

АКТИВАЦИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ЛАЗЕРНЫМ И КВЧ-ИЗЛУЧЕНИЕМ И ИХ СОЧЕТАННЫМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ

DOI: 10.17691/stm2017.9.1.03
 УДК 576.314.6/7–072.8:615.849
 Поступила 29.09.2016 г.



Р.К. Чайлахян, д.м.н., старший научный сотрудник, зав. лабораторией стромальной регуляции иммунитета¹;
 Ю.В. Герасимов, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории стромальной регуляции иммунитета¹;
 В.И. Юсупов, к.ф.-м.н., старший научный сотрудник лаборатории лазерной химии²;
 А.П. Свиридов, д.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории лазерной химии²;
 А.Х. Тамбиев, д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник кафедры биоинженерии³;
 Н.Н. Воробьева, научный сотрудник лаборатории лазерной химии²;
 А.Г. Грошева, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории стромальной регуляции иммунитета¹;
 А.И. Куралесова, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории стромальной регуляции иммунитета¹;
 И.Л. Москвина, научный сотрудник лаборатории стромальной регуляции иммунитета¹;
 В.Н. Баграташвили, д.ф.-м.н., профессор, зав. отделом атомно-молекулярных технологий²;
 профессор кафедры физической химии³

¹Научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098, ул. Гамалеи, 16;

²Институт фотонных технологий, Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Троицк, 142190, ул. Пионерская, 2;

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Ленинские горы, 1/12

Цель исследования — изучение влияния лазерного и КВЧ-излучений и их сочетанного воздействия на пролиферативную активность мультипотентных стромальных клеток (МСК) костного мозга *in vitro* в состояниях, условно характеризующихся как «норма» и «ослабленное», а также способности этих факторов влиять на изменение содержания МСК в костном мозге при воздействии в условиях *in vivo* и *in vitro*.

Материалы и методы. Лазерное излучение низкой и умеренной интенсивности, акустические импульсы, генерируемые лазерным излучением в биоткани, и КВЧ-излучение использовали для моно- и сочетанного (примененного впервые) воздействий на МСК *in vivo* и *in vitro*. Кратковременный фрагментарный лазерный нагрев голени крыс *in vivo* применяли для повышения эффективности колониеобразования МСК. Стимуляцию пролиферативной активности и содержание МСК изучали на штаммах, полученных из костного мозга человека, кроликов, морских свинок и крыс.

Облучение штаммов МСК проводили в состоянии «норма», а также «ослабленные» со сниженной пролиферативной активностью за счет уменьшения эмбриональной сыворотки в питательной среде. Дозы воздействия варьировали путем изменения мощности и времени облучения.

Результаты. Наблюдали двукратное увеличение числа выросших колоний при лазерном нагреве костного мозга, а также выраженную стимуляцию эффективности колониеобразования, превышающую контрольные значения на 85%, при КВЧ-облучении костномозговой суспензии дозой 8 Дж/см².

Влияние физических факторов существенно зависит от состояния МСК: происходит значительное усиление пролиферативной активности клеток, находящихся в «ослабленном» состоянии. Акустические импульсы лазероиндуцированной гидродинамики вызывают статистически значимое ($p < 0,01$) усиление пролиферативной активности МСК человека — на 80% по отношению к контролю. Исследования сочетанных воздействий показали, что они не усиливают пролиферативную активность МСК человека по сравнению с моно-воздействием акустических импульсов лазероиндуцированной гидродинамики.

Заключение. Исследованные физические воздействия в условиях *in vivo* и *in vitro* увеличивают содержание МСК в исходном костном мозге, а также усиливают их пролиферативную активность в процессе развития штаммов этих клеток *in vitro*. Применение данных методов в клинике позволит получать необходимое для обратной трансплантации число клеток на более ранних пассажах и тем самым избежать возникновения хромосомных aberrаций в культурах МСК.

Ключевые слова: мультипотентные стромальные клетки; пролиферативная активность стромальных клеток; эффективность колониеобразования; лазерное излучение; КВЧ-излучение; акустические импульсы лазероиндуцированной гидродинамики.

Как цитировать: Chailakhyan R.K., Gerasimov Yu.V., Yusupov V.I., Sviridov A.P., Tambiev A.Kh., Vorobieva N.N., Grosheva A.G., Kuralesova A.I., Moskvina I.L., Bagratashvili V.N. Activation of bone marrow multipotent stromal cells by laser and EHF radiation and their combined impacts. *Sovremennyye tehnologii v medicine* 2017; 9(1): 28–37, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.1.03>

Для контактов: Воробьева Наталия Николаевна, e-mail: natalie.vorobieva@gmail.com

English

Activation of Bone Marrow Multipotent Stromal Cells by Laser and EHF Radiation and Their Combined Impacts

R.K. Chailakhyan, MD, DSc, Senior Researcher, Head of the Laboratory of Stromal Immunity Regulation¹;
 Yu.V. Gerasimov, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Stromal Immunity Regulation¹;
 V.I. Yusupov, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Laser Chemistry²;
 A.P. Sviridov, DSc, Leading Researcher, Laboratory of Laser Chemistry²;
 A.Kh. Tambiev, DSc, Professor, Leading Researcher, Department of Bioengineering³;
 N.N. Vorobieva, Researcher, Laboratory of Laser Chemistry²;
 A.G. Grosheva, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Stromal Immunity Regulation¹;
 A.I. Kuralesova, DSc, Leading Researcher, Laboratory of Stromal Immunity Regulation¹;
 I.L. Moskvina, Researcher, Laboratory of Stromal Immunity Regulation¹;
 V.N. Bagratashvili, DSc, Professor, Head of the Unit of Laser Atomic and Molecular Nanotechnologies²;
 Professor, Department of Physical Chemistry³

¹Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Ministry of Health of the Russian Federation, 16 Gamaleya St., Moscow, 123098, Russian Federation;

²Institute of Photonic Technologies, Federal Scientific Research Centre "Crystallography and Photonics" of the Russian Academy of Sciences, 2 Pionerskaya St., Moscow, Troitsk, 142190, Russian Federation;

³Lomonosov Moscow State University, 1/12 Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russian Federation

The aim of the investigation was to study the effect of laser and extremely high frequency (EHF) radiation on the proliferative activity of bone marrow multipotent stromal cells (MSCs) in "normal" and "suppressed" states *in vitro*, as well as the ability of these factors to influence the content of MSCs in the bone marrow *in vivo* and *in vitro*.

