

УДК 615. 847.8 + 615.831]: 611.018.26

ВЛИЯНИЕ БЕГУЩЕГО ИМПУЛЬСНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ И ПОЛИХРОМАТИЧЕСКОГО НЕКОГЕРЕНТНОГО ПОЛЯРИЗОВАННОГО СВЕТА В ФИЗИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ДОЗИРОВКАХ НА МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ СТЕЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ НА МОДЕЛИ IN VITRO

**Алейник Д.Я., Щедрина М.А., Новиков А.В., Петров С.В., Сидорова Т.И.,
Чарыкова И.Н., Рубцова Ю.П.**

ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород, e-mail: daleynik@yandex.ru

Представлены результаты экспериментального исследования воздействия бегущего импульсного магнитного поля (БИМП) и полихроматического некогерентного поляризованного света в физиотерапевтических дозах на 7 штаммов мезенхимных мультипотентных стволовых клеток (ММСК). Культуры 3–4 пассажа (5 тыс. клеток/см²) через 24 часа после посева подвергались воздействию БИМП и/или полихроматического некогерентного поляризованного света. Одна из опытных серий в каждом эксперименте подвергалась воздействию трижды с интервалом в 24 часа. Контролировали состояние культуры и через 24, 48, 72 часа после воздействия определяли жизнеспособность, плотность клеток, продукцию фибронектина, ИЛ-10, ИЛ-6 и TGF- β . В опытных сериях с трехкратным облучением результаты снимали через 24 часа после последнего воздействия. Не выявлено цитотоксического влияния физioфакторов, влияния на фенотип, жизнеспособность, пролиферативную, секреторную активность.

Ключевые слова: регенеративная медицина, мультипотентные мезенхимные стволовые клетки, физioфакторы

THE EFFECT OF PULSED TRAVELING MAGNETIC FIELD AND POLYCHROMATIC INCOHERENT POLARIZED LIGHT IN PHYSIOTHERAPEUTIC DOSE ON MULTIPOTENT MESENCHYMAL STEM CELLS OF ADIPOSE TISSUE FOR AN IN VITRO MODEL

**Aleynik D.J., Schedrina M.A., Novikov A.V., Petrov S.V., Sidorova T.I.,
Charykova I.N., Rubzova U.P.**

Federal State Budgetary Institution «Privolzhsky Federal Research Medical Centre» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhni Novgorod, e-mail: daleynik@yandex.ru

The results of an experimental study of the effect of traveling pulsed magnetic field (TPMF) and polychromatic incoherent polarized light in physiotherapeutic dose on 7 strains of multipotent mesenchymal stem cells are presented. The cultures of 3 – 4 passage were used; the initial density was 5 thousand. cells / cm². After 24 hours, the cells were exposed to TPMF and / or polychromatic incoherent polarized light. One of the experimental series was exposed three times at intervals of 24 hours in each experiment. The condition of the culture was monitored during the growth by microscopy after 24, 48 and 72 hours after exposure, evaluating viability, cell density, fibronectin production, IL-10, IL-6 and TGF- β in control and test series. In the experimental runs with a triple exposure the results were taken 24 hours after the last exposure. It has been shown that the used experimental model revealed no cytotoxic effect for the effects under consideration on the cell culture; no changes in phenotype, viability, proliferation and secretory activity in the test series when compared to control have been observed.

Keywords: regenerative medicine, multipotent mesenchymal stem cells, physiofactors

Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки (ММСК), обладающие высокой биологической активностью и потенциалом дифференцировки, активно используют в развивающейся клеточной медицине [6]. Одним из наиболее доступных и перспективных типов стволовых клеток взрослого организма для аутологичной клеточной терапии считают ММСК жировой ткани (ММСК-ЖТ).

Результаты исследований в области регенеративной физиотерапии свидетельствуют о возможности комплексного использования стволовых клеток и различных физических факторов с целью ускорения

регенерации поврежденных тканей [2, 3]. Среди наиболее часто применяемых факторов в лечении костно-суставной патологии следует отметить импульсное магнитное поле (ИМП), механизмы действия которого нельзя считать до конца изученными [8, 9, 10]. Последние десятилетия в физиотерапевтической практике успешно используют и полихроматический некогерентный поляризованный свет, включающий видимый и инфракрасный диапазоны [1, 4, 5].

