

Воздействие непрерывного низкоинтенсивного лазерного излучения красного (635 нм) и зеленого (525 нм) спектров на мезенхимальные стволовые клетки человека *in vitro*: обзор литературы и собственные исследования

С.В. МОСКВИН¹, Д.Ю. КЛЮЧНИКОВ², Е.В. АНТИПОВ³, А.И. ГОРИНА², О.Н. КИСЕЛЕВА³

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

Одним из способов неспецифического регулирования клеточной активности мезенхимальных стволовых клеток (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. **Материал и методы.** В эксперименте использовалась адгезивная культура МСК, 4 пассажа, полученных из ткани пуповины донора, давшего информированное согласие. Для освечивания использовали лазерный терапевтический аппарат Лазмик-ВЛОК (ПУ №РЗН 2014/1410 от 06.02.14), 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.

The influence of continuous low-intensity laser radiation of the red (635 nm) and red (525 nm) spectra on the human mesenchymal stem cells *in vitro*: a review of the literature and the results of original investigations

S.V. MOSKVIN¹, D.YU. KLYUCHNIKOV², E.V. ANTIPOV³, A.I. GORINA², O.N. KISELEVA³

¹Federal state budgetary institution «State Research Centre of Laser Medicine», Russian Federal Medico-Biological Agency, Moscow, Russia; ²State budgetary healthcare facility «Samara Regional Centre for Family Planning and Reproduction», Samara, Russia; ³Non-government educational facility of higher professional education «REAVIZ», Samara, Russia

Low-intensity laser radiation can be used as one of the methods for the non-specific regulation of the human mesenchymal stem cell (MSC) activity at the preliminary stage of their *in vitro* cultivation. The objective of the present study was to estimate the influence of the limiting regimes of continuous low-intensity laser radiation (CLIR) of red (635 nm) and green (525 nm) spectra. **Material and methods.** The adhesive culture of human mesenchymal stem cells obtained from a donor's umbilical cord tissue was used in the experiments (following 4 passages). They were irradiated using a Lazmik-VLOK laser therapeutic device equipped with the KLO-635-40 (635 nm, 4.9 mW/cm²) and KLO-525-50 (525 nm, 5.4 mW/cm²) laser diode emitting heads operating in a continuous mode. A special nozzle (jar) for laser and vacuum massage (KB-5, 35 cm in diameter) was employed to fix the heads. The exposure time in all the irradiation regimes was 5 minutes. **Conclusion.** The study has demonstrated that neither the morphological features nor the viability of mesenchymal stem cells was altered under the influence of laser irradiation at the aforementioned energy and time parameters. The data obtained indicate that laser irradiation with the limiting levels of the chosen energy parameters produces no positive effect on the cell proliferative activity; more than that, it may cause its inhibition.

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

Имеющиеся к настоящему времени научные данные свидетельствуют о принципиальной возможности комплексного применения физиотерапевтических факторов и клеточных технологий в регенеративной медицине и открывают перспекти-

вы для развития нового направления в современной биомедицине — регенеративной физиотерапии [1]. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) — мультипотентные стромальные клетки — содержатся почти во всех тканях человека, способны к диффе-

ренцировке в различные типы клеток [2, 3] 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) [4–7]. Известно также, что МСК секретируют почти все основные провоспалительные цитокины и ростовые факторы [3]. 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].

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 непрерывном режиме (табл. 1). Ранее нами было показано, что низкоинтенсивный импульсный лазерный свет также способен эффективно стимулировать пролиферацию МСК *in vitro* [8, 9].

Энергетическая плотность (ЭП) находится в достаточно узких пределах (см. табл. 1), характерных для эффектов, наблюдаемых в других типах клеток [10], но важнейшие параметры методики воздействия часто не указываются, что не позволяет обеспечить воспроизводимость результатов лазерного освещивания [11]. Также не теряет своей актуальности вопрос оптимизации параметров освещивания, выбор длины волны в сочетании с оптимальными энергетическими характеристиками воздействия (мощность, плотность мощности и экспозиция) [12, 13].

Из табл. 1 видно, насколько разнообразны получаемые в результате лазерного освещивания эффекты, но обращает на себя внимание тот факт, что все они кальцийзависимые. Поскольку первичным механизмом стимуляции клеточной активности НИЛИ является термодинамический запуск Ca^{2+} -зависимых процессов [41], то это позволяет предположить возможное влияние низкоинтенсивного лазерного света на изменение физиологии регулирования на клеточном уровне. Также известно, что при увеличении внутриклеточного кальция снижается вероятность гибели по механизму апоптоза и повышается выживаемость эмбриональных стволовых клеток *in vitro* [42], МСК *in vivo* [43].

В отношении возможного влияния некогерентного света на МСК данные противоречивые, наша же позиция в отношении некогерентных источников однозначна — бесполезны, необходимо исполь-

зовать только лазерный монохроматический свет для эффективного воздействия, получения максимального отклика биологических систем разного уровня организации [10].

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 [44], т.е. необходимо проводить 3–5-кратное повторное освещивание с целью усиления воздействия.

