

Azione combinata di fototerapia e terapia con cellule staminali: un nuovo approccio nella medicina rigenerativa

Juanita Anders^a, Helina Moges^a, Xingjia Wu^a, Ilko Ilev^b,
Ronald Waynant^b e Leonardo Longo^c

^a *Reparto di Anatomia, Fisiologia e Genetica, Università di Scienze della salute Uniformed Services, Bethesda, MD 20814 USA*

^b *Centro di Devices e Radiological Health, US. Agenzia governativa per Cibo e farmaci, Silver Spring, MD 20993 USA*

^c *Istituto di Medicina Laser, Università di Siena, Siena 53100, Italia e Università di San Marino 47890, Repubblica di san Marino*

Sommario. La fototerapia, comunemente definita terapia laser a basso livello, può alterare le funzioni cellulari e le condizioni cliniche. Alcuni degli effetti della fototerapia *in vitro* e *in vivo* comunemente riportati comprendono la proliferazione cellulare, l'alterazione della reazione infiammatoria alla lesione, l'aumento della respirazione mitocondriale e della sintesi del trifosfato di adenosina. A partire dai noti effetti della luce sulle cellule e sui tessuti in generale e dagli studi degli ultimi 5 anni sull'interazione della luce con le cellule staminali, vi sono sempre più prove che indicano che la fototerapia porterebbe grandi benefici alla medicina rigenerativa basata sulle cellule staminali. Esperimenti su una varietà di cellule staminali adulte prelevate dimostrano che la fototerapia stimola la differenziazione e la proliferazione delle cellule e altera l'espressione dei fattori di crescita in numerosi tipi diversi di cellule staminali adulte e di progenitori *in vitro*. Ha inoltre il potenziale di attenuare gli effetti citotossici dei farmaci usati per purificare le cellule staminali autologhe prelevate e di aumentare la sopravvivenza delle cellule trapiantate.

Parole chiave: cellule staminali adulte, cellule staminali embrionali, fototerapia, progenitori, proliferazione, differenziazione, trapianto

PACS: 42.62.Be, 87.17.Uv, 87.19.L, 87.59.yt

INTRODUZIONE ALLE CELLULE STAMINALI E ALLA FOTOTERAPIA

La cellula staminale ha la capacità di autorinnovarsi a lungo termine e le cellule che produce hanno la capacità di differenziarsi in molti diversi tipi di cellule specializzate [1]. Le cellule staminali embrionali, come implica il nome stesso, derivano dall'embrione. Hanno molteplici potenzialità e possono produrre tutti i tipi di cellule del corpo. Le cellule staminali embrionali sono in grado di autorinnovarsi per molto tempo e possono proliferare per lunghi periodi di tempo *in vitro* producendo milioni di cellule [2]. Le cellule staminali embrionali vengono isolate dalla massa cellulare interna dell'embrione e il prelievo di queste cellule porta alla morte dell'embrione. Questo fatto ha sollevato preoccupazioni politiche, religiose e etiche [3].

E' risaputo che nell'adulto, la maggior parte dei tessuti possiede cellule staminali [2]. Le cellule staminali adulte possono autorinnovarsi, hanno potenzialità molteplici e possono produrre tipi di cellule diverse da quelle del loro tessuto di origine [1]. Le cellule staminali adulte possono essere prelevate dalla nascita alla maturità e possono essere manipolate *ex vivo* per produrre nuove cellule nuovi tessuti per il trapianto [3]. Sono stati riportati casi in cui alcune cellule staminali adulte sono state in grado di differenziarsi in tipi di cellule non in relazione con il tessuto d'origine, Per esempio il tessuto adiposo che deriva dal mesenchima ha delle cellule staminali derivate che possono differenziarsi in lineage mesenchimali [4] ma anche transdifferenziarsi in molti tipi di cellule compresi i neuroni, le ossa, la cartilagine, il tessuto cardiaco, il fegato e il muscolo liscio [4, 5]. Tuttavia, la questione della differenziazione delle cellule staminali adulte in tipi di cellule non in relazione con il tessuto d'origine è oggetto di discussione e polemica [6]. La maggior parte dei tessuti adulti contiene un basso numero di cellule staminali che possono essere difficili da identificare e isolare [2]. Inoltre è necessario migliorare i metodi per moltiplicare le cellule staminali adulte isolate e controllarne la differenziazione *in vitro*. L'aumento del numero delle cellule è fondamentale perché sono necessarie molte cellule per le terapie di sostituzione con cellule staminali come l'innesto e il trapianto di tessuto [6,3]. Una preoccupazione per quel che riguarda l'uso di cellule staminali embrionali e adulte nelle terapie di sostituzione di tessuto è il rigetto da reazione immunitaria. Tuttavia la terapia con cellule staminali autologhe dove le cellule staminali somatiche di un paziente potrebbero essere prelevate, moltiplicate *in vitro*, differenziate e trapiantate al paziente stesso sarebbe meno suscettibile di provocare il rigetto. [7]

