

Wpływ pojemnościowo-rezystywnego transferu elektrycznego o częstotliwości 448 kHz na komórki mezenchymalne

Impact Capacitive – Resistive Electric Transfer 448 khz of Human Mesenchymal Stem Cells

Beata Mazurek

Akademia Wychowania Fizycznego w Krakowie im. B. Czecha, Kraków

STRESZCZENIE

Mezenchymalne komórki macierzyste (ang. *Mesenchymal Stem Cells – MSCs*) przejawiają zdolność różnicowania się w więcej niż jeden typ wyspecjalizowanych komórek w naszym organizmie. Są potencjalnym źródłem komórek progenitorowych dla osteoblastów, chondroblastów, adipocytów, mięśni szkieletowych i kardiomiocytów. Mogą także różnicować się w komórki linii ekto- i endodermalnej np. komórki neurogenalne, komórki gleju, hepatocyty i keratynocyty. Komórki mezenchymalne stanowią zaledwie 0,001-0,01% wszystkich komórek szpiku kostnego, są kluczową populacją komórek biorących udział w rozrostowej fazie regeneracji uszkodzeń, są obecne prawie we wszystkich tkankach organizmu. Największa ich ilość znajduje się w tkance tłuszczowej i krwi. Właściwości komórek MSCs dały podwaliny nowej interdyscyplinarnej dziedzinie jaką jest inżynieria tkankowa. Znajduje ona szerokie zastosowanie w medycynie estetycznej, dermatologii, ortopedii, chirurgii plastycznej, fizjoestetyce i medycynie sportowej. Celem pracy jest przedstawienie charakterystyki wybranych właściwości mezenchymalnych komórek macierzystych poddanych działaniu bodźca elektrycznego o częstotliwości 448 kHz z zastosowaniem technologii CRET (ang. *Capacitive-Resistive Electric Transfer*).

Słowa kluczowe: mezenchymalne komórki macierzyste, elektroterapia Tryb CRET – pojemnościowo-rezystywny transfer elektryczny, terapia komórkowa

SUMMARY

Mesenchymal stem cells (MSCs) can differentiate into more than one type of specialist cells in our body. They are a potential source of progenitor cells for osteoblasts, chondroblasts, adipocytes, skeletal muscles, and cardiomyocytes. They may also differentiate into ecto- and endodermal cell lines, e.g., neural cells, glial cells, hepatocytes and keratinocytes. Mesenchymal cells represent only 0.001-0.01% of all bone marrow cells, are a crucial population of cells participating in the proliferative phase of damage regeneration, and they are present in nearly all body tissues, the largest number of them is in adipose tissue and blood. Properties of MSCs have formed foundations for a new interdisciplinary field, tissue engineering. Its extensive applications include aesthetic medicine, dermatology, orthopaedics, plastic surgery, physioaesthetics, and sports medicine. The aim of this study is to present selected properties of the mesenchymal stem cells exposed to an electric stimulus of frequency of 448 kHz using Capacitive-Resistive Electric Transfer (CRET) technology.

Key words: mesenchymal stem cells – MSC, Capacitive-Resistive Electric Transfer, cells therapy

Acta Balneol, TOM LIX, Nr 2(148);2017;153-157

WSTĘP

Mezenchymalne komórki macierzyste jako komórki nisko zróżnicowane, zdolne do samoodnowy i proliferacji w jeden lub więcej typów wyspecjalizowanych komórek będą przedmiotem naszego zainteresowania w kontekście obserwacji zmiany ich właściwości i proliferacji pod wpły-

wem oddziaływania prądu radiofrekwencyjnego. Źródłem efektywnego pozyskiwania komórek MSC jest: szpik kostny, tkanka tłuszczowa, krew pępowinowa, łożysko, miazga żółtowa, mięśnie szkieletowe, krew menstruacyjna. Badania naukowe przeprowadzone w ośrodku naukowo-badawczym z Hiszpanii wykazały, iż istnieje możliwość stymulacji pro-

