

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTÀ DI FARMACIA

Dipartimento di Scienze del Farmaco

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FARMACEUTICHE

XXIV ciclo

Dott.ssa Lucia Crascì

Valutazione dell'attività antinfiammatoria /antidegenerativa
di derivati 5-ariliden-4-tiazolidinonici come nuovi inibitori di
metalloproteasi di matrice

—————
TESI DI DOTTORATO
—————

Tutor:

Chiar.mo Prof. Annamaria Panico

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Giuseppe Ronsisvalle

Triennio 2008-2011

INDICE

INTRODUZIONE	5
--------------------	---

PARTE GENERALE

CAPITOLO 1- TIAZOLIDINONI	8
1.1. SINTESI.....	8
1.2. USI FARMACOLOGICI DEI 4 TIAZOLIDINONI	9
1.2.1. <i>Attività anti-HIV</i>	9
1.2.2. <i>Attività anticonvulsivante</i>	10
1.2.3. <i>Attività antimicrobica</i>	10
1.2.4. <i>Agonista dei recettori dell'ormone follicolo stimolante (FSH)</i>	11
1.2.5. <i>Attività antitumorale ed antiproliferativa</i>	12
1.2.6. <i>Attività antinfiammatoria</i>	13
1.2.7. <i>Inibitori CFTR</i>	14
1.2.8. <i>Attività Antiossidante</i>	14
1.2.9. <i>Ipoglicemizzanti orali- glitazoni</i>	14
1.2.10. <i>Inibitori di metalloproteasi</i>	16
1.2.11. <i>Utilizzi vari</i>	16
CAPITOLO 2- I TESSUTI CONNETTIVI E LA CARTILAGINE	17
2.1. CLASSIFICAZIONE DEI TESSUTI CONNETTIVO	17
2.2. COMPONENTI DEI TESSUTI CONNETTIVI	17
2.3. LA MATRICE EXTRACELLULARE	18
2.2.1. <i>Sostanza fondamentale</i>	18
2.3.2. <i>Componente fibrosa</i>	21
2.4.IL TESSUTO CARTILAGINEO	22
2.4.1. <i>Tipi di tessuto cartilagineo</i>	22
2.4.2. <i>ECM della cartilagine</i>	23
2.4.3. <i>Condrociti</i>	24
2.4.4. <i>Istogenesi ed accrescimento del tessuto cartilagineo</i>	25
2.5. CARTILAGINE ARTICOLARE	25
CAPITOLO 3- OSTEOARTRITE	29
3.1. DEFINIZIONE E GENERALITÀ	29
3.2. EPIDEMIOLOGIA	29
3.3. EZIOPATOGENESI ED EVOLUZIONE DELL'OA	30
3.3.1. <i>Fattori di rischio</i>	31
3.3.2. <i>Patogenesi</i>	32
3.4.SITI DI LOCALIZZAZIONE DELL'OA	35
3.5.PREVENZIONE E TERAPIA.....	36

CAPITOLO 4- MEDIATORI BIOCHIMICI NELL'EVENTO OSTEOARTRITICO	39
4.1. OMEOSTASI CARTILAGINEA	39
4.2. MEDIATORI ANABOLICI	40
4.3. MEDIATORI CATABOLICI	41
4.3.1. <i>Neuromediatori</i>	41
4.3.2. <i>Fibronectina</i>	41
4.4. MEDIATORI DELL'INFIAMMAZIONE.....	41
4.4.1. <i>Citochine pro-infiammatorie</i>	42
4.4.2. <i>Ossido nitrico (NO)</i>	43
4.4.3. <i>Eicosanoidi</i>	45
4.4.4. <i>NFkB (Nuclear Factor kB)</i>	46
4.4.5. <i>ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecules-1)</i>	49
4.5. PROTEASI	50
4.5.1. <i>Metalloproteasi</i>	51
4.5.2. <i>Classificazione delle MMPs</i>	52
4.5.3. <i>Regolazione trascrizionale delle MMPs</i>	55
4.5.4. <i>Meccanismo di attivazione delle MMPs</i>	55
4.5.5. <i>TIMPs (Tissue Inhibitor metalloproteinases)</i>	56
4.5.6. <i>Modifiche strutturali delle MMPs</i>	58
4.5.7. <i>Meccanismo d'azione delle MMPs</i>	58

PARTE SPERIMENTALE

CAPITOLO 5- PRIMA PARTE SPERIMENTALE	62
5.1. SCOPO DEL LAVORO.....	62
5.2. SCHEMA DI SINTESI	64
5.2.1. <i>Schema generale di sintesi dei 5-ariliden-2,4-tiazolidindioni</i>	64
5.3. RISULTATI E DISCUSSIONI	64
5.3.1. <i>EC₅₀ e SAR</i>	66
5.3.2. <i>Saggi biologici: GAGs ed NO</i>	67
5.4. MATERIALI E METODI	70
5.4.1. <i>Metodo di sintesi degli acidi 4-(5-ariliden-2,4-diossotiazolidin-3-il metil) benzoici</i>	70
5.4.2. <i>Metodo di sintesi degli acidi (5-ariliden-2,4-diossotiazolidin-3-il) acetici</i>	71
5.4.3. <i>Test fluorimetrico per MMP-13: EC₅₀</i>	72
5.4.4. <i>Preparazione di colture di condrociti</i>	73
5.4.5. <i>Saggio di vitalità cellulare (MTT)</i>	75
5.4.6. <i>Dosaggio dei GAGs</i>	75
5.4.7. <i>Determinazione dei livelli di NO</i>	76
5.5. ANALISI STATISTICA.....	77
CAPITOLO 6- SECONDA PARTE SPERIMENTALE	79
6.1. SCOPO DEL LAVORO.....	79
6.2. SCHEMA DI SINTESI	80
6.2.1. <i>Schema generale di sintesi degli acidi (5-ariliden-4-oxo-2-tioxo-</i>	

1,3-tiazolidin-3-il) acetici.....	80
6.3. RISULTATI E DISCUSSIONI	80
6.3.1. <i>EC</i> ₅₀ e SAR	82
6.3.2. Attività antiossidante: ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).....	85
6.3.3. Western blot: NFκB ed ICAM-1	88
6.3.4. Determinazione dei livelli di NO.....	91
6.3.5. Dosaggio dei GAGs.....	93
6.4. MATERIALI E METODI	94
6.4.1. Test fluorimetrico per MMP3/13: <i>EC</i> ₅₀	94
6.4.2. Attività antiossidante: ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).....	95
6.4.3. Preparazione di colture di condrociti	97
6.4.4. Saggio di vitalità cellulare: MTT.....	99
6.4.5. Western blot: NFκB ed ICAM	99
6.4.6. Determinazione dei livelli di NO.....	100
6.4.7. Dosaggio dei GAGs.....	101
6.5. ANALISI STATISTICA.....	101
CAPITOLO 7- CONCLUSIONI	102
CAPITOLO 8- BIBLIOGRAFIA	103

INTRODUZIONE

L'osteoartrite (OA) costituisce attualmente la più comune e diffusa malattia reumatica; essa rappresenta la causa più frequente di disabilità nell'anziano. [1-2] La frequenza della malattia aumenta progressivamente con l'avanzare dell'età; la sua diffusione è dunque destinata a crescere nei prossimi decenni, dato il graduale allungarsi della durata media della vita. Negli USA è stato calcolato che nel 2020 i soggetti in età superiore ai 65 anni rappresenteranno il 22% della popolazione, per cui il costo presumibile dell'OA, valutato secondo i parametri attuali, sarà intorno ai 100 miliardi di dollari. [2] Anche per l'Italia le analisi epidemiologiche concordano con quelle degli altri Paesi; l'OA rappresenta infatti il 72,6% delle affezioni reumatiche e, si calcola pertanto che circa 4 milioni di persone siano portatrici di tale affezione. [3]

In rapporto ad alcune caratteristiche proprie dell'OA, quali l'elevata diffusione, l'evoluzione cronica, l'entità del danno invalidante, la necessità di assistenza medica e di prescrizioni farmaceutiche, sia l'una che le altre ripetute e protratte nel tempo, è logico che la patologia artritica comporti oneri socio-economici di notevole entità.

Considerata l'importanza che tale patologia sta assumendo, non solo a livello sanitario ma anche socio economico, la ricerca è oggi indirizzata all'individuazione di nuove vie farmacologiche potenzialmente in grado di arrestare l'iter evolutivo di questa patologia e quindi di prevenire il possibile danno invalidante che da essa può derivare.

La scoperta dei meccanismi biochimici e delle sequenze patogenetiche che caratterizzano l'OA ha modificato profondamente l'atteggiamento terapeutico nei confronti di questa malattia, un tempo ritenuta priva di ogni possibilità terapeutica al di fuori di quella puramente sintomatica.

Il mio lavoro di tesi, inserendosi in questo ambito di ricerca, riguarderà lo studio di composti in grado di agire proprio sugli eventi caratterizzanti il processo osteoartritico: i tiazolidinoni (TZD).

I TZD rappresentano una classe di composti ampiamente studiata per le loro proprietà farmacologiche, essi hanno mostrato di possedere un'ampia varietà di attività biologiche ed oggi sono utilizzati nella cura del diabete come ipoglicemizzanti orali. Inoltre diversi studi hanno permesso di individuarli come inibitori di metalloproteasi (MMPs), enzimi chiave nel determinismo di varie patologie, tra cui l'OA.

PARTE GENERALE

CAPITOLO 1-TIAZOLIDINONI

I tiazolidinoni (TZD), costituiti da un anello tiazolico con il gruppo carbonilico sul carbonio quattro, rappresentano una classe di molecole dotate di un'ampia diversità nel profilo di risposta biologica; ciò ha indotto molti ricercatori ad esaminare questo nucleo nelle sue diverse potenziali attività. I TZD sono derivati di tiazolidine che appartengono ad un importante gruppo di composti eterociclici contenenti zolfo e azoto in un anello di cinque membri. I 4-tiazolidinoni sono derivati di tiazolidine con un gruppo carbonilico sia in posizione 4 che in posizione 2 (Figura 1).[4]

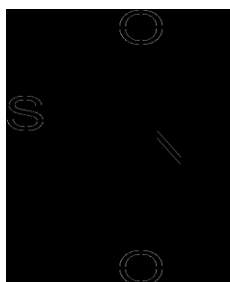
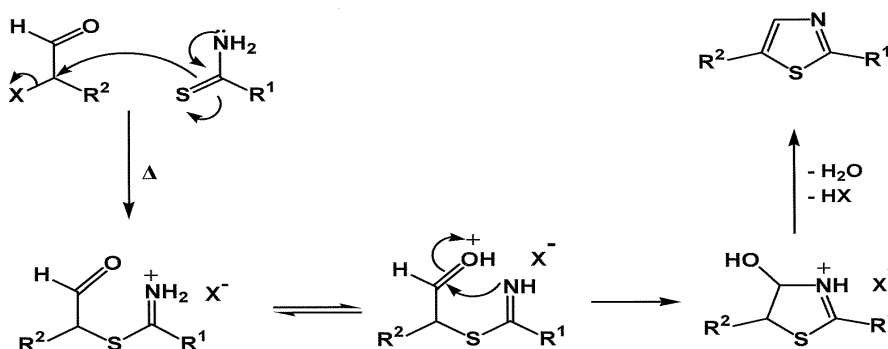


Figura 1. Struttura chimica dei 4- tiazolidinoni

1.1. Sintesi

Sintesi di Hantzsch del Tiazolo:



1.2. Usi farmacologici dei 4 tiazolidinoni.

I 4-tiazolidinoni hanno dimostrato di possedere un'ampia varietà di attività biologiche, dipendenti dalla natura e dalla posizione dei sostituenti sull'anello tiazolico; infatti modifiche nella struttura chimica dei TZD producono composti con differenti profili farmacologici.

1.2.1. Attività anti-HIV.

Il virus dell'immunodeficienza umana (HIV-1) fu identificato come agente responsabile dello sviluppo della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). Il ciclo replicativo dell'HIV-1 rappresenta uno dei potenziali target per l'intervento terapeutico, in particolare la trascrittasi inversa (RT) è un enzima, contenuto nel capsido virale, che gioca un ruolo essenziale e multifunzionale nella replicazione del virus. Una combinazione di inibitori nucleosidici della RT (NRTIs), inibitori non nucleosidici (NNRTIs) e Inibitori della proteasi (PIs), clinicamente usati per il trattamento dell'infezione da HIV-1, diminuiscono drammaticamente la carica virale, ma emergono facilmente resistenze a tali trattamenti. Di conseguenza è nata l'esigenza di sviluppare nuovi, selettivi, potenti e sicuri agenti antivirali, attive anche contro le forme mutanti del virus. [5]

I 2,3-diaryl-1,3-tiazolidin-4-oni, (Figura 2) sono riportati come agenti antivirali in qualità di NNRTI. [6-7] La presenza di un gruppo lipofilo adamantanico in posizione 2 dell'anello tiazolico, è stato mostrato giocare un ruolo cruciale per l'attività anti HIV, saggiata sia contro l'HIV-1 (IIIB) che HIV-2 (ROD) in colture di cellule CEM, prendendo Nevirapina come composto di riferimento. [8]

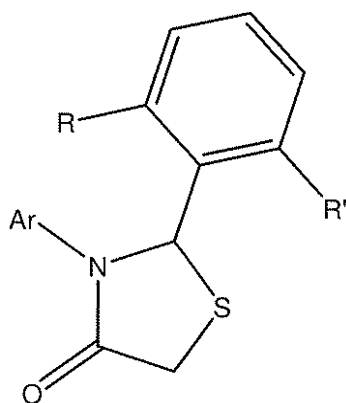


Figura 2. 2,3-diaryl-1,3-tiazolidin-4-oni,

1.2.2. Attività anticonvulsivante.

Numerosi articoli [9] riportano l'attività anticonvulsivante di 4-tiazolidinoni in cui sono state fatte sostituzioni in posizione 2, 3 e 5 dell'anello tiazolico. La maggior parte dei composti hanno mostrato una capacità di protezione contro le convulsioni indotte dal pentilentetrazolo. [10] Inoltre sono riportate sintesi, caratterizzazione e valutazione di nuovi anticonvulsivanti N,N-bis (arilidene) diidrazide (Figura 3) e bis -4-tiazolidinoni (Figura 4) derivati, che mostrano un meccanismo di protezione basato sul sequestro del pentilentetrazolo nel 90 % dei casi.

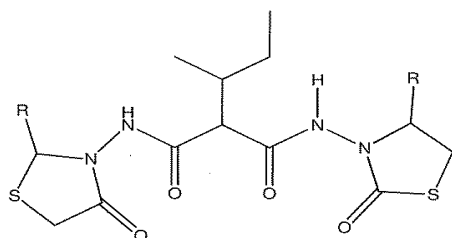


Figura 3. N,N-bis (ariliden) diidrazide

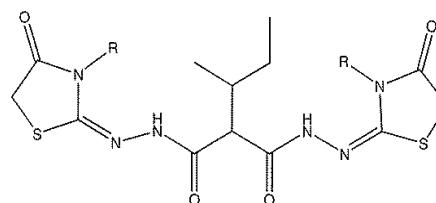


Figura 4. Bis-4-tiazolidinoni

1.2.3. Attività antimicrobica.

Il trattamento delle infezioni batteriche rimane ancora un problema importante ed impegnativo, a causa di una combinazione di fattori che includono sia l'emergere di nuove patologie infettive sia l'aumento del numero di microbi patogeni resistenti a molti farmaci. Nonostante un largo numero di antibiotici e chemioterapici disponibili, l'insorgenza di vecchie e nuove resistenze antibiotiche, sviluppatesi nell'ultima decade, ha reso necessario la progettazione di nuovi agenti antibatterici con differente modo di agire, così che non possano insorgere resistenze crociate. A tale scopo *Bhoot et al* [11] hanno sintetizzato 2-(ptolil-imino)-3-(4-tolil) -5-[5-(3,4-diclorofenil)-2-furilidene]-4-tiazolidinone (Figura 5) e suoi derivati allo scopo di saggiarli come agenti antimicrobici su numerosi ceppi batterici, come *B. mega*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. vulgaris* e funghi come *l'Aspergillus niger*. Notevole inibizione è stata osservata in composti contenenti sostituenti fenilici, 2-metossilici, 2 -metilfenilici, 3-metilfenil 4-nitrofenilici. [12] Inoltre 2-tiosso-4-tiazolidinoni e 4,4'-bis(2-tiosso-4-tiazolidinoni-3-il)

difenilsolfoni sono stati saggiati in vitro per la loro potenziale attività antibatterica ed antifungina, mostrando buona attività nei confronti sia delle specie batteriche considerate (gram positivi: *S. aureus* e *B. Cercus*, Gram negativi: *S. marcescens* e *P. Mirabilis*) che delle specie fungine (*Aspergillus* e *Penicillium*).[13]

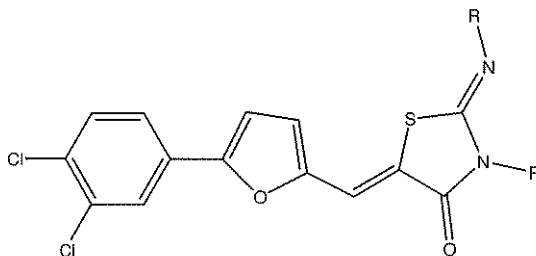


Figura 5. 2-(3,4-diclorofenil)-5-furilidene-2-tiazolidinone

Nuovi 2-tiazolidinone-5-aryliden-4-tiazolidinoni, ottenuti incorporando due noti nuclei eterociclici bioattivi, tiazolico e tiazolidinonico, hanno esibito una notevole inibizione della crescita di un'ampia varietà di batteri gram positivi e di *H. influenzae* (gram negativo), mentre non sono risultati attivi su *E. Coli* e funghi. Anche la presenza del gruppo arilidenico ha giocato un importante ruolo nell'aumentare le proprietà antimicrobiche di questa classe di composti, così come diverse sostituzioni sull'anello benzilidenico. [14]

1.2.4. Agonisti dei recettori dell'ormone follicolo stimolante (FSH).

L'ormone follicolo stimolante (FSH) è una proteina di 38 kDa che innesca la maturazione dei follicoli ovarici nelle donne e la spermatogenesi negli uomini. È rilasciato dalla ghiandola pituitaria anteriore, dopo stimolazione con l'ormone gonadotropina (GnRH), e funge da agonista naturale del recettore FSH. [15] Attraverso saggi di chimica combinatoriale utilizzando una serie nota di derivati tiazolidinonici, Yanofsky SD *et al.* hanno individuato tiazolidinoni (Figura 6), opportunamente sostituiti con gruppi alchilici in posizione 5, ad attività agonista dei recettori FSH (FSHR). In particolare, 3-((2S*, 5R*)-2-(4-benzilossi-fenil)-5-{[2-(3-etossi-4-metossifenil)-etilcarbamoil]-metil}-4-osso-tiazolidin-3-yl)-benzamide è risultato un potente attivatore dei FSHR sia umani che di ratti.

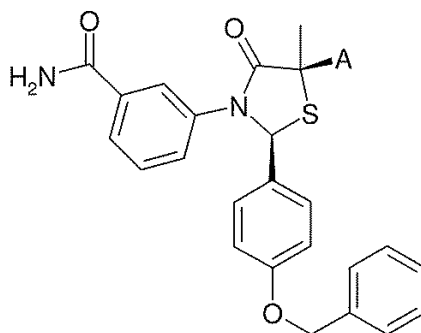


Figura 6. Derivati tiazolidinonici ad attività agonista dei recettori FSH.

1.2.5. *Attività antitumorale ed antiproliferativa.*

Secondo l'organizzazione mondiale della sanità (OMS), il cancro è un'importante patologia che colpisce più di 7 milioni di persone l'anno. Gli agenti chemioterapici utilizzati contro il cancro possono essere classificati come "ciclo-specifici" e "non ciclo-specifici". Recentemente, farmaci antitumorali con ridotta tossicità, sono stati sviluppati legandoli a piccole molecole o a residui aminoacidici. Il ruolo di coniugati peptidici in tali composti serve come substrato per enzimi che sono prodotti e secreti preferenzialmente nel tessuto tumorale. Questi remarks indicano che può essere possibile sviluppare strategie chemioterapiche altamente selettive basate sulla selettiva espressione di recettori nella vascolarizzazione tumorale

In generale un sistema di trasporto del farmaco al target tumorale è costituito da un residuo di riconoscimento del tumore ed un residuo citotossico connessi direttamente o tramite un appropriato *linker* a formare un coniugato, considerato come un pro farmaco, non tossico per via sistemica. Ciò significa che il linker deve essere stabile in circolo. Dopo l'internalizzazione nella cellula tumorale il coniugato deve essere scisso facilmente per rigenerare l'agente citotossico attivo. L'uso di composti eterociclici come *scaffolds* allo scopo di inserire sostituenti nella tasca delle proteasi rappresenta un importante strategia per la ricerca di inibitori di proteasi con migliore profilo farmacocinetico. Eterocicli contenenti amminoacidi dovrebbero facilitare l'incorporazione dello scaffold, offrendo un'ampia possibilità di variazioni, come nel caso dei composti tiazolici e tiazolidinonici, che vengono usati come sistema di trasporto del farmaco al tessuto tumorale. [16]

Vari derivati 4-tiazolidinonici sono stati sintetizzati per saggiare l'attività antiproliferativa in cinque linee cellulari umane del cancro del colon. [17].

Inoltre derivati ammidici e carbossilici di tiazolidinoni sono stati testati per le possibili proprietà antitumorali. [18]

1.2.6. Attività antinfiammatoria.

Sparatore *F* ha sintetizzato basi di Schiff e derivati 2,3 disostituiti del 1,3 tiazolidin-4-one (Figura 7) come agenti antinfiammatori; entrambi i tipi di composti hanno mostrato un buon livello di attività nei confronti dell'edema da carragenina nella zampa posteriore dei ratti, mentre solo una moderata attività è stata riscontrata in saggi *writhing* in topi. [19]

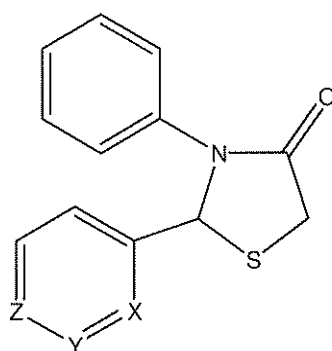


Figura 7. Derivati 2,3 disostituiti del 1,3 tiazolidin-4-one

Ottanà et al valutando 3,3'-(1,2-etanedi)-bis[2-aril-4-tiazolidinone] derivati, che hanno mostrato interessante stereo-selettiva attività antinfiammatoria/analgesica, suggerisce che essi interagiscono preferibilmente con la isoforma inducibile della COX-2. [20]

I 2-imino-4-tiazolidinoni and 5-arilidene-2-imino-4-tiazolidinoni furono testati per l'attività antinfiammatoria in vivo su un modello di infiammazione acuta quale l'edema della zampa indotto da carragenina in ratti, [21,22] mostrando buoni livelli di attività.

Inoltre, la capacità di questa nuova classe di agenti antinfiammatori di inibire l'isoforma COX, è stata saggiata in linee cellulari murine monociti/ macrofagi J774.

Geronikaki AA et al. [23] hanno mostrato l'attività antinfiammatoria di 4-tiazolidinoni usando un'analisi computazionale PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances).

1.2.7. Inibitori CFTR (Regolatore transmembrana della fibrosi cistica).

Il CFTR è un canale del cloro regolato dall'AMPc, che se mutato è in grado di produrre la fibrosi cistica (FC), malattia ereditaria. L'inibizione del CFTR rappresenta una potenziale strategia terapeutica per la diarrea secretoria. Tonghui Ma hanno dimostrato che i 4-tiazolidinoni sono dei potenziali inibitori CFTR: lo scopo dello studio era di identificare inibitori CFTR ad alta affinità per applicarli allo studio dei meccanismi della FC e al trattamento di diarree secretorie. [24] Lo screening primario di 50.000 composti diversi ha identificato un piccolo gruppo di presunti inibitori appartenenti alla classe dei 2-tiosso-4-tiazolidinoni. Questi composti sono stati correlati strutturalmente ad attivatori CFTR noti e agli inibitori CFTR difenilammina-2-carbossilato (DPC), 5-nitro-2-(3-fenilpropile-ammino) benzoato (NPPB) e glibenclamide. Gli stessi ricercatori hanno dimostrato l'attività inibitoria CFTR dei derivati tiazolidinonici utilizzando analisi computazionale, nonché i metodi convenzionali.

1.2.8. Attività Antiossidante

Tiazolil/benzotiazolil/isobenzotiazolil derivati, hanno mostrato attività antiossidanti, valutata nell'ambito dell'attività antinfiammatoria.

I composti sono stati testati per la loro capacità scavengers dei gruppi idrossilici e per la loro capacità di interagire con il radicale libero stabile DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil). [25a]

Più recentemente 5-aryliden-4-tiazolidinoni furono valutati per la loro attività antiossidante, nell'ambito del diabete mellito (DM). [25b]

1.2.9. Ipoglicemizzanti orali- glitazoni

Glitazoni (detti anche tiazolidinendioni) sono farmaci approvati per l'uso nel trattamento del diabete mellito di tipo 2, che includono ciglitazone, pioglitazone, troglitazone, rosiglitazone, rivoglitazone e balaglitazone. Nonostante la loro somiglianza chimica impressionante, questi composti hanno profili di sicurezza diversi, in modo tale che solo pioglitazone è attualmente ancora in uso clinico.

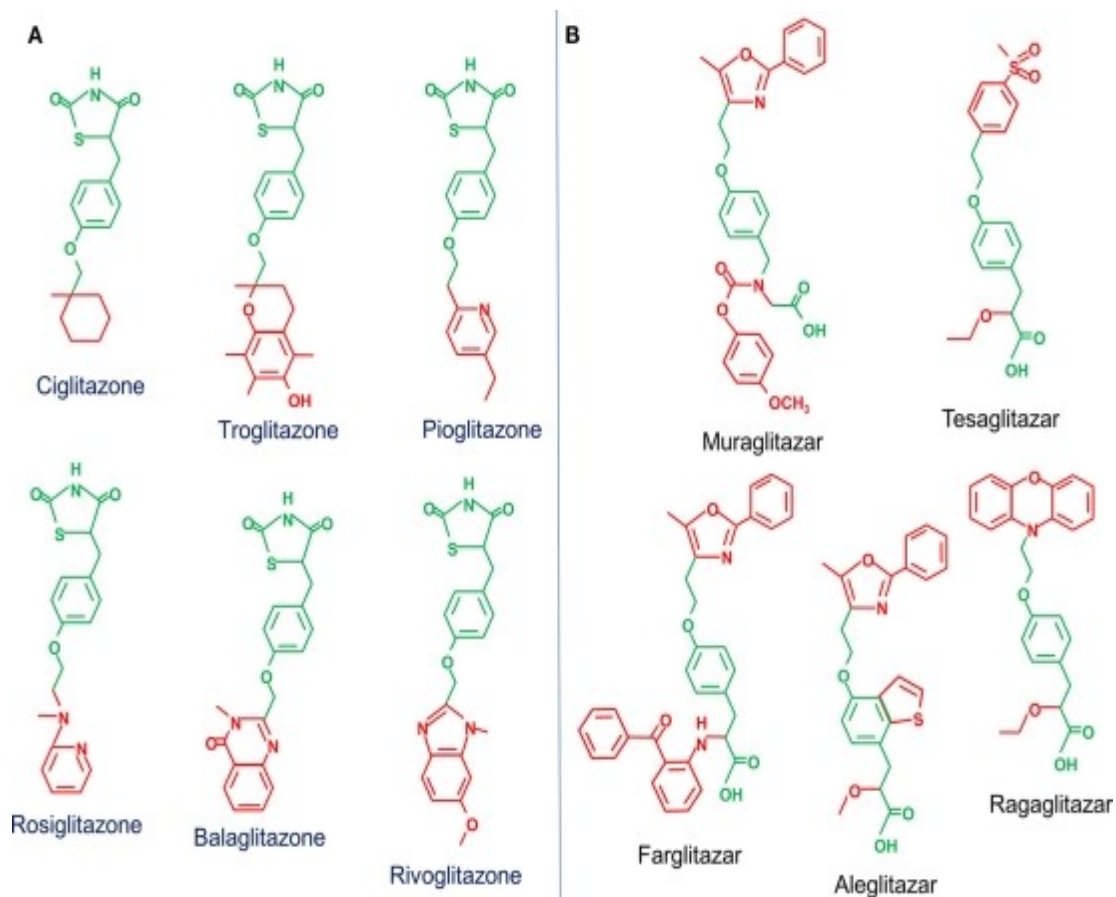


Figura 8 . Struttura chimica dei glitazoni (A) e glitazani (B).

