

STUDII EXPERIMENTALE PRIVIND INFLUENȚA UNDELOR MILIMETRICE APPLICATE LA PUTERI ATERMICE ASUPRA CELULELOR DEZORGANIZATE DIN APONEVROZA PALMARĂ (BOALA DUPUYTREN)

Dragoș Bogdan RUSU

Institutul de Inginerie Electronică și Tehnologii Industriale al AȘM

In this study, we looked after 10 patients to observe the irradiation effects in low-intensity electromagnetic field produced by the millimeter waves upon the cells of adulterated palmar aponeurosis. According to the biophysical and biochemical data, these types of millimeter waves somehow change the cell membrane polarity by influencing the ions active membrane transport, generating a cellular activity modification. The aim was to elaborate a method of alternative efficient treatment to stop the anarchical synthesis of immature collagen (Type III) in the precocious stages of the Dupuytren's disease.

Introducere

În ultimul timp electromagnetobiologia milimetrică este considerată drept una dintre tehnologiile principală noi de acțiune asupra obiectelor medico-biologice, care se utilizează pe larg în medicină și în biotehnologia modernă [1-8].

În perioada 1994–2007, în cadrul Departamentului Chirurgie Plastică Reconstructivă al Spitalului Clinic de Urgență „Bagdasar Arseni” din București (România) au fost operate și studiate aproximativ 295 de cazuri cu boală Dupuytren. Etapele teoretice și experimentale ale cercetării, care implicau investigarea influenței undelor milimetrice aplicate la puteri atermice asupra celulelor dezorganizate din aponevroza palmară, au fost realizate în cooperare cu Departamentul Interacții Bioelectromagnetice al Carfem Electronic din București (România), Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Științe Biologice (INSB) din București (România) și cu Centrul „Electronică și Biofizică Aplicată” al Institutului de Inginerie Electronică și Tehnologii Industriale (IETI) din Chișinău (Republica Moldova).

Grupul inițial de pacienți supuși studiului a fost constituit din 288 bărbați (97,63%) și 7 femei (2,37%). În prezent, etiopatologia bolii Dupuytren este încă prea puțin cunoscută; totodată, necesită a fi pe larg investigată dat fiind incidența și efectele ei asupra mobilității palmare. Concluziile acestui amplu studiu au arătat că cele mai frecvente cauze ale acestei boli sunt: **micro-traumatismele repetate** acumulate ca urmare a unei lungi perioade de muncă (ani) în condiții de vibrație mecanică accentuată, în care pacienții erau obligați să-și folosească forța mâinii, cu precădere la nivelul zonei palmare, și **moștenirea ereditară** a bolii, manifestată atât la bărbați, cât și la femei. Din punct de vedere anatomopatologic, s-au observat anumite aspecte importante ale contracturii aponevrozei palmare: întreruperi longitudinale în zonele superficială și transversală ale ligamentului palmar din aponevroza palmară; activitate macrofagică cronică și expansiune limfoidă (imunitate celulară) cu corecții autoimune și cicatrice hipertrofice; tumori conjunctive cu metaplazii epiteliale și mezenchimale. Microscopia optică și electronică a evidențiat la nivelul celulelor dezorganizate ale țesutului conjunctiv cu degenerare sclerozantă din aponevroza palmară o sinteză anarhică de Colagen imatur (Tip III), cu dilatări ale capsulei reticulului endoplasmatic, nodulul fiind centrul energetic activ.

În articolul de față, etapă a studiului mai amplu precizat mai sus, s-a urmărit evoluția a 10 pacienți, în vederea observării și evidențierii potențialelor efecte biologice atermice induse prin iradierea cu câmp electromagnetic de joasă intensitate și foarte înaltă frecvență (unde milimetrice) asupra celulelor dezorganizate din aponevroza palmară. În acord cu datele biofizice și biochimice obținute, undele milimetrice par a modifica polaritatea membranei celulare prin influențarea transportului activ membranar (pompele de ioni), provocând astfel modificări la nivelul activității generale celulare.

