

5. Paukov B.C. Pathological anatomy of alcoholism / B.C. Paukov, A. Ugryumov // Alcohol and public health in Russia. – M., 1998. – P. 202 – 204.
6. Magalhaes J.P., Eliaers F., Remacle J. Stress-induced premature senescence as alternative toxicological method for testing the long-term effects of molecules under development in the industry // Biogerontology. – 2000. – № 1. – P.179–183.

Acțiunea câmpului electromagnetic pulsat de frecvență joasă asupra proliferării și morfologiei celulelor stem mezenchimale

*C.Lîsîi¹, I.Sainsus², V. Nacu¹

Universitatea de Medicină și Farmacie «Nicolae Testemițanu»

¹Laboratorul “Inginerie tisulară și culturi celulare”.

²Laboratorul Institutului de Fizică al AȘM

*Corresponding author: E-mail: lisii.corneliu@yahoo.com.

Action of low frequency pulsed electromagnetic fields on proliferation and morphology of the mesenchymal stem cells

C.Lîsîi, I.Sainsus, V. Nacu

Stimulation of cell division is the source of physiological recovery that provides the most reliable perspective in tissue engineering. A non-invasive and accessible method of amplifying the process of cell division is using electromagnetic fields. Our purpose was to analyze the oscillating electromagnetic fields capacity to influence the cellular proliferation *in vitro*. For this purpose, we used cell cultures of mesenchymal stem cells, derived from 14 days avian embryos. Cells were subjected to a quasi-rectangular pulse of electromagnetic field with duration of 300 μs, a frequency of 7.5 Hz, 2 hours each day for 7 days. The results indicate a 25% increase in the number of cells subjected to the magnetic field, and this report was not influenced by the cell density. The cell morphology showed no difference between groups. These results suggest the possibility of using low frequency pulsed electromagnetic fields in tissue engineering with the purposes to accelerate mesenchymal stem cell division, which can be applied in bone regeneration therapy.

Key words: Stem cell, pulsed electromagnetic field, cell culture, tissue engineering, bone regeneration.

Действие низкого частотного импульсного электромагнитного поля на пролиферацию и морфологию мезенхимальных стволовых клеток

Стимуляция физиологического деления клеток является источником восстановления клеток, который обеспечивает наиболее надежные перспективы в тканевой инженерии. Использование электромагнитных полей является неинвазивным и доступным методом усиления процесса деления клеток. Целью этой работы был анализ способности пульсных электромагнитных полей влиять на клеточную пролиферацию *in vitro*. Для этой цели использовали культуру мезенхимальных стволовых клеток, полученных из птичьих эмбрионов. Клетки подвергались квази-прямоугольным пульсным электромагнитным полям с длительностью 300 μs, частота 7,5 Гц, 2 часа каждый день в течение 7 дней. Полученные результаты указывают на 25% рост количества клеток в группе подвергнутом магнитному полю чем в контрольной, и результат не зависит от плотности клеток. Морфология клеток не выявила различий между группами. Эти результаты свидетельствуют о возможности использования низкочастотных пульсных электромагнитных полей в тканевой инженерии с целью ускорить деление мезенхимальных стволовых клеток.

Ключевые слова: стволовые клетки, импульсные электромагнитные поля, культура клеток, тканевой инженерии, стволовые клетки.

Câmpurile electromagnetice pulsate (CEMP) sunt aplicate clinic pentru a stimula regenerarea osoasă [15]. Inițial, eficiența CEMP era asociată cu accelerarea formării matricei osoase din cauza apariției locale a unui curent electric slab, indus de câmpul magnetic [4,11].

Studiile ulterioare au indicat că câmpurile electromagnetice pot vindeca fracturile osoase și încetinesc pierderea de matrice osoasă la animale [3,9,13,19], aceasta a orientat aplicarea clinică în domeniul regenerării osoase. În pofida aplicării cu succes a câmpurilor electromagnetice au fost raportate și studii cu privire la efectele negative asupra proliferării și a diferențierii osteoblastelor [20, 21]. Sub influența câmpurilor magnetice specifice a fost determinat că activitatea fosfatazei alcaline crește, însă proliferarea osteoblastică este limitată [19]. Studiile actuale au demonstrat că aprovizionarea tisulară fiziologică cu celule funcționale mature este asigurată de proliferarea și diferențierea celulelor stem tisulare [16].