Materials and Methods. Laser radiation of low and moderate intensity, acoustic pulses generated by laser radiation in biological tissue, and EHF radiation have been used for mono and combined (applied for the first time) impacts on MSCs *in vivo* and *in vitro*. Short-term fragmentary laser heating of rat shins *in vivo* has been used to stimulate the colony-forming efficiency of MSCs. Stimulation of proliferative activity and MSCs content were studied on the strains derived from human bone marrow, rabbits, guinea pigs and rats.

Irradiation of MSCs strains was performed in the "normal" state, as well as in the "suppressed" strains with the decreased proliferative activity induced by the reduction of fetal serum concentration in the nutrient medium of the cultivated cells. Exposure doses were varied by altering the power and time of irradiation.

Results. A twofold increase of colony number was observed when the bone marrow was heated by a laser irradiation, and a marked stimulation of colony-forming efficiency exceeding the reference values by 85% under EHF radiation of bone marrow suspension with the dose of 8 J/cm² was also noted.

The effect of physical factors greatly depends on the MSCs state: there is a significant enhancement of proliferative activity of the cells being in the "suppressed" state. Acoustic pulses of laser-induced hydrodynamics cause a statistically significant ($p < 0.01$) increase of proliferative activity of human MSCs (by 80% relative to the control). The proliferative activity of human MSCs was not enhanced under combined impacts compared to the exposure to mono acoustic pulses of laser-induced hydrodynamics.

Conclusion. The studied physical effects *in vivo* and *in vitro* increase the content of MSCs in the initial bone marrow, as well as their proliferative activity in the process of MSCs strains development *in vitro*. Application of these techniques in clinic will make it possible to obtain the necessary cell number at earlier passages for autologous MSCs transplantation preventing thereby chromosomal aberrations in MSCs cultures.

Key words: multipotent stromal cells; proliferation activity of stromal cells; colony-forming efficiency; laser radiation; EHF radiation; acoustic pulses of laser-induced hydrodynamics.

В конце 60-х гг. прошлого столетия в НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи была открыта уникальная категория стромальных клеток-предшественников [1], которые при последующих исследованиях были охарактеризованы как стволовые клетки стромы костного мозга или мультимипотентные стромальные клетки (МСК) [2]. Стромальный компонент костного мозга пред-

ставлен различными типами клеток. Главным клеточным типом стромы костного мозга являются ретикулярные клетки, а также эндотелиальные клетки, адвентиция крупных сосудов и т.д. При эксплантации костного мозга в монослойные культуры именно ретикулярные клетки, прикрепляясь ко дну культурального флакона, приобретают морфологию

фибробластов и формируют колонии-клоны, состоящие из нескольких тысяч фибробластов (рис. 1). Полученные доказательства клональной природы колоний [1] позволили определить содержание этих клеток в органах кроветворения и иммунитета, изучить изменение их численности при различных патологических состояниях организма или воздействии на организм (травма, облучение и т.д.).

Интерес к изучению свойств и потенциальных возможностей МСК обусловлен широким терапевтическим потенциалом этих клеток, открывающим большие перспективы их использования в различных областях регенеративной медицины [3, 4]. В настоящее время они успешно используются в травматологии и ортопедии, челюстно-лицевой хирургии, стоматологии с целью восстановления костной ткани, гиалинового хряща суставов, сухожильно-связочного аппарата и других тканей [5, 6]. МСК и их потомки обладают огромным пролиферативным потенциалом [7, 8].

В работе [9] показано, что на первых пассажах нарушений хромосомного набора в препаратах МСК не происходит, в то время как на более высоких пассажах выявляются определенные нарушения — клетки с измененным кариотипом, полиплоидия и т. д. Поэтому возможности эффективного наращивания МСК, выделенных из донорского костного мозга, и последующая трансплантация этих клеток в организм на ранних пассажах вызывают чрезвычайный интерес. В связи с этим разработка методов активации пролиферативного и дифференцировочного потенциалов клеток для ускорения формирования и регенерации тканей является одной из ключевых задач тканевой инженерии. С этой целью традиционно используются различные факторы роста и цитокины, ускоряющие пролиферацию и метаболизм клеток. В последнее время развиваются и иные подходы, заключающиеся в воздействии на ткани и клеточные культуры различными физическими факторами, способными стимулировать функциональную активность клеток. Для этого, в частности, используют лазерное излучение видимого и

ближнего ИК-диапазонов [10–12], КВЧ-излучение [13–17], процессы лазериндуцированной гидродинамики (ЛИГ), генерирующие специфические акустические импульсы (АИ) [18, 19].

Интерес к изучению влияния процессов ЛИГ на биологические объекты связан с появлением в последнее время новых технологий лечения различных заболеваний, таких как остеомиелит [19, 20], остеохондроз [21–23] и др., основанных на формировании каналов в биоткани при продвижении торца оптического волокна, разогретого лазерным излучением. При этом в биоткани индуцируются различные гидродинамические процессы, в частности происходит генерация специфических АИ в диапазоне 0,1–2,0 кГц [19, 24, 25]. Есть основания полагать, что лечебное действие связано с этими АИ и обусловлено в основном низкочастотными механическими колебаниями ткани (эффекты механобиологии) [26].

Известно, что действие КВЧ-излучения на различные организмы проявляется лишь на определенных частотах, считающихся активными, при этом результирующие эффекты могут обладать кумулятивностью [17]. В медицинской практике обычно используется КВЧ-излучение с длиной волны 7,1 мм.

Сочетанные воздействия физических факторов на клетки и организмы могут приводить к синергетическим или антагонистическим эффектам [27, 28]. Это зависит от параметров воздействия, их последовательности, промежутков между ними и от состояния объекта. До сих пор исследования комбинированных воздействий на стволовые клетки не проводились, несмотря на интерес к подобным работам. В настоящей работе предпринята попытка исследования комбинации акустических импульсов и КВЧ-излучения. Оба этих фактора можно отнести к категории низкоинтенсивных нетепловых воздействий.

