

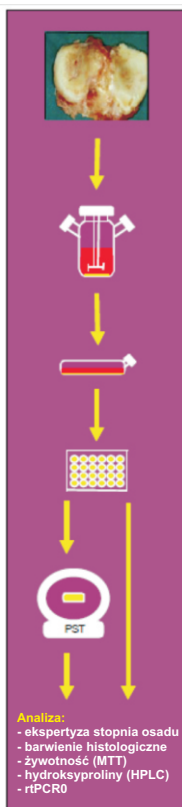
# WPŁYW TERAPII SYGNAŁEM PULSACYJNYM NA TRÓJWYMIAROWE KULTURY CHONDROCYTÓW

J. Zimmermann<sup>1</sup> • I. Krüger<sup>1</sup> • T. Knedel<sup>1/3</sup> • M. Sittinger<sup>1</sup> • M. Faensen<sup>2</sup>

## Wprowadzenie:

Pulsujące pola elektromagnetyczne (PEMF) były stosowane na szeroką skalę w leczeniu trudno leczących się złamań i związanych z nimi problemów z leczeniem kości od czasu ich zatwierdzenia przez Food and Drug Administration (FDA) w 1979 roku, ze średnim wskaźnikiem wyleczeń na poziomie 70-80% w wielu centrach w różnych krajach świata. Specjalna konfiguracja pulsujących pól magnetycznych jest stosowana w Terapii Sygnałem Pulsacyjnym<sup>®</sup>. Wielu pacjentów leczonych Terapią Sygnałem Pulsacyjnym<sup>®</sup> (PST<sup>®</sup>) pozbyło się bólu i wykazywało mniej symptomów osteoartrozy po jej zakończeniu.

## Materiały i metody:



Do badania pobrano próbki tkanki chrzęstnej łątkowej od różnych pacjentów (średnia wieku 71 lat) cierpiących odpowiednio na chorobę zwyrodnieniową stawu biodrowego i chorobę zwyrodnieniową stawu kolanowego.

Chondrocyty zostały wyizolowane, rozprze-strzeżone w hodowli jednowarstwowej i pogrupowane. Przygotowana została długotrwała uprawa z wykorzystaniem kultur osadowych, która następnie została poddana stymulacji PST<sup>®</sup> oraz kontroli. Kultury stymulowane PST<sup>®</sup> były wystawiane na jednogodzinny wpływ PST<sup>®</sup> przez 9 kolejnych dni.

Urządzenie terapeutyczne PST<sup>®</sup> składało się z generatora pola magnetycznego, elektronicznego interfejsu i systemu toroidalnych cewek. Produkuje ono jednokierunkowe statyczne eliptyczne pole magnetyczne o natężeniu 10 – 15 Gaussów ze zmienną częstotliwością w przedziale 10 i 30 Hz.

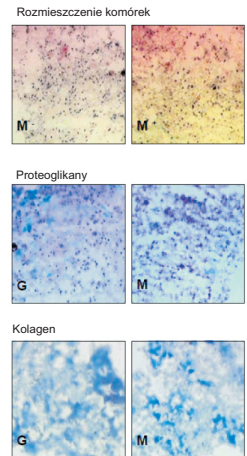
Osadzenie się składników macierzy zostało zweryfikowane histologicznie przez zabarwienie proteoglikanów błękitem alcjańskim, natomiast kolagenu błękitem azaniowym. Żywotność kultur chondrocytów została udokumentowana z wykorzystaniem testu kultur komórkowych (MTT), a wielkość osadu ustalona analizą obrazu przeprowadzoną z wykorzystaniem Adobe Photoshop<sup>®</sup>.

Ilość hydroksyproliny zmierzono wysokosprawną chromatografią ciecząową (HPLC), aby pośrednio określić ilościowo zawartość kolagenu.