La struttura chimica condiviso da tutti i composti della classe è indicato in verde, mentre in rosso è la parte della molecola che caratterizza i singoli composti.

Agiscono mediante l'attivazione dei recettori PPAR- γ (recettore Peroxisome proliferator-activated receptor gamma), noti proprio come recettori dei glitazoni, particolarmente numerosi nel tessuto adiposo, ma presenti anche nelle cellule β del pancreas, nell'endotelio vasale e nei macrofagi. Il recettore PPAR- γ è implicato nella regolazione della trascrizione di alcuni geni in grado di dettare una risposta ipoglicemizzante. L'azione si esplica principalmente a livello del tessuto adiposo, dove determinano riduzione del tessuto viscerale ed ectopico e aumento di quello sottocutaneo. Per effetto di meccanismi diretti e indiretti i Glitazoni aumentano la captazione di glucosio nel fegato, nel muscolo e nel tessuto adiposo, riducono la produzione epatica di glucosio e i livelli di acidi grassi liberi. Effetto dei glitazoni è quello di migliorare la sensibilità all'insulina del tessuto adiposo, del muscolo e del fegato, migliorando l'utilizzo del glucosio da parte di questi tessuti. Inoltre hanno dimostrato una significativa protezione

da eventi cardiovascolari micro- e macro-vascolari ed una stabilizzazione dell'placca aterosclerotica. [26]

1.2.10. Inibitori di metalloproteasi.

Diversi studi condotti su tiazolidinoni variamente sostituiti [27], hanno permesso di individuarli come inibitori di metalloproteasi (MMPs), per un effetto chelante lo ione Zinco contenuto nel sito attivo di tale enzima; ciò si è rivelato utile in diverse patologie quali l'Osteoartrite (OA).

1.2.11. Utilizzi vari

Oltre alle applicazioni farmacologiche i 4-tiazolidinoni sono stati utilizzati anche nella sintesi. Uno degli usi più antichi è stato nella sintesi di coloranti merocianine che estendono la sensibilità di emulsioni di alogenuri d'argento a lunghezze d'onda nella regione visibile dello spettro. Pawelczyk A e L Zaprutko hanno sintetizzato il 4-tiazolidinoni derivati con il metodo a microonde come nuove sostanze profumate ed analoghi insaturi dei gelsomini. [28]

CAPITOLO 2- I TESSUTI CONNETTIVI E LA CARTILAGINE

Il corpo umano e gli organi che lo compongono sono sostenuti e tenuti assieme da tessuti tradizionalmente denominati *connettivi*, termine che indica il loro ruolo strutturale e di sostegno. Tuttavia la funzione dei tessuti connettivi va ben oltre quella di supporto, fungendo da collegamento per gli altri tessuti, partecipando ai meccanismi di difesa dell'organismo e assicurando il nutrimento a tessuti che non sono vascolarizzati, come i tessuti epiteliali.

2.1. Classificazione dei tessuti connettivi.

Vi sono diversi tipi di tessuto connettivo, classificati in base a criteri morfologici e funzionali. Distinguiamo:

- *tessuti connettivi propriamente detti*, i più comuni, che svolgono funzioni di sostegno e protezione e costituiscono la base su cui poggiano i diversi epiteli. A questo gruppo appartengono: il tessuto mucoso, il tessuto fibrillare lasso, il tessuto fibrillare denso, il tessuto elastico e il tessuto adiposo;
- *tessuti di sostegno*, che svolgono la funzione di sostegno strutturale dell'intero organismo. Essi sono il tessuto cartilagineo e il tessuto osseo;
- *tessuti a funzione trofica*, che appunto svolgono un ruolo di supporto nutritivo e sono costituiti da due particolari e importantissimi tessuti fluidi: il sangue e la linfa. [29]

2.2. Componenti dei tessuti connettivi.

Tutti i tessuti connettivi sono formati da due componenti: una *popolazione cellulare* e una *matrice extracellulare*, costituita da una componente amorfa o sostanza fondamentale, e da una componente fibrosa.

Le proporzioni relative di ciascuna di queste due componenti variano in funzione del tipo di tessuto connettivo.

La componente cellulare è piuttosto eterogenea, comprendendo cellule deputate a svolgere attività diverse in relazione alla natura del tessuto a cui appartengono e alla posizione che questo assume nell'organismo. In generale, è possibile operare una distinzione tra cellule deputate alla formazione e al mantenimento della matrice (per es. fibroblasti, condroblasti, osteoblasti), cellule deputate alla difesa dell'organismo (macrofagi, mastociti, leucociti) e cellule

deputate a funzioni speciali, come gli adipociti del tessuto adiposo, che accumulano grassi come riserva energetica del corpo. È possibile anche distinguerle in cellule fisse (macrofagi fissi, fibroblasti, adipociti), che svolgono tutta la loro vita nel tessuto connettivo, e cellule migranti (granulociti neutrofili, linfociti, macrofagi) che invece raggiungono il tessuto connettivo dalla circolazione sanguigna. [30]

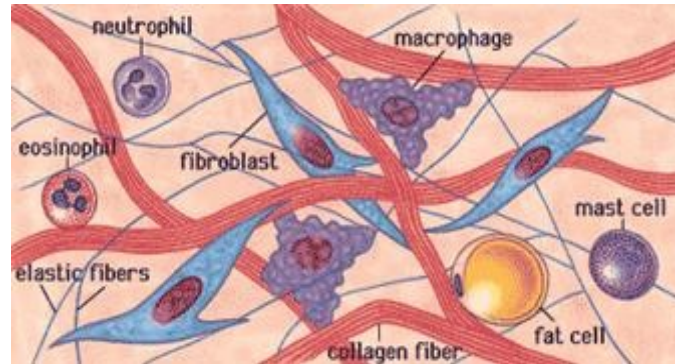


Figura 9. Componenti dei tessuti connettivi.

2.3. La matrice extracellulare ECM).

La matrice extracellulare (ECM) è una rete organizzata di materiali extracellulari presente nelle vicinanze della membrana plasmatica, che può giocare un ruolo chiave nel determinare la forma e le attività di una cellula. I suoi componenti vengono rinnovati continuamente, con un ritmo che rallenta con l'avanzare dell'età. Essa è costituita da una componente amorfa o sostanza fondamentale e da una componente fibrosa.

2.3.1. Sostanza fondamentale

La sostanza fondamentale o amorfa può essere definita come un sistema colloidale multifasico, di consistenza gelatinosa, formato da una fase disperdente acquosa, in cui sono disciolti elettroliti, e da una fase dispersa.

I costituenti chimici più importanti appartengono ad una classe eterogenea di sostanze denominate *glicosaminoglicani (GAGs)* che, legandosi a proteine, formano grossi complessi detti *proteoglicani (PGs)*. La sostanza amorfa contiene anche, in concentrazioni minori, *glicoproteine (GP)*. Infine, è costituita da acqua, sali inorganici, enzimi, ormoni, vitamine e quantità variabili di tropocollagene libero.

I GAGs sono lunghe catene polimeriche formate da unità disaccaridiche unite linearmente tra loro da legami O-glicosidici (Figura 10). In genere, le unità disaccaridiche sono formate da un acido uronico (D-glucuronato, L-iduronato) legato agli amino-zuccheri glucosamina o galattosamina che possono essere acetilati (N-acetil-glucosamina e N-acetil-galattosamina) o solforati (N-solfato-glucosamina e N-solfato-galattosamina). I GAGs possono essere solforati (cheteran-solfato -KS-, condroitin-solfato -CS-, eparan-solfato -ES-, dermatan-solfato -DS-, eparina) oppure non solforati (acido ialuronico -IA-). Il GAG più importante è l'acido ialuronico, che costituisce anche la catena centrale degli aggregati proteoglicanici.

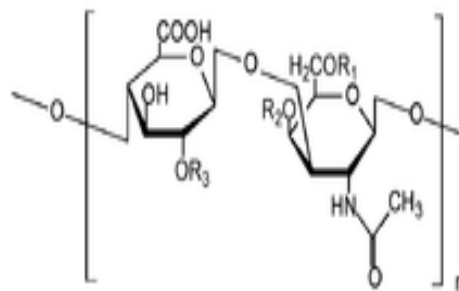


Figura 10. Unità disaccaridica dei GAGs.

I GAGs in soluzione e nei tessuti sono ionizzati e possono quindi essere considerati come elettroliti polianionici; come tali possono legare cationi inorganici ed organici nonché proteine. La natura delle molecole legate ai GAGs influenza notevolmente la conformazione della catena che è molto flessibile e può passare dalla forma distesa a quella strettamente attorcigliata, con conseguente mutamento della viscosità della soluzione.

I PGs sono costituiti da numerosi GAGs che si inseriscono su un asse proteico principale che funge da catena centrale; è in questo stato che si trova la maggior parte dei GAGs della matrice. Poiché i GAGs contengono numerosi gruppi alcolici e gruppi acidi, i PGs sono molto solubili e ciò garantisce alla sostanza fondamentale caratteristiche di plasticità e resistenza alla compressione. Il peso molecolare di un PG varia da 1 a 10 milioni di dalton, di cui l'80-95% è dato da GAGs e il 5-20% da proteine. I PGs possono inoltre unirsi intorno ad una molecola di acido ialuronico centrale, formando delle strutture di ordine superiore definite *aggreca* (Figura 11), con peso di decine milioni di dalton. Questa complessa struttura forma una sorta di rete tridimensionale, la quale funge da

filtro molecolare che permette la diffusione di alcune sostanze di basso peso molecolare, e ne impedisce quella di altre più voluminose. [31]

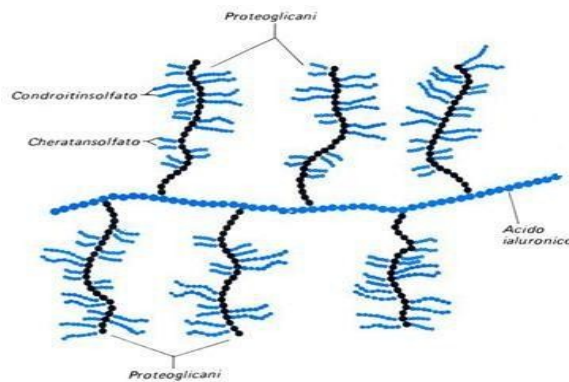


Figura 11. Struttura di un aggregano.

Le GP sono macromolecole contenenti, oltre a proteine, carboidrati rappresentati da acido sialico, glucosio, mannosio, galattosio, fucosio ed esosamine. Esse si distinguono dai PGs per la prevalenza della componente proteica (60-90%) su quella glucidica (10-40%). Le GP sono costituite da brevi catene oligosaccaridiche legate con legame O-glicosidico ad un'unica catena polipeptidica, di solito in corrispondenza dei residui di serina o di treonina o con legame N-glicosidico all'asparagina. Fra le GP ricordiamo:

- la *fibronectina*, costituita da due subunità legate da un ponte disolfuro. Il suo ruolo si pensa sia quello di glicoproteina adesiva: infatti la particolare composizione aminoacidica permette loro di legare sia proteine della membrana plasmatica di cellule connettivali, dove si lega ad uno specifico recettore (integrina), sia componenti della matrice extracellulare come fibre collagene, eparina, eparansolfato.

- la *laminina*, costituita da tre subunità legate da ponti disolfuro a formare una struttura quaternaria a forma di croce latina. Si trova nella lamina lucida della membrana basale e interagisce sia con le cellule sia con il collagene di tipo IV e con l'eparansolfato. L'interazione laminina-collagene tipo IV sarebbe responsabile dell'organizzazione strutturale della membrana basale e della giunzione tra epitelio e connettivo. [32]

2.3.2. Componente fibrosa

Immerse nella sostanza fondamentale, le fibre connettivali conferiscono stabilità alla struttura della ECM. In base alla composizione e alla struttura distinguiamo: *fibre collagene, fibre reticolari e fibre elastiche*.

Le fibre collagene sono le più numerose ed appaiono come lunghe fibre bianche ondulate, che hanno uno spessore variabile da 1 a 12 μm . Ogni fibra è formata da fibrille, a loro volta costituite da microfibrille. Ciascuna microfibrilla è costituita da molecole di tropocollagene, unità formate da tre catene polipeptidiche ricche in glicina, prolina, idrossiprolina e idrossilisina. Le fibre collagene sono molto resistenti alla trazione, flessibili, ma non estensibili. Sono sintetizzate principalmente da fibroblasti, condroblasti e osteoblasti, ma possono essere prodotte anche dalle cellule epiteliali. Esistono diversi tipi di fibre collagene, che differiscono per la composizione aminoacidica delle catene polipeptidiche e per il numero delle catene oligosaccaridiche. Le più comuni sono le fibre di tipo I, presenti nelle ossa, nei legamenti, nei tendini e nelle capsule articolari; le fibre di tipo II sono presenti nella cartilagine e nell'umor vitreo; le fibre di tipo III sono diffuse nel derma, nei muscoli e nella parete dei vasi sanguigni. Nelle membrane basali degli epitelii, dei capillari sanguigni e linfatici si trovano fibre di tipo IV, mentre fibre di tipo V sono presenti nel derma, tra le cellule muscolari lisce e nelle ossa.

Le fibre elastiche hanno uno spessore variabile da 0,2 a 1 μm . Strutturalmente sono formate da una matrice amorfa centrale, costituita da elastina, una glicoproteina, circondata da microfibrille di fibrillina, organizzate in una disposizione altamente ordinata. A differenza delle fibre collagene, le fibre elastiche sono molto estensibili e al cessare della trazione riacquistano le dimensioni originarie. Possono fondersi tra loro per formare lamine o membrane elastiche, presenti nei vasi sanguigni, oppure possono disporsi in fasci ramificati, come nel derma, responsabili dell'elasticità della cute. Sono meno numerose delle fibre collagene in tutti i tipi di tessuto connettivo, fatta eccezione per il tessuto connettivo denso elastico.

Le fibre reticolari sono formate da collagene di tipo III e danno vita ad una struttura tridimensionale ad ampie maglie in molti organi, quali fegato, milza e nelle pareti dei vasi sanguigni. [33]

2.4. Il tessuto cartilagineo.

Questa tipologia di tessuto connettivo specializzato ha funzioni di sostegno e le sue principali caratteristiche sono: solidità, flessibilità e una limitata deformabilità. Il tessuto cartilagineo costituisce l'abbozzo dello scheletro nella vita embrionale, sostituito durante lo sviluppo pre- e post-natale dal tessuto osseo, connettivo più robusto e resistente. Nell'adulto il tessuto cartilagineo permane sulle superfici articolari, nei dischi intervertebrali, nel padiglione auricolare, partecipa alla formazione della trachea e dei bronchi e di altre strutture corporee. Non contiene vasi sanguigni o linfatici e neppure fibre nervose; per questo motivo non ha capacità rigenerativa. Come tutti i tessuti connettivi è costituito da una matrice extracellulare, particolarmente compatta e consistente, e dai *condrociti*, che costituiscono la componente cellulare.

2.4.1. Tipi di tessuto cartilagineo

In base alla quantità e alla costituzione della matrice extracellulare distinguiamo tre tipi di tessuto cartilagineo: *ialino*, *elastico*, *fibroso*.

La cartilagine ialina è la varietà più abbondante nell'adulto. Appare come una sostanza bianca molto viscosa, traslucida ed opalescente. Il 65% del suo peso totale è costituito da acqua, fondamentale dal momento che, non essendo vascolarizzata, le sue cellule possono nutrirsi solo tramite processi di diffusione; le restanti componenti sono collagene di tipo II (15%), PGs (15%), condrociti (5%). Questo tipo di cartilagine costituisce le cartilagini costali, le lamine di accrescimento delle ossa lunghe (metafisi), lo scheletro delle vie respiratorie e riveste le superfici articolari. La cartilagine ialina, a esclusione di quella articolare, è avvolta dal *pericondrio*, uno strato di tessuto connettivo denso altamente vascolarizzato. La cartilagine elastica si presenta di colore giallastro, a causa dell'elevata presenza di fibre elastiche (dette anche fibre gialle), che la rendono assai flessibile. Possiede il pericondrio e costituisce lo scheletro del padiglione auricolare, le tube uditive e l'epiglottide, una cartilagine della laringe.

La cartilagine fibrosa presenta spessi fasci di fibre collagene di tipo I in cui sono sparsi pochi condrociti appiattiti. Non presenta pericondrio, in quanto si trova in continuità con cartilagine ialina o tessuto connettivo denso, da cui trae nutrimento per diffusione. Costituisce l'anello fibroso dei dischi intervertebrali ed

è presente nelle sinfisi, nelle zone di inserzione tra tendini e osso e nei menischi.
[34]

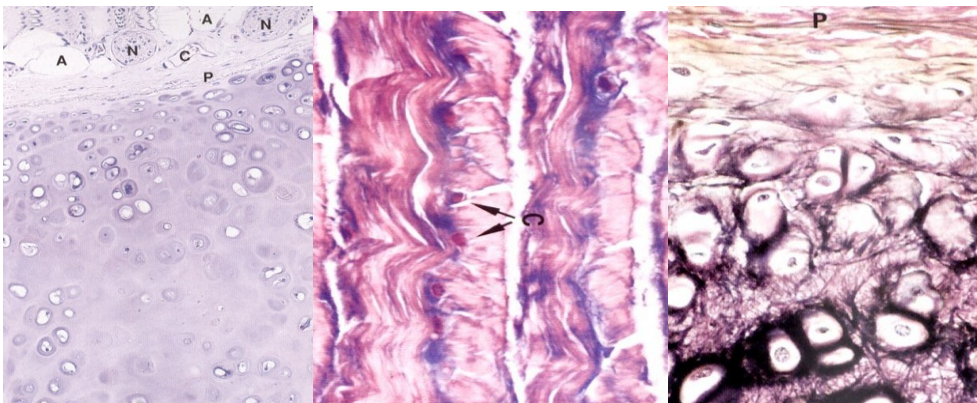


Figura 12. Da sinistra verso destra: cartilagine ialina, cartilagine fibrosa, cartilagine elastica.

2.4.2. ECM della cartilagine

La matrice extracellulare della cartilagine si presenta come un gel compatto, costituito da fibre collagene immerse in una sostanza amorfa fortemente idratata e ricca di GAGs, PGs e GP (Figura 13).

Le fibre collagene sono costituite da collagene di tipo II, che ha la caratteristica di avere tre catene polipeptidiche strutturalmente identiche (catene α_1) e formare fibrille di piccole dimensioni, organizzate in un delicato reticolo. La componente fibrosa conferisce alla cartilagine la forza tensile.

Nella sostanza amorfa predominano i condroitin solfati e, in minor misura, i cheratan solfati tra i GAGs; questi si legano ad una molecola di acido ialuronico per formare gli aggreganti, come descritto precedentemente.

Queste strutture voluminose sono responsabili dell'elevato grado di idratazione della cartilagine, che da un lato assicura la nutrizione del tessuto, dall'altro conferisce resistenza ed elasticità. Tra le glicoproteine presenti nella sostanza amorfa ricordiamo la condronectina, capace di legare i condrociti al collagene. La distribuzione delle fibre e della sostanza amorfa differisce da zona a zona per cui nella cartilagine si distinguono:

- una matrice territoriale, più vicina ai condrociti e con maggiore sostanza amorfa rispetto alle fibre collagene. Al microscopio elettronico è possibile individuare nella matrice dei granuli del diametro di 10-40 nm, detti granuli della matrice e costituiti da aggregati proteoglicanici.

- una matrice interterritoriale, più distanziata dalle cellule e più ricca di fibre collagene. Normalmente le fibre collagene non sono distinguibili al microscopio ottico nei preparati di cartilagine, ma devono essere evidenziate con speciali colorazioni e trattamenti oppure esaminate al microscopio elettronico. [35].

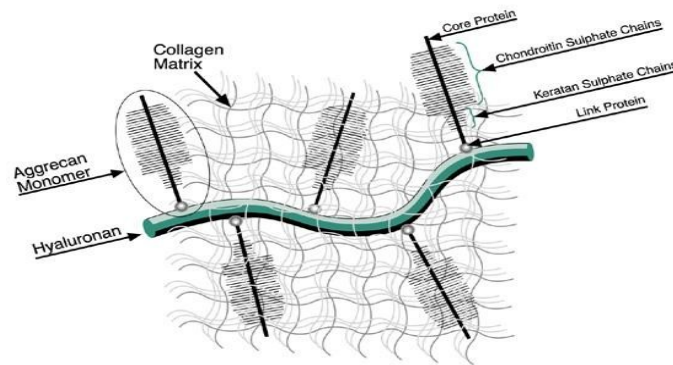


Figura 13. Struttura della matrice extracellulare cartilaginea.

2.4.3. Condrociti

I condrociti sono le unità cellulari funzionali del tessuto cartilagineo. Sono accolti in spazi scavati nella matrice extracellulare denominati *lacune*. Le lacune possono contenere uno solo o più condrociti. Nella parte centrale della cartilagine le cellule sono distribuite in gruppi, detti *gruppi isogeni*, ed hanno una forma sferica.

Man mano che ci si sposta verso la parte periferica assumono una forma più schiacciata, ovoidale, e perdono la loro distribuzione in gruppi. I condrociti contengono un nucleo voluminoso, numerosi mitocondri, elementi di reticolo endoplasmatico rugoso, ribosomi liberi, deputati alla sintesi delle fibrille di collagene, e un esteso complesso di Golgi; sono presenti anche quantità variabili di particelle di glicogeno.

Nel complesso di Golgi sono sintetizzati i carboidrati e vengono solforati i GAGs, che vanno a costituire la sostanza amorfa. I condrociti più maturi diventano quiescenti e presentano meno organuli, ma possono riprendere l'attività di sintesi quando necessario. Dopo essere stati avvolti dalla matrice da essi stessi sintetizzata, i condrociti continuano per tutto il periodo di accrescimento della cartilagine ad elaborare sostanza cartilaginea, sintetizzando e versando nella

matrice i costituenti della ECM (PGs, glicoproteine e collagene) e a dividersi (per accrescimento interstiziale, come descritto di seguito).

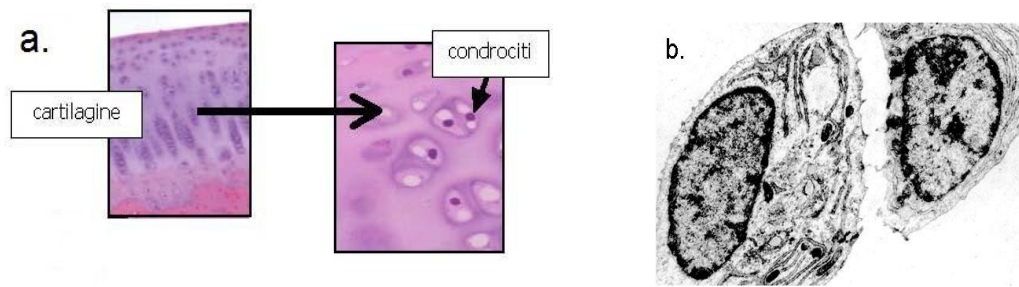


Figura 14. a. Gruppi isogeni di condrociti. b. Condrociti osservati al microscopio elettronico.

2.4.4. Istogenesi e accrescimento del tessuto cartilagineo

Durante lo sviluppo embrionale le cellule mesenchimali formano dei centri di condificazione o precartilaginei, nei quali esse assumono una forma similepiteliale; ciò è possibile perché le cellule mesenchimali retraggono i prolungamenti e si dispongono a mutuo contatto tra di loro; successivamente vanno incontro a divisione cellulare e le cellule figlie cominciano a produrre i costituenti della cartilagine (fibre e matrice amorfa). A seguito di ciò le cellule si allontanano espandendosi a macchia d'olio. Questo tipo di accrescimento, in cui la matrice cartilaginea si espande dall'interno, è detto interstiziale. Nel frattempo la matrice diventa sempre più densa e così le nuove cellule che si originano per successive divisioni non possono più allontanarsi e rimangono nelle lacune a formare i gruppi isogeni. Un altro meccanismo di accrescimento è detto apposizionale e consiste nel fatto che nuove cellule cartilaginee si formano dallo strato interno del pericondrio per divisione delle cellule condrogeniche; queste cellule si appongono al modello cartilagineo dall'esterno e una volta entrate a farne parte producono a loro volta i costituenti della matrice, che quindi vengono depositati sulla superficie della cartilagine. [36]

2.5. Cartilagine articolare

La cartilagine articolare, di tipo ialino, è suddivisibile in quattro regioni o zone:

- **zona superficiale**, la più sottile (circa 40 μm di spessore), è composta da due strati: quello più superficiale, chiamato anche "*lamina splendens*",

consiste di sottili fibrille di collagene disposte in modo parallelo con una bassa concentrazione di aggregati. Al di sotto vi sono condrociti ellissoidali, allineati parallelamente alla superficie. La percentuale di acqua in questa zona è elevata, conferendo forza tensile allo strato. È stato dimostrato che le alterazioni in questa zona possono contribuire allo sviluppo di osteoartrosi attraverso un mutamento del comportamento meccanico del tessuto. Inoltre, la rottura di questa zona potrebbe rilasciare molecole cartilaginee nel liquido sinoviale, e ciò può stimolare una risposta immunitaria o infiammatoria;

- zona di transizione, con fasci di fibrille più spesse, orientati in un intreccio apparentemente amorfo. Ha uno spessore di circa 250 µm e i condrociti di questa zona, rispetto a quelli della zona superficiale, hanno forma rotondeggiante e sono metabolicamente più attivi ;

- zona profonda o radiale, in cui i fasci di collagene, di maggior spessore, sono organizzati in modo perpendicolare rispetto alla superficie e si prolungano attraverso la zona sottostante fino all'osso subcondrale, garantendo l'ancoraggio della struttura. Questo strato presenta un minor contenuto di acqua e una maggior attività metabolica delle cellule, impilate in gruppi di 4-8 a formare colonne perpendicolari alla superficie. Al confine tra questa zona e la successiva zona calcificata è presente una sottile linea di demarcazione che prende il nome di "*tidemark*";

- zona calcificata, immediatamente sopra l'osso subcondrale, che funge da importante tampone meccanico tra la cartilagine articolare non calcificata e l'osso. Ha uno spessore di circa 1 mm e rappresenta una zona di transizione tra due componenti differenti dal punto di vista morfologico, biochimico e cellulare. In tale regione i condrociti, scarsi e di dimensioni maggiori, vengono definiti ipertrofici e sono circondati da una matrice extracellulare simil-ossea.

[37]

Dalla zona superficiale a quella più profonda, la densità cellulare e la quantità di collagene diminuiscono progressivamente, mentre il volume cellulare e la quantità di proteoglicani aumentano.

Nella matrice della cartilagine articolare matura le fibre di collagene di tipo II costituiscono il 50% del peso secco e con la loro configurazione a tripla elica forniscono al tessuto la forza di tensione e l'integrità meccanica

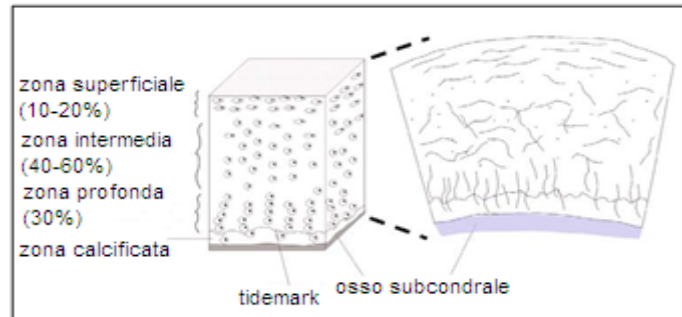


Figura 15. Zone della cartilagine articolare.

I PGs costituiscono il 12% del peso totale della cartilagine articolare e sono le macromolecole più importanti che occupano gli interstizi all'interno delle fibrille di collagene. I GAGs contengono gruppi carbossilici e/o gruppi solfato (cheratansolfato e condroitinsolfato). La carica negativa dei GAGs è in gran parte responsabile dell'elevata affinità per l'acqua manifestata dal tessuto, caratteristica che lo aiuta a resistere al carico di compressione. Inoltre, le adiacenti ramificazioni di aggreganti, con carica negativa, si respingono a vicenda, ciò consente loro di occupare lo spazio più ampio possibile. Queste, a loro volta, intrappolano i PGs all'interno della struttura retiforme del collagene e contribuiscono alla rigidità e alla forza.

