

Proliferacja i różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych po ekspozycji na pole elektromagnetyczne

Osuchowska P. N., Trafny E. A., Andrejuk K., Wała M., Podwysocka A. H., Łapiński M. P.

Centrum Inżynierii Biomedycznej, Instytut Optoelektroniki, Wojskowa Akademia Techniczna, ul. gen. Sylwestra Kaliskiego 2, 00-908 Warszawa

Wstęp

W ostatnich latach wzrost wiedzy na temat komórek macierzystych poszerzył możliwości ich zastosowań oraz spowodował szybki rozwój medycyny regeneracyjnej. Charakterystyczną cechą komórek macierzystych jest zdolność do proliferacji bez konieczności różnicowania. Komórki te są samoodnawialne (zdolne do ochrony własnej populacji) i zarazem są w stanie różnicować się w różne linie komórek zdolne do regeneracji uszkodzonych tkanek. Obecnie najszerze zastosowanie w medycynie i największe nadzieje terapeutyczne wiąże się z komórkami mezenchymalnymi MSC (ang. mesenchymal stem cells). MSC należą do grupy komórek multipotencjalnych, czyli takich, które zdolne są do różnicowania w obrębie danego listka zarodkowego ektodermy, endodermy lub mezodermy.

Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej uznaje komórkę za mezenchymalną komórkę macierzystą, jeśli spełnia ona następujące kryteria:

- posiada charakter multipotencjalny,
- można wyizolować ją z dorosłego organizmu, a następnie hodować *in vitro*,
- ma zdolność do samoodnowy i potencjał do różnicowania w różne linie komórkowe w warunkach *in vitro*,
- tworzy populację komórek zdolnych do adhezji do plastiku,
- nie posiada markerów charakterystycznych dla linii hematopoetycznych (CD14, CD34, CD45, HLA klasy II),
- posiada na swojej powierzchni określone makrocząsteczki m. in. CD73, CD29 czy CD105.

Efekty ELF-EMF

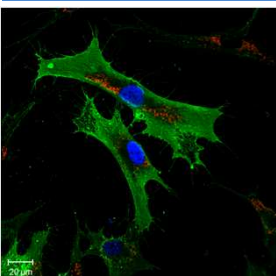


Ryc.1 Komora bezodbićcowa. Zamknięte, metaliczne przesłanianie do ochrony przed promieniowaniem elektromagnetycznym.

Badania wykazały, że pole elektromagnetyczne o niskich częstotliwościach ELF-EMF (ang. Extremely Low Frequency Electromagnetic Field) wpływa na różnicowanie i proliferację komórek mezenchymalnych. Działanie pola zależy od: typu i pochodzenia komórki, czasu trwania hodowli, podłoża oraz od parametrów pola elektromagnetycznego tj. rodzaju sygnału (pulsacyjne, ciągłe), stosowanej częstotliwości i natężenia oraz czasu ekspozycji komórek na działanie pola (Ross et al. 2015).

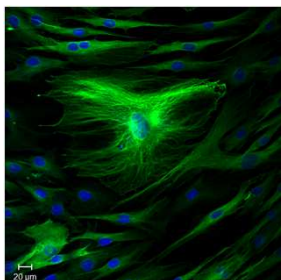
W celu izolacji komórek od zewnętrznego pola elektromagnetycznego podczas doświadczeń, inkubator z wbudowaną cewką umieszczony został wewnątrz komory bezodbićcowej widocznej na Ryc.1.

Różnicowanie MSC



Ryc.2 Mezenchymalne komórki macierzyste wybarwione SSEA-4 (marker komórek embrionalnych) i żelazem. Zdjęcie wykonano w IMDIK PAN za pomocą mikroskopu konfokalnego LSM510 firmy Zeiss

Procesy zachodzące w komórkach są regulowane poprzez bioelektryczne sygnały pochodzące z pomp jonowych oraz kanałów obecnych na powierzchni błon komórkowych. Sygnały przekazywane w wyniku zmiany potencjału determinują wiele procesów komórkowych, takich jak proliferacja, różnicowanie czy apoptoza. Wykazano, że stymulacja za pomocą pola elektromagnetycznego o niskich częstotliwościach wpływa na przepuszczalność kanałów jonowych i polaryzację błony komórkowej oraz pobudza większość struktur molekularnych.



Ryc.3 Mezenchymalne komórki macierzyste wybarwione β -tubuliną (marker różnicowania neuralnego). Zdjęcie wykonano w IMDIK PAN przy pomocy mikroskopu konfokalnego LSM 510 firmy Zeiss

Choć w ostatnich latach ukazało się wiele doniesień na temat wpływu ELF-EMF na różnicowanie MSC (Ryc.2), to dokładny mechanizm tego zjawiska nie został jeszcze poznany. Zaobserwowano pozytywny efekt działania pola elektromagnetycznego na różnicowanie komórek mezenchymalnych w kierunku neurogeny (Ryc.3) (Park et al. 2013), adipogeny (Sun et al. 2009), chondrogeny (Mayer-Wagner et al. 2011), kardiomiogeny (Gaetani et al. 2009) oraz osteogeny (Luo et al. 2012). Najwięcej publikacji można znaleźć na temat wpływu ELF-EMF na proces osteogeny.

