



Università degli Studi di Pavia
Dipartimento di Medicina Molecolare
Unità di Fisiologia

Relazione finale di ricerca

**Campi elettromagnetici pulsati e cellule staminali:
un'interessante sinergia per la terapia rigenerativa
tissutale**



INTRODUZIONE

I campi elettromagnetici pulsati (C.E.M.P.) sono ampiamente utilizzati nella pratica clinica ortopedica per promuovere i processi rigenerativi dell'osso. In particolare, nella pratica clinica si è osservato un aumento della deposizione di matrice extracellulare in seguito all'applicazione dei C.E.M.P. Tuttavia, nonostante il suo ampio utilizzo, non è ancora stato chiarito quale fase del processo rigenerativo osseo (fase infiammatoria, fase angio-mesenchimale, formazione ossea e rimodellamento – vedi *Figura 1*) sia maggiormente stimolata dalla applicazione dei campi elettromagnetici pulsati.

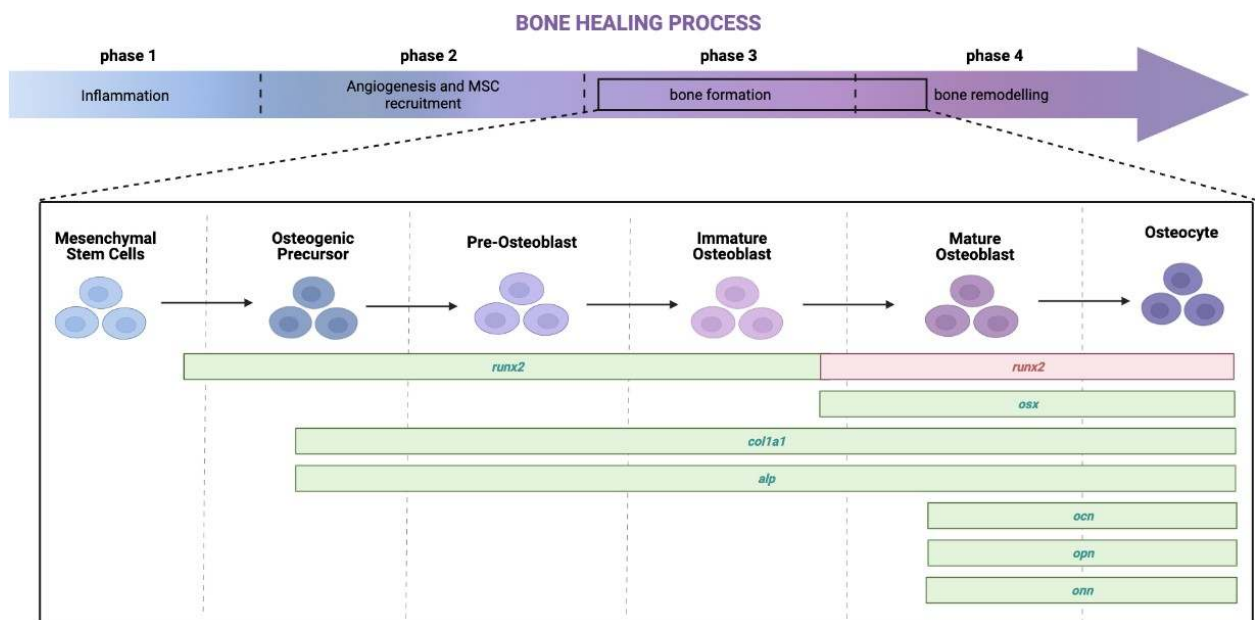


Figura 1 – Rappresentazione schematica delle fasi di rigenerazione ossea focalizzate sulla formazione ossea e parte del rimodellamento. Runt-related transcription factor (*runx2*) è un marker precoce che regola il successivo differenziamento. L'espressione di collagene I (*col1a1*) e fosfatasi alcalina (*alp*) è precoce e aumenta al progredire del differenziamento fino alla mineralizzazione del tessuto osseo.

Immagine creata con BioRender.com.