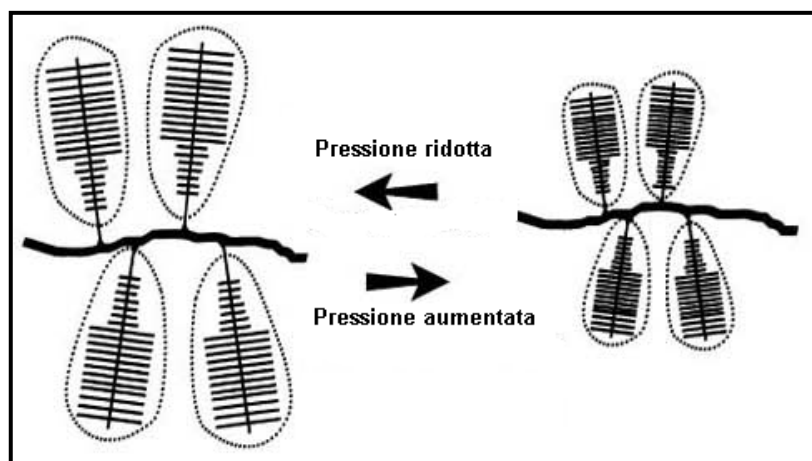


Figura 16. La pressione derivante dal carico sulla cartilagine porta a una compressione delle molecole dei proteoglicani, che offre una maggiore resistenza al carico, rispetto alla molecola normalmente estesa.

L'acqua costituisce dal 65 all'80% del peso totale della cartilagine articolare, a seconda dello stato di carico e della presenza o assenza di cambiamenti degenerativi. Grazie alla sua forte affinità con i PGs, a carica negativa, aiuta a sopportare carichi di compressione molto alti quando viene spostata. Questa resistenza al carico dipende dalla pressurizzazione dell'acqua, e sono le dimensioni del poro della matrice, determinate dalla concentrazione dei PGs, a stabilire la permeabilità del tessuto e la sua resistenza di attrito al flusso. L'acqua contribuisce inoltre alla lubrificazione dell'articolazione e al trasporto delle sostanze nutrienti. I condrociti occupano circa il 2% del volume totale della cartilagine articolare normale nell'adulto. Il loro metabolismo è influenzato da fattori del loro ambiente chimico e meccanico, come i mediatori solubili (fattori di crescita e interleuchina), la composizione della matrice, i carichi meccanici, le pressioni idrostatiche e i campi elettrici. A causa dell'ambiente in cui vivono, dotato di una concentrazione di ossigeno relativamente bassa, i condrociti hanno un metabolismo essenzialmente anaerobico. Poiché i condrociti sintetizzano tutte le macromolecole della matrice extracellulare e gli enzimi degradativi nella cartilagine articolare normale, essi sono importanti nel guidare il rimodellamento e la rigenerazione della cartilagine. L'assenza di cellule pluripotenti, con la loro capacità di migrare, di proliferare e di partecipare a una risposta di riparazione, all'interno della cartilagine matura, limita il potenziale di guarigione del tessuto. Inoltre, i condrociti maturi hanno solo una capacità limitata di incrementare la sintesi delle componenti della matrice circostante, per riparare i difetti del tessuto. Vi è una senescenza cellulare programmata, tale che la capacità di sintetizzare alcuni tipi di PGs e di incrementare la divisione cellulare in risposta agli stimoli decresce con l'età. [38]

CAPITOLO 3- OSTEOARTRITE

3.1 Definizione e generalità

L'osteoartrite (OA) è il tipo più comune di malattia articolare che fa parte delle patologie muscolo-scheletriche caratterizzate da dolore, eritema, gonfiore, versamento peri- ed intra-articolare, impaccio motorio e compromissione funzionale a livello articolare. [40] Essa infatti è caratterizzata da un'alterazione strutturale della sostanza fondamentale della cartilagine articolare, determinandone l'usura e lo sfibrillamento e riducendone la capacità di assorbire le sollecitazioni meccaniche durante il carico e il movimento; in seguito a ciò l'osso sottostante, pur reagendo con un aumento dell'osteogenesi, finisce per subire deformazioni [20]. Nella forma a lenta evoluzione può essere considerata una condizione parafisiologica di usura dell'articolazione, espressione dell'invecchiamento, mentre nella forma a rapida evoluzione rappresenta una vera e propria malattia.

L'OA presenta aspetti prevalentemente degenerativi, ma anche segni più o meno intensi di flogosi. La sede preferenziale del processo degenerativo è la cartilagine ialina, ma il danno può estendersi all'osso subcondrale, alla membrana sinoviale, alla capsula, ai tessuti ed ai muscoli periarticolari.

3.2 Epidemiologia

L'OA colpisce tutti i vertebrati ed è stata osservata non solo in animali terrestri, ma anche in animali acquatici e volatili. Nell'uomo la frequenza della malattia è molto elevata, in particolare nella popolazione di età media e senile. Segni radiologici di OA si possono riscontrare in oltre l'80% delle persone tra i 50 e i 65 anni, anche se la sintomatologia nella stessa fascia di età è presente nel 20% circa delle donne e nel 15% degli uomini. [41].

In Italia la patologia colpisce circa 4 milioni di persone e rappresenta uno dei motivi più frequenti di ricorso a visita medica negli ambulatori di medicina generale.

3.3 Eziopatogenesi ed evoluzione dell'OA

L'OA è il risultato finale non specifico di processi patologici e di diversi fattori, genetici o acquisiti, che determinano un'alterazione dell'equilibrio articolare. Tale equilibrio può essere mantenuto se un carico normale viene esercitato su una cartilagine normale. Quindi tutti i fattori capaci di modificare questo equilibrio, agendo sul carico o modificando le caratteristiche della cartilagine, possono essere considerati fattori di rischio dell'OA.

La malattia può sorgere in qualsiasi diartrosi del corpo, anche se è molto comune nelle mani, nelle anche, nelle ginocchia e nella spina dorsale; solitamente interessa contemporaneamente più articolazioni, sebbene esistano casi in cui si focalizza in una singola sede. Abituamente si distingue una forma primaria (o idiopatica) di OA legata ad un'alterazione metabolica primitiva della cartilagine articolare, apparentemente non correlabile a nessun fattore eziologico ben preciso, e una forma secondaria in cui un evento o una malattia noti sono responsabili del processo degenerativo articolare. Bisogna comunque tener conto che spesso è difficile definire il carattere primario o secondario dell'OA. Alcuni studi sull'artrosi dell'anca, per esempio, hanno dimostrato che molte forme considerate primarie sono in realtà secondarie ad anomalie anatomiche, causa di una precoce sofferenza del tessuto cartilagineo. Indipendentemente dalla forma di OA, il *primum movens* della patologia è individuabile in una sofferenza del condrocita che, a livello tissutale, concretizza uno squilibrio tra fattori condrolesivi e condroprotettivi; i primi hanno il sopravvento sui secondi, determinando un avanzamento graduale della patologia.

Gli esordi sono sempre silenziosi ma progressivi ed inarrestabili: la fase iniziale dell'OA è asintomatica poiché la cartilagine articolare manca di innervazione, il dolore compare solo quando la lesione si estende ai tessuti circostanti; successivamente dolore e gonfiore insorgono durante e dopo l'attività sportiva o al termine di una giornata lavorativa intensa; ciò può regredire con un'appropriata cura farmacologica e con un breve periodo di riposo. Nella fase seguente la mattina appena alzati o dopo una giornata di riposo, l'articolazione appare rigida, ma si sblocca nel giro di trenta minuti; si percepiscono scricchioli articolari (crepitus) mentre si compiono determinati movimenti; sintomi specifici compaiono quando l'OA colpisce il collo, o meglio le vertebre cervicali: vertigini, formicolii, cefalee ed un dolore che si irradia lungo il braccio.

Tutte queste condizioni sono giustificate dal fatto che la cartilagine perde la sua caratteristica levigatezza superficiale, si usura, diventa ruvida e totalmente incapace di assorbire e prevenire il trasferimento dello stress meccanico da compressione all'osso sub-cordale. Numerosi studi hanno dimostrato che l'usura è la conseguenza della degradazione di molteplici target molecolari costituenti l'ECM, tra i quali i più colpiti sono il collagene di tipo II e l'aggelano. [42]

3.3.1. Fattori di rischio

Come per altre patologie, si assiste ad una combinazione fra la predisposizione genetica dell'individuo e l'influenza di fattori ambientali nell'insorgenza e nell'aggravamento della patologia.

Tra i principali fattori di rischio ricordiamo:

- *fattori genetici*: alcune forme di OA presentano una familiarità particolarmente elevata, come l'OA delle interfalangee distali delle mani, per la quale è stata ipotizzata la dipendenza da un singolo gene, dominante nel sesso femminile e recessivo in quello maschile; negli altri casi l'ereditarietà sarebbe poligenica e di tipo recessivo. Sono geneticamente dipendenti altre condizioni morbose quali displasie scheletriche, lussazione congenita dell'anca, malattie metaboliche, che favoriscono l'insorgenza di artrosi secondaria.
- *soprappeso e obesità*: certamente tra i maggiori fattori di rischio in quanto determinano un aumento del carico che le articolazioni portanti (anca, ginocchio e colonna lombare) devono sopportare.
- *fattori ormonali e fattori metabolici*: la mancanza dell'effetto protettivo degli estrogeni è probabilmente la causa della maggior frequenza di OA nelle donne in menopausa. Alcune malattie endocrine come l'ipotiroidismo possono determinare una modifica strutturale della cartilagine favorendone la degradazione. Anche il diabete e l'iperlipidemia possono interferire con il metabolismo del tessuto cartilagineo e favorire l'insorgenza della patologia.
- *età*: sebbene l'incidenza della patologia aumenti in relazione all'età, l'invecchiamento, di per sé, non è causa di OA, essendo ben diverse le alterazioni della composizione della cartilagine articolare nell'anziano e nel malato. Tuttavia l'età favorisce l'assommarsi di fattori quali usura, microtraumi, alterazioni metaboliche, che facilitano o accelerano la comparsa

della malattia, e resta il fattore di rischio principale nonostante non si conosca il vero meccanismo per il quale questa correlazione si verifichi.

Inoltre esistono altre condizioni che possono favorire o aggravare la patologia come l'assunzione di posizioni errate e prolungate, l'uso intenso di determinate articolazioni in certe professioni o attività sportive, traumi che compromettono la geometria dell'articolazione (Figura 17). [41-42]

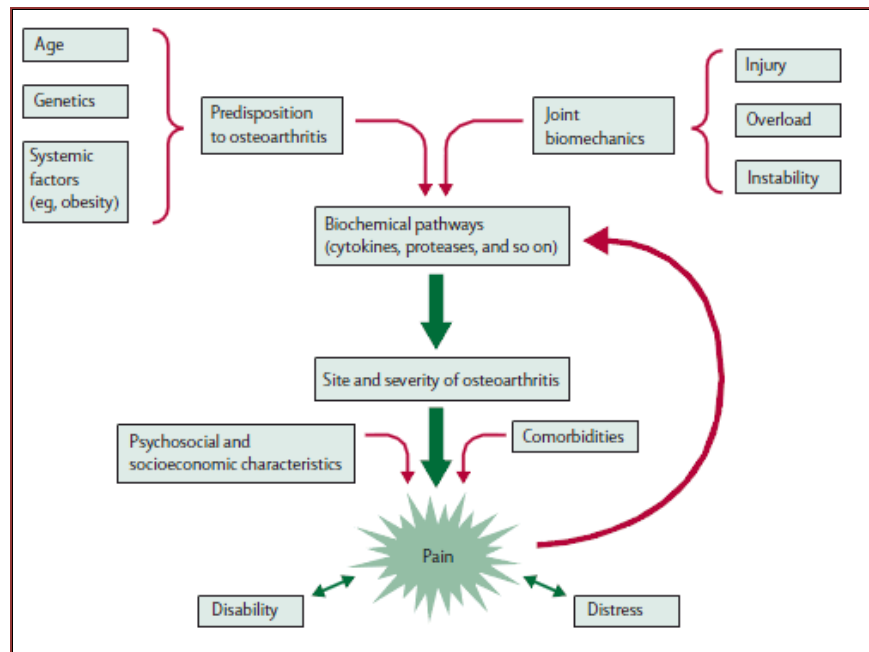


Figura 17. Fattori ambientali ed endogeni per il rischio di OA e loro conseguenze

3.3.2. Patogenesi

Nelle fasi iniziali dell'OA il ruolo principale nella degradazione della cartilagine è svolto dalle cellule che compongono lo stesso tessuto cartilagineo: i condrociti.

In essi si viene a creare uno squilibrio tra attività anabolica e catabolica con prevalenza di questa ultima che porta a depauperamento delle sostanze costitutive della cartilagine, in particolare i GAGs.

I GAGs sono complessati attorno a un core proteico in una fitta rete di catene laterali e nella cartilagine artrosica le catene laterali sono abnormemente corte. Facendo un confronto con la cartilagine di un anziano si può notare che in questa ultima si ha semplicemente un'alterazione qualitativa della composizione dei GAGs, e non quantitativa come nell'OA, con prevalenza dei cheratan solfati sui condroitin solfati. [43]

Un importante evento che causa la degradazione della cartilagine è l'intervento di un insieme di mediatori biochimici ad azione condrolesiva (vedi capitolo 4):

- MMPs, enzimi normalmente coinvolti nella formazione, nel rimodellamento e nella riparazione dei tessuti connettivi, la cui espressione ed attività aumenta in corso di OA, probabilmente in seguito a stimoli meccanici;
- Attivatori del plasminogeno (t-PA, u-PA);
- Catepsine B e D;
- Arilsolfatasi;
- Prostaglandine E₂ (PGE₂);
- Specie reattive dell'ossigeno (ROS);
- Sostanza P;
- Interleuchine (IL-1, IL-6, IL17);
- Tumor Necrosis Factor α (TNF- α).

Tali mediatori non solo sono capaci di minare l'integrità cartilaginea, ma riescono a perpetuare il danno, creando un circolo vizioso.

Le lente lesioni determinano l'induzione di una reazione flogistica sinoviale (sinovite) con ulteriore rilascio di una varietà di enzimi con conseguente degenerazione della cartilagine e delle cellule sinoviali.

La distruzione delle pareti cellulari libera acido arachidonico che può essere degradato, enzimaticamente, in leucotrieni o prostaglandine che causano i segni clinici dell'OA, cioè articolazioni dolenti, calde e gonfie. Il versamento è essudativo con meno mucina e più essudato plasmatico che, come conseguenza, determina una cattiva lubrificazione e nutrizione della cartilagine provocandone un ulteriore danneggiamento (Figura 18). [44]

Piccoli frammenti di cartilagine si staccano e contribuiscono ad accentuare il danno articolare, comportando una perdita delle proprietà meccaniche della cartilagine, in particolare si riduce l'azione ammortizzante delle sollecitazioni meccaniche sull'osso subcondrale.

Quest'ultimo reagisce con un processo di condensazione, nel tentativo di aumentare la sua resistenza, ma a scapito della sua elasticità. Per compensare il maggior carico a cui è sottoposto, l'osso subcondrale cerca di estendere la sua superficie producendo i cosiddetti osteofiti, escrescenze ai margini dell'articolazione che rappresentano un segno caratteristico dell'OA.

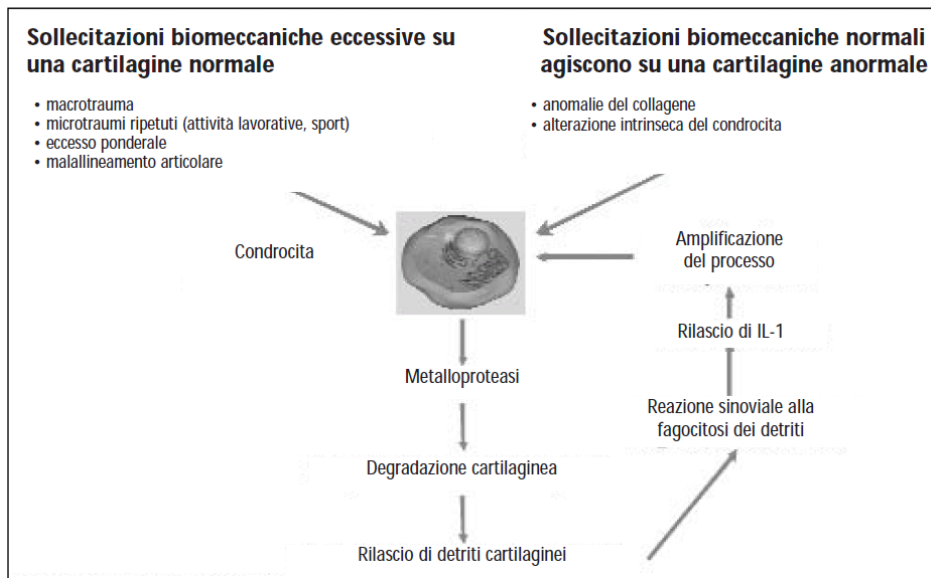


Figura 18. Patogenesi e perpetuazione del processo dell'OA

Gli osteofiti sono generalmente dolorosi, soprattutto quando le protuberanze presenti sui due capi ossei vengono in contatto tra loro o quando comprimono nervi e vasi sanguigni. Si possono verificare anche microfratture che in alcuni casi portano alla formazione di piccole cavità subcondrali chiamate geodi (Figura 19).

L'ultimo stadio dell'OA è rappresentato dalla completa scomparsa della cartilagine, che si accompagna a deformità e rigidità articolare, eventualmente associate a gonfiore. [45]

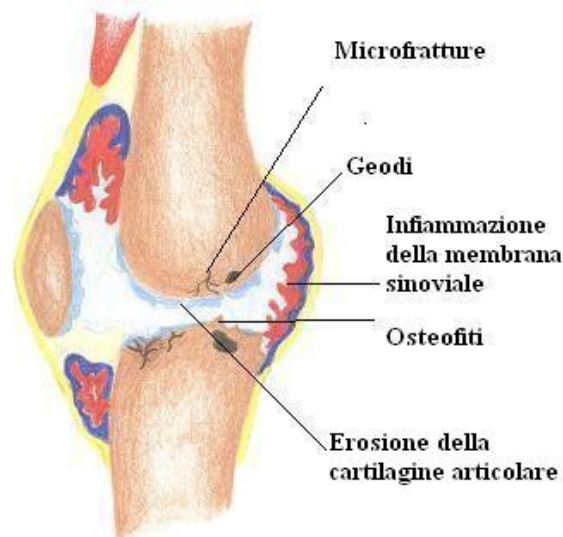


Figura 19. Articolazione colpita da osteoartrite.

3.4. Siti di localizzazione dell'OA

Le singole localizzazioni della patologia possono presentare alcuni aspetti peculiari. Nelle mani, in genere, la patologia inizia con dolori di grado discreto e lievi arrossamenti a cui si associano una crescente rigidità e la comparsa di tumefazioni dure che si formano sulla superficie dorsale, note come *noduli di Heberden* a livello delle interfalangee distali e *noduli di Bouchard* a livello delle interfalangee prossimali,. Dopo circa 6 mesi-1 anno le tumefazioni smettono di essere dolenti, ma finiscono per evolversi in deformità (dito a “serpente”), che in alcuni casi possono indurre un’alterazione della funzione. Questo tipo di OA colpisce prevalentemente le donne e mostra un’evidente familiarità.

L’OA dell’articolazione alla base del pollice, chiamata *rizoartrosi*, si manifesta inizialmente con dolore scatenato soprattutto da movimenti prensili della mano. Successivamente può apparire una lieve tumefazione con deviazione progressiva della base del dito.

L’OA dell’anca (*coxartrosi*) è una delle forme più importanti per frequenza e induzione di invalidità. La sintomatologia insorge subdolamente e in fase iniziale il dolore si verifica solo al carico e al movimento, e può essere avvertito all’inguine e alla parte anteriore della coscia, oppure al lato interno della coscia fino al ginocchio, più raramente alla natica. Al dolore si associa poi una limitazione progressiva dei movimenti, fino a impossibilitare il paziente a compiere gesti quotidiani ed assumere la posizione eretta. Nelle fasi avanzate della patologia il dolore può diventare continuo e presentarsi anche nelle ore notturne; per tali motivi spesso si deve ricorrere alla sostituzione chirurgica dell’articolazione.

L’OA del ginocchio (*gonartrosi*) è anch’essa una delle forme più diffuse e invalidanti. Possono essere colpite entrambe le articolazioni del ginocchio, la femoro-rotulea e la femoro-tibiale, anche se quest’ ultima risulta la più rilevante per la funzione del ginocchio. Caratteristica è la presenza di una tumefazione globosa del ginocchio, senza segni di flogosi, e di dolore accentuato dal carico, dal movimento, dalla salita e soprattutto dalla discesa delle scale. Nel 5-10% dei casi compaiono versamenti articolari ricorrenti, dovuti a liquido sinoviale. In una fase più avanzata compaiono limitazione al movimento e persistenza del dolore, che non viene attenuato dal riposo e può persistere anche nelle ore notturne.

L'OA del piede colpisce prevalentemente l'alluce (prima articolazione metatarso-falangea). È relativamente più dolorosa nelle fasi iniziali e comporta una discreta limitazione funzionale, potendo esitare in rigidità dell'alluce o più spesso in alluce valgo. Quest'ultimo spesso si complica con una borsite mediale, che può andare incontro a infiammazione o a infezione e rendere doloroso l'uso delle calzature.

L'OA della colonna vertebrale (*spondiloartrosi*) è estremamente frequente dal momento che segni radiologici si osservano nella maggior parte della popolazione in età avanzata. Le sedi più colpite sono la colonna cervicale e la colonna lombare . Spesso l'OA della colonna cervicale non provoca sintomi; in altri casi il paziente manifesta modesti dolori cervicali avvertendo anche periodiche crisi di cefalea. Nell'OA della colonna lombare il dolore tende ad aumentare progressivamente, specie in seguito a carico e a movimento. Il riposo migliora la sintomatologia dolorosa. Tuttavia la maggior parte delle lombalgie non sono causate dall'OA, ma da stiramenti e contratture muscolari o, per le forme croniche, da anomalie dei dischi intervertebrali. [46]

3.5. Prevenzione e terapie

La terapia dell'OA comprende diversi tipi di approcci che vanno dalle misure preventive ai trattamenti farmacologici, fisici e chirurgici.

L'obiettivo della terapia è quello di migliorare la qualità di vita del paziente attraverso il controllo del dolore, la conservazione della funzionalità articolare e il rallentamento della degradazione articolare.

Tra le *misure preventive* rientra l'eliminazione dei fattori di rischio modificabili, quali l'eccesso ponderale o l'uso scorretto dell'articolazione, al fine di evitare o ritardare l'insorgenza della patologia, e rallentare l'evoluzione della patologia nel malato di OA. Dunque di fondamentale importanza è un corretto stile di vita, controllando l'alimentazione, che deve garantire il raggiungimento e mantenimento del peso forma, e l'assunzione di quantità sufficienti di sostanze anti-ossidanti contenute in frutta e verdura. Il movimento è un altro punto fondamentale, in quanto un esercizio fisico moderato è in grado di mantenere in salute le articolazioni: la nutrizione della cartilagine articolare, infatti, è in larga misura consentita dalla penetrazione del liquido sinoviale sotto l'influenza della pressione esercitata durante il movimento. Inoltre l'attività fisica rinforza i legamenti e la muscolatura, che stabilizzano l'articolazione. Tra le attività più

indicate per il malato di OA rientrano il nuoto, il ciclismo e la semplice passeggiata, sotto la guida di un esperto in grado di redigere un programma di esercizio fisico adeguato, al fine di evitare errori che potrebbero anche peggiorare la situazione.

Anche l'impiego di sussidi ortopedici risulta utile in quanto aiuta a mantenere la giusta postura e la corretta geometria articolare. L'uso di bastoni, tutori di vario tipo, corsetti, collari e plantari ha la funzione di sostenere, proteggere o correggere un carico distribuito non correttamente su una articolazione.

I farmaci impiegati nell'OA possono essere suddivisi in *sintomatici*, che mirano a combattere il dolore, ed in farmaci che agiscono sulla struttura della cartilagine articolare detti *condroprotettori*. I farmaci antinfiammatori non-steroidi (FANS) rappresentano la terapia di prima scelta per il trattamento del dolore e delle fasi infiammatorie della patologia. Non è stato riconosciuto un FANS più efficace o più indicato per il trattamento sintomatico dell'OA. La scelta del tipo di FANS dipende dalla tollerabilità, da certe caratteristiche legate alla molecola quali durata e selettività d'azione, e dalla risposta clinica. Tra quelli più usati ricordiamo: *ibuprofene*, *nimesulide*, *naprossene*, *ketoprofene*, *diclofenac*. Il limite d'uso di tali farmaci è legato ai loro effetti collaterali, in particolare la gastrolesività, che non ne permette un uso continuativo. Molto utilizzato per la sua azione analgesica è il *paracetamolo*, specialmente nei pazienti a rischio gastro-intestinale o con altre controindicazioni all'impiego di FANS. Da qualche anno nel nostro Paese gli analgesici oppiacei possono essere impiegati per l'OA, utili nei soggetti che non tollerano i FANS o che rispondono poco agli analgesici non oppiacei. Fra i più usati la *codeina* e il *tramadolo*, che possono essere assunti anche in associazione o in combinazione. Altre terapie utili a cui si può ricorrere saltuariamente e in ambiente specialistico sono le *infiltrazioni intra-articolari* con un preparato cortisonico, durante le fasi di infiammazione acuta. Importante è non abusare con tale pratica (massimo 2-3 infiltrazioni l'anno) per evitare ripercussioni negative sull'equilibrio metabolico della cartilagine articolare. Anche l'acido ialuronico, normalmente presente a livello articolare e spesso degradato nella fase avanzata della patologia, viene utilizzato per infiltrazione, con azione sostitutiva lubrificante e condroprotettiva, oltre che antinfiammatoria. [47]

I farmaci condroprotettori, una delle nuove prospettive terapeutiche nel trattamento dell'OA, influenzano il metabolismo della cartilagine andando a inibire i processi degenerativi e/o stimolare la sintesi di nuova ECM da parte dei condrociti. Dagli studi effettuati su queste nuove sostanze, quella che ha dimostrato maggiore efficacia è la *glucosamina*, di origine naturale, in grado di inibire la produzione di fattori infiammatori della cartilagine, bloccare la sua degradazione e favorire la produzione di nuova cartilagine. Sono ancora sotto studio le altre sostanze candidate a questo ruolo fra cui lo stesso acido ialuronico, la condroitina solfato, la diacerina e gli estratti di soia e avocado.

Spesso al trattamento farmacologico si associano delle terapie "fisiche" al fine di attenuare la sintomatologia dolorosa. Tra queste ricordiamo le *cure termali* e in particolare la *fangoterapia*, ma anche la *kinesiterapia*, la *fisioterapia* e l'*agopuntura*.

La *terapia chirurgica* rappresenta il rimedio ultimo quando tutte le altre terapie non sono più efficaci nel trattamento delle condizioni più invalidanti e dolorose, quali l'OA dell'anca e del ginocchio. Gli interventi possono essere di tipo *palliativo* (enervazioni, tenotomie, osteotomie, resezioni) quando lo scopo è quello di attenuare il dolore riducendo, modificando o abolendo il carico sull'articolazione interessata. Gli interventi di *sostituzione proteasica*, invece, portano alla completa scomparsa della sintomatologia dolorosa e al miglioramento della funzione articolare. I limiti all'intervento, rappresentati dalla durata non illimitata delle protesi e dalla concomitanza di malattie che riducono l'operabilità del paziente, tendono a diminuire rispettivamente per il miglioramento dei materiali e per quello dell'assistenza al malato.

