INDIBA®

ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИЯ ПРИ ЧАСТОТЕ 448 кГц (CRET) СПОСОБСТВУЕТ ПРОЛИФЕРАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

HERNÁNDEZ-BULE ML, PAÍNO CL, TRILLO MA, ÚBEDA A. CELL PHYSIOL BIOCHEM 2014;34:1741-1755
(Официальный автореферат. Оригинал статьи можно найти на http://www.karger.com/Article/FullText/366375)

ВСТУПЛЕНИЕ

Клетки-предшественники играют важнейшую роль в регенерации тканей. После пролиферации новые клетки сохраняют за собой первоначальную функцию тканей. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются ключевой клеточной популяцией, задействованной в пролиферативной фазе посттравматической регенерации, они присутствуют практически во всех тканях взрослых людей.

Существует установившаяся традиция успешного применения такой разновидности физиотерапии как электрическая и электромагнитная стимуляция для содействия регенерации травматических и дегенеративных поражений ткани, а также в эстетической медицине (1-7). Среди методов электростимуляции есть емкостная-резистивная электротерапия, неинвазивный электротемпературный метод, основанный на применении электрических токов с радиочастотой 400 кГц-450 кГц. Недавние результаты, полученные in vitro, указывают на то, что при плотности тока, обеспечивающей термальный эффект, емкостная-резистивная электротерапия имеет признаки цитотоксичности для клеток человеческого рака, причем подобный эффект усиливается инъекциями микрочастиц металла в ткани обрабатываемой опухоли (8). На клеточном уровне влияние емкостной-резистивной электротерапии не ограничивается термальным эффектом. Емкостная-резистивная электростимуляция в субтермальных (без нагрева) дозах может вызвать анти-пролиферативные и цитотоксические реакции в культивированных клеточных линиях рака человека, но не в первичных культурах мононуклеарных клеток человеческой крови (9-13). Эти экспериментальные результаты можно интерпретировать как свидетельства в пользу того, что благотворный эффект применения емкостной-резистивной электротерапии в лечебных целях объясняется не только повышением температуры, но и прямыми клеточными реакциями на сам электрический стимул. Что касается регенерации тканей, емкостная-резистивная электротерапия в настоящее время используется в физиотерапевтической реабилитации и в спортивной медицине для лечения повреждений мышц, костей, связок и сухожилий (14-16). Ускорение восстановления после травм благодаря емкостной-резистивной электротерапии происходит благодаря уменьшению объема поврежденной области, а также благодаря противовоспалительным процессам, аналгезии и восстановлению мышечной функции (17-20).

Цель настоящего исследования – узнать, является ли усиление пролиферации стволовых клеток жировой ткани (разновидности МСК) одним из эффектов в рамках процессов регенерации тканей, стимулируемых емкостной-резистивной электротерапией при субтермальной плотности тока.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточная культура

Стволовые клетки, полученные из жировой ткани, были изолированы из образцов подкожного жира у наших четверых здоровых доноров (двух мужчин, 65 и 69 лет, и двух женщин 29 и 35 лет). В экспериментах использовались стволовые клетки жировой ткани третьего-восьмого пассажа.

Воздействие емкостной-резистивной электростимуляции (CRET)

Воздействие токов емкостной-резистивной электротерапии на клетки (как показано на Рис. 1) состояло из 5-минутных импульсов тока частотой 448 кГц при субтермальной плотности 50 μA/мм2, разделенных 4-часовыми временными промежутками; общий период воздействия был равен 48 часам. Пары электродов были последовательно подключены к генератору сигналов (прибор INDIBA®, INDIBA SA, Барселона, Испания). Предыдущими исследованиями нашей группы (9-13) было доказано, что такие параметры воздействия влияют на пролиферацию клеток. Культуры были выражены в инкубаторах, за ними велось постоянное наблюдение. В качестве плацебо-воздействия пары электродов, установленные на контрольные лотки, были также подсоединены к генератору, но подачи энергии не было.

