

А.Н. ЕМЕЛЬЯНОВ, В.В. КИРЬЯНОВА

ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, ул. Кирочная, 41, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 191015

The application of stem together with visible and infrared light in regenerative medicine (Part 2)

A.N. EMEL'YANOV, V.V. KIR'YANOVA

State budgetary educational institution of higher professional education «I.I. Mechnikov North-Western State Medical University», Russian Ministry of Health' ul. Kirochnaya 41, Sankt-Peterburg, Russian Federation, 191015

Несмотря на длительную историю фотохромотерапии, до сих пор не существует достаточной теоретической базы для выбора таких параметров облучения, как плотность мощности, доза облучения и время экспозиции. Также не существует обобщений применения света в области регенеративной медицины. Поэтому **цель** обзора — обобщить данные экспериментальных исследований, связанных с воздействием света видимого и инфракрасного диапазонов на стволовые клетки (СК) и как следствие уточнить рекомендации по выбору параметров облучения и углубить их научное обоснование. **Результаты.** Обнаружена взаимосвязь между повышением плотности мощности облучения СК и повышением скорости их дифференцировки. Освечивание светом СК не стимулированных в дифференцировку теми или иными индукторами не приводит к дифференцировке СК, а, наоборот, усиливает признаки их недифференцированности. Параметры облучения, необходимые для получения максимумов пролиферативной активности и скорости дифференцировки одного и того же типа СК, различаются. При повышении плотности мощности повышение скорости дифференцировки СК достигали уменьшением плотности энергии их облучения. **Вывод.** Для повышения ответа (пролиферации или дифференцировки) СК на облучение необходимо повышать плотность мощности облучения и уменьшать дозу облучения и время экспозиции. Облучение эффективно на всех стадиях работы с СК и, особенно, при использовании его для стимуляции удаленных от очага поражения резервуаров костного мозга организма при одновременной обработке светом очага поражения и преобразовке самих СК перед введением. Для оценки клеточного ответа на облучение мы предложили «график зависимости клеточного ответа от обобщенного стимула» и ввели два новых термина: «фотостресс» и «фотошок».

Ключевые слова: фотохромотерапия, свет, стволовые клетки, фототерапия, регенеративная медицина.

The objective of the present study was to review the experimental studies concerned with in vitro and in vivo visible and infrared light irradiation of human and animal stem cells (SC) to assess the possibilities of using its photobiomodulatory effects for the purpose of regenerative medicine (RM). Despite the long history of photochromotherapy there is thus far no reliable theoretical basis for the choice of such irradiation parameters as power density, radiation dose and exposure time. Nor is there a generally accepted opinion on the light application for the purpose of regenerative medicine. Therefore, the clinical application of light irradiation remains a matter of controversy, in the first place due to the difficulty of the rational choice of irradiation parameters. In laboratory research, the theoretical basis for the choice of irradiation parameters remains a stumbling block too. **Results.** A relationship between the increased radiation power density and the cell differentiation rate was documented. SC exposure to light in the absence of the factors causing their differentiation failed to induce it. On the contrary, it increased the features characteristic of undifferentiated cells. The maximum differentiation rate of the same cells was achieved by using irradiation parameters different from those needed to achieve the maximum proliferation rate. The increase of SC differentiation rate upon a rise in radiation power density was induced by increasing irradiation energy density. **Conclusion.** The increase of power density and the reduction of either energy density or exposure time were needed to enhance the SC responsiveness to irradiation in the form of either proliferation or differentiation. The effectiveness of phototherapy at all stages of SC treatment was documented especially when it was applied to stimulate the reservoirs of bone marrow lying far from the site of the pathogenic process together with simultaneous light irradiation of the affected site and pre-treatment of stem cells prior to their administration. Based on the results of this analysis we have proposed "a plot showing the dependence of cell response on the generalized photostimulus" and coined two new terms «photostress» and «photoshock».

Key words: photochromotherapy, light, stem cells, phototherapy, regenerative medicine.

Данная статья является продолжением статьи «Стволовые клетки и свет в регенеративной медицине (часть 1)», напечатанной в предыдущем номере журнала. Поэтому в данной статье сохранена сквозная нумерация ссылок на публикации, таблицы и рисунки. В связи с этим в тексте данной статьи

будут встречаться ссылки на публикации, рисунки и таблицы, напечатанные в части 1. Расшифровка со-

Сведения об авторах:

Емельянов Артем Николаевич — к.б.н., с.н.с. лаб. высоких лазерных и магнитных технологий каф. физиотерапии и медицинской реабилитации СЗГМУ, e-mail: EAN-6868@mail.ru; Кирьянова Вера Васильевна — д.м.н., проф., зав. каф. физиотерапии и медицинской реабилитации СЗГМУ

кращений, принятых в работе, также сквозная в порядке встречаемости по тексту от начала части 1. Расшифровка аббревиатур различных типов стволовых клеток (СК) дана также в подписи к табл. 1 части 1.

