



Università Campus Bio-Medico di Roma

Corso di Dottorato di Ricerca in
Rigenerazione Tissutale dell'Apparato Locomotore
ed Applicazioni Tecnologico-Sperimentali
(XXII ciclo anno 2007)

**Possono i campi elettromagnetici pulsati influenzare
il comportamento biologico di osteoblasti umani?**

Uno studio sperimentale in vitro

Dott. Rocco Papalia

Coordinatore
Prof. Vincenzo Denaro

Supervisor
Prof. Nicola Maffulli

18 gennaio 2010

INDICE

Capitolo 1

Le linee cellulari dell'osso.

1.1: Cellule del tessuto osseo.

1.2: la biologia cellulare degli osteoblasti: osteoblasto genesi e differenziamento cellulare.

1.2.1: Ruolo delle BMP's nel differenziamento osteoblastico

1.2.2: Recettore delle BMP's

1.2.3: Ruolo dei fattori di trascrizione smad nel differenziamento osteoblastico

1.2.4: Ruolo di Run-X2 e Osterix nel differenziamento osteoblastico

1.2.5: Ruolo degli osteoblasti nel differenziamento osteoclastico

1.2.6: Bibliografia I capitolo

Capitolo 2

Quali effetti esercitano i campi magnetici sui sistemi biologici?

2.1: Effetti biologici dei campi elettromagnetici

2.2: Effetti biologici dei campi elettromagnetici di bassa frequenza

2.3: I campi elettromagnetici pulsati e statici in ortopedia

2.4: La piezoelettricità dell'osso

2.5: Effetti cellulari

2.5.1: Effetti sui canali trans membrana

2.5.2: Effetti sui recettori di membrana

2.6: Applicazioni cliniche dei campi elettromagnetici nelle patologie ossee

2.6.1: Ritardo di consolidamento e pseudoartrosi

2.6.2: Algodistrofia

2.6.3 Necrosi avascolare

2.7: Effetti dei campi elettromagnetici pulsati sugli osteoblasti

2.8: Bibliografia II capitolo

Capitolo 3

Studio sperimentale

3.1: Premessa

3.2 Materiali e Metodi

3.2.1 Generazione dei campi elettromagnetici

3.2.2 Colture cellulari

3.2.3 Analisi della crescita cellulare

3.2.4 Metodo istochimico per la valutazione dell'ALP

(semiquantitativo)

3.2.5 Valutazione spettrofotometrica quantitativa dell'ALP

3.3 Analisi statistica

3.4 Risultati

3.4.1 Percentuale di proliferazione

3.4.2 Attività della Fosfatasi alcalina

3.5 Discussione

3.6 Conclusioni

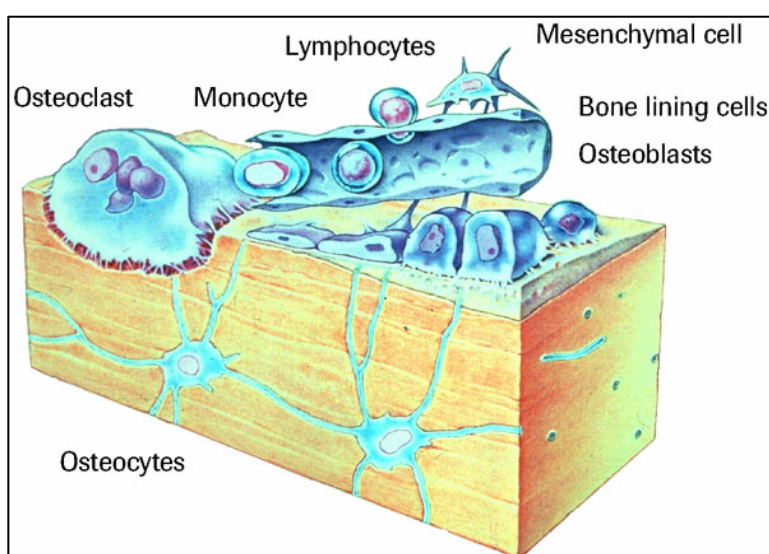
3.7 Bibliografia III capitolo

CAPITOLO 1

LA LINEE CELLULARI DELL'OSSO

1.1: Cellule del tessuto osseo⁹

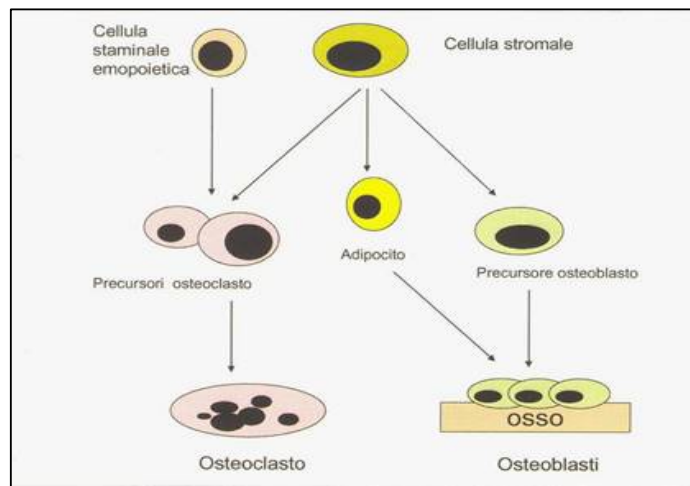
Le cellule proprie del tessuto osseo sono distinte in 4 tipi: le *cellule osteoprogenitrici* (dette anche *preosteoblasti*), gli *osteoblasti*, gli *osteociti* e gli *osteoclasti*. Cellule osteoprogenitrici, osteoblasti e osteociti sono fasi funzionali dello stesso tipo cellulare e pertanto considerabili come cellule autoctone dell'osso. Gli osteoclasti, per contro, derivano da precursori immigrati nel tessuto osseo dal sangue, i cosiddetti preosteoclasti, i quali a loro volta si differenziano da cellule



staminali del midollo osseo emopoietico. (Fig. 1 e 2).

Fig. 1: Schema delle varie tipologie cellulari presenti in una sezione di tessuto osseo.

Le cellule osteoprogenitrici, o preosteoblasti, hanno forma fusata o ovalare, con citoplasma scarso e basofilo e nucleo eucromatico con grande nucleolo. Al



microscopio elettronico, la basofilia citoplasmatica si dimostra dovuta a un gran numero di poliribosomi liberi. Gli altri organuli sono poco rappresentati. Le

cellule osteoprogenitrici si collocano sulle superfici libere delle ossa: le si riconoscono a livello dello strato più interno del periostio apposto all'osso, il cosiddetto *strato osteogenico di Ollier*, riccamente vascolarizzato.

Fig. 2: Schema dell'origine di osteoclasti e osteoblasti da cellule progenitrici emopoietiche e mesenchimali stromali.

Tali cellule sono altresì localizzate a livello del tessuto connettivo lasso che riveste le cavità interne dell'osso, il cosiddetto *endostio*, in vicinanza dei capillari sanguigni. Le cellule osteoprogenitrici sono dotate di capacità proliferativa, che si manifesta in modo particolare durante l'accrescimento corporeo ma che può esplicarsi anche durante la vita adulta, se si verifica la necessità di riparare fratture o altre lesioni ossee. Esse sono in grado di produrre e secernere le *bone morphogenetic proteins (BMP)*, fattori di crescita e di differenziamento autocrini. Quando inizia il differenziamento, le cellule osteoprogenitrici si trasformano in osteoblasti.

Gli osteoblasti sono primariamente responsabili della sintesi della sostanza intercellulare dell'osso e della sua mineralizzazione. Esse hanno forma globosa o poliedrica e tendono a giustapporsi le une alle altre a formare delle lamine epitelioidi a ridosso delle superfici ossee in via di formazione. Gli osteoblasti hanno dimensioni rilevanti (circa 20 μm), un nucleo rotondeggiante, eucromatico, con grande nucleolo ed un citoplasma abbondante e basofilo in cui possono mettersi in evidenza granulazioni PAS-positive. Istochimicamente, queste cellule si caratterizzano per la positività alla reazione per la fosfatasi alcalina. Al microscopio elettronico, gli osteoblasti presentano un ergastoplasma sviluppato e un grande apparato di Golgi. I mitocondri contengono numerosi granuli densi, interpretabili come accumuli di ioni calcio. In prossimità dell'apparato di Golgi sono visibili vescicole con vario aspetto contenenti sostanze da esocitare: alcune di queste sono oblunghe contengono un materiale fibrillare a modico arresto elettronico, rappresentato verosimilmente da molecole di procollagene; altre vescicole sono rotonde, a contenuto elettrone trasparente, e si pensa contengano proteoglicani e altre molecole della sostanza fondamentale. Nel citoplasma periferico possono essere presenti dei corpi delimitati da membrana, detti *globuli calcificanti*, di 0,2-0,5 μm di diametro, contenenti una matrice a medio arresto elettronico, in cui sono localizzati enzimi glicoproteici come la fosfatasi alcalina e la pirofosfatasi. Essi non vanno confusi con le cosiddette *sferule calcaree* (in inglese dette appunto *calcifying globules*), che si incontrano nella matrice ossea mineralizzata e che rappresentano i nuclei iniziali di aggregazione dei cristalli. Vescicole di secrezione e globuli calcificanti sono verosimilmente il corrispettivo delle granulazioni PAS-positive visibili al microscopio ottico. Gli osteoblasti sono uniti tra loro e con gli osteociti vicini tramite giunzioni serrate (o *gap junctions*),

tramite le quali le cellule si scambiano molecole segnale per la coordinazione dell'attività metabolica e di deposizione della matrice ossea. L'osteoblasto è la sede di sintesi delle molecole organiche della sostanza intercellulare dell'osso, le quali vengono poi esocitate ed assemblate all'esterno della cellula. L'osteoblasto presiede anche alla mineralizzazione della sostanza intercellulare, secondo modalità che non sono del tutto chiarite. Nel tessuto osseo che viene depositato per primo, il cosiddetto *osso fibroso*, si ritiene che giochino un ruolo chiave i globuli calcificanti. Questi sarebbero estrusi dalla cellula per gemmazione e pertanto ritrovati nella matrice ossea in via di mineralizzazione sotto forma di *vescicole della matrice*, caratteristicamente provviste di un involucro membranoso. Sembra che l'iniziale deposizione di minerale avvenga proprio a ridosso della membrana interna di queste vescicole, le cui componenti agirebbero da catalizzatori per tale processo. Quando poi la membrana si disgrega, tali molecole si disperderebbero nella sostanza intercellulare dove tuttavia manterrebbero questa loro proprietà. Non è ben compreso se un ulteriore ruolo nel processo di mineralizzazione sia svolto dalle sostanze contenute nelle vescicole della matrice che si liberano quando queste si disgregano. Si ritiene verosimile che i precipitati di minerale fungano da centri di nucleazione dei cristalli di apatite. Meno chiaro sarebbe il ruolo della fosfatasi alcalina: secondo alcuni studiosi essa si attiverebbe producendo ioni fosfato che si combinano con lo ione calcio presente nella sostanza extracellulare a cui si aggiunge quello che contemporaneamente si libera dai mitocondri dell'osteoblasto realizzando le condizioni critiche per l'associazione di calcio e fosfato; tale teoria (ipotesi di Robinson) è stata recentemente messa in discussione, poiché questo enzima è attivo anche in tessuti che non mineralizzano (dove è coinvolta nella sintesi della componente organica della matrice intercellulare) e poiché la presenza

di concentrazioni sufficienti di substrati organici fosforilati nei centri di mineralizzazione non è mai stata effettivamente dimostrata. Altrettanto oscuro è il possibile ruolo svolto dalla pirofosfatasi: secondo alcuni ricercatori anch'essa potrebbe attivarsi liberando gruppi pirofosfato da particolari molecole, denominate *difosfonati*, ed inattivandole. I difosfonati, quando sono integri, si combinano con le estremità dei cristalli di apatite e impediscono l'ulteriore concrezione di ioni calcio e fosfato, agendo quindi da inibitori della mineralizzazione. Quando vengano scissi dalla pirofosfatasi osteoblastica, i difosfonati perdono affinità per i cristalli di apatite consentendo così la crescita dei cristalli stessi.

