

TERAPIA SYGNAŁEM PULSACYJNYM (PST) ZWIĘKSZA KONCENTRACJĘ PROTEOGLIKANÓW W KULTURACH CHONDROCYTÓW U LUDZI.

*R. MARKOLL, F. NERUCCI, A. FIORAVANTI, C. TOFI,
K. RIGHESCHI, R. MARCOLONGO

ISTYTUT REUMATOLOGII, UNIWEKSYTET SIENA, SIENA, WŁOCHY.

*BIO-MAGNETICS THERAPY SYSTEMS, Inc., BOCA RATON, FLORIDA 33432, USA I MONACHIUM, NIEMCY.

WPROWADZENIE

Artretyzm jest jedną z najpowszechniejszych występujących chorób bezpośrednio dotyczących tkanki chrzęstnej stawów. Właściwości biomechaniczne tkanki chrzęstnej zależą od macierzy zewnątrzkomórkowej produkowanej przez chondrocyty, komórki zdolne do utrzymywania równowagi dynamicznej pomiędzy procesami anabolicznymi i katabolicznymi. Aktywność metaboliczna tych komórek jest regulowana przez wiele pośredników, takich jak cytokiny, hormony i czynniki wzrostu. Interleukina 1 β (IL-1 β) jest cytokiną związaną z procesami degradacyjnymi tkanki chrzęstnej. Jest ona produkowana przez kilka rodzajów komórek i może znajdować się w płynie stawowym obiektów dotkniętych artretyzmem.

Dowiedziano, że kliniczne zastosowanie Terapii Sygnałem Pulsacyjnym (PST™) było skuteczne w leczeniu 70,000 pacjentów cierpiących na artretyzm. Aby wytłumaczyć taką skuteczność, zakłada się, że potencjały faradyczne indukowane przez PST naśladują wewnętrzne ciśnienie generowanych przepływów potencjałów.

W tej pracy przebadaliśmy wpływ in vitro PST na kultury chondrocytów w ludzkich chondrocytach stawowych hodowanych w obecności IL-1 β oraz przy jej braku. W tych warunkach badaliśmy wpływ PST, poprzez aktywność metaboliczną szacowaną przez poziomy proteoglikanów (PG) w pożywce kultur oraz ocenę morfologiczną przeprowadzaną z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) i skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM).

Materiały i metody

Ludzka tkanka stawowa została pozyskana z głowy kości udowej ośmiu obiektów poddanych zabiegowi wszczepiania protezy biodrowej. Zaraz po zakończeniu zabiegu wycięto aseptycznie makroskopowo zdrową tkankę chrzęstną i rozdrobnilo ją na kawałki o wymiarach 2 mm². Fragmenty chrząstki zostały wymyte w roztworze soli fizjologicznej i roztworzone przez klostridiolakolagenazę.

Chondrocyty były hodowane w żelu alginowym na szalkach Petriego przez 72 godziny w obecności IL-1 β oraz przy jej braku (5ng/ml). Niektóre szalki były poddawane stymulacji PST przez 3 godziny dziennie. Kultury kontrolne przetrzymywano w identycznych warunkach, ale nie zostały one poddane stymulacji PST. Po okresie hodowania pożywka została usunięta i zebrała w celu określenia poziomu proteoglikanów metodą immunoenzymatyczną na mikrotalerzach do ilościowego mierzenia ludzkich proteoglikanów. Komórki w żelu alginowym zostały natychmiast utracone dla transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) i skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM).

Dane zostały wyrażone jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe z proteoglikanów uwolnionych do pożywki kultur na mikrogram DNA w ośmiu testowanych kulturach. Do analizy statystycznej wykorzystano

test Studenta; uzyskane $p < 0,05$ świadczy o wysokiej istotności statystycznej danych. W przypadku gdy dane miały rozkład normalny, wykorzystywano test U Manna-Whitneya.

Wyniki

Na pierwszym schemacie widoczna jest koncentracja proteoglikanów w pożywce kultur przed rozpoczęciem badania, w obecności IL-1 β z poziomem stężenia 5ng/ml bez stymulacji PST oraz pod wpływem PST. Obecność IL-1 β determinuje znaczne ($p < 0,05$) obniżenie poziomu proteoglikanów, aczkolwiek jeżeli komórki są hodowane w obecności IL-1 β pod wpływem PST, zaobserwowano statystycznie istotną ($p < 0,05$) restytucję produkcji proteoglikanów.

Wyniki dotyczące produkcji metabolicznej zostały następnie

potwierdzone przez odkrycia morfologiczne uzyskane dzięki TEM i SEM. Schemat 2 pokazuje zdjęcia chondrocytów wykonane przy użyciu TEM. Rysunek 2A przedstawia hodowaną komórkę w początkowych warunkach: jądra komórkowe (N) pojawiają się euchromatycznie, cytoplazma zawiera dużą ilość wstępnego retikulum endoplazmatycznego (RER) oraz kropelki lipidowe. Rysunek 2B pokazuje komórkę hodowaną w obecności IL-1 β i widać na nim ewidentne ślady zniszczeń: liczne wakuole (V) w cytoplazmie pozbawione są swoich typowych struktur.