De asemenea a fost sugerată ideea că sursa de suplimentare cu celule stem a țesuturilor este asigurată de celulele stem mezenchimale provenite din măduva osoasă. Terapia cu CEMP este utilizată cu succes pentru tratarea fracturilor osoase, osteoporozei [24;14]. Însă mecanismul acțiunii CEMP asupra proliferării și diferențierii celulelor osoase rămâne nedefinit.

Materiale și metode. Obținerea culturilor de celule

În cadrul experimentului au fost utilizate celule fetale din embrioni de pui. Embrionii au fost crescuți în incubator la 37°C atmosferă umedă, la a 14-a zi au fost extrași, iar din ei s-au separat primordiile oaselor, care au fost strivite și introduse într-o soluție de tripsină cu amestecare continuă într-un omogenizator magnetic, peste 20 min tripsina a fost inactivată cu mediu nutritiv suplimentat cu FBS 15%. Suspensia celulară s-a centrifugat, supernatantul a fost extras, iar precipitatul celular a fost resuspendat în mediu nutritiv și numărat în camera Goreev. Suspensiile celulare au fost translocate și cultivate în 2 cutii cu 24 de godeuri (Biofil).

Densitatea celulară a constituit 20,0x10⁵; 65,0x10⁵; 85,0x10⁵ celule per godeu în 0.5 ml de *Dulbeccos modified Eagle medium* suplimentat cu 15% FBS, glutamină, insulină și streptomycină, la 37°C, 5% CO₂, umiditatea de 95% timp de 7 zile.

Menționăm că o cutie a servit drept lot de control, iar cutia experimentală a fost introdusă într-un solenoid în care a fost creat câmpul magnetic necesar.

Câmpul electromagnetic pulsat a fost indus cu ajutorul unui generator de impulsuri electrice și a unui solenoid care au fost calibrate cu un osciloscop pentru a furniza un câmp electromagnetic oscilant cu durata de 300μs, frecvență de 7,5 hz, densitatea câmpului magnetic de 0,13mT, iar câmpul electric indus a fost de 2mV/cm. Aparatul a fost construit astfel ca cutiile cu culturi celulare să se afle în intensitatea maximă a câmpului magnetic, care se dezvoltă în centrul solenoidului, unde și au fost plasate cutiile cu celule. Generatorul a funcționat câte 2 ore zilnic timp de 7 zile.

Supravegherea celulelor a fost realizată prin intermediul microscopului invertat cu contrast de fază (KXD) la ziua 3 și 7, ulterior au fost colorate conform tehnicii Romanovski cu eozină și azur, după care au fost vizualizate la microscopul optic invertat (Olympus), unde celule au fost numărate în câmpul vizual și raportate la godeu.