Nel tessuto osseo che viene depositato successivamente all'osso fibroso e che lo rimpiazza, il cosiddetto *osso lamellare*, le vescicole della matrice sono invece virtualmente assenti. Si ritiene che, in questa sede, il processo di mineralizzazione sia avviato da componenti delle fibre collagene e/o da molecole della sostanza fondamentale associati alle fibre collagene. Sembra inoltre importante la presenza dei cristalli di idrossiapatite già presenti dallo stadio di osso fibroso, che in qualche modo ancora non chiaro potrebbero fungere da catalizzatori per la deposizione di nuovi cristalli. In entrambi i casi, alla regolazione della mineralizzazione della matrice ossea contribuirebbero inoltre altre molecole prodotte dagli osteoblasti, tra le quali vanno ricordate l'osteonectina, che favorisce la nucleazione dei cristalli minerali, e l'osteocalcina, che agirebbe invece da inibitore della precipitazione di fosfato di calcio. Una fisiologica deposizione di sostanza minerale è il risultato di un fine equilibrio che si raggiunge nell'azione di tutti i vari fattori capaci di influire su di essa. La produzione della matrice ossea e la sua mineralizzazione avvengono secondo un orientamento ben preciso: inizialmente l'osteoblasto depone osso dal lato rivolto verso la superficie ossea preesistente; successivamente ne depone da

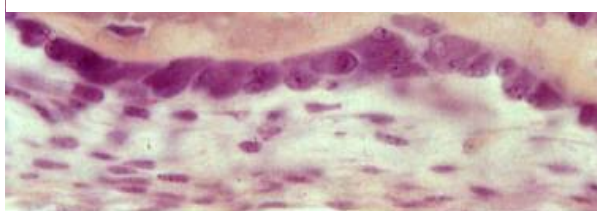
ogni lato tutto attorno a sé, di modo che ciascuna cellula si allontana progressivamente dalle circostanti a causa dell'interposizione di sostanza intercellulare. A questo punto l'osteoblasto rallenta sostanzialmente la sua attività metabolica e si trasforma in un *osteocita*, imprigionato nella lacuna della matrice di osso neoformato, mentre nuovi osteoblasti si differenziano via via dalle cellule osteoprogenitrici. Quando il processo di formazione di nuovo tessuto osseo si è esaurito, gli osteoblasti che rimangono a ridosso della superficie ossea cessano la loro attività, riducono i loro organuli e si trasformano in una membrana di cellule appiattite, le cosiddette *cellule di rivestimento dell'osso (bone lining cells)*, a cui si attribuisce un ruolo nel mediare gli scambi tra vasi sanguigni e osteociti. Gli osteoblasti producono e secernono fattori solubili, il più studiato dei quali è il *fattore di crescita trasformante (transforming growth factor)-β (TGF-β)* che è un potente stimolatore degli osteoblasti stessi. Esso fa parte della stessa famiglia a cui appartengono le BMP; agendo in maniera paracrina ed autocrina, è capace di modulare la proliferazione delle cellule osteoprogenitrici, di promuovere il loro differenziamento in osteoblasti e di incrementare il metabolismo e le sintesi macromolecolari degli osteoblasti maturi. Il TGF-β viene secreto in forma di precursore inattivo, il quale viene convertito nella forma attiva ad opera di proteasi presenti nell'ambiente extracellulare. Oltre al TGF-β, gli osteoblasti producono gli *insulin-like growth factors (IGF)*, molecole proteiche strettamente apparentate tra loro con una spiccata azione di stimolo sulla crescita e sul metabolismo

osteoblastico.

Gli osteoblasti sono coinvolti nei processi di rimaneggiamento dell'osso.



Fig. 3: Osteoblasti di forma poliedrica, con nucleo a cromatina lassa e citoplasma basofilo, riuniti in filiere a ridosso di una trabecola di osso in via di formazione.



Infatti, queste cellule sono in grado di innescare il riassorbimento della matrice ossea sia indirettamente, in quanto producono fattori solubili che attivano gli osteoclasti, le cellule preposte al riassorbimento osseo, sia direttamente, in quanto secernono enzimi proteolitici capaci di scindere i componenti della matrice organica dell'osso. Tra questi enzimi vi è la *collagenasi*, che viene secreta sotto forma di *procollagenasi* inattiva. La sua attivazione avviene nell'ambiente extracellulare ad opera di un'altra proteasi, l'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA), anch'esso prodotto dagli stessi osteoblasti. Il tPA attiva una proteasi ad ampio spettro, la *plasmina*, presente nel plasma sanguigno come precursore inattivo, detto plasminogeno. La plasmina opera il clivaggio proteolitico della procollagenasi trasformandola nella collagenasi attiva.

La collagenasi osteoblastica agirebbe rimuovendo lo strato di tessuto osteoide non mineralizzato che riveste la superficie dell'osso, consentendo così agli osteoclasti di aderire alla matrice mineralizzata e dissolverla.¹⁰

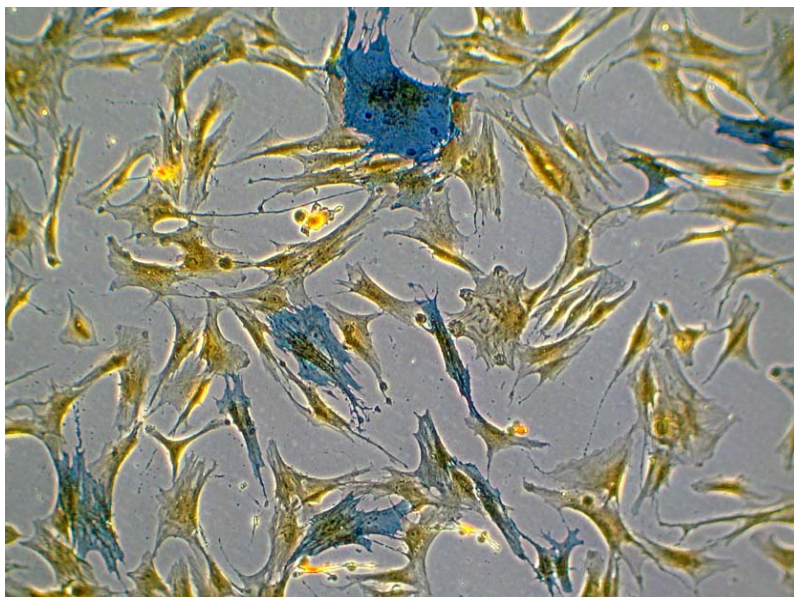


Fig. 4: Coltura cellulare di osteoblasti e cellule mesenchimali (ALP); gli osteoblasti si colorano intensamente di blu con la fosfatasi alcalina (ALP).

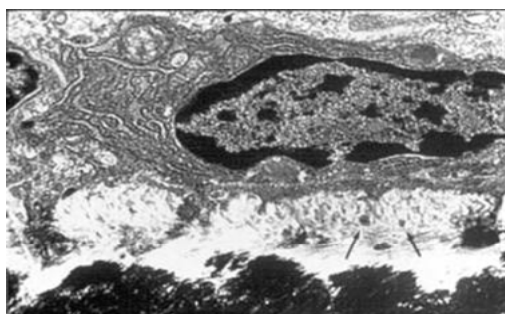


Fig. 5: Micrografia elettronica di un osteoblasto, riconoscibile per la presenza di numerose cisterne di reticolo endoplasmico granulare nel citoplasma. Le fibre collagene e alcune vescicole della matrice (frecce)

1.2: la biologia cellulare degli osteoblasti: osteoblasto genesi e differenziamento cellulare.

Il tessuto osseo è continuamente sottoposto a processi di rimodellamento, consistenti in riassorbimento e apposizione, finalizzati al mantenimento del volume osseo e dell'omeostasi del calcio.

Osteoblasti ed osteoclasti sono i principali attori dei processi di cui sopra, essendo rispettivamente responsabili dell'apposizione di nuovo tessuto e del riassorbimento di quello esistente. In particolar modo gli osteoblasti fenotipicamente maturi e polarizzati rendono conto della sintesi della maggior parte delle proteine della matrice extracellulare, tra le quali il collagene di tipo I è massimamente rappresentato. Inoltre, gli osteoblasti prendono parte ai processi di mineralizzazione tissutale favorendo la formazione dei cristalli d'idrossiapatite in osteoide.

Osteoblasti, condrociti, miociti e adipociti derivano tutti da un progenitore comune indifferenziato di tipo mesenchimale, nel corso del processo di differenziamento le cellule progenitrici acquisiscono lo specifico fenotipo maturo grazie all'azione sequenziale di diversi fattori di crescita e di regolazione. Le proteine

morfogenetiche dell'osso (BMP's) giocano un ruolo critico nel differenziamento dei precursori mesenchimali in osteoblasti.

Nel corso dell'embriogenesi, la formazione del tessuto osseo avviene attraverso due diverse modalità: 1) ossificazione intramembranosa e 2) ossificazione endocondrale. Nel caso dell'ossificazione intramembranosa, gli osteoblasti si differenziano direttamente a partire dalle cellule mesenchimali; nell'ossificazione endocondrale, prima le cellule mesenchimali si differenziano in condrociti, formando così un "template" cartilagineo; successivamente si determina il differenziamento osteoblastico, a partire dalle cellule mesenchimali presenti perifericamente, immediatamente dopo la maturazione dei condrociti ipertrofici nel contesto del template. Tali processi di sviluppo osseo e cartilagineo suggeriscono che osteoblasti e condrociti derivino entrambi da un unico progenitore commissionato.

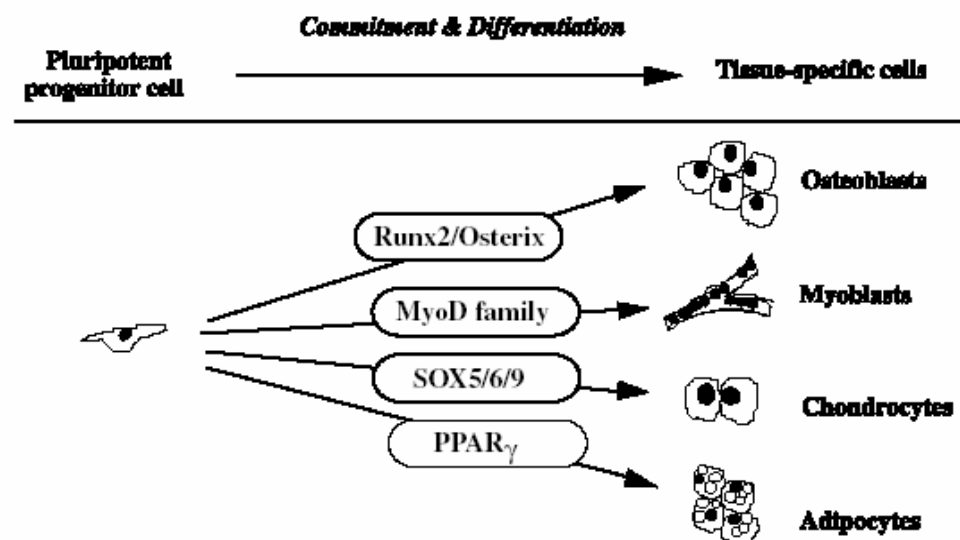


Fig. 6: Modello schematico del differenziamento di un progenitore mesenchimale in cellule tessuto specifiche. La cellula progenitrice pluripotente origina dal mesenchima indifferenziato e può differenziarsi in diversi tipi di cellule tessuto-specifiche come osteoblasti,

mioblasti, adipociti e condrociti. Ciascun pathway di differenziamento sembra essere regolato da fattori di trascrizione tessuto- specifici: Runx2/Osterix, MyoD family, PPARc and SOX5/SOX6/SOX9, rispettivamente.

Nell' acquisizione del fenotipo tissutale specifico, le cellule progenitrici perdono la loro pluripotenzialità: il processo avviene sotto lo stretto controllo di fattori di trascrizione tessuto-specifici (Fig.6).

1.2.1: Ruolo delle BMP's nel differenziamento osteoblastico

Le BMP's inducono la trascrizione di diversi geni osteoblastici, tra i quali si segnalano quelli codificanti per:

1. fosfatasi alcalina (ALP);
2. recettore del paratormone (PTH) e delle proteine correlate al paratormone (PTH-rP);
3. collagene di tipo I;
4. osteocalcina.

Le BMP's non solo favoriscono il differenziamento osteoblastico quando linee di cellule pluripotenti vengono esposte alla loro azione ma sono anche in grado di inibire il differenziamento mioblastico e convertire il pathway di differenziamento miogenico in osteoblastico.