La fototerapia [LT] comunemente definita terapia laser a basso livello, può alterare le funzioni cellulari e le condizioni cliniche [8, 9]. Alcuni degli effetti *in vitro* e *in vivo* della LT che vengono comunemente riportati includono la proliferazione cellulare [10-12], le alterazioni della reazione infiammatoria alla lesione [13] e l'aumento nella respirazione mitocondriale e nella sintesi del trifosfato di adenosina (ATP) [14-16]. In base agli effetti riportati della LT sulle cellule e i tessuti, la LT potrebbe essere utile in vari modi alla terapia rigenerativa con cellule staminali. Ha il potenziale di aumentare il numero di cellule staminali adulte *in vitro* aumentando la divisione delle cellule o abbreviando le fasi del ciclo cellulare e può influenzare la differenziazione delle cellule staminali lungo i diversi lineage

cellulari. La LT sarebbe anche un'utile aggiunta al trapianto di cellule staminali e all'impianto di tessuto diminuendo la reazione immunitaria dell'ospite e aumentando la sopravvivenza delle cellule o del tessuto dopo il trapianto.

EFFETTI DELLA FOTOTERAPIA SULLE CELLULE STAMINALI ADULTE

Cellule staminali mesenchimali *in vitro* e *in vivo*

Le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono cellule multipotenti che possono essere isolate dal midollo osseo, proliferare come cellule indifferenziate *in vitro* per poi differenziarsi in numerosi lineage mesenchimali che comprendono tessuto osseo, cartilagine, muscolo, grasso e altri tessuti connettivi [17]. Numerosi studi hanno esaminato il potenziale della LT di aumentare il numero di MSC *in vitro*, incidere sulla loro differenziazione e migliorare la sopravvivenza della cellula in seguito al trapianto.

L'effetto di una luce della lunghezza d'onda di 647 nm (+/- 10nm) da un diodo a emissione luminosa (LED) sulla differenziazione osteogenica è stata esaminata usando MSC di topo [18]. Le cellule sono state poste in coltura per tre giorni alla presenza di un mezzo di differenziazione osteogenico e poi trattate con luce (9,29 mW/cm², cellule irradiate una volta per 10s, 30s, o 90s a energie di radiazione di 0,093 J, 0,279J e 0,836 J). Le alterazioni nelle MSC sono state analizzate 48 ore dopo l'irradiazione con parecchi saggi biologici. Tutte e tre le impostazioni LED hanno accentuato la differenziazione delle MSC in osteoblasti rispetto alle MSC di controllo non irradiate. Questo aumento della differenziazione è stato confermato dall'aumento della marcature Alizarin Red-S per i depositi di calcificazione, da una maggiore attività di fosfatasi alcalina (ALP) (l'ALP si esprime nelle fasi iniziali della maturazione dell'osteoblasto), maggiore espressione dell'mRNA dei marcatori della differenziazione dell'osteoblasto che comprende l'osteocalcina, il collagene di tipo I, l'osteopontina e il fattore di trascrizione2 collegato a Runt e l'aumento dell'espressione del CD44. Il CD44 è una molecola di adesione che è un marcatore positivo delle MSC umane e di ratto e ha un ruolo nella differenziazione delle MSC.

