

УДК 57.085.23:615.837.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ УЛЬТРАЗВУКА НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ НА ММСК ЧЕЛОВЕКА В СИСТЕМЕ IN VITRO

Алейник Д.Я., Щедрина М.А., Новиков А.В., Чарыкова И.Н., Рубцова Ю.П.

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

Представлены результаты экспериментального исследования воздействия низкоинтенсивного ультразвука (УЗ) в терапевтических дозах на 5 штаммов мезенхимальных мультипотентных стволовых клеток (ММСК), выделенных из биоптатов стромально-васкулярной фракции жировой ткани пациентов с патологией мелких суставов кисти. Культуры 3–4 пассажа (5 тыс. клеток/см²) через 24 часа после посева и затем каждые 24 часа пятикратно подвергались воздействию УЗ с последующим контролем с помощью микроскопии. Через 24 часа после последнего воздействия в контрольных и опытных сериях определяли жизнеспособность, плотность клеток, фенотип, продукцию фибронектина, продукцию TGF- β и VEGF. Не выявлено влияния УЗ на морфологические характеристики и жизнеспособность клеток, на фенотип клеток культуры. Установлено, что под воздействием УЗ низкой интенсивности в терапевтических дозировках независимо от особенностей культуры ММСК и ее генеза (пол, возраст донора материала, характера повреждающего фактора) отмечается отчетливая тенденция к увеличению пролиферативной активности и активации синтеза фибронектина, а продукция VEGF и TGF- β в тех же культурах меняется неоднозначно.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК), низкоинтенсивный ультразвук, пролиферация, фибронектин, факторы роста, регенерация

STUDY OF LOW-INTENSITY ULTRASOUND EFFECT ON HUMAN MMSC IN VITRO

Aleynik D.Y., Shchedrina M.A., Novikov A.V., Charykova I.N., Rubtsova Y.P.

Privolzhsky Federal Research Medical Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhniy Novgorod, e-mail: daleyunik@yandex.ru

Results of an experimental study of low-intensity ultrasound effect in therapeutic doses on 5 strains of multipotent mesenchymal stem cells (MMSC) isolated from bioptic samples of stromal vascular fraction of adipose tissue in patients with pathologies of small joints of the hand are provided. Cultures of the 3^d–4th passages (5,000 cells/cm²) in 24 hours after isolate passage and later on every 24 hours were exposed to ultrasound five times with a further microscopy control. In 24 hours after the last exposure control and trial series were studied for cell viability, density, phenotype, fibronectin production, TGF- β and VEGF production. No ultrasound influence on morphological characteristics, cell viability and culture cell phenotype was revealed. It was established that irrespective of MMSC culture specifics and its genesis (material donor's sex, age, disturbing factor), with the exposure to low-intensity ultrasound in therapeutic doses there is a pronounced tendency towards increase of proliferative activity and fibronectin synthesis activation, while VEGF and TGF- β production in the same cultures changes ambiguously.

Keywords: multipotent mesenchymal stem cells (MMSC), low-intensity ultrasound, proliferation, fibronectin, growth factors, regeneration

Управление процессами регенерации тканей после травм остается одним из наиболее актуальных направлений современной восстановительной медицины. С этой целью в последние годы активно изучаются возможности клеточной терапии, различных физических факторов или их сочетаний [5, 11, 12]. Основным потенциальным клеточным материалом, используемым для восстановительной терапии, являются мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки взрослого организма (ММСК).

ММСК представляют собой гетерогенную популяцию клеток разной степени коммитированности, которые активно вовлекаются в физиологическое и регенеративное ремоделирование тканей. Эти клетки способны подавлять иммунные и воспалительные реакции, выделяют большое количество биологически активных веществ, ускоряю-

щих протекание реакций обмена в тканях, активизируют работу уже имеющихся высокоспециализированных клеток, обладают способностью к пролиферации и дифференциации в другие типы клеток [7]. ММСК могут быть получены из различных источников, но наиболее перспективным и доступным источником клеточного материала считается стромально – васкулярная фракция жировой ткани [18].

Изучение изменений характеристик ММСК in vitro под воздействием традиционных методов физиотерапевтического воздействия (УЗ, магнитотерапия, лазерное излучение) продолжает оставаться предметом пристального внимания, т.к. является важнейшим этапом для понимания тонких механизмов, происходящих в организме человека и/или экспериментальных животных.

