

## EFFETTI BIOLOGICI DELLE ONDE D'URTO SU COLTURE CELLULARI

B. Moretti\*, F. Iannone<sup>o</sup>, M. Corrado\*, L. Amoruso\*, G. De Donno\*, P. A. Iasella \*, V. Patella\*

\* *Facoltà di Med. E Chir. Università degli Studi di Bari- Dipartimento di Metodologia Clinica e Tecniche Medico Chirurgiche - Sezione di Ortopedia II*

<sup>o</sup> *Facoltà di Med. E Chir. Università degli Studi di Bari - Unità Operativa di Reumatologia Universitaria*

**Abstract dal 6° Congresso Nazionale S.I.T.O.D. -Roma 3-5 novembre 2005**

### Introduzione

La terapia con onde d'urto extracorporee (ESWT) è diffusamente utilizzata in campo ortopedico e traumatologico, sia nel trattamento delle patologie dei tessuti molli che dell'osso.

L'onda d'urto è un'onda acustica ad alta energia che può essere generata da apparecchi elettroidraulici, elettromagnetici o piezoelettrici. Ha un andamento ad impulso e diffonde nei tessuti secondo le leggi fisiche delle onde acustiche; i suoi effetti saranno quindi influenzati dalle caratteristiche particolari del mezzo che attraversa (densità, impedenza, ecc).

Oltre all'effetto pressorio diretto dell'impulso sul tessuto nella zona bersaglio, l'onda d'urto, attraversando tessuti ad elevato contenuto liquido, provoca la formazione di microscopiche bolle di gas (effetto cavitazionale) che vanno incontro ad una violenta implosione che forma un getto d'acqua, il cosiddetto "jet stream" che, colpendo i tessuti vicini, determina microlesioni la cui entità è funzione del numero degli impulsi e della loro energia. Queste lesioni sono responsabili della catena degli eventi biologici desiderati che inducono, a livello ultrastrutturale, diversi tipi di risposta secondo la qualità del tessuto su cui sono applicati. Nel tessuto osseo è stata osservata una risposta di tipo osteogenetico ed una di tipo vascolare, nei tessuti molli, invece, oltre ad una risposta vascolare si verifica anche una risposta antinfiammatoria ed antalgica.

Studi recenti sembrano dimostrare che le onde d'urto modificano il metabolismo dei condrociti ed osteoblasti "in vitro".

Scopo del nostro studio è quello di verificare gli effetti dell'onda d'urto a differente livello di energia ed impulsi totali sull'espressione di *IL-10*, *TNF $\alpha$*  e *integrina  $\beta 1$  (CD29)* da parte di condrociti di OA "in vitro" e sull'espressione di *CD29 (integrina  $\beta 1$ )*, *CD105 (recettore del TGF $\beta$ )*, *TNF $\alpha$*  e *IL-10* di osteoblasti di artrosi.

## Metodi

Gli osteoblasti sono stati isolati dall'osso subcondrale di 8 pazienti sottoposti ad intervento di protesi per gonartrosi e 3 soggetti di controllo non artrosici e coltivati in fiasche di 25 cm<sup>2</sup> in DMEM con 10% FCS. Le colture sono state sacrificate alla subconfluenza e gli osteoblasti trattati con EWT mediante un litotritore elettromagnetico (Minilith SL1, Storz Medical) selezionando due differenti livelli di energia (0,055 cioè basso livello e 0,17 mJ/mm<sup>2</sup> cioè livello medio) ognuno dei quali applicato con 500 e 1000 colpi. Dopo incubazione di 24h, l'espressione di CD29, CD105, TNF $\alpha$ , IL-10 è stata valutata mediante citofluorimetria (FACScan, Becton Dickinson); per la valutazione di TNF $\alpha$  e IL-10 intracellulari gli osteoblasti venivano previamente permeabilizzati con saponina.