Per la cura di molti tumori maligni, il prelievo di MSC da un paziente per una successiva cura necessita la purificazione *in vitro* delle cellule con agenti citotossici. Tuttavia, l'esposizione a farmaci citotossici può portare alla disfunzione delle MSC. In uno studio recente si sono usate MSC di topo per esaminare gli effetti della luce nell'impedire il deterioramento delle cellule staminali sottoposte a purificazione con un'alta dose di chemioterapia [19]. È stato usato un laser a diodo con luce a lunghezza d'onda di 660nm, forza di emissione di 60mW e diametro del raggio laser di 10mm. Sono state impiegate varie densità di energie (1,9 J/cm² fino a 11,7 J/cm²). La densità di potenza variava da 76mW/cm² per 1,9 J/cm² fino a 156 mW/cm² per 11,7 J/cm². La bassa densità di energia della LT ha aumentato la proliferazione delle MSC (basate su un saggio di DNA) mentre la densità di energia alta della LT diminuiva la proliferazione delle MSC. La LT era in grado di impedire o attenuare alcuni degli effetti dei vari farmaci citotossici testati e di ampliarne altri. La LT a 1,9 J/cm² eliminava gli effetti del Carboplatin ad alta concentrazione sulle cellule, ma quando si combinava con concentrazioni non efficaci di Paclitaxel si verificava l'inibizione delle cellule staminali. I risultati dipendevano non solo dai parametri laser usati ma anche dal tipo e concentrazione del farmaco citotossico testato. Questa relazione ha implicazioni cliniche importanti nel campo della chemioterapia ad alto dosaggio unita al recupero, purificazione e conservazione delle cellule staminali autologhe per usi futuri in impianti di cellule staminali autologhe.

In un'altra serie di esperimenti sono stati valutati gli effetti della LT sulle MSC prima dell'impianto. MSC isolate dal midollo osseo di topo e irradiate con il laser sono state impiantate nel cuore infartuato di un ratto [20]. Le MSC *in vitro* sono state irradiate con luce laser a lunghezza d'onda di 804 nm (densità di potenza di 50mW/cm², 20s, 1J/cm², una fibra ottica di mm 1,5 di diametro rivestita di metallo) quando le cellule hanno raggiunto una confluenza del 90%. 24 ore dopo l'irradiazione le MSC sono state prelevate, marcate con 5-bromo-2'-deossiuridina (BrdU) e impiantate nel cuore trenta minuti dopo l'infarto. I ricercatori hanno aspettato 24 ore dopo l'irradiazione prima di iniettare le cellule per dar tempo alle cellule di upregulate l'espressione dei fattori citoprotettivi prima dell'impianto. Le MSC sono state iniettate in due siti, uno vicino all'area dell'infarto e l'altra nella parte inferiore del ventricolo sinistro. I cuori sono stati asportati tre settimane dopo l'impianto. Le MSC irradiate hanno provocato una riduzione significativa della dimensione dell'infarto (53%) rispetto ai cuori con impianto di MSC non irradiate e si era anche verificato un aumento dell'angiogenesi e dell'espressione del fattore di crescita vascolare endoteliale nei cuori con impianti di MSC trattate con il laser. Un altro risultato interessante in questo studio è dato dal fatto che le MSC trapiantate trattate con la luce sono aumentate otto volte di più nell'area infartuata rispetto al numero dell'intero ventricolo sinistro. Gli autori suggeriscono che le cellule trapiantate siano migrate verso la zona dell'infarto. Tuttavia, non sono stati fatti studi di migrazione e differenziazione. Questo studio dimostra che la LT delle cellule staminali prima dell'impianto può aumentare in modo significativo la loro sopravvivenza e/o la loro proliferazione e può aumentare la migrazione delle cellule verso il sito del trauma. Come riportato in numerosi studi qui citati la LT delle cellule staminali può alterare la loro espressione dei fattori di crescita.

Osteoblasti umani *in vitro*

Diversi studi riportano che la LT influenza l'osteogenesi e la riparazione delle ossa in modelli di trauma animali [21]. I meccanismi cellulari e molecolari coinvolti in questo effetto non sono ancora chiari ma si sono ipotizzate la proliferazione di cellule ossee e la differenziazione. Sulla base di questi studi è stato esaminato l'effetto della LT sulla proliferazione e la differenziazione di osteoblasti umani [22]. Si è usato un laser che emetteva luce a lunghezza d'onda di 632nm (forza di uscita di 10 mW, diametro del raggio di 1,8mm, 180mW/cm². Sono stati testati tempi diversi e i risultati migliori sono stati ottenuti con l'esposizione di 3 sec e 0,43 J/cm². Gli osteoblasti sono stati irradiati al secondo e terzo giorno dopo la semina. La LT ha dato come risultato l'aumento del 25% nel numero delle cellule basato sul computo delle cellule e l'aumento del 40% dell'attività enzimatica mitocondriale basata sul saggio colorimetrico di bromuro dimetiliazol difeniltetrazolio (MTT). Inoltre dal 40% al 60% delle cellule hanno espresso attività ALP rispetto al 20% delle cellule non trattate con la luce. Questi risultati indicano che la LT è in grado di favorire la proliferazione e la maturazione degli osteoblasti *in vitro*.