Rok	Charakterystyka pola	Wpływ na różnicowanie	Wpływ na proliferację i żywołność	Referencje
2008	PEMF Serie 20 impulsów o $v=15\text{Hz}$ po 4,5ms i maks. $I=1,6\text{mT}$. Czas ekspozycji 8 godzin dziennie przez 24 dni	PEMF daje nieznaczny efekt przy stosowaniu plastiku i medium do osteogeny, natomiast dodatek BMP2 i PEMF promuje wzrost TGF β 1 i PGE2. PEMF z zastosowaniem dysku CaP (cienki film z fosforanu wapnia) zwiększa stężenie ALP i osteokalcyny po 20 dniu	Samo PEMF nie wywołuje spodziewanych efektów, natomiast z dodatkiem BMP2 zaobserwowano szybszy wzrost komórek we wczesnej fazie	Schwartz et al. <i>Pulsed electromagnetic fields enhance BMP-2 dependent osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells</i> (2008) J. Orthop. Res. 26, 1250-1255
2009	SPEMF kwazi-prostokątne impulsy; czas trwania impulsu 300 μ s $v=75\text{Hz}$ i $I=0,13\text{mT}$ (2mV/cm). Czas ekspozycji 2h/dzień. Ekspozowane PEMF przez 14 i 28 dni	Większa aktywność ALP w komórkach traktowanych PEMF, ale niewielki wzrost ekspresji Runx2/ Cbfa1, COL1 oraz nie stwierdzono różnicy w mineralizacji macierzy	W medium wzrostowym PEMF nie wpływa znacząco na tempo proliferacji MSC	Issai et al. <i>Modulation of Osteogenesis in Human Mesenchymal Stem by Specific Pulsed Electromagnetic Field Stimulation</i> (2009) J of Orthop. Res. 1169-1174
2010	PEMF Ciągła stymulacja $v=15\text{Hz}$, $I=1\text{G}$ (0,1mT) w 5ms seriach składających się z 5ps impulsów przez max 14dni	PEMF powoduje wzrost mineralizacji w 9 i 14 dniu. Znaczący wzrost ekspresji: BMP2, TGF β , MMP1 9 dnia i MMP3 5 dnia oraz Rankl 14 dnia stymulacji. PEMF nie wpływa na aktywność ALP	Brak pozytywnego efektu. W 14 dniu większą proliferację wykazywały komórki nie poddane działaniu pola elektromagnetycznego	Jansen et al. <i>Stimulation of osteogenic differentiation in human osteoprogenitor cells by pulsed electromagnetic fields: an in vitro study.</i> (2010) BMC Musculoskelet. Disord. 11, 188
2011	ELF-EMF $v=15\text{Hz}$ i $I=5\text{mT}$ Czas ekspozycji 45 min trzy razy dziennie co 8 godzin przez 21 dni.	EMF wraz z czynnikami wzrostowymi promuje chondrogenę (barwienie safraniną i toluidyną). Ekspresja kolagenu typu II zależy dodatkowo od pasażu komórkowego	brak informacji	Mayer-Wagner et al. <i>Effects of low frequency electromagnetic fields on the chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells</i> (2011) <i>Bioelectromagnetics</i> 32, 283-290
2012	PEMF Prostokątne impulsy 7ms $I=3,6\text{mV/cm}$ i $v=10\text{Hz}$ trwające 4h i co 4h, czas traktowania 28 dni	Synergiczny pozytywny efekt pola i szkieletów. Zwiększona aktywność ALP, mineralizacja macierzy oraz ekspresja genów OP, COL1, OC	Wzmocnienie proliferacji przez synergiczny efekt stosowania szkieletów 3D (polikaprolakton+kolagen) i pola	Hess et al. <i>Synergistic effect of defined artificial extracellular matrices and pulsed electric fields on osteogenic (2012) Biomat. 33 8975-8985</i>
2012	PEMF $I=1,1\text{mT}$, czas ekspozycji 30 min dziennie przez 21 dni, 6 różnych częstotliwości 5, 25, 50, 75, 100, 150 Hz	Najlepsze efekty przy zastosowaniu pola o $v=50\text{Hz}$. MSC traktowane PEMF wykazywały wzrost ALP oraz po 14 dniu wzrost poziomu COL1 i OC, wykazywały również większy stopień mineralizacji macierzy	Wzrost proliferacji komórek traktowanych PEMF, zmiana morfologii tych komórek	Luo et al. <i>Effects of pulsed electromagnetic field frequencies on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells</i> (2012) <i>Orthopedics</i> 35, e526-e531
2013	PEMF $I=2\pm 0,2\text{mT}$ ($\pm 1\text{mV}$), $v=75\pm 2\text{Hz}$ czas trwania impulsu ok. 1,3ms. Czas ekspozycji: 5, 10, 30 min oraz 1, 4, 8 godzin przez 7 i 21 dni.	PEMF powoduje wzrost ekspresji genów BOSP, OP, OSN, Runx2 w 21 dniu. Wzrost aktywności ALP i wzrost stopnia mineralizacji macierzy	Nie ma znaczącej różnicy w żywołności do 21 dnia pomiędzy komórkami traktowanymi PEMF i kontrolą. Po 21 dni obserwuje się wzrost proliferacji komórek PEMF	Ceccarelli et al. <i>A comparative analysis of the in vitro effects of pulsed electromagnetic field treatment on osteogenic differentiation of two different mesenchymal cell lineages</i> (2013) <i>Biores. 2</i> 283-294.
2014	PEMF $I=1,5\text{mT}$, $v=75\text{Hz}$ czas trwania impulsu ok. 1,3ms cykl 1/10. Czas ekspozycji 28 dni	PEMF zwiększa wydzielanie ALP i podwyższa poziom OC (dodatek BMP2 wzmacnia ten efekt). Zaobserwowano 95% wzrost mineralizacji po stymulacji PEMF z dodatkiem BMP2	brak informacji	Ongaro et al. <i>Pulsed electromagnetic fields stimulate osteogenic differentiation in human bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stem cells</i> (2014) <i>Bioelectromagnetics</i> 35, 426-436
2015	PEMF Ciągła stymulacja (24/7). Pole o częstotliwości 15Hz i natężeniu 1 G (0,1mT). Czas ekspozycji: 5 ms serie składające się 1ms impulsów	Samo PEMF nie powoduje znaczących zmian w osteoindukcji MSC. Dodatek DHEA wraz z działaniem PEMF znacząco podnosi ekspresję ALP, SMAD1, RUNX2, OP, OC	Zwiększona żywołność komórek o 13% dnia 7 a o 16% w 14 dniu	Kaivosoja et al. <i>The effect of pulsed electromagnetic fields and dehydroepiandrosterone on viability and osteo-induction of human mesenchymal stem cells</i> (2015) <i>Tissue Eng. Regen. Med.</i> 9, 31-40.

