

Produzione diretta ed indiretta di nitrossido d'azoto ad opera delle onde d'urto quale mediatore chimico della loro attività biologica.

S. Russo, E.M. Corrado, E. Amelio,
L. Cugola, G. Gotte,
E. Cavalieri, H. Suzuki

Introduzione

La scoperta che le onde d'urto possiedono un effetto antinfiammatorio oltre a quelli da più tempo noti, ha fatto sì che il bersaglio delle terapie non fosse limitato ai soli tessuti ossei, ma fosse ampliato ai tessuti molli (tendini, fibre muscolari, nervi) e ai vasi sanguigni. L'effetto antinfiammatorio è stato inoltre visto essere accompagnato dalla comparsa di radicali liberi e ad un processo di rivascolarizzazione dei tessuti. Quest'ultimo effetto è stato, tra l'altro, utilizzato nella terapia clinica delle ischemie e necrosi ossee.

Tutte queste evidenze hanno fatto pensare al coinvolgimento di una molecola che negli ultimi tempi si è visto essere coinvolta in moltissimi processi biochimici sia di natura fisiologica che patologica: l'ossido nitrico, NO•, la cui produzione nell'organismo è mediata dalle diverse forme dell'enzima NO-sintasi.

Anche l'NO, come le onde d'urto, manifesta effetti sia benefici che tossici, a seconda della dose prodotta in risposta ad eventi di stress fisico o biochimico: la produzione di NO• sembra essere il primo step di una cascata di eventi quali la produzione del fattore di crescita nervosa (NGF) e di crescita endoteliale (EGF) e quindi sembra essere alla base dei fattori di vascolarizzazione e conseguente rigenerazione tissutale riscontrati dopo il trattamento con le onde d'urto.

In base all'evidenza che l'effetto vasodilatatorio riscontrabile nella zona trattata con le terapie è pressoché immediato si è pensato innanzitutto di

verificare se l'effetto dell'onda d'urto provochi o meno la formazione di NO• anche attraverso un pathway (percorso) NON-ENZIMATICO, e, successivamente, verificare se essa non sia in grado di determinare l'attivazione delle NO-sintasi con produzione indiretta di NO.

Valutazione della produzione diretta di NO

Materiali e metodo

È stato messo a punto un sistema in soluzione acquosa tamponata a pH 7 comprendente L-Arginina, quale substrato che genera NO•, e perossido di idrogeno, H₂O₂, che in condizioni fisiologiche viene immediatamente consumato dalla catalasi, ma che in condizioni patologiche quali infiammazioni, infezioni ecc. può giungere a concentrazioni dell'ordine del *millimolare (mM)*.

Vi è qualche evidenza in letteratura che NO• può essere prodotto a 37°C per via non enzimatica in un contesto come quello qui citato [Nagase, S. et Al., 1997, *BBRC*, 233, 150-153], ma con cinetiche piuttosto lunghe (fino a 5 giorni). Scopo dello studio è quello di verificare se lo shock energetico provocato dall'Onda d'Urto accelera il decorso della reazione con formazione di quantità rilevabili di NO• anche dopo i pochi minuti impiegati per il trattamento.

Sono stati approntati 5 sistemi di volume di 2 ml ciascuno aventi diverse concentrazioni di L-Arg e H₂O₂ (di ordine di grandezza fisiopatologico) in tampone fosfato (NaP) 20mM, pH =7.0.

1. L-Arg 1mM + H₂O₂ 0.1mM campioni 1, 1', 1B, 1B'
2. L-Arg 10mM + H₂O₂ 0.1mM campioni 2, 2', 2B, 2B'
3. L-Arg 1mM + H₂O₂ 1mM campioni 3, 3', 3B, 3B'
4. L-Arg 10mM + H₂O₂ 1mM campioni 4, 4', 4B, 4B'
5. L-Arg 10mM + H₂O₂ 10mM campioni 5, 5', 5B, 5B'

Questi 5 sistemi da trattare con Onde d'Urto sono stati preparati in doppio campione da 2 ml ciascuno (1, 2, 3,... 1', 2', 3'...); sono stati preparati anche i corrispondenti "bianchi" (1B, 2B, 3B... 1B', 2B', 3B'...), e cioè identiche soluzioni da NON trattare con le Onde d'Urto, per quantificare anche

il livello basale di NO• prodotto senza l'intervento dell'Onda d'Urto.

Il primo gruppo di campioni è stato sottoposto a trattamento con 1000 colpi a potenza pari a 0.89 mj/mm². È stato utilizzato un litotritore elettromagnetico a bobina (Modulith SLK - Storz) fornito di apposito supporto reggiprovetta per il trattamento dei campioni di laboratorio.