1.2.2: Recettore delle BMP's

I processi che attengono all'attivazione osteoblastica hanno inizio con il legame dei fattori di crescita e in particolare delle BMP allo specifico recettore di transmembrana

Perché si abbia la trasduzione del segnale è necessaria la presenza di due recettori di membrana dotati di attività serin/treonin chinasi: tipo I e tipo II; l'attività chinasi del recettore di tipo II è infatti necessaria per la fosforilazione della regione enzimatica del recettore tipo I: le mutazioni che interessano questi domini sono responsabili di alterazioni del processo di differenziamento osteoblastico sia in eccesso che in difetto. Inoltre l'attivazione del recettore tipo II aumenta l'affinità del recettore tipo I per il ligando. BAMBI invece è un pseudorecettore per le citochine della superfamiglia TGF- β , stabilmente associato con il recettore tipo I e in grado di inibire il signaling grazie alla mancata formazione del complesso recettoriale di cui prima.

1.2.3 Ruolo dei fattori di trascrizione smad nel differenziamento osteoblastico

I fattori di trascrizione Smad sono substrati citoplasmatici del recettore attivato tipo I. Le proteine Smad fosforilate si trasferiscono nel nucleo dove legano le regioni regolatorie dei geni target e ne modulano la trascrizione. Così, le proteine Smad costituiscono molecole chiave nella trasduzione del segnale dalla membrana citoplasmatica al nucleo. Le proteine Smad sono classificate in tre sottogruppi: R-Smad, Co-Smad e I-Smad. Al primo sottogruppo appartengono Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 e Smad8. Queste sono fosforilate direttamente dal recettore tipo I a livello dell'estremità carbossiterminale.

L'espressione di Smad 1, Smad5 o Smad8 è il fattore determinante l'aumento di attività dell'ALP e la produzione di osteocalcina. Smad4 fa parte del gruppo Co-Smad e coopera con tutte le R-Smad. Al contrario, sia Smad6 che Smad7 inibiscono la trasduzione del segnale mediato dai membri della superfamiglia TGF- β e sono per questo comprese tra le I-Smad (Inibitory). L'espressione delle I-Smad

aumenta quando i livelli di BMP's e TGF- β sono elevati, con tipico meccanismo a feedback negativo.

Le BMP's attivano anche altre vie oltre a quella delle proteine Smad e allo stesso modo, fattori stimolanti o inibenti diversi dalle Smad sono in grado di mediare segnali analoghi a quelli indotti dalle Smad. È verosimile quindi che le Smad regolino l'espressione dei geni target interagendo con altri fattori trascrizionale.

1.2.4:Ruolo di Run-X2 e Osterix nel differenziamento osteoblastico

Il fattore di trascrizione Runx2 è essenziale nel processo di differenziamento osteoblastico come dimostrato dal fatto che i topi knockout per il gene non sviluppano né tessuto osseo né osteoblasti. Gli osteoblasti esprimono elevati livelli di Runx2 sia in vivo che in vitro. Il ruolo di Runx2 nel differenziamento condroblastico ed osteoblastico è piuttosto complesso: mentre l'iperespressione di Runx2 in cellule diverse dagli osteoblasti induce la trascrizione di geni osteoblasto-specifici, l'iperespressione di Runx2 in osteoblasti in vitro sopprime la produzione di collagene di tipo I. Per quanto riguarda i condrociti, l'iperespressione di Runx2 in vivo determina un'accelerazione dei processi di ossificazione endocondrale.

Le BMP's determinano l'aumento dell'espressione di Runx2 in vitro; inoltre le R-Smad interagiscono con Runx1/2/3 e i complessi così formati promuovono il differenziamento osteoblastico.

Osterix è un fattore di trascrizione tipo zinc-finger la cui assenza è responsabile della mancata formazione di tessuto osseo nei topi transgenici e questo nonostante la normale espressione di Runx2: tale dato suggerisce che Osterix possa avere un

ruolo nel processo di differenziamento osteoblastico e quindi nella formazione del tessuto osseo, agendo come substrato di Runx2.

1.2.5: Ruolo degli osteoblasti nel differenziamento osteoclastico

In tale processo sono implicati gli osteoblasti o cellule stromali attraverso l'interazione degli stessi con i precursori osteoclastici. Recenti studi²³⁻²⁴⁻²⁵ hanno rilevato che gli osteoblasti giocano un ruolo cruciale nella formazione degli osteoclasti. Gli osteoblasti infatti, esprimono il fattore di differenziamento osteoclastico (ODF anche chiamato RANKL, TRANCE e OPGL) come proteina di membrana in risposta a diversi fattori osteotropici quali diidrossivitamina D3 [$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$], ormone paratiroideo (PTH), l'interleuchina 1 (IL1) e l'interleuchina 11 (IL11) che supportano la differenziazione osteoclastica. Anche per lo sviluppo osteoclastico sono chiamati in causa gli osteoblasti attraverso sia la produzione di un fattore solubile, il fattore stimolante colonie macrofagico (M-CSF), anche chiamato colony-stimulating factor-1 (CSF-1), sia attraverso il contatto cellula-cellula tra osteoblasti e progenitori ematopoietici osteoclastici²⁶.

Risulta a questo punto necessario chiarire il ruolo del fattore stimolante colonie macrofagico (M-CSF) nella formazione osteoclastica. A tal proposito sono stati studiati topi che presentavano il gene per il M-CSF mutato²⁷⁻²⁸ nei quali è stato rilevato un ridotto riassorbimento osseo dovuto ad una diminuzione del numero di osteoclasti. Tale difetto può essere corretto in vivo tramite la somministrazione esogena di M-CSF²⁹⁻³⁰. I risultati di tale studio¹⁵ suggeriscono che l'M-CSF induce il differenziamento osteoclastico ma va anche ad aumentare il numero e l'attività dei macrofagi i quali, però, andrebbero a sopprimere il differenziamento osteoclastico stesso. In un altro studio¹⁶ è stato precisato che il ruolo del fattore

stimolante colonie macrofagico (M-CSF) aumenta solo il numero degli osteoclasti ma non la loro sopravvivenza infatti, paragonando colture cellulari con e senza M-CSF si poteva notare che l'area e il volume delle lacune in colture dove era presente l'M-CSF erano significativamente più grandi rispetto alle colture prive di M-CSF a testimonianza del fatto che erano presenti più o meno osteoclasti, rispettivamente, nei due terreni di coltura²⁹⁻³¹. Questi risultati non si potevano applicare alla sopravvivenza degli osteoclasti in quanto la morte cellulare diventava irreversibile subito dopo l'isolamento degli osteoclasti. Si rilevava, infatti, che l'aggiunta di M-CSF 3 e 6 ore dopo l'inizio delle colture non causava alcuna differenza in termini di sopravvivenza tra i due tipi di colture³².

Un'altra caratteristica del fattore stimolante colonie macrofagiche (M-CSF) è quella di indurre la fusione dei precursori osteoclastici in cellule multinucleate. Tali cellule giganti mostrano caratteristiche proprie degli osteoclasti come, ad esempio, l'espressione della fosfatasi acida tartrato resistente (TRAP), il legame alla calcitonina suggerendo che queste cellule sono osteoclasto-simili.

Concludendo gli osteoblasti¹⁷ si rendono fondamentali ai fini del riassorbimento osseo grazie alla produzione del fattore di differenziamento osteoclastico (ODF/RANKL) e del fattore stimolante colonie macrofagiche (M-CSF) fattori questi, essenziali per la formazione di precursori osteoclastici e di osteoclasti fosfatasi acida tartrato resistenti (TRAP+).

- Osteoprotegerina (OPG/OCIF/TR1)

1.2.6: Bibliografia I capitolo

1. Owen M.: Histogenesis of bone cells. *Calcif Tissue Res* 25: 205, 1978.

2. Urist MR et al.: Bone cell differentiation and growth factors. *Science* 220: 680, 1983.
3. Formigli L et al.: In vitro structural and functional relationships between preosteoclastic and bone endothelial cells: a juxtacrine model for migration and adhesion of osteoclast precursors. *J Cell Physiol* 162: 199, 1995.
4. Scheven BA et al.: In vitro osteoclast generation from different bone marrow fractions, including a highly enriched hemopoietic stem cell population. *Nature* 321: 79, 1986.
5. Urist MR et al.: Bone cell differentiation and growth factors. *Science* 220: 680, 1983.
6. Aubin JE, Tri.tt JT. Mesenchymal stem cells and osteoblast di.ereniation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*, 2nd edn. (2002)Academic Press: San Diego, pp. 59–81.
7. Karsenty G: The genetic transformation of bone biology. *Gene Dev* 13(1999).: 3037–3051.
8. Yamaguchi A, Komori T, Suda T: Regulation of osteoblast di.ereniation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev*(2000). 21: 393–411.
9. Chung UI, Lanske B, Lee K et al: The parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor coordinates endochondral bone development by directly controlling chondrocyte di.ereniation. *Proc Natl Acad Sci* (1998). USA 95: 13030–13035.
10. Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE: Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: e.ect of dexamethasone. *J Cell Biol* (1988) 106: 2139–2151.

11. Yamaguchi A, Kahn AJ: Clonal osteogenic cell lines express myogenic and adipocytic developmental potential. *Calcif Tissue Int* 49(1991):221–225.
12. Urist MR: Bone: formation by autoinduction. *Science* 150(1965): 893–899.
13. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ et al: Nove regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242(1988): 1528–1534.
14. Kingsley DM: What do BMPs do in mammals? Clues from the mouse short-ear mutation. *Trends Genet* 10 (1994): 16–21.
15. Kingsley DM: Genetic control of bone and joint formation. *Novartis Found Symp* 232(2001): 213–222; Discussion 222–234, 272–282.
16. Wozney JM, Rosen V.: Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop* 346 (1998): 26–37.
17. Reddi AH: Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 83-A (2001) Suppl 1 (Pt 1): S1–S6.
18. Sampath TK, Muthukumar N, Reddi AH: Isolation of osteogenin, an extracellular matrix-associated, boneinductive protein, by heparin affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(1987): 7109–7113.
19. Massague J: How cells read TGF- β signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(2000): 169–178.
20. Massague J, Chen Y-G. : Controlling TGF- β signaling. *Gene Dev* 14(2000): 627–644.
21. Miyazono K, ten Dijke P, Heldin CH: TGF- β signaling by Smad proteins. *Adv Immunol* 75 (2000): 115–157.
22. Wrana JL.: Regulation of Smad activity. *Cell* 100(2000): 189–192.

23. Yamaguchi A, Kahn AJ: Clonal osteogenic cell lines express myogenic and adipocytic developmental potential. *Calcif Tissue Int* 49(1991): 221–225.
24. Rosen V, Nove J, Song JJ et al : Responsiveness of clonal limb bud cell lines to bone morphogenetic protein 2 reveals a sequential relationship between cartilage and bone cell phenotypes. *J Bone Miner Res* 9(1994): 1759–1768.
25. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M et al: Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 127(1994): 1755–1766.
26. Rosenzweig BL, Imamura T, Okadome T et al : Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (1995): 7632–7636.
27. Beppu H, Minowa O, Miyazono K et al: cDNA cloning and genomic organization of the mouse BMP type II receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 235(1997): 499–504.
28. Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R et al: Silencing of TGF- β signaling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 401(1999): 480–485.
29. Sakou T: Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone* 22(1998): 591–603.
30. Miyazono K: Signal transduction by bone morphogenetic protein receptors: functional roles of Smad proteins. *Bone* 25(1999): 91–93.
31. Shi Y: Structural insights on Smad function in TGF- β signaling. *BioEssay* 23(2001): 223–232.

CAPITOLO 2

Quali effetti esercitano i campi magnetici sui sistemi biologici?

2.1 Effetti biologici dei campi elettromagnetici

L'uso dei campi elettromagnetici nella pratica medica riconosce origini piuttosto antiche: già alla fine del XIII secolo Paracelso diffuse in Occidente l'uso della calamita a scopo terapeutico partendo dal presupposto che l'applicazione del magnete su un focolaio morboso - seguendo determinate regole di orientamento polare - avesse azione assorbente sui versamenti e risolvesse manifestazioni patologiche quali l'epilessia, le diarree e i disordini emorragici. Sir Kenelm Digby (1603-1665) ne descrisse l'utilità per il trattamento delle ferite mentre Justis Fidus Klobius, qualche anno dopo, postulava l'uso terapeutico dell'ambra.

Oggi i campi elettromagnetici trovano indicazione per il trattamento di diverse forme morbose in altrettanto diversi ambiti specialistici: geriatria, fisioterapia e soprattutto ortopedia.

