VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI BIOLOGICI DI UN'ACQUA TERMALE SU CELLULE CUTANEE IN COLTURA

Maria Laura Flori, Giovanni Agostini, Michele Pellegrino, Lucio Andreassi*

Istituto di Scienze Dermatologiche, Università degli Studi di Siena
* Scuola di Specializzazione in Idrologia Medica, Università degli Studi di Pisa.

Estratto da
COSMETIC NEWS
n. 122 • settembre/ottobre 1998 • pag. 346/348

via Grado 9 - 20127 Milano

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI BIOLOGICI DI UN'ACQUA TERMALE SU CELLULE CUTANEE IN COLTURA

M.L. FLORI, G. AGOSTINI*, M. PELLEGRINO, L. ANDREASSI

Riassunto

Sulla base di documentati effetti terapeutici svolti da alcune acque termali nei confronti di patologie cutanee croniche a carattere infiammatorio, gli Autori hanno condotto un'indagine diretta ad osservare il comportamento in coltura di fibroblasti e cheratinociti umani in presenza di acqua termale di una nota fonte.
Lo studio ha dimostrato che l'acqua termale non inibisce lo sviluppo di queste cellule in coltura, né svolge effetti tossici nei loro confronti. I fibroblasti, in terreno ricostituito con l'acqua termale in oggetto, si sono sviluppati in modo sovrapponibile a quello osservato in presenza di terreno standard.
Nei cheratinociti il terreno (MCDB 153) ricostituito con acqua termale ha indotto una spiccata differenziazione analoga a quella che si osserva in presenza di sali di calcio.
Questi risultati suggeriscono che le colture cellulari possono rappresentare una valida metodica per lo studio degli effetti biologici delle acque termali.

Summary

On the basis of the documented therapeutic effects which some thermal waters have on some inflammatory chronic skin pathologies, the Authors made a research aimed to observe the behaviour in culture of human fibroblasts and keratinocytes in the presence of thermal water of a well-known spring.
The research proved that thermal water does not prevent the development of this cells in culture, nor has it any toxic effect against them.
The fibroblasts, in a culture medium which was reconstituted with thermal water Rocchetta, developed just like at the presence of a standard culture medium.
As concerns the keratinocytes, the culture medium (MCDB 153) which was reconstituted with thermal water induced a marked differentiation similar to the one that can be observed in the presence of calcium salts. These results suggest that cellular cultures can be a sound methodology for the study of the biological effects of thermal waters.

È ormai ampiamente documentato che alcune acque termali sono in grado di svolgere un effetto terapeutico nei confronti di dermatosi quali psoriasi e dermatite atopica 1, 2 probabilmente in relazione ad un'attività antinfiammatoria valutabile mediante opportuni modelli sperimentali [3,4].
Al momento attuale non è completamente noto il meccanismo con cui tale effetto si esplica.
Si può tuttavia ipotizzare che la presenza di alcuni ioni, a determinate concentrazioni, possa interagire con la biologia delle cellule cutanee e tradursi in un effetto normalizzatore sul metabolismo cellulare, notoriamente alterato in numerose condizioni dermatologiche caratterizzate da componente infiammatoria.
In particolare appare verosimile che i sali contenuti nell'acqua termale possano svolgere un'attività antiflogogena interferendo con le funzioni di membrana capaci di modulare gli effetti di sostanze proinfiammatorie.
L'acqua termale, la cui composizione è riportata nella Tabella 1, presenta caratteristiche non dissimili da quelle di acque con attività antinfiammatoria sperimentalmente dimostrabile ed indicata per un suo eventuale impiego in situazioni dermatologiche nelle quali può essere utile un tale effetto (Tab. 1).
Con queste premesse ci è sembrato interessante verificare se l'acqua termale citata, in particolare i sali in essa presenti, fossero capaci di interferire con lo sviluppo in vitro di cellule della cute umana.
Per tale motivo è stata condotta un'indagine intesa a valutare la dinamica della crescita ed eventuali modificazioni morfologiche di fibroblasti e cheratinociti incubati in terreno con e senza acqua termale in oggetto.