Очевидно, что эксплантация костного мозга в культуру ткани нарушает микроокружение МСК. Перенос этих клеток из своей естественной ниши, поддерживающей их стволовую статус, в новую нишу, например

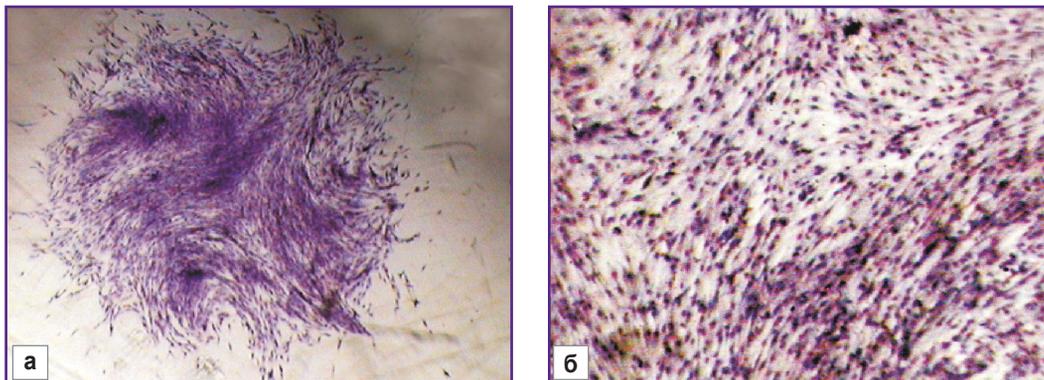


Рис. 1. Микрофотографии колонии мультипотентных стромальных клеток костного мозга: а — колония-клон, сформированная мультипотентными стромальными клетками; $\times 10$; б — структура колонии мультипотентных стромальных клеток, $\times 50$

в тканеинженерную конструкцию, может привести к изменению их статуса. Как следствие, может иметь место «ослабление» МСК, нежелательное изменение их пролиферативного и дифференцировочного потенциалов. Данный факт обуславливает актуальность исследований по воздействию различных физических факторов как на «нормальные», так и на «ослабленные» МСК.

Цель исследования — изучение влияния лазерного излучения низкой и умеренной интенсивности, акустических импульсов, генерируемых лазерным излучением, КВЧ-излучения и их комбинаций на изменение пролиферативной активности мультипотентных стромальных клеток *in vitro* в состояниях, условно характеризующихся как «норма» и «ослабленное», а также оценка способности этих факторов увеличивать содержание МСК в костном мозге при воздействии в условиях *in vivo* и *in vitro*.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись МСК костного мозга человека, кролика, морской свинки и крысы.

Этические принципы. Все экспериментальные операции выполнялись под наркозом с использованием разрешенных в ветеринарии препаратов (Золетил и Рометар) и соблюдением всех правил асептики и антисептики. В ходе манипуляций руководствовались правилами гуманного обращения с животными в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.). Работа была одобрена Этическим комитетом Научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Животных выводили из эксперимента передозировкой наркотика.

Получение штаммов МСК костного мозга человека. Костный мозг человека получали из клиники ЦНИИ стоматологии и челюстно-лицевой хирургии МЗ РФ при информированном согласии пациентов. Полученный трепанат костного мозга человека переносили во флакон со свежей питательной средой, шприцем готовили одноклеточную суспензию, фильтровали через четырехслойный капроновый фильтр и подсчитывали общее количество клеток. Клетки эксплантировали в пластиковые флаконы (Nunc 80 см², Nunc, Дания), содержащие 15 мл полной культуральной среды альфа-МЕМ (Sigma-Aldrich, США), 20% сыворотки эмбрионов коров (СЭК) (HyClone, США), и антибиотики из расчета $(3,5-4,0) \cdot 10^4$ клеток на 1 см² площади дна флакона. Культивирование выполняли при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. На 12–14-е сутки, когда во флаконах формировались дискретные колонии стромальных фибробластов, проводили 1-й пассаж, используя стандартные методы [7]. По дости-

жении клетками конфлюэнтного слоя проводили следующий пассаж.

Получение штаммов костного мозга кроликов и морской свинки. Под местным обезболиванием 0,5% раствором новокаина, в условиях асептики, удаляли крыло тазовой кости кролика и помещали в чашку Петри. В боксе крыло расщепляли скальпелем, костный мозг высребали и переносили во флакон с питательной средой. Морских свинок и крыс усыпляли эфиром, с соблюдением асептики выделяли бедренные кости, обрезали концы и шприцем вымывали костный мозг в питательную среду. Дальнейшие действия были аналогичны процедурам при получении штаммов МСК костного мозга человека.

Получение штаммов МСК в измененном «ослабленном» состоянии. Колонии фибробластов, сформированные к 12–14-му дню после эксплантации костного мозга человека или кролика, подвергали пассированию в оптимальных условиях культивирования — в среде, состоящей из 80% среды альфа-МЕМ, 20% СЭК и антибиотиков. При следующем пассаже снятые клетки разделяли на две части и эксплантировали в культуральные флаконы с питательной средой различного состава. В первом случае культуральная среда состояла из 80% среды альфа-МЕМ и 20% СЭК и обозначалась нами как «норма», во втором — из 97% среды альфа-МЕМ и 3% СЭК и обозначалась как «ослабленная». В дальнейшем эти культуры вели параллельно до IV–VI пассажей. Такое значительное уменьшение СЭК приводило к стабильному снижению (примерно в 3 раза) пролиферации клеток. Перед облучением МСК низкоинтенсивными полями культуры обрабатывали 0,25% трипсином и снимали с «пластика». Суспензии МСК объемом 3 мл, содержащие $3,0 \cdot 10^5$ клеток, разливали в пластиковые пробирки диаметром 15 мм. Воздействие проводили либо на суспензию клеток, либо на осажденные клетки.

Исследование стимуляции пролиферации МСК после воздействия. МСК из каждой пробирки с облученными клетками и из пробирок с контролем эксплантировали в три культуральных флакона площадью 25 см² по $1 \cdot 10^5$ клеток в каждый, потом выращивали в инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 5 дней. По завершении культивирования клетки снимали с «пластика» и подсчитывали число выросших клеток.