I campi elettromagnetici a frequenza industriale (ELF, extremely low frequencies, 30-300 Hz) a radiofrequenza e alle microonde (da 100 kHz a 300 GHz) rientrano nella gamma delle radiazioni non ionizzanti, caratterizzati cioè da una lunghezza d'onda maggiore di 10^{-7} m e una energia associata inferiore a 12 eV. Tale energia è di intensità insufficiente per indurre fenomeni di ionizzazione delle molecole o per rompere legami chimici anche molto deboli. Per questo motivo fino a qualche decennio fa tali radiazioni non ionizzanti non

sono state considerate in grado di interagire con i sistemi biologici; di conseguenza anche i relativi studi erano poco numerosi e le informazioni sull'argomento molto scarse, specie se confrontate con la

grossa mole di conoscenze accumulata sulle interazioni tra radiazioni ionizzanti e i sistemi biologici. Solo recentemente, a causa dell'utilizzo sempre più frequente di campi elettromagnetici a diverse frequenze e intensità, è stata avviata una vasta attività di ricerca volta alla definizione dei principali effetti biologici e sanitari sui cui risultati si è poi basata la scelta dei limiti di esposizione attualmente raccomandati.

Gli effetti indotti dall'interazione tra campi elettromagnetici e sistemi biologici vengono comunemente distinti in effetti termici e non termici.

Gli *effetti termici* sono dovuti alla trasformazione di energia elettromagnetica in calore e la quantità di calore prodotta è dipendente dalle caratteristiche del materiale biologico attraversato, dalla frequenza e intensità del campo, dalla durata dell'esposizione, dal contenuto in acqua dei tessuti irradiati. Tali effetti, essendo ben noti in letteratura, non costituiscono un grosso problema per la salute dell'uomo, dal momento che è possibile scegliere con precisione limiti di esposizione tali da prevenire situazioni dannose. E' da notare che per molto tempo si è ritenuto che l'unica conseguenza indotta da un campo elettromagnetico in un sistema biologico

fosse un innalzamento di temperatura; solo negli ultimi anni i ricercatori impegnati in questo settore hanno considerato la possibilità di interazioni di tipo non termico.

Gli *effetti non termici* sono rappresentati da alterazioni biologiche in assenza di incremento apprezzabile di temperatura. Essi sono dovuti ad interazioni con strutture molecolari ma il meccanismo di azione a tutt'oggi non è ancora completamente noto, anche se esistono diverse ipotesi più o meno accreditate tendenti a chiarire tali interazioni.

La valutazione degli effetti biologici dei campi elettromagnetici viene effettuata mediante studi *in vitro* e studi *in vivo*.

In letteratura sono riportati numerosi studi *in vitro* riguardanti svariati parametri biologici che potrebbero risultare alterati in seguito all'esposizione a campi elettromagnetici.

Tra questi, si elencano di seguito i più studiati:

- a) *la cinetica della proliferazione cellulare* (una accelerazione o un ritardo dei tempi di crescita fisiologici potrebbe avere ripercussioni sulla promozione della cancerogenesi);
- b) *le variazioni di alcune attività enzimatiche* (gli enzimi, proteine che catalizzano moltissime reazioni biochimiche, controllano processi cellulari fondamentali);
- c) *i flussi ionici intramembrana* (fondamentali per regolare gli scambi tra interno e esterno della cellula, per garantire la risposta cellulare agli stimoli esterni e per attivare processi metabolici);
- d) *l'integrità del corredo cromosomico* (alterazioni numeriche o strutturali del corredo cromosomico, *effetti genotossici*, la cui integrità è fondamentale per la funzionalità cellulare).

2.2 Effetti biologici dei campi elettromagnetici di bassa frequenza

Alcuni studi riportano variazioni nella velocità di proliferazione cellulare in seguito a esposizioni a campi magnetici sinusoidali a frequenza di 50 Hz e a intensità di campo variabili. In particolare, Kwee e Raskmark ¹ hanno riscontrato un incremento nella proliferazione di fibroblasti umani esposti a intensità di campo di 0.08 mT, mentre Kula e Drozd ² hanno evidenziato una inibizione della crescita cellulare in fibroblasti murini esposti a intensità di 20 mT. Anche sperimentazioni svolte esponendo colture di linfociti umani hanno dato risposte differenti (incremento, decremento o assenza di effetto nella velocità di crescita) in base all'intensità del campo magnetico applicato ^{3,4}. Inoltre, la velocità di crescita è stata valutata in cellule embrionali di riccio di mare esposte a campi magnetici sinusoidali di bassa frequenza; anche in questo caso i risultati non sono univoci ^{5,6}.

La letteratura riguardante gli effetti sulla proliferazione cellulare di esposizioni a campi magnetici pulsati a frequenza di 50 Hz è abbastanza concorde nell'evidenziare incrementi della proliferazione in diversi tipi cellulari ^{7,8}. E' interessante notare che la capacità di tali campi viene sfruttata con successo in ortopedia per facilitare la riparazione delle ossa.

Più recentemente, l'attenzione di molti ricercatori è stata rivolta alla valutazione di effetti genotossici indotti da esposizioni simultanee a campi elettromagnetici e a noti mutageni chimici o fisici. L'ipotesi alla base di questi studi è che i campi elettromagnetici, piuttosto che avere una azione diretta sul materiale genetico, possano interferire con l'azione di noti mutageni, amplificandone o inibendone l'effetto. Anche in questo caso la letteratura riporta dati contrastanti

e gli effetti cooperativi, quando presenti, sono correlati al tipo cellulare studiato, alle caratteristiche del campo applicato e al mutageno impiegato^{7, 24-28}.

Allo stato attuale delle conoscenze, gli effetti biologici *in vitro* dei campi elettromagnetici sia di bassa sia di alta frequenza quando presenti sono strettamente correlati alle condizioni sperimentali adottate, sia in termini di bersaglio biologico e di sistema biologico esaminato sia in termini di caratteristiche e modalità dell'esposizione effettuata.

Inoltre, nella valutazione degli effetti genotossici, un aspetto interessante da sottolineare riguarda gli studi che si riferiscono alla valutazione di effetti cooperativi tra campi elettromagnetici e mutageni chimici o fisici: essi risultano particolarmente interessanti poiché riproducono una situazione reale in cui un individuo è esposto ad una miscela di fattori chimici o fisici piuttosto che ad un unico agente.

Bisogna infine notare che gli studi disponibili sono difficilmente paragonabili, poiché differiscono per le modalità di esposizione impiegate (frequenza, modulazione, tasso di assorbimento specifico, tempo di esposizione), per il sistema biologico esaminato, per i saggi utilizzati.

2.3 I campi elettromagnetici pulsati e statici in ortopedia

Per qualsiasi fattore esterno ad un sistema biologico, che possiamo prendere in considerazione, due concetti:

1) EFFETTO BIOLOGICO: in relazione alla possibilità di misurare, all'interno di un sistema biologico, una variazione del sistema intervenuta a seguito di uno specifico stimolo esterno;

2) RISCHIO BIOLOGICO: è un effetto biologico che produce un danno certo alla salute di un individuo.

Nel caso dei campi elettromagnetici ha senso, una schematizzazione riferita alla frequenza:

1) BASSA FREQUENZA: < 30 kHz

PRINCIPALI SORGENTI:

- rete di trasmissione e distribuzione energia elettrica
- apparecchi di trasformazione e trasmissione di energia elettrica

2) ALTA FREQUENZA: > 30 kHz (< 1 miliardo di kHz)²

PRINCIPALI SORGENTI:

- sorgenti di emissione industriale (forni a induzione; processi di saldatura; incollaggi; sistemi di alimentazione dei treni ad inverter; ecc...)
- sorgenti di emissione a radiofrequenza (AM; FM; sistemi radar; apparecchiature diagnostiche; ecc...)

Alle basse frequenze, e solo a queste, ha senso distinguere tra campo elettrico e campo magnetico. È bene sapere che i corpi conduttori sono facilmente schermati ai campi elettrici, ma non ai campi magnetici. Ad esempio i campi elettrici, sia pur di elevata intensità, generati dalle linee di trasmissione elettrica (elettrrodotti), vengono fortemente attenuati dalla presenza di alberi, edifici, veicoli, ecc... Ciò non accade in generale, per i campi magnetici. Inoltre, l'intensità del campo elettrico decresce al crescere della distanza dalla sorgente, e l'intensità del campo magnetico decresce al crescere della distanza dalla sorgente ancora più rapidamente.

Gli effetti biologici dei campi elettromagnetici ad alta frequenza vengono normalmente considerati quelli derivanti dal riscaldamento delle cellule del tessuto esposto, e ciò avviene solamente ad intensità elevate (es. radar, antenne per emissioni radiofoniche e televisive, ecc...), ed in particolare (come sappiamo bene coi nostri forni a microonde) nell'intervallo delle microonde, che fanno oscillare bene le molecole d'acqua provocando quindi facilmente un surriscaldamento di tutte le sostanze che contengono acqua, come la materia vivente.

2.4 La piezoelettricità dell'osso

Un cenno particolare merita l'interazione tra campi magnetici pulsati e osso. Molti autori (Yasuda, Bassett, Becker, Shamos, Anderson, ecc.) hanno dimostrato un fenomeno conosciuto come piezoelettricità dell'osso.

Un osso lungo, sottoposto ad un'azione deformante (ad es. la flessione), forma cariche elettrostatiche positive sulla superficie convessa, zona di trazione, e negative sulla superficie concava, zona di compressione. E' chiaro che l'osso, sottoposto a carico alternato, come avviene durante la deambulazione, si deforma elasticamente e periodicamente, caricandosi alternativamente di cariche elettrostatiche. Quelle positive si dispongono sulla superficie convessa dell'osso, zona di trazione e di riassorbimento osseo (Yasuda e Bassett), mentre le cariche negative si distribuiscono sulla superficie concava, zona di pressione e di apposizione ossea. L'apposizione ossea avviene lungo le linee isostatiche che corrispondono alla linea isoelettrostatica negativa. La quantità di cariche

elettrostatiche di cui si carica ad es. il femore durante la fase di appoggio è dell'ordine di 1-1,5 mV.



Fig. 1 - Schema di disposizione delle cariche elettrostatiche che si realizza in un femore durante la deambulazione

l'evoluzione di un callo osteoide in tessuto osseo tramite l'infissione di elettrodi direttamente nell'osso. Tale metodica era però ricca di complicazioni per cui vari autori cercarono il modo di indurre una corrente elettrica che fosse biostimolante, che potesse essere quantizzata (intorno a 3-5mV, di poco superiore a quell'1-1,5 mV che si ritrova fisiologicamente), che non diminuisse nel tempo, che investisse tutto l'osso e che fosse scevra di pericoli (infezioni, necrosi).

Tutto questo è tecnicamente possibile adoperando i campi magnetici pulsati, che inducono una corrente elettrica direttamente nell'osso con una metodologia non invasiva ed utilizzabile anche attraverso l'apparecchio gessato. La guarigione di una pseudoartrosi o di un ritardo di ossificazione con campi magnetici pulsati avviene attraverso uno stimolo fisico che realizza la continuità dei monconi ossei isolati tra loro da tessuto connettivo; una volta realizzata la continuità fisica inizia la guarigione biologica per migrazione degli osteoni lungo l'asse diafisario, che corrisponde anche alle linee di massima induzione

Dalle acquisizioni sulla piezoelettricità dell'osso al trattamento delle pseudoartrosi e delle fratture con corrente il passo è stato breve. Inizialmente Kraus e Lechner stimolarono in una pseudoartrosi la formazione e

elettrica nell'osso, purché si adoperino due solenoidi contrapposti percorsi da corrente pulsata. L'interpretazione fisica della guarigione è spiegata dal seguente schema: la magnetoterapia forma una corrente elettrica indotta nei due monconi mentre il tessuto di pseudoartrosi si comporterebbe come un dielettrico (materiale meno conduttore). Il processo di guarigione è propiziato dall'abbattimento della barriera dielettrica rappresentata appunto dal tessuto di pseudoartrosi; questa ricostruita conducibilità elettrica permette l'instaurarsi del processo di guarigione clinica e radiografica. Nello stesso modo si comporta la piaga o una cicatrice rispetto al tessuto sano che la circonda.

2.5 Effetti cellulari

I campi elettromagnetici tipo ELF (extremely low frequencies, 15-30 Hz) rientrano nella gamma delle radiazioni non ionizzanti, caratterizzate cioè da una lunghezza d'onda maggiore di 10^{-7} m e una energia associata inferiore a 12 eV. Tale energia è di intensità insufficiente per indurre fenomeni di ionizzazione delle molecole o per rompere legami chimici anche molto deboli. Per questo motivo fino a qualche decennio fa tali radiazioni non erano considerate in grado di interagire con i sistemi biologici. È oggi noto che campi elettromagnetici di diversa intensità e frequenza (Pulsed electromagnetic fields) sono capaci di mediare effetti biologici comunemente distinti in “termici” e “non termici”.