Результаты

Дифференцировка

Данные, касающиеся исследований дифференцировки, сведены в табл. 3. Как и в случае исследо-

Таблица 3. Исследования дифференцировки

Номер статьи по списку	Тип клеток	Тип индукторов дифференцировки	Максимальное значение отличий относительно контроля, %	Длина волны, нм	Плотность мощности, мВт/см ²	Время экспозиции, мин	Плотность энергии, Дж/см ²
40	МСККМ	Ост.	+	1064	28,1	0,5	3,81
30	МСККМ	Ост.	+	632,8	0,5	10	0,3
33	МСККМ	Ост.	+14	690	26,6	1	1,6
44	МСККМ	Ост.	+21	630	15	4,26	4
47	МСККМ	Ост.	+165	810	167	0,4	4
46	МСККМ	Ост.	+166	620	6,67	10	4
37	МСККМ	Ост.	+235	647	9,29	0,5	0,279
39	МСККМ	Ост.	+700	405	200	3	36
75	СКПЗ	Ост.	+56	810	15,3	8,33	7,643
74	СКПЗ	Ост.	+60	653	3,73	0,224	1
77	СКПЗ	Ост.	+214	830	6,25	10	3,75
76	СКПЗ	Ост.	+575	810	15,3	8,33	7,643
86	ФКК	Ост.	+22	905	8,3	8,5	3,75
88	ФКК	Ост.	+32	830	6,4	10	3,82
89	ФКК	Ост.	+49	830	6,4	10	3,82
87	ФКК	Ост.	+70	830	6,4	10	3,82
90	ФКК	Ост.	+100	650	8,3	10	2,28
56	МСКЖТ	Ост.	+260	632,8	125	0,13	1
61	МСКЖТ	Нервн.	+	660	“-”	10	“-”
67	НСК	Нервн.	+	810	50	0,07	0,2
70	НСК	Нервн.	+	632,8	7,5	8	3,6
68	НСК	Нервн.	+100	808	7,5	2	0,9
72	ЭСК	Нервн.	+300	470	40	0,10	0,2
47	МСККМ	Нервн.	+3700	810	167	0,6	6
98	СатК	Мио	-80	632,8	176,9	0,05	0,53
92	СатК	Мио	-50	632,8	176,9	0,08	0,88
95	СатК	Мио	+	560	0,0022	1380	0,182
93	СатК	Мио	+	560	0,01	1440	0,864
107	СатК	Мио	+26	808, 905	641,2	0,042	1,6
94	СатК	Мио	+100	560	0,01	720	0,432
36	МСККМ	Мио	+40	635	6,61	12,5	5
62	ГСК	Дендр.	-	810	10	5	3
16	МФ	Миоф.	+	820	0,86	19	1
104	МФ	Миоф.	+70	632,8	2	10	1,2
60	МСКЖТ	Нет	0	636	12,1	6,53	5
57	МСКЖТ	Нет	0	636	8,59	9,46	5
59	МСКЖТ	Нет	0	635	5,5	15	5
58	МСКЖТ	Нет	0	632,8	60	0,33	1,2
81	МСК	Нет	-	940	8	10	4
12	МСККМ	Нет	0	635	6,37	2,5	0,96
52	МСККМ	Нет	0	635	6,61	1,15	0,5
80	ЭпСК	Нет	0	632,8	25	1,33	2

Примечание. Буквенные обозначения типов клеток такие же, как в табл. 1; «-» — нет численных значений; — — отрицательное значение, вычисленное по маркерам недифференцированных клеток; + — нет численных значений, только качественная положительная оценка; Ост. — индукторы остеогенной дифференцировки; Нервн. — индукторы неврогенной дифференцировки; Мио — индукторы миогенной дифференцировки; Дендр. — индукторы взросления дендритных клеток; Миоф. — исследования дифференцировки фибробластов в миофибробласты; Нет — нет индукторов. Прибавка пролиферации выражена в процентах, что позволяет сравнивать данные, полученные разными методами.

ваний пролиферации, значения параметров облучения даны для максимального оценочного числа скорости дифференцировки, выраженного в процентах прибавки относительно контроля. Что позволяет сравнивать между собой результаты, полученные различными методами. Для оценки дифференцировки большинством авторов использовали окраску клеток на те или иные маркеры дифференцировки, сравнивая интенсивность этой окраски с контролем.

Анализ зависимостей увеличения скорости дифференцировки от значений плотности мощности, времени экспозиции и плотности энергии без учета типа использованных клеток каких-либо закономерностей не выявил. Это говорит о значимости исходного типа клеток. Аналогичный анализ по группам типов клеток выявил зависимость увеличения скорости дифференцировки клеток от увеличения плотности мощности использованного облучения. Анализ показал также, что облучение светом без индукторов не приводит к дифференцировке, но, наоборот, увеличивает признаки недифференцированности клеток [52, 57—60, 74]. В этой связи показательна работа А. Строка и соавт. [72], в которой использовали ЭСК мыши, трансфицированные геном белка ChR2, вызывающим при облучении синим светом потенциал действия на клеточной мембране благодаря выходу кальция из клеточных депо. Данные клетки давали увеличение скорости нейрогенной дифференцировки только в нейродифференцировочной среде. В работе С. Шена и соавт. [61] показано, что облучение направленных в течение суток в нейрогенную дифференцировку МСКЖТ не приводит к увеличению пролиферации, но только к ускорению дифференцировки. Также анализ исследований показал, что максимум дифференцировки достигается с помощью параметров облучения, отличных от параметров облучения, необходимых для достижения максимума пролиферации тех же самых клеток [40, 46, 47].