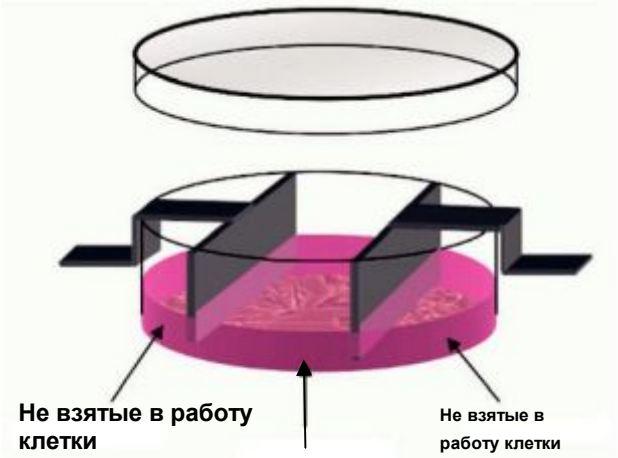

Рис. 1. Воздействие тока 448 кГц, проходящего между двумя электродами in vitro. Плотность тока гомогенна на поверхности лотка, приходящейся на пространство между электродами (рабочая зона; контрольная плацебо-зона1065 мм^2). Не взятые в работу клетки были убраны с лотка и утилизированы в конце процедуры

Количественный анализ дифференциации для мезенхимальной характеризации

Чтобы оценить дифференцирующую мультипотентность полученных из жировой ткани стволовых клеток, их инкубировали в адипогенной, хондрогенной и остеогенной средах. На 15 день инкубации в этих средах стволовые клетки из жировой ткани была проведена оценка адипогенной, хондрогенной и остеогенной дифференцировки.

Та же процедура оценки дифференцировки применялась для того, чтобы определить, возможно ли повлиять на мультипотентность стволовых клеток из жировой ткани при помощи воздействия емкостной-резистивной электротерапии.

Оценка пролиферации клеток

Воздействие емкостной-резистивной электротерапии на пролиферацию клеток определялось колориметрическим количественным анализом с применением реагента XTT, а также количественным выражением синтеза ДНК при помощи иммунофлуоресцентной детекции включения 5-бромдезоксиуридина (BrdU).

Анализ клеточного цикла

Потенциальный эффект воздействия на клеточный цикл был оценен при помощи проточной цитометрии с культурами в пассажах P3 и P4. Чтобы оценить клетки в фазах S и G2 клеточного цикла, был использован ядерный антиген клеточной пролиферации (PCNA), который является маркером белка, связанного с ДНК-полимеразой (21).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Адипогенная, хондрогенная и остеогенная дифференциация стволовых клеток жировой ткани

Стволовые клетки показали четкие тенденции распределения по трем линиям: адипоциты, хондроциты и остеоциты (Рис. 2)