liferacji (namnażania) komórek mezenchymalnych, przy wykorzystaniu prądu radiofrekwencyjnego w trybie CRET – *Capacitive-Resistive Electric Transfer* (pojemnościowo-rezystancyjny transfer elektryczny). Pobudzenie elektryczne przynosiło bardzo zadowalające efekty w procesie odtwarzania uszkodzonych tkanek. Najlepsze rezultaty osiągnano stosując prąd elektryczny o częstotliwości radiowej 448 kHz – częstotliwość została opatentowana przez ośrodek naukowo-badawczy w Barcelonie. Opracowana forma terapii komórkowej nosi nazwę Indiba Activ.

PRĄD RADIOFREKWENCYJNY O CZĘSTOTLIWOŚCI 448 KHZ W TRYBIE CRET

Technologia oparta jest na przepływie prądu przez jedną z dwóch elektrod i oddziaływaniu bodźca elektrycznego na tkanki. Elektroda działająca w trybie pojemnościowym – Capacitive – posiada warstwę izolacyjną służącą jako dielektryk kondensatora. Metalowa część elektrody aktywnej ma ładunek dodatni, a warstwa zewnętrzna wykonana ze specjalnego tworzywa posiada ładunek ujemny. Cząsteczki dielektryka umieszczone w obszarze pola elektrycznego kondensatora ulegają częściowemu lub całkowitemu uporządkowaniu (polaryzacji), dzięki czemu, wewnątrz kondensatora pojawia się przeciwnie skierowane, dodatkowe pole elektryczne. Szybkość zmian polaryzacji zależy od częstotliwości fali lub sygnału. Prąd dociera do tkanek pacjenta w postaci przepływu naładowanych jonów i cząsteczek, które wywołują zderzenia z nieruchomymi cząsteczkami tkanki powodując efekt cieplny oraz to co najważniejsze: przywracają potencjał elektryczny w środowisku zewnętrznym komórki. Tryb pojemnościowy działa powierzchownie poprawiając waskularyzację tkanek i ich właściwości anatomiczne. W przypadku elektrody rezystywnej, która nie posiada warstwy izolacyjnej, czyli nie posiada dielektryka kondensatora, prąd elektryczny dostarczany jest przez przepływ jonów, wywołując w tkankach wzrost temperatury zgodnie z prawem Joulea. Ciepło wydzielane jest w wyniku przepływu prądu przez tkankę wprost proporcjonalnie do oporu tkankowego jaki napotyka. Energia prądu elektrycznego zmienia się w energię wewnętrzną przewodnika. W przypadku trybu rezystywnego hipertermia zlokalizowana jest na większej głębokości niż w trybie pojemnościowym. Przepływ jest możliwy nawet w przypadku wysokiej impedancji wynikającej z gorszego nawodnienia i unaczynienia tkanki. Efektem trybu rezystywnego jest przywrócenie potencjału elektrycznego wewnątrz i na zewnętrznym komórki w następstwie międzykomórkowej wymiany jonowej [1].

W terapii opartej na transferze elektrycznym pojemnościowo-rezystywnym CRET następuje stymulacja wewnątrz i zewnątrzkomórkowa wywołana uruchomieniem pompy jonowej, następuje przywrócenie fizjologicznej aktywności elektrycznej komórek i właściwego potencjału błony komórkowej. Międzykomórkowa wymiana jonowa możliwa jest dzięki liniowemu ruchowi jonów. Wieloletnie badania wpływu różnych częstotliwości na komórki wykazały, iż na cechy i kierunek ruchu jonów kluczowy wpływ ma częstotliwość prądu. W częstotliwościach poniżej 448 kHz

nie udaje się uzyskać efektu wewnątrzkomórkowego, gdyż błona komórkowa zachowuje się jak izolator, a jony jedynie wprawiane są w ruch przypominający drganie. Częstotliwość 448 kHz wprawia jony w ruch liniowy powodując wymianę międzykomórkową oraz kaskadę procesów biochemicznych w komórce. Wyższe częstotliwości – powyżej 448 kHz powodują, iż jony obracają się wokół własnej osi powodując tarcie molekularne towarzyszące rotacji jonów, co wywołuje jedynie silny efekt termiczny, bez efektu międzykomórkowej wymiany jonowej [2, 9].