Ținta acestor studii experimentale a urmărit clarificarea unor etape preliminare, demonstrative, care să furnizeze date esențiale pentru elaborarea unui tratament alternativ eficient privind stoparea sintezei anarhice de Colagen imatur (Tip III) în stadiile incipiente ale bolii Dupuytren.

Material și metode

1. Iradierea cu unde milimetrice (MMW – millimeter waves);
2. Recoltarea intraoperatorie de fragmente de țesut proaspăt;
3. Analiza histopatologică prin microscopie optică;
4. Studii electronomicroscopice.

Iradierea cu unde milimetrice

Generatorul de câmp electromagnetic de foarte înaltă frecvență și joasă intensitate tip „EHF-ND” (*Institutului de Inginerie Electronică și Tehnologii Industriale – IETI, Centrul „Electronică și Biofizică Aplicată”, Laboratorul „Biofizică Aplicativă”, din Chișinău*), utilizat în protocolul experimental de iradiere (*Carferm Electronic din București*), este prevăzut cu trei canale independente de ieșire, corespunzătoare frecvențelor de emisie pre-setate ale aparatului: $42,2 \pm 0,2$ GHz ($\lambda_1 = 7,1$ mm), $53,5 \pm 0,2$ GHz ($\lambda_2 = 5,6$ mm) și $61,2 \pm 0,3$ GHz ($\lambda_3 = 4,9$ mm), „sweep width” 100 MHz. Puterea de ieșire, P_{out} , a dispozitivului este 10 mW, iar devierea frecvenței de lucru se află în intervalul 50–150 MHz. Având la bază un – „controller” pe bază de microprocesor, panoul de control permite selectarea unuia din cele 2 regimuri de lucru „continuu” sau „impuls”, timpul de emisie fiind fixat prin intermediul unui temporizator digital (1–99 minute). Emițătorul utilizat a fost un ghid de undă circular, mobil, pentru frecvența de 42,25 GHz ($\lambda = 7,1$ mm). Pentru colimarea fluxului electromagnetic EHF, emițătorul este dotat cu o lentilă dielectrică (îndeplinește și rolul de distanțor; Fig. 1,c) și dezvoltă o densitate de putere incidentă la suprafața pielii cuprinsă ca valoare în intervalul 4–12 mW/cm², funcție de tipul de emițător folosit. În funcție de procesul evolutiv al patologiei țesutului biologic „țintă” (*prelevări succesive de material biologic pentru studii histopatologice*), timpul de expunere fixat a avut în vedere datele experimentale obținute și comunicate în literatura științifică internațională. Pentru testarea funcționalității emițătorului, generatorul MMW este prevăzut din fabricație cu un detector în **banda – S**, prevăzut cu LED de semnalizare, plasat pe panoul de control. Generatorul a fost folosit pentru studiul **efectelor biologice MMW de natură atermică** (*emițătorul produce la nivelul zonei biologice țintă o încălzire mai mică de 0,1°C, statistic nesemnificativă*).

