

Влияние ударных волн на отложение Ca ++ в остеобластах человека in vitro.

(статья представлена в нашем переводе, некоторые термины адаптированы для русского языка).

C. Russo¹ *, L. Vallefucio², M. D'Anna², G. Suzuki³, A. Ciampa³,
E. Marlinghaus⁴, E. M. Corrado¹, C. Montagnani²

1. Ортопедическая клиника кафедры хирургической и ортопедических наук.
2. DEPT. из Биоморфологических и функциональных наук, медицинский факультет, «Федерико II» Университет Неаполя
3. Кафедра Морфологических и биомедицинских наук Университета Вероны
4. Оборудование предоставил научно-исследовательский центр, Storz Medical AG, Kreuzlingen, Швейцария



Sergio Russo
Клиника ортопедии кафедры
хирургических и ортопедических
Наук, медицинский факультет,
университета «Федерико II»,
Via Pansini 5, I - 80131 Неаполь

Предпосылки.

В целях содействия уточнить биологические эффекты лечения ударных волн (SW), мы провели лечение *in vitro* на культуре человеческих остеобластов. Здесь мы оценили влияние SW на пролиферацию клеток, отложение Ca ++ и щелочной фосфатазы (ALP), и активность NO-синтазы (NOS).

Методика

In vitro культивированные человеческие остеобласты были получены из хирургических фрагментов. Так же были представлены три SW аппарата. Отложение Ca ++, активность ALP и NOS, клеточные темпы роста и дифференцировки были оценены и сопоставлены с данными, связанными с контрольной группой клеток.

Результаты

Лечение может ингибировать как темпы роста, так и отложения Ca ++. В то же время SW изменяет активность NO-синтазы (NOS) человеческих остеобластов, поэтому предположительно влияет на активность ALP.

Интерпретация

Низкий уровень отложения Ca ++, индуцированного лечением SW, может быть связан с уменьшением активности ферментов, с минерализацией костной ткани, такими как активность ALP, а также изменениями Ca ++ внутри- и внеклеточных потоков.

Использование ударной волны (Shock Wave) к клиническому применению ортопедических болезней было рассмотрено с особым вниманием (Haupt G, 1997). Наш интерес был вызван некоторыми заболеваниями костей и сухожилий, такими

отклонениями как кальцификация intratendineous, которые восстанавливаются в нормальных условиях после обработки SW.

SW является временным нарушением давления, которое распространяется быстро в трехмерном пространстве, это связано с резким ростом от атмосферного давления до максимального давления и кавитации из-за негативной фазы волн (*Ogden JA и др., 2001*). Различные авторы изучали влияние SW на нормальных и патологических клетках (*Смитс Г.А. и др., 1991*), а в последнее время было показано, что эта физическая стимуляция вызывает кратковременное повышение проницаемости клеточных мембран. На самом деле это приводит к образованию ямки на клеточной мембране и гиперполяризации мембранного потенциала (*Martini L и соавт. 2005*). Исследования в естественных условиях и *in vitro* показали, что механическое раздражение связано с физиологическими изменениями в костных клетках (*Wang FS и соавт., 2003*). Ответ на механические раздражители в костных клетках связан с увеличением открытия ионного канала, потенциальными изменениями в мембранах, в пролиферации клеток и синтезе белков деятельности, связанной с регулированием формирования костей и костной ткани (*Хартер LVET др. 1995*).

Так биологический эффект этих устройств, производимый на Ca^{++} клеточный метаболизм, тем не менее совершенно неизвестен, наше исследование было сосредоточено на морфологии, распространения и ферментативной деятельности, связанной с минерализацией, как щелочной фосфатазы (ALP), в пробирке культивированных человеческих остеобластов. В естественных условиях лечение SW, очевидно, очень отличается от нашей экспериментальной системы, как биологические структуры, таких тканей как мышцы, суставы, сухожилия и т.д., создают биологический фильтр между источником SW и клетками, которые являются конечной целью лечения. Это не произойдет в пробирке, где SW действует непосредственно на клеточной популяции.

