

## Влияние гидродинамических процессов и низкоинтенсивного излучения с длинами волн 0,63 мкм и 7,1 мм на пролиферативную активность стволовых клеток стромы костного мозга *in vitro*

Р.К. Чайлахян<sup>1</sup>, В.И. Юсупов<sup>2</sup>, Ю.В. Герасимов<sup>1</sup>, П.А. Соболев<sup>1</sup>,  
А.Х. Тамбиев<sup>3</sup>, Н.Н. Воробьёва<sup>2</sup>, А.П. Свиридов<sup>2</sup>, В.Н. Баграташвили<sup>2</sup>

<sup>1</sup> — Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии  
им. Г.Ф. Гамалеи, Москва

<sup>2</sup> — Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН,  
Московская область

<sup>3</sup> — Московский государственный университет им. М.И. Ломоносова, Москва

Контактная информация: Юсупов Владимир Исаакович [iouss@yandex.ru](mailto:iouss@yandex.ru)

Изучался эффект воздействия излучения гелий-неонового лазера, излучения крайне высоких частот (КВЧ) с длиной волны 7,1 мм, а также лазеро-индуцированных гидродинамических процессов на пролиферацию стволовых клеток стромы костного мозга *in vitro* в состояниях «норма» и «ослабленное». Ослабление клеток достигалось их культивированием на питательных средах с пониженным содержанием сыворотки эмбрионов коров. Показано, что использованные физические воздействия могут усиливать пролиферативную активность стволовых клеток, причем эффект усиления наиболее выражен при воздействии на «ослабленные» стволовые клетки.

**Ключевые слова:** стволовые клетки стромы костного мозга, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, лазерное излучение, КВЧ излучение, лазеро-индуцированная гидродинамика

Все возрастающий интерес к изучению биологии и свойств стволовых клеток, в частности, стволовых стромальных клеток костного мозга или мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) вызван их широким терапевтическим потенциалом, открывающим серьезные перспективы их использования в различных областях регенеративной медицины [1]. При трансплантации в организм выращенные *in vitro* ММСК способны образовывать различные ткани мезенхимального происхождения [14]. С развитием клеточных технологий эти клетки все более успешно используются в медицинской практике (травматологии и ортопедии, челюстно-лицевой хирургии, стоматологии и др.)

для восстановления целостности костной ткани, гиалинового хряща суставов, сухожильно-связочного аппарата и других тканей [7, 10].

Очевидно, что эксплантация костного мозга в культуру ткани нарушает микроокружение ММСК. Перенос этих клеток из своей естественной ниши, поддерживающей их стволовой статус, в новую нишу, например, в тканеинженерную конструкцию [2] может привести к изменению их статуса. Как следствие, может иметь место «ослабление» ММСК, нежелательное изменение их регенераторного и дифференцировочного потенциала. Для восстановления возможных изменений свойств ММСК, наступивших при их извлечении из естественной ниши, в этой

работе используются «физические» воздействия на клетки, включая воздействие низкоинтенсивным электромагнитным излучением и лазероиндуцированными гидродинамическими процессами.

В настоящее время воздействие низкоинтенсивным электромагнитным излучением широко используется в медицинской практике для лечения различных заболеваний. Наибольшее распространение получили лазерная терапия, основанная на применении низкоинтенсивного лазерного излучения видимого и ближнего инфракрасного диапазонов [6], и КВЧ — терапия, использующая волны миллиметрового диапазона [9]. Стремительное распространение этих методов воздействия связано с их высокой терапевтической эффективностью. Действие низкоинтенсивного лазерного излучения на различные биологические объекты исследовалось на молекулярном, субклеточном, клеточном и организменном уровнях [3, 13, 15].

Лазероиндуцированные гидродинамические (ЛИГ) процессы при воздействии лазерного излучения умеренной мощности (1-5 Вт) на водонасыщенные биоткани в последнее время также стали эффективно использоваться в регенеративной медицине [4, 8]. Механизм терапевтического действия лазероиндуцированных гидродинамических процессов обусловлен образованием и схлопыванием парогазовых пузырьков в водонасыщенной ткани вблизи торца оптического транспортного волокна (через которое лазерное излучение вводится в биоткань), что приводит к возникновению в зоне лазерного воздействия кумулятивных микроструй и генерации мощных низкочастотных механических колебаний среды [12, 16]. Возникшие механические колебания среды вследствие

эффектов механобиологии и запускают процесс регенерации ткани [5].