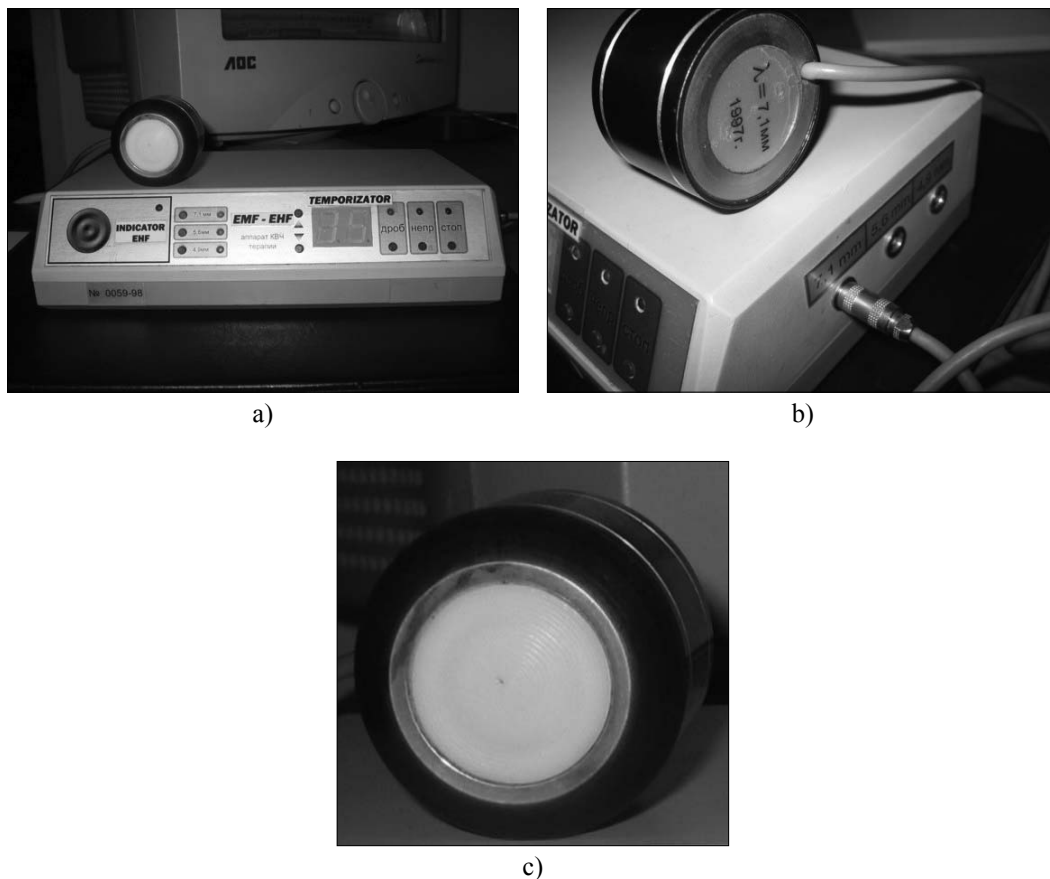


Fig.1. Generatorul de unde milimetrice „EHF – ND” folosit în experiment.

Recoltarea intraoperatorie de fragmente de țesut proaspăt

- țesut aponevroză palmară de la 10 pacienți cu boală Dupuytren (*aponeuroctomie totală*) anterior iradiată MMW;
- țesut aponevroză palmară de la pacienți cu boală Dupuytren, neiradiat MMW (*probe control*);
- țesut aponevroză palmară normal de la pacienți cu alte tipuri de traumatisme la nivelul mâinii, fără boală Dupuytren (*a se vedea Fig.2 și Fig.3*).

Menționăm că probele proaspăt iradiate au fost procesate în conformitate cu standardele internaționale de lumină și analiză morfologică și microscopică.

Analiza histopatologică prin microscopie optică

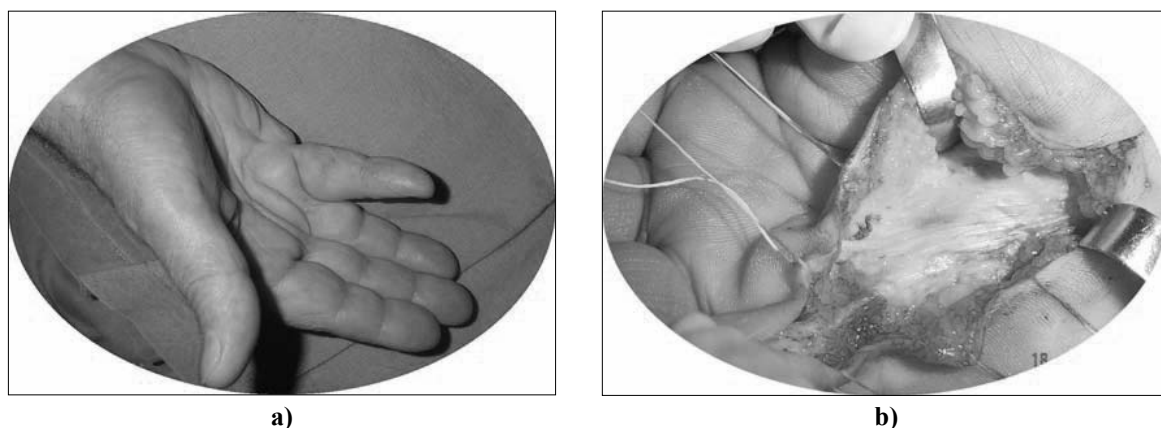


Fig.2. Boală Dupuytren:
a) iradiere MMW prealabilă înainte de operație; b) excizarea intraoperatorie a nodurilor Dupuytren.