Caratteri fisico-chimici dell'acqua termale allo studio

Caratteri fisici e costanti chimico-fisiche	
Conducibilità elettrica specifica a 20°C	260.1 µS/cm
pH a 18°C	7.41
Residuo fisso a 180°C	173.32 mg/l
Gas disciolti in un litro d'acqua (a 0°C e 760 mm Hg)	
Anidride carbonica libera	10.76 mg/l
Risultati analitici	**mg/l**
Ione Calcio Ca^{++}	55.13
Ione Sodio Na^{+}	5.03
Ione Magnesio Mg^{++}	3.54
Ione Potassio K^{+}	0.50
Ione Stronzio^{++}	0.25
Ione Idrocarbonico HCO^{-}_{3}	171.45
Ione Solforico $SO_4^{=}$	7.92
Ione Cloridrico Cl^{-}	9.31
Ione Nitrico NO_3^{-}	1.95
Ione Fluoridrico F^{-}	0.1
Silice SiO_2	5.07
Elementi contenuti in tracce: ferro	

Oligoelementi	
Fluoro	0,10 mg/l
Stronzio	0,25 mg/l
Litio	4,19 µg/l
Bario	2,07 µg/l
Cromo (VI)	0,49 µg/l
Bario	0,03 mg/l
Fluoro	0,14 mg/l

Tab. 1

Istituto di Scienze Dermatologiche, Università degli Studi di Siena,
** Scuola di Specializzazione Idrologia Medica, Università degli Studi di Pisa*

Materiali e metodi

Terreni

Fibroblasti - È stato impiegato il terreno risultante da una miscela 1:1 del "Dulbecco's Modified Eagle's (DME)"e del "Ham's F 12 Nutrient" tamponato con HEPES.
Tale terreno consente lo sviluppo di una grande varietà di cellule da solo o con l'aggiunta di minime quantità di siero fetale bovino (SFB).
Esso, disponibile in polvere, è stato ricostituito al momento dell'uso con acqua bidistillata apirogena e con acqua termale.
In ambedue le versioni è stato aggiunto siero fetale bovino nella misura del 5%.
Cheratinociti - È stato impiegato il terreno MCDB 153 capace di assicurare la crescita dei cheratinociti in assenza di siero.
Proprio per questo motivo, tale terreno è particolarmente adatto per osservare le caratteristiche di crescita dei cheratinociti in condizioni che richiedano valutazioni comparative.
Anche in questo caso il terreno disponibile in polvere è stato ricostituito rispettivamente con acqua bidistillata apirogena e con l'acqua termale sperimentata.

Colture

Fibroblasti - Sono stati allestiti da frammenti di cute indenne ottenuti nel corso di interventi chirurgici per asportazione di neoformazioni cutanee benigne in pazienti di giovane età.
Frammenti cutanei della grandezza di 1-2 mm, sono stati fissati sul fondo di dischi di Petri e posti ad incubare in MEM arricchito di SFB 10%.
Dopo 15 giorni, tempo necessario per ottenere lo sviluppo di un abbondante outgrowth, i fibroblasti sono stati distaccati e subcoltivati fino ad ottenere colture in mono-layer che sono state impiegate per lo studio in esame.

Cheratinociti - Sono stati allestiti da frammenti di cute ottenuti in condizioni analoghe a quelle dei fibroblasti.
Strisce di epidermide, prelevate con il dermatomo Davol sono state poste ad incubare in tripsina-EDTA fino ad ottenere un distacco epidermico in sede soprabasale.
I cheratinociti raccolti mediante scraping sono stati posti ad incubare su un feeder layer di fibroblasti murini (3T3) mortalmente irradiati.
Tali colture, a confluenza, sono state utilizzate per lo studio in esame nelle condizioni sperimentali più avanti descritte.

Procedimento

Fibroblasti a confluenza, ottenuti come sopra descritto, sono stati seminati in dischi da 3 cm di diametro nella quantità di 50.000 cellule per disco e posti ad incubare rispettivamente in terreno ricostituito con acqua bidistillata apirogena e con acqua termale.
Le colture sono state seguite giornalmente con il microscopio invertito a contrasto di fase.
Ad intervalli regolari (24 ore) 2 o più dischi per ciascuna serie sono stati impiegati per il conteggio dei fibroblasti allo scopo di definirne la curva di crescita.
Per ogni giornata di valutazione è stata considerata la media dei valori ottenuti.
Agli stessi intervalli di tempo alcuni dischi sono stati fissati in formolo tamponato e colorati con metodi diversi allo scopo di osservare più finemente la morfologia cellulare.
Cheratinociti a confluenza, ottenuti come sopra descritto, sono stati seminati in dischi di 3 cm di diametro, nella quantità di 200.000 cellule per disco e posti ad incubare in terreno ricostituito con acqua bidistillata apirogena e con acqua termale.
Le colture sono state monitorizzate con osservazione diretta.
Ad intervalli regolari (48 ore) 2 o più dischi per ciascuna serie sono stati impiegati per il conteggio dei cheratinociti allo scopo di definirne la curva di crescita.
Per ogni tempo di valutazione è stata considerata la media dei valori ottenuti.
Agli stessi intervalli di tempo alcuni dischi sono stati fissati in formolo tamponato e colorati con blu di rodanile e con ematossilina-eosina allo scopo di apprezzare meglio gli aspetti morfologici delle cellule.
Altri dischi infine sono stati processati per la microscopia elettronica a trasmissione.