Больше всего работ ($n=19$) посвящено исследованию остеогенной дифференцировки, однако они очень разнородны. Авторы использовали различные дифференцировочные маркеры, оценивали дифференцировку на различных сроках, использовали различные длины волн. От всех этих условий зависел результат. Так, например, оценка активности дифференцировки по доле прибавки внеклеточной минерализации могла отличаться от аналогичной оценки по доле прибавки внутриклеточной дифференцировочной активности в 2 раза и более [37, 46, 77]. Большое влияние на результат имели сроки оценки дифференцировки. Одни авторы определили максимум дифференцировочной активности на 7-й день после начала дифференцировки, другие — на 15-й, а третьи пришли к выводу, что лучше всего оценивать остеогенную дифференцировку на 28-й день.

Обращают на себя внимание исследования [87—89]. Эти исследования выполнены одной и той же исследовательской группой, на одних и тех же клетках, с абсолютно идентичными условиями облучения и оценки дифференцировки. В исследовании [87] облучение начинали сразу после посева клеток в дифференцировочную среду и далее — 1 раз в день несколько раз. В исследовании [89] облучение проводили 1 раз в первые сутки после посева клеток, и в исследовании [88] — однократно на третьи сутки. Как видно из **табл. 3**, наибольшего результата исследователи достигли при освещении клеток несколько раз, начиная с первого дня дифференцировки. В работах [75] и [76] авторы при абсолютно одинаковых условиях облучения и анализа получили результат, различающийся в 10 раз. Однако они никак не попытались объяснить его и в более поздней работе [75] просто не ссылаются на свою же более раннюю работу.

Все подобные моменты не позволили сделать определенных выводов при анализе, казалось бы, достаточного количества работ на остеогенную дифференцировку. Можно говорить только об общем создавшемся впечатлении. Так, в конечном счете, при повышении плотности мощности для увеличения скорости дифференцировки необходимо уменьшать время воздействия и плотность энергии. При использовании различных длин волн закономерности изменения параметров для повышения эффективности облучения схожи, но различаются по конкретным численным значениям для каждой волны. При уменьшении длины волны тот же эффект достигается при использовании меньшей плотности мощности. Данные исследований неостеогенных дифференцировок не доказывают, но и не противоречат перечисленным выводам.

М. Мониси и соавт. [112] проводили исследование на миобластах C2C12. Авторы использовали модулированный высокой частотой совмещенный свет от двух источников 808 и 905 нм. Плотность мощности объединенного светового потока составила 1,6 Дж/см², плотность мощности — 621,2 мВт/см². Индукторы миогенной дифференцировки не менялись. В этих условиях обнаружили ингибирование пролиферации и стимуляцию дифференцировки. В свою очередь, Н. Бен-Дов и соавт. [92], освещая миобласты рпi23 светом длиной волны 632,8 нм, плотностью мощности 0,88 Дж/см² и плотностью энергии 176,9 мВт/см², получили прибавку пролиферации и снижение дифференцировки. В то же время при плотности энергии 1,768 Дж/см² наблюдалось снижение пролиферативной активности клеток. Активность дифференцировки авторы в последнем случае не проверяли. Таким образом, вполне вероятно, что эти два исследования указывают на возможность управления дифференцировочным процессом либо в сторону пролиферации клеток,

Таблица 4. Исследования миграции

Номер статьи по списку	Тип клеток	Максимальное значение отличий относительно контроля, %	Длина волны, нм	Плотность мощности, мВт/см ²	Время экспозиции, мин	Плотность энергии, Дж/см ²
84	НП	+	880	0,00012	1440	0,01
67	НСК	+	810	50	0,04	0,2
68	НСК	+75	808	7,5	2	0,9
99	СатК	+100	632,8	176,9	0,03	0,53
80	ЭпСК	+100	632,8	25	1,33	2
64	ГСК	+110	958	120	15	32,5
102	ЭКВП	+115	632,8	9	0,5	0,26
70	НСК	+142	632,8	7,5	8	3,6
42	МСККМ	+164	850	10	6,4	4
42	МСККМ	+193	630	15	4,27	4
17	МСКЖТ	+307	530	0,0664	2880	5,7
50	МСККМ	+450	804	50	0,33	1
51	МСККМ	+2000	804	10	1,67	1

Примечание. Буквенные обозначения типов клеток такие же, как в табл. 1; + — нет численных значений, только качественная положительная оценка.

либо в сторону дифференцировки с помощью изменения плотности энергии.

Л. Перейра [78] брала СКПЗ и при одних и тех же условиях облучения получала ответ клеток от одних пациентов и не получала от других. В исследовании [62] авторы выделили из МСККМ крыс дендритные клетки. Далее их стимулировали медиаторами воспаления, которые приводят к взрослению этих иммунных клеток. Определили, что облучение нивелирует действие стимуляции. В работах [88] и [90] авторы определили уменьшение количества остеокластов после облучения. В работе [54] — уменьшение количества тучных клеток в костном мозге. В работе [113] — уменьшение уровня вызванной стимуляцией пептидогликаном золотистого стафилококка экспрессии интерлейкина-6.

Исходя также из общеизвестного опыта применения в клинике в основном ультрафиолетового облучения, вполне вероятно, что для иммунных клеток после облучения характерно снижение способности к дифференцировке.