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

Материал и методы

Культура клеток

В эксперименте использовалась адгезивная культура МСК, 4 пассажа, полученных из ткани пуповины донора, давшего информированное согласие. Забор, транспортировка и обработка материала проводилась в течение 24 ч с момента родов. МСК получены методом эксплантов с последующим культивированием фрагментов. Культивирование проводили в течение 6 сут с использованием стандартных питательных сред: Minimum Essential Medium Eagle, Alpha Modification with $NaHCO_3$ («Sigma-Aldrich», Германия), 2 mM L-глутамина («ПанЭко», Россия), 10% сыворотки плодов коровы (MSC FBS, «Gibco», Австралия). Культивирование проводилось на чашках Петри площадью 11,78 см² (EasyGrip, «Beckton Dickinson», США). 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).

Сведения об авторах:

Москвин Сергей Владимирович — к.т.н., д.б.н., в.н.с. ГНЦ лазерной медицины ФМБА РФ, e-mail: 7652612@mail.ru; Ключников Дмитрий Юрьевич — биолог лаб. СОЦ планирования семьи и репродукции, e-mail: registry@cordbank.ru; Антипов Евгений Валерьевич — к.б.н., ассистент каф. естественно-научных дисциплин НОУ ВПО Медицинский институт «РЕАВИЗ», e-mail: eugantipov@gmail.com; Горина Анна Игоревна — биолог лаб. СОЦ планирования семьи и репродукции, e-mail: annapovojilova@gmail.com; Киселева Ольга Николаевна — преподаватель каф. естественно-научных дисциплин НОУ ВПО Медицинский институт «РЕАВИЗ», e-mail: olenka.kiseleva@bk.ru

Таблица 1. Результаты воздействия НИЛИ с разной длиной волны на МСК *in vitro*

| Эффекты | Длина волны, нм | Плотность мощности, мВт/см ² | Время, с | ЭП, Дж/см ² | Источник литературы |
|---|-----------------|--|----------------------|---|---------------------|
| Внеклеточная кальцификация | 405 | 2,5 | 180 | 9, 18, 27, 36 | [14] |
| 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 | [15] |
| Пролиферация | 630 | 15 | 270 | 4 | [16] |
| Трансмембранная миграция | 630, 850 | 15 | 270 | 4 | [17] |
| Пролиферация | 633 | 3 | 10 | 0,3 | [18] |
| 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 | [19] |
| 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 <i>Akt1</i> , <i>Pip2b</i> , <i>Sik17b</i> , <i>Cend1</i> и <i>Pik3ca</i> | 635 | 6,61 | 75 | 0,5 | [21] |
| Активация сигнальной РНК (miR-193) | 635 | 6,61 | 75 | 0,5 | [22] |
| Пролиферация | 635 | 5,5 | 90 | 0,5 | [23] |
| Высвобождение эпидермального фактора роста (EGF) | 635 | 12,1 | 413 | 5 | [24] |
| Повышение жизнеспособности (МСК получены из жировой ткани) | 636 | 9,3 | 550 | 5 | [25, 26] |
| 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 | [27] |
| Пролиферация, ослабление цитотоксического действия препаратов | 660 | 76—156 | 25—12 | 1,9 | [28] |
| Пролиферация | 660 | 30 мВт | — | 0,5 и 1 | [29] |
| 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 | [30] |
| Пролиферация | 660 | 20 и 40 мВт | 6 и 3 | 3 | [31] |
| НИЛИ снижает липополисахаридиндуцированную 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) | [32] |
| Высвобождение bFGF, инсулинподобного фактора роста-1 (IGF-1) и рецептора IGF-1 (IGFBP3) | 685 | 14,3 | 140 | 2 | [33] |
| Выживаемость | 780 | 1000 | 10 | 10 | [34] |
| Пролиферация | 804 | 50 | 20, 60 | 1, 3 | [35] |
| Пролиферация | 804 | 10 | 100 | 1 | [36] |
| Управление ростом | 810 | 10 | 100 | 1 | [37] |
| Дифференцировка и распространение | 810 | — | — | 3—6 | [38] |
| Дифференцировка и пролиферация | 1064* | 15 Гц, 100-150 мДж, 1,5—2,25 Вт | — | — | [39] |
| Пролиферация | 635* | 144 нс, 1500 Гц и многочастотный режим Лазмик | 300 | 0,009 и 0,036 | [8] |
| | 904* | 108 нс, 1500 Гц и многочастотный режим Лазмик | 300 | 0,015 и 0,042 | |
| Продукция активных форм кислорода | 405 | 100 | 60 и 120 | 6 и 12 | [40] |
| | 664 | | | | |
| | 808 | | | | |

Примечание. * — импульсный режим.

Таблица 2. Параметры НИЛИ-освещения (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 |

Исследование проводилось 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 $9,1 \cdot 10^4$ кл/см² на чашки Петри поверхностью 11,8 см². Опытные 1-ю и 5-ю группы освещивали в режиме лазера №1, 2-ю и 6-ю группы — в режиме №2. При этом пассирование освещенных клеток в 1-й и 2-й группах проводилось на обедненной сывороткой среде (1% FBS), а клеток в 5-й и 6-й группах — на стандартной (10% FBS). Контрольные группы (3, 4, 7 и 8-я) не освещивались. Пассирование клеток в 3-й и 8-й группах (контроль 1-я и 4-я) проводилось также на обедненной сывороткой среде, а 4-й и 7-й групп (контроль 2-я и 6-я) — на стандартной (10% FBS). Автоматический подсчет общего количества клеток, живых клеток и жизнеспособности проводился в 1–4-й группах на 1, 3 и 4-е сутки. Морфологический анализ проводился в 5–8-й группах на 3-и сутки. Визуальное наблюдение за ростом культуры проводилось регулярно. Культивирование проводилось при 37 °С и 5% CO₂.