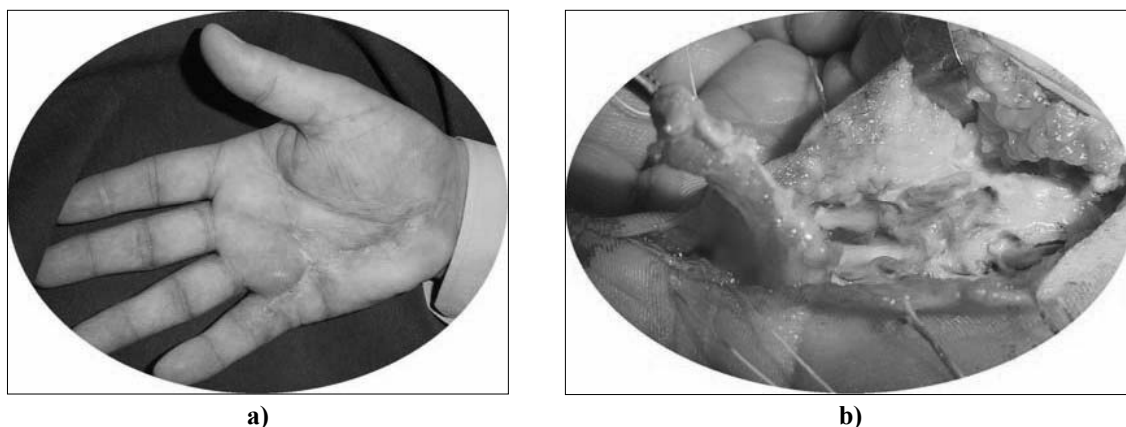


Fig.3. Pacient cu traumatism de origine nepatologică, mecanică (probe de control):
a) înainte de operație; b) după operație.

Probe mici de țesut provenite de la pacienți cu noduli Dupuytren (cât și cei cu traumatisme nepatologice) au fost fragmentate, imersate în soluție Bovin's, dehidratate în etanol, curățate în xilen și apoi înglobate în parafină. Prin utilizarea microtomului, s-au obținut secțiuni de 5 μm , care au fost ulterior tratate cu hematoxi-lin-eozină. Analiza histopatologică a nodurilor Dupuytren îi evidențiază pe aceștia în stadiul inițial de evoluție, adică proliferativ (Fig.4). În acest stadiu nodulii sunt caracterizați printr-un număr mare de fibroblaste, cu fibre de collagen situate între ele (Fig.4).

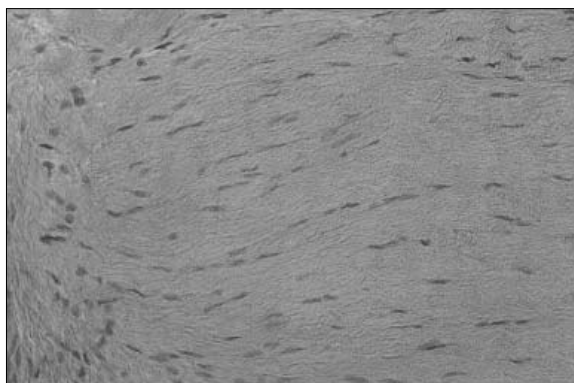


Fig.4. Probe de țesut aponevroză Dupuytren (mărire x 40).

Nodulii Dupuytren se regăesc asociați cu glandele exocrine de perspirație (transpirație), imaginea fiind completată de prezența țesutului adipos și a vaselor sangvine capilare provenite din țesutul interstițial de conexiune (*a se vedea* Fig.4 și Fig.5).