Вазодилатация, вероятно, важный SW эффект. В естественных условиях, мы решили оценить также активность NOS и производство NO в нашей культуре после лечения SW. Недавно было показано, что экстракорпоральная SW, на низком значении плотности энергии, способна быстро увеличить активность нейронной синтазы окиси азота (NNO) и производство базального оксида азота (NO) у крыс, линии клеток глиомы C6 (*Ciampa, 2005*). Оксид азота (NO) является универсальной сигнальной молекулой, которая производится в различных типах клеток, по крайней мере, три изоформы NO-синтазы (NOS) путем преобразования L-аргинина и кислорода в L-цитруллин. Два фермента, нейронов NOS (NNO) и эндотелиальной NOS (ENOS), которые выражены конститутивно и их ферментативная активность Ca^{++} / кальмодулин-зависимая. Эти учредительные NOS (CNOS) несут ответственность за производство физиологических уровней NO, участвуют в таких мероприятиях, как расширение кровеносных сосудов, ангиогенез, и нейротрансмиссия (*Ciampa и соавт. 2005*). Третий фермент индуцибельной и Ca^{++} -независимая изоформа NOS (Тоз), практически экспрессируется во всех типах клеток и повышается после стимуляции различных цитокинов.

МЕТОДЫ МАТЕРИАЛЫ и клеточные культуры

Хирургические образцы костной ткани были получены из молодых пациентов (8 мужчин в диапазоне 18-24 лет) при травматических повреждениях. Они промыты антибиотиком на физрастворе, представлены микродиссекции, как механически под микроскопом, так ферментативно, под коллагеназой (*коллагеназа IV-S8 Sigma, Сент-Луис, Миссури, США*) 40' при 37 ° C, и, наконец, высеены в культуру блюд и культивированы в MEM α -среда с 10% FBS, L-glutamine 20 мм, P / S 1%, витамина C 50 μ g/ml и fungyzone 0,2%. Клетки культивировали в увлажненном воздухе 95% / 5% CO₂ инкубатор, при температуре 37 ° C. Когда клетки мигрировали из микрофрагментов ткани в посуду культуры, после 3-4 недель, мы добавили 1-2ng/ml основной FGF (*FGF б, Sigma, Сент-Луис, Миссури, США*) и Desamethasone 10⁻⁸ M и β -глицерин- фосфат 2mg/ml (*Sigma,*

Сент-Луис, штат Миссури США) в среду, чтобы вызвать дифференциацию остеобластов и минерализацию костного матрикса.

Лечение с помощью ударных волн.

Мы провели лечение с SW на наших первичных культурах человеческих остеобластов, которые приведены в табл. 1;

Group	Impulses	mJ/mm ²	№ of applications
A	1000	0,1	3
B	1000	0,030	3
C	250	0,006	3
D	500	0,006	3
E	1000	0,006	3
Control	---	—	--

между каждым приложением следовало 48 часов перерыва. Генератор SW, который мы использовали для наших экспериментов *in vitro*, представляет собой электромагнитное устройство, специально разработанное для клинического использования в ортопедии и травматологии. Lithotripter MODULITH SLK был любезно предоставлен Storz Medical AG (Kreuzlingen, Швейцария). Клетки культивировались в 30 мм чашках Петри с 2 мл среды, обрабатывались SW с непосредственной фокусировкой в центре пластины. Блок SW находился в контакте с ячейкой, содержащей блюдо с культурой, с помощью заполненной водой подушкой. Обычный ультразвуковой гель был использован в качестве контактной среды между подушкой и блюдом культуры.

Пролиферация клеток

Клетки были отделены с помощью 0,25% трипсина в ЭДТА и клеточную пролиферацию оценивали с Neubauer, гемоцитометром, на 2, 4 и 7 дней культуры. Скорость роста клеток изучалась в ходе лечения, то есть между приложением и следующей процедурой, а затем в конце лечения.