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 («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 °С. 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. Несвязавшийся 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, оценка жизнеспособности проводились на автоматическом анализаторе концентрации и жизнеспособности клеток Vi-Cell XR («BeckmanCoulter», США). Обработка данных и построение графиков проводились с помощью программного обеспечения Excel (Microsoft Office 2007, «Microsoft», США). Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы SigmaPlot v. 11.0.

Параметры лазерного воздействия

Опытные группы клеток освещивались НИЛИ (параметры представлены в **табл. 2**), время экспозиции 5 мин на 1 чашку. Контрольные группы не подвергались воздействию. Применяли аппарат лазерный терапевтический Лазмик-ВЛОК (Регистрационное удостоверение №РЗН 2014/1410 от 06.02.14), лазерные излучающие головки, работающие в непрерывном режиме с одним лазерным диодом. Фиксация лазерных излучающих головок, что необходимо для равномерной засветки всей чашки, обеспечивалась специальной насадкой (банкой) для лазерно-вакуумного массажа из комплекта КБ-5 диаметром 35 мм.

Чашки полностью находились в световом поле, что обеспечивало поглощение ~90% всей падающей световой энергии. Исходя из этого рассчитывалась плотность мощности (ПМ) и ЭП для каждого варианта освещения. Требование к равномерной засветке всей поверхности чашки связано с обеспечением лучшего эффекта, чем при точечном воздействии на часть культуры клеток [22, 45].

Результаты и обсуждение

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

При подсчете общего количества клеток в культуре было показано, что на 3-й день после освещения (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 освещения (5-го дня пассирования) незначительно отличаются от показателей 3-го дня.

Таблица 3. Жизнеспособность клеток до и после освечивания

| Группа клеток | 1-е сутки | | | 3-и сутки | | | 4-е сутки | | |
|---------------|--------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------|---------------------|
| | общее количество, $\cdot 10^6$ | живые, $\cdot 10^6$ | жизнеспособность, % | общее количество, $\cdot 10^6$ | живые, $\cdot 10^6$ | жизнеспособность, % | общее количество, $\cdot 10^6$ | живые, $\cdot 10^6$ | жизнеспособность, % |
| 1-я | 0,1076 | 0,0977 | 89,9 | 0,1333 | 0,097 | 73,8 | 0,1639 | 0,1382 | 81,3 |
| 2-я | 0,1490 | 0,1022 | 69,9 | 0,1796 | 0,12789 | 71,7 | 0,1333 | 0,0869 | 63,9 |
| 3-я | 0,1027 | 0,0766 | 77,5 | 0,1333 | 0,082 | 60,7 | 0,1130 | 0,1076 | 96,7 |
| 4-я | 0,3281 | 0,3025 | 92,3 | 0,7637 | 0,6715 | 87,9 | 0,7790 | 0,6715 | 86,4 |