Однако большинство известных исследований по воздействию физических факторов на ММСК на модели in vitro проводилось с использованием временных ин-

тервалов, дозировок и аппаратуры, отличающихся от применяемых в стандартной физиотерапии, и пригодных, скорее, для экспериментальных исследований, чем для практической медицины [7].

Цель исследования: изучить воздействие бегущего импульсного магнитного поля и полихроматического некогерентного поляризованного света в терапевтических дозах с использованием стандартной аппаратуры («Алмаг», «Биоптрон»), применяемой в клинике, на морфологию, фенотипические характеристики, жизнеспособность, пролиферативную и секреторную активность ММСК-ЖТ в культуре.

Материалы и методы исследования

Работа проводилась на 7 штаммах культур ММСК – ЖТ. Источником материала была жировая ткань семи пациентов, лечившихся в отделении микрохирургии, у которых её забирали в объеме 1-2 мл во время реконструктивных операций.

Каждый пациент дал информированное согласие на участие в научном исследовании, протокол которого утвержден комитетом по Этике и ученым советом ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России.

Клетки выделялись с помощью тепловой ферментативной обработки коллагеназой (ООО «ПанЭко, Москва») в течение часа при 37С° и культивировались в среде α – MEM с добавлением 20 % телячьей эмбриональной сыворотки (ТЭС), глутамина, антибиотиков (пенициллин/стрептомицин) при абсолютной влажности, 37С°, 5 % CO₂. Использовали среды и реактивы фирмы ООО «ПанЭко», Москва, Россия. По достижении 50 % субконфлюэнтного монослоя культуру пересеивали. В экспериментах использовали культуру 3–4 пассажа. Клетки засеивали с плотностью 5 тыс/см² на восемь флаконов (Costar) площадью 25 см².

Перед началом эксперимента определяли фенотип клеток на цитофлюориметре «Becton Coulter», используя моноклональные антитела CD 45 PC 5, CD 14 PC5, CD HLA-DR PC7, CD 34 PC7, CD 90 Fite, CD 105 PE, CD 44 Fite, CD 73 PE, CD 10 PC7, CD 13 PC5 с соответствующими изотипическими контролями.

Культуру в трех флаконах подвергали однократному воздействию различными физическими факторами в терапевтических дозах. На клетки в первом флаконе воздействовали трижды в терапевтической дозе с интервалом 24 часа ежедневно. Контролем служила интактная культура, флаконы с которой на время воздействия извлекались из инкубатора. В течение всего эксперимента смены среды не проводили.

Наблюдение за состоянием культуры в процессе роста и видеоархивирование проводили с помощью инвертированного микроскопа «Leica DM IL», оснащенного видеокамерой и программой «Leica IM 1000», при увеличении 50х, 100х, 200х перед началом воздействия и через 24, 48 и 72 часа после него. В эти же периоды определяли плотность клеток на единицу площади культурального сосуда, жизнеспособность клеток, отбирали и замораживали пробы ростовой среды для последующего определения протеинов и факторов роста.

При исследовании трехкратного воздействия фиксацию результатов и отбор проб проводили через 24 часа после последнего. По окончании эксперимен-

та определяли фенотип клеток в культуре. Для исследования секреторной активности клеток культуры определяли уровень одного из основных протеинов межклеточного матрикса – фибронектина, трансформирующего фактора роста TGF- β , интерлейкинов ИЛ – 6, ИЛ – 10.

Определение фибронектина, интерлейкинов и фактора роста проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа, используя наборы реагентов группы компаний BCM «Биохиммак». Величину оптической плотности регистрировали на анализаторе «Sunrise» (Австрия) с использованием программы «Magellan», которая в автоматическом режиме позволяет строить калибровочную кривую и определять концентрацию исследуемых веществ.