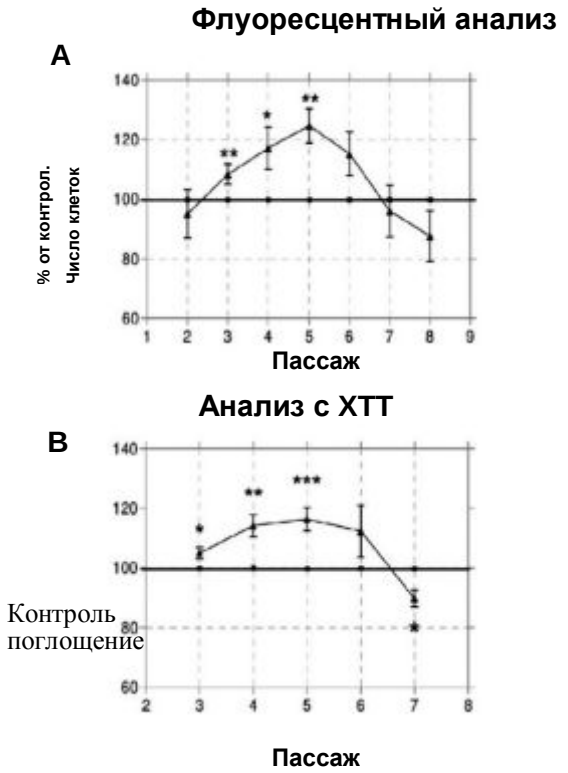

Рис. 3. Количественный анализ пролиферации. (A) Флуоресцентная микроскопия позволяет подсчитать клетки, окрашенные бисбензимидом, в пассажах P2 – P8. Данные нормализированы по соответствующим контрольным выборкам. (B) Кол. анализ с XTT на пролиферацию клеток в пассажах P3 – P7. *: 0.01 p 0.05; **: 0.001 p 0.01: ***: p <0.001 (критерий Стьюдента).

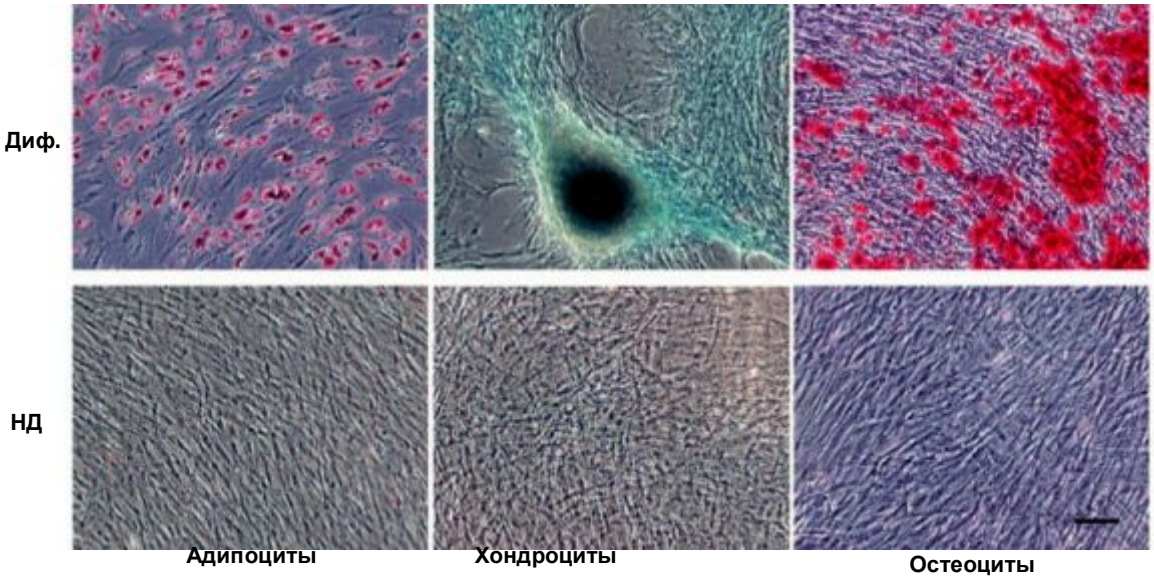

Рис. 2. При помещении в адипогенную, хондрогенную и остеогенную среды клетки, изолированные из жировой ткани, дифференцируются в соответствующие клеточные линии (Диф.), в то время как при отсутствии среды (НД) клетки остаются недифференцированными. Масштабная линейка = 100 µm.

Пролиферация под действием электротерапии

Эффект электротерапии зависит от пассажа. Стволовые клетки, воздействие на которые пришлось на пассажи P3 – P5, показали статистически значимый рост числа клеток, до 25% по сравнению с контролем в пассаже P5 (Рис. 3A). Колориметрический анализ с XTT подтвердил рост числа клеток до 20% в культурах, где воздействие пришлось на пассажи P3 – P5, по сравнению с контролем (Рис. 3B).

Доля BrdU+ (бромдезоксиуридин) клеток в прошедшей электротерапию группе оказалась значительно – на 38% – выше, чем в контрольной группе ($p < 0.001$).