W zależności od natężenia dawki impulsu elektrycznego w trybie pojemnościowo-rezystywnym CRET, możliwe jest uzyskanie jednego z trzech efektów na poziomie fizjologicznym: stymulacji, waskularyzacji lub hiperaktywacji. Dobierając odpowiednie dawki natężenia prądu przy zachowanej częstotliwości 448 kHz, można wpływać na zwiększenie metabolizmu komórek, poprawę dotlenienia tkankowego, wzrasta mikrocyrkulacja tkankowa. Następuje efekt rozszerzenia naczyń krwionośnych oraz usprawnienie żylnego i limfatycznego wchłaniania zwrotnego.

WPLYW TRYBU CRET NA PROLIFERACJĘ KOMÓREK MEZENCHYMALNYCH

Dotychczasowe projekty nad radiofrekwencją realizowane były głównie przez zespoły badawcze w ośrodkach naukowych w: Ramóny Cajal z Madrytu, CIMA i QUIRON z Barcelony, Santa Cruz i Sant Pau z Barcelony, Klinika Uniwersytecka z Walencji, a także w Kanadzie, USA, Wielkiej Brytanii i Japonii. W projektach naukowych udział brały prestiżowe Instytuty: Medycyny, Nauki i Sportu CONI z Rzymu i Gaetano Pini z Mediolanu.

Badania wykazały, iż ekspozycja komórek mezenchymalnych na impuls elektryczny 448 kHz stosowany w terapii komórkowej CRET wywołuje pozytywną regulację szlaku ERK $\frac{1}{2}$ i sprzyja proliferacji komórek mezenchymalnych uzyskanych od zdrowych dawców. Wyniki wskazują na skuteczność terapii CRET procesów naprawczych w uszkodzonym obszarze poprzez aktywację proliferacji komórek pozyskanych z tkanki tłuszczowej. Tkanka tłuszczowa jest najlepszym źródłem pozyskiwania komórek macierzystych u dorosłego człowieka [2].

Ekspozycja na przerywany bodziec elektryczny o częstotliwości 448 kHz zastosowany w terapiach z pojemnościowo-rezystancyjnym transferem elektrycznym zwiększa odsetek komórek w fazach S, G2 i mitozy, a także wywołuje proliferację mezenchymalnych komórek macierzystych u ludzi. Uzyskane wyniki wskazują, że leczenie elektryczne CRET może wywoływać regenerację tkanek poprzez aktywację proliferacji spoczynkowych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej (ADSC) obecnych w uszkodzonym obszarze bez narażania multipotencjalności komórek macierzystych na późniejsze zróżnicowanie apidogenne, chondrogenne lub osteogenne. Dane te, wraz z wcześniej opublikowanymi dowodami eksperymentalnymi, znacząco wspierają hipotezę, że mechanizmy molekularne i komórkowe inne niż termiczne mogą mieć kluczowe znaczenie dla skuteczności terapeutycznej leczenia metodą CRET. W związku z tym można zaproponować zastosowanie CRET jako skuteczne-

Tabela 1. Wybrane czynniki regulujące różnicowanie MSC**Table 1.**

Biologiczne i chemiczne czynniki różnicujące	Kierunek różnicowania
TGF- β	chondrocyty, miocyty gładkie
IGF-1	chondrocyty
bFGF	chondrocyty, osteoblasty, neurony
EGF	chondrocyty
PDGF	chondrocyty, miofibroblasty, miocyty gładkie
VEGF	komórki endotelialne
BMP-12	cenocyty
Deksametazon+izobutylometyloksantyna+indometacyna+insulina	adipocyty
Kwas askorbinowy	chondrocyty
β -glicerofosforan	osteoblasty
5'azacytydyna	kardiomiocyty
Kwas linolowy	oligodendrocyty, neurony
DMSO+deksametazon	astrocyty

go środka pomocniczego przy regeneracji różnych zmian w tkankach i naczyniach [3].

Różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych w warunkach *in vitro* w określonym kierunku wymaga zastosowania swoistych czynników wzrostu lub związków chemicznych o właściwościach różnicujących. Wybrane czynniki determinujące różnicowanie MSC przedstawiono w tabeli 1 [4].

PROLIFERACJA MSC W CHONDROCYTY I OSTEOLASTY POD WPLYWEM IMPULSU ELEKTRYCZNEGO W TRYBIE CRET

Czynniki wzrostu, które modulują różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych, to m.in. rodzina czynników TGF-b (TGF-b1, TGF-b2 i TGF-b3), a także białka morfogenetyczne kości (BMP). W badaniach nad ludzkimi MSC stwierdzono, że TGF-b2 i TGF-b3 są bardziej aktywne niż TGF-b1. Po stymulacji TGF-b2 i TGF-b3 obserwowano wzmożoną syntezę proteoglikanów i kolagenu typu II. Białko morfogenetyczne kości 2, 4 i 6 uczestniczy w różnicowaniu MSC w kierunku komórek tkanki chrzęstnej [26]. Regeneracja chrząstki jest procesem trudnym, ze względu na wysoką oporność, niski wskaźnik proliferacji i słabe unaczynienie. Badania nad wpływem impulsu elektrycznego w trybie CRET na uszkodzoną chrząstkę, wykazały iż efekt indukcji proliferacji komórek macierzystych sprzyja regeneracji chrząstki poprzez wzrost: różnicowania komórek macierzystych do komórek chrzęstnych, syntezę chondrocytów zawartych w tkankach oraz makrocząsteczek C pozakomórkowej matrycy chrząstki. Stymulacja w trybie rezystywnym zwiększa proliferację i akcelerację komórek mezenchymalnych w chondrocyty i osteoblasty przyspieszając tym samym proces leczenia uszkodzonych ścięgien, chrząstek oraz skracając czas zrostu kości [5, 6].

Wyniki eksperymentalne dostarczyły dowodów, że stymulacja prądem radiofrekwencyjnym w trybie CRET działa

na poziomie komórkowym. Komórki macierzyste zwiększoną ekspresję i aktywację Sox5 – cząsteczek zaangażowanych w chondrogenezę i tworzenie chrząstki. Badania wskazały na przyspieszenie syntezy macierzy chrząstki z siarczanem chondroityny i glukozaminoglikami (KNEBEL). Korzystne efekty terapeutyczne wykazano także u pacjentów z uszkodzeniem tkanki kostnej oraz ze zmianami zwyrodnieniowymi, poddanych zabiegom opartym na technologii CRET. Badania wykazały, iż oprócz różnicowania komórek macierzystych w osteoblasty (komórki kostne) zwiększa się także aktywność fosfatazy alkalicznej i tworzą się osady wapniowe i następuje przyspieszona mineralizacja i tworzenie tkanki kostnej (2).

Rycina 1 przedstawia wpływ bodźca elektrycznego w trybie CRET na proliferację komórek wyizolowanych z tkanki tłuszczowej. Na zdjęciach widoczny jest efekt po okresie 14 dni od czasu ekspozycji na impuls elektryczny. Widoczne zróżnicowanie na różne typy komórek: adipocyty, chondrocyty, osteocyty [8].