Gli effetti termici sono dovuti alla trasformazione di energia elettromagnetica in calore e la quantità di calore prodotta è dipendente dalle caratteristiche del materiale biologico attraversato, dalla frequenza e intensità del campo, dalla durata dell'esposizione, dal contenuto in acqua dei tessuti irradiati. Tali effetti non costituiscono un problema data la possibilità di scegliere con precisione limiti di esposizione tali da prevenire situazioni dannose.

Gli effetti non termici sono rappresentati da alterazioni biologiche in assenza di incremento apprezzabile di temperatura. Sono dovuti ad interazioni con strutture molecolari cellulari e sono i principali mediatori dell'effetto terapeutico dei CEM nella patologia ossea.

I campi elettromagnetici sono infatti in grado di regolare, in vitro, l'espressione di geni codificanti per proteine strutturali della matrice extracellulare (ECM). Ne deriva un aumento dei livelli di proteoglicani (PG) e collagene in colture sia di osteoblasti sia di condrociti sia di cellule osteoprogenitrici. Nei modelli in vivo e particolarmente negli studi sul ritardo di consolidamento e le pseudoartrosi, l'aumento della produzione di ECM si traduce in una più rapida formazione del callo osseo e nel miglioramento di parametri fisici come forza e resistenza.

La maggiore difficoltà nella comprensione del meccanismo di azione dei CEM riguarda certamente la modalità con cui le cellule ricevono lo stimolo fisico e lo traducono in eventi di produzione e rimaneggiamento della matrice. La membrana cellulare sembra giocare in proposito un ruolo di primo piano: i CEM potrebbero infatti agire prioritariamente modificando la permeabilità di

canali transmembrana oppure attraverso la stimolazione/inibizione di recettori trans membrana, in particolare tramite effetti mediati dai canali del calcio

2.5.1 Effetti sui canali transmembrana

La risposta cellulare ai CEM¹⁶ si accompagna ad un aumento della concentrazione citoplasmatica di calcio, cui consegue l'attivazione del sistema calcio/calmodulina . Quando si usano correnti elettriche pure con tecnica capacitiva (capacitive coupling) l'aumento della concentrazione citoplasmatica di calcio è effettivamente conseguenza dell'aumentata conduttanza dei canali del calcio voltaggio-dipendenti; i campi elettromagnetici (tecnica induttiva) sembrerebbero invece mediare il suddetto effetto attraverso un aumento del rilascio del calcio intracellulare dai depositi endoplasmatici.

Non sono stati dimostrati effetti su altri canali transmembrana⁶. In particolare studi che hanno usato campi elettromagnetici di diversa ampiezza e frequenza in combinazione non hanno mostrato alcun effetto sui canali del potassio ATP- dipendenti⁷. Qualche debole evidenza si ha piuttosto sulla possibilità di modificazioni a carico delle gap junction, il che farebbe pensare ad un possibile ruolo dei campi elettromagnetici nella regolazione del cross-talking intercellulare⁸.

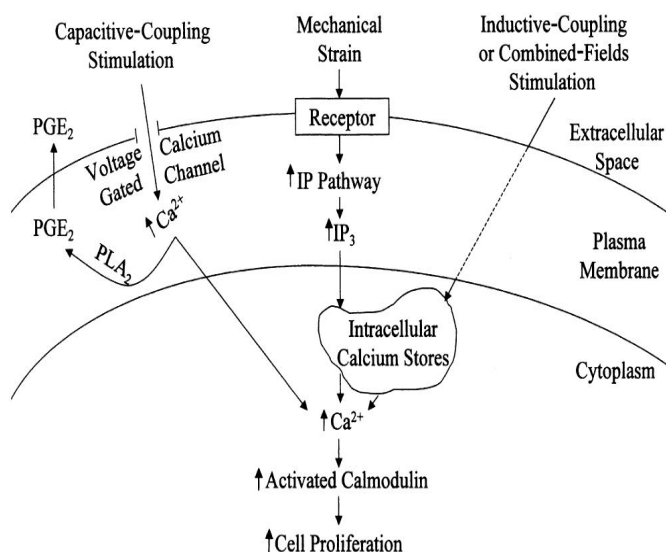


Fig 2. : pathway di traduzione del segnale attivato da campi elettrici, magnetici e dalla tensione meccanica. PGE₂ = prostaglandina E₂; PLA₂ = fosfolipasi A₂; IP = inositolo fosfato; IP₃ = inositolo trifosfato. La traduzione del segnale passa attraverso l'attivazione della calmodulina.

2.5.2 Effetti sui recettori di membrana

È stato postulato che l'effetto dei CEM potesse dipendere dall'interazione con diversi recettori ormonali di membrana e in modo peculiare dal blocco dell'accoppiamento recettore-adenilato ciclasi⁹. Uno dei primi lavori ha messo in evidenza l'interazione dei CEM con il recettore del paratormone (PTH) espresso alla superficie delle cellule del tessuto osseo⁹. Normalmente il PTH determina un aumento

della concentrazione intracellulare di AMP-c. In presenza di campi elettromagnetici tale effetto è abolito. Il campo quindi elimina l'effetto inibitorio sulla sintesi di collagene prodotto dal PTH ma non è in grado di fare lo stesso nel caso in cui l'inibizione sia dovuta alla vitamina D attivata: ne deriva che i CEM agiscono specificamente sui recettori di membrana, verosimilmente inducendo modificazioni conformazionali del tratto transmembrana del recettore del PTH¹⁰.

Altri studi eseguito su co-culture di osteoblasti ed osteoclasti hanno mostrato come i campi elettromagnetici siano in grado di interrompere l'interazione tra la calcitonina ed il suo recettore, rendendo così gli osteoclasti insensibili all'azione dell'ormone¹¹.

Di fondamentale importanza è anche l'azione dei campi elettromagnetici in termini di stimolazione della sintesi di fattori di crescita. I campi elettro-magnetici pulsatili (PEMF) ottenuti con tecnica induttiva (IC) anzitutto stimolano l'espressione di diversi geni codificanti per proteine morfogenetiche dell'osso (BMPs). Yajima¹², ad esempio, ha valutato l'espressione di varie BMPs tramite RT-PCR da parte di osteoblasti umani immortalizzati (tipo SV-HFO) dimostrando un importante aumento, tempo dipendente, dei livelli di mRNA per le proteine BMP-4, -5 e -7, con il massimo incremento dopo 24 ore di esposizione ai PEMF. Anche l'espressione del TGF- β sembra incrementare per effetto della stimolazione elettromagnetica. In particolare i livelli di TGF- β e prostaglandina-E2 (PGE2) si modificano in modo proporzionale alla durata della stimolazione e allo stadio di maturazione cellulare lungo la linea osteoblastica¹³⁻¹⁴⁻¹⁵.

I campi elettromagnetici (CEM) sono in grado di aumentare la trascrizione dei geni e la sintesi proteica di diversi fattori di crescita, che a loro volta favoriscono la

produzione di matrice extracellulare e pertanto accelerano i processi di riparazione tissutale. Di qui deriva l'uso dei campi elettromagnetici nella terapia dei ritardi di consolidamento, delle pseudoartrosi e così via.

2.6: Applicazioni cliniche dei campi elettromagnetici nelle patologie ossee

I campi elettromagnetici (PEMF) trovano indicazione per il trattamento di diverse forme morbose. Alcuni esempi sono:

- ritardo di consolidamento ¹⁸⁻³¹
- pseudoartrosi ¹⁸⁻³¹;
- fusioni fallite ¹⁹⁻⁴⁵;
- necrosi avascolare ¹⁻²⁻³;
- osteoporosi;
- algodistrofie;
- osteomieliti;
- tendiniti refrattarie croniche;
- osteocondriti dissecanti.

Per ciascuna di esse sono descritti specifici protocolli di trattamento, differenti per ciò che riguarda il tipo di campo magnetico impiegato (pulsato o continuo, ad alta o bassa frequenza), la modalità di applicazione (invasiva o non invasiva, capacitiva o induttiva), la durata delle singole applicazioni e il numero delle sedute necessarie al raggiungimento dell'obiettivo.

Passiamo, adesso, ad analizzare singolarmente le principali condizioni patologiche.

2.6.1 Ritardo di consolidamento e pseudoartrosi.

Si definisce “ritardo di consolidamento” la mancata guarigione di una frattura nel tempo normalmente previsto per il tipo e la sede della frattura e in rapporto all'età e alle condizioni generali del paziente. Parlando di “pseudoartrosi” ci si riferisce invece, ad una frattura non consolidata e non consolidabile se non con l'ausilio di adeguati provvedimenti chirurgici (toilette del focolaio e apposizione di trapianti) e/o non chirurgici (PEMF).

Sia i campi elettrici che quelli elettromagnetici possono essere utilizzati al fine di promuovere la consolidazione delle fratture e il rimodellamento osseo; esistono in proposito diverse tecniche:

- ***direct electrical current***: una corrente elettrica viene direttamente applicata all'osso per mezzo di elettrodi impiantati chirurgicamente; il catodo in titanio è posizionato nella sede di frattura mentre l'anodo è inserito nei tessuti molli vicini, a circa 8 cm di distanza dal catodo. La sorgente elettrica può essere interna o esterna e fornisce, per almeno 6 mesi, una corrente costante di intensità pari a 5-100 A in grado di indurre l'osteogenesi a livello del catodo.
- ***capacitive coupling***: si basa sull'uso di correnti elettriche alternate, indotte dall'esterno mediante elettrodi applicati alla cute, in sedi diametralmente opposte rispetto al sito della frattura. In genere si utilizzano potenziali compresi tra 1 e 10 V alla frequenza di 20-200 kHz, in modo che il campo elettrico risultante nel tessuto sia di circa 1-100 mV/cm.

- **inductive coupling**: si basa sull'applicazione, al tessuto osseo, di correnti elettriche alternate indotte dall'esterno mediante campi elettromagnetici pulsati (PEMF)³⁰⁻³¹.

2.6.2 Algodistrofia

L'algodistrofia è una sindrome multiforme, sia per la gravità che per la diversità del quadro clinico e sintomatologico ed ha, come denominatore comune, il reperto radiografico di una intensa decalcificazione, talvolta generalizzata e talvolta a chiazze, che si associa ad una sindrome vasomotoria con edema, cianosi, sudorazione fredda, iperpatia muscolare e cutanea ed a rigidità dell'articolazione colpita. Dal punto di vista etiopatogenetico presenta un difficile inquadramento nosologico, come è dimostrato dai tanti sinonimi che si possono riscontrare in letteratura, quali causalgie minori, osteoporosi post-traumatica, distrofia simpatico-riflessa. L'insorgenza della sindrome può avvenire per traumi di lieve entità con immobilizzazione anche di breve durata. La sindrome ha per lo più una evoluzione spontanea, favorevole nel giro di qualche mese, ma talvolta può prolungarsi per oltre un anno, con remissione subtotale. Data la sintomatologia causalgica di notevole entità, alcuni autori propongono di trattare questa patologia con applicazioni giornaliere di PEMF (100-120 Volts, 50-55 Hz, 25% Duty-cycle, erogati mediante due solenoidi contrapposti) per due o più ore al giorno. A seconda della gravità della sindrome consigliano la terapia per 3-4 settimane fino alla regressione della sintomatologia dolorosa. La guarigione clinica avviene prima della scomparsa dei reperti radiologici, la cui normalizzazione si completa in 2-3 mesi dall'inizio del trattamento.

2.6.3 Necrosi avascolare

La necrosi avascolare (AVM) o necrosi ischemica è un disturbo che comunemente interessa la testa del femore di soggetti di giovane età (36- 38 anni) e frequentemente conduce ad una osteoartrosi degenerativa precoce dell'articolazione coxo-femorale. Il trattamento definitivo di questa condizione spesso richiede la protesizzazione totale dell'anca: data la giovane età dei pazienti, i risultati a lungo termine di questa procedura tendono ad essere tuttavia poco soddisfacenti e ciò in virtù di una maggiore necessità di revisioni. Proprio per queste ragioni, si tende oggi a posticipare per quanto possibile l'intervento e a promuovere lo sviluppo di trattamenti e procedure volte a preservare l'articolazione. I PEMF sono in tal senso una alternativa non invasiva alla chirurgia, sebbene la loro reale efficacia sia ancora relativamente dubbia.¹ Il rationale per l'uso dei PEMF nel trattamento della necrosi avascolare della testa del femore risiede nel fatto che:

- 1) sono in grado di controllare l'infiammazione locale e prevenire la degenerazione della cartilagine articolare;
- 2) sono capaci di stimolare l'attività riparativa delle aree necrotiche, potenziando sia la neoangiogenesi sia la deposizione di nuovo tessuto osseo. Questi effetti possono combinatamente risultare in un buon controllo del dolore, condroprotezione e ottimizzazione del processo di guarigione con conseguente conservazione della testa del femore.