Одним из основных физических факторов, традиционно применяемых для восстановительной терапии травматических повреждений, является ультразвук (УЗ) низкой интенсивности, терапевтический эффект которого обусловлен улучшением микроциркуляции, активацией тканевых ферментов, повышением проницаемости клеточных мембран и др. [9, 17]. Однако механизмы взаимодействия ультразвука с ММСК окончательно не ясны и продолжают активно изучаться на различных экспериментальных моделях [8, 16].

Исследование воздействия УЗ на морфологические характеристики и функциональную активность ММСК в системе *in vitro* поможет не только понять процессы, происходящие в организме при их сочетании [15], но и определить тактику применения при составлении программ реабилитации для каждого пациента.

Цель работы – изучение воздействия УЗ низкой интенсивности в терапевтических дозировках на морфофункциональные характеристики ММСК, выделенных из жировой ткани пациентов с заболеваниями суставов кисти, на модели *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Работа проводилась на 5 штаммах культур ММСК стромально-выселяющей фракции жировой ткани. Источником клеточного материала были биоптаты жировой ткани пяти пациентов с поражением мелких суставов кисти, находившихся на лечении в отделении микрохирургии ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России, у которых во время реконструктивных операций забирали 1–2 мл жировой ткани.

В исследование вошли трое мужчин и две женщины с различными повреждениями кисти: два человека с болезнью де Кервена, двое – с посттравматическим артрозом и один пациент с посттравматической деформацией кисти после комбинированной термической травмы (ожог + отморожение).

Каждый пациент дал добровольное информированное согласие на участие в исследовании, протокол которого был утвержден Локальным Этическим комитетом (протокол № 6 от 14.04.2015 года) и Ученым советом ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России.

Клетки выделялись с помощью тепловой ферментативной обработки коллагеназой (ООО «ПанЭко, Москва) в течение часа при 37°C и культивировались в среде α – MEM с добавлением 20% телячьей эмбриональной сыворотки (ТЭС), глутамина, антибиотиков (пенициллин/стрептомицин) при абсолютной влажности, 37°C, 5% CO₂. Были использованы среды и реактивы фирмы ООО «ПанЭко» (Москва, Россия), пластик фирмы «Costar».

По достижении 50% субконфлюэнтного монослоя культуру пересевали. В экспериментах использовали культуру 3–4 пассажа. Исходная плотность клеток составляла 5 тыс./см². Для эксперимента клетки засеивали на восемь чашек Петри («Costar»), каждая площадью 20 см².

Перед началом эксперимента определяли фенотип клеток на цитофлюориметре «Becman Coulter», используя панель моноклональных антител «Becman Coulter»: CD 45 PC5, CD 14 PC5, CD HLA-DR PC7, CD 34 PC7, CD 90 Fitc, CD 105 PE, CD 44 Fitc, CD 73 PE, CD 10 PC7, CD 13 PC5 с соответствующими изотипическими контролями.

Через 24 часа после пересева культуру в чашках опытных серий подвергали двухминутному воздействию ультразвуком низкой интенсивности с помощью портативного аппарата для комбинированной физиотерапии «Sonopuls-492 new» фирмы «Enraf Nonius».

Использовали излучатель диаметром 0,8 см². Воздействие осуществляли в импульсном режиме, согласно программе «Повреждения суставов, костной и мышечной ткани», изложенной в «Инструкции пользователя на русском языке Sonopuls 492». Выбор импульсного режима определялся тем, что при нем слабее проявляются тепловые эффекты. Параметры программы соответствовали частоте работы излучателя 1 МГц – 3 МГц. Интенсивность воздействия составляла 0,05 Вт/см², что соответствовало максимальному уровню безопасности, обусловленному международным стандартом ИЕС. Частота импульсов установлена 100 Hz. Коэффициент заполнения импульсов (скважность) – 5–20%. Воздействие осуществлялось через слой ростовой среды (5 мм). Предварительно обработанная 70% спиртом и промытая стерильной деионизированной водой головка датчика погружалась в среду на глубину 1 мм. Тщательно контролировалось отсутствие контакта с клеточным слоем.

Через каждые 24 часа воздействие повторяли. Всего культура подвергалась воздействию пять раз по аналогии с курсом лечения в клинической практике.

Контролем служила интактная культура, чашки с которой на время воздействия извлекались из инкубатора. В течение всего эксперимента смена среды не проводилась.

Для наблюдения за состоянием культуры в процессе роста использовали метод светлого поля и фазового контраста. Микроскопию и видеосъемку проводили с помощью инвертированного микроскопа «Leica DM IL», оснащенного видеокамерой и программой «Leica IM 1000», при увеличении 50x, 100x, 200x перед началом воздействия и затем через каждые 24. По окончании эксперимента в опытных и контрольных сериях определяли плотность клеток на единицу площади культурального сосуда, жизнеспособность клеток, фенотип клеток культуры, отбирали и замораживали пробы ростовой среды для последующего определения протеинов и факторов роста.