Per seguire la formazione dell'NO• (specie estremamente instabile) va determinata la concentrazione del prodotto di prima ossidazione del radicale stesso e cioè NO₂⁻.

Le due metodiche da utilizzare sono la determinazione spettrofotometrica seguente a reazione di NO₂ con reattivo di Griess, oppure la determinazione fluorimetrica connessa alla formazione di un prodotto fluorescente in seguito a reazione del nitrito con 2, 3-diamminonafalene (DAN). Quest'ultima metodica è molto più sensibile della prima (riesce a rivelare concentrazioni di NO• fino a 10 nM [nanomolare], mentre la prima arriva a stento a 500 nM).

I risultati ottenuti mediando 14 valori "stimati" per ogni diversa condizione dopo le misure spettrofotometriche sono riassunti nella tabella sottostante e sicuramente promettenti.

I risultati ottenuti con il metodo fluorimetrico sono comunque da considerare molto più attendibili: infatti usando in ambiente acido il reattivo 2, 3-diamminonafalene (DAN) è possibile "intrappolare" l'NO₂ prodotto dal primo step ossidativo dell'NO•; la reazione che ha luogo trasforma il DAN in 2,3-naftotriazolo (NAT), prodotto altamente fluorescente e stabile tra pH 11 e 13, tanto da presentare un limite di rilevabilità anche inferiore a 10nM (nanomolare).

Sia per la costruzione della curva standard di taratura che per la determinazione del nitrito nei campioni incogniti è stata seguita, con qualche modifica, la metodica indicata da Milles e coll. [Miles. A.M. et al., 1995 *Methods Comp in Meth. In Enzymology*,. 7, 40-47].

Campione 1 ^a serie	1 ^a lettura (nM)	2 ^a lettura (nM)	Media (nM)	Campione 2 ^a serie	1 ^a lettura (nM)	2 ^a lettura (nM)	Media (Nm)	Media 1 ^a e 2 ^a serie
1	163	109	136	1'	97	37	67	102 nM
2	0	0	0	2'	34	68	51	25 nM
3	54	138	96	3'	128	92	110	103 nM
4	11	40	25.5	4'	20	27	23.5	23 nM
5	31	33	32	5'	42	28	35	33 nM

La determinazione spettrofotometrica di NO₂⁻, con il reattivo di Griess ha fornito dei valori inferiori al limite di rilevabilità del metodo che vanno quindi presi con beneficio d'inventario, ma il fatto che in 18 campioni su 20 il valore di assorbanza misurato nei campioni trattati con Onde d'Urto sia risultato sempre superiore a quello del corrispondente bianco (cioè non trattato con le Onde), ha fatto pensare che la linea di tendenza sia quella ipotizzata: e cioè che una certa quantità di NO• sia prodotto direttamente dalle Onde senza l'intervento dell'enzima NO-sintasi.

I dati ottenuti con 3 aliquote degli stessi campioni analizzati con il metodo spettrofotometrico (1, 2, 3, 4, 5; 1', 2', 3', 4', 5', ogni campione tarato sul suo "bianco") sono stati mediati e dai dati ottenuti è emerso che la condizione più favorevole per la produzione-Onda d'Urto-dipendente di NO• è la 4 (e 4').

L'Arg 10 mM + H₂O₂ 1 mM (millimolare)

Si è pertanto deciso di ripetere un'altra serie di misure (condizioni 1-5), aumentando però il numero di determinazioni relative alla

condizione 4. Inoltre sempre per questa condizione si è provato a diversificare il numero di colpi, ripetendo tre serie di misure con campioni a 500 colpi e non a 1000.

I dati ottenuti sono stati mediati sul numero di aliquote utilizzate su ogni singolo campione e sul valore medio dei vari campioni omologhi (N, N', ...) si è calcolata la media pesata (tenendo cioè conto del numero di aliquote su cui si a la media per ogni singolo campione). Valori così ottenuti sono stati ricondotti alla concentrazione di NO₂⁻ (concentrazione NO₂⁻ = [NO₂⁻]) e quindi alla concentrazione di NO• presente nelle diverse condizioni e riassunti nella seguente tabella:

Serie Campione	1	2	3	4	4	5
Parametri						
[L-Arg] mM	1	10	1	10	10	10
[H ₂ O ₂] mM	0.1	0.1	1	1	1	10
N° colpi	1000	1000	1000	1000	500	1000
[NO•] mM ±S.D*	<5	11±5	0	86±21	38±9	0
N° tot. misure	10	10	10	15	8	10

* = Deviazione Standard; mM = millimolare 10⁻³ M (moli/litro); nM = nanomolare, 10⁻⁹ M.