Источником бегущего импульсного магнитного поля (БИМП) был аппарат «Алмаг-01». Воздействие осуществляли в терапевтической дозировке, согласно инструкции, у пациентов с патологией кисти (величина магнитной индукции (20±6) мТл, длительность импульса – 1,5–2,5 мс, частота следования импульсов МП в каждой из катушек – 6Гц, частота волн БИМП – 1,5 гц, время воздействия – 10 минут).

Второй исследуемый фактор – полихроматический некогерентный поляризованный свет от аппарата «Биоптрон компакт III» (Швейцария) удельной мощностью 40 мВт/см², с плотностью потока световой энергии 2,4 Дж/см² в минуту. Воздействие осуществляли с расстояния 10 см в течение 6 минут.

Результаты исследования и их обсуждение

В процессе наблюдения за ростом культуры при сравнении состояния монослоя и формирующих его клеток в опытных и контрольных сериях, признаков изменения рисунка и плотности монослоя, нарушения адгезии клеток к поверхности пластика, признаков дегенерации, патологических изменений в цитоплазме и ядерных структурах зафиксировано не было. Детрита практически не определялось, клетки были правильной формы с четкими контурами, выраженными отростками, плотными ядрами, в которых фиксировалось 2-4 ядрышка. Резких изменений pH среды не отмечено.

Таким образом, признаков цитотоксического воздействия исследуемых факторов на клетки в культуре не выявлено.

Фенотип клеток всех культур был типичным для мезенхимных стволовых клеток, на них в 98–99 % определялись CD 90+, CD 105+, CD 44+, CD 73+, CD 10+, CD 13 + и не фиксировались маркеры гемопоэтических клеток CD 45, CD 14, CD HLA-DR, CD 34.

По окончании эксперимента (через 72 часа после воздействия) повторяли исследование, которое продемонстрировало отсутствие изменения экспрессии на клетках исследуемых культур. На них в 98–99 % случаев определялись маркеры мезенхимных клеток и не фиксировались маркеры гемопоэтических клеток.

Таблица 1

Изменение плотности клеток на 1см² площади в процессе роста культуры после воздействия физических факторов

Группы	Период после воздействия			через 24 ч после 3-х кратного воздействия
	24 ч	48 ч	72 ч	
Опыт (воздействие БИМП)	6388,75 ± 840,06	7310,78 ± 1123,41	8233,56 ± 1499,28	8092,6 ± 1397,42
Опыт (воздействие полихроматическим некогерентным поляризованным светом)	6755,5 ± 904,15	7646,18 ± 1400,17	11990,56 ± 3696,22	11534,25 ± 3442,41
Контроль	6535,26 ± 547,78	7227,92 ± 684,38	9544,12 ± 1637,83	9544,12 ± 1637,12

Таблица 2

Изменение уровня фибронектина в нг/мл в ростовой среде в процессе роста культуры после воздействия физических факторов

Группы	Период после воздействия			через 24 ч после 3-х кратного воздействия
	24 ч	48 ч	72 ч	
Опыт (воздействие БИМП)	820 ± 311,3	1115,1 ± 355,07	1463,8 ± 351,25	1275,4 ± 313,38
Опыт (воздействие полихроматическим некогерентным поляризованным светом)	435,04 ± 137,56	777,3 ± 216,02	937,04 ± 248,67	1006,56 ± 313,36
Контроль	653,81 ± 181,01	1011,44 ± 203,39	1274,2 ± 229,07	1274,2 ± 229,07

Жизнеспособность клеток в опытных и контрольных сериях не отличалась и составляла не менее 98–99%. Плотность клеток в процессе роста равномерно нарастала в течение всего времени наблюдения и достоверно не отличалась в опытных и контрольных сериях (табл. 1).

При определении уровня одного из основных белков внеклеточного матрикса – фибронектина отмечено равномерное накопление его в ростовой среде, начиная с третьих суток наблюдения, как в опытных, так и в контрольных сериях, без достоверных отличий между сериями (табл. 2).

Уровень цитокинов ИЛ-6, ИЛ-10 и TNF-β также достоверно не отличался в опытных и контрольных сериях в течение всего периода наблюдения.