Проведенные ранее исследования по воздействию на биологические объекты низкоинтенсивного лазерного излучения показали, что результат воздействия значительно зависит от состояния самих биологических объектов [13]. Так, при воздействии на биологические объекты, состояние которых характеризуется как «норма», различные контролируемые характеристики (такие как, например, индукция интерферона лейкоцитами) до и после воздействия достоверно не отличаются. Иная картина наблюдается при воздействии низкоинтенсивного излучения на биологические объекты, находящиеся в «ослабленном» состоянии. В этом случае после воздействия низкоинтенсивного излучения большинство контролируемых характеристик изменяются в сторону значений, характерных для биообъектов в состоянии «норма».

В этой работе, являющейся продолжением наших исследований физических воздействий на ММСК [11], изучается влияние ряда используемых в современной медицине физических полей на изменение пролиферативной активности ММСК *in vitro* в состояниях, условно характеризующихся как «норма» и «ослабленное».

### Материалы и методы

Для сравнительного изучения пролиферативной активности ММСК костного мозга в состояниях «норма» и «ослабленное» под воздействием низкоинтенсивных полей нами была разработана методика получения штаммов ММСК в измененном («ослабленном») состоянии. Колонии фибробластов, сформированные к 12-14 дню после эксплантации костно-

го мозга человека, обрабатывали 0,25% раствором трипсина, снимали с пластика и подвергали пассированию в оптимальных условиях культивирования — в среде, состоящей из 80% среды  $\alpha$ -МЕМ, 20% сыворотки эмбрионов коров (СЭК) с добавлением антибиотиков. Спустя несколько дней в культуральных флаконах образовывался конфлюэнтный слой клеток, состоящий из фибробластов. При последующих пассажах культура клеток разделялась на две части и эксплантировалась в культуральные флаконы с питательной средой различного состава. В первом случае культуральная среда состояла из 80% среды  $\alpha$ -МЕМ и 20% СЭК и обозначалась нами как «норма», в другом — из 97% среды  $\alpha$ -МЕМ и 3% СЭК и была обозначена нами как «ослабленная». В дальнейшем, мы вели эти культуры параллельно до IV-VI пассажа. Такое значительное уменьшение СЭК приводило к стабильному снижению (примерно в 3 раза) пролиферации клеток. Перед облучением ММСК низкоинтенсивными полями клетки обрабатывались 0,25% трипсином и снимались с пластика. Суспензии ММСК объемом 3 мл разливались по пластиковым пробиркам с диаметром 15 мм. В каждой из пробирок содержалось около  $3 \times 10^5$  клеток.

Облучение суспензии «нормальных» и «ослабленных» клеток проводили следующими полями:

— излучением He-Ne лазера (лазерный аппарат ЛГН-213-1, длина волны 0,63 мкм, мощность 0,8 мВт, интенсивность облучения 0,4 мВт/см<sup>2</sup>, время воздействия 60 с);

— КВЧ — излучением (аппарат «Аквастин» фирмы ИРЭ-Полюс, длина волны 7,1 мм, интенсивность облучения 5 мВт/см<sup>2</sup>, время воздействия 10 с, 30 с и 60 с);

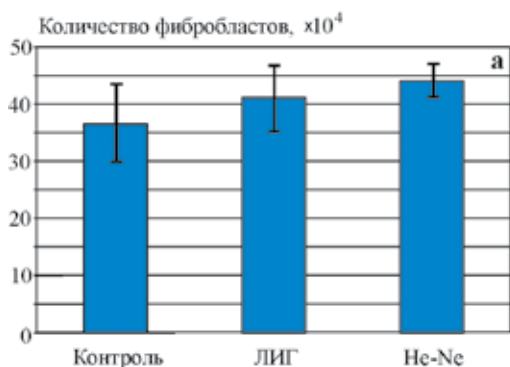
— полем ЛИГ (использовался волоконный лазерный аппарат ЛС-0,97 фирмы ИРЭ-Полюс, длина волны 0,97 мкм, мощность 3 Вт, время воздействия 60 с).