Tab. 1 Wpływ pola elektromagnetycznego na proliferację i różnicowanie komórek MSC w kierunku osteogeny i chondrogeny. PEMF-pulsacyjne pole elektromagnetyczne (ang. pulsed electromagnetic field), OP (ang. osteopontin), ALP (ang. alkaline phosphatase), OC (ang. osteocalcin), OSN (ang. osteonectin), COL1 (ang. collagen type I), DHEA (ang. dehydroepiandrosterone), MMP1 (ang. matrix metalloproteinase-1), SMAD1 (ang. small body size and mothers against decapentaplegic-related protein-1) RUNX2 (ang. runt-related transcription factor-2), Cbfa1 (ang. core binding factor alpha 1), BMP-2 (bone morphogenetic protein 2), TGF β (ang. transforming growth factor beta), PGE2 (ang. prostaglandin E2)

W celu potwierdzenia osteogeny oznacza się obecność charakterystycznych markerów oraz ekspresję specyficznych genów. W tabelce powyżej wymienione zostały najważniejsze z nich tj. fosfataza alkaliczna (ALP), kolagen typu I (COL1), osteokalcyna (OC) czy geny tj. RUNX2 czy Cbfa1. Niestety z zebranych publikacji nie można jednoznacznie stwierdzić, jaką rolę pełni pole elektromagnetyczne w proliferacji i różnicowaniu komórek mezenchymalnych. Wynika to prawdopodobnie z zastosowania różnych warunków, zarówno podłoża jak i parametrów pola. Najlepsze wyniki otrzymane zostały w przypadku stosowania pulsacyjnego pola elektromagnetycznego (PEMF) oraz dodatkowych komponentów (tj. szkielety, dyski, DHEA) czy czynników wzrostowych (tj. TGF β).

POZOSTALE PIŚMIENICTWO:

- Park et al. *Electromagnetic fields induce neural differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells via ROS mediated EGFR activation* (2015) *Neurochem. Int.* 62: 418-424
- Gaetani et al. *Differentiation of human adult cardiac stem cells exposed to extremely-low frequency electromagnetic fields* (2009) *Cardiovasc. Res.* 82, 411-420
- Ross et al. *The effect of low-frequency electromagnetic field on human bone marrow stem/progenitor cell differentiation* (2015) *Stem Cell Res.* 15, 96-108
- Sun et al. *Effect of pulsed electromagnetic field on the proliferation and differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells* (2009) *Bioelectromagnetics* 30, 251-260