Risultati

Colture di fibroblasti

Le curve di crescita osservate nelle colture incubate con terreno ricostituito con l'acqua termale citata hanno fatto registrare un andamento sostanzialmente sovrapponibile a quello osservato nelle colture incubate con terreno ricostituito con acqua bidistillata apirogena.
Le colture colorate con blu di toluidina dimostrano che il colore dei dischi, parametrico della densità cellulare, è progressivamente più intenso passando dalla prima all'ultima giornata di coltura, senza differenze visivamente apprezzabili tra le due serie di colture.
Questi dati sono stati confermati dai conteggi delle cellule riportati nella figura 1.

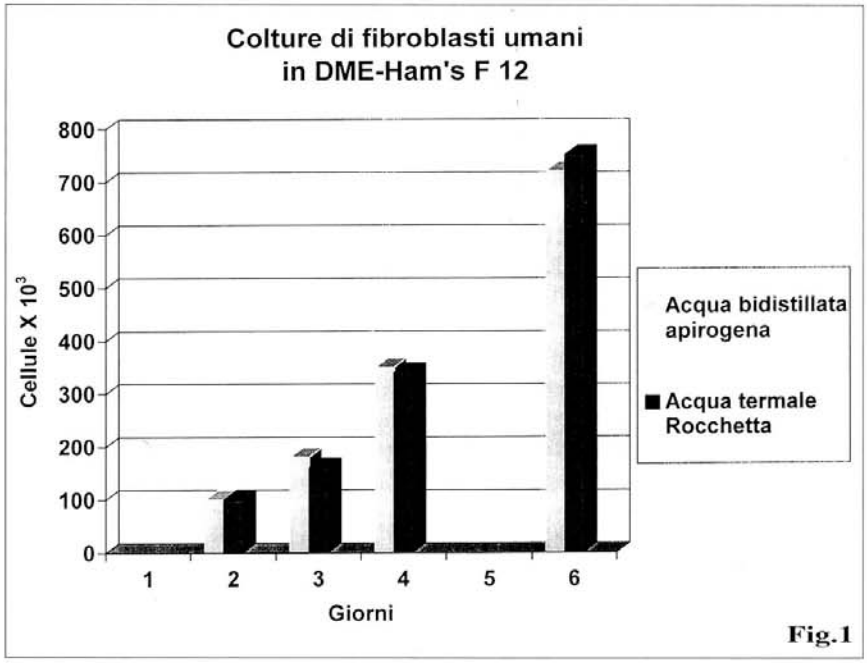

Fig.1

Infatti il numero delle cellule nelle colture con terreno standard da 100.000/disco dopo 24 ore è passato a 180.000/disco, 350.000/disco e

720.000/disco nelle giornate successive; mentre i fibroblasti coltivati con terreno ricostituito con l'acqua termaleallo studio sono passati da 100.000/disco dopo 24 ore a 160.000/disco, 340.000/disco e 750.000/disco nelle giornate successive.
L'analisi statistica mediante la *t* di Student per dati appaiati non ha evidenziato differenze significative tra le 2 serie studiate.
Anche l'osservazione morfologica delle colture non ha evidenziato differenze rilevanti fra le cellule coltivate in terreno ricostituito con acqua bidistillata apirogena e terreno ricostituito con acqua termale.

Colture di cheratinociti
I preparati ottenuti colorando i cheratinociti con blu di rodanile, che ha affinità per le citocheratine, dimostrano che il colore dei dischi è progressivamente più intenso passando dalla prima all'ultima giornata di coltura, con tonalità più francamente rossastre nei cheratinociti coltivati con terreno contenente l'acqua termale.
Questo reperto è stato confermato dall'osservazione microscopica di queste colture che hanno rivelato sia nei preparati a fresco che in quelli fissati e colorati una cheratinizzazione più spiccata rispetto alle colture di controllo.
Il conteggio delle cellule effettuato nelle diverse giornate di coltura ha dimostrato che il numero dei cheratinociti è passato da 250.000/disco dopo 48 ore a 350.000, a 480.000 e a 750.000 per i cheratinociti coltivati in terreno standard e da 300.000/disco a 340.000, 480.000 e 700.000 per i cheratinociti coltivati in terreno ricostituito con questa acqua termale.