Использовались следующие методики облучений. Для воздействия излучением He-Ne лазера использовался расходящийся лазерный луч, образованный с помощью линзы с фокусным расстоянием 10 мм. Пробирка с культурой ММСК устанавливалась на расстоянии 40 см от линзы, где интенсивность облучения соответствовала выбранному значению 0,4 мВт/см<sup>2</sup>. Для воздействия КВЧ — излучением предварительно отцентрифугированные пробирки с суспензией ММСК располагались внутри конусной антенны КВЧ аппарата таким образом, чтобы зауженное дно пробирки устанавливалось на излучающем торце головки аппарата. При воздействии полем ЛИГ пробирка с клеточной суспензией устанавливалась в кювету с водой. Там же в воде на расстоянии около 5 мм от пробирки закреплялся фрагмент куриной кости, в которой кварцевым волокном аппарата ЛС-0,97 прожигались (формировались) лазерные каналы. Формирование каналов проводилось контактно кварцевым волокном диаметром 400 мкм. При этом вблизи торца волокна развивались активные гидродинамические процессы, которые порождали широкополосные акустические сигналы [9, 12], воздействующие на ММСК в пробирке. Контроль параметров лазерного излучения проводился с помощью измерителя мощности FieldMaster (Coherent, США).

Фибробласты из каждой облученной пробирки и пробирок с контролем эксплантировали в три культуральных флакона площадью 25 см<sup>2</sup>. Клетки выращивались в инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 5 дней. Для

определения пролиферативной активности ММСК культуры обрабатывались раствором TrypLe, затем проводился подсчет выросших фибробластов с помощью счетчика клеток Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen). По результатам измерений вычислялись средние значения и стандартные отклонения. Существование различий между отдельными выборками проверяли с помощью U-критерия Манна-Уитни.

### Результаты и их обсуждение



всех экспериментов выше контрольных значений. Наибольшее отличие от контроля (уровень значимости  $p \leq 0,01$ ) зарегистрировано при воздействии на «ослабленные» клетки с помощью ЛИГ и КВЧ (при времени воздействия 10 с и 30 с). При этом пролиферативная активность ММСК при воздействии на суспензию «ослабленных» клеток за счет процессов ЛИГ в течение 60 с (рис. 1б) и КВЧ излучением в течение 10 с (рис. 2б) возросла на 30%. Увеличение времени воздействия КВЧ излучением до 30 с (рис. 2б) привело

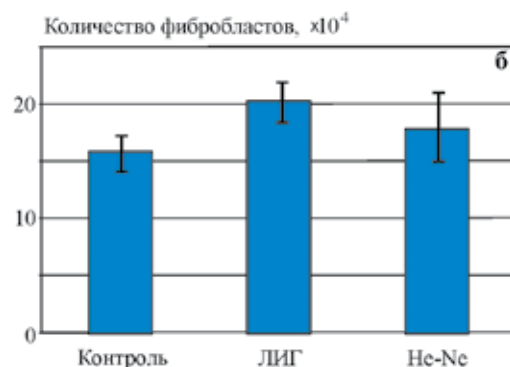


Рис. 1. Пролиферация «нормальных» (а) и «ослабленных» (б) ММСК после облучения полем ЛИГ и низкоинтенсивным излучением He-Ne лазера.