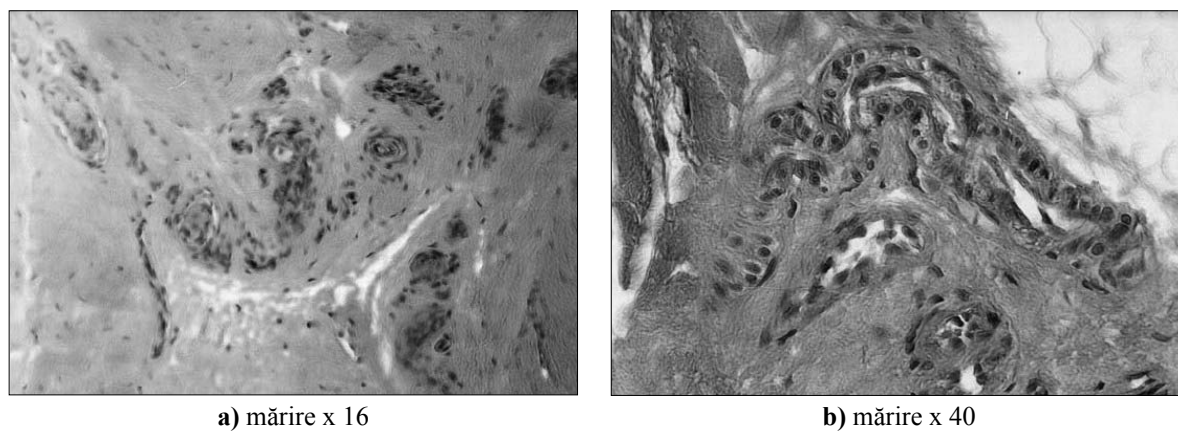


Fig.5. Probă de țesut aponevroză Dupuytren:
a) asocierea nodulilor cu glandele exocrine; b) prezența țesutului gras și a capilarelor sangvine.

O altă caracteristică importantă a fibroblastelor din probele analizate este că acestea prezintă nuclei alungiți și o cantitate moderată de citoplasmă (*a se vedea* Fig.6):

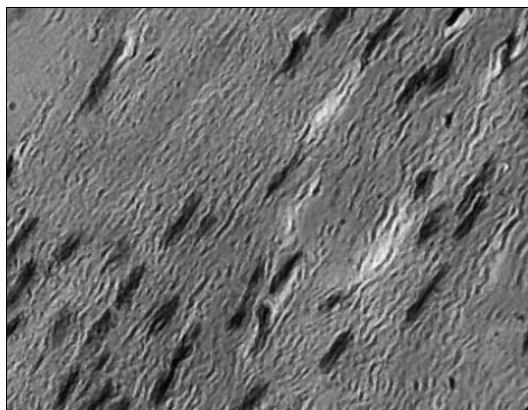


Fig.6. Fibroblaste cu nuclei alungiți (mărire x 40).

După executarea protocolului de iradiere MMW asupra nodulilor Dupuytren, numărul de fibroblaste pare a fi scăzut semnificativ (*a se vedea pentru comparație* Fig.7):