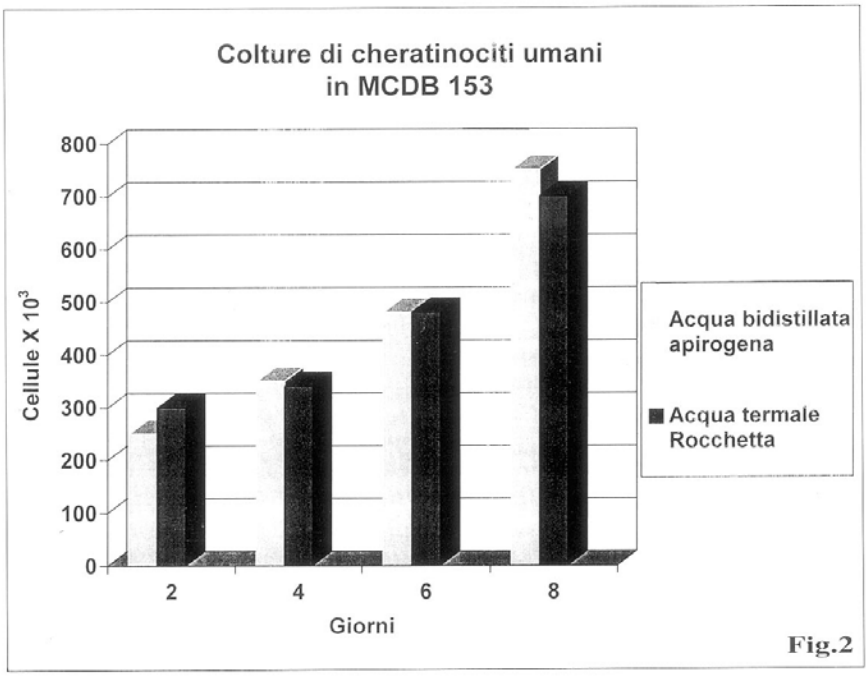

Fig.2

L'analisi statistica effettuata mediante la *t* di Student per dati appaiati non ha dimostrato differenze significative tra le due serie di colture.

Commento e conclusioni
Sintetizzando i risultati ottenuti possiamo affermare che le indagini in vitro hanno dimostrato che l'acqua termale presa in esame rende possibile la crescita cellulare.
Se consideriamo le difficoltà che spesso si incontrano in laboratorio per ottenere un' acqua idonea all'allestimento dei terreni, questo, a nostro avviso, è un dato molto significativo.
In altre parole esso dimostra che l'acqua termale citata non contiene elementi che disturbino la crescita cellulare.
Questo dato è particolarmente evidente per le colture di fibroblasti.
Nelle colture di cheratinociti l'acqua termale in esame non ostacola la crescita, ma induce una spiccata differenziazione cellulare verso la cheratinizzazione.
Questo fenomeno è attribuibile alla presenza di alcuni sali ed in particolare al calcio, che notoriamente è capace di modulare i livelli di adenilciclasi endocellulare e quindi è in grado di interferire con la differenziazione di queste cellule verso una più spiccata cheratinizzazione.
Questi risultati, in particolare la differenziazione indotta sui cheratinociti in coltura, gettano le basi per una utilizzazione dell'acqua termale in oggetto sia per la balneoterapia, sia per terapie idropiniche in situazioni dermatologiche caratterizzate da componente infiammatoria.

Bibliografia
1. Andreassi L. History of keratinocyte cultivation. Burns, 18, Supplement 1, S2-S4, 1992.
2. Chappuis JP. Applications de la biométrologie à l'étude des propriétés anti-inflammatoires de l'Eau thermale d'Avéne. IV Symposium Jean-Louis Alibert, Annecy, 1993, pp 149-155.
3. Hennings H, Michael D, Cheng C et al. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. Cell, 19, 245, 1980.
4. Mitry E, Guerrero D, Billot JP et al. Evaluation objective des modifications cutanées au cours d'une cure thermale à Avène. Nouv Dermatol C.C.I., 1991.
5. Pinton J, Friden H, Kettaneh-Wold N et al. Clinical and biological effects of a selenium-rich termal water on psoriasis vulgaris. Congres de Recherche Americaine en Dermatologie, Chicago, 1995.
6. Poelman MC, Cosson C, Duval C. Dermatite de contact au lauryl sulfate de sodium, Ètude in vivo de l'activité anti-irritante d'un eau thermale. Dermatologie Pratique, Supplément au N° 120, 1993.
7. Rheinwald JG , Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. Cell 6, 331, 1975.
8. Tsao MC, Walthall BJ, Ham RG. Clonal growth of normal epidermal keratinocytes in a defined medium. J. Cell Physiol 110, 219, 1982.

Il presente lavoro è consultabile all'indirizzo: **www.percorsi medici.com/rocchetta**