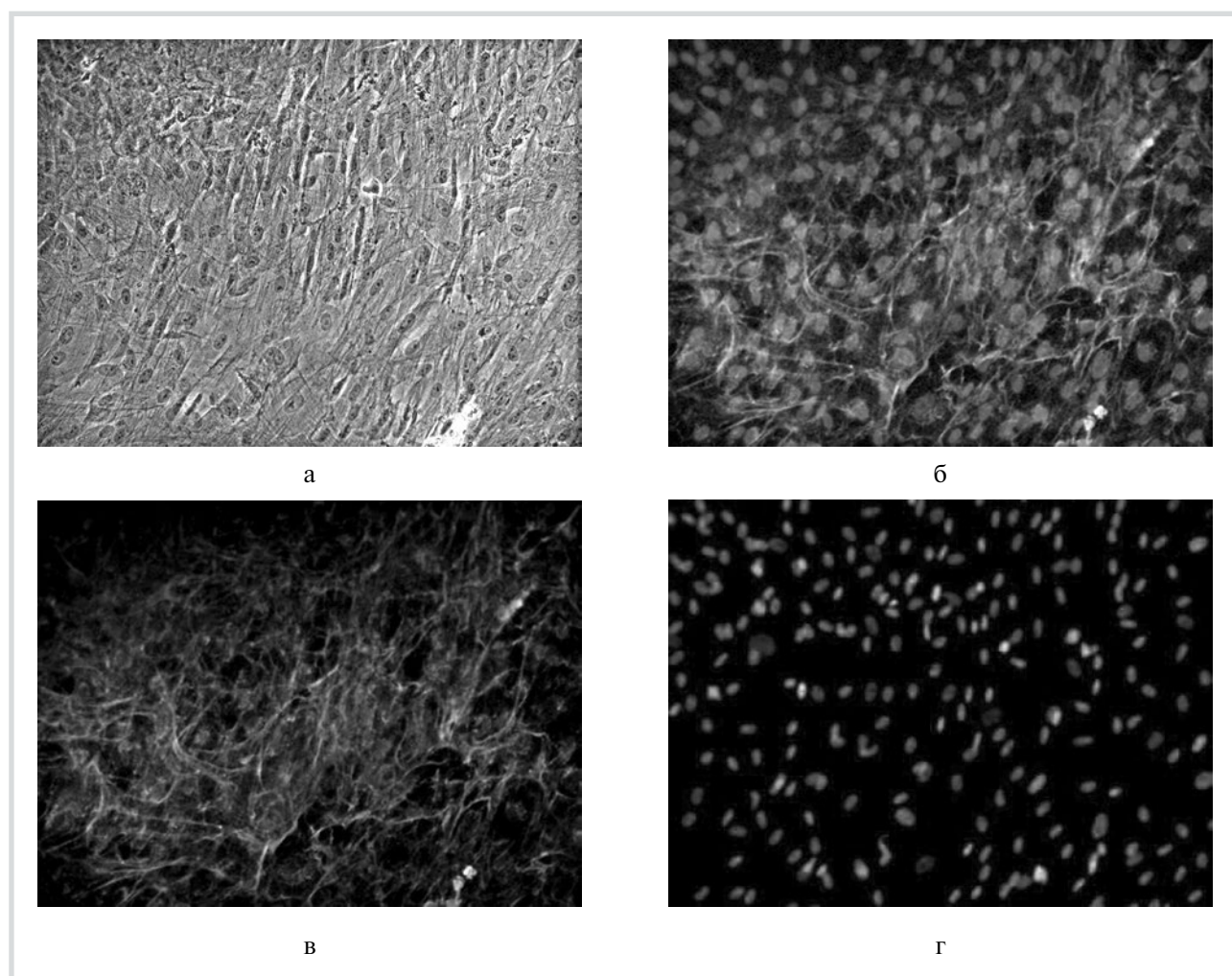


Рис. 1. Микрофотография культуры, выращенной на среде с 10% сыворотки и освеченной НИЛИ в режиме №1 (красный лазер, 635 нм), в проходящем свете и окрашенной флуоресцентными красителями.

а — фотография клеток в проходящем свете. Ув. 10; б — под флуоресцентным микроскопом, окрашенной DAPI и WGA-alexa; в — под флуоресцентным микроскопом, окрашенной WGA-alexa; г — под флуоресцентным микроскопом, окрашенной DAPI.

Параллельно с определением плотности культуры определяли жизнеспособность клеток во всех вариантах.

Как видно из табл. 3, жизнеспособность клеток во всех вариантах варьирует в пределах 75–90% в разные дни и не коррелирует с особенностями состава среды. Однако стоит отметить, что в опытном

образце, который подвергался освечиванию в режиме №2, наблюдалась самая низкая жизнеспособность (статистически не достоверно).

Оценка морфологии клеток

1-я группа (режим НИЛИ №1, красный лазер, 635 нм, 10% FBS, рис. 1). В данном варианте культура плотная, наблюдается наслаивание клеток (мно-