E' stato esaminato l'effetto dell'irradiazione laser superpulsato sull'attività osteogenica di cellule umane MG-63 simili all'osteoblasto [23]. In questo studio le cellule sono state esposte a irradiazione laser superpulsato usando uno strumento dentistico con lunghezza d'onda di 904-910nm (ampiezza d'impulso 200 nanosecondi, picco minimo di potenza 33 W, frequenza 30 kHz, potenza media di uscita 200 mW, energia totale 60 J, tempo di esposizione 5 minuti). Sono stati valutati i seguenti parametri: crescita e vitalità cellulare (microscopio ottico, rilascio di lattato deidrogenasi), depositi di calcio (Marcatura Alizarin Red S), ed espressione di fattori ossei morfogenetici (PCR in tempo reale). L'irradiazione laser ha diminuito la crescita cellulare, indotto l'espressione di molecole mediatrici di formazione ossea che comprendono TGF-beta2, BMP-4, e bmp-7, collagene tipo I, ALP, osteocalcina e ha aumentato la dimensione e il numero dei depositi di calcio. Questi studi sostengono l'ipotesi che la LT può promuovere la proliferazione e la differenziazione degli osteoblasti *in vitro*.

Cellule staminali di umano adulto derivate da tessuto adiposo *in vitro*

Il tessuto adiposo come il midollo osseo deriva dal mesenchima e contiene uno stroma di sostegno facilmente isolabile che contiene cellule staminali. E' stata esaminata la capacità della LT di favorire la proliferazione e la differenziazione delle colture primarie delle cellule staminali di umano adulto derivate da tessuto adiposo [24]. Si è usato un LED della lunghezza d'onda di 635nm con una potenza di uscita di 50,2 mW, un diametro di raggio di 3,3 mm (5,5 mW/cm², 5 J/cm²). La luce ha aumentato la vitalità misurata in base alla luminescenza ATP, ha incrementato la proliferazione rilevata da un saggio di densità ottica, e ha aumentato l'espressione del marcatore della cellula staminale, beta1-integrina che gli autori hanno interpretato come indicatore del mantenimento delle proprietà della cellula staminale. Non è chiaro se la beta1-integrina ha anche un ruolo nella differenziazione di cellule staminali di umano adulto derivate da tessuto adiposo simile al marcatore CD44 per le MSC (vedi la sezione sulle cellule staminali mesenchimali *In Vitro* e *In Vivo*) e non sono stati usati marcatori di differenziazione in questa serie di esperimenti. Perciò non si sa se la LT ha provocato la differenziazione di una sottopopolazione delle cellule staminali come viene riportato per gli studi delle cellule staminali mesenchimali e dell'osteoblasto umano sopra descritto.

Cellule staminali di polpa dentale di umano adulto *In Vitro*

E' stata valutata l'efficacia della LT nell'alterare la proliferazione delle cellule staminali della polpa dentale di umano adulto (hDPSC) *in vitro*. E' stato usato un ceppo di hDPSC. Le cellule sono state mantenute semi confluenti e fatte crescere in un mezzo scarsamente nutritivo. E' stato usato un laser che emetteva luce alla lunghezza d'onda di 660 nm (sono state usate potenze di emissione di 40 e 20 mW a una densità di energia di 3 J/cm², l'area del raggio era di 3,6mm²). Si è praticata l'irradiazione delle cellule attraverso il fondo delle piastre di titolazione a 96 pozzetti. L'irradiazione a 20 mW era più efficace nello stimolare la crescita cellulare delle hDPSC. Sfortunatamente gli autori hanno scelto di usare il saggio MTT per l'analisi della crescita cellulare. Il saggio MTT è un saggio colorimetrico che misura l'attività degli enzimi della riduttasi per ridurre l'MTT a formazano. Queste riduzioni si verificano solo quando gli enzimi della riduttasi sono attivi e perciò il saggio MTT viene spesso usato come misura della vitalità cellulare. Tuttavia l'attività metabolica può essere aumentata o diminuita da molteplici condizioni diverse. I cambiamenti nell'attività metabolica possono provocare grandi cambiamenti nel MTT mentre il numero delle cellule vitali rimane costante. Parecchi studi hanno esaminato gli effetti della LT sulla proliferazione delle cellule con l'impiego sia di test MTT sia di saggi basati sul DNA e non hanno evidenziato alcun cambiamento nella proliferazione cellulare con il saggio basato sul DNA ma grandi aumenti con il saggio MTT il che indica che la LT alterava l'attività metabolica ma non la proliferazione [26]. Questi risultati indicano che per la valutazione della proliferazione nella ricerca sulla LT bisognerebbe usare il computo delle cellule, saggi di densità ottica o saggi basati sul DNA. Quindi in questo studio non è possibile valutare se la LT ha alterato la proliferazione delle hDPSC.