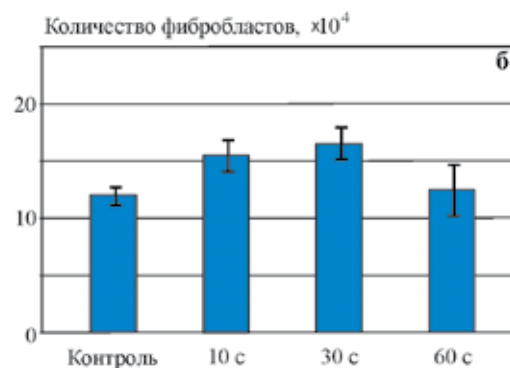
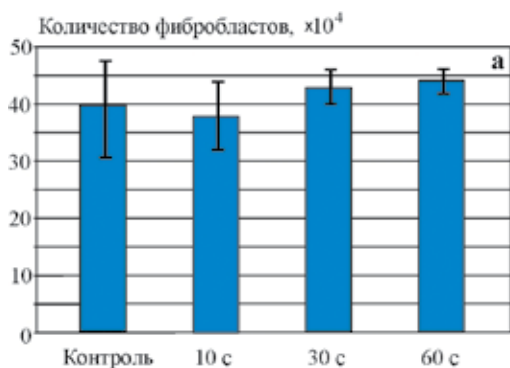


Рис. 2. Пролиферация «нормальных» (а) и «ослабленных» (б) ММСК после облучения КВЧ излучением при различных временах воздействия.

На рисунках 1 и 2 представлены полученные результаты. Как видно из рисунков, средние значения количества выросших фибробластов практически для

любого из экспериментов выше контрольных значений. Наибольшее отличие от контроля (уровень значимости  $p \leq 0,01$ ) зарегистрировано при воздействии на «ослабленные» клетки с помощью ЛИГ и КВЧ (при времени воздействия 10 с и 30 с). При этом пролиферативная активность ММСК при воздействии на суспензию «ослабленных» клеток за счет процессов ЛИГ в течение 60 с (рис. 1б) и КВЧ излучением в течение 10 с (рис. 2б) возросла на 30%. Увеличение времени воздействия КВЧ излучением до 30 с (рис. 2б) привело

60 с привело к нивелированию позитивного эффекта. Таким образом, результаты наших исследований, проведенных на ММСК, показывают, что эффект от воздействия на клетки различными физическими факторами существенно зависит от состояния самих клеток. Такие воздействия, практически не действуют на ММСК в состоянии «норма», но увеличивают пролиферативную активность клеток, находящихся в «ослабленном» состоянии.

### Выводы

Используемые нами факторы физического воздействия на ММСК (электромагнитное излучение гелий-неонового лазера, КВЧ излучение крайне и интенсивные акустические волны, генерируемые в условиях лазеро-индуцированной гидродинамики) увеличивают их пролиферативную активность. Максимальный эффект усиления наблюдался при воздействии на «ослабленные» ММСК, культивирование которых проводилось на питательных средах с дефицитом СЭК. Полученные результаты открывают новые возможности терапевтического применения указанных физических воздействий, в частности, при использовании ММСК в клеточных технологиях и тканевой инженерии.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты 10-02-01472, 09-02-00714, 10-02-00672).

### Список литературы

1. Биология стволовых клеток и клеточные технологии / под ред. М.А. Пальцева. — М.— Медицина. — 2009. — с. 728.

2. *Бухарова Т.Б., Антонов Е.Н., Попов В.К., Фатхудинов Т.Х., Попова А.В., Волков А.В., Бочкова С.А., Баграташвили В.Н., Гольдштейн Д.В.* Биосовместимость тканеинженерных конструкций на основе пористых полилактидных носителей, полученных методом селективного лазерного спекания, и мультипотентных стромальных клеток костного мозга // Клеточные Технологии в Биологии и Медицине. — 2010. — № 1. — с. 40-46.

3. *Кару Т.И.* Клеточные механизмы низкоинтенсивной лазерной терапии // Успехи современной биологии. — 2001. — Т.121. — № 1. — с.110-120.

4. *Крочек И.В., Привалов В.А., Ланна А.В. и др.* Лазерная остеоперфорация в лечении острого и хронического остеомиелита // Методические рекомендации.— Челябинск: ЧГМА, ЧГУ. — 2004. — с. 34.

5. Лазерная инженерия хрящей // под ред. Баграташвили В.Н., Соболев Э.Н., Шехтер А.Б. — М.: Физматлит. — 2006. — с. 488.