Riguardo le prospettive terapeutiche future le speranze maggiori derivano dai progressi dell'ingegneria tissutale: l'*"impianto di condrociti autologhi"*, cioè l'innesto di cellule cartilaginee prelevate dallo stesso paziente, sta ottenendo buoni risultati. Tuttavia si tratta ancora di un intervento limitato, che sembra essere risolutivo solo in pazienti di giovane età, su alcune articolazioni e in casi di lesioni modeste che non abbiano intaccato l'osso sottostante. [48]

CAPITOLO 4- MEDIATORI BIOCHIMICI NELL'EVENTO OSTEOARTRITICO

Il funzionamento e la resistenza della cartilagine articolare dipendono dal mantenimento di un'intatta architettura cartilaginea. Infatti l'origine della patologia osteoartritica sembra consistere in una sofferenza del condrocita, fulcro dell'omeostasi cartilaginea.

Durante la vita, il turnover della matrice cartilaginea è mediato da una moltitudine di complessi fattori omeostatici, autocrini e paracrini, con attività anabolica o catabolica, prodotti dagli stessi condrociti. Dunque nell' OA sia fattori catabolici che anabolici convergono nella distruzione tissutale.

4.1. Omeostasi cartilaginea

Il tessuto cartilagineo è in grado di rimodellarsi sostituendo le parti deteriorate della matrice e mantenendo l'equilibrio tra processi anabolici e catabolici. La formazione di nuova cartilagine è esclusiva competenza dei condrociti, che in condizioni fisiologiche producono nuovo tessuto con un normale rapporto tra la componente fibrosa e quella amorfa. Con l'avanzare dell'età e nell'OA la capacità di mantenere questo equilibrio tende a diminuire. Infatti la produzione di componenti della ECM varia sia quantitativamente, con uno sbilanciamento metabolico a favore dei processi catabolici, che qualitativamente, riducendosi la sintesi di aggregati e aumentando la sintesi di collagene di tipo I, III e X in sostituzione del collagene di tipo II [48].

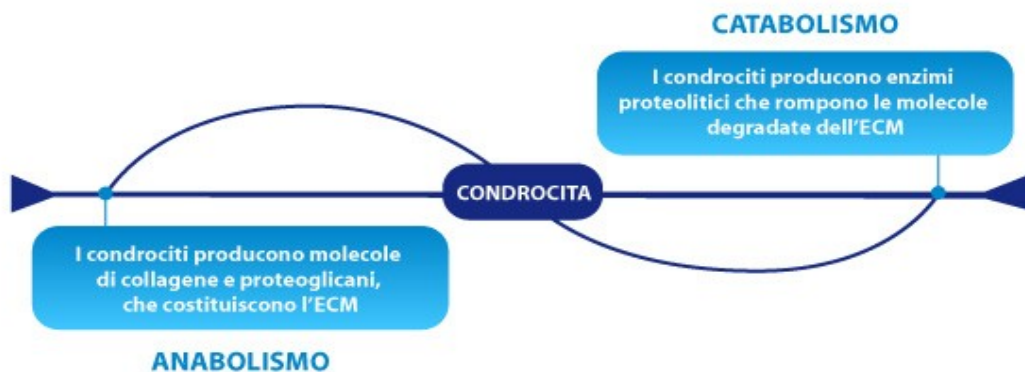


Figura 20. Equilibrio metabolico della cartilagine.

Numerosi mediatori anabolici e catabolici sono coinvolti nel normale turn-over della cartilagine articolare. Se, da un lato, specifiche citochine attiveranno enzimi capaci di degradare gli elementi costitutivi della cartilagine, dall'altro particolari fattori rallenteranno tale degradazione e stimoleranno la formazione di nuova cartilagine. [49]

4.2. Mediatori anabolici

L'anabolismo comprende un insieme dei processi endoergonici che provvedono alla formazione delle componenti cellulari e dei tessuti corporali.

La cartilagine articolare risente di vari fattori anabolici, tra i quali alcuni "fattori di crescita" che, necessari per la sintesi di una ECM in grado di espletare le proprie funzioni, hanno una concentrazione generalmente bassa a livello di cartilagine adulta sana. Alcuni di questi fattori possono indurre processi degenerativi, in parte responsabili dei processi catabolici tipici dell'OA [50].

I fattori di crescita più rappresentativi che influenzano lo stato del tessuto sia in normo-condizioni che in presenza di OA sono:

- il *Transforming growth factor* o *Tumor growth factor* (Tgf- α , - β), una famiglia di proteine multifunzionali. Normalmente la cartilagine articolare possiede riserve di TGF- β in forma latente, al contrario è stato notato che nella cartilagine osteoartritica i livelli aumentano come stimolo alla riparazione. Il TGF- β non solo aumenta la sintesi di proteoglicani, ma anche contrasta la soppressione della sintesi dei proteoglicani indotta dall'IL-1 β . [51] Questo fattore possiede, inoltre, ruoli non sempre chiari poiché induce infiammazione sinoviale negli animali e, se da un lato sembra che protegga il tessuto dalla distruzione tramite l'inibizione della sintesi di alcune proteasi (MMP-9 ed MMP-1), dall'altro induce nei condrociti la MMP-13, esacerbando il danno cartilagineo in caso di OA.
- Il *fattore di crescita insulino-simile (IGF)* è un polipeptide che contribuisce alla crescita ed allo sviluppo di diversi tessuti. La sintesi della matrice e l'attività mitotica dei condrociti sono regolate soprattutto dall'IGF-1 che, in tal senso, può essere considerato un importante fattore omeostatico per la cartilagine: in quella normale, l'espressione dell'IGF-1 è bassa, ed è up-regolata in caso di OA. [52]
- La *Galectina – 3* è una lectina animale solubile, dal peso di 30 kDa, normalmente prodotta dai condrociti. In caso di OA la produzione aumenta

[46adri]. Essa funge da condroprotettore [47adri] in sede intracellulare, ma fuori dalla cellula ha effetti deleteri sia nel tessuto cartilagineo sia in quello dell'osso subcondale. [53]

4.3. Mediatori catabolici

I fattori catabolici coinvolti sono molteplici ed includono neuromediatrici, fibronectina, mediatori dell'infiammazione e MMPs.

4.3.1 Neuromediatrici

Tra i neuromediatrici coinvolti nell'eziopatogenesi dell'OA si annovera la *leptina*, [54] piccolo ormone di natura proteica e codificato dal gene dell'obesità (OB); ha un peso molecolare di 16 KDa ed è fortemente coinvolta nella regolazione del metabolismo lipidico e del consumo energetico.

In condizioni normali i livelli di leptina aumentano dopo il pasto e si riducono nel digiuno prolungato. Nella cartilagine affetta da OA, i livelli dell'ormone aumentano e concorrono sia all'insorgenza dell'infiammazione, per produzione di leucotrieni e PGE₂, sia all'attivazione della via apoptotica realizzata dalla proteina p 53, [55] in sinergia con l'IL1-β.

4.3.2 Fibronectina

La fibronectina è una glicoproteina dimerica costitutiva della ECM che aumenta in caso di OA, ma il problema non deriva dalla glicoproteina intera, piuttosto dai frammenti che ne derivano. [56] I frammenti ritrovati in cartilagine hanno peso molecolare da 30 a 200 kDa e mostrano un'attività catalitica che consiste nel diminuire la sintesi di PGs e aumentare quella di MMP-1, MMP-9, MMP-13, aggreganasi, serin-proteasi [57] ed ossido d'azoto in associazione ad Ossido d'azoto sintetasi inducibile (iNOS).

4.4. Mediatori dell'infiammazione

Evidenze sperimentali suggeriscono che la secrezione di alcuni mediatori dell'infiammazione nella cartilagine induce e/o coopera all'alterazione del metabolismo cellulare in diversi modi.

4.4.1. Citochine proinfiammatorie

Le citochine sono una famiglia eterogenea di mediatori proteici con azione di tipo ormonale, la cui sintesi, per risposta a stimoli antigenici o infiammatori, è transitoria con fenomeni di secrezione di breve durata ed autolimitanti. Coinvolti principalmente nella modulazione delle risposte immuni ed infiammatorie, a seconda della linea cellulare da cui vengono prodotte possono essere definite:

- monochine, se prodotte da macrofagi;
- linfocine, quelle prodotte dai linfociti;
- chemochine se dotate di proprietà chemio tattica.

Generalmente agiscono a livello locale con meccanismi autocrini o paracrini. Sulle cellule bersaglio, esse si legano e attivano recettori specifici ad alta affinità, che nella cellula stimolata sono supersensibilizzati (up-regulated). La loro attività è frequentemente ridondante (diverse citochine esercitano lo stesso effetto) e, spesso, consiste o nella regolazione dell'espressione e dell'azione di altre citochine o nel controllo del metabolismo e della divisione cellulare.

Tra i numerosi percorsi biochimici che vengono attivati nella cartilagine articolare durante l'OA, troviamo mediatori classicamente associati all'infiammazione, in particolare l'**interleuchina 1 β** (IL-1 β) e il **tumor necrosis factor α** (TNF- α). [58]

Le loro azioni principali sono quelle di:

- guidare le reazioni cataboliche;
- inibire la sintesi della ECM;
- promuovere l'apoptosi cellulare.

Sia l'IL-1 β che il TNF- α influenzano il metabolismo dei condrociti, riducendo la sintesi di proteoglicani e collagene e aumentando la produzione di proteasi, quali le MMPs. Inoltre inducono i condrociti e le cellule sinoviali a produrre altri mediatori infiammatori come IL-8 e IL-6, ossido nitrico e prostaglandina E₂. Le azioni di entrambe le citochine sono in parte mediate dall'attivazione del fattore di trascrizione *NF- κ B*, che aumenta ulteriormente la loro espressione e quella di altre proteine cataboliche, come la forma inducibile dell'ossido nitrico sintetasi (*iNOS*) e la cicloossigenasi-2 (*COX-2*), creando così una cascata auto-catalitica che promuove l'auto-distruzione della cartilagine.

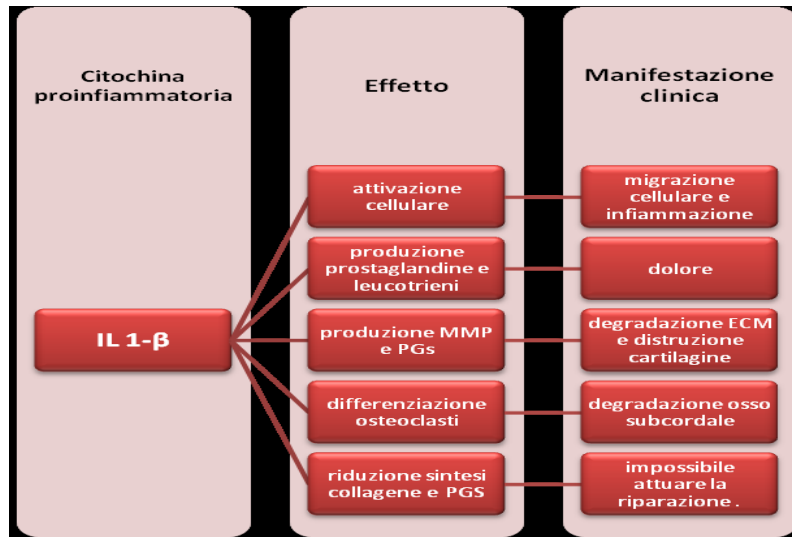


Figura 21. Effetti dell'IL-1 β

4.4.2. Ossido Nitrico (NO)

Fino a metà del 1980, NO era conosciuto come un gas velenoso che, incolore e poco solubile in acqua, si forma in aria ad alte temperature. [59] Nel nostro organismo la sintesi di questo composto si realizza, a partire dall'ossigeno molecolare (O₂) e dall'azoto guanidinico dell'arginina, che viene convertita in citrullina, per mezzo di enzimi della famiglia delle ossido nitrico sintetasi (NOS) (Figura 22).

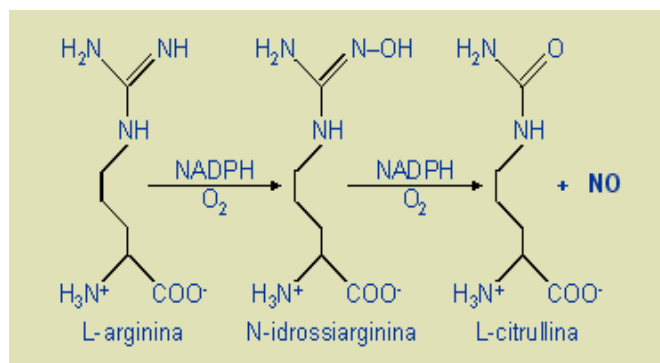


Figura 22. Biosintesi dell'NO

Tali enzimi esistono in tre isoforme delle quali due sono costitutive (cNOS):

- ❖ la NOS - 1 detta anche nNOS poiché localizzata a livello neuronale;
- ❖ la NOS - 3 o eNOS enzima endoteliale.
- ❖ L'isoforma NOS-2 è un enzima inducibile (iNOS) che è presente nella cartilagine.

L'espressione dell'iNOS, in caso di OA, è stimolata ed indotta dalle citochine, [60] per cui l'NO prodotto aumenta rispetto ai valori normali e induce la sintesi

della COX-2, da cui derivano le prostaglandine come PGE₂. Si ritiene che l'NO agisca da fattore autocrino e paracrino che induce sia la riduzione dei processi anabolici sia l'aumento di quelli catabolici, tramite l'inibizione della sintesi delle macromolecole cartilaginee e l'aumento dell'attività delle MMPs. Inoltre, interagendo con le specie reattive dell'ossigeno (ROS) quali l'anione superossido, l'NO, agendo da radical scavengers, si trasforma in perossinitrito dirigendo i condrociti verso l'apoptosi. [61]

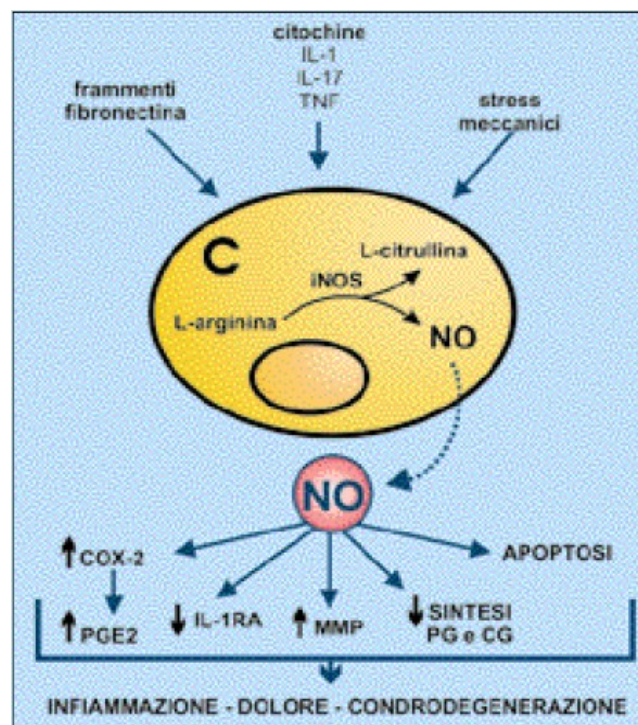


Figura 23. Effetti dell'ossido nitrico

L'NO esercita dunque diversi effetti (Figura 23) quali :

- inibizione della sintesi di collagene e PGs, con conseguente riduzione della sintesi della ECM;
- attivazione di MMPs, con conseguente degradazione dei componenti dell'ECM;
- aumento dell'attività di COX-2, con conseguente aumento della sintesi di PGE₂ ed avvio di un processo infiammatorio;
- aumenta la suscettibilità al danno provocata da altri ossidanti;
- aumenta il processo apoptotico, per azione del radicale perossinitrito.

Tutto ciò si traduce in infiammazione , dolore e condrodegenerazione.

4.4.3. Eicosanoidi

La genesi del dolore e dell' infiammazione, tipiche dell'OA, dipende da stimoli che, trasformati in segnali chimici, rendono l'individuo cosciente del cambiamento dello stato di salute.

La figura 24 mostra le principali tappe del processo biologico noto come "cascata dell'acido arachidonico" che interessa particolarmente la cartilagine malata.

I fosfolipidi della membrana cellulare, stimolati da neurotrasmettitori, da altri ormoni, da diversi farmaci, da agenti tossici o da certi allergeni, liberano Fosfolipasi A₂, enzima responsabile della liberazione di Acido Arachidonico. Questo composto, il cui nome IUPAC è acido-8,11,14-eicosatetraenoico, è un acido grasso insaturo a 20 atomi di carbonio contenente 4 doppi legami e contenuto in forma esterificata nei fosfolipidi. Secondo il tipo di cellula e dello stimolo, l'acido arachidonico può essere trasformato o per opera di diverse lipossigenasi (LOX) in leucotrieni (LT), che sono coinvolti nei processi immunitari e nelle risposte infiammatorie, oppure in composti intermedi noti come endoperossidi ciclici per mezzo delle cicloossigenasi degli acidi grassi (COX-1 e COX-2), dette anche prostaglandine endoperossido sintetasi-1 e 2, (che aggiungono 2 molecole di O₂) e della diidroperossidasi che forma la PGH₂.

Gli endoperossidi ciclici, sotto successiva azione di vari e specifici enzimi, formano (Figura 24): i *trombossani* e le *prostacicline* che influenzano l'aggregazione delle piastrine e la dilatazione o costrizione dei vasi sanguigni e le *prostaglandine*.

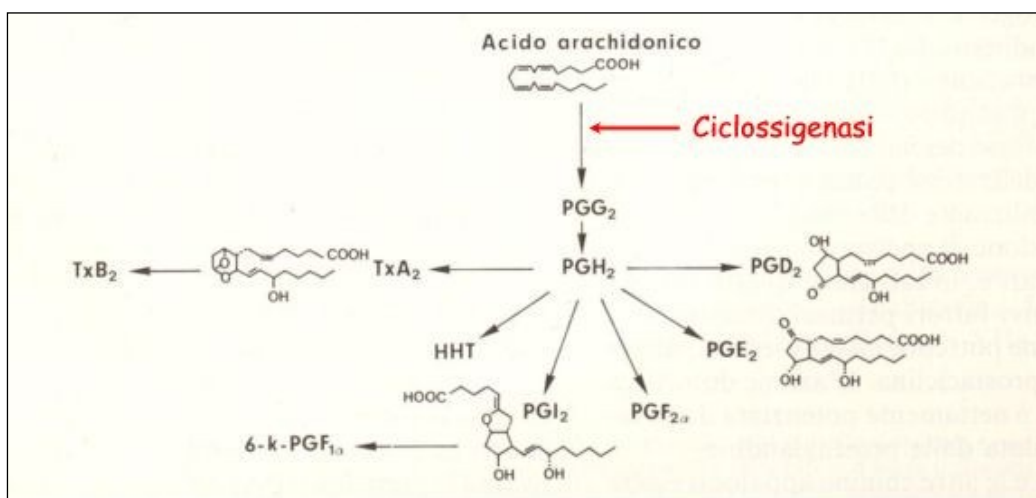


Figura 24. Via della cicloossigenasi

Esistono, però, tre isoforme di COX:

☞ **Cox-1** o prostaglandina endoperossido sintetasi 1 che è costitutiva in quasi tutti i tessuti (in particolare in piastrine, cellule endoteliali, tratto gastrointestinale e reni). I suoi livelli aumentano di 2-4 volte in risposta a stimoli infiammatori. Questo enzima sintetizza le prostaglandine che contribuiscono alle funzioni omeostatiche nel tratto gastrointestinale e nel rene.

☞ **Cox-2** o prostaglandina endoperossido sintetasi 2 viene indotta nel corso di processi flogistici nelle cellule infiammatorie, in quanto sintetizza le prostaglandine che mediano dolore, tumefazione e danno tissutale. Di norma non evidenziabile in condizioni basali, la cox-2 è presente a basse concentrazioni in alcuni tessuti. Le sue concentrazioni aumentano di 10-20 volte in risposta a stimoli infiammatori.

☞ **Cox-3** o prostaglandina endoperossido sintetasi 3 è espressa nel sistema nervoso centrale ed è coinvolta nella genesi della febbre e del dolore.

In caso di OA, come già ricordato, è l'IL 1- β ad indurre la COX- 2 e le due isoforme microsomiali dell'enzima PGE₂-sintetasi, mPGES-2 e mPGES-1; per cui i livelli di PGE₂ sono 50 volte superiori rispetto a quelli di una cartilagine sane. Alcuni studi hanno evidenziato il particolare coinvolgimento dell' mPGES-1. [62]

La PGE₂ è solo uno degli eicosanoidi coinvolti in OA, in quanto anche i leucotrieni svolgono un ruolo non indifferente. [63]

4.4.4. *NFκB (Nuclear Factor KB)*

L' NF- κ B è un fattore di trascrizione nucleare dimerico, costituito da una piccola famiglia di proteine che comprende: c-Rel, RelB, RelA (p65), NF- κ B 1 (p50) e NF- κ B 2 (p52). La forma trovata più abbondantemente nelle cellule stimulate è l'eterodimero RelA/NF- κ B1 (p65/p50). [64] I geni che rispondono a questo fattore di trascrizione giocano un ruolo cruciale nel programma di sopravvivenza cellulare, poiché codificano per citochine infiammatorie, mediatori ed effettori della risposta immunitaria (innata e secondaria), e inibitori dell'apoptosi. [65] Quindi, in condizioni fisiologiche, l'NF- κ B rientra in quei complessi meccanismi cellulari che intervengono nel combattere un'infezione o nella risposta allo stress. Tuttavia, una risposta eccessiva dello stesso fattore di trascrizione può

contribuire a mantenere stati di infiammazione cronica, come avviene nell'asma, nella sclerosi multipla, in patologie intestinali e nell'OA. [66] E' stato anche dimostrato che la condizione di infiammazione cronica dovuta ad iperattività dell'NF- κ B contribuisce alla formazione di placche sclerotiche nelle arterie e nelle malattie cardiache. [67] La forma inattiva dell'NF- κ B si trova nel citoplasma di tutte le cellule, legata ad una proteina inibitoria, l'I κ B, che ne impedisce la traslocazione nel nucleo. Una varietà di segnali extracellulari, portano all'attivazione dell'*I κ B chinasi* (IKK), enzima che causa la fosforilazione specifica di una coppia di residui serinici, situati all'estremità N-terminale dell'I κ B. Una volta fosforilato, l'I κ B viene riconosciuto dalla *ubiquitina-proteina ligasi E₃*, che causa il processo di ubiquitinazione (legame di quattro monomeri di ubiquitina). In questo modo il complesso 26S *proteasoma* riconosce e degrada l'I κ B. L'NF- κ B è ora libero di traslocare nel nucleo dove si lega a specifiche sequenze nel DNA (*response elements*) e attiva la trascrizione dei geni target. [66] Il processo viene schematizzato nella figura sottostante.

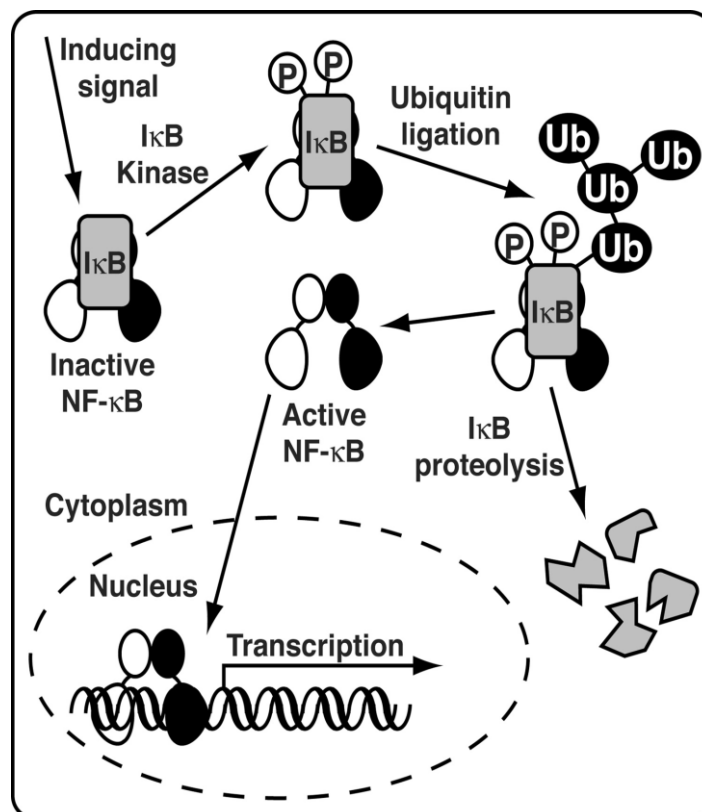


Figura 25. Meccanismo di attivazione dell'NF- κ B.

L'NF- κ B può essere attivato da stimoli di diversa natura, quali batteri e proteine virali, citochine, fattori di crescita, radiazioni, ischemia/riperfusion e stress

ossidativo. Sono stati identificati più di 150 geni target dell'NF-κB, tra cui geni codificanti per citochine, chemochine, molecole di adesione cellulare, fattori di crescita e diversi enzimi. [68] Alcuni esempi di stimoli induttori e targets dell'NF-κB sono riportati nello schema seguente:

INDUCERS	TARGETS	EFFECT
<i>Cytokines</i> IL-1 TNFα	TNFα IL-1 IL-6 IL-17	➡ <i>inflammation</i>
<i>T cell receptors</i> CD40L FasL TRANCE/RANKL	IL-8 MCP-1 ICAM-1 VCAM-1 GM-CSF	➡ <i>recruitment of inflammatory cells</i>
<i>Growth factors</i> PDGF bFGF	VEGF	➡ <i>neovascularization</i>
<i>Viral proteins</i> HTLV-1 tax	COX-2 iNOS	➡ <i>prostaglandin and NO production</i>
<i>Bacterial products</i> LPS SCW	MMP-1 MMP-3 MMP-9 MMP-13	➡ <i>tissue remodelling</i>
<i>Oxidative stress</i>	c-Myc cyclin D	➡ <i>proliferation</i>
<i>Ischemia/reperfusion</i>	IEX-1L TRAF 1/2 c-IAP 1/2 XIAP A1/Bfl-1	➡ <i>antiapoptosis</i>

Figura 26. Induttori e targets dell'NF-κB.

4.4.5. ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecules-1)

L'ICAM-1 è una glicoproteina transmembrana che contiene cinque domini extracellulari di tipo immunoglobulinico, un dominio transmembrana e una porzione citoplasmatica. In condizioni fisiologiche è espressa in discreta quantità su un limitato numero di cellule come monociti, granulociti e cellule endoteliali. [69] In presenza di diversi stimoli, può essere indotta o “up” regolata su molte cellule, compresi linfociti T e B, cheratinociti, fibroblasti, cellule epiteliali e condrociti. [70] E' fondamentale nella regolazione della risposta immunitaria e infiammatoria. La sua espressione è regolata attraverso quattro vie principali, tra cui, quella più comune nelle cellule coinvolge l'NF- κ B, tramite l'interazione delle citochine IL-1 β e TNF- α ai rispettivi recettori. [71]

Nella figura che segue viene illustrata questa via di regolazione insieme ad altre due vie a cascata che vanno ad attivare il promotore AP-1 dell'ICAM-1: la via ERK1 e ERK2 viene attivata da fattori di crescita, mentre le cascate di JNK e p38 vengono attivate da altre citochine, ma anche da condizioni di stress ossidativo.

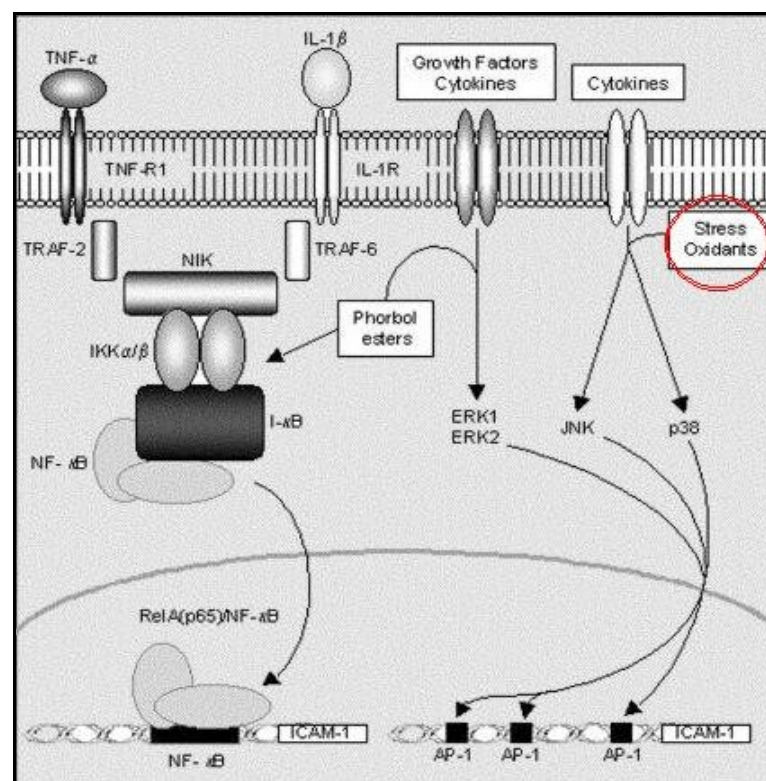


Figura 27. Schema semplificato della regolazione dell'ICAM-1.