Cellule satellite muscolari *In Vitro*

Come discusso in precedenza (vedi Cellule staminali mesenchimali *in vitro* e *in vivo*) il trattamento delle cellule staminali prima dell'impianto può aumentare la loro sopravvivenza e/o la proliferazione e alterare l'espressione dei loro fattori di crescita. In un altro studio sono state analizzate gli effetti della LT sulle cellule staminali prima e dopo il trapianto [27]. La rigenerazione del muscolo dipende dalle cellule staminali residenti conosciute come cellule satellite. Se c'è una perdita di grandi quantità di tessuto muscolare, le cellule satellite residenti non possono rimpiazzare il tessuto, condizione che rende necessario il trapianto del mioblasto. Tuttavia i tentativi di terapia con trapianto del mioblasto sono falliti a causa della perdita delle cellule trapiantate nel giro di ore dal trapianto [27]. In questa serie di esperimenti sono state prelevate cellule satellite muscolari di ratto dal muscolo scheletrico di ratto maschio, irradiate, seminate su supporti di gel e incubate per tre giorni. I supporti sono poi stati trapiantati nel muscolo parzialmente asportato di ratti femmine. E' stato usato un laser He-Ne (lunghezza d'onda di 632,8nm, 4,5 mW, diametro del raggio di 1,8 mm, 200 mW/cm², e 0,6 J/cm²) per trattare le cellule satellite prima del trapianto e il sito di trapianto. Le cellule del donatore maschio sono state identificate nel tessuto muscolare femminile con l'ibridizzazione in situ del cromosoma Y. Le cellule trattate con la LT prima e durante il trapianto sono sopravvissute e si sono fuse col i mioblasti ospiti e hanno creato un sincizio ospite-donatore. Tuttavia le cellule non irradiate non sono sopravvissute. Questo studio illustra che la LT, procedura semplice e riproducibile, può essere usate per trattare le cellule staminali prima e durante il trapianto. Non sono stati studiati i vantaggi della LT sul trapianto di cellule staminali dopo il trapianto.

INTERAZIONE DELLA LUCE CON LE CELLULE PROGENITRICI NEURALI UMANE IN VITRO

Abbiamo in precedenza riferito gli effetti della luce alla lunghezza d'onda di 810nm sulla differenziazione delle cellule progenitrici neurali umane normali (NHNPC) *in vitro* riguardo ai fattori di crescita [28]. Questo studio è stato il primo a dimostrare che la luce poteva essere usata come sostituzione dei fattori di crescita per la differenziazione *in vitro* delle cellule progenitrici neurali. Le NHNPC sono state separate in tre gruppi: Gruppo di controllo (senza luce, senza fattori), Gruppi con fattori (solo fattori, senza luce), e Gruppo trattato con la luce (solo luce, senza fattori). Le NHNPC trattate con la luce sono state esposte a un laser a diodo a luce a onda continua con lunghezza d'onda di 810 nm, della potenza di 150 mW (densità di potenza di 50 mW/cm², tempo di esposizione di 4s, e una dose di radiazione di 0,2 J/cm² o 100 mW/cm², 2 s, e 0,2 J/cm²).

