

## **Lo sviluppo della ricerca nella terapia con onde d'urto.**

Lucia Martini

*Servizio di Chirurgia Sperimentale Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna*

**Abstract dal 3° Congresso Nazionale S.I.T.O.D. - 17 maggio 2002 - Milano**

### **Introduzione**

Nonostante la terapia con onde d'urto (ESWT) nel campo della litotrissia venga impiegata ormai da trenta anni, il suo utilizzo in ortopedia e traumatologia deve essere considerato una recente acquisizione.

Esiste un'ampia letteratura relativa a studi clinici sull'impiego di questa terapia dell'ESWT in campo ortopedico per il trattamento di diverse patologie (epicondilite, epitrocleiti, tendinite calcifiche di spalla, fasciti plantari, pseudoartrosi, ritardi di consolidazione e necrosi della testa del femore dell'adulto), ma il meccanismo d'azione attraverso cui le onde d'urto possano stimolare o riattivare il processo di guarigione dei tessuti non è ancora noto.

Si ritiene che questa terapia possa agire favorendo la vascolarizzazione di tessuti scarsamente vascolarizzati o avascolarizzati, stimolando la liberazione di fattori locali di crescita e comunque promuovendo il reclutamento di cellule staminali che rappresentano una componente cellulare molto importante per una guarigione del tessuto interessato.

Probabilmente l'effetto delle onde d'urto sui tessuti si esplica principalmente attraverso l'effetto fisico legato al meccanismo di cavitazione con la produzione di microbolle nei fluidi costituenti i diversi tessuti che producono effetti micromeccanici a carico dei tessuti dell'apparato muscoloscheletrico che si traducono in effetto a livello delle diverse componenti cellulari dei tessuti stessi.

Molti sono gli studi sperimentali condotti sia "in vivo" che "in vitro" su gli effetti delle onde d'urto per comprendere il meccanismo d'azione di questa terapia.

Gli studi sperimentali condotti utilizzando modelli animali hanno esaminato diversi aspetti dell'effetto delle onde d'urto sui tessuti dell'apparato muscoloscheletrico. Tali studi oltre a considerare modelli diversi e quindi con risultati talvolta non sempre sovrapponibili, hanno preso in esame anche varie componenti tessutali che sono state trattate con apparecchiature, frequenze ed intensità differenti fornendo indicazioni parziali per quanto attiene il meccanismo d'azione di questa terapia.

Ciò ha portato, soprattutto, ad una certa difficoltà ad interpretare i risultati ottenuti dalle varie ricerche in maniera comparativa.

Anche considerando gli studi "in vitro" condotti valutando gli effetti delle onde d'urto sui tessuti nel corso degli anni sono stati impiegati modelli molto diversi e anche in questo caso i risultati non sempre erano tra loro confrontabili. I modelli "in vitro", però non rispecchiano la complessità di un organismo vivente "in toto", ma hanno il vantaggio, rispetto ai modelli animali di valutare in dettaglio i vari processi fisiopatologici alla base della rigenerazione tessutale e ben si prestano alla valutazione dei meccanismi d'azione a livello cellulare dei trattamenti terapeutici.

Scopo della nostra ricerca, considerando la letteratura esistente sugli studi sperimentali degli effetti delle onde d'urto in ortopedia, è di valutare gli effetti di questa terapia utilizzando una unica apparecchiatura su colture cellulari costituenti i tessuti dell'apparato muscoloscheletrico considerando gli effetti specifici di questo tipo di terapia sui singoli costituenti cellulari.

Una particolare attenzione è stata posta all'effetto prodotto sulla singola cellula per vedere se gli incoraggianti risultati ottenuti negli studi clinici possano essere dovuti oltre che ad una stimolazione di fenomeni di rivascolarizzazione, di liberazione di mediatori chimici con effetti antidolorifici, rimozione di tossine ecc, anche ad un effetto diretto stimolante sulla cellula con un aumento dell'attività metabolica della stessa.

Questo studio preliminare, a nostro avviso, ha permesso di indagare sulle eventuale liberazione di mediatori chimici da parte della cellula trattata permettendo quindi una più appropriata comprensione degli aspetti fisiopatologici dei tessuti trattati con onde d'urto.