I principali ligandi dell'ICAM-1 sono due β_2 integrine: LFA-1 espressa sui linfociti e Mac-1 espressa sui macrofagi. L'interazione con tali recettori regola un

meccanismo di trasduzione del segnale che favorisce l'infiltrazione di leucociti nel tessuto, la proliferazione dei linfociti e l'attivazione di cellule T citotossiche. [72]

4.5 Proteasi

La regolazione del turnover delle macromolecole che compongono l'ECM è cruciale per la normale attività della cartilagine articolare e, in questo, le proteasi giocano un ruolo fondamentale. I principali gruppi di enzimi degradanti l' ECM sono:

- ∞ le serin-proteasi;
- ∞ le cistein-proteasi;
- ∞ le metalloproteasi (MMPs);

suddivise in sottogruppi a seconda delle caratteristiche biochimiche del loro sito attivo. Uno sbilanciato ed elevato turnover dell'ECM comporta una degradazione eccessiva del tessuto.

Tra le serin-proteasi implicate nei processi del rimodellamento tessutale si annoverano l'attivatore tessutale del plasminogeno (tPA) e l'attivatore del plasminogeno tipo urochinasico (uPA), enzimi che convertono il plasminogeno dallo stato di zimogeno in plasmina, la quale può degradare

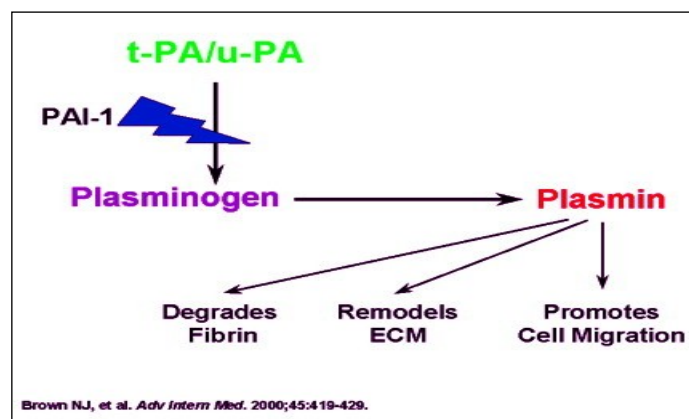


Figura 28. Ruolo della plasmina

componenti dell' ECM , attivare le pro-MMPs nella forma attiva e promuovere la migrazione cellulare (Figura 33).

L'uPA è in grado sia di degradare la fibronectina sia di attivare la gelatinasi A. [73]. Stimolati dall'IL 1- β , i livelli di uPA aumentano e, contemporaneamente, i livelli dei loro inibitori fisiologici (PAI) diminuiscono nella cartilagine con OA.

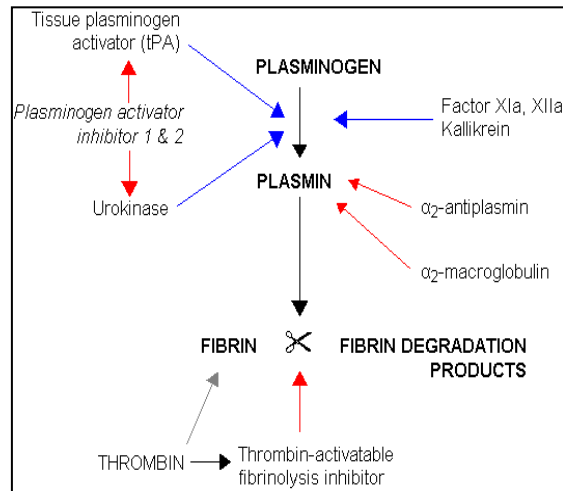


Figura 29. Modulatori della cascata della plasmino
(La freccia rossa indica inibizione, la freccia blu attivazione)

Inoltre l' α_2 -antiplasmina svolge un ruolo primario nel modulare l'attività delle MMPs bloccando la loro attivazione tramite l'inibizione della plasmina prodotta dagli attivatori del plasminogeno (Figura 29).

Alla famiglia delle cistein-proteasi appartengono enzimi di origine lisosomiale che si occupano della degradazione in aree dove il pH è acido: le catepsine. Esse vengono rilasciate nell' ECM in particolari condizioni patologiche, ed in particolare nel caso di OA è stata riscontrata la presenza di catepsine B, K, L e S. Si sostiene che ognuna di esse abbia un preciso ruolo nell'indurre il danno:

- la *catepsina G* contribuisce al rimodellamento della matrice extracellulare attraverso l'attivazione della collagenasi-1 (MMP-1);
- le *catepsine B* attiva MMPs e, come la L taglia collagene di tipo II, IX e XI.

4.5.1. Metalloproteasi

Le metalloproteasi, dette pure matricine, sono delle metallo peptidasi, appartenenti alle "Metzincine". A questa superfamiglia, appartengono, oltre alle MMPs, altre famiglie:

- ❖ Serralisine;
- ❖ Astacine;

❖ ADAMs/Adamalysine.

Le metzincine contengono tre istidine (His) che legano un atomo di zinco al sito catalitico e sono accomunati dal Met Turn, cioè un residuo di metionina al di sotto del sito attivo dello zinco.

La sigla del motivo che lega lo Zinco é HEBXHXBGBXHZ, in cui i residui d'istidina (H), di acido glutammico (E) e di glicina (G) restano invariati; B è un voluminoso residuo idrofobico, X un residuo variabile e Z un aminoacido famiglia-specifico:

Le Serralisine, che hanno una prolina in posizione Z, sono enzimi batterici che spesso giocano un ruolo importante nella virulenza e nella patogenicità dei microrganismi.

Le Astacine hanno un acido glutammico in posizione Z ed includono: la proteina-1 osteo-morfogenica (BMP-1), che è la C-proteinasasi del procollagene, che rimuove i pro-peptidi C-terminali del procollagene fibrillare.

Per le Adamalysine, l'aminoacido che si trova in posizione Z è invece l'acido aspartico. Sono enzimi solubili di veleni di serpente ad azione molto aggressiva nel degradare l' ECM.

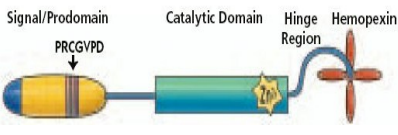
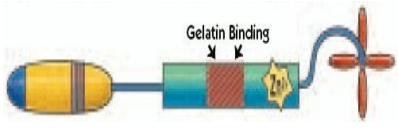
4.5.2. Classificazione delle MMPs

Il termine anglosassone "matrix metalloproteinase" (MMP) rileva la dipendenza della loro attività da ioni metallici, Zinco e Calcio, ed il loro coinvolgimento nella degradazione dei componenti dell'ECM, [74] benchè esse degradano anche alcune molecole cellulari di superficie ed altre proteine pericellulari. Il primo membro di questa famiglia fu descritto nel 1962, in seguito all'osservazione della degradazione della tripla elica di collagene nel processo di riassorbimento della coda del girino durante la metamorfosi. [75] Da allora le MMPs sono state individuate in molte specie, dai celenterati all'uomo, e sono state individuate 25 MMPs nei vertebrati e 23 nell'uomo, [76] nel topo, oltre a diverse MMPs negli invertebrati. [77] Ogni MMP possiede una propria specificità di substrato (talvolta parzialmente sovrapposta ad altre MMPs) che permette la classificazione in 5 famiglie, i membri delle quali sono accomunati da una particolare struttura.

Tutti i membri della famiglia hanno in comune un dominio propeptidico che viene perso dopo il processo di attivazione ed uno catalitico che contiene un sito di legame per lo zinco. Inoltre, il dominio COOH-terminale delle MMPs è

probabilmente il responsabile della specificità per il riconoscimento del substrato ed è presente nella stragrande maggioranza delle MMPs ad eccezione della matrilisina che quindi è la più piccola delle MMPs conosciute (Figura 30).

Questo dominio emopexina/vitronectina like è connesso al dominio catalitico tramite una regione perno (hinge) o di legame (linker) e, se presente, influenza il legame con il TIMP, con altri substrati. La regione di legame, infine, variando in lunghezza e composizione, influenza la specificità di substrato. Le gelatinasi A e B (rispettivamente MMP-2 e MMP-9) sono MMPs caratterizzate dall'inserzione di tre ripetizioni cysteine-rich testacoda all'interno del loro dominio catalitico, necessarie per legare e scindere collagene ed elastina.

FAMIGLIA E DOMINI STRUTTURALI TIPICI.	MEMBRI		SUBSTRATO	ATTIVATO DA
	Nomenclatura numerica	Nomenclatura tradizionale		
<p>Collagenasi</p>  <p>DOMINIO EMOPEXINA SEMPLICE</p>	MMP-1	Collagenasi-1	Collagene I, II, VII, VIII, X, gelatina, α 2 macroglobulina, TNF precursore.	MMP-3, -10, plasmina, kallikreina
	MMP-8	Collagenasi-2	Collagen I, II, III, VII, VIII, X, gelatina, fibronectina, α 2macroglobulina.	MMP-3, -10, plasmin
	MMP-13	Collagenasi-3	Collagen I, II, III, IV, IX, X, XIV, gelatina, fibronectina, laminina, PAI	MMP-2, -3, -10, 14, 15, plasmina
<p>Gelatinasi</p>  <p>GELATIN-BINDING</p>	MMP-2	Gelatinasi -A	Gelatina, collagene I, IV, V, VII, X, XI, XIV, fibronectina, laminina, tenascina, vitronectina, α 2-macroglobulina, TNF precursore, angiostatina	MMP-1, -7, -13, -14, -15, -16, -24
	MMP-9	Gelatinasi- B	Gelatin, collagen IV, V, VII, X, XI, V, elastina, vitronectin, α 1-antitrypsin, α 2-macroglobulina, TNF precursor, angiostatina	MMP-2, -3, -13, plasmin


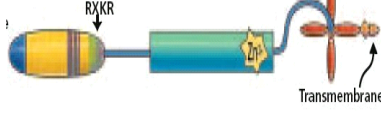
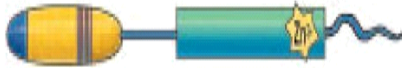
<p>Stromolisine</p>  <p><u>DOMINIO EMOPEXINA SEMPLICE</u></p>	MMP-3	Stromolisina - 1	Collagen III, IV,V, IX, X, gelatina, fibronectina, laminina.	Plasmina, kallikreina, elastasi
	MMP-10	Stromolisina - 2	Collagene III, IV,V, gelatina, fibronectin, elastina.	Plasmina, kallikrein, elastase
	MMP-11	Stromolisina - 3	α 1-proteinase inhibitor, fibronectin, laminina.	Furina
<p>Tipo di membrana (MT-MMP)</p>  <p><u>TRANSMEMBRANA</u></p>	MMP-14	MT1-MMP	Collagen I, II, II, gelatin, fibronectina, laminina.	Plasmina, furina.
	MMP-15	MT2-MMP	Fibronectina, laminina, tenascina	
	MMP-16	MT3-MMP	Gelatin, caseina	
	MMP-17	MT4-MMP	Gelatina, precursore TNF.	
<p>Matrilisina</p>  <p><u>MINIMAL DOMAIN</u></p>	MMP-7	Matrilisina -1	Collagen IV, gelatina, fibronectin, laminina, elastina, angiostatin.	MMP-3, plasmin
	MMP-26	Matrilisina -2		

Figura 30. Famiglie di MMPs

L'espressione della maggior parte delle MMPs è regolata a livello trascrizionale da vari fattori di crescita, da ormoni, citochine e da trasformazioni cellulari: le MMPs sono implicate in numerosi processi fisiologici tra i quali la riproduzione, lo sviluppo fetale e la guarigione delle ferite; esse subiscono, però, un processo di up-regulation in processi patologici, tra cui la degradazione tessutale propria dei processi infiammatori di vari organi, il cancro, la sclerosi multipla, l'aterosclerosi e l'OA. [78] In quest'ultimo caso, evidenze sperimentali hanno dimostrato che la MMP più abbondante è la 13 [79] che degrada il collagene di tipo II e, rompendo il legame tra l'Asn³⁷³ e Phe³⁷⁴, l'aggregano. [80] Studi di immunistoichimica hanno mostrato anche la presenza di MMP-3 (stromelisina) che degrada vari componenti della matrice, inclusa la cartilagine, i PGs, la fibronectina, il collagene di tipo IV, la laminina ed il collagene di tipo IX.

4.5.3. Regolazione trascrizionale delle MMPs

La regolazione dell'attività metalloproteasica è un meccanismo complesso, controllato sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale. L'espressione genica delle MMPs è controllata da diversi fattori stimolatori e soppressori. Essa può subire up- o down- regulation ad opera degli esteri del forbolo, di proteine dell'ECM, secondariamente a stress cellulari, a variazioni della forma cellulare ed alle interazioni cellula-matrice e cellula-cellula. L'espressione viene, inoltre, regolata da numerose citochine e fattori di crescita fra cui le interleuchine (soprattutto la IL1- β), interferoni, Fattore di Crescita Epiteliale (EGF - Epithelial Growth Factor), TNF, Induttore extracellulare delle MMPs (Extracellular Matrix _ Metalloproteinase Inducer) e TGF- α (Trasforming growth factor).

A livello post-trascrizionale le MMPs possono essere regolate da vari meccanismi. Le copie di mRNA che codificano per le MMPs 1 e 3 sono stabilizzate dall'EGF, mentre le copie della MMPs-13 sono stabilizzate dai glicocorticoidi e destabilizzate dal TGF.

4.5.4. Meccanismo di attivazione delle MMPs

Come altri enzimi proteolitici, la regolazione dell'attività è indispensabile per la sicurezza del tessuto; nel caso delle MMPs si osserva una duplice regolazione:

Sono sintetizzate in forma di *zimogeni* inattivi, dotati di:

- ❖ una sequenza di segnale, una porzione N-terminale (predomain) - rimossa dopo aver diretto la sintesi delle MMPs al reticolo endoplasmatico-
- ❖ un pro-peptide che deve essere rimosso durante l'attivazione, poiché ha la funzione di mantenere la latenza dell'enzima. La latenza delle MMPs è mantenuta attraverso un gruppo sulfidrilico di cisteina posto all'estremità C-terminale del dominio pro-peptidico; tale gruppo agisce come un quarto ligando per lo ione zinco del sito attivo. L'attivazione avviene attraverso la

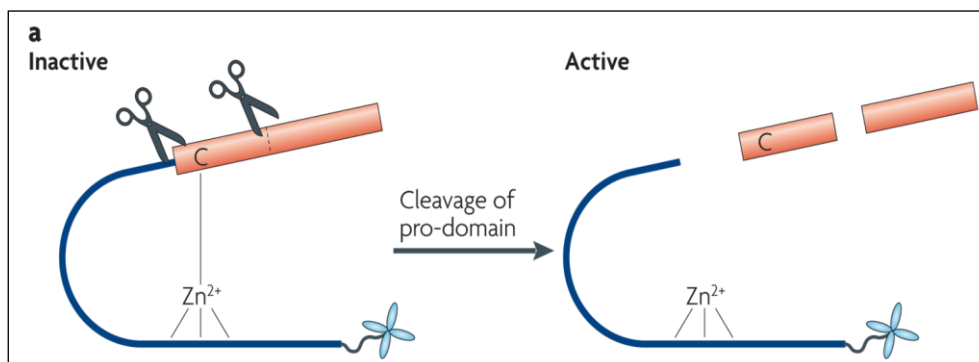


Figura 31. Attivazione delle MMP_ Page-McCaw et al 2007 [70]

rottura delle interazioni Cys-Zn²⁺: cystein switch. Il gruppo tiolo rimosso è rimpiazzato da una molecola d'acqua che a sua volta potrà attaccare i legami peptidici dei target delle MMPs. [76] (Figura 31)

L'attivazione in vivo delle Pro-MMPs è resa possibile da proteinasi tissutali, plasmatiche o batteriche. Il sistema uPA/plasmina, per esempio, possiede un importante ruolo nell'attivazione di diverse pro-MMPs e nello specifico nell'attivazione della gelatinasi B.

L'attivazione extracellulare della maggior parte delle pro-MMPs avviene ad opera di altre MMPs o di serina-proteasi che possono scindere i legami peptidici all'interno dei pro-dominii metalloproteinasici.

Diversamente, l'attivazione delle MT-MMPs avviene durante il trasporto verso la superficie della cellula o direttamente sulla superficie della membrana cellulare, attraverso variazioni conformazionali non proteolitiche o grazie a molecole quali serina proteasi furina-like (a livello intracellulare) o plasmina (a livello di superficie cellulare).

4.5.5. TIMPs (Tissue Inhibitors Metalloproteinases)

La loro attività proteolitica è fisiologicamente controllata dagli inibitori endogeni (α -macroglobulina) e dai loro inibitori tissutali (Tissue Inhibitors Metalloproteinases - TIMPs). [81]

I TIMPs sono inibitori specifici delle MMPs e vengono sintetizzati dalle stesse cellule che producono le MMPs. Sono stati identificati quattro TIMPs (1,2,3,4) che inibiscono le MMPs legandosi in modo specifico non-covalente al loro sito attivo, in rapporto stechiometrico 1:1. [82]

TIMP-1 e TIMP-2 sono presenti nella cartilagine e sono sintetizzati dai condrociti, ma solo TIMP-1 è stato riscontrato nel tessuto articolare affetto da OA e nel fluido sinoviale. Anche TIMP-3 è stato individuato nel tessuto cartilagineo osteoartrotico ed è capace di bloccare l'attività delle MMPs. TIMP-4 è stato trovato solo nelle cellule cancerose e sembra modulare l'attivazione della progelatinasi, come regolatore tissutale specifico del rimodellamento della matrice extracellulare.

Sebbene la principale funzione dei TIMPs sia quella di inibire le MMPs, possono anche stimolare la proliferazione cellulare, influenzare l'espressione dei fattori di crescita e promuovere la crescita tumorale; ciò potrebbe limitare l'uso clinico di TIMPs alle patologie artritiche. Altresì, i TIMP a causa della scarsa biodisponibilità orale, della bassa emivita plasmatica, dell'elevato Peso Molecolare (21-28 kDa), che ne limita fortemente la penetrazione tissutale, specialmente a livello cartilagineo, potrebbero trovare una scarsa utilizzazione. [82]

Seguendo questa logica si cerca di trovare inibitori specifici per le varie MMPs. [83]

Il processo totale della proteolisi è schematicamente riassunto in Figura 32

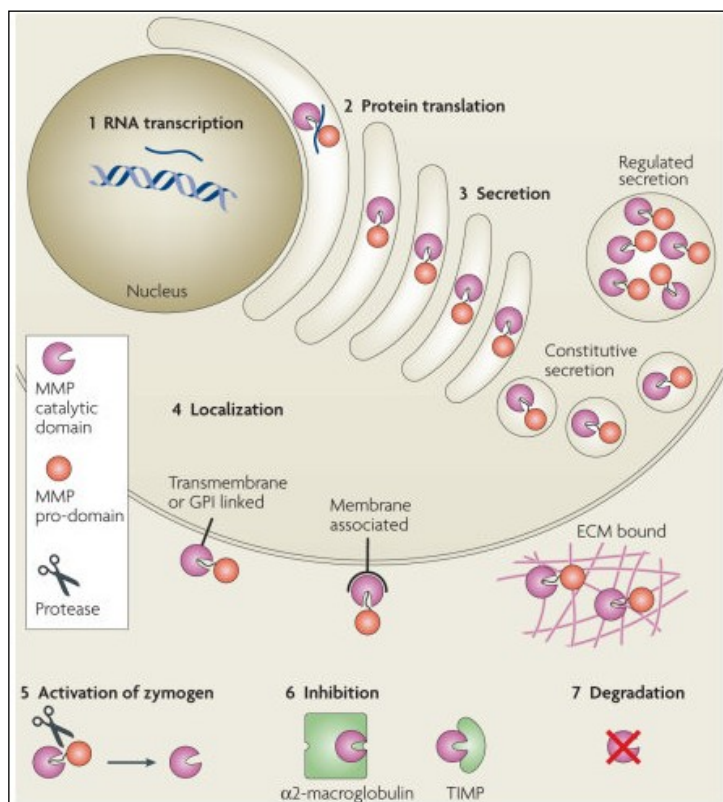


Figura 32. Regolazione del processo proteolitico.

La funzione delle MMP è regolata in diversi livelli, dalla trascrizione dell'RNA alla sintesi degli enzimi; dalla secrezione alla localizzazione. Si ponga attenzione ai punti 5, 6 e 7. In questo lavoro si verifica l'attività al punto 7 di alcuni composti di sintesi.

4.5.6. Modifiche strutturali delle MMPs

La somma di tutti i fattori precedentemente descritti fornisce, dunque, il quadro completo dell'evento osteoartritico. A questa descrizione bisogna aggiungere una delle prime modifiche morfo-funzionali osservate nel tessuto colpito: la deplezione di aggregani.

Questo evento si verifica nonostante un aumento dei livelli di sintesi ed è dovuto all'incapacità dell'aggregano, di dimensioni ridotte, di legarsi con l'AI: le MMPs, sintetizzate e secrete dai condrociti, determinano una digestione proteolitica delle regioni di legame dell'AI. [84]

Pertanto, nel tessuto si ritrovano frammenti parzialmente degradati di molecole di aggregano e, a livello cellulare, diminuisce gradualmente la concentrazione di GAGs: i livelli di tali sostanze possono essere usati come indicatori della sofferenza condrocitaria. La ricerca scientifica mira sia ad approfondire le conoscenze in merito sia ad individuare molecole ad azione condroprotettiva per inibizione delle MMPs.

4.5.7. Meccanismo d'azione delle MMPs

Dal punto di vista catalitico, le MMPs possono essere classificate in due gruppi:

- ❖ uno che catalizza l'idrolisi del gruppo ammidico in maniera diretta, mediante l'acqua, che a sua volta può essere attivata sia mediante legame ad un catione zinco sia attraverso legame ad una regione compresa tra due residui di acido aspartico (Asp);
- ❖ l'altro gruppo di enzimi, invece, catalizza l'idrolisi del legame ammidico in maniera indiretta; il gruppo idrossilico di un residuo di serina (Ser) o di treonina (Thr) ed il gruppo tiolico di un residuo di Cys, agiscono da nucleofili attaccando il carbonile ammidico con conseguente rottura del legame C-N per formare un intermedio acilico (estere o tioestere); questo intermedio viene quindi idrolizzato dall'acqua per completare l'idrolisi.

La maggior parte delle MMPs può sia catalizzare l'idrolisi di un legame ammidico sia rompere i legami peptidici in maniera selettiva, per la presenza negli enzimi di siti di legame complementari a determinati substrati.

Il meccanismo di idrolisi avviene in vari step (Figura 33):

- (a) La MMP, grazie alla presenza di una molecola d'acqua legata alla catena laterale carbossilica dell'acido glutammico-219 (Glu-219) della proteasi per mezzo di legami ad idrogeno, può subire attacchi nucleofili;
- (b) la coordinazione del gruppo carbonilico del legame ammidico allo zinco è presumibilmente seguita dall'attacco nucleofilo dell'acqua legata allo zinco con simultaneo trasferimento protonico allo ione carbossilato e formazione di un intermedio tetraedrico di zinco;
- (c) a questo punto si verifica il trasferimento di un protone dall'acido glutammico all'azoto ammidico seguito dal collasso dell'intermedio tetraedrico con la generazione di un ponte salino tra il residuo di acido glutammico e l'ammina libera del substrato idrolizzato da una catalisi acida.

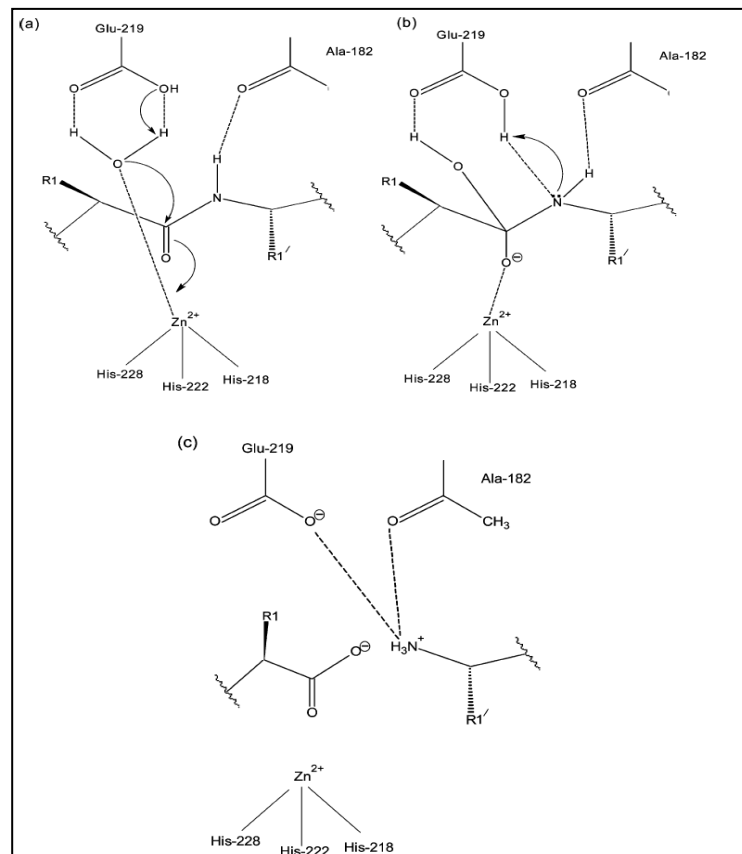


Figura 33. Meccanismo catalitico di idrolisi del legame ammidico da parte delle MMPs

In questi enzimi lo zinco è generalmente coordinato da una combinazione di residui di His (N), Glu (O), Asp (O) e Cys (S) mediante azoto, ossigeno, zolfo che agiscono da donatori. L'His funge da donatore neutro coordinando lo zinco mediante il sostituito imidazolico, mentre il Glu e l'Asp mediante i loro sostituenti anionici carbossilati.[85]

Sebbene tutti gli enzimi zinco dipendenti formino una struttura tetraedrica con tre residui ed una molecola di acqua o uno ione ossidrile, ciascun enzima media differenti funzioni. Le proprietà catalitiche sono determinate dalla natura del gruppo donatore e dal differente amminoacido posto tra i residui coordinanti. [86]

PRIMA PARTE SPERIMENTALE

CAPITOLO 5- PRIMA PARTE SPERIMENTALE

5.1. SCOPO DEL LAVORO

L'OA è una patologia ad eziologia multifattoriale caratterizzata da fenomeni degenerativi, ossidativi ed infiammatori. Nel suo determinismo un ruolo fondamentale è svolto da proteinasi e markers infiammatori prodotti dai condrociti, che rappresentano le unità morfologiche e funzionali del tessuto cartilagineo. [87]

I condrociti in condizioni fisiologiche regolano la sintesi dell'ECM, attraverso un sofisticato equilibrio tra processi degradativi e riparativi dell'ECM, costituita da proteoglicano (PG), a sua volta formato da GAGs e fibre collagene, prevalentemente di tipo II. Nel corso di processi osteoartritici si assiste ad uno sbilanciamento di tale equilibrio, che dà luogo ad una modifica delle proprietà dell'ECM, proprio come risultato di differenti fattori catabolici prodotti dagli stessi condrociti, che includono citochine pro-infiammatorie (IL-1 β e TNF- α) radicali liberi (ROS ed NO) e metalloproteasi di matrice (MMPs). [88]

Considerato il fondamentale ruolo delle MMPs nella degradazione dei componenti dell'ECM, negli ultimi anni sono stati condotti vari studi volti ad evidenziare il coinvolgimento di tali enzimi nei processi che caratterizzano l'OA. [89]

Il mio lavoro di tesi, inserendosi in questo ambito di ricerca, mira a valutare la capacità di derivati 5-ariliden-2-fenilimmino-4-tiazolidinonici (**1-3**, Figura 34) e 5-arilidene-2,4-tiazolidinendioni (**4-9**, Figura 34) di inibire l'azione della MMP-13, una delle MMPs maggiormente coinvolte nell' OA, nota anche come collagenase-3; essa è responsabile della degradazione di fibrille di collagene di tipo I, II e III, con maggiore attività nei confronti del collagene di tipo II, il più rappresentato a livello cartilagineo. [42-90]

I composti in esame sono stati sintetizzati presso il Dipartimento Farmaco Chimico dell'Università di Messina, dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Ottanà; [91]

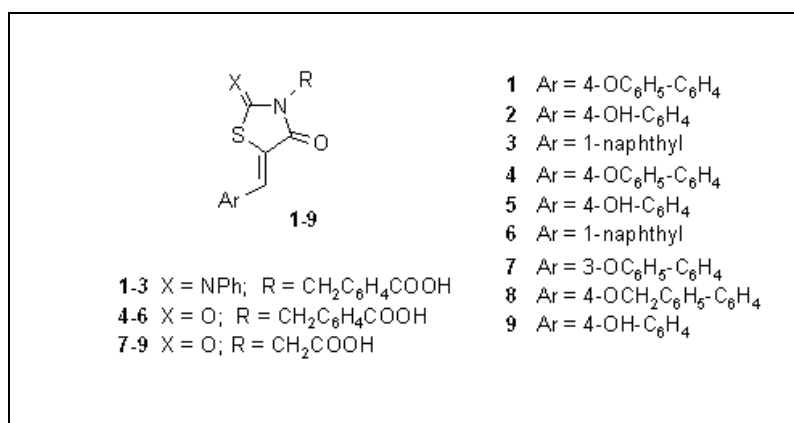


Figura 34. Struttura dei composti in esame

essi sono stati progettati come analoghi strutturali dei più noti inibitori selettivi della COX-2 (celecoxib), farmaci ad attività antiinfiammatoria, nonché come inibitori di alcune MMPs.