I parametri del trattamento con la luce usati in questo studio si sono basati su una serie di esperimenti preliminari. Per gli esperimenti preliminari iniziali le NHNPC sono state piastrate su vetrini e trattate con la luce una volta al giorno per tre giorni e fatte crescere per un totale di sette giorni usando i seguenti parametri laser: 1) lunghezze d'onda: 458,6, 477, 488,7, 515, 646, 660, 780, 807, 810 e 975 nm e una densità di energia di 0,2J/cm². Per questo esperimento il diametro del raggio laser era di 10 mm e corrispondeva a un'area di 0,785 cm². È stato usato un minimo di due piastrine che contenevano NHNPC di ogni gruppo sperimentale. Le piastrine dei controlli e dei fattori sono state incluse nell'analisi. Si è usata un'analisi dell'area di superficie, usando una griglia a mm² posta a caso sul vetrino del pozzetto per valutare la crescita delle NHNPC. I risultati dell'esperimento sull'efficacia delle varie lunghezze d'onda ha rivelato che la luce a lunghezza d'onda di 810 nm era paragonabile ai fattori di crescita nella percentuale di superficie occupata dai gruppi e processi di NHNPC (810 nm notevolmente maggiore di: 646 nm (p<0,01); 477 nm (p<0,05); e Controlli 458,6 nm, 488,7 nm (p<0,001). La luce a lunghezza d'onda 515 nm era inibitoria rispetto ai fattori di crescita e la luce a 810 nm (515 nm significativamente inferiore a : 660 nm, 780 nm (p<0,01); 807 nm (p<0,05); e 820 nm (p<0,001). La statistica si è avvalsa del test ANOVA con Tukey Post hoc (Fig. 1)

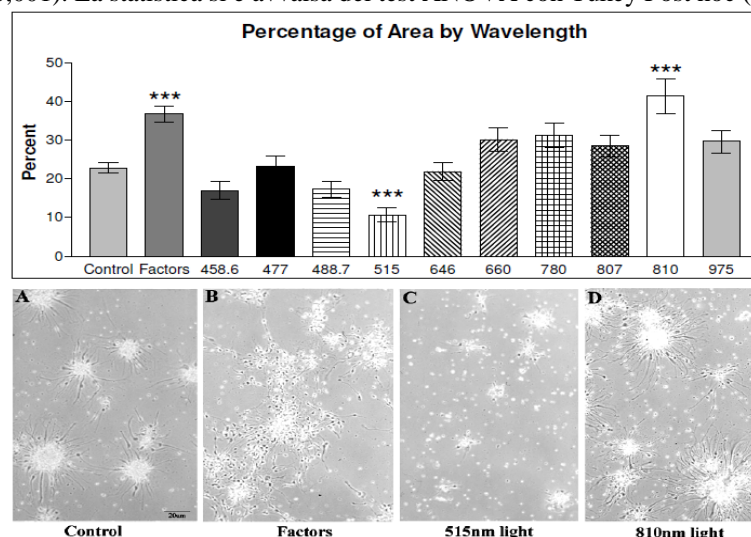


FIGURA 1. Il diagramma a barre mostra la percentuale di area occupata dai gruppi e processi delle NHNPC. L'area occupata dalle NHNPC, trattate con la luce a lunghezza d'onda di 810 nm, era paragonabile ai fattori mentre la luce a lunghezza d'onda di 515 nm era significativamente inferiore ai fattori e ai gruppi a lunghezza d'onda di 810 nm. I fotomicrografi rivelano la comparsa delle NHNPC a diverse condizioni: A. gruppo di controllo senza luce, B. gruppo fattori, C. gruppo trattato con luce a lunghezza d'onda e D. gruppo trattato con luce a lunghezza d'onda di 810 nm. Chiave; ***(p<0,001).