Анализ клеточного цикла

Касательно эффекта емкостной/резистивной электротерапии на клеточный цикл, в пассажах P3 – P5 был скромный (3%), но статистически значимый спад в доле клеток в фазе G0/G1, который сопровождался статистически значимым ростом (21% и 10% по сравнению с контрольной группой) клеток в фазах S и G2/M, соответственно (Рис.4). Эти данные подкреплялись числом ядерных антигенов клеточной пролиферации PCNA в положительных клетках, где электротерапии вызвала статистически значимый рост (35%) по сравнению с контрольной группой.

Мультипотентость стволовых клеток жировой ткани после электротерапии

Через две недели, которые прошедшие воздействие электротерапии клетки и клетки контрольной группы провели в инкубаторе в присутствии соответствующей дифференцирующей среды, было обнаружено отсутствие значительных различий в схемах дифференциации в этих двух группах (Рис. 5).

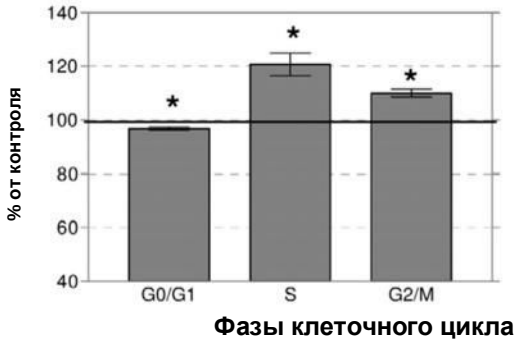

Рис. 4. Влияние электротерапии на число клеток в разных фазах цикла; процент по сравнению с контрольной группой (100%). *: 0.01 p 0.05.