Цитохимия

Для цитохимического анализа активности Са ++, обработанные и необработанные клетки высевали на покровные стекла и витражи, методом фон Косса, модифицированный для клеточных культур (Postiglione *u coavm.*, 2003). Короче говоря, клетки фиксируют в течение 3 мин с 3% раствором формальдегида в PBS, дважды промывают в PBS, покрытых 0,5% водным раствором нитрата серебра и подвергают воздействию УФ-светом (Philips, 30W) в течение 30 мин при 25 ° С. Покровные клетки, затем промывают дистиллированной водой и обрабатывают 5% Na₂SO₄. После промывки в проточной воде, покровные были покрыты 1% нейтральный красный для окрашивания ядер, а затем представлен на шаблонном проходе в спирт, ксилол и монтажную среды. Пятно было выполнено на 7 и 12 день после обработки.

Ферментативная активность

Активность ALP наблюдалась после окрашивания ферментативного набора и определялась количественно, с помощью автоматического анализатора, сразу после каждого применения (SW). Мы измерили активность eNOS и iNOS с использованием как DAF флуоресцентного окрашивания, так и биохимическим методом, как описано, в конце лечения.

1) активность щелочной фосфатазы-

Согласно протоколу, предложенному Sigma Aldrich (Sigma Diagnostics, Сент-Луис, штат Миссури, США) фиксированные клетки инкубировали при комнатной температуре 18-26 ° С в растворе, содержащем нафтол AS-BI-фосфат и недавно подготовленным Fast Red LB Фиолетовая соль или соль Быстрый Синий, ВВ буфером при рН 9,5 с 2-амино-2-метил-

1,3-пропандиол (AMPD). Показателем деятельности являются красный или синий, в зависимости от выбора солей диазония.

2) измерение щелочной фосфатазы

Щелочную фосфатазу (ALP) определяли с помощью р-нитрофенилфосфата, в качестве субстрата (*Sigma*). Клетки соскабливались на 500 мкл сборного ледяного буфера (10 мМ Трис-НСl, рН 7,4, 0,2% NP-40 и 2 мм фенилметилсульфонилфторида, PMSF,) (*Sigma*). Enzymatic активность измерялась с помощью автоматического анализатора (*Hitachi 747, Bohringer Mannheim, Индианаполис, Индиана, США*). Результаты выражали в виде UI / (активность ферментов) / 10⁴ клеток.

3) анализ nNOS

Деятельность nNOS оценивали по конверсии L-2, 3,4,5 - [3H] аргинина в L-2, 3 - [3H] цитруллин, в соответствии с методом, описанным Коласанти М. и соавт. (1999).

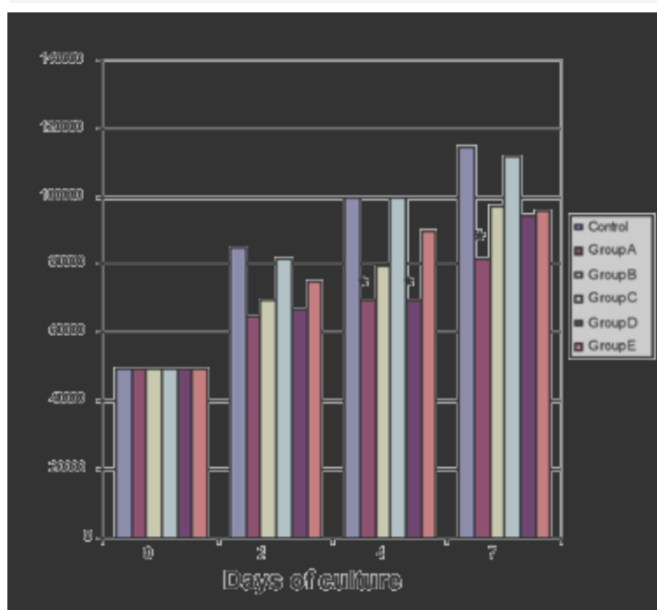
Производство NO оценивали используя DAF-2DA системы обнаружения, как описано ранее (*Mariotto S и соавт. 2005*). . Вкратце, 10 мл 4,5-диамино флуоресцеина диацетата (DAF-2DA; *Alexis-Corp, Сан-Диего, Калифорния, США*) был добавлен в клетки культивированные в среде без сыворотки. И инкубировали при 37 ° C в течение 10 мин. После промывок PBS, плюс 1,2 мМ СаCl₂, клетки фиксировали 3% вес / объем параформальдегида, плюс 4% вес / объем сахарозы и просматривали клеточные флуоресценции, наблюдаемые с помощью флуоресцентного микроскопа (*Axioplan 2, LSM 510, Carl Zeiss, Геттинген, Германия*), оборудованного для захвата изображений.