Исследование содержания МСК в костном мозге крыс после воздействия. Животных выводили из эксперимента на 3-й день, выделяли большеберцовые кости, подвергшиеся облучению, и контралатеральные необлученные голени, которые использовали в качестве контроля. В каждой серии опытов готовили общую для 3 крыс суспензию клеток костного мозга. Аналогичным образом готовили суспензию клеток костного мозга контралатеральных голеней тех же крыс. В культуральные флаконы площадью 25 см², содержащие 5 мл полной культуральной среды с анти-

биотиками, эксплантировали по $5 \cdot 10^5$ костномозговых клеток в каждый и помещали в инкубатор. По завершении культивирования, на 12–14-й день, флаконы дважды промывали физиологическим раствором, фиксировали 70° этанолом в течение 30–45 мин, окрашивали по Гимзе и под бинокулярной лупой подсчитывали число выросших колоний.

Фрагментарное тепловое лазерное воздействие на клетки костного мозга *in vivo*. Исследования проводили на самцах крыс породы Wistar массой 100–120 г. Под эфирным наркозом стерильно обнажали большеберцовую кость. Через кость в 10 точках ее верхней трети проводили локальное облучение костного мозга. Точки воздействия располагали на расстоянии 1 мм друг от друга по двум параллельным линиям, расположенным вдоль оси верхней части кости. Облучение кости осуществляли контактно посредством оптического волокна диаметром 0,6 мм. Для этого использовали волоконный лазер с длиной волны 1,56 мкм отечественного производства («ИРЭ-Полюс», Россия). Длительность лазерного импульса при воздействии на каждую точку составляла 0,5 с. Таким образом осуществляли фрагментарное воздействие — вокруг областей лазерного нагрева оставалась интактная ткань.

Животные были разделены на 4 группы в соответствии с 4 дозами облучения — по 3 крысы на каждую дозу. Мощность лазерного излучения составляла 0,1; 0,2; 0,6 и 1,2 Вт. Всего было проведено 5 серий экспериментов. Измеряемым параметром являлась колониеобразующая активность МСК, т.е. отношение числа колоний, выросших из суспензий облученного и необлученного костного мозга, к числу эксплантированных клеток.

Температурное поле, формируемое в костном мозге, измеряли с помощью термпар в условиях моделирующих эксперименты *in vivo*.

Факторы низкоинтенсивного физического действия на МСК костного мозга

1. **Излучение He-Ne лазера.** Использовали серийный аппарат ЛГН-213-1 (Россия) с длиной волны излучения 0,63 мкм и мощностью 0,8 мВт. Пробирку с суспензией МСК объемом 3 мл располагали в расходящемся лазерном пучке с плотностью мощности 0,4 мВт/см² и экспонировали в течение 60 с. Мощность лазерного излучения контролировали с помощью измерителя мощности Field Master с измерительной головкой LM-2VIS (Coherent, США).

2. **Акустические импульсы процессов лазероиндуцированной гидродинамики** генерировали с помощью специально разработанного аппарата АЛИГ. Первоначально в блок памяти аппарата записывали акустический сигнал, генерируемый при продвижении оптического волокна с лазерным излучением 0,97 мкм вдоль костномозгового канала берцовой кости теленка. Мощность излучения составляла 5 Вт, а на торец волокна было предварительно нанесено поглощающее покрытие [19]. Пробирку с суспензией

или осажденными МСК устанавливали в наполненную водой кювету аппарата. Записанный в блок памяти аппарата и усиленный сигнал возбуждал в воде АИ с помощью пьезокерамического преобразователя. Экспонирование МСК составляло 50 с.

3. **КВЧ-излучение.** Использовали аппарат «Аква-стин» («ИРЭ-Полюс», Россия) с длиной волны 7,1 мм и плотностью мощности на выходах излучателя, рупорной и стержневой антенн 5; 0,5 и 3 мВт/см² соответственно. Пробирки с осажденными МСК устанавливали на излучающем торце головки аппарата, время воздействия составляло 30 с.

При исследовании влияния КВЧ-излучения на эффективность колониеобразования МСК *in vitro* костномозговую суспензию готовили обычным способом. Стержневую антенну КВЧ-излучателя устанавливали над суспензией, которая перемещивалась с помощью магнитной мешалки. Время воздействия составляло 15, 45 и 90 мин. Через 15 мин КВЧ-воздействие прекращали, отбирали необходимое для эксплантации число клеток и продолжали воздействие. Таким же образом поступали через 45 и 90 мин. В пластиковые флаконы с полной культуральной средой площадью 25 см² засеивали по $5 \cdot 10^5$ клеток и культивировали в обычном режиме 12–14 дней.

Влияние КВЧ-излучения на пролиферативную активность МСК костного мозга морской свинки изучали, воздействуя на клетки с помощью рупорной антенны. В каждую лунку 6-луночного планшета засеивали $5 \cdot 10^4$ клеток штаммов МСК костного мозга и перед началом облучения давали им адгезироваться к пластику в течение 60 мин. Антенну КВЧ-аппарата подносили либо сверху, облучая МСК через миллиметровый слой культуральной среды, либо снизу, приставляя ее непосредственно к пластику. В первом случае КВЧ-излучение значительно ослаблялось из-за поглощения культуральной средой. Во втором случае излучение практически без потерь достигало МСК, поскольку в пластике поглощение КВЧ-излучения незначительно. Диаметр рупорной антенны полностью соответствовал диаметру лунки с клетками. Облучение проводили в течение 0,5; 1; 3 и 9 мин. Контролем служили лунки с таким же числом эксплантированных клеток, не подвергавшиеся облучению. На 4-й день после облучения культивирование прекращали. Выросшие клетки обычным методом снимали с пластика и подсчитывали их численность.

Сочетанные воздействия. Эксперименты проводили в разных последовательностях: АИ + КВЧ, КВЧ + АИ. В первом случае воздействовали АИ аппарата АЛИГ в течение 50 с и затем через интервал 60 с — КВЧ-излучением в течение 30 с. Во втором случае воздействия проводили в обратном порядке.

Статистическая обработка данных. Существование различий между отдельными выборками проверяли с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни (ANOVA). По результатам измерений вычислялись средние значения и стан-

дартные отклонения. В некоторых случаях для наглядности на гистограммах представляли относительные величины, когда средние результаты по облученным клеткам нормировали на средние значения для соответствующих контрольных экспериментов с учетом их ошибок.

Результаты и обсуждение. Динамика роста температуры в костном мозге, представленная для двух различных мощностей лазера (рис. 2, а), демонстрирует, что в течение лазерного импульса происходит монотонный нагрев ткани и постепенное ее охлаждение до исходной температуры после окончания лазерного импульса. При увеличении лазерной мощности от 0,2 до 0,6 Вт максимальный нагрев костномозговой ткани монотонно возрастает соответственно от 17 до 42°C.