Va sottolineato che il valore di NO• riportato è relativo alla differenza tra il campione trattato con Onde d'Urto e il rispettivo non trattato, pertanto il caso 5, in cui si ha un valore 0 di NO₂⁻ prodotto, non deve sorprendere: infatti i valori assoluti di Fluorescenza registrati in questi campioni erano più elevati, ma nei rispettivi "bianchi" erano quasi sempre addirittura superiori. Ciò non deve preoccupare perché la condizione più favorevole (4) è quella che più si avvicina alle condizioni fisiopatologiche esistenti nell'organismo.

Questi dati, anche se riferiti ad un sistema estremamente semplificato rispetto a quello *in vivo*, sono indubbiamente molto promettenti perché, concentrazioni di NO• vicine a 100nM sono significative per le attività biologiche ad esse correlate.

In particolare sarà molto interessante studiare un sistema più complesso di quello ora studiato, ad esempio l'effetto delle Onde d'Urto in tessuti o colture cellulari, in cui vi sia la presenza dell'enzima NOS (NO-sintasi).

Si è infine voluto verificare la specificità della reazione in gioco provando a trattare con Onde d'Urto substrati diversi da L-Arg, sempre potenziali "donatori di azoto", che con la specie donatrice di ossigeno (H₂O₂) potrebbero portare a formazione di NO, nella condizione più favorevole (4). Ma L-Citrullina, o L-Valina, o Glicina o Urea 10mM + H₂O₂ 1mM, sia trattati che non, hanno dato valori di Fluorescenza

prossimi allo zero: ciò indica che, pur ottenendo NO per via non-enzimatica, la formazione di questa molecola-chiave sembra seguire ugualmente un cammino specifico.

Determinazioni della produzione indiretta di nNO ad opera di cellule endoteliali umane

I trattamenti sulle cellule sono iniziati utilizzando cellule primarie dell'endotelio in cui fosse sicuramente assente la forma della NOS inducibile (iNOS) e allo stesso tempo fosse espressa la forma costitutiva endoteliale di membrana (eNOS).

Materiali e metodo

Sono state utilizzate cellule HUVEC (human umbelical vein endothelial cordon) isolate a partire da 3 cordoni ombelicali umani da dove sono state separate tramite collagenasi.

Coltivate in terreno di coltura M199 addizionato di 20% FBS (Fetal Bovine Serum) in presenza del fattore di crescita ECGS (endothelial cell growth supplement) e tenute in incubatore a 37°C in presenza di 5%CO₂.

Le cellule sono state utilizzate al 3° passaggio di crescita, utilizzandone circa 5 milioni per ogni punto, suddivise in 8 aliquote uguali per operare gli esperimenti programmati come segue:

- 1) Controllo (nessun trattamento)
- 2) Controllo + Onde d'Urto (1000 colpi, potenza 0.030 mJ/mm² (L5).
- 3) Epigallocatechinagallato (EGCG) 100 µM
- 4) Epigallocatechinagallato 100 µM + Onde d'Urto (1000 colpi, potenza 0.030 mJ/mm²
- 5) IFN-γ 10pg/ml + LPS 1 µg/m12 h (LPS, lipopolisaccaride, induce infiammazione)
- 6) IFN- γ 10pg/ml + LPS 1 µg/m12 h + Onde d'Urto (1000 colpi, potenza 0.030 mJ/mm²
- 7) Epigallocatechingallato 100 µM dopo 30' + IFN- γ 10pg/ml + LPS 1 µg/m12 h
- 8) Epigallocatechingallato 100 µM, dopo 3 0'+ IFN- γ 1 0pg/ml + LPS 1 µg/m12 h + Onde d'Urto (1000 colpi, potenza 0.030 mJ/mm²).

Le cellule sono state staccate con Tripsina e risospese in 1 ml di terreno di coltura senza siero e sono state trasferite nelle vials adatte al trattamento con Onda d'Urto.

Tutti gli 8 campioni sono stati trattati allo stesso modo lasciandoli a temperatura ambiente nell'intervallo di tempo tra la loro preparazione ed il trattamento con S.W.

Durante il trattamento (4 min 15 sec) sia i campioni trattati (2,4,6,8) che i rispettivi controlli, (1,3,5,7) sono stati termostatati a 37°C per poi essere posti in bagno di ghiaccio (0°C) immediatamente dopo la fine del trattamento.