(Personal Communication - Bina Valentina, Brancato Alice Maria, Caliozna Laura, Benazzo Francesco, Barbagallo Fabio, Gastaldi Giulia, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia)

OBIETTIVO DELLA RICERCA

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare “*in vitro*” l’effetto dell’applicazione dei C.E.M.P. tramite il dispositivo medico Osteoplus Biostimolatore Tissutale, sulle fasi di formazione ossea e di rimodellamento.

La fase di formazione ossea è caratterizzata dal differenziamento delle cellule staminali mesenchimali reclutate verso i fenotipi osteoblastico e condroblastico, processi sotto il controllo rispettivamente dei geni *runx2* e *sox9*. La fase di rimodellamento è legata all’equilibrio tra le attività di biosintesi degli osteoblasti e di riassorbimento degli osteoclasti, equilibrio responsabile dell’omeostasi del tessuto osseo.

In questo lavoro sono state utilizzate due differenti linee cellulari:

1) cellule staminali mesenchimali umane (hASCs) isolate da tessuto adiposo prelevato dalla regione peritrocanterica durante interventi di sostituzione protesica d’anca, previo consenso informato firmato dal paziente; 2) osteoblasti umani (hOBs) acquistati dalla ditta PromoCell.

Le hASCs erano isolate, espanse in laboratorio, seminate in monolayer su piastre di polistirene e coltivate: a) in presenza di terreno di crescita (privo di fattori di differenziamento, GM); b) in presenza di terreno osteogenico (terreno di crescita addizionato di acido ascorbico, desametasone e beta-glicerofosfato, OM). Raggiunta la confluenza dell’80%, una metà delle piastre (sia in GM che in OM) era sottoposta al trattamento con i CEMP, l’altra metà non riceveva alcun trattamento ed era considerata la popolazione di controllo. Al termine dei trattamenti, schematizzati nella *tabella 1*, le cellule venivano sacrificate e valutate per i markers di differenziamento osteogenico.

Le analisi prendevano in considerazione:

- l’attività metabolica delle cellule trattate (per valutare la possibile cito-tossicità del trattamento);
- l’espressione genica di *runx2*, *alp*, *colla1* tramite real-time PCR;
- l’espressione proteica di ALP, RUNX2 e di alcune proteine strutturali della matrice con tecniche di citochimica, immunofluorescenza e saggi ELISA.

Linea cellulare	Frequenza (Hz)	Intensità (mT)	Durata (min/die)	Condizioni di coltura
hASCs	50	7	60	GM (terreno di crescita senza fattori osteogenici)
				OM (terreno con fattori osteogenici: desametasone, glicerofosfato, acido ascorbico)
hOBs	50	7	30, 60	GM (terreno di crescita)

Tabella 1 – Set up sperimentale utilizzato; parametri dei trattamenti erogati da Osteoplus e linee cellulari utilizzate.

RISULTATI

▪ Nessuna cito-tossicità dei trattamenti

Il saggio del WST, utilizzato per valutare l'attività metabolica delle cellule, ha dimostrato che essa era simile nelle hASCs trattate con Osteoplus e in quelle non trattate (w/o), indicando che i parametri selezionati per questo studio erano adeguati al trattamento di cellule coltivate in monolayer.

▪ Differenziamento delle hASCs

I risultati dell'espressione genica delle hASCs mantenute in coltura senza fattori osteogenici (GM) indicavano che già dopo 7 giorni il trattamento con Osteoplus era in grado di innescare il differenziamento in senso osseo delle cellule staminali con un aumento statisticamente significativo di *runx2* (regolatore chiave del differenziamento osteogenico) e di *alp* (enzima coinvolto nella mineralizzazione della matrice) rispetto alle cellule non trattate.

Dopo 14 giorni dall'inizio del trattamento le cellule (hASCs in GM) acquisivano caratteristiche simili a quelle delle hASCs coltivate in presenza di fattori osteogenici (hASCs in OM): in particolare, aumentava in maniera statisticamente significativa l'espressione di *colla1*, gene che codifica per la proteina più abbondante della matrice ossea (collagene I). La presenza contemporanea di fattori osteogenici e CEMP determinava l'ulteriore differenziamento delle hASCs verso la formazione di osteoblasti (hASCs in OM + CEMP), come riportato in *Figura 2*.