Статистический анализ

Для статистической оценки нашим данным на пролиферацию клеток мы использовали Т-критерий Стьюдента для непарных данных; значение вероятности р < 0,05 было принято статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ пролиферации клеток

Пролиферация клеток в 2, 4 и 7 дней после посева и во время лечения представлены в табл. 2, очевидно, шаги были статистически значимыми. Клеточный рост снизился в группе, которая была представлена после сильного лечения, в то время как снижение распространения было меньше, чем для более легкого лечения, как темпы роста, указанные в группе С.



Таб. 2 распространение остеобластов во время лечения SW

Ферментативная активность

1) Активность щелочной фосфатазы-ALP, очевидно реакция окрашивания была проведена после 4 дней в пробирке в нашей культуре. Это пятно было выполнено как в базальных условиях, чтобы подтвердить, что наши клетки были дифференцированными остеобластами и после лечения. Ферментативная активность хорошо прослеживается во всех блюдах с клетками, во время проверки в световом

микроскопе, но морфология клеток, а также их количество, действительно разные. В частности, лечение SW может изменять формы клеток, которые после ALP окрашивания, кажутся более плоским, и немного уменьшаются во всех группах лечения (рис. 1).

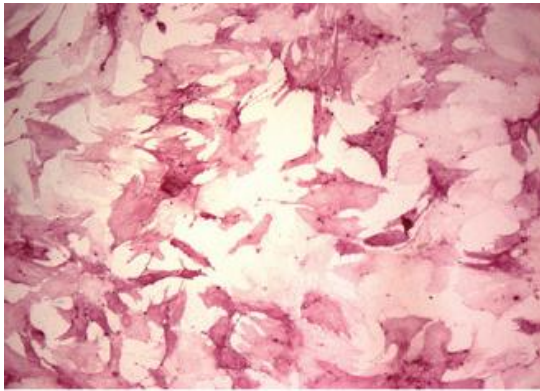


Рис.1 ALP окрашивание *in vitro* культивированных человеческих остеобластов. SW лечение изменяет морфологию клеток и уменьшает ферментативную активность ALP (A) Контрольная группа, (B) группа E. Увеличение 130X

2) Измерение щелочной фосфатазы

ALP измеряется с помощью автоматических анализаторов и выражается в UI / (активность ферментов) / 10⁴ клеток продемонстрировали снижение ALP деятельности в SW обработанных клетках, начиная с первого применения (табл. 3). Ферментативная количественная деятельность связана с количеством клеток, для контроля, а также клетками, обработанным. Так уменьшилось количество остеобластов после того, как клетки подвергли воздействию. Мы измерили, SW не несет ответственности за снижение активности ALP. Существует восстановление ALP уровня в течение 24 часов после первого и второго применения SW, но это не случилось после третьего применения.

Tab. 3 ALP активности в человеческих остеобластов во время лечения SW.