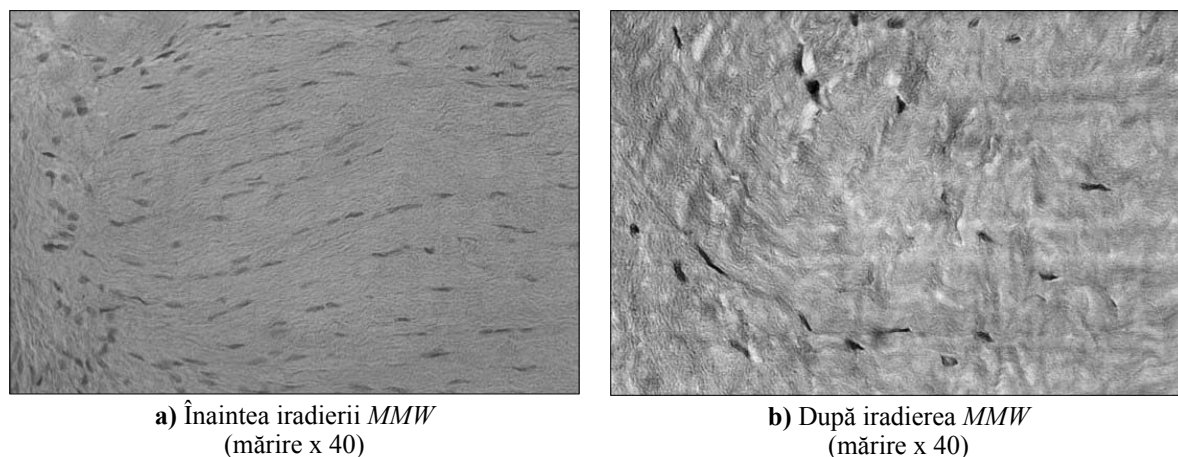


Fig.7. Comparație între probele de țesut (fibroblaste):
a) înaintea iradierii MMW; b) după iradierea MMW.

Nu în ultimul rând, după expunerea MMW, fibroblastele au degenerat, fragmentat, forma lor devenind iregulară, prezentând nuclei hiper cromatici (*a se vedea* Fig.8). Au existat și cazuri în care, în anumite regiuni ale nodulilor Dupuytren iradiați, fibroblastele s-au menținut normale, fusiforme, dar numărul lor a fost considerabil mai mic decât în probele neiradiate (de control) (*a se vedea* Fig.8):

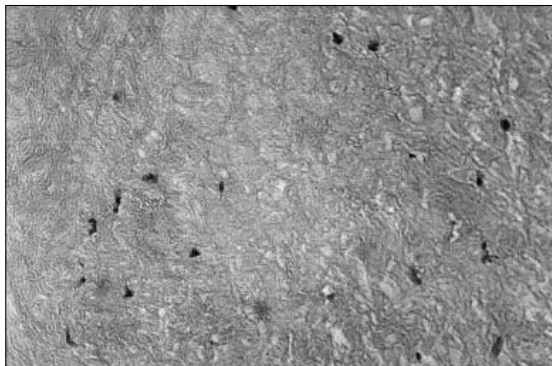


Fig.7. Fibroblaste degenerate (după expunerea MMW).

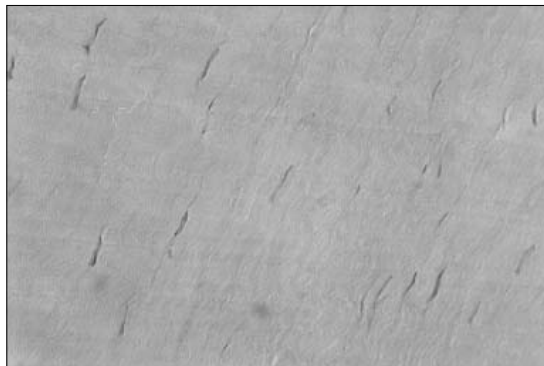


Fig.8. Fibroblaste normale, dar reduse semnificativ ca număr (după iradierea MMW).

Studii electronomicroscopice

Probele de țesut destinate studiului electrono-microscopic au fost „semplate” în cuburi de 1 mm³ în camera de operație, fiind apoi plasate într-o soluție 2,5% glutaraldehidă, tamponate cu o soluție 0,1M sodiu cocodilat cu pH 7,4 și apoi fixate în 1% OsO₂, folosindu-se aceeași soluție tampon și dehidratant; ulterior acestor etape de pregătire au fost înglobate în EPON 812. Secțiunile ultrasubțiri obținute au fost tratate cu uranil-acetat și citrat de plumb, fiind apoi studiate la un microscop electronic PHILIPS 206S, care operează la 80 kV.