L'ottimizzazione della dosimetria, e la densità di potenza (intensità), è attualmente di grande interesse per gli scienziati e i clinici che lavorano nel campo della fototerapia. Sono state valutate combinazioni diverse della dosimetria e della densità di potenza per 810 nm con l'impiego di NHNPC *in vitro*. Le NHNPC sono state poste in uno dei tre gruppi di trattamento, due vetrini per gruppo, 1) Controlli (senza fattori, senza luce); Fattori (senza luce); e 3) Trattati con la luce a lunghezza d'onda di 810nm (dimensione dello spot di 0,78cm²). Il gruppo trattato con luce a lunghezza d'onda di 810 nm era composto di 4 sottogruppi: 1) dosaggio di 0,01 J/cm²: 1, 5 e 19mW/cm²; 2) dosaggio 0,05 J/cm²: 1,5, 15, 19, 25 e 50 mW/cm²; 3) dosaggio 0,2 J/cm²: 1, 5, 15, 19, 25 e 50 mW/cm²; e 4) dosaggio 1 J/cm²: 1, 5, 15, 19, 25 e 50 mW/cm² (Tabella 1) Le NHNPC sono state trattate per tre giorni consecutivi e fissate al settimo giorno. Sono state catturate digitalmente immagini di venti neurosfere per gruppo prese a caso e saggiate per la differenziazione determinando il numero e la lunghezza dei neuriti. Si è determinata e fatta la media della lunghezza totale dei neuriti per tutti i neuriti di ogni neurosfera per gruppo. I dati sono stati analizzati con ANOVA a senso unico con Tukey Post tests. Sulla base di questi dati la lunghezza dei neuriti per neurosfera aumentava con l'aumento della

densità di potenza (19-50 mW/cm²) e del dosaggio (0,05-1J/cm²) (Tabella 1). Questi dati suggeriscono che non c'è una combinazione ottimale di dosaggio e densità di potenza ma piuttosto un'isola di combinazioni efficaci di dosaggio e densità di potenza per una data lunghezza d'onda.

Parameters	1 mW/cm ²	5 mW/cm ²	15 mW/cm ²	19 mW/cm ²	25 mW/cm ²	50 mW/cm ²
0.01 J/cm ²	NS	NS	----	NS	----	----
0.05 J/cm ²	NS	NS	NS	S**	S**	NS
0.2 J/cm ²	NS	NS	NS	S*	S*	S**
1 J/cm ²	NS	NS	NS	NS	NS	S*

NS: No statistical difference. S: Groups significantly greater than Factors group. (One way ANOVA *p<0.01, **p<0.001)

Le NHNPC non solo erano in grado di essere incrementate dalla luce in assenza di fattori di crescita, ma erano anche in grado di differenziarsi normalmente come accertato dalla formazione di neuriti e dall'immunocolorezione per i marcatori neuronali e gliali [28]. Le NHNPC hanno avuto una up-regulation nell'espressione dell' FGF-2 endogeno, del BDNF e dell'NGF come risposta alla luce. Il sale di suramina esasadica, un antagonista del recettore P2 non selettivo, ha diminuito in modo significativo lo sviluppo dei neuriti nelle cellule trattate con la luce ma non ha avuto alcun effetto sull'estensione dei neuriti nelle NHNPC di controllo o trattate con i fattori (Fig. 2).

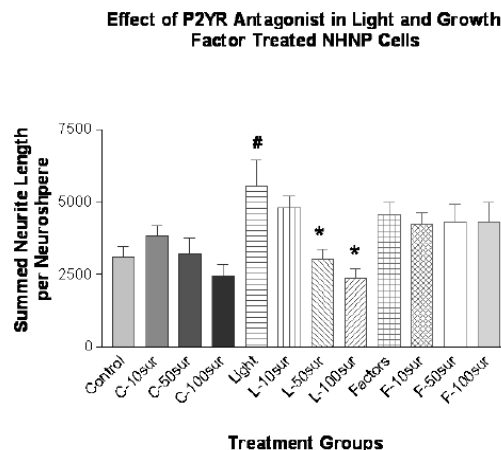


FIGURA 2. Il grafico illustra gli effetti del sale di suramina esasadica, un antagonista purinergico non selettivo P2Y sull'estensione del neurite. Il sale di suramina esasadica è stato aggiunto alle colture prima dei trattamenti con luce o con fattori. Sono state usate tre diverse concentrazioni di sale di suramina esasadica: 10µM, 50µM e 100µM. Il sale di suramina esasadica ha diminuito l'estensione del neurite in modo correlato al dosaggio. NHNPC di controllo trattate con 10µM di suramina (C-10sur), NHNPC di controllo trattate con 50µM di suramina (C-50sur), NHNPC di controllo trattate con 100µM di suramina (C-100 sur), NHNPC sottoposte a fototerapia trattate con 10µM di suramina (C-10 sur), NHNPC trattate a luce con 10µM di suramina (L-10 sur), NHNPC trattate a luce con 50µM di suramina (L-50 sur), le NHNPC trattate a luce con 100µM di suramina (L-100sur), NHNPC trattate con fattori con 10µM di suramina (F-10 sur), NHNPC trattate con fattori con 50µM di suramina (F-50 sur), NHNPC trattate con fattori con 100µM di suramina (F-100 sur), # indica che il gruppo ha avuto un aumento statisticamente significativo rispetto al gruppo di controllo, * indica che i gruppi hanno avuto una diminuzione statisticamente significativa rispetto al gruppo trattato con la luce.