Таким образом, как однократное, так и трехкратное воздействие БИМП и полихроматическим некогерентным поляризованным светом в терапевтических дозировках не оказывает цитотоксического эффекта на морфологию ММСК-ЖТ, не влияет на иммунофенотип клеток культуры, жизнеспособность, пролиферативную и секреторную активность клеток в системе *in vitro*.

Однако существует мнение, что физические факторы влияют на процессы регенерации и восстановления физиологических

функций тканей в основном опосредованно, через воздействие на обмен веществ, состояние нервной и эндокринной систем, энергетические процессы и интенсивность кровообращения в поврежденных органах, а также активность и выработку гуморальных и тканевых регуляторов, так называемых факторов роста [3].

Заключение

Так как клетки мезенхимного ряда являются активными продуцентами цитокинов и факторов роста, обеспечивающих аутокринную и паракринную регуляцию, можно предположить, что результаты влияния тех или иных воздействий будут проявляться в системе *in vitro* в более поздние сроки или на следующих клеточных популяциях. Поэтому для оценки влияния физических факторов на жизнедеятельность ММСК на модели *in vitro* необходимы дальнейшие исследования.

Список литературы

1. Жирнов В.А., Жеваго Н.А., Гиза И.В., Данилова-Перлей В.И., Милорадова С.Н. Современные технологии фототерапии в спортивной и восстановительной медицине: Метод. рекомендации для специалистов по спорт. медицине, восстановительному лечению и реабилитации. Комитет по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга, 2006. – 40 с.

2. Кончугова Т.В., Бобровницкий И.П., Орехова Э.М. Пузырева Г.А., Королев Ю.Н., Ильинская Г.В. Возможности и перспективы регенеративной физиотерапии // I-й Национальный Конгресс по регенеративной медицине: материалы Конгр. – М., 2013. – С. 126.
3. Кончугова Т.В., Бобровницкий И.П., Орехова Э.М., Пузырева Г.А. Перспективы развития регенеративной физиотерапии // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. – 2014. – № 5. – С. 42–49.
4. Корчажкина Н.Б., Олесова В.Н., Кравченко В.В., Жазаева З.З., Рубанченко А.А., Петрова М.С., Парникова Т.Г. Михайлов А.В. Применение полхроматического поляризованного некогерентного излучения аппаратов «Биоптрон» в клинической стоматологии: метод. рекомендации. – М., 2010. – 28 с.
5. Федорова Л.В. Влияние поляризованного света на процессы ремоделирования предстательной железы у больных хроническим простатитом: автореф. дисс... канд. мед. наук. – М., 2009. – 24 с.
6. Шахпазян Н.К., Астрелина Т.А., Яковлева М.В. Мезенхимальные стволовые клетки из различных тканей человека: биологические свойства, оценка качества и безопасности для клинического применения // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – № 1. – С. 23–33.
7. Barnaba S., Papalia R., Ruzzini L., Sgambato A., Maffulli N., Denaro V. Effect of pulsed electromagnetic fields on human osteoblast cultures // *Physioter. Res.Int.* – 2013. – Vol. 18, № 2. – P. 109–114.
8. Chen C.H., Lin Y.S., Fu Y.C., Wang C.K., Wu S.C., Wang G.J., Eswaramoorthy R., Wang Y.H., Wang C.Z., Wang Y.H., Lin S.Y., Chang J.K., Ho M.L. Electromagnetic fields enhance chondrogenesis of human adipose-derived stem cells in a chondrogenic microenvironment in vitro // *J. Appl. Physiol.* – 2013. – Vol. 114, № 5. – P. 647–655.
9. Gomez-Ochoa I., Gomez-Ochoa P., Gomez-Casal F., Cativiela E., Larrad-Mur L. Pulsed electromagnetic fields decrease proinflammatory cytokine secretion (IL-1 β and TNF- α) on human fibroblast-like cell culture // *Rheumatol. Int.* – 2011. – Vol. 31, № 10. – P. 1283–1289.
10. Ongaro A., Pellati P., Bagheri L., Fortini C., Admin S., De Mattei M. Pulsed electromagnetic fields stimulate osteogenic differentiation in human bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stem cells // *Bioelectromagnetics.* – 2014. – Vol. 35, № 6. – P. 426–436.