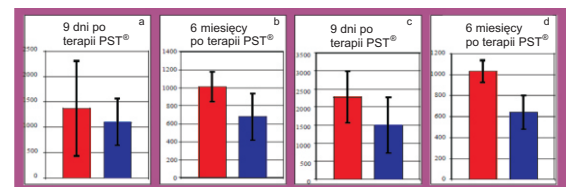
Referencje:  
 Trock D.H., Bollet A. J., Markoll R., The effect of pulsed electromagnetic fields in the treatment of osteoarthritis of the knee and cervical spine. Report of randomized, double blind, placebo controlled trials. Journal of Rheumatology 1994; 21:10, 1904-1911.  
 M. Sittinger et al., Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocyte. Biomed Mat Res 33, 57-63, (1996).  
 M. Sittinger, J. Bujia, N. Rotter, D. Reitzel, W. W. Minuth, G. R. Brumester, Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. Biomaterials. 17, 237-242, (1996).  
 P. D. Benya, J. D. Schaffer, Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. Cell, 30, 215-224, (1982).  
 K. van der Mark, V. Gauss, H. van der Mark, P. Müller, Relationship between cell shape and type of collagen synthesized as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. Nature, 267, 531-532, (1977).  
 A. I. Caplan, Cartilage. Sci. Am. 251 (4), 84-94, (1984).

## Wyniki:

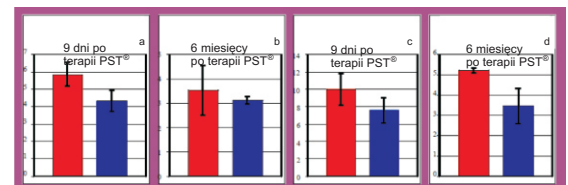
Barwienie histologiczne wykazało produkcję proteoglikanów i kolagenu. Test MTT potwierdził żywotność komórek. Mikroskopowo, 9 dni i 6 miesięcy po zakończeniu leczenia PST, osady chondrocytów wydawały się rozmiarowo większe w porównaniu do chondrocytów nie leczonych PST<sup>®</sup>. Odnosząc się do ilości hydroksyproliny (HPLC), osady chondrocytów poddane PST<sup>®</sup> wykazały zwiększoną syntezę macierzową kolagenu.



Rozmieszczenie komórek – Proteoglikany – Kolagen  
 Konwencjonalne barwienie H&E chondrocytów łątkowych poddanych stymulacji PST (M+) i kontrolnych (M-), barwienie proteoglikanów błękitem alcjańskim oraz barwienie składników macierzy kolagenowej azaniem w kulturach osadowych z ludzkich stawów (G) i ludzkich chondrocytów łątkowych (M).



Stożek osadu (wynik punktowy i średnia luminacja) osadowych kultur chondrocytów leczonych PST<sup>®</sup> (czerwony) i kontrolnych (niebieski). Stożek osadu był mierzony dla chondrocytów stawowych 9 dni (a) i 6 miesięcy (b) po zakończeniu terapii PST<sup>®</sup> i dla chondrocytów łątkowych 9 dni (c) i 6 miesięcy (d) po zakończeniu terapii.



Zawartość hydroksyproliny (ng/mg mokry ciężar) osadowych kultur chondrocytów leczonych PST<sup>®</sup> (czerwony) i kontrolnych (niebieski). Hydroksyprolina była mierzona dla chondrocytów stawowych 9 dni (a) i 6 miesięcy (b) po zakończeniu terapii PST<sup>®</sup> i dla chondrocytów łątkowych 9 dni (c) i 6 miesięcy (d) po zakończeniu terapii.

## Dyskusja:

Celem naszego eksperymentu było zbadanie roli jaką odgrywa PST<sup>®</sup> w formowaniu macierzy chondrocytowej w tkance chrzęstnej i łątkowej dorosłych ludzi. Postawiono hipotezę, że terapia PST<sup>®</sup> oddziałująca w pulsującym polu elektromagnetycznym może fizjologicznie stymulować chondrocyty do zwiększania ich aktywności metabolicznej i do formowania zewnątrzkomórkowej macierzy chrzęstnej. Podsumowując tematykę formowania macierzy chrzęstnej, analizy biochemiczne i histologiczne odśloniły marginalny wpływ PST<sup>®</sup> na artretyczne chondrocyty stawowe. Aktualne wyniki tego badania pokazują obiecujące podejście do oceny wpływu PST<sup>®</sup> powodującego łagodzenie skutków chorób artretycznych. Do dalszej analizy wpływu PST<sup>®</sup> na chondrocyty stosowane są analizy ekspresyjne odrębnych podzbiorów genów macierzy zewnątrzkomórkowej (kolagen typu I, II oraz X, agrekany i białka łączące), po to, aby uzyskać gruntowną wiedzę zdarzeń molekularnych będących skutkami leczenia PST<sup>®</sup>.