TERAPIA KOMÓRKOWA CRET W SPORCIE

Ze względu na powyżej opisane efekty terapeutyczne na poziomie komórkowym, elektroterapia w trybie CRET znalazła zastosowanie w ortopedii sportowej i rehabilitacji. Jest stosowana przez ponad 200 federacji sportowych na całym świecie. Na elektroterapii CRET bazuje między innymi: FC Barcelona, Espanyol, AC Roma, Tinkoff SAXO. W Polsce terapia komórkowa CRET wykorzystywana była w pracy fizjoterapeutów reprezentacji narodowej piłki nożnej, w przygotowaniach do EURO 2016 oraz wspomagała zawodników piłki ręcznej reprezentacji narodowej na Igrzyskach Olimpijskich w RIO. W Ego Power Lab w Ośrodku Przygotowań Olimpijskich KOLNA z technologii CRET opartej na częstotliwości 448 kHz korzystają mistrzyni Polski – koszykarki Wisły Can-Pack oraz wielu sportowców klasy mistrzowskiej i olimpijczyki różnych

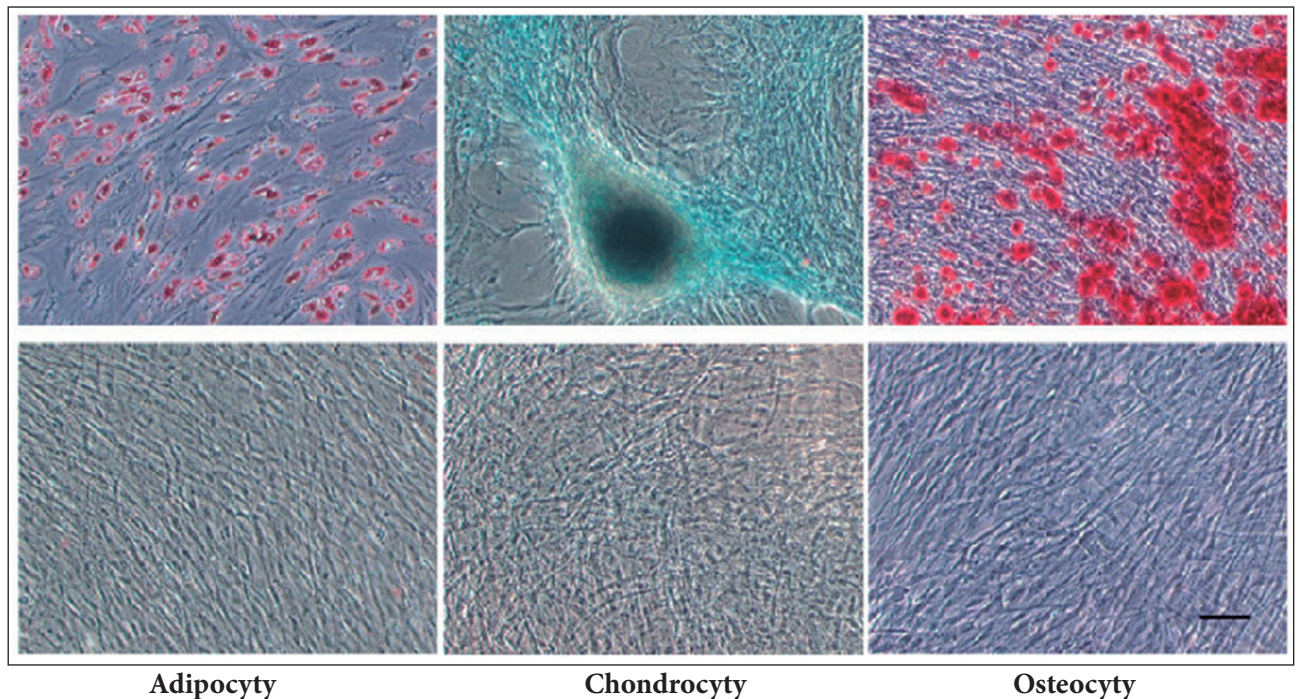


Fig.1.