Grazie all'esperienza del servizio di Chirurgia Sperimentale sulla valutazione degli effetti "in vitro" di altri tipi di terapie fisiche quali il laser ed i campi elettromagnetici su colture cellulari primarie di origine umana, di origine animale e di linee cellulari immortali è stato allestito un protocollo di ricerca in cui diversi tipi di colture cellulari sono state sottoposte a terapia con onde d'urto utilizzando un generatore elettro idraulico Ossatron® HMT, utilizzando le seguenti energie: 14, 21, 28 Kv ed un numero totale di 500 e 1000 colpi. Per ciascun tipo cellulare sono state allestite colture di controllo non sottoposte a terapia, ma sottoposte agli stessi passaggi di laboratorio.

Questo studio è stato condotto in via preliminare su linea cellulare osteoblast-like (MG63), su osteoblasti e su cellule cartilaginee in coltura primaria umani e di origine ovina; successivamente verranno trattate con gli stessi parametri cellule tendinee e su cellule muscolari sia in coltura primaria, sia su linee cellulari immortali per valutare l'effetto di questo tipo di terapia su tutte le componenti dell'apparato muscoloscheletrico.

Infine verranno esaminati come ultima linea di ricerca l'effetto di questo tipo di terapia su cellule staminali prelevate dal midollo osseo in particolare per valutare se è in grado di influenzare il grado e le modalità di differenziazione di queste cellule.

Questo approccio con un modello "in vitro" trae origine da ben precise richieste etiche e legislative nazionali e comunitarie che richiedono comunque un approccio alla ricerca sperimentale con studi "in vitro" prima di passare a studi con modelli animali, la stessa Direttiva comunitaria (86/609/ECC) recepita con il D.L.vo116/92 in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali prevede che vengano sviluppati metodi alternativi all'impiego di modelli "in vivo" quali appunto i metodi "in vitro".

Questo studio porta all'osservazione degli effetti diretti sulla componente cellulare dei diversi tessuti dell'apparato muscoloscheletrico e se da un lato la coltura cellulare non è in grado di ricreare quello che avviene nella globalità del tessuto sottoposto al trattamento d'altra parte un eventuale effetto di stimolazione o di citotossicità può essere messo direttamente in correlazione con le ESWT. Le colture cellulari sono utili per gli studi sulla biologia del tessuto osseo in quanto permettono di valutare fattori che sono determinanti per la proliferazione e la differenziazione della componente cellulare del tessuto osseo e questi stessi marker biochimici sono indicativi dell'attività delle stesse cellule anche nell'osso intatto "in vivo".

## **Materiali e metodi**

La fase preliminare di questo studio è stato condotto sugli osteoblasti ritenendo questo tipo di cellule la componente centrale nel processo di rimodellamento dell'osso; queste cellule di origine mesenchimale sono in grado di sintetizzare diversi costituenti fondamentali per il processo di produzione e di mantenimento della matrice ossea.

La scelta di utilizzare cellule di diversa origine, umana e ovina in coltura primaria e cellule osteoblast-like è legata al fatto che tale terapia trova già largo impiego in campo clinico e quindi da qui la necessità di valutare gli effetti direttamente sulle cellule interessate dal trattamento e per tale motivo sono stati valutati gli effetti sulle cellule umane in coltura primaria. D'altro canto la necessità di ricorrere eventualmente a modelli sperimentali "in vivo" affidabili ci ha indotto ad utilizzare anche cellule di derivazione ovina perché la pecora negli ultimi anni trova un sempre più largo impiego nella ricerca sperimentale in campo ortopedico per le dimensioni dei segmenti ossei abbastanza sovrapponibili a quelle dell'uomo.

Colture cellulari sono state messe in sospensione nel medium ad una concentrazione di  $1 \times 10^6$  cellule/ml in 1.5 ml.

Le sospensioni cellulari sono state mantenute ad una temperatura di 37°C per tutta la durata dell'esperimento; per l'esecuzione dello studio sono stati formati, per ogni tipo di cellule, quattro gruppi: gruppo A, gruppo B e gruppo C in funzione dell'energia utilizzata 14, 21 e 28 kV ed un gruppo di controllo; tutti i gruppi sono stati ulteriormente divisi in due sottogruppi (1 e 2) in funzione del numero totale di colpi utilizzati (500 e 1000 colpi); il gruppo di controllo non è stato trattato con onde d'urto, ma è stato sottoposto alle stesse procedure delle altre cellule per valutare l'eventuale alterazione della vitalità cellulare legate alle procedure sperimentali.

Alla fine del trattamento le cellule sono state contate (Coulter Z1 Counter) ed è stata valutata la vitalità cellulare con test di colorazione ad esclusione vitale (Trypan blue dye exclusion); i dati ottenuti sono stati confrontati con i valori basali.