Si è trovato che i recettori P2Y2 E P2Y11 erano espressi dalle NHNPC con immunomarcatura. Sulla base di questi ritrovati si è ipotizzato che il meccanismo con cui la luce sostiene la differenziazione delle NHNPC sia dovuto ad aumenti nell'ATP che porta ad un incremento dell'ATP extracellulare che attiva i recettori P2Y [28]. Inoltre, è stato riportato che l'ATP può stimolare l'estensione del neurite indipendentemente da altri fattori neurotrofici e l'effetto neurotrofico dell'ATP può essere mediato tramite il pathway della chinasi della proteina attivata dal mitogeno (MAPK) [29]. I pathway MAPK trasducono una grande varietà di segnali esterni che danno come risultato molte risposte cellulari, compresa la crescita, la differenziazione, l'infiammazione e l'apoptosi [30].

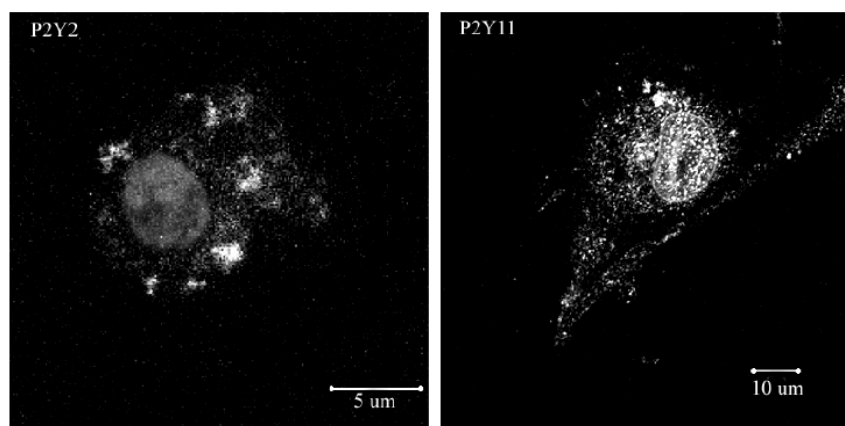


FIGURA 3. Fotomicrografo delle NHNPC fluoromarcati con anticorpi primari contro i recettori P2Y2 e P2Y11.

CONCLUSIONI

Sulla base di una serie di studi degli ultimi 5 anni, sono sempre più numerose le prove che indicano che la LT potrebbe avere un effetto molto benefico per la medicina rigenerativa basata sulle cellule staminali. Esperimenti su una varietà di cellule staminali adulte prelevate dimostra che la LT potenzia la differenziazione e la proliferazione delle cellule in vitro. La LT altera l'espressione dei fattori di crescita in numerosi diversi tipi di cellule staminali adulte e di progenitori in vitro. Ha inoltre il potenziale di attenuare gli effetti citotossici dei farmaci usati per purificare le cellule staminali prelevate per impiego futuro negli impianti di cellule staminali autologhe. Il trattamento delle cellule staminali con la luce prima del trapianto e/o nel momento del trapianto ha aumentato la sopravvivenza delle cellule trapiantate. Sulla base della letteratura generale della LT, un certo numero di funzioni cellulari potrebbero essere alterate dalla LT che darebbe come risultato un aumento della sopravvivenza delle cellule trapiantate. Per esempio la LT può aumentare l'espressione delle proteine anti apoptosi e ridurre le proteine pro-apoptosi [31].

Un'altra area di impiego potenziale della LT che non è stata indagata finora è la manipolazione delle popolazioni delle cellule staminali adulte endogene. Per esempio la LT potrebbe venir usata per indirizzare la capacità di autorinnovamento delle cellule staminali residenti per aumentare le risorse rigenerative quando necessario, per indurre le cellule staminali adulte residenti a differenziarsi lungo un lineage specifico e di stimolare le cellule a migrare verso un'area di lesione/malattia e reintegrare le cellule lese o morenti.