Acest tip de analize au confirmat existența unor diferențe între ultrastructura nodulilor Dupuytren neiradiați și a celor iradiați MMW. Astfel, în nodulii expuși MMW s-au identificat adesea fibroblaste și miofibroblaste aflate în contact. Fibroblastele neiradiate se caracterizează printr-un reticul endoplasmic bine dezvoltat, mitocondrii și vezicule secretoare care sugerează o bogată activitate de sinteză proteică. Miofibroblastele au un fenotip similar cu cel al fibroblastelor, dar acestea conțin microfilamente de actină în citoplasmă; totodată, acestea sunt înconjurate de un strat extracelular conectat cu „lamina basalis” (*a se vedea* Fig.9):

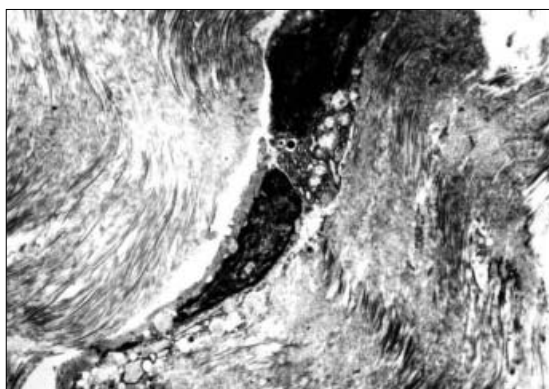


Fig.9. Probă de țesut noduli Dupuytren neiradiați MMW (Philips 206S x 4.500).

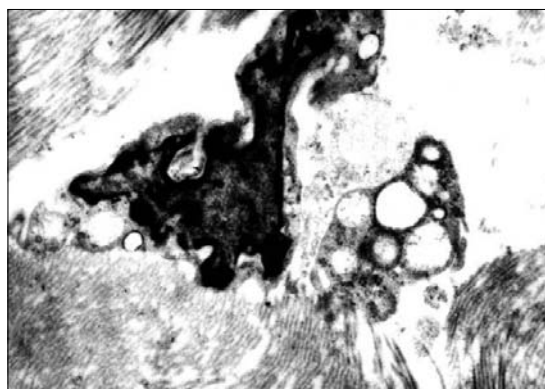


Fig.10. Probă de țesut noduli Dupuytren iradiați MMW (Philips 206S x 9.100).

În cazul nodulilor Dupuytren iradiați MMW, majoritatea fibroblastelor și miofibroblastelor apar degenerate structural, identificându-se un număr foarte mare de fibroblaste apoptotice (*a se vedea* Fig.10).

De asemenea, miofibroblastele prezintă o dezorganizare la nivelul nuclear, la nivelul reticulului endoplasmic și al vacuolelor citoplasmice, microfilamentele de actină având o distribuție neregulată (la întâmplare); stratul extracelular s-a prezentat într-o formă discontinuă (*a se vedea* Fig.11):

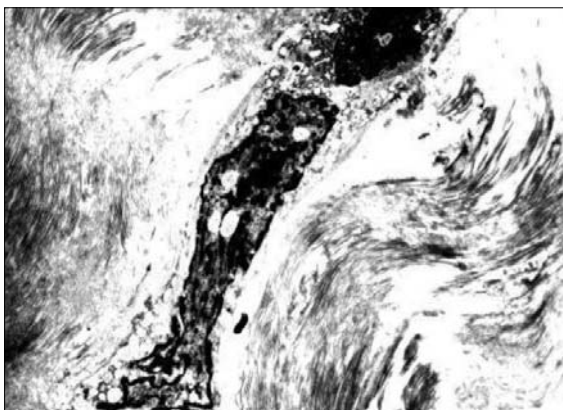


Fig.11. Miofibroblaste în dezorganizare (Philips 206S x 4.500).

În structura nodurilor Dupuytren neiradiată fasciculele de fibre de colagen (formează structura țesutului conectiv) sunt strâns asociate între ele și orientate în aceeași direcție (*a se vedea* Fig.12):

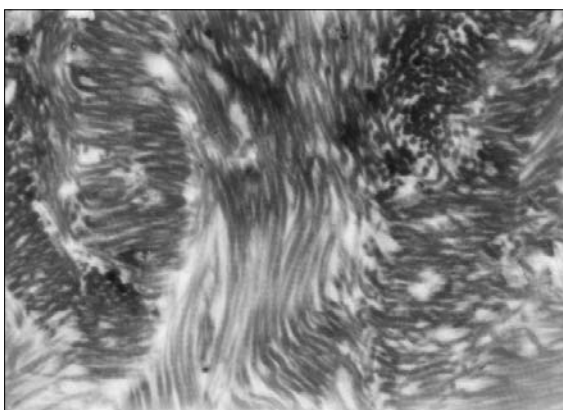


Fig.12. Fascicule de fibre de colagen din probele neiradiate MMW având aceeași orientare și direcție; fibrele sunt strâns legate între ele (Philips 206S x 16.000).