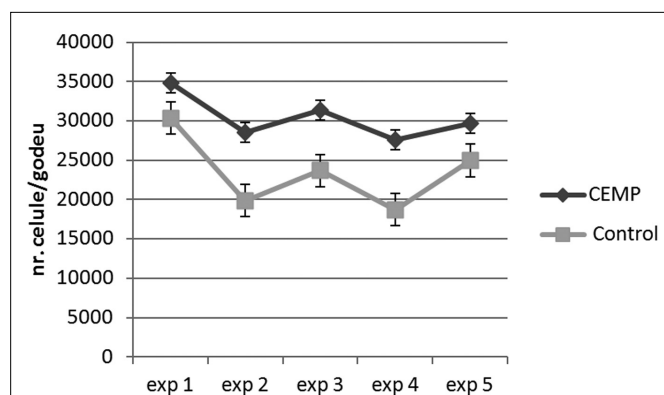
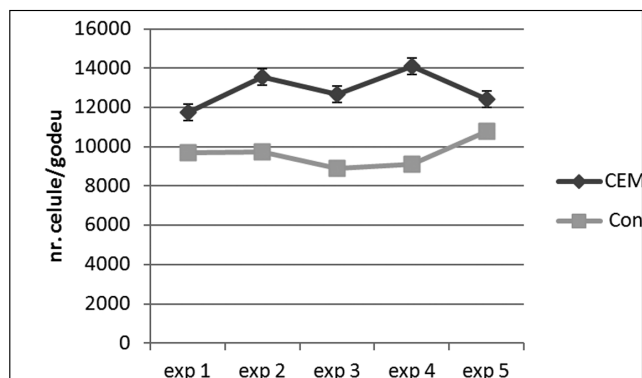
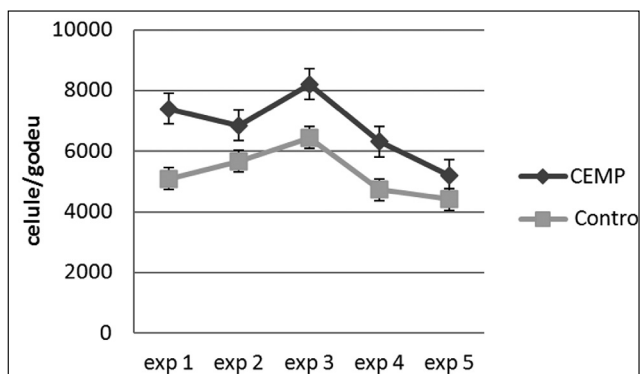


Fig. 3. Numărul de celule rezultate de la densitatea inițială 85,0x10⁵cel/godeu. Notă: CEMP- câmpuri electromagnetice pulsate, exp- numărul experimentului.

Rezultate și discuții. Experimentul a fost repetat de cinci ori, pentru a determina care este influența câmpului electromagnetic pulsat asupra procesului de diviziune celulară după criteriul cantitativ (fig.1; fig.2; fig.3).

Astfel am observat că numărul de celule din proba supusă acțiunii câmpului magnetic pulsat a fost mai mare în medie cu $24.55 \pm 3.13\%$ ($p < 0,05$) decât proba de control (fig.4), în cazul densităților inițiale diferite de celule per godeu ($20,0 \times 10^5$; $65,0 \times 10^5$; $85,0 \times 10^5$ cel/godeu) diferența medie a fost de doar $1.62\% \pm 0.7191$ (fig. 5).

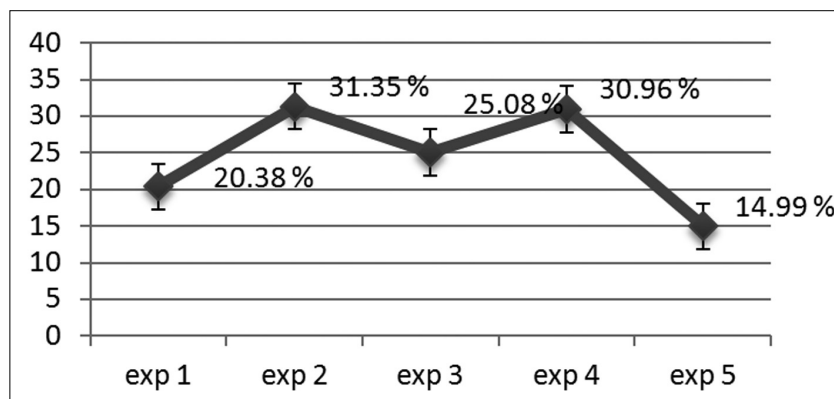


Fig.4. Raportul dintre numărul de celule din lotul CEMP și lotul martor în funcție de numărul experimentului.

Notă: CEMP – câmpuri electromagnetice pulsate.