Figura 35

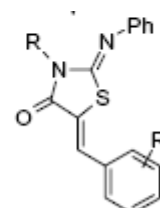
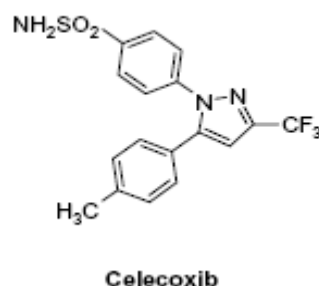


Figura 36

In recenti lavori [92] i derivati arilidene-fenilimino-tiazolidinonici (Figura 36) hanno dimostrato di ridurre in vivo l'infiammazione indotta da carragenina, attraverso inibizione dell'espressione della COX inducibile. In altri studi Panico, Ottanà et al. [93] hanno dimostrato che analoghi strutturali opportunamente sostituiti nelle posizioni 3 e 5 del sistema 4-tiazolidinonico sono in grado di mediare un effetto condroprotettivo su colture di condrociti umani stimolati da IL-1 β , modello molto utile per riprodurre i meccanismi coinvolti nell'OA.

Inoltre composti a struttura benzil-isotiazolidinonici hanno mostrato di inibire l'azione della MMP-3, attraverso interazione col sito S' dell'enzima. [94-95]

Su tali basi il nostro lavoro è stato rivolto alla valutazione in via preliminare dell'attività inibitoria (EC_{50}) sulla MMP-13 dei derivati 2-fenilimmino/2-osso-5-ariliden-4-tiazolidinonici; successivamente è stata valutata l'attività antinfiammatorio-condroprotettiva in vitro su colture di condrociti umani stimolati con IL-1 β , attraverso l'identificazione dei livelli di GAGs ed NO.

5.2. SCHEMA DI SINTESI

5.2.1. Schema generale di sintesi dei 5-ariliden-2,4-tiazolidindioni

Una miscela di 2,4-tiazolidindione (1,5 g, 20 mmoli) con l'opportuna benzaldeide (20 mmoli) e con piperidina (1,4 g, 16 mmoli) in etanolo viene posta a riflusso per 24 ore. Il grezzo di reazione viene versato in H₂O e acidificato con AcOH per dare i 5-ariliden-2,4-tiazolidindioni, che vengono cristallizzati da metanolo.

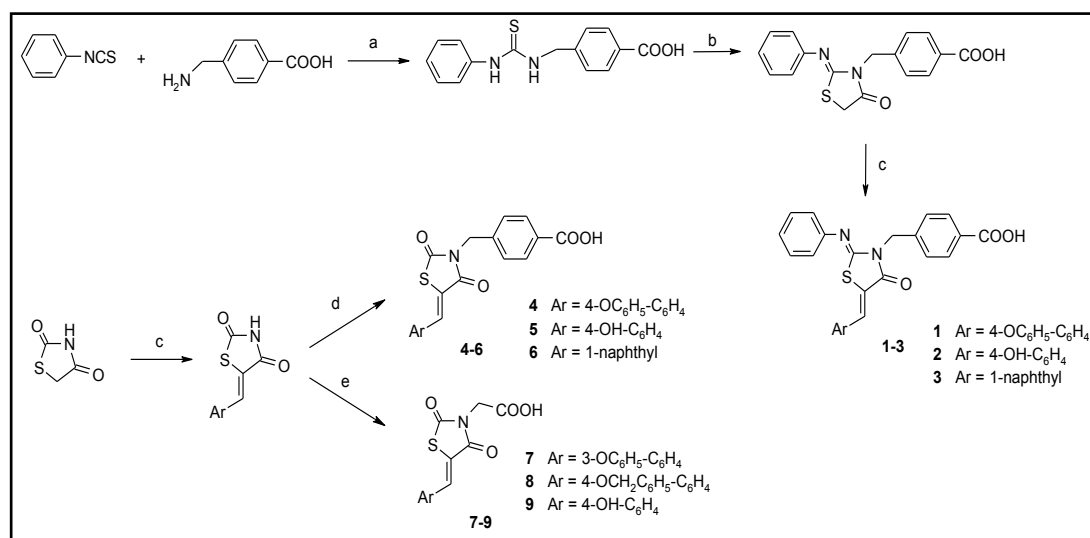


Figura 37. Schema di sintesi dei composti 2-fenilimmino/2-osso-5-ariliden-4-tiazolidinonici.
 a) EtOH, Δ ; b) ClCH₂COCl, Et₃N, EtOH, Δ ; c) ArCHO, C₅H₁₁N, EtOH, Δ ; d) BrCH₂C₆H₄COOH, K₂CO₂, acetone, Δ ; e) BrCH₂COOH, K₂CO₂, acetone, Δ .

5.3. RISULTATI E DISCUSSIONI

Nell'ambito del mio lavoro di tesi sono state prese in esame le proprietà antinfiammatorie ed antidegenerative dei composti **1-9**, riportati in figura 34, come inibitori della MMP-13. I composti **1-9** sono già riportati in precedenti lavori, come potenti inibitori della protein-tirosin fosfatasi 1B (PTP1B) (acidi benzoici **1-**

6) [91] e dell'aldoso reduttasi (ARL2) (acidi acetici 7-9), [96] entrambi coinvolti nel Diabete Mellito (DM) di tipo 2 e nelle sue complicanze infiammatorie croniche. Infatti la PTP1B agisce come regolatore negativo dell'insulina e della sensibilità alla leptina, defosforilando il recettore per l'insulina ed il recettore per la leptina, dunque riduce la capacità di metabolizzazione del glucosio, che giungendo ad alti livelli diviene responsabile di una cascata di processi infiammatori. [97] In particolare la leptina prende parte anche alla regolazione di processi anabolici e catabolici nella cartilagine osteoartrotica, quindi gioca un ruolo chiave nella patogenesi dell'OA. [98] L'ALR2 normalmente ha la funzione di ridurre aldeidi tossiche nella cellula ad alcoli inattivi, ma quando la concentrazione di glucosio nella cellula diventa troppo elevata essa riduce il glucosio in sorbitolo, che successivamente viene metabolizzato a fruttosio dalla sorbitolo deidrogenasi. [99] Recenti studi [100] hanno mostrato il coinvolgimento dell'ALR2, oltre che nel danno ossidativo del diabete, [101] in varie patologie infiammatorie, suggerendo un possibile sviluppo di inibitori dell'ALR2 come agenti anti-infiammatori.

Su tali basi la valutazione biologica dei composti **1-9** potrebbe rappresentare un'estensione della loro capacità di prevenire l'attivazione di una via infiammatoria, che è anche coinvolta nel DM e nelle sue complicanze. Inoltre nel contesto dei complessi processi infiammatori dell'OA è stato utile valutare la capacità inibitoria su MMP-13 di tali composti, considerando che già alcuni composti contenenti acidi carbossilici sono stati valutati come inibitori di MMPs ed alcuni di essi sono anche stati usati in trias clinici. [102]

Nel mio lavoro di tesi è stata analizzata la capacità dei composti **1-9** di inibire la MMP-13, coinvolta nel processo osteoartrotico, attraverso l'inibizione dell'idrolisi di un peptide fluorescente. Dal confronto dei valori di EC_{50} ottenuti, abbiamo selezionato i derivati con la migliore attività ed abbiamo studiato i loro effetti condroprotettivi in colture di condrociti umani stimolati con IL-1 β (alla dose di 10 ng/ml). Questo modello in vitro riproduce i meccanismi implicati nell'OA: l'IL-1 β induce la iNOS, determinando alti livelli di NO, che determinano da un lato l'inibizione della sintesi di PGs, con un abbassamento della produzione condrocitaria di GAGs, dall'altro l'NO induce un aumento dell'attività delle MMPs,

determinando la rottura di collagene e PGs della ECM con la conseguente perdita di GAGs.

Un requisito fondamentale per i composti in esame è che non determinino morte cellulare; a tale scopo è stato effettuato il saggio dell'MTT, da cui è emerso che i composti in esame alle dosi considerate (10 e 2,5 μM) non risultano tossiche per le cellule (dati non mostrati).

5.3.1. EC_{50} e SAR

Per valutare la capacità dei composti **1-9** di inibire la MMP-13, è stato impiegato un substrato fluorogenico, costituito da un fluoroforo (MCA) che è legato ad un quencher di fluorescenza (DPA), esso ha la sequenza amminoacidica: MCA-Pro-Leu-Leu-**Gly--Leu**-DPA-Ala-Arg-NH₂AcOH. La MMP-13 idrolizzando il legame Gly-Leu, permette al fluoroforo, eccitato a 328 nm, di emettere fluorescenza a 393 nm, con conseguente aumento di quest'ultima. Una inibizione della MMPs da parte dei composti in esame si traduce in un abbattimento della fluorescenza emessa dallo stesso substrato.

Tutti i derivati 5-ariliden-4-tiazolidinonici testati hanno mostrato una buona attività inibitoria sulla MMP-13, tranne i composti **3** e **4** che non hanno presentato valori significativi di EC_{50} (Tabella 5.1).

Il composto più attivo, con EC_{50} pari a 0,11 μM , è risultato il composto **6** che possiede in posizione 3 dell'anello tiazolidinonico un gruppo benzoico ($R=\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH}$) ed in posizione 4 un gruppo carbonilico ($X=\text{O}$), così come il composto **5**, che differisce solo per il sostituente del gruppo arilico, anche questo derivato presenta una buona attività inibente ($EC_{50} = 4,8 \mu\text{M}$).

Anche il composto **1**, che presenta in posizione 3 dell'anello tiazolidinonico un gruppo benzoico, in analogia al derivato più attivo (**6**) mostra un buon valore di EC_{50} , pari a 1,7 μM .

L'acido benzoico **6** è il più potente inibitore della MMP-13 fra i composti testati, seguito dall'analogo 2-fenilimmino sostituito (**1**) e dal 2,4-tiazolidindione (**5**). Entrambi i 2,4-tiazolidindioni **5** e **6** mostrano una potenza maggiore rispetto ai

loro derivati 2-fenilimmino sostituiti **2** e **3**, mentre il composto **6** è significativamente più attivo del tiazolidindione analogo **4**.

Compd	R	X	Ar	EC ₅₀ (μM)	LogP ^a
1	CH ₂ C ₆ H ₄ COOH	NC ₆ H ₅	4-OC ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	1.7	7.02
2	CH ₂ C ₆ H ₄ COOH	NC ₆ H ₅	4-OH-C ₆ H ₄	53.22	5.21
3	CH ₂ C ₆ H ₄ COOH	NC ₆ H ₅	1-naphthyl	n.a.	6.51
4	CH ₂ C ₆ H ₄ COOH	O	4-OC ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	109	4.96
5	CH ₂ C ₆ H ₄ COOH	O	4-OH-C ₆ H ₄	4.8	3.15
6	CH ₂ C ₆ H ₄ COOH	O	1-naphthyl	0.11	4.45
7	CH ₂ COOH	O	3-OC ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	11.1	3.05
8	CH ₂ COOH	O	4-OCH ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	22.3	3.12
9	CH ₂ COOH	O	4-OH-C ₆ H ₄	48	1.25
NNGH*				0,0026	

Tabelle 5.1. Inibizione della MMP-13. *L'acido *N*-isobutil-*N*-[4-metossifenilsulfonil]glicilidrossamico (NNGH -Biomol, Inc.) è stato usato come controllo.

La lipofilia di questi composti non appare essere un fattore determinante ai fini dell'attività, come si può evincere dai valori di LogP^a. Infatti la rimozione dell'anello fenilico nella porzione acida degli acidi benzoici, porta ad un inibitore 10 volte meno potente (da 4,8 μM nel composto **5** a 48 μM nel composto **9**), il composto **9** mostra invece attività simile all'analogo 4-idrossi- benziliden sostituito (**2**). Comparando l'effetto inibitorio del 4-idrossi- fenil sostituiti analoghi **5** e **9** suggeriscono che il residuo acido p-metil benzoico in posizione 3 potrebbe essere più favorevole rispetto alla catena acetica per l'inibizione della MMP13.

5.3.2. Saggi biologici: GAGs ed NO

Una delle prime modifiche osservate nell'OA è la deplezione di aggreganti dalla cartilagine, che si verifica nonostante un aumento dei livelli di sintesi; ciò suggerisce che nella cartilagine osteoartritica l'aggregano perde la capacità di legarsi con l'acido ialuronico (AI) e diminuisce le sue dimensioni. Questo avviene perché le MMPs, sintetizzate e secrete da cellule del tessuto connettivo, determinano una digestione proteolitica delle regioni di legame dell'AI, presenti nel *core proteico* dell'aggregano. [103] La MMP-13 rompendo le fibrille di

collagene di tipo II, abbondantemente rappresentato nella matrice cartilaginea, aumenta il rilascio di GAGs, che sono legati alle fibre di collagene dalla ECM, con conseguente alterazione dell'equilibrio e sofferenza condrocitaria, che determinano il danno cartilagineo. La concentrazione totale di GAGs nel surnatante della coltura cellulare è un indice del danno cartilagineo; infatti quando il condrocita è sottoposto all'azione dell'IL-1 β si assiste ad una riduzione condrocitaria dei livelli di GAGs, mentre nel controllo non trattato la produzione di GAGs è maggiore.

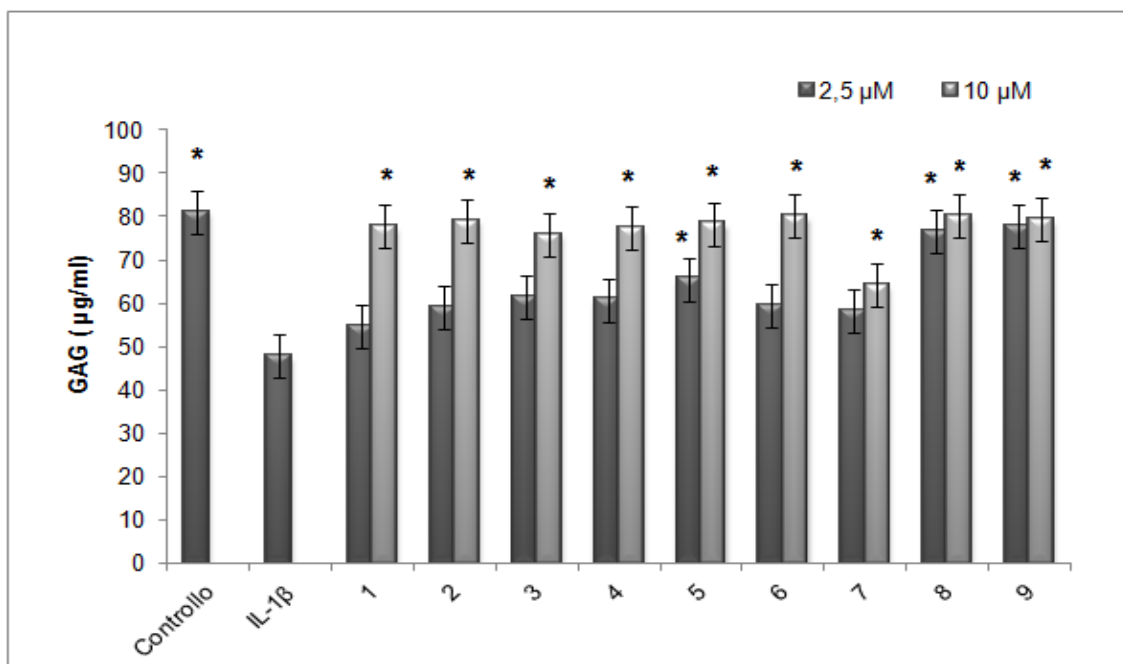


Grafico 5.1 Effetto dei 5-ariliden-4-tiazolidinoni derivati 1-9 nel rilascio di GAGs. Rilascio di GAGs in colture di condrociti stimolati con IL-1 β (10ng/mL) dopo trattamento di 120 h con i composti 1-9 alle concentrazioni di 2,5 μ M e 10 μ M. * Significativamente differenti dal campione trattato con IL-1 β (P < 0.005).

Il [grafico 5.1](#) mostra la determinazione dei livelli di GAGs nel terreno di coltura dei condrociti, ottenuta attraverso il metodo Farndale, dai quali si può evincere come la concentrazione dei GAGs è stata ridotta significativamente in cellule esposte a IL-1 β (10 ng/ml). Tutti i composti testati, alle concentrazioni di 2,5 e 10 μ M, hanno mostrato un effetto protettivo nei confronti del tessuto cartilagineo ed alla concentrazione più alta riportano a valori uguali rispetto al controllo non trattato. Tutti i composti testati ad entrambe le concentrazioni utilizzate,

aumentano il rilascio di GAGs, in modo dose-dipendente in accordo con i dati EC₅₀.

L'NO riveste un ruolo importante nella patogenesi di numerosi eventi cellulari coinvolti nel processo infiammatorio; è il prodotto dell'attività enzimatica della NOS che esiste in due isoforme: una costitutiva (cNOS) e l'altra inducibile (iNOS). L'IL-1 β , in condizione patologiche, induce un rilascio abnorme di NO da parte dei condrociti, stimolando probabilmente l'attività della iNOS.

Nel grafico 5.2 sono rappresentati i risultati ottenuti dopo aver incubato i composti in esame per 120 ore, alla concentrazione di 2,5 e 10 μ M. Si può osservare che la produzione di NO nei condrociti in condizioni basali è molto bassa, ciò è dovuto principalmente all'attività della cNOS. Vari studi hanno mostrato come la produzione basale di NO sia necessaria per mantenere sana la cartilagine articolare e che la totale soppressione farmacologia di NO potrebbe favorire l'insorgenza e la progressione dell'OA. Quando i condrociti umani sono trattati con IL-1 β (10 ng/ml) si osserva un incremento notevole della produzione di NO. Tutti i composti in esame, in confronto al campione non trattato, inducono una ridotta produzione di NO ad entrambe le concentrazioni utilizzate, in modo dose-dipendente. I composti più attivi si sono mostrati il composto **4** ed i derivati acetici **7- 8 e 9**.

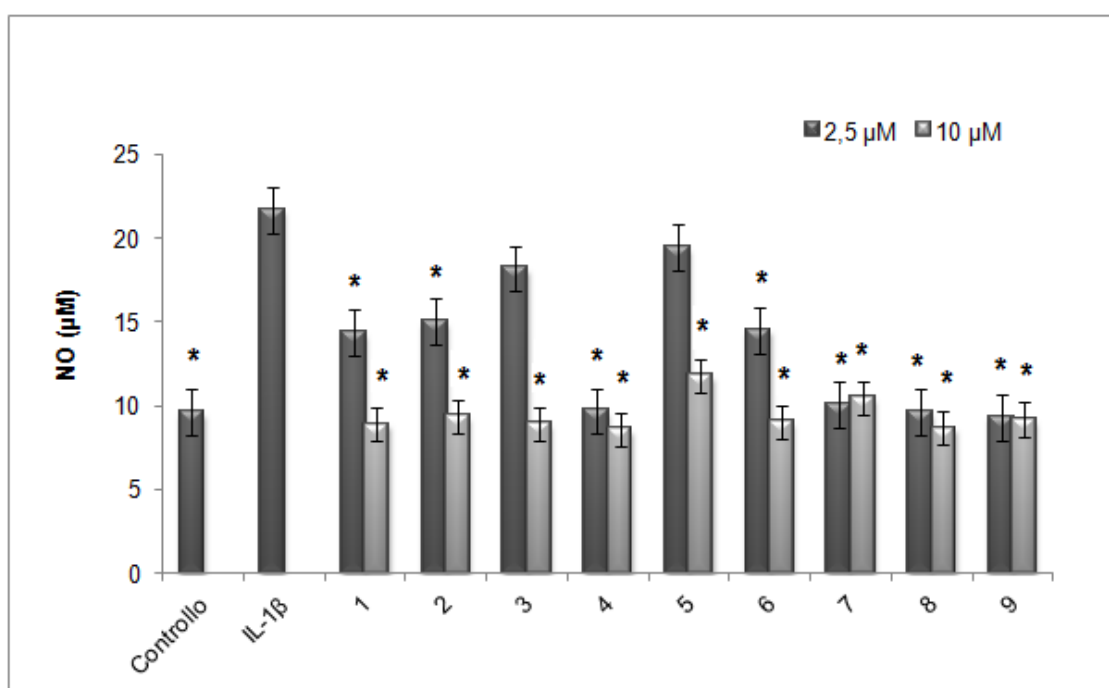


Grafico 5.2 . Effetto dei 5-ariliden-4-tiazolidinoni 1-9 sulla produzione di NO. La produzione di NO (μM) in colture di condrociti stimolati con IL-1 β dopo 120 h di trattamento con le sostanze in esame alle concentrazioni di 2.5 and 10 μM .* Significativamente differenti dal campione trattato con IL-1 β (P < 0.005).

5.4. MATERIALI E METODI

5.4.1. Metodo di sintesi degli acidi 4-(5-ariliden-2,4-diossotiazolidin-3-il metil) benzoici (Figura 34, 4-6) [104]

Metodo generale: una miscela di 5-ariliden-2,4-tiazolidindione (10 mmol), acido 4-(bromometil)benzoico (4.30 g, 20 mmol) e potassio carbonato (5.33 g, 40 mmol) in acetone (150 ml) viene posta a riflusso per 48 ore. Il solvente viene evaporato a pressione ridotta e il residuo solido viene solubilizzato in metanolo; la soluzione viene acidificata con HCl (pH 3) e viene mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per circa 30 minuti. Dopo evaporazione completa sotto vuoto, il grezzo viene lavato con H₂O e ricristallizzato da metanolo per fornire gli acidi benzoici puri.

Acido 4-[5-(4-benzilossibenziliden)-2,4-diossotiazolidin-3-ilmetil] benzoico (4) (Figura 34, 4): Resa 90 %; p.f. 250 °C (dec.); ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 4.92 (s, 2H, NCH₂); 5.21 (s, 2H, OCH₂); 7.21 (m, 2H, arom); 7.38-7.50 (m, 7H, arom); 7.62 (m, 2H, arom); 7.93 (m, 2H, arom); 7.95 (s, 1H, CH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 44.3 (NCH₂); 69.5 (OCH₂); 115.7, 127.5, 127.8, 128.0, 128.5, 129.6, 132.3, 133.5 (CH arom + CH arilidenico); 117.8 (5-C); 125.5, 130.2, 136.4, 140.3, 160.3 (Cq arom); 165.6, 166.9, 167.4 (C=O); Anal. (C₂₅H₁₉NO₅S) C, H, N. (PM=431)

Acido 4-[5-(4-fenossibenziliden)-2,4-diossotiazolidin-3-ilmetil] benzoico (5) (Figura 34, 5): Resa 50 %; p.f. 252 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 4.91 (s, 2H, CH₂); 7.11-7.15 (m, 4H, arom); 7.23 (m, 1H, arom); 7.41-7.49 (m, 4H, arom); 7.67 (m, 2H, arom); 7.92 (m, 2H, arom); 7.97 (s, 1H, CH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 44.4 (CH₂); 119.3 (5-C); 118.2, 119.8, 124.6, 127.5, 129.6, 130.2, 132.4, 133.0 (CH arom + CH arilidenico); 130.1, 140.2, 155.0, 159.1 (Cq arom); 165.5, 166.9, 167.3 (C=O); Anal. (C₂₄H₁₇NO₅S) C, H, N. (PM=355)

Acido 4-(5-naftalen-1-ilmetilen-2,4-diossotiazolidin-3-ilmetil) benzoico (6) (Figura 34, 6): Resa 60 %; p.f. 268 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 4.93 (s, 2H, CH₂); 7.45 (m,

2H, arom); 7.57-7.73 (m, 4H, arom); 7.92 (m, 2H, arom); 8.02-8.14 (m, 3H, arom); 8.59 (s, 1H, CH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 44.3 (CH₂); 123.4, 125.5, 126.4, 126.8, 127.4, 127.6, 128.8, 129.6, 130.5, 131.0 (CH arom + CH arilidenico); 124.7 (5-C); 130.1, 130.2, 130.8, 133.2, 140.1 (Cq arom); 166.9, 167.1, 167.6 (C=O); Anal. (C₂₂H₁₅NO₄S) C, H, N. (PM=389)

5.4.2. Metodo di sintesi degli acidi (5-ariliden-2,4-diossotiazolidin-3-il)acetici (Figura 34, 7-9)

Metodo generale: il 2,4-tiazolidindione commerciale (1.3 g, 17 mmoli) viene solubilizzato in 30 ml di acetone anidro. Alla soluzione vengono aggiunti K₂CO₃ (4.7 g, 34 mmoli) e metilbromoacetato (5.0 g, 34 mmoli). Dopo evaporazione del solvente a pressione ridotta, il grezzo viene solubilizzato in CHCl₃, la fase organica viene lavata con H₂O (3×100ml) e disidratata con Na₂SO₄ anidro. Dopo evaporazione del solvente, il solido, costituito dall'estere metilico dell'acido (2,4-diossotiazolidin-3-il)acetico (10 mmoli), viene posto a riflusso con AcOH (120 ml) e HCl 12N (30 ml) per 90 minuti. Dopo concentrazione sotto vuoto, il residuo viene posto nuovamente a riflusso con AcOH (120 ml) e HCl 12N (30 ml) per 90 minuti. Dopo evaporazione sotto vuoto fino a secchezza, il residuo viene lavato più volte con H₂O e ricristallizzato da etanolo per dare l'acido (2,4-diossotiazolidin-3-il)acetico puro. Quest'ultimo (1.7 g, 10 mmoli) viene posto a riflusso con l'opportuna benzaldeide (10 mmoli) e con piperidina (8 mmoli) per 24 ore. Il grezzo di reazione viene versato in H₂O e acidificato con AcOH per dare i composti **7-9**, che vengono ottenuti puri dopo cristallizzazione da metanolo.