Spre deosebire de probele de control, în nodulii Dupuytren iradiată MMW țesutul conectiv se caracterizează prin fragmentarea și dezorganizarea fibrelor de colagen, între acestea existând spații de diferite mărimi (*a se vedea* Fig.13); mai mult, fibrele de colagen sunt dispuse pe direcții diferite, la întâmplare (aspect neregulat) (*a se vedea* Fig.14).

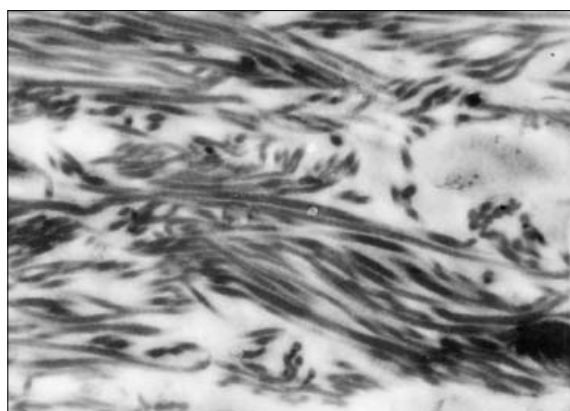


Fig.13. Țesut conectiv fragmentat și dezorganizat (după iradierea MMW)(Philips 206S x 16.000).



Fig.14. Fibre de colagen dispuse pe direcții diferite (Philips 206S x 10.000).

Concluzii

Observațiile noastre experimentale, efectuate cu ajutorul microscopiei optice și electronice, au subliniat ideea că undele milimetrice ar putea fi implicate în inducerea apoptozei celulelor implicate în sinteza țesutului conectiv, prin aceasta contribuind la reorganizarea fibrelor de colagen afectate de boala Dupuytren. S-au putut constata mari diferențe între ultrastructura nodulilor iradiați MMW și probele de control. De asemenea, observațiile clinice efectuate se corelează cu modificările ultrastructurale celulare puse în evidență, pacienții descriind o „înmuire” a nodulilor din zona aponevrozei palmare și o senzație de „micșorare” a acestora (prin autopalpare), urmat de un grad de libertate sporit al mâinii; nu s-a observat nici o recădere, dar timpul de observație a fost, evident, foarte scurt pentru o asemenea concluzie.

Referințe:

1. Betskii O.V., Kislov V.V., Lebedeva N.N. Millimeter waves and living systems, ISBN 5-94818-024-7. – Moscow, 2004.
2. Rusu D.B. Guglielmo d’Inzeo. Proposal for a mechanism model explicating phenomenological interactions between millimeter waves and living cells by means of stochastic resonance.
3. Wellens Th., Shatokhin Vy., Buchleitner A. Stochastic resonance, S0034-4885(04)31707-0, UK, 2003.
4. Deviatkov N.D., Betskii O.V. Biological aspects of low intensity millimeter waves, ISBN 5-86213-001-2. – Moscow, 1994.
5. Chiotan N., Matusz P., Florescu I. Cicatrizarea. – București: Național, 1999.
6. Badalamente M.A., Hurst L.G., Grandia S.K., Sampson S.P. Platelet derived growth factor in Dupuytren’s disease // J. Hand. Surg. – 1992. – 17A:317.
7. Hay E.D. Epithelial-mesenchymal transitions // Semin. Dev. Biol. – 1990. – 1:347.
8. Prietto A.L, Crossin K.L. Cell-Cell Adhesion Molecules in Epithelial Mesenchymal Transformation In: Epithelial-Mesenchymal Transitions / Red. D.Newgreene, Acto Anatomico, 1995, 154(1), 1:21.– Basel: Karger,1995.

Prezentat la 13.04.2009