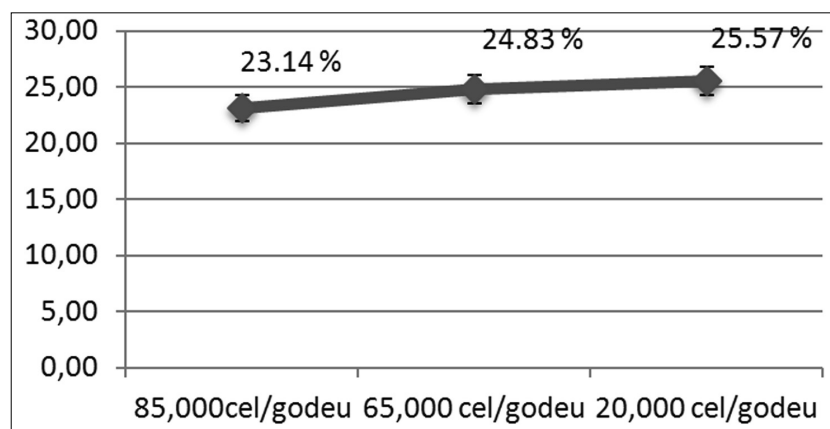


Fig.6. Raportul dintre numărul de celule din lotul CEMP și lotul martor în funcție de densitatea celulară inițială.

Notă: CEMP – câmpuri electromagnetice pulsate.

După aspectul morfologic am determinat celule de tip *fibroblast-like* care în funcție de timp își schimbau morfologia de la celule scurte în a 2–3 zi, la celule lungi cu procese celulare mari în a 7 zi, manifestând o tendință de confluență determinată prin detectarea coloniilor, proprietățile date fiind caracteristice celulelor stem mezenchimale.

Astfel evidențiem o creștere moderată a numărului de celule în culturile supuse CEMP. A fost demonstrat că regenerarea osoasă are loc nu doar pe seama stimulării osteoblastelor, dar și din contul accelerării apoptozei osteoclastelor [8,19], însă sursa dominantă de aprovizionare a țesutului osos cu celule este considerată măduva osoasă hematogenă [22], care conține celule stem mezenchimale capabile să se diferențieze și să formeze țesut cartilajinos, conjunctiv, osos [24]. Studiile efectuate au sugerat că CEMP stimulează proliferarea și diferențierea osteoblastelor *in vitro* [10], însă alte cercetări au relevat că regenerarea osoasă este stimulată de nivelul ridicat de fosfatază alcalină, iar câmpurile electromagnetice au efect limitat asupra proliferării osteoblastelor [19]. Lucrarea noastră demonstrează că rolul CEMP în regenerarea osoasă este amplificarea diviziunii celulelor stem mezenchimale. Mecanismul acțiunii rămâne neelucidat, însă conform [23], CEMP induce vibrația forțată a tuturor ionilor liberi pe suprafața membranei celulare [12], presupun că conductivitatea membranei plasmatică și nucleare se reduce considerabil pe parcursul impulsurilor electromagnetice. Aceste cercetări orientează acțiunea CEMP asupra modificării potențialului electric transmembranar și stimularea diviziunii celulare prin alterarea echilibrului electrolitic și inducerea ciclului de diviziune celulară. Toate aceste teorii nu au fost argumentate definitiv, cert este că câmpurile electromagnetice pulsate sunt capabile de a stimula diviziunea celulelor stem mezenchimale.

Concluzii

Rezultatele noastre argumentează utilizarea câmpurilor electromagnetice pulsate în situațiile clinice când într-un timp limitat este necesar de a obține o cantitate mai mare de celule stem mezenchimale. Astfel acest studiu ne sugerează implementarea CEMP în ingineria tisulară și în special în regenerarea osoasă.