Миграция

В табл. 4 отражены данные, касающихся исследований миграции клеток. Таких работ мы нашли 10. Эти работы очень разнородны, выполнены на разных типах клеток. Анализируя данные работы, можно сказать только, что достаточно хороших результатов исследователи достигали, используя и различные типы клеток, и различные параметры облучения.

Обращают на себя внимание работы [84] и [17], в которых использованная плотность мощности на несколько порядков меньше, чем обычно, однако конечная плотность энергии сопоставима с соответствующими значениями в других работах. Это может говорить о значимости данного параметра.

В работах [50] и [51] авторы исследовали воздействие света на течение искусственно вызванного у крыс инфаркта миокарда. Из этих работ нельзя сделать определенных выводов, поскольку авторы во второй работе [51] изменили одновременно два параметра: изменили плотность мощности и прибавили к облучению сердца еще облучение голени крыс. Таким образом, стало непонятно, за счет чего происходила прибавка миграции: за счет изменения плотности мощности или за счет добавочного облучения голени крыс. По косвенным признакам (и благодаря уже проведенному нами анализу пролиферации и дифференцировки) мы предполагаем, что прибавка миграционной способности клеток в случае дополнительного облучения голени слишком велика, чтобы проистекать только из-за изменения плотности мощности. Я. Ли и соавт. [42] использовали две длины волны, одинаковую плотность энергии и различную плотность мощности. Получили незначительное различие (20%) миграции клеток. Авторы проделали два эксперимента: опыт с нарушением монослоя и опыт по трансмембранной миграции. В первом случае было получено увеличение миграции до 83%. Во втором случае в нижнюю камеру добавляли 10% сыворотки коров, а в верхнюю — только 2%. При таких условиях прибавка скорости миграции увеличилась до 193%. Следовательно, можно сделать предположительный вывод, что воздействие светом на уже организованную направленную миграцию более эффективно.

Анализ использования частотной модуляции

Частотную модуляцию излучения использовали в работах [40, 43, 54, 61, 68, 72, 85, 89, 90, 94, 101, 112]. Из этих работ две [101, 85], в которых вообще не добились никакого положительного эффекта облучения. Одна работа [68] показала неэффектив-

ность частотной модуляции 70 Гц при воздействии светом на область искусственного инсульта у крыс. В работах О. Халеви и соавт. [93, 94] показана большая эффективность постоянного облучения цыплят, чем прерывистого (15/15 мин). В работе [61] показан положительный эффект частотной модуляции 50 Гц на нервную дифференцировку МСКЖТ. В работе [67] авторы добились прироста скорости пролиферации на 24%. В работе [89] авторы обнаружили, что облучение с модуляцией 1–2 Гц дает больший прирост скоростей пролиферации и дифференцировки МСККМ человека, чем постоянное или с модуляцией 8 Гц, но цифры этого прироста (для пролиферации +45, а для дифференцировки +49) невелики. В работах [40] и [90] авторы добились большего успеха: прибавка скорости пролиферации и дифференцировки до +70 и +100 соответственно. И только в работе [72] авторы добились значительного прироста скорости дифференцировки (+300). Однако в этой работе, как уже упоминалось, они использовали трансфицированные клетки геном *chr2*. Таким образом, на данном этапе нет никаких оснований говорить об эффективности облучения с частотной модуляцией. Более того, на наш взгляд, нет оснований прибавлять еще один неизученный фактор к и так уже многофакторной и слабоизученной системе.

Обсуждение

Выбор плотности мощности, времени экспозиции и дозы (плотности энергии) облучения

На основании нашего анализа, а также анализа, проведенного в обзоре П. Пеплоу [27], стало возможным построить график зависимости клеточного ответа (пролиферации или дифференцировки) от изменений плотности мощности, дозы и времени экспозиции. П. Пеплоу, говоря только о пролиферативном эффекте и дозе облучения, выделяет 4 фазы клеточного ответа: подпороговую, фазу линейного клеточного ответа, фазу плато и фазу ингибирования пролиферации. Но при такой интерпретации сразу возникает вопрос. Как это сочетается с закономерностью, продемонстрированной на графиках **рис. 1**, в правой части которых доза облучения уменьшается, а эффект при этом растет?

Здесь приходится уточнить. График зависимости пролиферации от дозы облучения будет верным только в случае, когда плотность мощности — фиксированная величина, не ниже пороговой. В этом случае для всех фиксированных величин плотности мощности мы получим аналогичные графики ответа клетки на изменение дозы облучения, различающиеся кривизной фаз, но сохраняющие форму. Поэтому, видимо, П. Пеплоу и не представил в своей работе график, а только перечислил фазы клеточного ответа. Если мы, наоборот, зафикси-

руем дозу и будем изменять плотность мощности, получится аналогичный график. Следовательно, если мы объединим действие дозы и плотности мощности в общий стимул, как это и есть в реальных условиях, то получится график зависимости ответа клетки от этого стимула, показанный на **рис. 2**. Анализируя этот график, можно заключить, что в фазе I, когда доза или плотность мощности находится в подпороговой области, мы получим небольшой и непродолжительный ответ. Следует учитывать, что поскольку ответы клетки на изменения одного из факторов (дозы или плотности мощности), вероятно, обратно пропорционально зависят друг от друга (это видно на **рис. 1**), при увеличении одного фактора порог ответа на другой снижается, и наоборот. На **рис. 1** также видно, что, по-видимому, большинство работ, в которых прибавка пролиферации меньше 50–70% относятся к фазе I. Исследования, попавшие в правую часть графиков (см. **рис. 1**), относятся к фазе II — быстрого более-менее линейного возрастания клеточного ответа. Фазы III и IV на графиках **рис. 1** не отражены, поскольку мы анализировали только максимально положительные результаты. Однако большинство авторов в обобщенных нами работах исследовали зависимость клеточного ответа либо от дозы, либо от плотности мощности и обнаружили с определенных величин либо отсутствие увеличения клеточного ответа, либо его уменьшение.