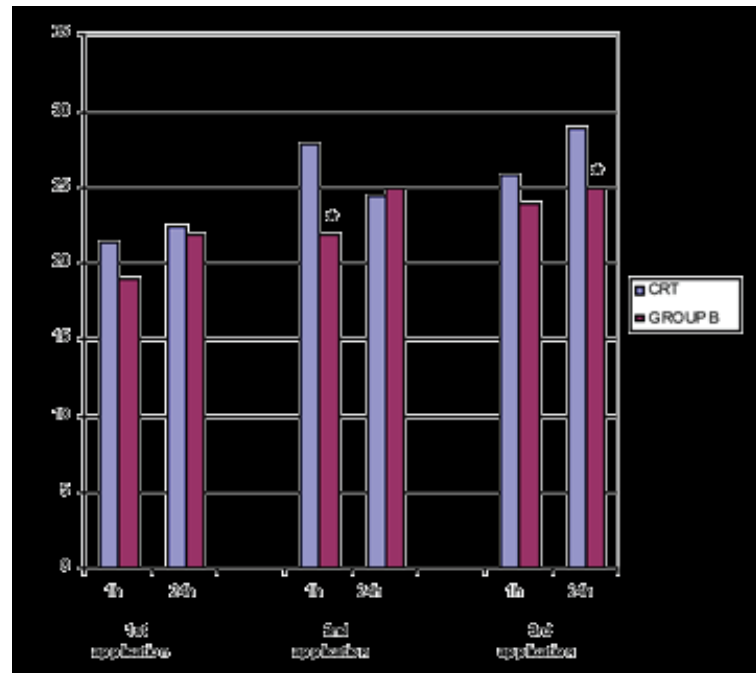
3) анализ NOS

SW индуцированные изменения в деятельности NOS представлены в табл. 4. Существует резкое повышение активности pNOS в ячейке группы B, по сравнению с контрольной группой, в то время как значение этого типа NOS снизилась в группе A. iNOS

увеличилось, очевидно в связи с увеличением мощности лечения.

Эндотелиальные формы, напротив, менее выражены, по сравнению с контрольной группой на низком уровне SW лечения и более

выраженны после сильного лечения. Чтобы проверить, является ли повышение активности pNOS после SW, привело ли к увеличению синтеза NO, из внутриклеточного NO, измерялось с помощью DAF-2DA системы обнаружения. Когда клетки обрабатывали SW, DAF-2T флуоресценция была существенно повышена выше фонового уровня (данные не показаны). Как и ожидалось, эта ответная флуоресценция был предотвращена в клетках, обработанных с 1 мМ N-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) в течение 30 мин до начала лечения SW, указывая тем самым, что увеличение DAF-2T флуоресценции было обусловлено активацией из L-аргинина - NO пути.



Tab. 4 Эффект влияния SW на активность NOS

Цитохимия

Мы использовали отложения Ca^{++} .

Ca^{++} показал, коричневатые выделения в минерализованной матрице, в качестве доказательства клеточной дифференцировки.

Пятно было выполнено через 7 и

12 дней после обработки с SW. Ca^{++} коричневатого осадка минерализованной матрицы всегда раньше проявляется в контрольных клетках; в в культурах клеток, минерализованных ECM, , обработанных SW, появился, только через 7 дней. Количество осадка Ca^{++} было менее очевидным, чем в необработанных клетках. Пятно, выполненное через 12 дней после лечения, показало убедительные доказательства минерализации для всех групп клеток, но подтвердило, снижение уровня отложения Ca^{++} в клетках, представленных после лечения SW(рис. 2).