Зависимость относительного изменения числа колоний МСК в костном мозге голени крыс от мощности лазерного излучения при фрагментарном тепловом лазерном воздействии представлена на рис. 2, б.

В образцах, обработанных лазерным излучением с мощностью 0,1 Вт, число выросших *in vitro* колоний не изменяется. При мощности 0,2 Вт наблюдается почти двукратное увеличение числа колоний ($p < 0,01$), что свидетельствует о существенном повышении числа колониеобразующих клеток по сравнению с контрольными образцами. Этот эффект уменьшается с повышением мощности до 0,6 Вт, а при мощности 1,2 Вт отмечается небольшое подавление колониеобразования ($p < 0,2$).

Рост числа МСК в костном мозге при кратковременном фрагментарном лазерном нагреве до ~60°C (при мощности 0,6 Вт и времени нагрева ~2 с), скорее всего, вызван их стимуляцией, направленной на восстановление частично нарушенного гомеостаза. При облучении с мощностью 1 Вт в течение 5 с температура ткани увеличивается до ~100°C, увеличивается также и объем перегретой ткани. Столь значительный рост температуры и объема перегретой ткани, очевидно, вызывает существенно большие повреждения костного мозга. В таких условиях клетки, оставшиеся интактными при локальном нагреве, уже не способны восстановить гомеостаз и число МСК уменьшается. В этом проявляется механизм гормезиса, имеющий достаточно универсальный характер, который, по нашему мнению, реализуется в условиях данного эксперимента.

Повышение эффективности колониеобразования МСК костного мозга отмечено также при воздействии КВЧ-излучения на суспензию костномозговых клеток крыс с помощью стержневой антенны (рис. 3). Облучение дозой 8 Дж/см² в течение 15 мин не вызвало стимуляции эффективности колониеобразования клеток, в течение 45 мин — приводило к выраженной

стимуляции эффективности колониеобразования, превышающей контрольные значения на 85%, а в течение 90 мин — уже к ее значительному ингибированию.

Результаты исследований по воздействию низкоинтенсивного лазерного излучения, КВЧ-излучения, а также АИ процессов ЛИГ на пролиферацию МСК костного мозга человека в состояниях «норма» и «ослабленное» (рис. 4, 5) показывают, что средние значения количества МСК после воздействия различных физических факторов практически для всех экспериментов выше контрольных. При этом значительные статистически значимые ($p < 0,01$) отличия от контроля зарегистрированы при воздействии на «ослабленные» клетки с помощью АИ и КВЧ-излучения. Пролиферативная активность «ослабленных» МСК после воздействия на них АИ в течение 60 с (см. рис. 4) и КВЧ-излучения в течение 10 с (см. рис. 5) возросла на 30%. Увеличение времени воздействия КВЧ-излучения до 30 с вызвало усиление пролиферативной активности МСК по сравнению с контролем до 40%, а увеличение времени до 60 с привело к нивелированию позитивного эффекта.

Результаты наших исследований показывают, что

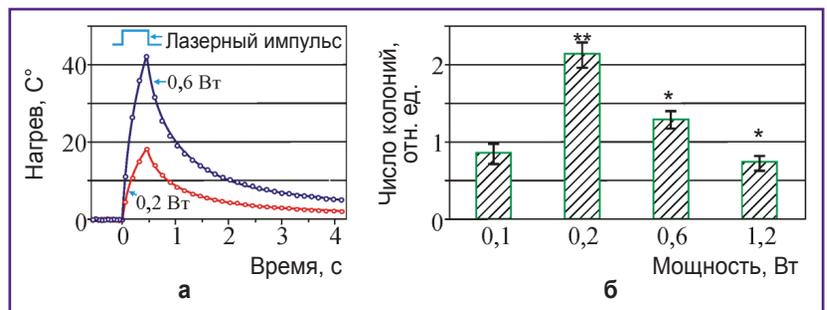


Рис. 2. Влияние кратковременного теплового лазерного воздействия на эффективность колониеобразования мультипотентных стромальных клеток в костном мозге голени крыс: а — динамика изменения температуры костного мозга под действием лазерного импульса длительностью 0,5 с при различных мощностях лазерного излучения; б — относительное изменение числа колоний мультипотентных стромальных клеток в зависимости от мощности лазерного излучения при фрагментарном тепловом воздействии. Значение 1 на оси ординат соответствует контролю; статистически значимое отличие от контроля: * — $p < 0,2$; ** — $p < 0,01$

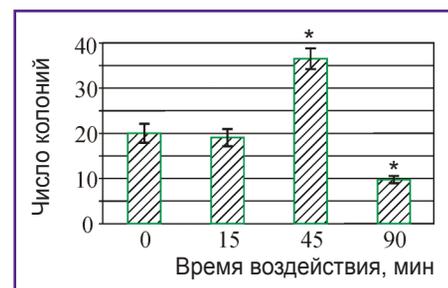


Рис. 3. Численность колоний мультипотентных стромальных клеток во взвеси костного мозга крысы в зависимости от времени КВЧ-облучения; * — статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,01$

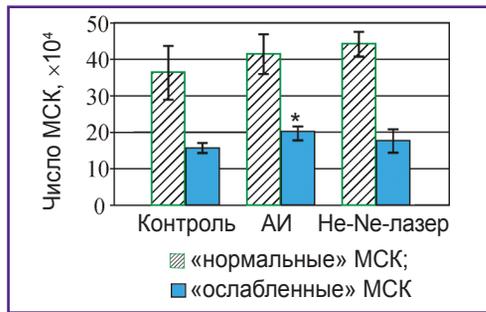


Рис. 4. Пролiferация «нормальных» и «ослабленных» мультипотентных стромальных клеток (МСК) человека после воздействия акустическими импульсами (АИ) или излучением He-Ne-лазера; * — статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,01$

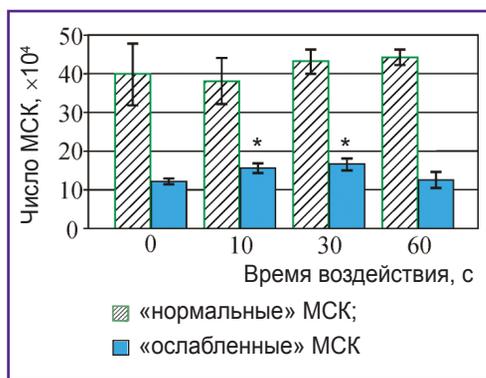


Рис. 5. Пролiferация «нормальных» и «ослабленных» мультипотентных стромальных клеток (МСК) человека после КВЧ-облучения при различных временах воздействия; * — статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,01$

эффект воздействия различных низкоинтенсивных физических факторов (лазерного излучения низкой интенсивности, КВЧ-излучения, АИ процессов ЛИГ) существенно зависит от состояния самих клеток. Физические воздействия практически не влияют на МСК в состоянии «норма», но увеличивают пролифе-

ративную активность клеток, находящихся в «ослабленном» состоянии.