За реакцией СК на воздействие светом мы можем следить по различным показателям (скорости пролиферации, дифференцировки или величине миграции), поскольку, как мы выяснили, СК отвечают на воздействие светом неспецифично. Исследования относительно дифференцировки и миграции недостаточны, поэтому график на **рис. 2** построен только относительно увеличения скорости пролиферации. Форма этого графика напоминает график стрессорной реакции организма по Г. Селье. Действительно, вначале в фазе I мы повышаем стимул, но ничего практически не происходит: буферная емкость клетки поглощает воздействие. С некоторого значения стимула возникает бурный ответ (фаза II). Буферная емкость заполнена, и механизмы клеточного ответа начинают работать свободно. Зависимость клеточного ответа от стимула более-менее линейна. Эту фазу по аналогии со стрессорной реакцией всего организма можно назвать фазой адаптации. При дальнейшем повышении стимула все механизмы клеточного ответа постепенно включаются на полную мощность и в определенный момент перестают реагировать на прибавку стимула. Наступает фаза насыщения III (фотостресса). При дальнейшем повышении стимула возникает истощение и поломка механизмов ответа клетки на облучение (фаза IV). Эту фазу можно назвать фазой фотошока.

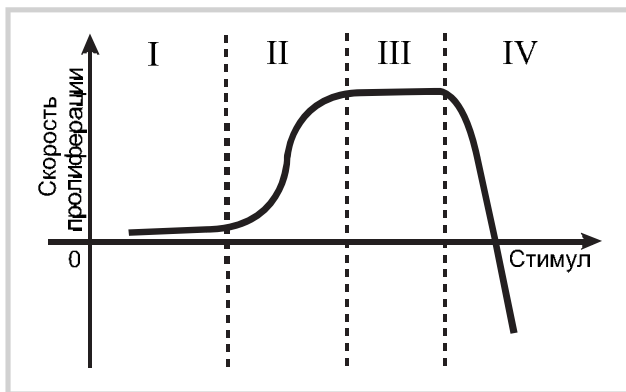


Рис. 2. График зависимости скорости пролиферации от объединенного стимула (плотность мощности (в Вт/см²) + дозы облучения (в Дж/см²)).

Римскими цифрами обозначены этапы изменения клеточного ответа: I — область подпороговых стимулов; II — логарифмическая фаза (адаптации); III — фаза насыщения (фотостресс); IV — область депривации клеточного ответа (фотошок). Объяснение в тексте.

Известно понятие теплового шока. Обнаружены белки теплового шока и соответствующие стрессорные сигнальные каскады. В отличие от процессов теплового шока свет в физиологической дозе активирует MAPK/ERK-сигнальный каскад при одновременной депрессии стрессорных p38/MAPK и SAPK/JNKs-каскадов [43, 92, 96, 98, 99]. Вполне вероятно, что в фазе насыщения (фотостресса) и особенно в фазе фотошока начинают работать уже стрессорные сигнальные каскады. С этой точки зрения понятия фото- и теплового шока окажутся весьма близкими. Это еще предстоит исследовать. В регуляции светом процессов остеогенной дифференцировки обнаружено участие стрессорных механизмов [75, 76].

Существуют несколько работ, в которых использованные параметры облучения на порядок или на несколько порядков ниже обсуждавшихся выше [17, 84, 93—95]. В этих работах получены положительные эффекты, хотя из наших рассуждений вытекает, что никаких положительных эффектов при этих условиях быть не должно. Данное положение, по-видимому, можно объяснить эффектом сверхмалых доз облучения. Показано, что в области очень малых количеств стимула вновь появляется биологический эффект, зависимость которого от стимула нелинейна [114].

Плотность мощности в исследованиях варьирует от 0,0012 до 1000 Вт/см². Плотности энергии — от 0,05 до 42 Дж/см². К. Альгамди [26] на основе резюмированных им работ рекомендует для получения максимального пролиферативного эффекта применять плотность энергии от 0,05 до 10 Дж/см² (0,5—4 Дж/см²), не говоря ничего о плотности мощности. Но на наш взгляд, этот параметр является не менее важным, чем доза облучения. Именно при значи-

тельном увеличении плотности мощности были получены максимальные прибавки как пролиферации, так и дифференцировки [39, 47, 49, 56, 69, 72, 73, 98, 99]. Большинство работ, исследующих механизмы воздействия света на клетку, тоже выполнены при высоких значениях плотности мощности [39, 43, 45, 62, 67, 92, 96, 98, 99]. Поэтому, на наш взгляд, рационально при выборе параметров облучения ориентироваться на увеличение плотности мощности и в зависимости от нее подбирать время облучения. Теоретически время облучения можно уменьшать до времени, сопоставимого с временем протекания фотореакций (10⁻⁹—10⁻⁶—10⁻³—10 с).