In conclusione possiamo affermare che i PEMF trovano una valida indicazione negli stadi precoci di osteonecrosi della testa del femore (I e II), con la precipua finalità di evitare o quantomeno ritardare l'intervento chirurgico di protesizzazione totale d'anca.

La stimolazione elettrica e magnetica rappresenta dunque un importante e affidabile strumento nelle mani del chirurgo ortopedico; essa è in grado di ripristinare ed aumentare l'attività osteogenica del tessuto riparativo osseo, ed è indicata in tutte quelle condizioni in cui sia evidente una insufficiente risposta osteogenica.

Deve essere attuata soltanto con strumenti di provata efficacia e sicurezza, con le modalità e dosaggi indicati in letteratura.

2.7 Effetti dei campi elettromagnetici pulsati sugli osteoblasti

Il trattamento di osteoblasti con campi pulsati (frequenza pari a 15 Hz, intensità di 0.1 mT) accelerano la proliferazione cellulare, ma sembrano non influenzare la differenziazione cellulare: pertanto gli effetti della stimolazione con PEMF della formazione del tessuto osseo sembra essere associata essenzialmente con un aumento del numero di cellule, più che con un incremento della loro differenziazione.

2.8 Bibliografia II capitolo

1. Ikehata, M., Koana, T., Suzuki, Y., Shimizu, H., Nakagawa, M., 1999. Mutagenicity and co-mutagenicity of static magnetic fields detected by bacterial mutation assay. *Mutation Research* 427, 147–156.
2. Loscher, W., Liburdy, R.P., 1998. Animal and cellular studies on carcinogenic effects of low frequency (50–60-Hz) magnetic fields. *Mutation Research* 410, 185–220.
3. Rosen, A.D., 2003. Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems. *Cellular Biochemistry Biophysics*: 39, 163–173

4. Varani K, Gessi S, Merighi S, et al. Effect of low frequency electromagnetic fields on A2A adenosine receptors in human neutrophils. *Br J Pharmacol.* 2002;136:57–66

5. Mc Cann, J., Dietrich, F., Rafferty, C., Martin, A.O., 1993. A critical review of the genotoxic potential of electric and magnetic fields. *Mutation Research* 297, 61–95.

6. Kwee, S.; Raskmark, P. Changes in cell proliferation due to environmental non-ionizing radiation 1. ELF electromagnetic fields. *Bioelectrochem. & Bioenerg.* 36: 109-114; 1995.

7. Kula, B.; Drozd, M. A study of magnetic field effects on fibroblast cultures Part 1. The evaluation of effects of static and extremely low frequency (ELF) magnetic fields on vital functions of fibroblasts. *Bioelectrochem. & Bioenerg.* 39: 21-26; 1996.

8. Paile W, Jokela K, Koivistoinen A, Salomaa S. Effects of 50 Hz sinusoidal magnetic fields and spark discharges on human lymphocytes in vitro. *Bioelectrochem. & Bioenerg.* 36: 15-22; 1995.

9. Scarfi MR, Lioi MB, Zeni O, Della Noce M, Franceschi C, Bersani F. Micronucleus frequency and cell proliferation in human lymphocytes exposed to 50 Hz sinusoidal magnetic fields. *Health Physics*, 76(3), 244-250 1999.

10. Zeni O, Scarfi MR, Della Noce M, La Cara F, Bersani F, De Prisco PP: Influence of 50 Hz sinusoidal magnetic field on sea urchin embryogenesis. In “Proceedings of the 2nd World Congress for Electricity and Magnetism in Biology and Medicine”, Kluwer Academic/Plenum Publisher, F. Bersani Ed., 545-547, 1999.

11. Pagnac C, Genevriere AM, Moreau JM, Picard A, Jousset-Dubien J, Veyret B. No effects of DC and 60-Hz AC magnetic fields on the first mitosis of two species of sea urchin embryos. *Bioelectromagnetics*. 19,494-7, 1998.

12. Scarfi' MR, Bersani F, Cossarizza A, Monti D, Franceschetti G, Franceschi C. Spontaneous and mitomycin C-induced micronuclei in human lymphocytes exposed to extremely low frequency pulsed electromagnetic fields. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 176, 194-200, 1991.

13. Cossarizza A, Capri M, Salvioli S, Monti D, Franceschi C, Bersani F, Cadossi R, Scarfi' MR, Angioni S, Petraglia F. Electromagnetic fields affects cell proliferation and citokine production in human cells. In "Electricity and Magnetism in Biology and Medicine" M.Blank Ed., San Francisco Press, 640-642, 1993.

14. Litovitz TA, Krause D, Mullins JM. Effect of coherence time of the applied magnetic field on Ornothine decarboxylase activity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 178, 862-865, 1991.

15. Mullins JM, Penafiel LM, Juutilainen J, Litovitz TA. Dose-response of electromagnetic field-enhanced Ornothine decarboxylase activity. *Bioelectrochem & Bioenerg*, 48, 193-199, 1999.

16. Cress LW, Owen RD, Desta AB. Ornothine decarboxylase activity in L929 cells following exposure to 60 Hz magnetic fields. *Carcinogenesis*, 20, 1025-1030, 1999.

17. Dutta SK, Nazar AS, Verma M. Enolase activity in chicken embryo primary retina cells is not affected by exposure to a 60-Hz electric field. *Cancer Biochem Biophys* 16, 45-52, 1998.

18. Farndale RW, Maroudas A, Marsland TP. Effects of low-amplitude pulsed magnetic fields on cellular ion transport. *Bioelectromagnetics*; 8,119-34, 1987.
19. Walleczek J, Liburdy RP. Nonthermal 60 Hz sinusoidal magnetic-field exposure enhances $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in rat thymocytes: dependence on mitogen activation. *FEBS Lett.*271, 157-60, 1990.
20. McCann, J.; Dietrich, F.; Rafferty, C.; Martin, A.O. A critical review of genotoxic potential of electric and magnetic fields. *Mutation Res.* 297: 61-95; 1993.
21. Mc Cann J, Dietrich F, Rafferty C. The genotoxic potenzial of electric and magnetic fields: an update, *Mutation Res.* 411: 45-86, 1998.
22. Murphy, J.C.; Kaden, D.A.; Warren, J.; Sivak, A. Power frequency electric and magnetic fields: A review of genetic toxicology. *Mutation Res.* 296: 221-240; 1993.
23. Verschaeve L. Electromagnetic fields and cancer. *Cancer Journal*, 34, 125-31, 1995.
24. Juutilainen, J. and Lang, S.: Genotoxic carcinogenic and teratogenic effects of electromagnetic fields. Introduction and overview, *Mutation Res.* 387: 165-171, 1997.
25. Khalil AM, Qassem W. Cytogenetic effects of pulsing electromagnetic field on human lymphocytes in vitro: chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and cell kinetics, *Mutation Res.* 247: 141-146, 1991.
26. Scarfi MR, Prisco F, Lioi MB, Zeni O, Della Noce M, Di Pietro R, Franceschi C, Iafusco D, Motta M, Bersani F. Cytogenetic effects induced by extremely low frequency pulsed magnetic fields in lymphocytes from Turner's syndrome subjects, *Bioelectrochem. & Bioenerg.* 43: 221-226, 1997.

27. Scarfi' MR, Prisco F, Lioi MB, Zeni O, Della Noce M, Di Pietro R, Franceschi C, Bersani F. 50 Hz, 1 mT sinusoidal magnetic fields do not affect micronucleus frequency and cell proliferation in human lymphocytes from normal and Turner's syndrome subjects. *Electro & magneto-biology*, 16(3), 301-307, 1997.

28. Simko M, Kriehuber R, Lange S. Micronucleus formation in human amnion cells after exposure to 50 Hz MF applied horizontally and vertically. *Mutat Res* 1998, 418 (2-3), 101-11.

29. Simko M, Dopp E, Kriehuber R. Absence of synergistic effects on micronucleus formation after exposure to electromagnetic fields and asbestos fibres in vitro, *Toxicol Letters* 108: 47-53, 1999.

30. Hintenlang DE. Synergistic effects of ionising radiation and 60 Hz magnetic fields, *Bioelectromagnetics* 14: 545-551, 1993.

31. Lagroy I, Poncy JL. The effect of 50 Hz electromagnetic fields on the formation of micronuclei in rodent cell lines exposed to gamma radiation, *Int. J. Radiat. Biol.* 72: 249-54, 1999.

32. Maes A, Collier M, Vandoninck S, Scarpa P, Verschaeve L., Cytogenetic effects of 50 Hz magnetic fields of different magnetic flux densities. *Bioelectromagnetics*, 21(8):589-96, 2000.

CAPITOLO 3

Studio Sperimentale

3.1 Premessa

I campi elettromagnetici pulsati (PEMF) possono essere efficaci nel trattamento delle pseudoartrosi congenite o nei ritardi di consolidazione delle fratture(1)

I campi elettromagnetici esogeni (EMF) influenzano il metabolismo dell'osso, ma i meccanismi responsabili di questo fenomeno sono tuttora non chiariti.

I PEMFs possono influenzare il turnover dell'osso diminuendo il riassorbimento osteoclastico e incrementando l'apposizione osteoblastica mediante l'attivazione di differenti vie di traduzione del segnale e di fattori di crescita (2-5).

Precedenti studi eseguiti su culture cellulari hanno posto la loro attenzione sui campi magnetici statici continui (SMF), usati principalmente nella pratica odontoiatrica(6).

GLI SMF influenzano la proliferazione e il grado di differenziazione degli osteoblasti umani(7,8), mentre i campi magnetici statici continui (SMF) ritenuti comparabili a quelli generati intorno ad un device metallico (Ti spinal implant) dalle correnti elettriche generate tra la vite (Ti6Al4V) e la barra (Ti) influenzano sfavorevolmente la proliferazione e differenziazione degli osteoblasti(9,10).

Noi riportiamo i risultati ottenuti dall'esposizione di culture di osteoblasti umani a PEMFs della stessa intensità con cui vengono utilizzati nella pratica clinica. La nostra ipotesi nulla è stata che campi elettromagnetici di differente tipologia e intensità non influenzano in modo differente le stesse culture cellulari d'osteoblasti.

3.2 Materiali e Metodi

3.2.1 Generazione dei campi elettromagnetici

Il nostro sistema di generazione è composto dall'accoppiamento tra un generatore di onde elettriche e una bobina di stimolazione. La bobina di stimolazione è rappresentata da un solenoide con 30 cm di lunghezza e 15 cm di diametro, (45 spire di filo magnetico del diametro di 20 gauge).

Si è scelto di utilizzare nello studio un campo elettromagnetico pulsato, approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) per il trattamento dei ritardi di consolidamento delle fratture e delle pseudoartrosi. Le caratteristiche dell'onda elettromagnetica possono così essere riassunte: una serie di 21 impulsi (N), ciascuno dei quali di durata pari a 260 μs ($T_{\text{pulse}} = 260 \mu\text{s}$) e seguito da una pausa (segmento OFF), di modo tale che la durata complessiva del ciclo (fase pulsata + fase spenta) sia di 67 ms ($T_{\text{burst}} = 67\text{ms}$); l'intensità del campo elettromagnetico indotto al centro del solenoide (B_{amp}) è pari a 0,4 mT; la frequenza dei singoli impulsi (F_{pulse}) è di 3.85 Hz mentre la frequenza dell'intero ciclo (F_{burst}) è pari a 14.9 Hz.

Il tipo di corrente imposta al solenoide è stata una corrente di piccolissima intensità, circa 1 mA, continua e ad andamento sinusoidale (ondulante). Il campo elettromagnetico che si genera all'interno del solenoide è un campo uniforme, diretto lungo l'asse del solenoide, la cui intensità è costante, con variazioni decrementali non significative verso le estremità del solenoide stesso.

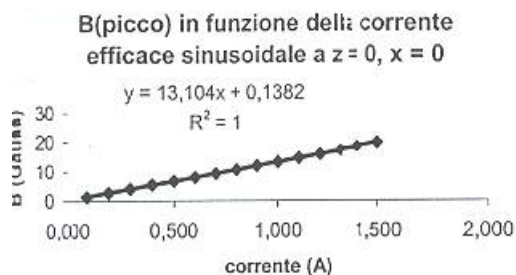


Fig. 1: Il grafico mostra la variabilità del campo B all'interno del solenoide sulla base dell'intensità di corrente (A) applicata.