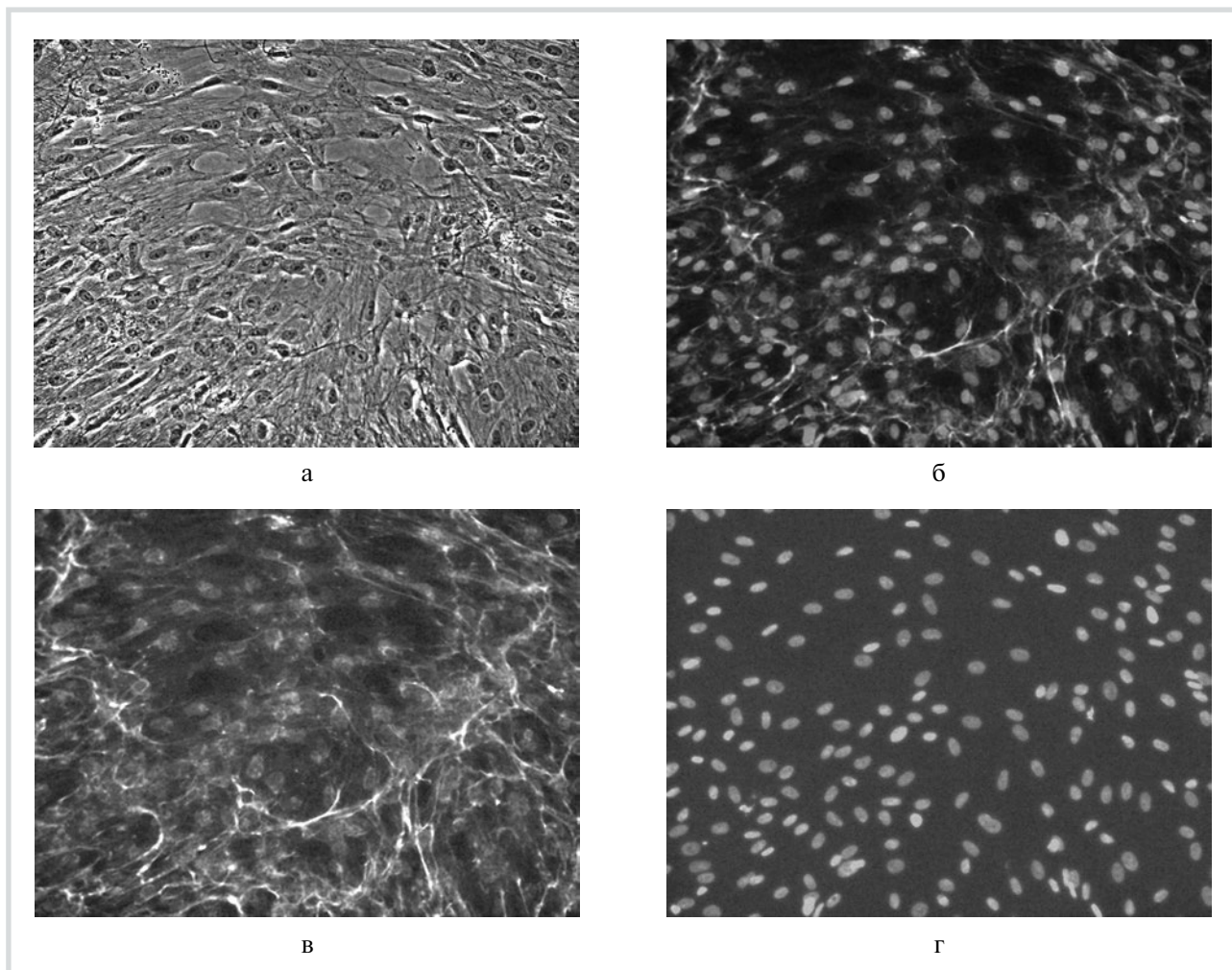


Рис. 2. Микрофотография культуры, выращенной на среде с 10% сыворотки и освещенной НИЛИ в режиме №2 (зеленый лазер, 525 нм), в проходящем свете и окрашенной флюоресцентными красителями.

а — фотография клеток в проходящем свете. Ув. 10; б — под флюоресцентным микроскопом, окрашенной DAPI и WGA-alexa; в — под флюоресцентным микроскопом, окрашенной WGA-alexa; г — под флюоресцентным микроскопом, окрашенной DAPI.

гослойная культура). Клетки веретеновидной формы, края не деформированы, ядра четкие, во многих просматриваются ядрышки. Клетки без морфологических особенностей.

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

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

4-я группа (контроль, 1% FBS, **рис. 4**). 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.

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 веретеновидные фибробластоподобные, распластаные по подложке. Ядра четкие, по большей части находящиеся в интерфазе деления, структура не изменена, хорошо просматриваются ядрышки.