Воздействия КВЧ-излучения и АИ, в том числе и сочетанные, на МСК кролика не привели к усилению пролиферативной активности клеток при уровне значимости $p < 0,05$ (рис. 6). Более того, наблюдалась тенденция к торможению роста числа МСК при использовании этих физических факторов, за исключением сочетанного воздействия в последовательности КВЧ-излучение + АИ.

Однако для МСК человека во всех случаях, когда использовались АИ, происходило статистически значимое ($p < 0,01$) усиление на 80% пролиферативной активности клеток по отношению к контролю. Полученный результат, связанный с позитивным воздействием специфических АИ ЛИГ-процессов на МСК человека, является для нас ожидаемым. ЛИГ-процессы служат основным терапевтическим фактором при воздействии лазерного излучения умеренной мощности на биоткань. Мы полагаем, что именно АИ, сопровождающие ЛИГ-процессы, запускают регенерацию ткани по механизму механо-биологии.

Исследования сочетанных воздействий АИ и КВЧ-излучения показали, что они не приводят к усилению пролиферативной активности МСК человека по сравнению с моновоздействием АИ (см. рис. 6). Более того, если в последовательности АИ + КВЧ-излучение сочетанное воздействие не приводит к значимому изменению скорости пролиферации МСК по сравнению с моновоздействием АИ, то в противоположной последовательности КВЧ-излучение + АИ такое воздействие существенно (на 20%) уменьшает скорость пролиферации. Последнее указывает на антагонистичность используемой дозы КВЧ-излучения и акустического сигнала.

КВЧ-облучение адгезированных клеток с помощью рупорной антенны излучателя показало, что их прирост практически не зависит от положения рупора антенны. Наибольший прирост клеток (с увеличением ~2,3 раза) был отмечен в лунках, облученных в течение 0,5 мин. Пролiferативная активность МСК при

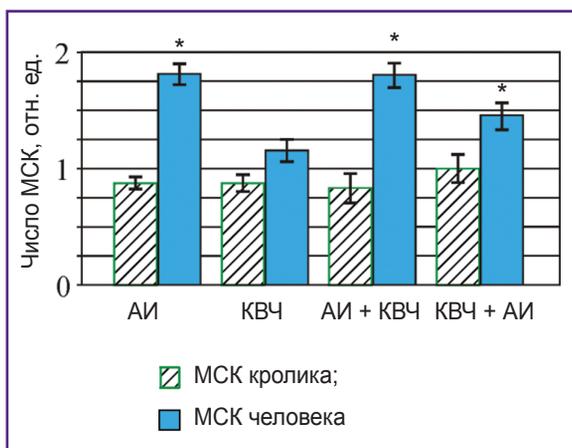
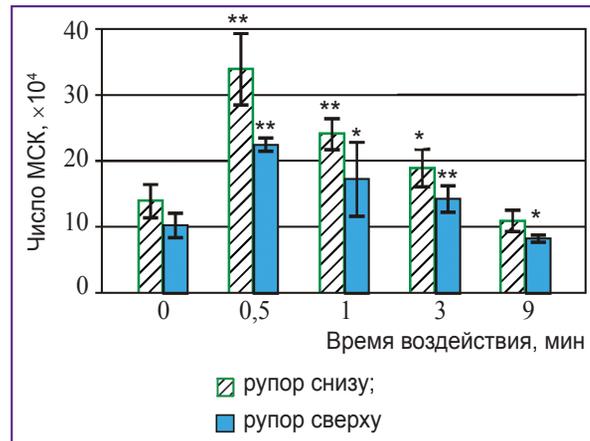


Рис. 6. Пролiferация мультипотентных стромальных клеток (МСК) кролика и человека после воздействия различных физических факторов: акустических импульсов (АИ) и КВЧ-излучения (КВЧ). По оси ординат показаны нормированные на контроль значения; * — статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,01$

Рис. 7. Пролиферация мультипотентных стромальных клеток (МСК) костного мозга морской свинки после КВЧ-облучения при различных временах воздействия и разном положении рупора антенны излучателя; статистически значимое отличие от контроля: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$



облучении 1 и 3 мин была ниже и превысила контрольные значения в 1,7 и 1,3 раза, при 9-минутном облучении отмечалось угнетение клеточного роста (рис. 7).

Заключение. Использование методов физического воздействия (лазерного излучения низкой и умеренной интенсивности, акустических импульсов, генерируемых лазерным излучением, и КВЧ-излучения) в условиях *in vitro* и *in vivo* увеличивает содержание мультипотентных стромальных клеток в исходном костном мозге, а также усиливает их пролиферативную активность в процессе развития штаммов клеток *in vitro*. Применение этих методов в клинике позволит на более ранних пассажах получать необходимое для обратной трансплантации число клеток и тем самым избежать возникновения хромосомных aberrаций в культурах клеток.

Финансирование исследования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда: в части изучения увеличения содержания МСК в костном мозге (грант 16-15-00042), а также в части исследования стимуляции пролиферативной активности клеток (проект №14-25-00055) при воздействии физических факторов.

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература/References

1. Чайлахян Р.К., Лалыкина К.С. Спонтанная и индуцированная дифференцировка костной ткани в популяции фибробластоподобных клеток, полученных из длительных монослойных культур костного мозга и селезенки. Доклады АН СССР 1969; 187(2): 473–479. Chailakhyan R.K., Lalykina K.S. Spontaneous and induced differentiation of bone tissue in population of fibroblast-like cells derived from prolonged monolayer cultures of bone marrow and spleen. *Doklady AN SSSR* 1969; 187(2): 473–479.
2. Friedensteyn A.J., Chailakhyan R.K., Gerasimov U.V. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 1987; 20(3): 263–272, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1987.tb01309.x>.
3. Ng T.K., Fortino V.R., Pelaez D., Cheung H.S. Progress

of mesenchymal stem cell therapy for neural and retinal diseases. *World J Stem Cells* 2014; 6(2): 111–119, <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i2.111>.