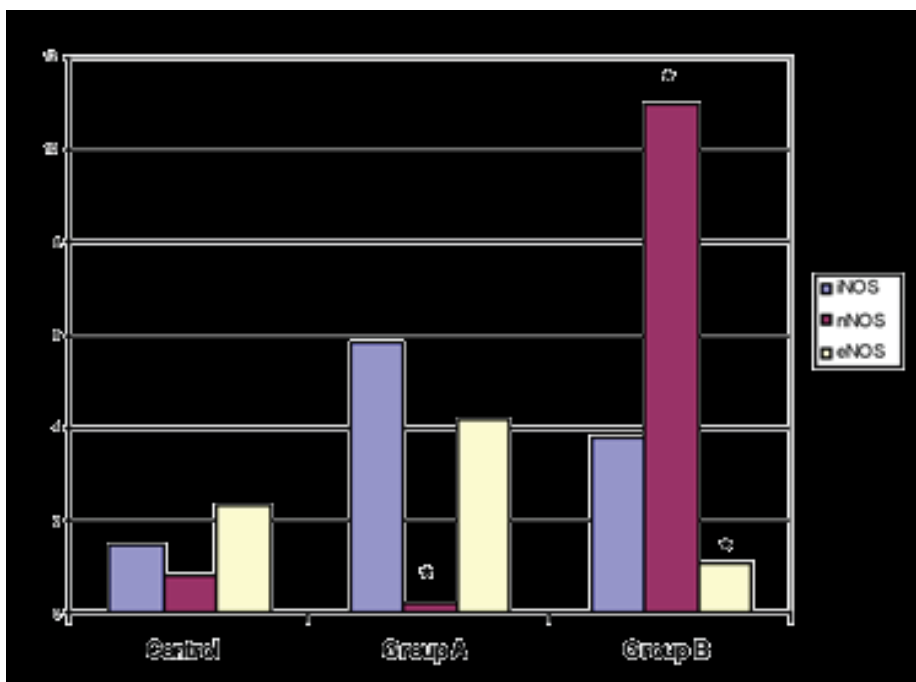
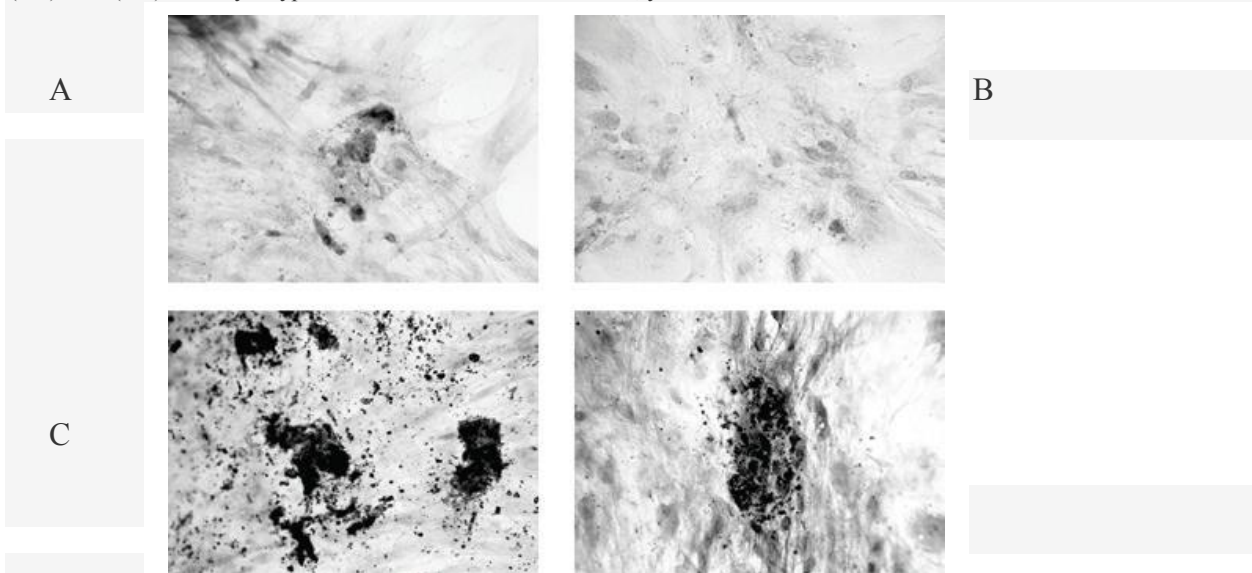


Рис. 2 отложение Ca^{++} в пробирке уменьшается на фоне лечения SW, также в присутствии дексаметазона и β -глицерофосфата. Слева образец из контрольной группы, справа от SW, рассматриваем группу В. Данные относятся к 7 (AB) и 12 (CD) дней культуры после лечения SW. Фон Косса, увеличение 450X



ОБСУЖДЕНИЕ

Наш интерес был сосредоточен на некоторых заболеваниях костей и сухожилий, таких как отклонения в кальцификации intratendineous, которая, как правило, восстанавливает нормальное состояние после проведения SW лечения. Мы исследовали биологические эффекты лечения SW с помощью простой экспериментальной модели, состоящей из человеческих остеобластов культивируемых в пробирке, в среде, которая носит разрешительный характер для их дифференциации и минерализованных отложений

матрицы. Этот метод позволяет оценить некоторые морфологические и физиологические аспекты клеток, такие как темпы роста, Н.У.К. активность и экспрессию маркеров костной дифференциации, как ALP деятельности и Ca^{++} отложений.