Концентрацию и жизнеспособность клеток подсчитывали в камере Горяева и счетчике клеток «Countes», Invitrogen, США. При использовании камеры Горяева подсчитывали не менее 5 полей зрения в каждой группе, как опытной, так и контрольной. Для оценки жизнеспособности использовали прижизненный краситель трипановый синий.

При определении секреторной активности клеток культуры определяли уровень одного из ключевых протеинов межклеточного матрикса – фибронектина, трансформирующего фактора роста – TGF- β 1, VEGF.

Определение фибронектина и факторов роста проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа, используя наборы реагентов группы компаний BCS «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.

Результаты исследования обработаны методами непараметрической статистики с применением критерия парных сравнений Вилкоксона при помощи пакета программ STATSTICA 6.0.

Результаты исследования и их обсуждение

Культуры, используемые в эксперименте, соответствовали минимальным критериям для ММСК человека, установленным Интернациональным обществом по клеточной терапии [9].

Морфологические характеристики культуры в процессе роста, как в контрольных, так и в опытных сериях, соответствовали критериям мезенхимальных клеток. Это были фибробластоподобные клетки, звездчатой или веретенной формы с выраженными отростками, плотными ядрами, формирующие на поверхности пластика типичную картину монослоя в виде «завитков».

Фенотип клеток в процессе исследования не менялся и оставался стабильным. Определялись маркеры мезенхимальных клеток: CD 90+, CD 105+, CD 44+, CD 73+, CD 10+, CD 13+ при отсутствии панлейкоцитарного маркера CD 45- и маркеров CD 34-, HLA – DR-, CD 14-.

Следует подчеркнуть, что жизнеспособность клеток под воздействием УЗ не нарушалась, и не отмечалось достоверных отличий в количестве жизнеспособных клеток в опытных сериях по сравнению с контрольными сериями. Полученные результаты согласуются с данными Ефимовой Н.Н. и соавт., 2007 [3]; KiTaek Lim and al, 2013 [14], отмечавшими отсутствие отрицательного воздействия УЗ низкой интенсивности на морфологические характеристики и жизнеспособность клеток в культуре.

В каждом эксперименте в опытных сериях зафиксирована отчетливая тенденция к стимуляции пролиферации ММСК по сравнению с таковой в контрольных сериях (табл. 1), которая не зависела от индивидуальных характеристик и генеза каждого штамма.

Аналогичные данные получены при исследовании воздействия УЗ на процессы пролиферации дифференцированных клеток мезенхимального дифферона – дермальных фибробластов человека в системе *in vitro* [6], при исследовании воздействия УЗ на модели МСК крысы [8]. Одной из важнейших функций клеток мезенхимального ряда является синтез компонентов внеклеточного матрикса, в частности коллагена и гликопротеинов. Фибронектин – мультифункциональный высокомолекулярный гликопротеин, содержащийся в биологических жидкостях и тканях и участвующий в регуляции функций лейкоцитов, тромбоцитов, ретикулоэндотелиальной системы, пролиферации и дифференцировке фибробластов и эпидермальных клеток и играющий важнейшую роль в процессах заживления ран [4;13]. Фибробласты являются одними из основных продуцентов фибронектина, играющего важнейшую роль в функционировании межклеточного матрикса. Показано, что в процессе роста дермальных фибробластов человека в монослое в течение первых двух суток происходит внутриклеточное накопление этого белка, а, начиная с третьих суток, фибронектин накапливается в ростовой среде [2]. Аналогичная динамика накопления фибронектина отмечена нами ранее и в культурах ММСК, выделенных из стромально-вазкулярной фракции жировой ткани человека [1]. Под воздействием низкоинтенсивного УЗ в ростовой среде в опытных сериях всех исследованных штаммов монослойных культур ММСК фиксируется увеличение уровня фибронектина по сравнению с уровнем этого протеина в контрольных сериях (табл. 2).

Можно предполагать, что накопление фибронектина в ростовой среде связано с накоплением клеточной биомассы, а усиление пролиферации под воздействием УЗ, приводящее к образованию большего количества клеток сопровождается и усилением продукции фибронектина. В литературе параллельно активации пролиферации отмечают и накопление коллагена или в ростовой среде, или непосредственно в матрице около клеток, увеличивающееся под воздействием доз УЗ, близких к терапевтическим [6].