Questi risultati, nel complesso, indicano che i CEMP sono in grado di innescare il differenziamento osteogenico di cellule staminali (hASCs in GM + CEMP) e di accelerare il differenziamento quando applicati in sinergia con i fattori osteogenici (hASCs in OM + CEMP).

Il differenziamento osteogenico era confermato dalle analisi delle proteine: il trattamento con Osteoplus determinava, anche in assenza di fattori osteogenici, la sintesi e la traslocazione nucleare di RUNX2 (*Figura 3*) e un incremento dell'attività enzimatica di ALP.

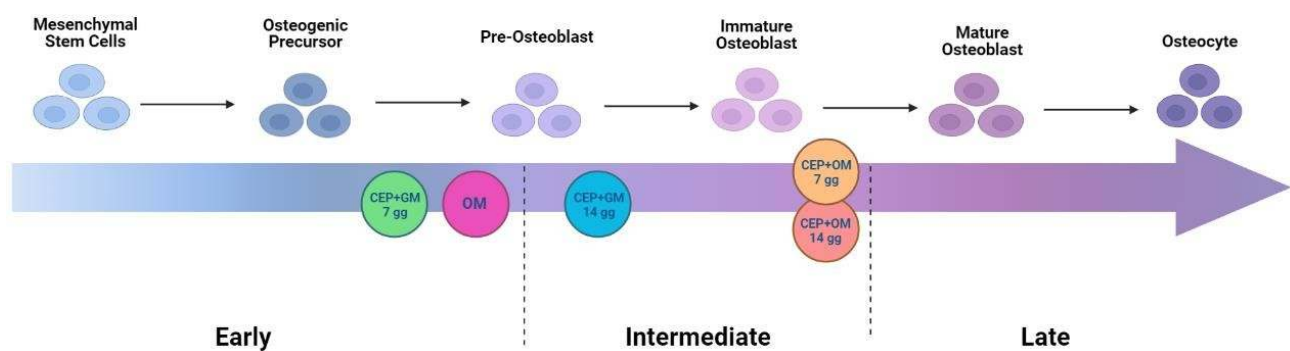


Figura 2 – Proposta di schema di differenziamento osteogenico. La figura rappresenta un modello di differenziamento osteogenico proposto sulla base di dati di letteratura e risultati ottenuti in questo lavoro. I CEMP stimolano la progressione del differenziamento osteogenico verso la fase “Late”. I pallini colorati rappresentano i livelli di espressione genica delle cellule dei diversi gruppi sperimentali.

(Personal Communication - Bina Valentina, Brancato Alice Maria, Caliogna Laura, Benazzo Francesco, Barbagallo Fabio, Gastaldi Giulia, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia).

▪ Attività Biosintetica degli Osteoblasti (hOBs)

Sono stati valutati gli effetti dei CEMP sull'attività biosintetica degli osteoblasti allestendo un modello “*in vitro*” che prevedeva la coltura delle cellule in monolayer nel terreno di crescita fornito dalla ditta. Su queste cellule è stata valutata la secrezione di proteine strutturali (osteopontina, osteocalcina, osteonectina e collagene I) con test ELISA e, indirettamente, il processo di mineralizzazione tramite il dosaggio dell'attività di ALP. I risultati ottenuti hanno evidenziato che, per ottenere un aumento statisticamente significativo della attività di ALP, era necessaria l'applicazione prolungata di Osteoplus (trattamenti di 1 h/gg per 14 giorni). Per quanto riguarda invece l'attività biosintetica, non sono emerse differenze statisticamente significative tra i differenti gruppi sperimentali.