Клеточные культуры были представлены в тот же режим, который используется для пациентов и наши данные показывают, что пролиферация клеток уменьшается после SW обращения на всех использованных клетках. В то же время, как и интенсивность морфологии клеток рано увеличиваются, полигональные формы и "клей" в обработанных клетках. "Клей" фенотип, как правило, связан с уменьшением пролиферации клеток *in vitro* и это не удивительно, но в то же время мы ожидали увеличение дифференциации клеток и отложения Ca^{++} . Напротив, отложение Ca^{++} , очевидно, проходило медленнее в SW обработанных клетках, по сравнению с контрольными. Мы исследовали NOS деятельность в нашей экспериментальной системе, потому что мы считаем, что наши данные, вероятно, не связанные с противовоспалительным действием SW. Известно, что SW подозревается в увеличение выброса NO обработанной тканью (*Ciampa al. 2005 и др.*). Мы заметили, что iNOS деятельность увеличилась в зависимости от энергии SW. Напротив, nNOS активность резко возросла на низком уровне энергии SW и тормозится на более высоком уровне, в то время как eNOS влияет в противоположном направлении. Интересно, что обе их ферментативных деятельности несут ответственность за производство физиологического уровня NO, участвуют в расширении сосудов и ангиогенез и Ca^{++} / кальмодулин - зависимой, и принято считать, что SW хорошо влияет на ионный Ca^{++} трансмембранных токов.

Недавно было показано, что SW приводит к увеличению активности eNOS и не образуется и в других экспериментальных системах (*Maruotto S и соавт. 2005*) В то время, как присутствие nNOS в человеческих остеобластах еще не общепринятое утверждение (*MacPherson H и соавт. 1999*). В результате, уровень nNOS является очень низким в человеческих остеобластах, при культивировании в лабораторных условиях, но он быстро увеличивается на низких уровнях энергии в нашей экспериментальной системе. Наши результаты подтверждают, что SW способствует быстрому увеличению NO производства за счет повышения каталитической активности nNOS, с максимальным значением (около 10 складок под контролем значений) было достигнуто на среднем уровне плотности энергии. С другой стороны, наблюдаемое снижение eNOS могло бы способствовать подавлению активности щелочной фосфатазы и отложения Ca^{++} в минерализационной матрице. Недавно было продемонстрировано заметное замедление, как в послеродовом формировании костей, так в созревании остеобластов у мышей eNOS нокаутом, в результате уменьшения объема кости (*Aguirre J и соавт., 2001*). Все вместе, эти результаты способствуют выяснению причин, почему SW лечение является полезным инструментом для уменьшения отложений Ca^{++} , как они действуют замедляя минерализацию Дополнительной костной клеточной Матрицы *in vitro* культурного слоя остеобластов, а также они делают в атипично локализованных кальцинированных участках тканей, в естественных условиях. Что касается различных уровней энергии, которую мы использовали, по нашему мнению, средне-низкий уровень предпочитают для исследования биологических эффектов SW; сильные уровни (как группы) могут вызвать повреждение клеток, в то время как слишком низкое приложении (группа C) может быть практически неотличимы от контрольной группы. Поэтому мы решили показать главным образом наши данные о группе В и группе Е. Интересно, что некоторые свидетельства показывают, что SW на более высоких уровнях энергии,

индуцированного увеличением производства NO, может оказать положительное влияние на дифференцировку мезенхимальных клеток к остеопрогенерации (*Wang FS и соавт., 2002*). Это не согласуется с нашими данными, как это хорошо известно, что SW являются полезными в процессах регенерации, в естественных условиях: они могли действовать вызывая дифференциацию проживающих или циркулирующих мезенхимальных клеток. Напротив, мы использовали более низкие энергии, и только хорошо дифференцированные остеобласты, наблюдались различные эффекты SW. Это может означать, что мы можем модулировать ее последствия путем изменения ее энергетических уровней.

Наши данные показывают, что клеточная пролиферация всегда снижалась на SW, но не уточняем, есть ли пропорциональное соотношение между энергетическим уровнем SW и темпами роста. Это может быть полезно для выполнения других экспериментов по профилю клеточного цикла остеобластов человека, чтобы оценить влияние SW на темпы роста, а также на производство различных компонентов ECM. Другие исследования, помогут прояснить механизм действия SW на Ca⁺⁺, перенос и осаждение. Авторы благодарят Storz Medical Italia за использование литотриптера МОДУЛИТ SLK. Нет конкурирующих интересов.