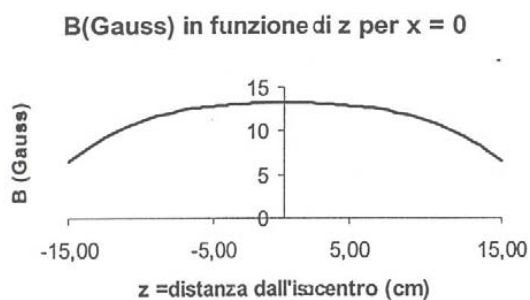


Fig. 2: Il grafico mostra la variabilità del campo B all'interno del solenoide in funzione della sua distanza dal centro dello stesso

Il grafico più in alto mostra la funzione tramite la quale si calcola l'intensità di corrente da applicare al solenoide per ottenere l'intensità del campo magnetico da noi voluta.

Il grafico in basso, invece ci mostra la variabilità dell'intensità del campo magnetico quando ci si allontana dal centro del solenoide.

Il solenoide stesso è stato posto all'interno di un incubatore.



Fig 3: Il solenoide all'interno dell'incubatore.

Il supporto del solenoide è costituito da rame che può resistere intatto per giorni in un incubatore a 37 °C e al 100% d'umidità relativa.

3.2.2 Colture cellulari

Gli osteoblasti sono stati isolati da teste di femore prelevate da pazienti sottoposti a chirurgia protesica d'anca. Quindi sono state effettuate tre digestioni enzimatiche dei frammenti di osso in una soluzione costituita da 1mg/ml di Collagenasi tipo IV+ 0,25% di Tripsina in soluzione tampone di Hank in base al seguente protocollo:

1^a DIGESTIONE: 20 min. a 37°C in agitazione ed eliminare il supernatante;

2^a DIGESTIONE: 40 min. a 37°C in agitazione e raccogliere il supernatante e centrifugare a 1500 rpm per 5 min. poi risospingere in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO) e piastrare in flasche medie (75 cm²) in 10ml di mezzo di coltura;

3^aDIGESTIONE: 60 min. a 37°C in agitazione, raccogliere il supernatante e centrifugare a 1500 rpm per 5 min. poi risospendere in (DMEM) + 10% FCS e piastrare in flasche medie(75cm²) in 10 ml di mezzo di coltura.

Vengono poi recuperati e piastrati i frammenti digeriti in DMEM + 10% FCS.

Le cellule così ottenute vengono mantenute in mezzo di coltura apposito: DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) cui vengono aggiunti: 1% di glutamina 4mmol/L; 10% siero fetale bovino (FBS) (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO); 1% di antibiotici (penicillina/streptomina) (Pen-strep) (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO). Gli osteoblasti possono quindi essere seminati in piastre di Petri aventi superficie di coltura pari a 78,5 cm² e contenenti ciascuna 10 ml di terreno. Le colture richiedono di essere incubate in atmosfera al 5% di CO₂, a temperatura costante di 37°C e con umidità del 100%. Alla confluenza le cellule furono tripsinizzate e amplificate per la caratterizzazione ed essere utilizzate per questi studi. Le cellule dal secondo e terzo passaggio furono utilizzate per gli esperimenti.

3.2.3 Analisi della crescita cellulare

Il solenoide e le colture cellulari sono state posizionate all'interno di un incubatore in grado di mantenere una temperatura costante di 37°C e una pressione atmosferica di CO₂ pari al 5%. Le colture d'osteoblasti sono state poste in parte all'interno del solenoide (colture trattate) e in parte in un altro incubatore con le stesse caratteristiche (controlli) in modo che, a parità di condizioni ambientali (temperatura e tensione CO₂), solamente le trattate subissero l'effetto del campo elettromagnetico pulsato.

Gli effetti del campo elettromagnetico sulle colture trattate sono stati valutati a 72h, 7gg e 10gg e quindi confrontati con i risultati ottenuti, nei medesimi tempi, sulle colture di controllo.

Ai tempi indicati, si procede alla rimozione del terreno di coltura dalle piastre e



all'effettuazione di due lavaggi con soluzione elettrolitica tamponata (PBS: phosphate-buffered saline) (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO); quindi si aggiungono 0.25% di tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO), un agente proteolitico che favorisce il distacco degli osteoblasti dal substrato (piastra di Petri); si

lascia agire l'enzima per 10 minuti a 37°C. Le sospensioni cellulari vengono poi centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti a 25°C ed il supernatante viene eliminato. Il pellet viene risospeso in (PBS: phosphate-buffered saline) e leccole ottenute vengono contate utilizzando un conta cellule automatico (Counter).

Tutte le conte vengono eseguite tre volte. Alla fine si hanno 9 conte (tre per ogni osservazione) per ogni coltura (cellule esposte) e (controlli).

3.2.4 Metodo istochimico per la valutazione dell'ALP (semiquantitativo)

L'attività dell'ALP viene valutata utilizzando il kit n.85 Sigma-Aldrich. Gli osteoblasti vengono fissati con apposita soluzione di acetone in tampone citrato al 60% direttamente nelle piastre di coltura, dopo avere eliminato il mezzo di coltura ed effettuato 2 lavaggi con PBS. La soluzione fissante deve essere portata a temperatura ambiente (18-26°C) e lasciata agire per 30 secondi; quindi si elimina e si provvede a sciacquare delicatamente le piastre con acqua deionizzata per 45 secondi. Evitando che le piastre si asciugino si procede poi alla colorazione con la

soluzione di Sali Fast Blue RR avendo cura che il periodo di incubazione, ad una temperatura di 18-26C°, non sia inferiore ai 30 min. Trascorso il tempo indicato il colorante può essere rimosso e le piastre lasciate asciugare. Infine si esegue la valutazione al M.O e si procede alla fotografia e al confronto dei trattati con i rispettivi controlli a 72, 7gg e 10gg.

La valutazione semiquantitativa viene effettuata seguendo la tabella fornita con il protocollo del kit Sigma n°85: una volta selezionata ad ingrandimento 900x un'area in cui le cellule risultino a contatto tra loro e in numero di almeno 100, si osservano i siti di attività fosfatasi, che appaiono come granuli blu in sede citoplasmatica. Alle cellule viene quindi assegnato un punteggio compreso tra 0 e 4+, in base alla quantità e all'intensità del colorante precipitato all'interno del citoplasma. La valutazione globale rappresenta la somma dei voti assegnati alle 100 cellule esaminate.

3.2.5 Valutazione spettrofotometrica quantitativa dell'ALP

La fosfatasi alcalina catalizza l'idrolisi, in ambiente alcalino, del p-nitrofenilfosfato in p-nitrofenolo e fosfato. Misurando in spettrofotometria l'aumento di assorbanza nell'unità di tempo a 405 nm e a PH 10,2, si calcola l'attività della fosfatasi alcalina nel campione esaminato. Per quantificare l'attività di fosfatasi alcalina secondo metodo spettrofotometrico è stato utilizzato il kit Triton X-100 (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO)

Dopo avere preparato la soluzione di lavoro (Triton 1% = 50ml di PBS + 500µL di Triton X-100), avendo cura di lavorare in ghiaccio, si procede alla raccolta delle cellule secondo il seguente protocollo:

1. aspirare il terreno di coltura
2. lavare due volte in PBS
3. aggiungere 1ml di Triton 1% e scrapperare

4. trasferire in eppendorf
5. centrifugare a + 4°C a 14.000 rpm per 15 minuti
6. prelevare il supernatante che contiene l'estratto facendo attenzione a non toccare il pellet di membrane
7. trasferire in eppendorf pulita

Le soluzioni da analizzare con lo spettrofotometro devono essere preparate considerando che devono essere aggiunti 100µl totali di reagente (A + B) per ogni pozzetto (well), utilizzando piastre da 96 pozzetti (96-well microtiter plate): ciascun pozzetto dovrà infatti contenere 50 µl di reagente A, 50 µl di reagente B e 50 µl di lisato. Il bianco viene preparato ponendo nell'apposito pozzetto 50 µl di reagente A, 50 µl di reagente B e 50 µl di Triton 1%.

Le soluzioni vengono disposte negli appositi pozzetti in modo che per ogni tempo considerato, il pozzetto di sinistra contenga il lisato ottenuto dalla coltura di controllo, quello centrale il lisato delle cellule trattate e quello di destra il bianco.

3.3 Analisi statistica

I dati sono il risultato di un minimo di tre esperimenti replicati e sono espresso come media \pm SD. Il coefficiente di correlazione intraclassa è stato usato per validare l'affidabilità della conta cellulare. La comparazione tra il gruppo di cellule sottoposte a PEMF ed il controllo (non esposti) è stata eseguita mediante test di student e il valore di P di significatività fu a $<.005$.

3.4 Risultati

L'analisi statistica delle tre misure ottenute per ogni conta ha rilevato un alto coefficiente di correlazione intraclassa (r 0.975; $p < .05$).

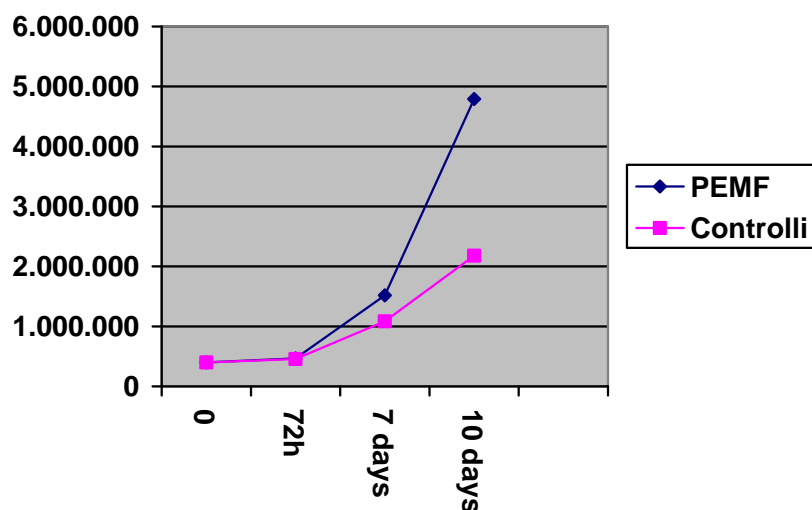
3.4.1 Percentuale di proliferazione

Ad ogni tempo di osservazione, le differenze in numeri di cellule tra cellule esposte a PEMF e controllo fu statisticamente significativo ($p < 0.005$). Gli osteoblasti esposti a PEMF hanno evidenziato un'incrementata percentuale di proliferazione rispetto al gruppo di controllo. Le differenze in numero di cellule furono statisticamente significativi ($p < 0.05$) dopo 7 giorni e 10 giorni di esposizione. Infatti, il gruppo delle cellule esposte a PEMF ha evidenziato un 1.8% ($p > 0.05$), 29% and 55.5% di incremento in numero di cellule dopo 72 ore, 7 giorni e 10 giorni rispettivamente. (Fig 1).

3.4.2 Attività della Fosfatasi alcalina

Da tutte le immagini è possibile per ogni tempo di valutazione osservare come la captazione del colorante per la fosfatasi alcalina sia molto più intensa e marcata da parte di quelle cellule esposte ai PEMF rispetto al controllo. L'attività della fosfatasi alcalina delle colture cellulari di osteoblasti esposti a PEMF ha rilevato un incremento statisticamente significativo ($p < 0.05$) quando comparato con il gruppo di controllo dopo 7 e 10 giorni di esposizione. Il gruppo esposto a PEMF ha evidenziato un 1% ($p > 0.05$), 20% e 58% d'incremento dell'attività della Fosfatasi alcalina dopo 72 h, 7 giorni e 10 giorni, rispettivamente.

Fig 4: Il grafico evidenzia come la curva di crescita degli osteoblasti. La differenza in numero di cellule tra cellule esposte a PEMF e controlli non esposti è statisticamente significativa a 7 e a 19 giorni. I dati sono presentati come media (\pm SD).



3.5 Discussione

Dopo I primi esperimenti sulla stimolazione elettrica del metabolismo dell'osso, l'osteogenesi elettricamente indotta è stata intensamente studiata, sia in vivo che in vitro (11,12).