Таким образом:

1) для получения максимального клеточного ответа (пролиферации или дифференцировки) нужно повышать плотность мощности и уменьшать время воздействия и плотность энергии;

2) параметры для получения максимальной прибавки пролиферации и дифференцировки различны (см. раздел «Дифференцировка») и, вероятно, могут быть взаимосвязаны с помощью изменения плотности энергии [92, 112].

Условия культивирования и облучения клеток

Рекомендации для условий культивирования и проведения облучения относительно получения максимальной пролиферации клеток, перечисленные во введении, остаются в основном прежними. Все они подтвердились на проанализированном нами экспериментальном материале. Добавим, что не только волны от 600 до 700 нм можно использовать и что облучение каждый день или через день в несколько раз более эффективно, чем однократное облучение. Н. Бен-Дов [92] обнаружил, что CatK от 2-недельных мышей можно с успехом размножать под действием света без особых стимуляторов, в то время как клетки от 6-недельных мышей только при помощи света прибавки пролиферации не дают.

Рекомендации для получения максимума дифференцировки такие же. Еще раз отметим, что для успешной дифференцировки необходимы соответствующие индукторы [52, 57—60, 74]. По-видимому, облучение в течение первых трех суток от начала дифференцировки более эффективно [86, 87]. Облучение клеток до помещения в дифференцировочную среду влияния не оказывает [32]. Дифференцировка иммунных клеток светом подавляется [43, 54, 88, 90].

На организменном уровне из анализа доклинических работ [12, 58, 81, 95] видно, что действие света, в общем и целом повторяет его действие на уровне клетки. Однако при одних и тех же условиях облучения может преобладать либо дифференцировка, либо пролиферация. Изучение сочетанного влияния света и механизмов общей регуляции деятельности организма на регенерацию в очаге поражения, по-видимому, позволит объяснить выбор програм-

мы регенерации: пролиферативной или дифференцировочной.

Предобработка СК и пред- и послеобработка целого организма

Когда мы переходим от облучения клеток в лабораторных условиях к облучению на уровне организма, ситуация в корне меняется. На уровне организма становится необходимым учитывать реакции дифференцированных клеток и рефлекторные реакции нервной системы на облучение, и, следовательно, становятся существенными такие параметры, как длина волны и время воздействия. Кроме того, становится важна стадия того процесса, на который мы хотим воздействовать.

Фазу предобработки целого организма можно разделить на две:

1) общая и местная отставленная подготовка организма к трансплантации СК;

2) общая и местная подготовка организма непосредственно перед введением СК.

К общей подготовке можно отнести различного рода процедуры, и в частности световые. Из них выделяются специфические процедуры стимуляции светом резервуаров красного костного мозга в грудине, гребнях подвздошных костей и эпифизах больших трубчатых костей. Однако никто не оценивал влияние общей предобработки организма светом на течение основного процесса при трансплантации СК. Единственное исключение составляет работа Е. Туби и соавт. [51], в которой они сравнивали результаты воздействия светом на большеберцовую кость и непосредственное воздействие на сердце у крыс с инфарктом миокарда. Оказалось, что облучение большеберцовой кости в 1,6 раза эффективнее уменьшает дилатацию инфарктного (левого) желудочка и приблизительно в 10 раз увеличивает концентрацию МСК в очаге поражения. При этом концентрация МСК в других органах остается прежней. М. Пичек и соавт. [54] обнаружили повышение митотической активности гемопоэтической системы крыс после облучения их задних конечностей.

Положительное влияние местной предобработки светом на больных с повреждениями спинного мозга обнаружили С. Клеймблосем и Л. Лонго [38]. Х. Занг и соавт. [12] обнаружили значительное увеличение скорости восстановления инфарктного миокарда у крыс при его облучении непосредственно перед введением МСКМ. А. Орон и соавт. исследовали местное влияние световых процедур на течение основного процесса и поведение СК при окклюзии средней мозговой артерии [68] и резекции 70% печени у крыс [81]. В исследовании 68 облучение проводили контралатерально через 4 и 24 ч после окклюзии. Четко определили положительное влияние облучения через 24 ч после окклюзии на пролиферацию, дифференцировку и миграцию в

сторону очага поражения нейробластов субвентрикулярной зоны. Это говорит о значимости для выбора светотерапии стадий протекания основного процесса. В исследовании [81] также обнаружено положительное влияние освечения. Н. Поуреау-Шнейдер и соавт. [104] наблюдали у пациентов повышение образования миофибробластов в облученной ранке, оставшейся после экстракции зуба. Интересно исследование [16]. В этом исследовании авторы воздействовали на кожную рану у крыс. Облучение проводили различными длинами волн, различными плотностями энергии и не на рану, а рядом с ней. Обнаружили повышение в ране дифференцировки в миофибробласты фибробластов и МСК. При этом влияние имело только облучение светом длиной волны 820 нм и дозой 2 Дж/см² (плотности мощности авторы, по-видимому, значения не придавали).