6. Низкоинтенсивная лазерная медицина // под ред. Москвин С.В., Буйлин В.А. — М.: ТОО “Техника”. — 2000. — с. 724.

7. *Осепян И.А., Чайлахян Р.К., Гарибян Э.С., Айвазян В.П.* Лечение неросслыхся переломов, ложных суставов и дефектов длинных костей трансплантацией аутологичных костномозговых фибробластов, выращенных in vitro и имплантированных в АГМ // Ортопедия, травматология и протезирование. — 1987. — Т.9. — с.96-98.

8. *Сандлер Б.И., Суляндзига Л.Н., Чудновский В.М. и др.* Перспективы лечения дискогенных компрессионных форм пояснично-крестцовых радикулитов с помощью пункционных неэндоско-

пических лазерных операций, — Владивосток: Дальнаука. — 2004. — с.180.

9. **Тамбиев А.Х., Кирикова Н.Н., Бецкий О.В., Гуляев Ю.В.** Миллиметровые волны и фотосинтезирующие организмы // под ред. Ю.В. Гуляева, А.Х. Тамбиева. — М.: «Радиотехника». — 2003. — с.175.

10. **Чайлахян Р.К.** Восстановление гиалинового хряща путем трансплантации стромальных клеток предшественников костного мозга, выращенных *in vitro*. // Сборник материалов Всероссийского симпозиума «Коленный сустав», — Москва. — 1999. — с. 75-77.

11. **Чайлахян Р.К., Герасимов Ю.В., Свиридов А.П., Кондюрин А.В., Тамбиев А.Х., Баграташвили В.Н.** Действие ИК лазерного излучения на стволовые стромальные клетки костного мозга крыс *in vivo* // Российский иммунологический журнал. — 2009. — Т. 3(12). — № 3-4. — с. 318-322.

12. **Чудновский В.М., Буланов В.А., Юсупов В.И., Корсков И.В., Косарева**

**О.В., Тимошенко В.С.** Экспериментальное обоснование лазерного пункционно-го лечения остеохондроза позвоночника // Лазерная медицина. — 2010. — Т.14. — вып.1. — с.30-34.

13. **Чудновский В.М., Леонова Г.Н., Скопинов С.А., Дроздов А.Л., Юсупов В.И.** Биологические модели и физические механизмы лазерной терапии / Владивосток: Дальнаука. — 2002. — с.157.

14. **Friedenstein A.J., Chailakhyan R.K., Gerasimov J.V.** Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation chambers. // Cell Tissue Kinet. — 1987. — №20. — p.263-272.

15. **Lin F., Josephs S.F., Alexandrescu D.T. et al.** Laser, stem cell, and COPD // Journal of Translational Medicine. — 2010. — V. 8. — p. 16-26.

16. **Yusupov, V.I. Chudnovskii, and V.N. Bagratashvili.** Laser-Induced Hydrodynamics Water-Saturated Biotissues. 1. Generation of Bubbles in Liquid // Laser Physics. — 2010. — V. 20. — №7. —p.1641-1647.

## Effect of hydrodynamic processes and low-intensity radiation with wavelengths 0,63 $\mu\text{m}$ and 7,1 mm on the proliferative activity of bone marrow stromal stem cells *in vitro*

R.K Chailakhyan, V.I Yusupov, J.V. Gerasimov, P.A. Sobolev, A.H. Tambiev, N.N. Vorobieva, A.P. Sviridov, V.N.Bagratashvili

The effects of He-Ne laser and extremely high frequency (wavelength 7,1mm) radiations as well as of laser induced hydrodynamic processes on the proliferation of bone marrow stromal stem cells *in vitro* were studied. We have tested stem cells in states «normal» and «suppressed». Suppression of cells was realized by reduction of cow embryo serum concentration in a nutrient medium of cultivated cells. It is shown that applied physical impacts have minor effects on «normal» bone marrow stromal stem cells, but stimulate proliferation of «suppressed» cells.

**Key words:** stem cells, bone marrow stromal stem cells, laser radiation, extremely high frequency, laser induced hydrodynamical field