Таблица 1

Изменение плотности ММСК в культуре после воздействия УЗ средняя (Min – Max)

Номер культуры	Контроль	Опыт	p
1	8249,18 (8221,4 – 8276,95)	11075,03 (10900,65 – 11210)	0,1336
2	16439,43 (15060,4 – 17442,7)	18010,36 (17887,1 – 18201,35)	0,1336
3	8895 (8681 – 8999)	11428,96 (11221,1 – 11554,4)	0,1336
4	13069,35 (12788,7 – 13582)	17226,18 (17103 – 17305,1)	0,1336
5	13812,6 (12943,15 – 15165,15)	17523,81 (16442,8 – 18270,35)	0,1336

Таблица 2

Изменение уровня фибронектина в ростовой среде ММСК после воздействия УЗ в нг/мл – средняя (Min – Max)

Номер культуры	Контроль	Опыт	p
1	0,92 (0,88877 – 0,94996)	1,77 (1,6425 – 1,8351)	0,2482
2	0,78 (0,0026 – 1,3055)	1,22 (1,1928 – 1,2542)	1,000
3	0,98 (0,87422 – 1,0737)	1,27 (1,1553 – 1,3396)	0,2482
4	1,04 (0,94996 – 1,1116)	1,34 (1,268 – 1,4169)	0,2482
5	0,9 (0,88877 – 0,92799)	1,38 (1,1718 – 1,5004)	0,2482

Характер изменения уровня факторов роста TGF-β и VEGF под воздействием УЗ в различных штаммах ММСК отличался от направленности изменений пролиферации и накопления фибронектина. Уровень TGF-β в трех культурах после пятикратного воздействия УЗ не менялся, в то время как в двух других увеличивался (табл. 3). Уровень VEGF после воздействия УЗ в двух культурах не менялся, в двух – фиксировалась тенденция к увеличению в опытных сериях по сравнению с контрольными сериями, а в одной культуре отмечалось снижение продукции этого протеина (табл. 4).

Известно, что семейство VEGF – факторов играет важнейшую роль в регуляции процессов ангиогенеза, в то время как группа трансформирующих факторов роста TGF-β участвует в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки и апоптоза. Оба изучаемых фактора имеют значение и в регуляции патологических процессов. Факторы семейства TGF-β, ингибируя пролиферативную активность, предотвращают размножение недифференцированных (мутировавших – опухолевых клеток). Васкулоэндотелиальные факторы (VEGF), играя важную роль в поддержании стабильности

Таблица 3

Изменение уровня TGF-β в ростовой среде ММСК после воздействия УЗ в пг/мл – средняя (Min – Max)

Номер культуры	Контроль	Опыт	p
1	510,4 (499,63 – 517,39)	507,14 (496,37 – 523,78)	1,0000
2	1069,97 (1053,1 – 1079)	1203,73 (1161 – 1235,1)	0,2482
3	1122,17 (1074,3 – 1164,4)	1,48 (1,3853 – 1,5478)	0,2482
4	1196,33 (1163,3 – 1218,4)	1163,67 (1148,5 – 1172,4)	1,0000
5	1230 (1199,4 – 1290)	1295,27 (1257,2 – 1338,6)	0,4795

Таблица 4

Изменение уровня VEGF в ростовой среде ММСК после воздействия УЗ в пг/мл – средняя (Min – Max)

Номер культуры	Контроль	Опыт	p
1	727,41 (673,1 – 781,56)	488,15 (454,82 – 519,48)	0,2482
2	3349,47 (3268,8 – 3449,4)	3456,93 (3391 – 3544,4)	1,000
3	2025,13 (1846,34 – 2295,8)	1791,09 (1677,66 – 1885,56)	1,000
4	5116,6 (4712 – 5505,2)	5808,07 (5273 – 6354)	0,2482
5	2640 (2584 – 2691,2)	2582,8 (2402 – 2827,6)	1,000

эндотелия и физиологическом неоангиогенезе, могут участвовать в процессах неоваскуляризации в патологических ситуациях, в частности, в росте атеросклеротической бляшки и неопластических процессах при онкогенезе.

Поэтому понимание направленности изменений указанных факторов, происходящих в различных культурах под воздействием УЗ, чрезвычайно важно для правильного и безопасного его использования при различных патологических состояниях.

Выводы

1. Пятикратное воздействие УЗ низкой интенсивности в терапевтических дозировках не влияет на жизнеспособность, фенотип и морфологию ММСК в культуре.

2. Под воздействием терапевтических доз УЗ независимо от особенностей культуры ММСК и ее генеза (пол, возраст донора материала, характера повреждающего фактора) отмечается отчетливая тенденция к увеличению пролиферативной активности и активации синтеза фибронектина.