Da ogni provetta sono state coltivate alla concentrazione di  $1 \times 10^4$  cellule/ml e messe in coltura per 48 ore.

Sulle colture cellulari è stato eseguito l'MTT test per valutare la vitalità cellulare.

Il surnatante delle colture cellulari è stato raccolto a 24 e 48 ore per eseguire valutazioni di citotossicità e per valutare il metabolismo cellulare; in particolare sono stati eseguiti i seguenti tests: LDH (lattico deidrogenasi), NO (ossido nitrico) ALP (fosfatasi alcalina), OC (osteocalcina), PICP (procollagene tipo 1) TGF- $\beta$ 1.

Per quanto riguarda l'analisi statistica dei dati ottenuti questa è stata condotta utilizzando il programma statistico SPSS 10.0 (SPSS inc. Chicago, IL, USA) riportando i dati con il valore medio più o meno la deviazione standard con un livello di significatività con  $p < 0.05$ .

Dopo aver verificato la distribuzione normale e l'omogeneità della varianza, è stato eseguito un'analisi della varianza multi canale (ANOVA) per valutare il grado di interferenza tra i fattori oggetto dello studio (livello di energia e numero totale di colpi) e i risultati della conta cellulare e della vitalità cellulare (MTT test); infine è stata condotta un'analisi a tre vie (MANOVA) (livello di energia, numero di colpi e tempo trascorso dalla terapia) per valutare l'effetto di questi parametri e i fattori biochimici considerati.

## **Risultati**

Per quanto riguarda la vitalità cellulare è stata osservata una drastica riduzione del numero di cellule al termine del trattamento ai livelli più alti di energia 21 e 28 kV mentre i gruppi trattati con energie inferiori (14 kV) presentavano un numero di cellule uguale al controllo.

Osservando i valori dell'MTT test abbiamo constatato che il livello di energia è il parametro critico che influenza positivamente o negativamente la sopravvivenza delle cellule.

Infatti mentre le cellule trattate con intensità di 28 kV presentavano livelli molto più bassi rispetto al controllo, le cellule trattate con un livello di energia di 14 kV a 48 dimostravano un aumento nella produzione di MTT.

Analizzando questi dati si può ipotizzare un effetto citodistruttivo per i valori di energia più elevati, mentre per quanto concerne le intensità inferiori si può ipotizzare un effetto di citostimolazione.

Queste differenze sono più evidenti nelle cellule ossee, mentre le cellule cartilaginee presentano una resistenza superiore agli effetti citodistruttivi di questa terapia ai livelli maggiori di energia.

Per quanto concerne il numero totale di colpi abbiamo osservato nel nostro studio che con i due parametri scelti 500 1000 colpi solo alcuni fattori biochimici sono influenzati, ma non abbiamo notato particolare differenze tra 500 e 1000 colpi per quanto riguarda la vitalità cellulare. Gli unici fattori che presentano una differenza tra le due variabili sono l'OC e il PICP, nel trattamento degli osteoblasti: entrambi variano sia in funzione dell'energia totale, ma anche in funzione del numero totale di colpi; infatti la concentrazione minore di entrambi si osserva ai livelli maggiori di energia e a 1000 colpi.

## **Conclusioni**

Quindi concludendo è il livello di energia che rappresenta il parametro in grado di condizionare la vitalità cellulare in senso positivo o negativo, portando alla morte cellulare alle intensità maggiori e ad una citostimolazione ai valori più bassi di energia.

Per quanto riguarda l'effetto citodistruttivo è massimo al termine delle prime 24 ore, perché a distanza di 48 ore le cellule che sopravvivono al trattamento anche a 28 kV non vanno incontro ad ulteriori fatti citodistruttivi, quindi possiamo ritenere che questo effetto negativo sia massimo al termine del trattamento. Questo aspetto viene confermato dall'aumento in questo gruppo del valore di LDH che però non presenta differenze tra le 24 e le 48 ore. L'effetto di citostimolazione viene confermato dall'aumento di OC, ALP e PICP che sono indice di una attivazione osteoblastica.

In conclusione dalla fase preliminare dello studio possiamo affermare che il livello di energia condiziona la sopravvivenza delle cellule e a livelli di energia di 14 kV ( $015\text{mJ/mm}^2$ ) le onde d'urto danno origine ad una citostimolazione, a livelli intermedi di energia 21 kV non si osservano effetti di aumento del metabolismo cellulare, ma non si verificano nemmeno effetti negativi, mentre i livelli maggiori di energia 28 kV hanno un effetto citodistruttivo che non si protrae oltre le 24 ore dal trattamento.