Acido [5-(3-benzilossibenziliden)-2,4-diossotiazolidin-3-il] acetico (7) (Figura 34, 7): Resa 94 %; p.f. 216–217 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 4.35 (s, 2H, CH₂); 7.05–7.46 (arom); CH 7.82 (s, 1H, CH, arilidene); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 132.1 (CH); 40.9 (CH₂); 117.8, 118.1, 119.1, 122.9, 123.5, 128.7, 129.4, 133.3, 154.7, 156.7 (Cq arom); 120.6 (5-C); 163.8, 165.6, 166.6 (C=O); Anal. (C₁₈H₁₃NO₅S) C, H, N. (PM=355)

Acido [5-(4-Benzilossibenzilidene)-2,4-diossotiazolidin-3-il] acetico (8) (Figura 34, 8): Resa 41%; pf 262 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 4.40 (s, 2H, CH₂); 5.23 (s, 2H, CH₂O); 7.22 (m, 2H, arom); 7.39–7.51 (m, 5H, arom); 7.65 (m, 2H, arom); 7.99 (s, 1H, CH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 42.1 (CH₂); 69.5 (CH₂O); 117.5 (5-C); 115.8, 127.8, 128.0, 128.5, 132.4 (CH arom); 133.8 (CH metilidene); 125.5,

136.4, 160.4 (Cq arom); 165.1, 167.0, 167.9 (CO); Anal. (C₁₉H₁₅NO₅S) C, H, N. (PM=369)

Acido [5-(4-Ildrossibenzilidene)-2,4-diossotiazolidin-3-il] acetico (9) (Figura 34, 9): Resa 74%; pf 257 °C; ¹H NMR (DMSO-d₆): d 4.36 (s, 2H, CH₂); 6.97 (m, 2H, arom); 7.54 (m, 2H, arom); 7.90 (s, 1H, CH); 10.41 (br s, 1H, OH); ¹³C NMR (DMSO-d₆): d 42.1 (CH₂); 116.4, 132.7 (CH arom); 116.1, 160.3 (Cq arom); 123.7 (5-C); 134.3 (CH metilidene); 165.2, 167.0, 167.9 (CO); Anal. (C₁₂H₉NO₅S) C, H, N. (PM=279)

Apparecchiature della fase sintetica

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio Kofler-Reichert. Per le analisi elementari è stato utilizzato un analizzatore Carlo Erba mod. 1106, i dati corrispondono ai valori teorici con uno scarto di ± 0,4. Gli spettri di massa sono stati ottenuti con uno spettrometro GC17/MSQP5050 Shimadzu. Gli spettri ¹H e ¹³C NMR sono stati registrati con uno spettrometro Varian 300 MHz. I chemical shift sono espressi in ppm (δ) dal riferimento interno (Me₄Si) e si riferiscono a soluzioni in CDCl₃ o DMSO-d₆. I valori delle costanti di accoppiamento (J) sono riportati in Hz. Gli spettri ¹³C NMR sono stati ottenuti con esperimenti di “attached proton test” (APT). Per i controlli su TLC sono state utilizzate lastre di gel di silice GF₂₅₄ (Merck). La cromatografia su colonna è stata eseguita utilizzando come fase stazionaria gel di silice (70-230 mesh e 230-300 mesh, Merck). Per l’irraggiamento con microonde è stato utilizzato un forno a microonde Discover (CEM).

5.4.3. Test fluorimetrico per MMP-13: EC₅₀

composti sono stati valutati per la loro capacità di inibire l’idrolisi del peptide fluorescente (Biomol, Inc.), la cui sequenza amminoacidica è: Mca-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂AcOH. La Mca è un fluoroforo, quando è legata al peptide la Dpa assorbe la fluorescenza emessa dalla Mca (quench di fluorescenza). Le MMPs scindono il legame Gly-Leu, separando la Mca dalla Dpa, in questo modo la Mca, eccitata alla lunghezza d’onda di 328 nm, riemette luce a lunghezza d’onda maggiore (max a 393 nm). Il saggio è stato condotto, in multiwell da 96 pozzetti dal volume di 250 µl, con buffer per MMP 13 usando

l'enzima proteolitico (MMP-13) ad una concentrazione 10 nM e il peptide a 1µM. L'enzima è stato incubato a 25 °C con concentrazioni crescenti di inibitore e la fluorescenza è stata misurata per 5 minuti dopo l'aggiunta del substrato usando uno spettrofluorimetro (Perkin Elmer Victor V3). L'inibitore acido *N*-isobutil-*N*-[4-metossifenilsulfonil]glicil idrossamico (Biomol, Inc.) è stato usato come controllo.

Preparazione del buffer per MMP-13: Il buffer per la MMP-13 ha la seguente composizione:

HEPES (acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico)	50mM
CaCl ₂	5 mM
ZnCl ₂	0,1 mM
Brij (Poliossietilenglicol dodecil etere)	0,05 %
pH	7

Preparazione della soluzione di inibitore: Il potenziale inibitore si solubilizza in DMSO e viene diluito in varie soluzioni a concentrazioni decrescenti:

100 mM, 10 mM, 1 mM
 100 µM, 10 µM, 1 µM, (0,1 µM)

5.4.4. Preparazione di colture di condrociti

L'allestimento di una coltura cellulare di condrociti richiede innanzitutto la dissezione di cartilagine umana, che proviene generalmente da pezzi operatori (testa di femore) in seguito ad interventi chirurgici di protesi. Essa viene ridotta in frammenti sottili di piccole dimensioni (circa 3 mm in lunghezza) utilizzando bisturi sterili. I frammenti vengono raccolti in una capsula Petri e pesati in una bilancia elettronica. Essi sono poi sminuzzati e trasferiti in una nuova capsula nella quale viene aggiunto medium completo senza Fetal Calf Serum (FCS). I campioni, infine, vengono tenuti in un incubatore a 37°C con 5% di CO₂ e 95% di aria umidificata per 24 ore. La procedura di isolamento viene condotta in condizioni asettiche sotto cappa sterile. Le cellule cartilaginee vengono isolate

mediante tre passaggi sequenziali di digestione enzimatica della matrice extracellulare:

1. incubazione con ialuronidasi 0.1% (1mg/ml per 100 mg di cartilagine da digerire), (hyaluronidase Type III) per 30 min, a 37°C;
2. incubazione con Pronasi 0.5% (5 mg/ml per 100 mg di cartilagine), (pronase type XIV), per 60 min a 37°C;
3. incubazione con Collagenasi 0.2% (2 mg/ml per 100 mg di cartilagine); (collagenase type IA) per 45 min a 37°C in agitazione.

Gli enzimi vengono disciolti tutti in medium senza siero. Questi enzimi che agiscono rispettivamente su PGs, molecole proteiche non collagene e fibre collagene, consentono una degradazione progressiva dei frammenti, poiché grazie all'azione diretta su ciascun costituente specifico della cartilagine permettono lo smascheramento e, quindi, l'accessibilità di nuove strutture per l'azione enzimatica della fase successiva. La sospensione cellulare così ottenuta viene filtrata con filtri da 100 µm e 70 µm in modo da eliminare i residui della digestione e gli aggregati cellulari per ottenere una sospensione condrocitaria monocellulare. Si aggiunge una uguale quantità di medium completo con FCS, si centrifuga a 1700 rpm per 7 minuti a 25° C. Si aspira il surnatante e lo si butta, si utilizza il *pellet* a cui si aggiungono altri 5 ml di medium completo con FCS e si risospende. Si mette in una fiasca da 5 ml e si osserva se le cellule siano fluttuanti. Si effettua l'incubazione a 37°C per 48 h.

Preparazione del medium completo senza FCS: per preparare 200ml di medium occorrono:

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	192mL
Hepes (1M)	2mL
Sodio piruvato	2mL
Antibiotici (penicillina/streptomina)	2mL
Glutammina	2mL

Preparazione del medium completo con FCS: la composizione è la medesima, ma vengono usati 172 mL di DMEM ed addizionati di 20 ml di FCS.

Preparazione del composto di riferimento: si solubilizza il composto di riferimento con DMSO per ottenere una soluzione 10^{-3} M. Si diluisce in rapporto 1:100 con medium di coltura.

Preparazione dei tiazolidinoni : i composti vengono solubilizzati in DMSO per ottenere una concentrazione di 10^{-3} M. Successivamente si diluiscono con medium alle concentrazioni di 10 μ M e 2,5 μ M.

5.4.5. Saggio di vitalità cellulare (MTT)

La vitalità cellulare si è misurata attraverso il saggio colorimetrico ai sali di tetrazolio, [105] che valuta la capacità delle cellule di ridurre, per mezzo della succinato deidrogenasi mitocondriale, il bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT). L'MTT entra nelle cellule e passa nei mitocondri dove è ridotto in un prodotto colorato ed insolubile, il formazano. Per rendere visibile il colore si solubilizzano i granuli colorati di formazano tramite l'aggiunta di DMSO. La reazione *MTT-cleavage* richiede la completa integrità della cellula ed è proporzionale al grado di attività metabolica della stessa. Dopo incubazione delle cellule per tre ore, in 5% CO₂ a 37°C, con 20 μ l della soluzione del sale di tetrazolio, solubilizzato in medium (5 mg/ml), e 180 μ l di medium, si rimuove il sovrantante e si aggiungono 100 μ l di DMSO. Per ogni campione si allestiscono prove in triplicato e su ognuna viene misurata la densità ottica a $\lambda=550$ nm con uno spettrofotometro per micropiastre (Titertek Multiscan, Flow Laboratories). La vitalità cellulare viene espressa come in % Abs rispetto a quella del controllo non trattato.

5.4.6. Dosaggio dei GAGs

La concentrazione totale di GAGs nel medium di coltura viene misurata attraverso un dosaggio spettrofotometrico quantitativo (metodo di Farndale) [106] in micropiastra a 96 pozzetti in cui ad ogni 4 μ l di surnatante vengono aggiunti 250 μ l di 1,9-dimethylemethylene blue (DMB). L'assorbanza dei campioni viene determinata su un lettore multiskan a $\lambda=535$ nm. Questo metodo richiede la costruzione preliminare di una curva standard di riferimento per concentrazioni di GAGs comprese tra i 100-500 μ g. A tale scopo sono pesati 0,2 mg di condroitina solfato e vengono solubilizzati in 0,2 ml di tampone fosfato ottenendo una soluzione standard di riferimento (stock solution o SS) di 1 mg/ml.

Tampone formiato : in una bilancia elettronica si pesa 1 gr di sodio formiato anidro che viene disciolto in 20 ml di acqua distillata sotto agitazione (questa soluzione ha un pH pari a 9). Si aggiunge 250 μ l di acido formico al 98% (pH=4,47) e sodio formiato solido sino ad ottenere un pH di 5.48. Aggiungendo acqua distillata il tampone viene portato ad un volume finale di 500 ml.

Tampone fosfato : si pesano 5,1 g di fosfato monobasico di sodio (NaH_2PO_4) in una bilancia elettronica e si disciolgono in 85 ml di acqua distillata, ottenendo una soluzione 0.5 M. Si pesano 5,68 g di fosfato bibasico di sodio (Na_2HPO_4) che vengono disciolti in 40 ml di acqua distillata, per ottenere una soluzione 0.1 M. Le due soluzioni vengono mescolate, ottenendo così un volume finale di 125 ml, il cui pH è 7. Poi si porta al volume di 500 ml con acqua distillata.

Preparazione della soluzione di DMB: in una bilancia elettronica si pesano 8 mg di DMB che vengono dissolti in 2,5 ml di etanolo assoluto. A questa soluzione si aggiungono 47,5 ml di tampone formiato così si ottiene una stock solution (s/s) di DMB. Per effettuare il saggio bisogna diluire 5 ml di s/s di DMB in 45 ml di tampone formiato (diluizione 1:10).

5.4.7. Determinazione dei livelli NO

L'NO è una molecola altamente reattiva con emivita brevissima che in condizioni fisiologiche si ossida spontaneamente in un composto stabile: NO^{2-} . Pertanto, il rilascio di NO può essere valutato per via indiretta attraverso la determinazione dei suoi metaboliti NO^{2-} (metodo di Griess). [107] La concentrazione di NO^{2-} viene misurata mediante un dosaggio spettrofotometrico in micropiastra a 96 pozzetti in cui ad ogni 100 μ l di surnatante vengono aggiunti 100 μ l di sulfanilamide (SA), ponendo al riparo dalla luce per 5 minuti, e 100 μ l di 0.1% N-(1-naftil) etilendiamina cloruro (NED) (Sigma) in 5% di acido cloridrico per 10 min. a temperatura ambiente e sempre al riparo dalla luce. La reazione di Griess consente di ottenere a partire dai NO^{2-} un composto dotato di un ponte azoico che assorbe fra 520 e 590 nm. L'assorbanza dei campioni viene determinata su un lettore multiskan a $\lambda=570$ nm e la concentrazione di NO^{2-} (μM) viene ricavata utilizzando una curva di riferimento con concentrazione note di NaNO_2 (0-500 μM) in acqua distillata.

Preparazione del reattivo di Griess: poco prima di iniziare il saggio si pesano in una bilancia elettronica 0.1g di SA che vengono portati in soluzione con 10 ml di HCl 3 M e 0.1 g di NED che si solubilizzano in 10 ml di acqua bidistillata.

5.5 ANALISI STATISTICA

Per ciascun test sono stati allestiti esperimenti indipendenti della durata di 48 ore. Ogni risultato è stato riportato negli istogrammi rappresentanti le medie \pm l'errore standard di tre esperimenti realizzati in triplicato. I risultati sono stati comparati al controllo e all'IL-1 β . Il t-test di Student e l'Anova sono stati impiegati per calcolare la significatività delle differenze tra le medie.

SECONDA PARTE SPERIMENTALE

CAPITOLO 6- SECONDA PARTE SPERIMENTALE

6.1. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo della seconda parte del mio lavoro di tesi, riguarda la valutazione dell'attività antinfiammatoria, antiossidante ed antidegenerativa, di composti a struttura tiazolidinonica, in cui sono state introdotte appropriate modifiche ai composti analizzati.

Infatti, tra i composti presi in esame nella prima fase, sono stati selezionati quelli più attivi nell'inibire il rilascio di NO a livello cellulare e sono state introdotte modifiche strutturali in funzione della loro possibile attività e selettività nei confronti delle MMPs maggiormente coinvolte nel processo osteoartritico, la MMP-13 e la MMP-3.

In corso di patologia osteoartritica si assiste ad una serie di eventi ossidativi che sostengono il processo infiammatorio e degradativo dell'ECM. Infatti in condizioni di stress ossidativo il fattore NFkB viene attivato, traslocando nel nucleo dei condrociti, a livello del quale è indotta la trascrizione di geni che codificano per proteine pro-infiammatorie, quali l'ICAM-1, e per diversi enzimi quali la COX2, l'iNOS e le MMPs.

Viene così innescato un processo infiammatorio e degenerativo che conduce alla progressiva degradazione dell'ECM.

Dunque nella seconda fase del mio lavoro di tesi, nuovi tiazolidinoni opportunamente modificati sono stati saggiati sia come inibitori delle MMP-3 e 13, sia come possibili agenti antiossidanti.

Sulla base dei risultati ottenuti, i composti sono stati valutati *in vitro* per la loro capacità di inibire il processo infiammatorio/ ossidativo, attraverso la valutazione dell'espressione di NFkB e ICAM-1 e dei livelli di NO e GAGs.

6.2. SCHEMA DI SINTESI

6.2.1. Schema generale di sintesi degli acidi (5-ariliden-4-oxo-2-tioxo-1,3-tiazolidin-3-il) acetici

Gli acidi (5-ariliden-4-oxo-2-tioxo-1,3-tiazolidin-3-il) acetici sono stati sintetizzati a partire dall'acido (4-oxo-2-tioxo-1,3-tiazolidin-3-il) acetico, in presenza di piridina, etanolo e dell'opportuna benzaldeide, secondo il seguente schema generale di sintesi (Figura 38):

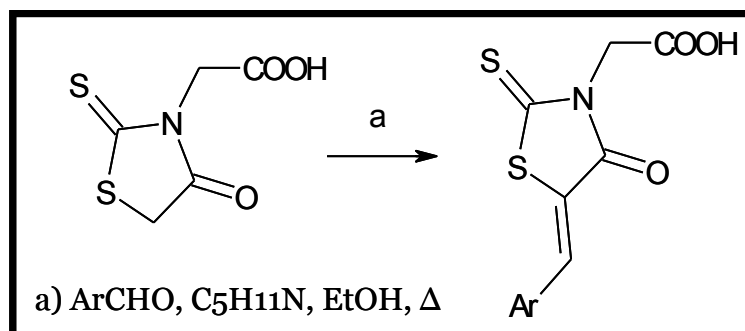
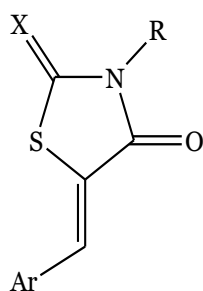


Figura 38. Schema di sintesi degli acidi (5-ariliden-4-oxo-2-tioxo-1,3-tiazolidin-3-il) acetici.

6.3. RISULTATI E DISCUSSIONI

La seconda parte del mio lavoro di tesi si è sviluppata a partire dai risultati acquisiti nella prima fase, dalla quale è emerso che i derivati acetici (7-9), tra quelli presi in esame (Figure 34), sono i composti più attivi per la loro capacità di inibire il rilascio di NO in colture di condrociti stimolati con IL-1 β .

Sulla base di ciò sono state introdotte specifiche modifiche alla struttura tiazolidinonica, sostituendo l'atomo di ossigeno in posizione 2 con un atomo di zolfo, considerando che il gruppo tiosotiazolidinonico è un gruppo chelante lo ione Zinco (ZBG), [108] presente nel sito attivo delle MMPs.



Composto	R	X	Ar
10	CH ₂ COOH	S	4-OC ₆ H ₅ -C ₆ H ₄
11	CH ₂ COOH	S	3-OC ₆ H ₅ -C ₆ H ₄
12	CH ₂ COOH	S	4-OCH ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄
13	CH ₂ COOH	S	3-OCH ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄

Figura 39. Struttura dei tiazolidinoni in esame 10-13.

Inoltre è stato valutato l'effetto determinato dalla presenza dei gruppi 3-fenossibenzilidenico e 4-benzilossibenzilidenico, sia nei confronti dell'inibizione delle MMPs che sull'attività cellulare. A tale scopo è stata valutata l'attività inibitoria (EC_{50}) sia sulla MMP-13 che sulla MMP-3, entrambe coinvolte nel processo osteoartritico

Vari studi [109] hanno mostrato il coinvolgimento dello stress ossidativo nella patologia osteoartritica. Infatti stimoli ossidativi attivano la cascata delle chinasi, lasciando libero il fattore di trascrizione NF- κ B di traslocare nel nucleo. In questa sede il fattore NF κ B induce la trascrizione di geni che codificano per diverse proteine pro-infiammatorie, tra cui la molecola di adesione ICAM-1, e di agenti ossidanti, come l'NO prodotto dall' iNOS, enzima la cui espressione viene attivata dall'NF- κ B. Quindi risulta assai utile, nel trattamento della patologia osteoartritica, l'uso di sostanze dotate di attività antiossidanti.

In considerazione di ciò è stata saggiata l'attività antiossidante dei composti in esame, tramite il metodo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity); [110] successivamente è stata valutata l'attività antinfiammatoria /antiossidante su colture di condrociti stimolati con IL-1 β , attraverso l'espressione di NF κ B ed ICAM-1, mediante analisi Western Blot, ed il rilascio di NO, mediante il metodo di Griess.

Infine vari studi [111] hanno mostrato come il ripristino dei livelli di GAGs, oltre che indurre un effetto condroprotettivo, inibisce l'attivazione di NF κ B, indotta dall'IL-1 β , in condrociti umani; da tale premessa è apparso utile valutare i livelli di GAGs nel terreno di coltura dei condrociti trattati con le sostanze in esame.

Attraverso il saggio di vitalità cellulare, MTT, è stato possibile valutare l'eventuale citotossicità dei derivati 2-tiosso-4-tiazolidinonici alle concentrazioni di 2,5 μ M e 10 μ M; i composti alle concentrazioni utilizzate non interferiscono con la vitalità delle cellule, riuscendo a metabolizzare il sale di tetrazolio, ridotto dalla succinato deidrogenasi nel composto insolubile e colorato formazano. (dati non mostrati).

6.3.1. EC_{50} e SAR

In condizioni fisiologiche, le MMPs sono responsabili di processi fondamentali, quali il mantenimento dell'omeostasi dell'ECM, il rimodellamento tissutale, la guarigione delle ferite, l'angiogenesi e l'apoptosi.

Esse sono anche implicate nei processi patofisiologici di diverse patologie, quali l'artrite, il cancro, la sclerosi multipla, conseguenza di una loro over-espressione. [112]

La necessità di un' inibizione selettiva delle MMPs rappresenta un punto cruciale nella ricerca di composti ad attività inibitoria, poiché diverse patologie sono mediate da differenti isoforme di MMPs. Inoltre la mancanza di selettività conduce a problemi di tossicità, legata proprio all'inibizione indiscriminata di varie MMPs. Lo sviluppo di inibitori selettivi delle MMPs può aiutare a superare alcuni degli effetti collaterali indesiderati che ostacolano il successo clinico di questi composti. [113]

Gran parte degli inibitori delle MMPs riportati in letteratura possiedono un gruppo funzionale capace di chelare lo zinco catalitico presente nel sito attivo dell'enzima, lo Zinc-Binding-Group (ZBG), ed una porzione planare e lipofila capace di occupare prevalentemente il sito di legame S1' dell'enzima. I derivati in possesso di una funzione chelante di tipo idrossammico sono risultati gli inibitori più potenti ed efficaci, ma hanno mostrato problemi di biodisponibilità e tossicità, spingendo la ricerca verso molecole in grado di ovviare a tali problematiche. [114]

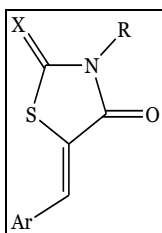
Recenti studi [114] hanno mostrato come piccole modifiche sul ZBG, ad esempio di idrofobicità o di pKa, possano modulare l'interazione nei confronti del sito S1' della MMPs e siano fondamentali ai fini di una interazione selettiva. Allo stesso modo, modifiche conformazionali del ZBG, possono influire sulla forza d'interazione enzima/inibitore, nonché sulla capacità d'interazione col sito secondario S1', dunque possono modulare non solo la selettività, ma anche la potenza dell'inibitore.

Sulla base di tali considerazioni, è stata valutata l'attività inibitoria su MMPs di nuovi 4-tiazolidinoni in cui l'atomo di ossigeno in posizione 2, rispetto alle molecole analizzate nella prima fase, è stato sostituito con un atomo di zolfo.

Tale modifica è stata apportata sulla base del fatto che il gruppo tiossotiazolidinonico è un ZBG, quindi risulta favorevole per l'interazione con l'enzima.

Inoltre opportune modifiche sono state introdotte alla porzione arilica della molecola, per valutare l'effetto dei gruppi fenossibenzilidenico e benzilossibenzilidenico, in posizione 3 e 4 dei 2-tiosso-4-tiazolidinoni.

Ai fini della valutazione della selettività dei 2-tiosso-4-tiazolidinoni in esame, sono state prese in considerazione le MMPs maggiormente coinvolte nel processo osteoartrotico, la MMP-3 e la MMP-13, su cui è stato effettuato il saggio fluorimetrico di inibizione enzimatica. La MMP-3, nota anche come stromelina 1, agisce direttamente sulla cartilagine, degradando vari componenti della matrice, quali i PGs, la fibronectina, il collagene di tipo IV, la laminina ed il collagene di tipo IX. La MMP-13 agisce degradando le fibrille di collagene, specialmente quelle di tipo II, il più rappresentato a livello cartilagineo. [79-80]



Compd	R	X	Ar	EC 50	EC 50	LogP ^a
				MMP-13	MMP-3	
10	CH ₂ COOH	S	4-OC ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	3,8 μM	8,96 μM	3.94
11	CH ₂ COOH	S	3-OC ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	4,7 μM	14,2 μM	3.94
12	CH ₂ COOH	S	4-OCH ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	6,97 μM	58,5 μM	4.01
13	CH ₂ COOH	S	3-OCH ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	1,59 μM	4,19 μM	4.01

Tabella 6.1. Inibizione della MMP-13 e MMP-3

Dai risultati di EC₅₀ mostrati in tabella 6.1 si evince come tutti i composti siano in grado di inibire le MMP-3 e 13, anche se in modo non selettivo, in quanto ugualmente attive su entrambe le MMPs, ad eccezione del composto **12**, che risulta essere selettivo nei confronti della MMP-13, con un valore di EC₅₀ pari a 6,97 μM, rispetto alla MMP-3 (EC₅₀ = 58,5 μM).

Inoltre è possibile evidenziare come l'allungamento della catena in posizione 4 non sia favorevole all'attività sulla MMP-13, infatti il derivato col gruppo 4-benzilossibenzilidenico (**12**) ha un valore di EC₅₀ pari a circa il doppio (EC₅₀ = 6,97 µM) del derivato col gruppo 4-fenossibenzilidenico (**10**) (EC₅₀ = 3,8 µM).

Lo stesso comportamento si può osservare nei confronti della MMP-3, in cui il composto **12** è circa 5 volte meno attivo (EC₅₀ = 58,5 µM) del suo analogo inferiore **10** (EC₅₀ = 8,96 µM)

Al contrario, in posizione 3 della porzione arilica tale modifica risulta favorevole per l'attività, infatti il derivato col gruppo 3- benzilossibenzilidenico (**13**) risulta circa 3 volte più attivo (EC₅₀ = 1,59 µM) del derivato 3 fenossibenzilidenico (**11**) (EC₅₀ = 4,7 µM), nei confronti della MMP-13.

Analogamente nei confronti della MMP-3 il derivato **13** risulta essere circa tre volte più attivo (EC₅₀ = 4,19 µM) dell'analogo inferiore **11** (EC₅₀ = 14,2 µM).

Infine possiamo notare (Tabella 6.3) come i composti **10-13**, rispetto ai loro osso-derivati (**7-8**) presentino una migliore attività sia nei confronti della MMP-13 che della MMP-3; su quest'ultima addirittura i composti **7-8** sembrano essere non attivi.

Ciò dimostra come la modifica effettuata in posizione 2 dell'anello tiazolidinonico sia favorevole per l'attività dei composti in esame.

Compd	X	Ar	EC ₅₀ MMP-13	EC ₅₀ MMP-3
7	O	3-OC ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	11,1 µM	n.a.*
8	O	4-OCH ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	22,3 µM	n.a.*
10	S	4-OC ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	3,8 µM	8,96 µM
11	S	3-OC ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	4,7 µM	14,2 µM
12	S	4-OCH ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	6,97 µM	58,5 µM
13	S	3-OCH ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	1,59 µM	4,19 µM

Tabella 6.3. Inibizione enzimatica su MMP-13 e 3 dei derivati acetici. (* n.a. = non attivi)

6.3.2. Attività antiossidante: ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Lo stress ossidativo svolge un ruolo rilevante nell'insorgenza della patologia osteoartritica. Numerosi fattori determinano la formazione di radicali liberi in sede articolare, ad esempio stress meccanici o traumi, condizioni di ipossia/riperfusion microemorragie e infiammazione. [115] Inoltre, l'aumento della produzione di specie radicaliche con l'invecchiamento, dovuto al deficit dei sistemi fisiologici antiossidanti, può spiegare perché l'OA sia una patologia altamente correlata con l'età. [116]

Lo stress ossidativo sostiene il processo infiammatorio e di degradazione dell'ECM, tipici dell'OA; ciò avviene attraverso l'attivazione dell'NF- κ B che, a sua volta, aumenta l'espressione di citochine pro-infiammatorie (IL-1 β e TNF- α), di enzimi pro-infiammatori (COX-2 e iNOS), di molecole di adesione (ICAM-1 e VCAM-1), e di enzimi degradanti l'ECM (MMPs). Condizioni di stress ossidativo, inoltre, contribuiscono all'attivazione della trascrizione genica dell'ICAM-1, esaltando ulteriormente la condizione di flogosi nelle articolazioni affette da OA. [117]

Pertanto, risulta assai utile l'uso di sostanze ad azione antiossidante nel trattamento e nella prevenzione della patologia osteoartritica.

I derivati 2-tiosso-4-tiazolidinoni sono stati sottoposti al saggio ORAC [110] per valutarne il loro potere antiossidante, in relazione ad un composto antiossidante di riferimento, il Trolox.