4. Chen S.L., Fang W.W., Ye F., Liu Y.H., Qian J., Shan S.J., Zhang J.J., Chunhua R.Z., Liao L.M., Lin S., Sun J.P. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004; 94(1): 92–95, <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2004.03.034>.

5. Осемян И.А., Чайлахян Р.К., Гарибян Э.С., Айвазян В.П. Лечение несросшихся переломов ложных суставов и дефектов длинных костей трансплантацией аутологичных костномозговых фибробластов, выращенных *in vitro* и имплантированных в АГМ. Ортопедия, травматология и протезирование 1987; 9: 96–98. Osepyan I.A., Chailakhyan R.K., Garibyan E.S., Ayvazyan V.P. Treatment of nonunion fractures of false joints and long bone defects by transplantation of autologous bone marrow fibroblasts cultured *in vitro* and implanted into ASM. *Ortopediya, travmatologiya i protezirovaniye* 1987; 9: 96–98.

6. Wakitani S., Imoto K., Yamamoto T., Saito M., Murata N., Yoneda M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10(3): 199–206, <https://doi.org/10.1053/joca.2001.0504>.

7. Chailakhyan R.K., Gerasimov Y.V., Fridenshteyn A.Y. Number of osteogenic precursor cells in bone marrow and their multiplication in culture. *Bull Exp Biol Med* 1984; 98(5): 1570–1573, <https://doi.org/10.1007/bf00800038>.

8. Chailakhyan R.K., Gerasimov Y.V., Kuralesova A.I., Latsinik N.V., Genkina E.N., Chailakhyan M.R. Proliferative and differentiation potential of individual clones derived from bone marrow stromal precursor cells. *Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences* 2001; 28(6): 575–584, <https://doi.org/10.1023/a:1012316218732>.

9. Бочков Н.П., Никитина В.А. Цитогенетика стволовых клеток человека. Молекулярная медицина 2008; 3: 40–47. Bochkov N.P., Nikitina V.A. Cytogenetics of human stem cells. *Molekulyarnaya meditsina* 2008; 3: 40–47.

10. Tuby H., Maltz L., Oron U. Low-level laser irradiation (LLL) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg Med* 2007; 39(4): 373–378, <https://doi.org/10.1002/lsm.20492>.

11. Eduardo F. de P., Bueno D.F., de Freitas P.M.,

Marques M.M., Passos-Bueno M.R., Eduardo Cde P., Zatz M. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers Surg Med* 2008; 40(6): 433–438, <https://doi.org/10.1002/lsm.20646>.

12. Чайлахян Р.К., Герасимов Ю.В., Свиридов А.П., Кондюрин А.В., Тамбиев А.Х., Баграташвили В.Н. Действие ИК лазерного излучения на мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга крыс *in vivo*. Российский иммунологический журнал 2009; 3(3–4(12)): 333–337. Chailahyan R.K., Gerasimov Ju.V., Sviridov A.P., Kondjurin A.V., Tambiev A.H., Bagratishvili V.N. Effect of IR laser radiation on the multipotent mesenchymal stromal stem cells of rat marrow *in vivo*. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal* 2009; 3(3–4(12)): 333–337.

13. Чайлахян Р.К., Юсупов В.И., Герасимов Ю.В., Соболев П.А., Тамбиев А.Х., Воробьева Н.Н., Свиридов А.П., Баграташвили В.Н. 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*. Биомедицина 2011; 1(2): 24–29. Chailakhyan R.K., Yusupov V.I., Gerasimov J.V., Sobolev P.A., Tambiev A.H., Vorobieva N.N., Sviridov A.P., Bagratashvili V.N. Effect of hydrodynamic processes and low-intensity radiation with wavelengths 0.63 μm and 7.1 mm on the proliferative activity of bone marrow stromal stem cells *in vitro*. *Biomeditsina* 2011; 1(2): 24–29.

14. Чайлахян Р.К., Юсупов В.И., Свиридов А.П., Герасимов Ю.В., Тамбиев А.Х., Воробьева Н.Н., Куралесова А.И., Москвина И.Л., Баграташвили В.Н. Акустическое и КВЧ-воздействия на стволовые стромальные клетки костного мозга *in vitro*. Биомедицинская радиоэлектроника 2013; (2): 36–42. Chailakhyan R.K., Yusupov V.I., Sviridov A.P., Gerasimov Y.V., Tambiev A.Ch., Vorobieva N.N., Kuralesova A.I., Moskvina I.L., Bagratashvili V.N. Acoustic and EHF impact on bone marrow stromal stem cells *in vitro*. *Biomeditsinskaya radioelektronika* 2013; (2): 36–42.

15. Тамбиев А.Х., Баграташвили В.Н., Герасимов Ю.В., Свиридов А.П., Чайлахян Р.К. Влияние КВЧ-излучения низкой интенсивности на пролиферацию *in vitro* мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга. В кн.: Труды XVI международной конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии». Гурзуф, Крым; 2008. Tambiev A.H., Bagratashvili V.N., Gerasimov Yu.V., Sviridov A.P., Chailakhyan R.K. Vliyaniye KVCh-izlucheniya nizkoy intensivnosti na proliferatsiyu *in vitro* multipotentnykh mezenkhimal'nykh stromal'nykh kletok kostnogo mozga. V kn.: *Trudy XVI mezhdunarodnoy konferentsii "Novye informatsionnye tekhnologii v meditsine biologii, farmakologii"* [Effect of low-intensity EHF radiation on *in vitro* proliferation of multipotent mesenchymal stromal cells of the bone marrow. In: Proceedings of XVI International Conference "New information technologies in medicine, biology, pharmacology"]. Gursuf, Krym; 2008.