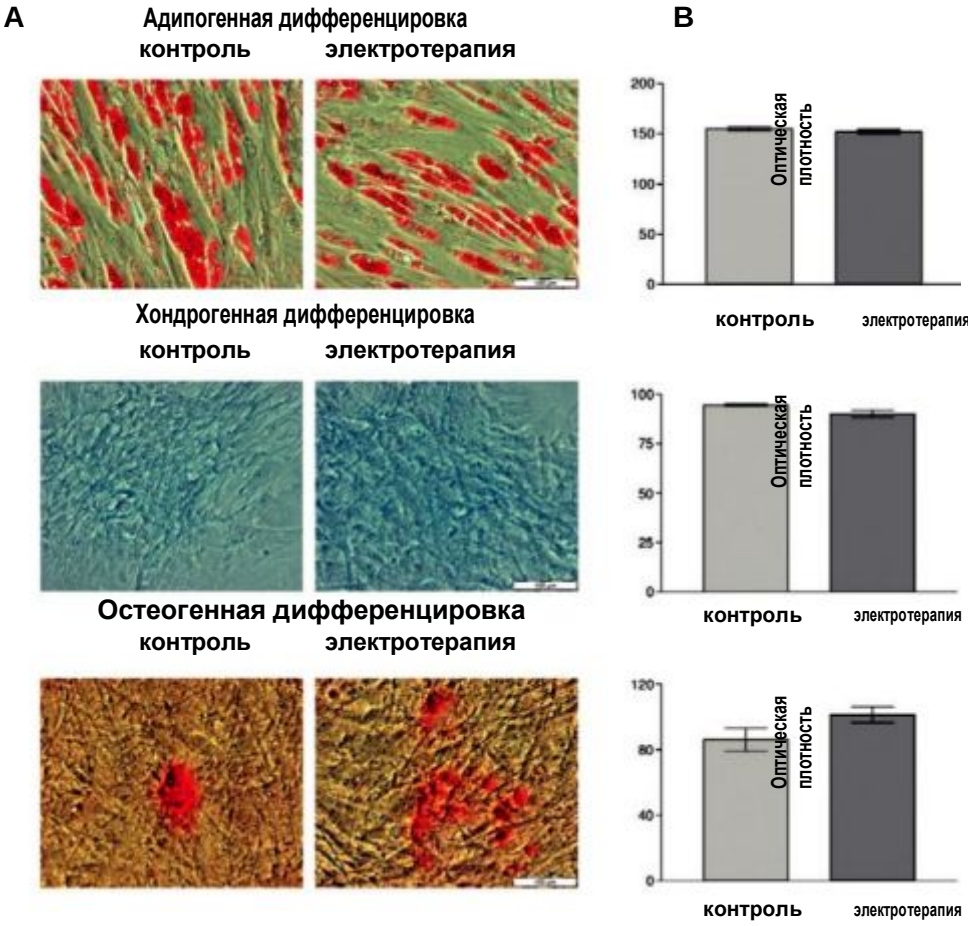

Рис. 5. Мультипотентность стволовых клеток жировой ткани после электротерапии. После сеансов электротерапии (или плацебо в контрольной группе) в течение 14 дней клеточные культуры в пассажах P3 и P4 выращивались в присутствии дифференцирующих сред. (A) верхние образцы – адипогенная среда, средние – хондрогенная и нижние – остеогенная, окрашенные масляным красным, альциановым синим и ализариновым красным, соответственно. Масштаб: 100 µm. (B) Дифференцировка стволовых клеток оценивалась при помощи окрашивания компьютерным визуальным анализом. Гистограммы показывают, что средние величины ± погрешность оптической плотности в группе электротерапии не имеет существенных отличий от соотв. параметров контрольной группы (p > 0.05).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показывают, что периодическое воздействие электрического стимула с частотой 448 кГц в рамках емкостной-резистивной электротерапии увеличивает процент клеток в фазах S, G2 и в митозе, и содействует пролиферации мезенхимальных стволовых клеток человека. Полученные результаты позволяют предположить, что емкостная-резистивная электротерапия может помогать регенерации тканей, активизируя пролиферацию стволовых клеток жировой ткани, находящихся в состоянии покоя в поврежденном участке, при этом не происходит снижения мультипотентности стволовых клеток для последующей адипогенной, хондрогенной или остеогенной дифференциации. Эти сведения, в сочетании с ранее опубликованными экспериментальными данными, свидетельствуют в пользу гипотезы о том, что терапевтический эффект, в том числе в регенерации тканей, от сеансов емкостной-резистивной электротерапии объясняется молекулярными и клеточными механизмами, не температурными.

Таким образом, изложенные выше результаты позволяют утверждать, что емкостная-резистивная электротерапия может содействовать или ускорить заживление повреждений путем пролиферации уже делящихся стволовых клеток. Исходя из этого, можно предположить, что емкостная-резистивная электротерапия может применяться как эффективное адъювантное средство для лечения ряда повреждений тканей и сосудов, или в качестве дополнительного средства у пациентов с противопоказаниями к ряду фармакологических средств. Емкостная-резистивная электротерапия может также использоваться как противовоспалительное средство.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1 Messerli MA, Graham DM: Extracellular electrical fields direct wound hea-ling and regeneration. Biol Bull 2011;221:79-92.

2 Pilla AA: Nonthermal electromagnetic fields: From first messenger to thera-peutic applications. Electromagn Biol Med 2013;32:123-136.

3 Belenky I, Margulis A, Elman M, Bar-Yosef U, Paun SD: Exploring chan-neling optimized radiofrequency energy: A review of radiofrequency history and applications in esthetic fields. Adv Ther 2012;29:249-266.

4 Boyette MY, Herrera-Soto JA: Treatment of delayed and nonunited fractures and osteotomies with pulsed electromagnetic field in children and adoles-cents. Orthopedics 2012;35:e1051-1055.

5 Whipple TL: From mini-invasive to non-invasive treatment using mono-polar radiofrequency: The next orthopaedic frontier. Orthop Clin North Am 2009;40:531-535, x.

6 Conner-Kerr T, Isenberg RA: Retrospective analysis of pulsed radiofrequen-cy energy therapy use in the treatment of chronic pressure ulcers. Adv Skin Wound Care 2012;25:253-260.