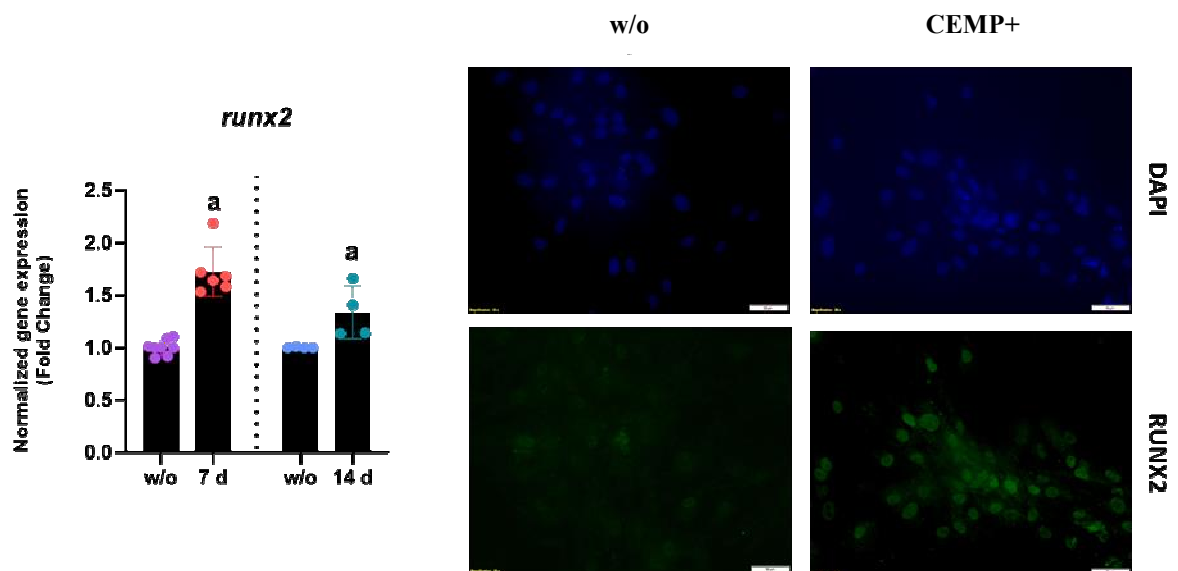


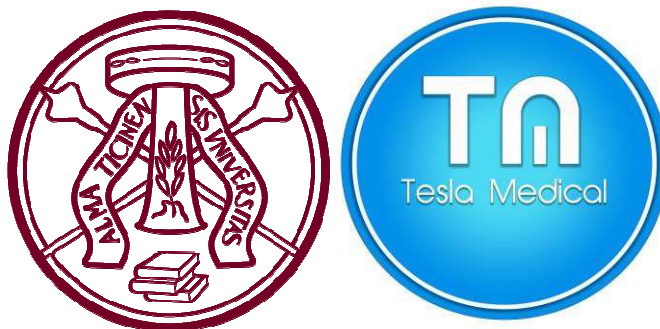
Figura 3 – Espressione proteica di RUNX2 in hASCs GM + CEMP e hASCs GM w/o. Il trattamento con Osteoplus induce l'espressione, la sintesi e la traslocazione nucleare di RUNX2 come evidenziato dalla co-localizzazione dei segnali verde e blu (segnale verde, RUNX2; segnale blu, nucleo), confermando l'innesco del differenziamento, in assenza dei fattori osteogenici.

(Personal Communication - Bina Valentina, Brancato Alice Maria, Calìogna Laura, Benazzo Francesco, Barbagallo Fabio, Gastaldi Giulia, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia).

CONCLUSIONI

Per concludere, i risultati di questa ricerca ”*in vitro*” hanno dimostrato che in questo modello sperimentale i CEMP sembra che abbiano un importante effetto nella fase di formazione dell’osso, agendo in particolare sul differenziamento delle cellule staminali (hASCs).

L’applicazione dei CEMP su cellule già differenziate (hOBs) invece, determina un aumento dell’attività enzimatica di fosfatasi alcalina facilitando la mineralizzazione e accelerando quindi il processo di guarigione ossea.



Università degli Studi di Pavia
Dipartimento di Medicina Molecolare
Via Forlanini 6 - 27100 Pavia
Tel. 0382987514/7511
e-mail: dmm@unipv.it

GIULIA GASTALDI

Unità di Fisiologia
giulia.gastaldi@unipv.it
tel: +39.0382.987172
fax: +39.0382.987664

www.osteoplus.com