16. Тамбиев А.Х., Баграташвили В.Н., Герасимов Ю.В., Свиридов А.П., Антонов Е.Н., Чайлахян Р.К. Действие электромагнитного излучения миллиметрового диапазона низкой интенсивности на стволовые стромальные клетки костного мозга. В кн.: Труды XV международной конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии». Гурзуф, Крым; 2007. Tambiev A.H., Bagratashvili V.N., Gerasimov Yu.V., Sviridov A.P., Antonov E.N., Chailakhyan R.K. Deystvie elektromagnitnogo

izlucheniya millimetrovogo diapazona nizkoy intensivnosti na stvolovye stromal'nye kletki kostnogo mozga. V kn.: *Trudy XV mezhdunarodnoy konferentsii "Novye informatsionnye tekhnologii v meditsine biologii, farmakologii"* [Effect of low-intensity millimeter-range electromagnetic radiation on the bone marrow stem stromal cells. In: Proceedings of XV International Conference "New information technologies in medicine, biology, pharmacology"]. Gursuf, Krym; 2007.

17. Тамбиев А.Х., Кирикова Н.Н., Бецкий О.В., Гуляев Ю.В. Миллиметровые волны и фотосинтезирующие организмы. М: Радиотехника; 2003; 175 с. Tambiev A.H., Kirikova N.N., Betskiy O.V., Gulyaev Yu.V. *Millimetrovye volny i fotosinteziruyushchie organizmy* [Millimeter waves and photosynthesizing organisms]. Moscow: Radiotekhnika; 2003; 175 p.

18. 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; 157 с. Chudnovskiy V.M., Leonova G.N., Skopinov S.A., Drozdov A.L., Yusupov V.I. *Biologicheskie modeli i fizicheskie mekhanizmy lazernoy terapii* [Biological models and physical mechanisms of laser therapy]. Vladivostok: Dal'nauka; 2002; 157 p.

19. Чудновский В., Буланов В., Юсупов В. Лазерное индуцирование акустогидродинамических эффектов в хирургии. Фотоника 2010; 1: 30–36. Chudnovskiy V., Bulanov V., Jusupov V. Laser induction of acoustic hydrodynamical effects in medicine. *Fotonika* 2010; 1: 30–36.

20. Крочек И.В., Привалов В.А., Лаппа А.В., Евневич М.В., Минаев В.П. Лазерная остеоперфорация в лечении острого и хронического остеомиелита. Челябинск: ЧГМА, ЧГУ; 2004. Krochek I.V., Privalov V.A., Lappa A.V., Evnevich M.V., Minaev V.P. *Lazernaya osteoperforatsiya v lechenii ostrogo i khronicheskogo osteomyelita* [Laser osteoperforation in managing acute and chronic osteomyelitis]. Chelyabinsk: ChGMA, ChGU; 2004.

21. Чудновский В.М., Буланов В.А., Юсупов В.И., Корсков И.В., Косарева О.В., Тимошенко В.С. Экспериментальное обоснование лазерного пункционного лечения остеохондроза позвоночника. Лазерная медицина 2010; 14(1): 30–35. Chudnovskiy V.M., Bulanov V.A., Yusupov V.I., Korskov I.V., Kosareva O.V., Timoshenko V.S. Experimental backrounding for laser puncture treatment of spinal osteochondrosis. *Lazernaya meditsina* 2010; 14(1): 30–35.

22. Чудновский В.И., Юсупов В.И. Метод лазерного интервенционного воздействия при остеохондрозе. Патент РФ 2321373. 2008. Chudnovskiy V.I., Yusupov V.I. *Metod lazernogo interventsionnogo vozdeystviya pri osteokhondroze* [Method of laser interventional impact in osteochondrosis]. Patent RF 2321373. 2008.

23. Сандлер Б.И., Суляндзига Л.Н., Чудновский В.М., Юсупов В.И., Косарева О.В., Тимошенко В.С. Перспективы лечения дискогенных компрессионных форм пояснично-крестцовых радикулитов с помощью пункционных неэндоскопических лазерных операций. Владивосток: Дальнаука; 2004; 181 с. Sandler B.I., Sulyandziga L.N., Chudnovskiy V.M., Yusupov V.I., Kosareva O.V., Timoshenko V.S. *Perspektivy lecheniya diskogennykh kompressionnykh form poyasnichno-kresttsovykh radikulitov s pomoshch'yu punkttsionnykh neendoskopicheskikh lazernykh operatsiy* [Perspectives of treating discogenic compression forms of lumbosacral radiculitis using puncture nonendoscopic laser operations]. Vladivostok: Dal'nauka; 2004; 181 p.

24. Yusupov V.I., Chudnovskii V.M., Bagratashvili V.N. Laser-induced hydrodynamics in water-saturated biotissues. 1. Generation of bubbles in liquid. *Laser Physics* 2010; 20(7): 1641–1646, <https://doi.org/10.1134/s1054660x1014001x>.

25. Yusupov I.V., Chudnovskii V.M., Bagratashvili V.N. *Laser-induced hydrodynamics in water and biotissues nearby optical fiber tip. Hydrodynamics — advanced topics*. Schulz H.E., Simões A.L.A., Lobosco R.J. (editors). InTech; 2011, <https://doi.org/10.5772/28517>.

26. Лазерная инженерия хрящей. Под ред. Баграташвили В.Н., Соболев Э.Н., Шехтер А.Б. М: Физматлит; 2006; 488 с. *Lazernaya inzheneriya khryashchey* [Laser cartilage engineering]. Pod red. Bagratashvili V.N., Sobol' E.N., Shekhter A.B. [Bagratashvili V.N., Sobol' E.N.,

Shekhter A.B. (editors)]. Moscow: Fizmatlit; 2006; 488 p.

27. Буйлин В.А., Москвин С.В., Гулиев С.Г. Анализ возможностей сочетанного применения КВЧ и лазерного излучений в медицине. Buylin V.A., Moskvina S.V., Guliev S.G. *Analiz vozmozhnostey sochetannogo primeneniya KVCh i lazernogo izlucheniya v meditsine* [Analysis of capabilities of combined application of EHF and laser radiations in medicine]. URL: http://milta-f.ru/mil/articles/general_terapy/analyz.

28. Комарова Л.А., Терентьева Л.А., Егорова Г.И. Сочетанные методы физиотерапии. Рига: Зинатне; 1986; 175 с. Komarova L.A., Terent'eva L.A., Egorova G.I. *Sochetannyye metody fizioterapii* [Combined methods of physiotherapy]. Riga: Zinatne; 1986; 175 p.