7 Lolis MS, Goldberg DJ: Radiofrequency in cosmetic dermatology: A review. Dermatol Surg 2012;38:1765- 1776.

8 San BH, Moh SH, Kim KK: Investigation of the heating properties of pla-tinum nanoparticles under a radiofrequency current. Int J Hyperthermia 2013;29:99-105.

9 Hernandez-Bule ML, Trillo MA, Bazan E, Martinez-Pascual MA, Leal J, Ube-da A: Nonthermal levels of electric currents applied in capacitive electric transfer therapy provokes partial cytotoxic effects in human neuroblasto-ma cultures. Neurocirugia (Astur) 2004;15:366-371; discussion 371.

10 Hernandez-Bule ML, Trillo MA, Cid MA, Leal J, Ubeda A: In vitro exposure to 0.57 MHz electric currents exerts cytostatic effects in HepG2 human hepatocarcinoma cells. Int J Oncol 2007;30:583-592.

11 Hernandez-Bule ML, Cid MA, Trillo MA, Leal J, Ubeda A: Cytostatic response of HepG2 to 0.57 MHz electric currents mediated by changes in cell cycle control proteins. Int J Oncol 2010;37:1399-1405.

12 Hernandez-Bule ML, Roldan E, Matilla J, Trillo MA, Ubeda A: Radiofrequen-cy currents exert cytotoxic effects in NB69 human neuroblastoma cells but not in peripheral blood mononuclear cells. Int J Oncol 2012;41:1251-1259.

13 Hernandez-Bule ML, Trillo MA, Ubeda A: Molecular mechanisms underlying antiproliferative and differentiating responses of hepatocarcinoma cells to subthermal electric stimulation. PLoS One 2014;9:e84636.

14 Ganzit GP, Stefanini L, Stesina G: Nuove methodice nei trattamento de-lla patología muscolo-articolare dell´atleta: La tercaterapia. Med Sport 2000;53:361-367.

15 Melegati G, Volpi P, Tornese D, Mele G: Rehabilitación en patologías del tendón. Revista del Deporte, Investigación de traumatología e investiga-ciones afines 1999;21:66-83.

16 Mondardini P, Tanzi R, Verardi L, Briglia S, Maione A, Draco E: Nuove meto-dología nel trattamento della patología muscolare traumática dell´atleta. Med Sport 1999;52:201-213.

17 Takahashi K ST, Onodera M, Hirabayashi S, Tsuzuki N, Zhong-Shi L: Clini-cal effects of capacitive electric transfer hyperthermia therapy for lumba-go. J Phys Ther Sci 1999;11

18 Takahashi K ST, Onodera M, Hirabayashi S, Tsuzuki N, Zhong-Shi L: Clini-cal effects of capacitive electric transfer hyperthermia therapy for cervi-co-omo-brachial pain. J Phys Ther Sci 2000;12:43-48.

19 Arnedo F, Andrew A, Till L, Sendrós S, Hellín S: Radiofrecuencia monopolar capacitiva/resistiva 448 kHz (indiba activ therapy) en el tratamiento reha-bilitador de lesiones de la musculatura isquitibial derivada de la práctica deportiva: XIV Congreso Nacional de la Federación Española de Medicina del Deporte. Santander, Spain, 2012, XXIX, pp 915.

20 Sust F, Linde X, Sendrós S, Figueras G, Till L: Radiofrecuencia monopolar capacitiva/resistiva 448 kHz (indiba activ therapy) en el tratamiento de lesiones músculo-tendinosas: XIV Congreso Nacional de la Federación Es-pañola de Medicina del Deporte. Santander, Spain, 2012, XXIX, pp 915.

21 Woods AL, Hall PA, Shepherd NA, Hanby AM, Waseem NH, Lane DP, Levison DA: The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immu-nostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S, G2, M phase fraction (flow cytometric analysis) and prognosis. Histopathology 1991;19:21-27.

MKT-2014-186 V3-2015.10.13 - ENG