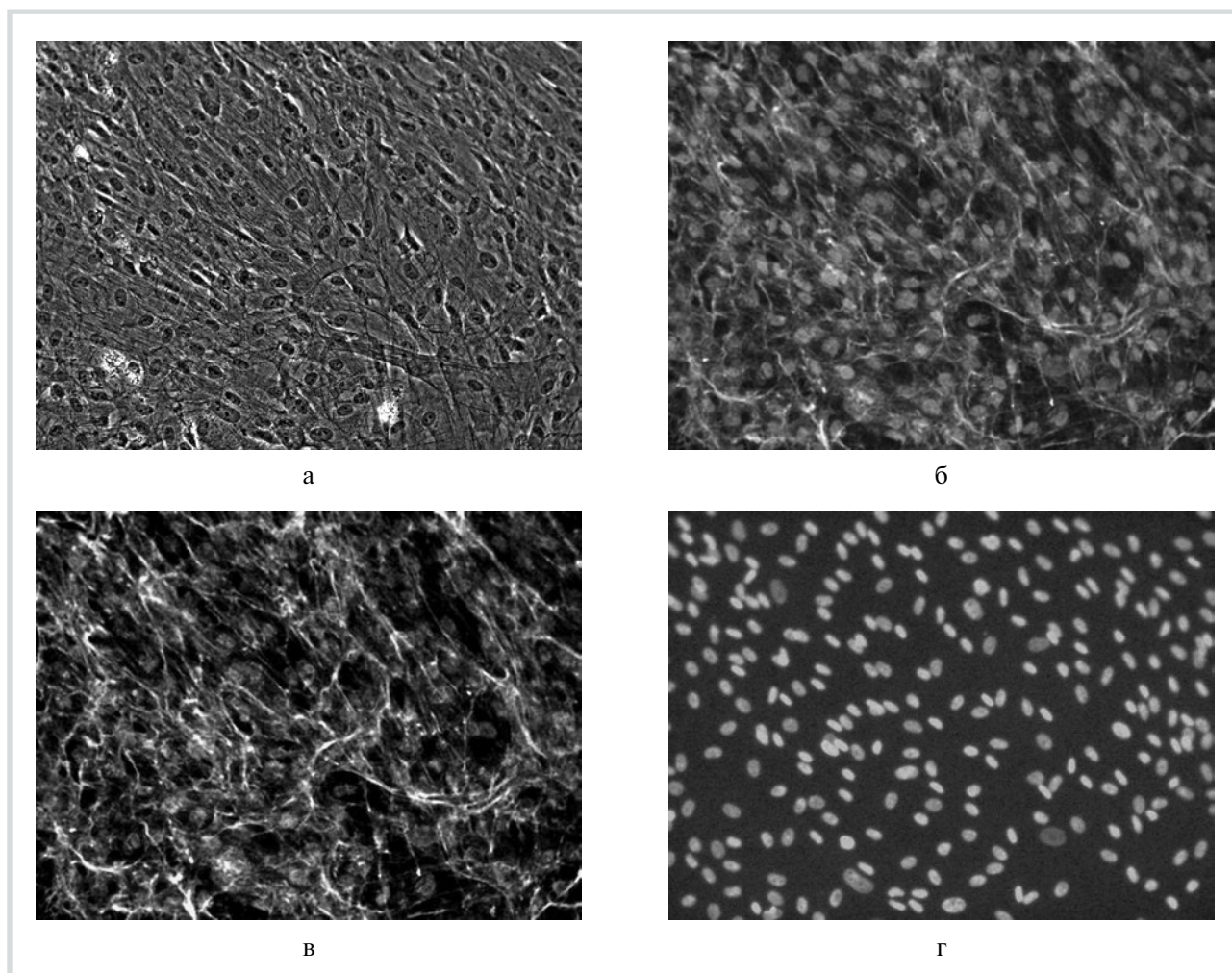


Рис. 3. Микрофотография контрольной культуры, выращенной на среде с 10% сыворотки без освечивания НИЛИ в проходящем свете и окрашенной флуоресцентными красителями.

а — фотография клеток в проходящем свете. Ув. 10; б — под флуоресцентным микроскопом, окрашенной DAPI и WGA-alexa; в — под флуоресцентным микроскопом, окрашенной WGA-alexa; г — под флуоресцентным микроскопом, окрашенной DAPI.

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

В 1-й и 2-й группах (клетки, освещенные НИЛИ) никаких различий между собой и контролем также не наблюдается. Единственный отличный от нормы вариант в 4-й группе, 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 пара-

метров воздействия необходима дальнейшая исследовательская работа. Однако о предельных режимах воздействия можно говорить достаточно уверенно, что в дальнейших исследованиях позволит 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 ПМ варьирует в значительно более широких пределах, от 3–6,61 мВт/см² [18–23] до 32,6 мВт/см² [20], а экспозиция — соответственно от 10 до 90 с (см. табл. 1). При этом М. Giannelli и соавт. [20] получили увели-