dyscyplin sportu: kajakarze, piłkarze, chodźnicy, biegacze, judocy, kolarze, zawodnicy MMA, zawodnicy futbolu amerykańskiego. Technologię CRET wykorzystuje się w celu leczenia kontuzji sportowych i urazów ortopedycznych, a także regeneracji powysiłkowej i przygotowania mięśni do wysiłku. Obecnie rozpoczęły się pierwsze w Polsce badania wpływu elektroterapii w trybie pojemnościowo-rezystywnym o częstotliwości 448 kHz na właściwości reologiczne, biochemiczne, hormonalne i enzymatyczne krwi realizowane przez Akademię Wychowania Fizycznego w Krakowie w kontekście regeneracji powysiłkowej oraz prewencji zawałów i zatorów u biegaczy powyżej 40 roku życia. Badaniom przewodniczyć będzie wybitny reolog prof. dr hab. Zbigniew Dąbrowski.

Piśmiennictwo

- Schaffler A, Buchler C. Concise review: Adipose tissue-derived stromal cells—basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 2007;25:818-827.
- Hernández-Bule ML, Paíno CL, Trillo MÁ et al. Electric stimulation at 448 kHz promotes proliferation of human mesenchymal stem cells. *Cell Physiol Biochem*. 34:1741-1755. Published online 2016 Mar 21. doi: 10.3892/mmr.2016.5032. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4838151>.
- S. Karger. Electric stimulation at 448 kHz promotes proliferation of human mesenchymal stem cells. Departamento de Investigación-BEM, Hospital Universitario Ramón y Cajal - IRYCIS, Madrid, Spain. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25427571>)
- Shah, SGS Farrow A. Trends in the Availability and Usage of Electrophysical Agents in Physiotherapy Practices from 1990 to 2010: A Review. *Physical Therapy Reviews*.2012;17(4):207-226. Published online 2016 Mar 18 <http://dx.doi.org/10.1179/1743288x12y.0000000007>.
- Watson T. *Electrotherapy: Evidence Based Practice*. 12th ed. London: Elsevier Churchill Livingstone; 2008;45- 48.
- Bajek A, Olkowska J, Gurtowska N et al. Human amniotic-fluid-derived stem cells: a unique source for regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther*. 2014;14(6):831-9. doi: 10.1517/14712598.2014.898749. Review. PMID: 24655038
- Binoy Kumaran. Apacitive Resistive Monopolar Radiofrequency (CRMRF) therapy at 448 KHz: the effects on deep blood flow and elasticity of tissues. 2016 Jun 21. https://www.researchgate.net/publication/283078888_Capacitive_Resistive_Monopolar_Radiofrequency_CRMRF_therapy_at_448_KHz_the_effects_on_deep_blood_flow_and_elasticity_of_tissues
- Chamberlain G., Fox J., Ashton B et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007;25:2739-2749.
- Jackson L, Jones DR, Scotting P et al. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J. Postgrad. Med*. 2007;53:121-127.
- Hernández -Bule ML, -Botas JM, Trillo MÁ et al. Antiadipogenic effects of subthermal electric stimulation at 448 kHz on differentiating human mesenchymal stem cells. Published online on: Monday, March 21, 2017 Pages: 3895-3903 DOI: 10.3892/mmr.2016.5032 (<https://www.spandidos-publications.com/mmr/13/5/3895/abstract>)
- Belenky I, Margulis A, Elman M et al. Exploring channeling optimized radiofrequency energy: A review of radiofrequency history and applications in esthetic fields. *Adv Ther*. 2012;29:249-266. View Article : Google Scholar PubMed/NCBI