Rysunek 2C pokazuje komórki hodowane w początkowych warunkach a następnie poddane wpływowi PST: komórka wykazuje dobry stan zdrowia. Rysunek 2D pokazuje komórkę hodowaną w obecności IL-1 β oraz poddawaną stymulacji PST; można zaobserwować wyraźną restytucję struktur komórkowych: cytoplazma zawiera wstępne oraz równe retikulum endoplazmatyczne oraz kropelki lipidowe.

Rysunek 3 pokazuje obrazy komórek uzyskane dzięki SEM. Rys. 3A pokazuje komórki w początkowych warunkach: możemy zaobserwować ciekawą rzecz – komórka zachowuje swój sferyczny kształt, niektóre wydzielane ziarenka oraz gęstą sieć włókien kolagenu. Rys. 3B pokazuje komórkę hodowaną w obecności IL-1 β : jej uszkodzenia są wyraźnie widoczne a jest to dodatkowo potwierdzone utratą procesów cytoplazmatycznych i obecnością zmian powierzchniowych. Rys. 3C pokazuje komórki hodowane w początkowych warunkach a następnie poddane stymulacji PST: uzyskany obraz SEM pokazuje włókna macierzowe występujące w dużych ilościach oraz wydzielone ziarenka. Rys. 3D pokazuje komórkę hodowaną w obecności IL-1 β oraz poddawaną stymulacji PST; można zaobserwować wyraźną restytucję struktur komórkowych jest to również potwierdzone obecnością kilku ziarenek na jej powierzchni.

Dyskusja

Kultury chondrocytów reprezentują uzasadniony i uproszczony model biologiczny, na którym można testować efekty oraz wpływ różnych czynników na syntezę i degradację składników zewnątrzkomórkowych. Mogą one mieć również zastosowanie dla oceny morfologicznej i ultrastrukturalnej.

W tym badaniu przetestowaliśmy wpływ stymulacji PST na morfologię i metabolizm ludzkich chondrocytów in vitro. Testy te potwierdziły wyniki wcześniejszych badań przeprowadzonych na eksperymentalnych modelach in vitro: IL-1 β wywołuje zmniejszenie produkcji proteoglikanów. W momencie gdy komórki były hodowane w obecności IL-1 β i jednocześnie poddawane stymulacji PST, zanotowano restytucję koncentracji proteoglikanów w pożywce kultur. Wyniki dotyczące produkcji metabolicznej zostały dalej potwierdzone poprzez badania morfologiczne i ultrastrukturalne przeprowadzone z wykorzystaniem TEM i SEM.

przeprowadzone z wykorzystaniem TEM i SEM.

Te dane pokazują ochronną rolę odgrywaną przez PST, która przeciwdziała efektom wywołanym przez IL-1 β na chondrocytach in vitro. Wyniki te potwierdzają in vitro dane uzyskane w badaniach klinicznych przeprowadzanych na pacjentach dotkniętych artretyzmem.

Dalsze badania są konieczne aby wyjaśnić wagę tego podejścia w leczeniu schorzeń tkanki chrzęstnej, takich jak artretyzm.

Schemat 1.

Poziom proteoglikanów zmierzony w pożywce kultur (ng/ μ g DNA), w początkowych warunkach, w obecności IL-1 β z i bez stymulacji PST.

PG measured in culture medium (ng/ μ g DNA) at baseline conditions, in the presence of IL-1 β without and with PST stimulation

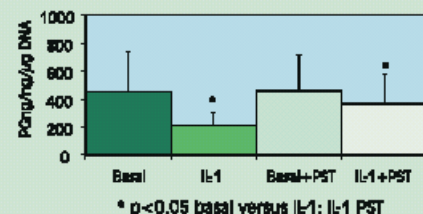


Fig. 1

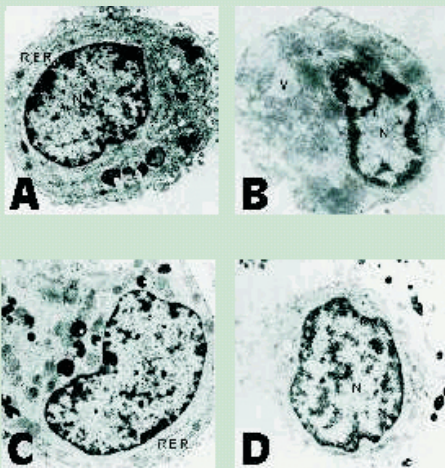


Fig. 2 A, B, C, D

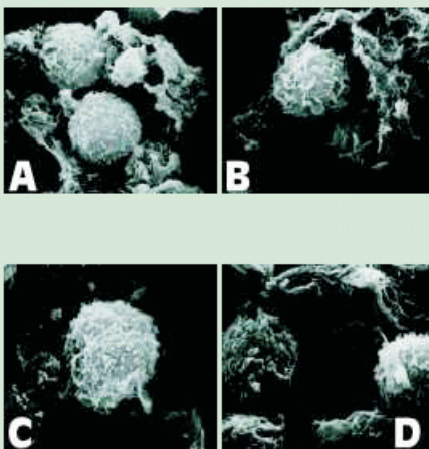


Fig. 3A, B, C, D