Показано, что значительное влияние может иметь обработка светом СК непосредственно перед их введением в организм. Так, Е. Туби и соавт. [50] облучали МСКМ за 24 ч до введения их в зону инфаркта у крыс, что приводило к значительным положительным результатам по сравнению с необлученными МСК. А. Васек и соавт. [65] облучали СКМ крыс перед их введением облученным γ -лучами крысам. Эти авторы обнаружили увеличение количества колоний белой крови в селезенке крыс, получивших облученные СК, по сравнению с крысами, получившими необлученные СК. Кроме того, авторы обнаружили, что данный эффект сохраняется только при введении МСК в течение 1 ч после их облучения (СКМ выделяли, но не культивировали).

Послеобработка организма может быть местная, общая и специфическая на резервуары костного мозга. По-видимому, большинство выводов относительно обработки светом резервуаров костного мозга во время подготовки организма к трансплантации СК можно применить и к послетрансплантационному периоду ведения, хотя специальные исследования по этому поводу не проводились. Существуют несколько исследований местной обработки светом очага поражения до и после введения СК. Так, в исследовании [95] обнаружили положительный эффект местного облучения после введения СК в область перелома голени у кроликов. М. Нагата и соавт. [53] исследовали эффект облучения красным светом раны свода черепа крыс непосредственно перед введением туда аспириата КМ. Обнаружили значительный положительный эффект света на пролиферацию, миграцию и дифференцировку СК в ране. В исследовании [97] сателлитные клетки облучали и сажали на желатиновый матрикс. Через 3 дня матрикс с клетками вводили в мышечную рану крыс и сразу проводили облучение концов поврежденной мышцы рядом с повреждением. Обнаружили сохра-

нение и включение в миотубулы донорских МСК, что не наблюдалось без облучения. В исследованиях [58] и [56] изучали заживление кожной раны у крыс. МСКЖТ вводили в рану самостоятельно или на соединительнотканном скаффолде. Свет направляли прямо на рану. При такой обработке свет оказывался эффективным только при сочетанном освещении и введении МСК. С. Янг и соавт. [115] обнаружили значительное повышение эффекта при использовании света и МСККМ при лечении крыс со сдавлением седалищного нерва. Эти авторы вводили МСК в рану, предварительно помещая их в коллагеновый гель. Рану зашивали и через 12 ч воздействовали на нее светом. Н. Танкович и соавт. [105] обнаружили положительный эффект облучения при лечении пациентов с кожными ранами. Из биоптатов кожи пациентов получали прогениторные клетки фибробластов, которые размножались и направлялись для продукции коллагеназы и коллагена. После введения в рану СК, рану освещивали. Результаты оценивали по скорости заживления раны, секреции сигнальных белков, ростовых факторов и стимуляции собственных СК пациентов. Е. Туби и соавт. [48] исследовали возможные отставленные отрицательные реакции у крыс в результате длительного воздействия светом в физиологических и повышенных дозах на резервуары КМ. Через 8 мес эти авторы не обнаружили в почках, печени, головном и костном мозге облученных крыс каких-либо гистологических различий относительно контроля. Также не было обнаружено никаких неопластических образований. С. Барбоза и соавт. [31] также обнаружили, что облучение МСККМ и МСКЖТ светом с длиной волны 660 нм, плотностью мощности 30 мВт/см² и плотностью энергии 1 Дж/см² не вызывает пикнотических изменений и фрагментации ядер облученных клеток.

Таким образом, показана эффективность применения фототерапии на всех этапах лечения целого организма СК:

- 1) стимуляция резервуаров костного мозга целого организма до применения СК;
- 2) местная фототерапия до применения СК;
- 3) обработка СК светом непосредственно перед введением в организм;
- 4) местная обработка светом очага поражения перед введением СК;
- 5) стимуляция светом резервуаров костного мозга организма непосредственно перед трансплантацией СК;
- 6) обработка светом очага поражения после трансплантации СК;
- 7) обработка светом соседних участков тканей рядом с очагом поражения после трансплантации СК;
- 8) стимуляция светом резервуаров костного мозга организма после трансплантацией СК.

Однако нет исследований по сочетанию применения света на разных этапах лечения (не говоря уже о конкретных методиках). Вполне вероятно, что применение фототерапии на одном этапе будет ингибировать эффект от ее применения на другом этапе. Кроме того, вполне вероятно, на том или ином этапе можно применить другие физиотерапевтические методы либо самостоятельно, либо сочетанно с фототерапией.

Заключение

Обзор экспериментальных работ в области использования света видимого и инфракрасного диапазонов в РМ показал, что данная область находится еще только на начальном этапе своего развития. Однако уже можно сделать определенные обобщения. Мы выяснили два основных параметра облучения (плотность мощности и дозу облучения с преувеличением плотности мощности), особенно важных для подбора условий облучения СК *in vitro*. Оказалось, что для увеличения ответа СК на стимул необходимо повышать плотность мощности и уменьшать дозу облучения. В отличие от других исследователей, мы дополнительно применили оценку только максимальных значений пролиферации и дифференцировки СК. Это позволило из разнородных количественных оценок вывести общую количественную зависимость клеточного ответа (скорости пролиферации) от изменений фотостимула, что в свою очередь позволило выделить качественно различные состояния клетки (фазы) в процессе увеличения фотостимула. Таким образом, мы представили график зависимости (функцию) клеточного ответа (скорости пролиферации) от фотостимула и ввели понятия «фотостресс» и «фотошок» для обозначения стадий этого ответа. По-видимому, данную закономерность можно использовать и для оценки зависимости дифференцировки и миграции СК от фотостимула.