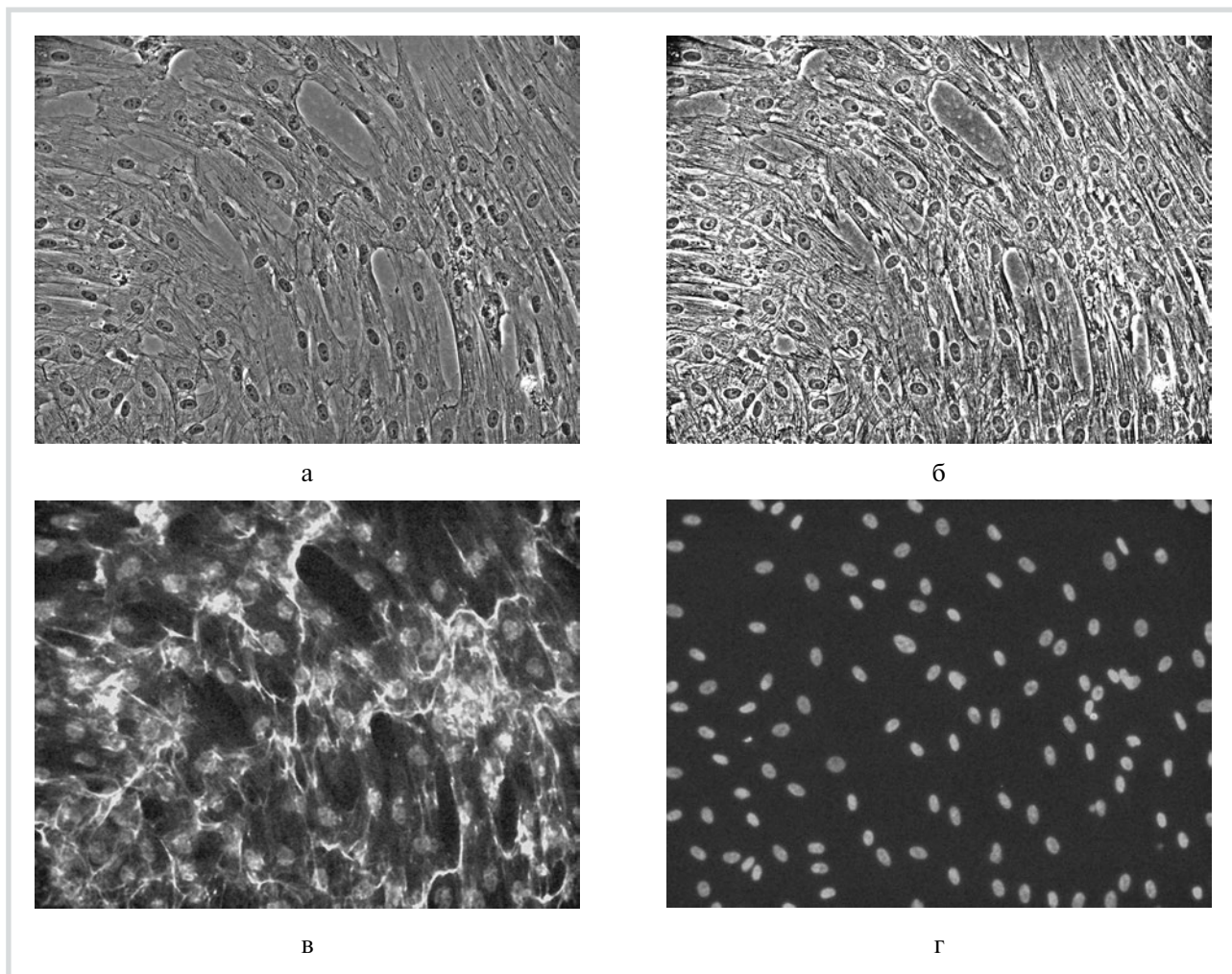


Рис. 4. Микрофотография контрольной культуры, выращенной на среде с 1% сыворотки без освечивания НИЛИ в проходящем свете и окрашенной флюоресцентными красителями.

а — фотография клеток в проходящем свете. Ув. 10; б — под флюоресцентным микроскопом, окрашенной DAPI и WGA-alexa; в — под флюоресцентным микроскопом, окрашенной WGA-alexa; г — под флюоресцентным микроскопом, окрашенной DAPI.

чение пролиферации более чем в 2 раза в первые 3 сут, что авторы связали с активацией Ca^{2+} -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) [46], 5 Дж/см² при ПМ 2,2 мВт/см² [47] и при ПМ 3 мВт/см² [48, 49], 8 Дж/см² при ПМ ~1 мВт/см² [50].

В некоторых работах [24—26] положительные результаты воздействия НИЛИ с длиной волны 635 нм достигаются 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.

Среди причин разброса энергетических параметров в зависимости от типа клеток и изучаемого параметра могут быть либо различия в спектрах поглощения клеток и соответственно эффективности светового воздействия, либо в механизмах и/или интенсивности регулирования разных физиологических процессов [51].

Из вышесказанного можно сделать вывод, что для длины волны 635 нм ЭП 1,3 Дж/см² при плотности мощности ~5 мВт/см² является предельным, уже не вызывающим стимулирование пролиферации МСК, дальнейшее увеличение этих параметров

воздействия нецелесообразно, рекомендуется ограничить экспозицию 100 с при заданной ПМ. Такой временной период определяется временем релаксации эндогенных волн Ca^{2+} , регулирующих самые разнообразные внутриклеточные процессы, в том числе пролиферацию, а также участвующих во внеклеточных взаимодействиях МСК [52, 53].

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, повышение этого уровня может вызвать ингибирование внутриклеточных процессов [54, 55].

В спектральном диапазоне 520—525 нм исследований по изучению фотобиологического действия на культуру животных клеток пока не проводилось, есть единичные работы, в которых использовался когерентный и некогерентный (светодиоды) свет в зеленом спектре с близкими длинами волн, но не МСК. R. Lubart и соавт. [56] 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 Ca^{2+} в лимфоцитах и стимулирует производство ими IL-2 [57, 58]. 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 [15].

Заключение

Результаты предварительного изучения возможного влияния непрерывного НИЛИ красного (635 нм) и зеленого (525 нм) спектров на морфологию, жизнеспособность, пролиферативную активность и скорость роста МСК *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 недостоверны 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) [59].

Сравнительная оценка оптимальных энергетических параметров возможна только после уточнения спектров поглощения культуры МСК в разных спектральных диапазонах, но 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 данных литературы необходимо также учитывать способ получения и другие особенности МСК.

Конфликт интересов отсутствует.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования, редактирование: С.М., Д.К.

Сбор и обработка материала, статистическая обработка данных: С.М., Д.К., Е.А., А.Г., О.К.

Написание текста: С.М.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кончугова Т.В., Бобровницкий И.П., Орехова Э.М., Пузырева Г.А. Перспективы развития регенеративной физиотерапии. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. 2014;91(5):42-49.
2. Freshney RI, Stacey GN, Auerbach JM. *Culture of human stem cells*. Hoboken, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2007.
3. Соколова И.Б., Павличенко Н.Н. Механизмы воздействия экзогенных мезенхимных стволовых клеток на ишемизированную ткань при сердечно-сосудистых заболеваниях. *Цитология*. 2010;52(11):911-917.
4. Шахбазов А.В., Космачева С.М., Картель Н.А., Потапов М.П. Нейрогенная дифференцировка мезенхим-