I campioni con le cellule sono stati centrifugati per 5 min a 1000 rpm (round per minute), conservando il sovrnatante per le determinazioni dei Nitriti e dei Nitrati.

Le cellule sono state lisate con 100 µl di

tampone di lisi ipotonico (Hepes 50 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, DTT (riducente) 1 mM, mix di inibitori di proteasi) e tramite shock termico (congelamento in azoto liquido e scongelamento a 37°C per 3-4 volte). Le cellule sono state poi centrifugate per 30' a 12000 rpm a 4°C. Nel surnatante si trova eNOS.

Il pellet così ottenuto (dove si trovano le membrane e quindi eNOS) è stato usato con 100 µl di tampone di lisi con aggiunta di CHAPS 20 mM (detergente) e sempre mediante shock termico. I campioni sono stati nuovamente centrifugati per 30' a 12000 rpm a 4°C.

Il sovrinatante così ottenuto è stato ulteriormente purificato tramite una resina di affinità ADPAgaroso che trattiene gli enzimi NADPH-dipendenti tra cui la eNOS.

L'eluato ottenuto è stato usato per determinare l'attività dell'enzima, utilizzando una mix di reazione in cui sono presenti i cofattori della eNOS (tetraidrobiopterina, NADPH, Ca⁺⁺, Calmodulina, FAD) e il substrato di reazione, L-Arg, sia calda che fredda (radioattiva e non). La reazione è stata condotta a 37°C per 30 min, stoppata con tampone a pH 5,5. L-Arg è carica positivamente e viene trasformata in L-Citrullina, neutra. Si usa pertanto una resina a scambio ionico per separare la Citrullina prodotta dall'Arginina residua, che rimarrà legata alla resina.

La produzione di citrullina viene determinata tramite lettura al β-counter (scintillatore), in doppio per ogni campione. I risultati (media di 2 letture) sono i seguenti (cpm: conte per minuto) :

1) 724 cpm	2) 3617 cpm	2/1: circa 5
3) 5566 cpm*	4) 5374 cpm*	
5) 0 cpm*	6) 562 cpm	
7) 12831 cpm	8) 12795 cpm	

I dati con asterisco sono la media di 2 ripetizioni in cui si ha elevata variabilità, per gli altri i doppioni sono più riproducibili.

Questi dati sono puramente preliminari e andranno ripetuti più volte.

La tendenza sembra dire che le S.W. attivano la eNOS, ma in presenza di EGCG le differenze si annullano. Dato interessante è quello relativo

al controllo (2) in cui il trattamento con S.W. porta un aumento di circa 5 volte di attività, che potrebbe spiegare la vasodilatazione riscontrata.

Conclusioni

I dati conclusivi che scaturiscono dallo studio dimostrerebbero una correlazione tra la terapia ad onde d'Urto, la produzione intratissutale di nitrossido d'azoto e le risposte biologiche del bersaglio trattato. I dati sono ancora preliminari e vanno verificati con ulteriori metodi di studio.

Se questi risultati saranno confermati si potrà attribuire senza ombra di dubbio al nitrossido di azoto il ruolo di mediatore fisiologico di tutti gli effetti osservati nei tessuti sottoposti a trattamento. Molto suggestiva appare la produzione diretta di NO la quale richiede comunque valori di potenza elevati (francamente cavitazionali) a differenza della produzione indiretta di NO che richiede potenze decisamente più basse per l'attivazione delle catene enzimatiche delle sintasi.

Ciò comporta delle immediate implicazioni a livello di approccio terapeutico. Ad esempio nel trattamento di un'area di necrosi ossea porre il punto focale al centro di tale area non può sortire effetti in quanto la bassa potenza non potrà sviluppare attivazione enzimatica essendo la necrosi pressoché totale in quel punto.

Le elevate potenze potrebbero in linea teorica produrre NO con metodo diretto, ma l'assenza di un tessuto cellulare vivente renderebbe vana tale produzione. Risulta evidente che in tali situazioni cliniche il trattamento deve essere rivolto all'interfaccia tra tessuto vitale, seppure ischemico e tessuto francamente necrotico. Solo con il progressivo ripristino delle condizioni vitali nell'area periferica alla lesione si potrà di volta in volta dirigere il fuoco in senso centripeto alla lesione.

L'ulteriore approfondimento del ruolo del nitrossido d'azoto potrà aprire le porte a nuove applicazioni cliniche anche in campi diversi da quello puramente ortopedico.