Referințe

1. Beresford JN. 1989. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop Relat Res* 240: p. 270–280.
2. Brighton CT, Hozack WJ, Brager MD, Windsor RE, Pollack SR, Vreslovic EJ, Kotwick JE. 1985. Fracture healing in the rabbit fibula when subjected to various capacitively coupled electrical fields. *J Orthop Res* 3: p. 331–340.
3. Brighton CT, Katz MJ, Goll SR, Nichols CE III, Pollack SR. 1985. Prevention and treatment of sciatic denervation disuse osteoporosis in the rat tibia with capacitively coupled electrical stimulation. *Bone* 6: p. 87–97.
4. Brighton CT, Tadduni GT, Pollack SR. 1985c. Treatment of sciatic denervation disuse osteoporosis in the rat tibia with capacitively coupled electrical stimulation. Dose response and duty cycle. *J Bone Joint Surg Am* 67: p. 1022–1028.
5. Chang K, Chang WHS, Yu YH, Shih C. 2004. Pulsed electromagnetic field stimulation of bone marrow cells derived from ovariectomized rats affects osteoclast formation and local factor production. *Bioelectromagnetics* 25:134–141.
6. Chang WH, Chen LT, Sun JS, Lin FH. 2004b. Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. *Bioelectromagnetics* 25:p. 457–465.
7. Chang K, Chang WHS, Huang S, Huang S, Shih C. 2005. Pulsed electromagnetic fields stimulation affects osteoclast formation by modulation of osteoprotegerin, RANK ligand and macrophage colony-stimulating factor. *J Orthop Res* 23: p. 1308–1314.
8. Chang K, Chang WHS, Tsai MT, Shih C. 2006. Pulsed electro-magnetic fields accelerate apoptotic rate in osteoclasts. *Connect Tissue Res* 47: p. 222–228.
9. de Haas WG, Watson J, Morrison DM. 1980. Non-invasive treatment of ununited fractures of the tibia using electrical stimulation. *J Bone Joint Surg Br* 62-B:, p.465–470.
10. Diniz P, Shomura K, Soejima K, Ito G. 2002. Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. *Bioelectromagnetics* 23:, p.398–405.
11. Friedenbergh ZB, Brighton CT. 1966. Bioelectric potentials in bone. *J Bone Joint Surg Am* 48:, p.915–923.
12. Garner AL, Chen G, Chen N, Sridhara V, Kolb JF, Swanson RJ, Beebe SJ, Joshi RP, Schoenbach KH. 2007. Ultrashort electric pulse induced changes in cellular dielectric properties. *Biochem Biophys Res Commun* 362:139–144
13. Grace KL, Revell WJ, Brookes M. 1998. The effects of pulsed electromagneticism on fresh fracture healing: Osteochondral repair in the rat femoral groove. *Orthopedics* 21:297–302.
14. Halleux C, Sottile V, Gasser JA, Seuwen K. 2001. Multi-lineage potential of human mesenchymal stem cells following clonal expansion. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2:71–76.
15. Heckman JD, Ingram AJ, Loyd RD, Luck JV, Jr., Mayer PW. 1981. Nonunion treatment with pulsed electromagnetic fields. *Clin Orthop Relat Res* 161:58–66.
16. Korblyng M, Estrov Z. 2003. Adult stem cells for tissue repair-a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 349:570–582.
17. Luben RA. 1991. Effects of low-energy electromagnetic fields (pulsed and DC) on membrane signal transduction processes in biological systems. *Health Phys* 61:15–28.
18. McLeod KJ, Rubin CT. 1992. The effect of low-frequency electrical fields on osteogenesis. *J Bone Joint Surg Am* 74:920–929.
19. McLeod KJ, Donahue HJ, Levin PE, Fontaine MA, Rubin CT. 1993. Electric fields modulate bone cell function in a density dependent manner. *J Bone Miner Res* 8:977 – 984.
20. Norton LA. 1982. Effects of a pulsed electromagnetic field on a mixed chondroblastic tissue culture. *Clin Orthop Relat Res* 167:280–290.
21. Norton LA, Witt DW, Rovetti LA. 1988. Pulsed electromagnetic fields alter phenotypic expression in chondroblasts in tissue culture. *J Orthop Res* 6:685–689.
22. Owen M, Friedenstein AJ. 1988. Stromal stem cells: Marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 136:42–60.
23. Panagopoulos DJ, Karabarbounis A, Margaritis LH. 2002. Mechanism for action of electromagnetic fields on cells. *Biochem Biophys Res Commun* 298:95–102.
24. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143–147.