3. Продукция VEGF и TGF- β в тех же культурах меняется неоднозначно.

4. Целесообразно проведение дальнейших исследований на штаммах культур ММСК, полученных от пациентов с различной патологией.

Список литературы

- Алейник Д.Я., Щедрина М.А., Новиков А.В., Петров С.В., Сидорова Т.И., Чарыкова И.Н., Рубцова Ю.П. Влияние бегущего импульсного магнитного поля и поляризованного некогерентного поляризованного света в физиотерапевтических дозировках на мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани на модели *in vitro* // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 12 (часть 4). – С. 625–628.
- Алексеев А.А., Лавров В.А., Ушакова Т.А. Клиническое значение определения уровня фибронектина у тяжелообожженных // Хирургия. – 2000. – № 2. – С. 50–53.
- Ефимова Н.Н., Полукошко Е.Ф., Гронская Р.И., Адзериго И.Э., Никандров В.Н. Влияние низкочастотного ультразвука на культуру эндотелиальных клеток *in vitro* // Медицинский журнал. – Минск, 2007. – №4. – С. 60–62.
- Лавров В.А., Заец Т.Л. Фибронектин, как составная часть раневого экссудата и его значение в заживлении раны // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1998. – Т. 125, № 3. – С. 355–357.
- 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. – Т.7, №1. – С.23–33.
- Bohari S.P., Grover L.M., Hukins D.W. Pulsed low-intensity ultrasound increases proliferation and extracellular matrix production by human dermal fibroblasts in three-dimensional culture // *Tissue Eng.* – 2015. – Vol. 6. – P. 2041731415615777.
- Caplan A.I., Hariri R. Body management: mesenchymal stem cells control the internal regenerator // *Stem Cells Transl. Med.* – 2015. – Vol.4, N7. – P.695–701.
- Cheung W.-H., Chin W.-C., Wei F.-Y., Li G., Leun K.-S. Applications of exogenous mesenchymal stem cells and low intensity pulsed ultrasound enhance fracture healing in rat model // *Ultrasound Med. Biol.* – 2013. – Vol.39, N1. – P.117–125. – URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2012.08.015>.
- Della Rocca G.J. The science of ultrasound therapy for fracture healing // *Indian. J.Orthop.* – 2009. – Vol. 43, № 2. – P. 121–126.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy.* – 2006. – Vol. 8, №4. – P. 315–317.
- Filardo G., Perdisa F., Roffi A., Marcacci M., Kon E. Stem cells in articular cartilage regeneration // *J.Orthop. Surg. Res.* – 2016. – Vol.11– P.42.
- Freitag J., Ford J., Bates D., Boyd R., Hahne A., Wang Y., Cicuttini F., Huguenin L., Norsworthy C., Shah K. Adipose derived mesenchymal stem cell therapy in the treatment of isolated knee chondral lesions: design of a randomised controlled pilot study comparing arthroscopic microfracture versus arthroscopic microfracture combined with postoperative mesenchymal stem cell injections // *BMJ Open.* – 2015. – Vol.5, N12. – e009332.
- Grinnel F. Fibronectin and wound healing // *J. Cell. Biochem.* – 1984. – Vol.26, N2. – P.107–116.
- Lim K., Kim J., Seonwoo H., Park S.H., Choung P.H., Chung J.H. In vitro effects of low-intensity pulsed ultrasound stimulation on the osteogenic differentiation of human alveolar bone-derived mesenchymal stem cells for tooth tissue engineering // *BioMed. Res. Int.* – 2013 (2013), Article ID 269724, 15 pages. – URL: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/269724>.
- Uddin S.M., Qin Y.X. Enhancement of osteogenic differentiation and proliferation in human mesenchymal stem cells by a modified low intensity ultrasound stimulation under simulated microgravity // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, N9. – e73914. doi: 10.1371/journal.pone.0073914. eCollection 2013. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24069248>.
- Wei F.-Y., Leung K.-S., Li G., Qin J., Chow S.K., Huang S., Sun M.H., Qin L., Cheung W.H. Low intensity pulsed ultrasound enhanced mesenchymal stem cell recruitment through stromal derived factor-1 signaling in fracture healing // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol.9, N9. – e106722. doi:10.1371/journal.pone.0106722.
- Yan S.G., Huang L.Y., Cai X.Z. Low-intensity pulsed ultrasound: a potential non-invasive therapy for femoral head osteonecrosis // *Med. Hypotheses.* – 2011. – Vol.76, N1. – P. 4–7.
- Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // *Mol. Biol. Cell.* – 2002. – Vol.13, N12. – P.4279–4295.