12. Hamida ZH, Comtois AS, Portmann M et al. Effect of electrical stimulation on lipolysis of human white adipocytes. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2011;36:271-275. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI
13. Kato S, Saitoh Y, Miwa N. Repressive effects of a capacitive-resistive electric transfer (CRet) hyperthermic apparatus combined with provitamin C on intracellular lipid-droplets formation in adipocytes. *Int J Hyperthermia.* 2013;29:30-37. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI
14. Hernández-Bule ML, Roldán E, Matilla J et al. Radiofrequency currents exert cytotoxic effects in NB69 human neuroblastoma cells but not in peripheral blood mononuclear cells. *Int J Oncol.* 2012;41:1251-1259. PubMed/NCBI
15. Messerli MA, Graham DM. Extracellular electrical fields direct wound healing and regeneration. *Biol Bull.* 2011;221:79-92.
16. Pilla AA. Nonthermal electromagnetic fields: From first messenger to therapeutic applications. *Electromagn Biol Med.* 2013;32:123-136.
17. Belenky I, Margulis A, Elman M et al. Exploring channeling optimized radiofrequency energy: A review of radiofrequency history and applications in esthetic fields. *Adv Ther.* 2012;29:249-266.
18. Boyette MY, Herrera-Soto JA. Treatment of delayed and nonunited fractures and osteotomies with pulsed electromagnetic field in children and adolescents. *Orthopedics.* 2012;35:e1051-1055.
19. Whipple TL. From mini-invasive to non-invasive treatment using monopolar radiofrequency: The next orthopaedic frontier. *Orthop Clin North Am.* 2009;40:531-535.
20. Ganzit GP, Stefanini L, Stesina G. Nuove metodiche nei trattamenti della patologia muscolo-articolare dell'atleta: La tercatapia. *Med Sport.* 2000;53:361-367.
21. Ley Valle A. Tratamiento quirúrgico de los gliomas malignos. In: Ley Valle. *Tumores del sistema nervioso central, Barcelona: Doyma.* 1993:55-64.
22. Martínez RA, Bordás JR. Tratamiento del asma mediante transferencia eléctrica capacitiva. *Rehabilitación Física, XXI.* 1992;3:18-19.
23. Hernandez-Bule ML, Cid MA, Trillo MA et al. Cytostatic response of HepG2 to 0.57 MHz electric currents mediated by changes in cell cycle control proteins. *International Journal of Oncology.* 2010;37:1399-1405.
24. Hernandez-Bule ML, Ubeda A. In vitro Cytostatic Response to 0.57- MHz Electric Currents, Department of Bioelectromagnetismo-Investigacion, Hospital Ramon y Cajal. Madrid, Spain 2009.
25. Filip S, Mokry J, Horacek J et al. Stem cells and the phenomena of plasticity and diversity: a limiting property of carcinogenesis. *Stem Cells Dev.* 2008;17:1031-1038.
26. Burke ZD, Tosh D. Therapeutic potential of transdifferentiated cells. *Clin. Sci.* 2005;108: 309-321.
27. Shen CN, Burke ZD, Tosh D. Transdifferentiation, metaplasia and tissue regeneration. *Organogenesis.* 2004;1: 36-44.
28. Qi L, Shen H, Larson I et al. "Gender-specific association of a perilipin gene haplotype with obesity risk in a white population". *Obes. Res.* 2014;12:1758-65. doi:10.1038/oby.2004.218. PMID 15601970.
29. Corella D, Qi L, Sorli Jv et al. "Obese subjects carrying the 11482G>A polymorphism at the perilipin locus are resistant to weight loss after dietary energy restriction". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005;90:5121-6. doi:10.1210/jc.2005-0576. PMID15985482.

Konflikt interesów:

Autor nie zgłasza konfliktu interesów

Pracę nadesłano: 08.03.2017**Zaakceptowano:** 25.04.2017**ADRES DO KORESPONDENCJI:****Beata Mazurek**

ul. Kolna 2, Kraków 30-381

e-mail: egopowerlab@gmail.com

tel.: 504 054 249