Nonostante i successi clinici, il meccanismo di azione rimane parzialmente non chiarito. L'impulso biofisico, includendo I campi elettrici ed elettromagnetici, regola l'espressione dei geni per proteine della matrice extracellulare strutturale (ECM) inducendo un accelerazione della riparazione tissutale. I campi elettrici (EF) ed elettromagnetici (EMF) possono incrementare la sintesi dei fattori di crescita mediante l'attivazione di segnali di trasduzione cellulare, aumentano in questo modo la formazione dell'osso endondrale(13). Gli EMFs possono influenzare differenti aspetti della sintesi biomolecolare nelle cellule, tra cui la cinetica del DNA, RNA, e la produzione delle proteine(14). Un incrementata sintesi

di DNA e di proteoglicani è stata osservata nei condrociti, mentre il contrario ovvero un'alterata sintesi di collagene e proteoglicani è stata notata nei fibroblasti(15,16). Vi sono tre differenti metodi di stimolazione della crescita ossea mediante EF/EMF: capacitativa usando coppie di elettrodi piazzate sulla pelle, diretta che utilizza elettrodi impiantati, e stimolazione elettromagnetica per mezzo di coppie induttive che utilizzano campi magnetici tempo-variabili. L'applicazione clinica dell'ultima categoria può essere possibile attraverso 2 differenti tecnologie approvate dalla FDA: i campi elettromagnetici pulsatili (PEMF) e i campi elettromagnetici combinati (CMF)(17). I PEMF sono stati approvati dalla FDA nel 1979 e utilizzati clinicamente per più di 26 anni. Inizialmente questa forma d'energia a termica era usata come opzione di salvataggio per pazienti lungodegenti con ritardo di consolidazione dell'osso resistente alle terapie chirurgiche convenzionali. Trias clinici hanno dimostrato come i PEMF promuovano la guarigione di fratture acute, ritardi di consolidazione e pseudoartrosi, pseudoartrosi congenite, e fallimento d'artrodesi (18). I PEMF sembrano influenzare le cellule ossee già differenziate attraverso vari pathways di traduzione e fattori di crescita, decrementando il riassorbimento osteoclastico e incrementando la formazione dell'osso(18). Studi su colture cellulari dell'osso hanno evidenziato che stimolazione elettromagnetica con PEMF promuove la sintesi del DNA all'interno degli osteoblasti, suggerendo in tal modo una probabile influenza dei campi elettromagnetici sui meccanismi del nucleo cellulare(19,20). Chang *et al* hanno dimostrato che la stimolazione PEMF mediate incrementa significativamente la proliferazione degli osteoblasti, ma non influenza la differenziazione cellulare(2). Di contro, Diniz *et al* hanno riportato che I PEMF hanno un effetto di stimolazione sugli osteoblasti nelle prime fasi delle colture, portando ad un aumento della formazione di tessuto simile all'osso dato dall'azione sull'incremento della differenziazione cellulare(21). In vitro i PEMF possono influenzare gli osteoblasti,

incrementando il livello basale di $[Ca^{2+}]$ intracellulare, la produzione di matrice extracellulare, la secrezione d'IGF-II e TGF- β e decrementando la secrezione di PGE2, in pratica tutti gli eventi che portano alla formazione del tessuto osseo(3,18,22). Lee *et al*(23) ha scoperto che i PEMF possono anche influenzare in vitro la morfologia e l'orientamento degli osteoblasti. Le cellule osteoblasti-like esposte ai PEMF sono consistentemente più piccole delle cellule trattate e soprattutto orientate ortogonalmente ai campi magnetici applicati evidenziando un significativo decremento della lunghezza cellulare e un incremento in sfericità(23), suggerendo un'interferenza sulla differenziazione cellulare. I campi magnetici statici (SMF) sono un altro tipo di campi elettromagnetici usati nella pratica clinica specialmente odontoiatrica. Sebbene studi in vitro hanno evidenziato che i PEMF sono più efficaci sulla formazione dell'osso rispetto agli SMF, SMF di moderata intensità che varia da 1 mT a 1 T influenzano un'ampia varietà di sistemi biologici (7,23,24).

I campi magnetici statici continui SMF(7) inducono una differenziazione degli osteoblasti nel primo stadio; questi effetti potrebbero essere ottenuti regolando i primi fattori locali rilasciati dalle cellule.

Noi abbiamo dimostrato in altri studi come l'applicazione di SMF a bassa intensità generati da devices metalli per la colonna vertebrale porta ad una down-regulation sia della proliferazione che la differenziazione degli osteoblasti, confermando che i campi elettromagnetici generati da impianti in titanio per la colonna vertebrale possono essere coinvolti nella patogenesi dell'osteolisi asettica periprotetica(9,10). Dati controversi sono presenti in Letteratura riguardo all'effetto di differenti tipi di campi elettromagnetici (SMF and PEMF) su cellule della linea cellulare ossea. Infatti, i lavori pubblicati sugli effetti della stimolazione mediante PEMF e SMF sulla proliferazione e differenziazione osteoblastica sono contraddittori.

Comparando i risultati presenti con i nostri precedenti risultati (9) sugli effetti degli SMF sulle stesse colture cellulari, si evidenzia come i campi magnetici statici comparabili a quelli che si generano intorno ai device di metallo hanno differenti effetti portando all'inibizione dell'attività della fosfatasi alcalina specifica degli osteoblasti. In pratica i PEMF producono un'up-regulation della proliferazione degli osteoblasti e dell'attività della fosfatasi alcalina, mentre GLI SMF producono una down-regulation delle stesse variabili, per causa degli effetti osteolitici dei campi elettromagnetici generati dal titanio impiantato sulla colonna vertebrale(9). Comparando ancora i risultati del presente studio con uno precedentemente pubblicatola massima differenza nell'attività della fosfatasi alcalina tra cellule esposte a SMF e controllo si è evidenziata dopo 72 ore mentre nelle cellule esposte a PEMF la proliferazione e differenziazione osteoblastica sono influenzate dopo più di 72 ore d'esposizione.

L'interazione dei campi elettromagnetici con un sistema biologico deve includere l'attivazione di un processo cellulare e i pathways di traduzione del segnale(25). E' anche possibile che in vitro la risposta degli osteoblasti ai campi elettromagnetici dipende dalle caratteristiche degli EMF così come la frequenza e l'intensità che probabilmente influenzano i processi cellulari a differenti stadi di differenziazione.

E' difficile determinare se le differenze nelle risposte a fattori biofisici derivano dal tipo di segnale o dalla forma o dalla durata del segnale(26). I meccanismi sottostanti questi effetti sulla proliferazione e differenziazione prodotti dai campi elettromagnetici con differenti caratteristiche devono essere chiariti.

3.6 Conclusioni

L'applicazione di differenti tipi di campi elettromagnetici determina differenti Effetti sugli osteoblasti umani.

La stimolazione PEMF mediate ha accelerato la proliferazione e differenziazione degli osteoblasti, mentre le cellule esposte agli SMF evidenziano un decremento sia della proliferazione che della differenziazione(9).

Gli effetti degli EMF su colture d'osteoblasti umani sembrano essere dipendenti dallo stadio di differenziazione: le colture esposte agli SMF evidenziano una differenza massimale d'attività della fosfatasi alcalina dopo 72 ore, mentre le cellule esposte ai PEMF evidenziano che la proliferazione e differenziazione sono influenzate dopo 72 ore d'esposizione.

Differenti tipi di campi elettromagnetici potrebbero influenzare differentemente il meccanismo molecolare di stimolazione dell'attività delle cellule dell'osso.

3.7 Bibliografia III capitolo

1. Trock DH 2000 Electromagnetic fields and magnets. Investigational treatment for musculoskeletal disorders. *Rheum Dis Clin North Am* **26**(1):51-62.
2. Chang WH, Chen LT, Sun JS, Lin FH 2004 Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. *Bioelectromagnetics* **25**(6):457-65.
3. Fitzsimmons RJ, Ryaby JT, Mohan S, Magee FP, Baylink DJ 1995 Combined magnetic fields increase insulin-like growth factor-II in TE-85 human osteosarcoma bone cell cultures. *Endocrinology* **136**(7):3100-6.
4. Otter MW, McLeod KJ, Rubin CT 1998 Effects of electromagnetic fields in experimental fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* (355 Suppl):S90-104.
5. Ryaby JT 1998 Clinical effects of electromagnetic and electric fields on fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* (355 Suppl):S205-15.
6. Riley MA, Walmsley AD, Harris IR 2001 Magnets in prosthetic dentistry. *J Prosthet Dent* **86**(2):137-42.

7. Huang HM, Lee SY, Yao WC, Lin CT, Yeh CY 2006 Static magnetic fields up-regulate osteoblast maturity by affecting local differentiation factors. *Clin Orthop Relat Res* **447**:201-8.
8. Yamamoto Y, Ohsaki Y, Goto T, Nakasima A, Iijima T 2003 Effects of static magnetic fields on bone formation in rat osteoblast cultures. *J Dent Res* **82**(12):962-6.
9. Denaro V, Cittadini A, Barnaba SA, Ruzzini L, Denaro L, Rettino A, De Paola B, Papapietro N, Sgambato A 2008 Static electromagnetic fields generated by corrosion currents inhibit human osteoblast differentiation. *Spine (Phila Pa 1976)* **33**(9):955-9.
10. Denaro V, Papapietro N, Sgambato A, Barnaba SA, Ruzzini L, Paola BD, Rettino A, Cittadini A 2008 Periprosthetic electrochemical corrosion of titanium and titanium-based alloys as a cause of spinal fusion failure. *Spine (Phila Pa 1976)* **33**(1):8-13.
11. Spadaro JA 1997 Mechanical and electrical interactions in bone remodeling. *Bioelectromagnetics* **18**(3):193-202.
12. Yasuda I, Noguchi K, Sata T 1955 Dynamic callus and electric callus. *J Bone Joint Surg Am* **37**:1292-1293.
13. Aaron RK, Boyan BD, Ciombor DM, Schwartz Z, Simon BJ 2004 Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields. *Clin Orthop Relat Res* (419):30-7.
14. Liboff AR, Williams T, Jr., Strong DM, Wistar R, Jr. 1984 Time-varying magnetic fields: effect on DNA synthesis. *Science* **223**(4638):818-20.
15. Farndale RW, Murray JC 1985 Pulsed electromagnetic fields promote collagen production in bone marrow fibroblasts via athermal mechanisms. *Calcif Tissue Int* **37**(2):178-82.

16. Lee KE, Pelker RR 1985 Effect of freezing on histologic and biomechanical failure patterns in the rabbit capital femoral growth plate. *J Orthop Res* **3**(4):514-5.
17. Pilla AA 2002 Low-intensity electromagnetic and mechanical modulation of bone growth and repair: are they equivalent? *J Orthop Sci* **7**(3):420-8.
18. Taylor KF, Inoue N, Rafiee B, Tis JE, McHale KA, Chao EY 2006 Effect of pulsed electromagnetic fields on maturation of regenerate bone in a rabbit limb lengthening model. *J Orthop Res* **24**(1):2-10.
19. Goodman R, Abbot J, Krim A, Henderson A 1985 Nucleic acid and protein synthesis in cultured chinese hamster ovary (CHO) cells exposed to the pulsed electromagnetic fields. *J Bioelect* **4**:565.
20. Korenstein R, Somjen D, Fischler H, Binderman I 1984 Capacitative pulsed electric stimulation of bone cells. Induction of cyclic-AMP changes and DNA synthesis. *Biochim Biophys Acta* **803**(4):302-7.
21. Diniz P, Shomura K, Soejima K, Ito G 2002 Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. *Bioelectromagnetics* **23**(5):398-405.
22. Lohmann CH, Schwartz Z, Liu Y, Guerkov H, Dean DD, Simon B, Boyan BD 2000 Pulsed electromagnetic field stimulation of MG63 osteoblast-like cells affects differentiation and local factor production. *J Orthop Res* **18**(4):637-46.
23. Lee JH, McLeod KJ 2000 Morphologic responses of osteoblast-like cells in monolayer culture to ELF electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* **21**(2):129-36.
24. Okano H, Onmori R, Tomita N, Ikada Y 2006 Effects of a moderate-intensity static magnetic field on VEGF-A stimulated endothelial capillary tubule formation in vitro. *Bioelectromagnetics* **27**(8):628-40.

25. Simko M, Mattsson MO 2004 Extremely low frequency electromagnetic fields as effectors of cellular responses in vitro: possible immune cell activation. *J Cell Biochem* **93**(1):83-92.
26. Schwartz Z, Simon BJ, Duran MA, Barabino G, Chaudhri R, Boyan BD 2008 Pulsed electromagnetic fields enhance BMP-2 dependent osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* **26**(9):1250-5.