- ных стволовых клеток: трансгенный подход. *Цитология*. 2010;52(4):301-304.
5. 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. Москвин С.В., Ключников Д.Ю., Антипов Е.В., Волчков С.Е., Киселева О.Н. Изменения в культуре мезенхимальных стволовых клеток человека под влиянием импульсного низкоинтенсивного лазерного излучения красного и инфракрасного спектров. *Лазерная медицина*. 2014;18(2):30-36.
 9. Москвин С.В., Ключников Д.Ю., Антипов Е.В., Волчков С.Е., Киселева О.Н. Влияние импульсного низкоинтенсивного лазерного излучения красного (635 нм) и инфракрасного (904 нм) спектров на мезенхимальные стволовые клетки человека in vitro. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. 2014;(6):40-47.
 10. Москвин С.В. Эффективность лазерной терапии. Серия «Эффективная лазерная терапия». Т. 2. М.—Тверь: Триада; 2014.
 11. Hode L. *The DOSE: a minute to learn, a lifetime to master*. World Association for Laser Therapy Conference. Gold Coast; 2012:50.
 12. Емельянов А.Н., Кирьянова В.В. Стволовые клетки и свет в регенеративной медицине (часть 1). *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. 2015;1:51-62.
 13. Емельянов А.Н., Кирьянова В.В. Стволовые клетки и свет в регенеративной медицине (часть 2). *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. 2015;2:43-51.
 14. Kushibiki T, Awazu K. Blue laser irradiation enhances extracellular calcification of primary mesenchymal stem cells. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2009;27(3):493-498.
 15. Anwer AG, Gosnell ME, Perinchery SM 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;44(9):769-778.
 16. Li WT, Leu YC. 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.
 17. Li WT, Chen CW, Huang PY. 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.
 18. 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.
 19. Hou JF, 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.
 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;228(1):172-181.
 21. Wu YH, Wang J, Gong DX et al. Effects of low-level laser irradiation on mesenchymal stem cell proliferation: a microarray analysis. *Lasers Med Sci*. 2012;27(2):509-519.
 22. 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.
 23. 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;23(3):277-282.
 24. Mvula B, Moore TJ, Abrahamse H. Effect of low-level laser irradiation and epidermal growth factor on adult human adipose-derived stem cells. *Lasers in Medical Science*. 2010;25(1):33-39.
 25. 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/>
 26. de Villiers JA, Houreld NN, 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;7(4):869-882.
 27. Kim HK, Kim JH, Abbas AA et al. Red light of 647 nm enhances osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *Lasers in Medical Science*. 2009;24(2):214-222.
 28. 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.
 29. Barboza CAG, Ginani F, Soares DM et al. Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of mesenchymal stem cells. *Einstein (Sao Paulo)*. 2014;12(1):75-81.
 30. de Oliveira TS, Serra AJ, Manchini MT 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;30(1):217-223.
 31. Eduardo FP, Bueno DF, de Freitas PM et al. Stem cell proliferation under low-intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2008;40(6):433-438.
 32. Wu JY, Chen CH, Wang CZ et al. Low-power laser irradiation suppresses inflammatory response of human adipose-derived stem cells by modulating intracellular cyclic AMP level and NF- κ B activity. *PLoS One*. 2013;8(1):e54067: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3546978/>
 33. Saygun I, Nizam N, Ural AU 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. Diniz IMA, Matos AB, Marques MM. 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/>
 35. 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;39(4):373-378.
 36. 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;31(6):269-273.
 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. 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.
 39. 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.
40. 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.
 41. Москвин С.В. Системный анализ эффективности управления биологическими системами низкоэнергетическим лазерным излучением: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Тула; 2008.
 42. 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):123-125.
 43. Gärtner A, Pereira T, Armada-da-Silva PAS 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.
 44. Li WT, Leu YC, Wu JL. Red-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.
 45. Lins EC, Oliveira CF, Guimaraes OC et al. A novel 785-nm laser diode-based system for standardization of cell culture irradiation. *Photomed Laser Surg.* 2013;31(10):466-473.
 46. 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;25(6):519-525.
 47. Zungu IL, Mbene AB, Hawkins-Evans DH et al. Phototherapy promotes cell migration in the presence of hydroxyurea. *Lasers Med Sci.* 2009;24(2):144-150.
 48. Hawkins D, Abrahamse H. Biological effects of helium-neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts. *Photomedicine and Laser Surgery.* 2005;23(3):251-259.
 49. 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;24(6):705-714.
 50. Pal G, Dutta A, Mitra K et al. Effect of low intensity laser interaction with human skin fibroblast cells using fiber-optic nano-probes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 2007;86(3):252-261.
 51. Karu T. Activation of metabolism of nonphotosynthesizing microorganisms with monochromatic visible (laser) light: A critical review. *Lasers in the Life Sciences.* 1996;7(1):11-33.
 52. 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>
 53. Kim TJ, 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;4:04876.
 54. AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci.* 2012;27(1):237-249.
 55. Lin F, Josephs SF, Alexandrescu DT et al. Lasers, stem cells, and COPD. *Journal of Translational Medicine.* 2010;8(16): <http://www.translational-medicine.com/content/8/1/16>.
 56. Lubart R, Friedmann H, Peled I, Grossman N. Light effect on fibroblast proliferation. *Laser Therapy.* 1993;5(2):55-57.
 57. Poon VKM, 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;81(1):1-8.
 58. Tong M, Liu YF, Zhao XN 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;15(3):201-206.
 59. Opländer C, Hidding S, Werners FB et al. Effects of blue light irradiation on human dermal fibroblasts. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 2011;103(2):118-125.

Поступила 30.06.2015