La cartilagine articolare è stata ottenuta da 9 pazienti sottoposti ad intervento di protesi per gonartrosi. I condrociti sono stati isolati mediante digestione enzimatica sequenziale con ialuronidase, pronase e collagenase e la vitalità cellulare valutata mediante test al tripan bleu. I condrociti sono stati suddivisi in due popolazioni A e B: quelli A sono stati sottoposti ad un unico trattamento con ESWT utilizzando i suddetti parametri sperimentali con lo stesso tipo di litotritore; i condrociti B non sono stati sottoposti ad alcun trattamento. Successivamente, tutti gli elementi cellulari (A e B) sono stati posti in coltura (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) per 48 h e, quindi, la valutazione dell'espressione di CD29, TNF $\alpha$ , IL-10 è stata eseguita mediante citofluorimetria.

A tal fine i condrociti sono stati incubati a 4°C per 20 min con l'anticorpo monoclonale anti-CD29, anti-TNF $\alpha$ , anti-IL-10. Nel caso di anti-TNF $\alpha$  e anti-IL-10 le cellule sono state previamente permeabilizzate con saponina e fissate con paraformaldeide per la valutazione delle citochine intracellulari.

## Risultati

I risultati preliminari del nostro studio hanno dimostrato che i livelli intracellulari di IL10 negli osteoblasti artrosici aumentavano dopo trattamento con EWT 14.5 %  $\pm$  3 (0.055 mJ/mm<sup>2</sup>/500 impulsi), 14.8 %  $\pm$  4 (0.055 mJ/mm<sup>2</sup>/1000 impulsi), 15.0 %  $\pm$  4 (0.17 mJ/mm<sup>2</sup>/1000 impulsi) e la differenza risultava statisticamente significativa (p < 0.05 verso basale 11.0 %  $\pm$  3). Gli osteoblasti artrosici trattati mostravano un profilo analogo delle variazioni metaboliche con identici livelli di significatività, mentre tali risultati non si rilevavano negli osteoblasti dei soggetti sani di controllo. L'espressione di CD29, CD105 e TNF $\alpha$  non differiva significativamente tra osteoblasti sottoposti a ESWT ed osteoblasti non trattati.

Il nostro studio ha dimostrato, inoltre, che il trattamento con onde d'urto a basse e medie energie non determina un effetto citotossico sui condrociti trattati che sopravvivono al trattamento.

È stata osservata una riduzione statisticamente significativa dell'espressione del TNF-alfa nei condrociti trattati con onde d'urto rispetto al gruppo controllo; questa riduzione sembrerebbe direttamente proporzionale all'aumentare del livello energetico e del numero di colpi .

Un andamento simile si è riscontrato nell'espressione dell'IL10 che va incontro ad una riduzione che sembra proporzionale all'aumentare delle energie utilizzate.

Non sono state ritrovate differenze statisticamente significative nell'espressione delle B1 integrine (CD29).

### Conclusione

Il trattamento con ESWT a bassi livelli di energia ed impulsi sembra stimolare le attività sintetiche soprattutto degli osteoblasti umani patologici "in vitro". In particolare, i livelli intracellulari di IL-10 appaiono aumentati dopo 24h dal trattamento con energie medio- basse.; anche se il ruolo dell'IL-10 nella fisiopatologia degli osteoblasti è sconosciuto, tuttavia, in analogia con altri sistemi tissutali, è verosimile che l'IL-10 moduli la differenziazione e la crescita degli osteoblasti.

Dall'analisi dei dati emersi dal nostro studio relativamente all'azione dell'ESWT sui condrociti possiamo concludere che l'azione delle onde d'urto a basse e medie energie sui condrociti patologici non si realizzerebbe attraverso una induzione metabolica, bensì attraverso un rallentamento del processo catabolico che si dimostra attraverso la riduzione dell'espressione delle citochine procataboliche.

Questi dati sperimentali suggeriscono la possibilità che il trattamento con onde d'urto possa intervenire modificando il processo anatomo-patologico che caratterizza l'artrosi.

Ulteriori studi sono necessari, soprattutto nell'ambito clinico, per confermare i dati preliminari.

Lo studio di ulteriori pazienti e soprattutto di soggetti di controllo potrà chiarire il significato fisiopatogenetico ed il possibile risvolto clinico di tali risultati.