Следует отметить, что во многих случаях нам было трудно оценить результаты исследований не только давних работ, но и совсем свежих. Такой параметр, как плотность мощности невозможно точно вычислить, если указана только мощность излучения источника. Например, Ч. Шен и соавт. [61] исследовали воздействие света на МСКЖТ, направленных в нейрогенную дифференцировку, и влияние облученных МСКЖТ на течение инсульта у крыс. Однако эти авторы привели только значение выходной мощности источника. Поэтому сравнить их данные с данными других работ не представилось возможным. В части работ были представлены графики эффектов без их численного выражения, в результате чего нам пришлось вручную линейкой измерять значения показателей.

При обобщенном анализе совершенно бесполезным оказался такой показатель, как «оценка жизнеспособности». Исследователи понимают его значение по-разному. Одни исследователи, например, определяют жизнеспособность по количеству синтезированной клетками АТФ, другие — по активности митохондриальных дегидрогеназ по МТТ-тесту (многие исследователи используют этот тест просто для оценки количества клеток). Часть исследователей для оценки жизнеспособности определяют количество апоптозов и т.д. и т.п. Самым продуктивным для оценки пролиферации оказался простой подсчет живых клеток. Если авторы хотят оценить пролиферацию, например, по включению BrdU или другим способом, то желательно вычислить и указать коэффициент пересчета этого метода оценки по отношению к методу подсчета клеток. Относительно оценки дифференцировки что-либо сказать трудно. Типов клеток много, и они по-разному дифференцируются. Но если говорить применительно к оценке дифференцировки *in vitro* для РМ, то в этом случае, по-видимому, имеет больший смысл говорить о маркерах ранней дифференцировки, поскольку полностью дифференцированные клетки в организм вводить не имеет смысла. В то же время оценка поздней дифференцировки *in vivo* — это фактически оценка репарации ткани или органа.

На основании проведенного анализа авторских работ мы уточнили рекомендации по стимуляции светом пролиферации СК и впервые представили рекомендации по стимуляции светом дифференцировки СК (см. в разделе «Обсуждение»). Мы систематизировали данные доклинических и клинических исследований сочетанного использования СК и фототерапии при лечении. Клинических исследований в данной области практически не существует. Однако на основании исследований с животными можно заключить, что использование света эффективно на всех стадиях использования СК для лечения.

Мы надеемся, что наша работа позволит приблизиться к решению проблемы осмысленного под-

бора параметров облучения. Некоторые исследователи, судя по последним работам, считают, что в этой области сделано уже достаточно и нужно сконцентрироваться на механизмах действия света. Мы склоняемся к мнению, что такой подход малопродуктивен, поскольку нет реальной модели исследования света, в которой можно было бы следить за изменением одного параметра, в то время как остальные оставались бы учтенными и постоянными. Используя предложенную нами зависимость реакции клетки от обобщенного светового стимула (см. рис. 2), базирующуюся на отношениях между плотностью мощности и временем экспозиции (см. рис. 1), можно, по-видимому, найти оптимальные значения этих параметров. Для этого нужно найти максимальное значение плотности мощности для максимального клеточного ответа при минимальном значении дозы облучения. Таким образом, можно выяснить состояние клеток при переходе от фазы адаптации к фазе фотостресса. Исследования клеток в этом состоянии позволят окончательно оценить значение длины волны, а также продуктивно исследовать механизмы воздействия света на клетки.

Благодарности

Авторы благодарят руководителя Группы фотоэкологии животной клетки Института цитологии РАН проф. К.А. Самойлову за неоценимые советы при подготовке работы. По одной из тем обзора совместно с проф. К.А. Самойловой был сделан доклад на конференции [116]. Также мы благодарим руководителя Лаборатории динамики внутриклеточных мембран Института цитологии РАН проф. Е.С. Корнилову за ценные советы по содержанию текста.

Конфликт интересов отсутствует.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования, редактирование: А.Е., В.К.

Сбор и обработка материала, статистическая обработка данных, написание текста: А.Е.

ЛИТЕРАТУРА

113. Shiba H., Tsuda H., Kajiya M. et al. Neodymium-doped yttrium-aluminum-garnet laser irradiation abolishes the increase in interleukin-6 levels caused by peptidoglycan through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in human pulp cells. J. Endod. 2009; 35: 373–6.
114. Бурлакова Е.Б., Голощапов А.Н., Жижина Г.П., Конрадов А.А. Новые аспекты закономерностей действия низкоинтенсивного облучения в малых дозах. Радиационная биология. Радиоэкология. 1999; 1: 26–34.
115. 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. doi: 10.1002/term.1714.
116. Емельянов А.Н., Кирьянова В.В., Самойлова К.А. Особенности воздействия электромагнитного излучения оптического диапазона на клетки различных типов человека и животных. В кн.: Тезисы Всероссийской конференции «Актуальные вопросы фототерапии в лечении и реабилитации». СПб.; 2014: 14–5.

Поступила 01.10.2014