In questo saggio, l'attività scavenger dei composti in esame è stata valutata osservando il tempo di abbattimento della fluorescenza di una soluzione costituita da fluoresceina-AAPH. In presenza dei radicali perossidici, prodotti dall'AAPH nelle opportune condizioni di temperatura e pH, la fluoresceina viene degradata perdendo la sua fluorescenza. Un composto antiossidante presente nella miscela di reazione, interagendo con i radicali, determina un ritardo nella degradazione della fluoresceina. Una misura quantitativa dell'attività antiossidante delle sostanze in esame è stata ottenuta osservando la fluorescenza nel tempo fino al suo totale decadimento.

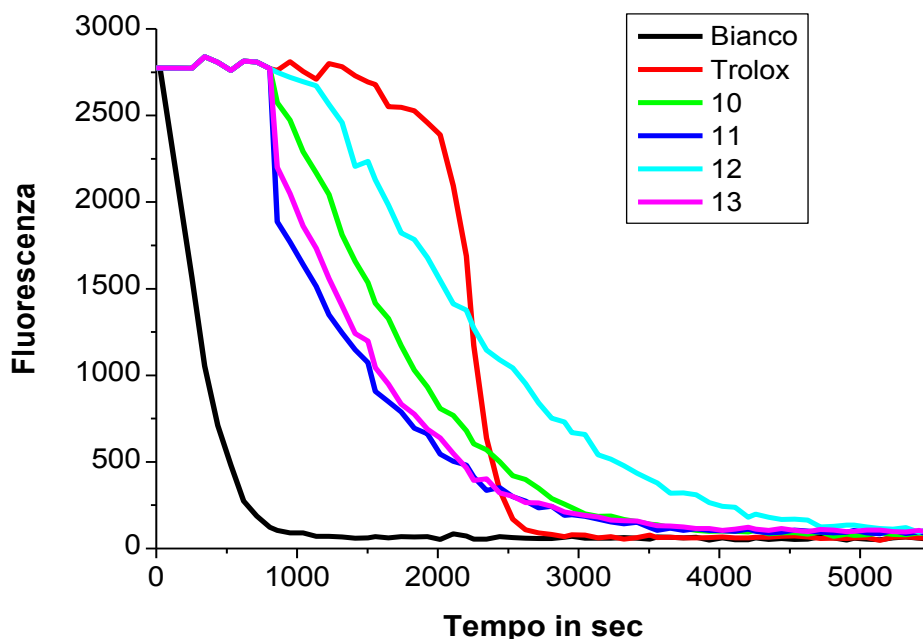


Grafico 6.1 . Tempo di abbattimento della fluorescenza di una soluzione di Fluoresceina-AAPH in presenza dei composti **10-13** e di un composto di riferimento: il Trolox.

Dal grafico 6.1, si evince come tutte le sostanze in esame posseggono attività antiossidante, in quanto tutte ritardano l’abbattimento della fluorescenza, rispetto alla soluzione fluoresceina–AAPH (Bianco).

Tutti composti esaminati hanno mostrato attività antiossidante (Tabella 6.3). In particolare, il composto **12** risulta essere il migliore (1,078 Unità ORAC), mostrando un’attività pari a quella del Trolox (1 Unità ORAC).

Tabella 6.3. Risultati ORAC dei composti 10-13, ottenuti calcolando per ogni composto l’Area Sotto la Curva (AUC), ed applicando la formula $AUC_{\text{campione}} - AUC_{\text{bianco}} \setminus AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{bianco}}$ per ricavare le unità ORAC.

	Unità ORAC*
Trolox	1
10	0,76
11	0,61
12	<u>1,078</u>
13	0,65

*1 unità ORAC equivale alla protezione netta fornita da una micromole di Trolox.

Inoltre come si può notare dai valori ORAC dei composti **7-8** (Tabella 6.4), le modifiche apportate alle struttura tiazolidinonica, sono risultate favorevoli ai fini del miglioramento dell'attività antiossidante.

Tabella 6.4. Risultati ORAC di composti 7-8, ottenuti calcolando per ogni composto l'Area Sotto la Curva (AUC), ed applicando la formula $AUC_{\text{campione}} - AUC_{\text{bianco}} \setminus AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{bianco}}$ per ricavare le unità ORAC.

*1 unità ORAC equivale alla protezione netta fornita da una micromole di Trolox.

	Unità ORAC*
Trolox	1
7	0,139
8	0,328

6.3.3. Western Blot: NFκB ed ICAM-1

Molecole ad attività antiossidante [118] hanno mostrato di inibire l'attivazione dell'NF-κB, come mostrato nella figura 40.

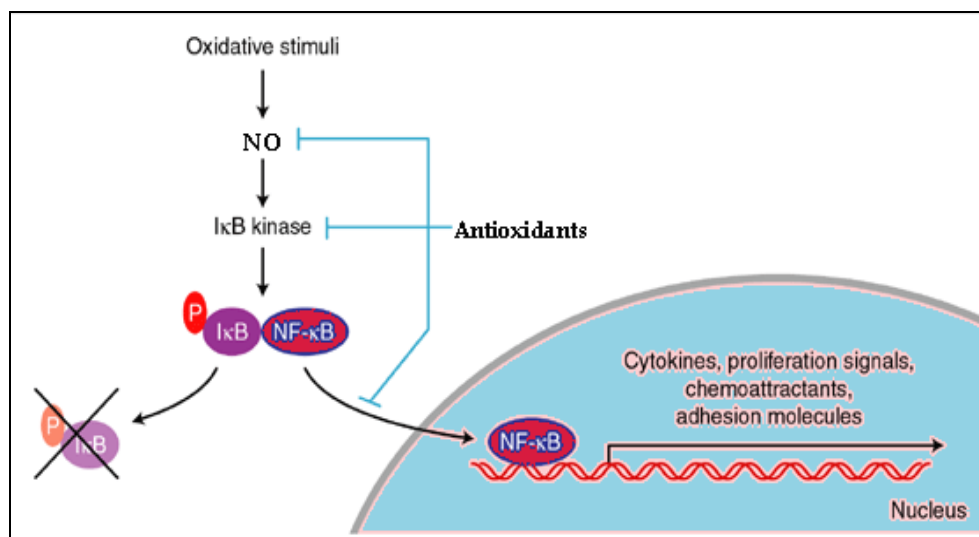


Figura 40. Effetto degli antiossidanti sull'attivazione dell'NF-κB.

Infatti, l'NF-κB rappresenta il fattore che media sia il processo ossidativo che quello infiammatorio nell'OA. Infatti condizioni di stress ossidativo, come una sovra produzione di NO, attivano la cascata delle chinasi, con conseguente fosforilazione dell'IκB. L'IκB viene degradato ed il dimero p50/p65, che costituisce l'NF-κB, viene lasciato libero di traslocare nel nucleo. Nel nucleo l'NF-κB induce la trascrizione di numerosi geni che codificano proteine pro-infiammatorie, come citochine (TNF-α e IL-1β), molecole di adesione, enzimi degradanti l'ECM (MMPs) ed enzimi pro-infiammatori, tra cui COX-2, responsabile degli alti livelli di prostaglandina E₂, e iNOS, che causa iperproduzione di NO, instaurando un meccanismo a feedback.

Nei saggi in vitro, tale condizione di stress ossidativo/infiammatorio è stata riprodotta utilizzando l'IL-1β, che legandosi a specifici recettori, presenti sulla superficie dei condrociti, stimola la cascata delle chinasi, con conseguente attivazione dell'NFκB. [119]

In tale contesto è dunque apparso utile valutare, tramite analisi western blot, la capacità dei composti **10-13** di inibire il processo infiammatorio/ossidativo che si innesca in corso di OA, attraverso la valutazione dell'espressione di NFκB.

I risultati vengono riportati nel [grafico 6.2](#).

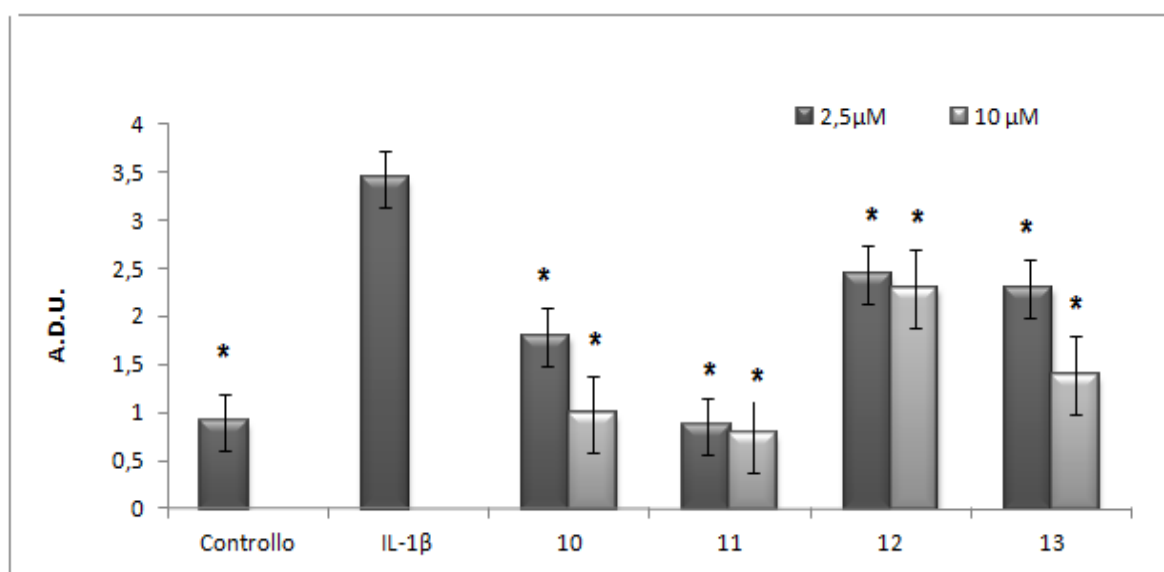


Grafico 6.2 . Effetto dei 2-tiosso-4-tiazolidinoni (**10-13**) sull'espressione di NFκB in colture di condrociti stimolati con IL-1β dopo 72 h di trattamento con le sostanze in esame alle concentrazioni di 2,5 and 10 μM, espresse come Unità Densitometriche Arbitrarie (A.D.U.).

* Significativamente differenti dal campione trattato con IL-1β (P < 0.005).

Dal [grafico 6.2](#) si evince come la stimolazione dei condrociti con IL-1β (10ng/ml) aumenta notevolmente l'espressione dell'NF-κB rispetto al controllo non trattato.

Tutti i composti esaminati hanno ridotto l'espressione del fattore di trascrizione. In particolare il composto **10**, già alla concentrazione più bassa (2,5 μM), riduce di circa il 50 % l'espressione dell'NF-κB, per ridurla ulteriormente alla concentrazione più alta (10 μM), fino a valori del controllo non trattato.

Tuttavia, i risultati migliori si sono ottenuti con il derivato **11**, che già alla concentrazione 2,5 μM riporta i valori di espressione dell'NF-κB a quelli espressi dal controllo non trattato. I derivati 4-benzilossibenzilidenici (**12**) e 3-benzilossibenzilidenici (**13**), invece, hanno mostrato una discreta riduzione dell'espressione del fattore NFκB .

L'NFκB regola l'espressione della proteina di adesione l'ICAM-1, tramite l'interazione dell'IL-1β con specifici recettori.

L'ICAM-1 è una glicoproteina transmembrana che appartiene alla superfamiglia delle immunoglobuline. E' fondamentale nella regolazione della risposta

immunitaria e infiammatoria. Infatti l'interazione con i suoi ligandi, LFA-1 sui linfociti e Mac-1 sui macrofagi, attiva meccanismi di trasduzione del segnale che facilitano l'infiltrazione dei leucociti nei tessuti infiammati, la proliferazione dei linfociti e l'attivazione di cellule T citotossiche.[120]

Inoltre alcuni studi hanno messo in evidenza come l'attivazione di questa proteina è mediata anche da stimoli ossidativi che possono provocare l'attivazione della trascrizione dell'ICAM-1, attraverso due vie di regolazione (JNK e p38) che attivano il promotore AP-1 dell'ICAM-1 (Figura 25).

Dal momento che i derivati 2-tiosso-4-tiazolidinonici hanno mostrato sia attività antiossidante che la capacità di ridurre l'espressione dell'NF- κ B, è apparso opportuno valutare, tramite analisi Western Blot, la loro attività sull'espressione dell'ICAM-1 (grafico 6.3).

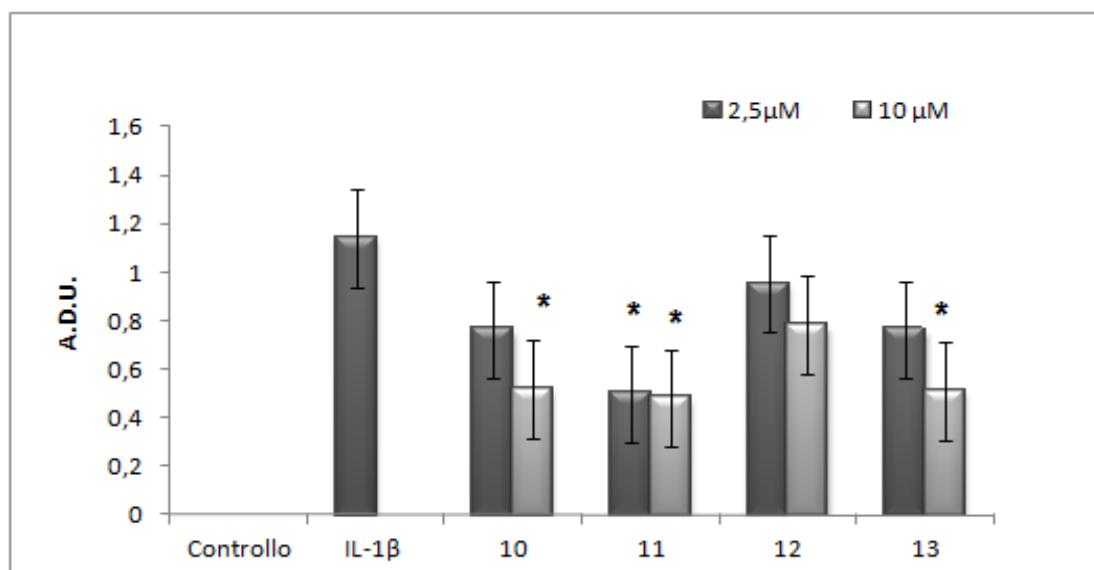


Grafico 6.3. Effetto dei 2-tiosso-4-tiazolidinoni (**10-13**) sull'espressione di ICAM-1 in colture di condrociti stimolati con IL-1 β dopo 72 h di trattamento con le sostanze in esame alle concentrazioni di 2,5 and 10 μ M, espresse come Unità Densitometriche Arbitrarie (A.D.U.).

* Significativamente differenti dal campione trattato con IL-1 β (P < 0.005).

La molecola di adesione ICAM-1, in condizioni fisiologiche, non viene espressa nei condrociti (controllo). In seguito a stimolazione con IL-1 β (10ng/ml) compare una notevole produzione di ICAM-1, che contribuisce al processo infiammatorio.

I composti **10-13** riducono l'espressione di ICAM-1. I risultati migliori, in accordo con i dati ottenuti dall'espressione dell'NF- κ B, si sono ottenuti con il derivato **11**, che riduce di oltre il 50% l'espressione della molecola di adesione già alla concentrazione 2,5 μ M. Per tutti gli altri composti si è osservata una riduzione dell'espressione di ICAM-1 dose dipendente.

6.3.4. *Determinazione dei livelli di NO*

L'attivazione dell'NF- κ B da parte di stimoli ossidativi induce la trascrizione genica dell'iNOS nei condrociti, con conseguente over-produzione di NO. Prodotto in concentrazioni superiori a quelle compatibili con le attività di modulazione fisiologica, l'NO reagisce con altri radicali liberi e, dopo trasformazione in molecole estremamente tossiche, come i perossinitriti, diventa mediatore di danno a carico della cartilagine articolare, causando apoptosi, degradazione dell'ECM, aumento della sintesi di citochine pro-infiammatori. [121] Diversi studi [122] hanno accertato che pazienti con OA mostrano un aumento dei livelli di NO nel liquido sinoviale, nel siero e nelle urine, dei nitrati e nitriti in circolo, e up-regulation dell'espressione di iNOS nei condrociti. Accertata l'attività antiossidante delle sostanze in esame e la loro capacità di ridurre l'espressione dell'NF- κ B, sono stati determinati i valori di NO nel surnatante cellulare.

L'NO ha un'emivita molto breve e in condizioni fisiologiche si ossida spontaneamente in un composto stabile: NO²⁻. Pertanto, il rilascio di NO è stato valutato per via indiretta attraverso la determinazione dei suoi metaboliti NO²⁻ (metodo di Griess). [107]

Nel grafico 6.4 viene riportata la produzione di NO in colture cellulari di condrociti, incubate per 72 ore con i composti in esame alle concentrazioni 2,5 μ M e 10 μ M, stimolati con IL-1 β (10ng/ml).

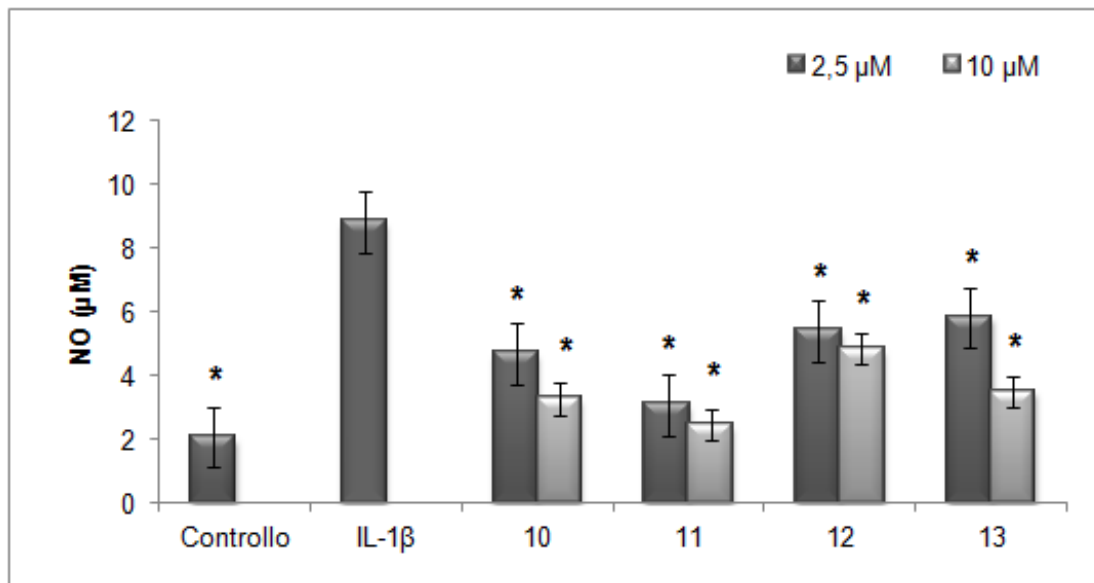


Grafico 6.4 . Effetto dei 2-tiosso-4-tiazolidinoni (**10-13**) sulla produzione di NO. La produzione di NO (μM) in colture di condrociti stimolati con IL-1 β dopo 72 h di trattamento con le sostanze in esame alle concentrazioni di 2,5 and 10 μM . * Significativamente differenti dal campione trattato con IL-1 β ($P < 0.005$).

La produzione basale di NO nella coltura di condrociti non stimolati (controllo) potrebbe essere giustificata dall'attività della cNOS e d'altronde ciò risulta favorevole per bloccare la progressione della malattia. Vari studi, infatti, hanno mostrato come la produzione basale di NO sia necessaria per mantenere sana la cartilagine articolare e che la totale soppressione farmacologica di NO potrebbe favorire l'insorgenza e la progressione dell'OA. In seguito a stimolazione dei condrociti con IL-1 β (10ng/ml), la produzione di NO aumenta notevolmente. Tutte le sostanze, alle concentrazioni utilizzate (2,5 e 10 μM), hanno dimostrato di ridurre la produzione di NO, in maniera dose-dipendente. In particolare il composto **11** in accordo con i dati ottenuti dall'espressione dell'NF- κB , ha mostrato la migliore attività, specie alla concentrazione 10 μM (2,45 μM), riportando la produzione di NO quasi al valore del controllo non trattato (2,07 μM).

6.3.5. Dosaggio dei GAGs

A livello condrocitario la riduzione del rilascio di GAGs rappresenta un indice della sofferenza condrocitaria che conduce alla distruzione del tessuto cartilagineo. Essa è strettamente connessa sia all'attività delle MMPs che ad un processo infiammatorio/ossidativo derivante dall'attivazione di NFkB.

Un'inibizione della MMP-13 si traduce indirettamente in un effetto condroprotettivo, mentre un'inibizione della MMP-3 esplica un effetto diretto su catene di PGs. [123]

Inoltre alcuni studi [124] hanno mostrato come la somministrazione di Condroitina solfato (CS) e glucosammina possano ridurre l'infiammazione, prevenendo l'attivazione del fattore NFkB; in particolare la glucosammina inibisce l'attivazione dell'NFkB indotta dall'IL-1 β in colture di condrociti umani di pazienti affetti da osteoartrite. [111]

Pertanto, per completare il quadro delle attività dei derivati 2-tiosso-4-tiazolidinoni in esame, ai fini di una migliore comprensione del meccanismo d'azione, considerato l'effetto mostrato dai derivati tiazolidinonici in esame sia sulla capacità di inibire le MMPs 13 e 3, che sulla capacità di inibire in vitro l'espressione di NFkB, è apparso utile, valutare l'effetto dei composti **10-13** sul rilascio di GAGs, attraverso il metodo Farndale.[106]

Come si evince dal grafico 6.5, la concentrazione dei GAGs è stata ridotta significativamente in cellule esposte a IL-1 β (10 ng/ml). Tutti i composti testati, alle concentrazioni di 2,5 e 10 μ M, sono in grado di ripristinare i livelli di GAGs in modo dose dipendente. In particolare i composti più attivi, alla dose di 10 μ M, in accordo con i dati di EC₅₀ sulle MMP-13, sono il composto **10** (14 μ g/ml) ed il composto **13** (13 μ g/ml), essendo in grado di riportare i livelli di GAGs ai valori del controllo non trattato (14,5 μ g/ml). Anche il composto **11**, alla dose più bassa utilizzata, è risultato essere attivo (10 μ g/ml)

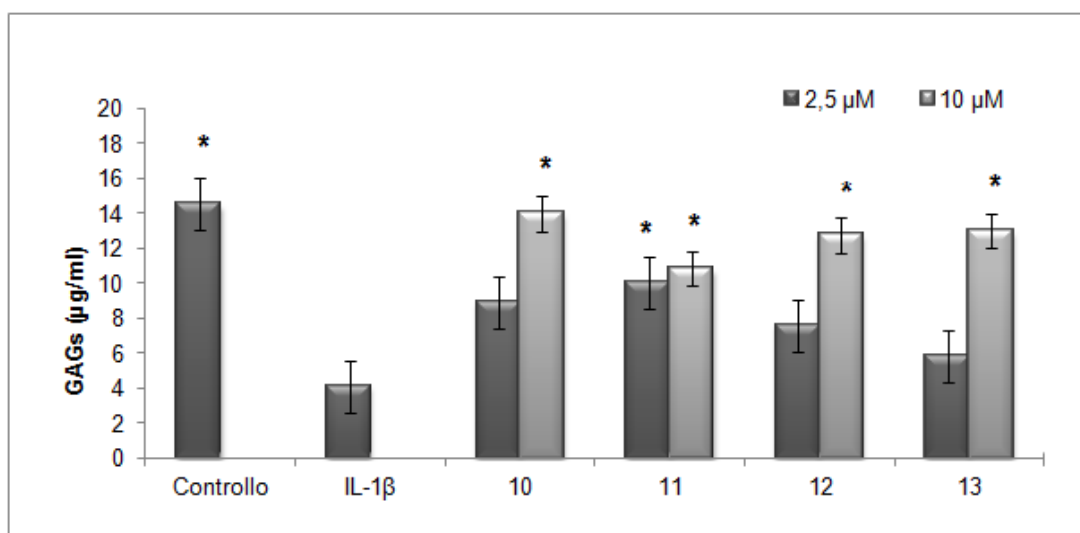


Grafico 6.5. Effetto dei 2-tiosso-4-tiazolidinoni derivati 10-13 nel rilascio di GAGs. Rilascio di GAGs in colture di condrociti stimolati con IL-1 β (10ng/ml) dopo trattamento di 72 h con i composti **10-13** alle concentrazioni di 2,5 μ M e 10 μ M. * Significativamente differenti dal campione trattato con IL-1 β (P < 0.005).

6.4. MATERIALI E METODI

6.4.1. Test fluorimetrico per MMP 3/13:EC₅₀

I composti sono stati valutati per la loro capacità di inibire l'idrolisi del peptide fluorescente (Biomol, Inc.), la cui sequenza amminoacidica è: Mca-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂AcOH. La Mca è un fluoroforo, quando è legata al peptide la Dpa assorbe la fluorescenza emessa dalla Mca (quench di fluorescenza). Le MMPs scindono il legame Gly-Leu, separando la Mca dalla Dpa, in questo modo la Mca, eccitata alla lunghezza d'onda di 328 nm, riemette luce a lunghezza d'onda maggiore (max a 393 nm). Il saggio è stato condotto, in multiwell da 96 pozzetti dal volume di 250 μ l, con buffer per MMP 13 usando l'enzima proteolitico (MMP-3/13) ad una concentrazione 10 nM e il peptide a 1 μ M. L'enzima è stato incubato a 25 °C con concentrazioni crescenti di inibitore e la fluorescenza è stata misurata per 5 minuti dopo l'aggiunta del substrato usando uno spettrofluorimetro (Perkin Elmer Victor V3). L'inibitore acido *N*-isobutil-*N*-[4-metossifenilsulfonil]glicil idrossamico (Biomol, Inc.) è stato usato come controllo. [92]

Preparazione del buffer per MMP-13; il buffer per la MMP-13 ha la seguente composizione:

HEPES (acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico)	50mM
CaCl ₂	5 mM
ZnCl ₂	0,1 mM
Brij (Poliossietilenglicol dodecil etere)	0,05 %
pH	7

Per la preparazione del buffer per la MMP-3 è necessario modificare la composizione, sostituendo l'HEPES con il MES (50 mM) e ottenere un pH finale pari a 6.

Preparazione della soluzione di inibitore: il potenziale inibitore si solubilizza in DMSO e viene diluito in varie soluzioni a concentrazioni decrescenti:

100 mM, 10 mM, 1 mM
100 µM, 10 µM, 1 µM, (0,1 µM)

6.4.2. Attività antiossidante: ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Il saggio ORAC è il metodo specifico per la misurazione del potere antiossidante delle sostanze in campioni biologici. Nel 1993 il medico e chimico Guohua Cao e collaboratori hanno pubblicato i principi di tale saggio. [76]Questo test fornisce una misura della capacità *scavenger* verso i radicali perossidici generati dalla decomposizione a 37°C dell' azocomposto 2,2' azobis (2-amidinopropano) dicloridrato (AAPH). Il saggio si basa sulla degradazione ossidativa di molecole fluorescenti, che fungono da sonde, dopo essere state mescolate con il composto generatore di radicali liberi. I radicali danneggiano la sonda che, quindi, perde la sua fluorescenza. Le sostanze antiossidanti, bloccando l'azione dei radicali, proteggono la sonda, ritardandone il decadimento di fluorescenza. La sonda più utilizzata è la *fluoresceina*. Importante è l'utilizzo di un composto standard per misurare il grado di attività antiossidante dei campioni in esame. A

questo scopo viene utilizzato il Trolox. Il saggio è stato condotto utilizzando lo spettrofluorimetro Victor V3 della Perkin Elmer. La calibrazione è stata effettuata con il Trolox (standard), un analogo idrosolubile della vitamina E.

Le multiwell da 96 pozzetti sono state riempite fino al volume di 200 µl nella seguente maniera:

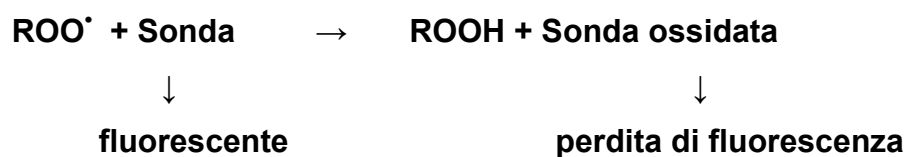
- ◇ Per il Bianco: 150 µl di fluoresceina [10 nM] e 25 µl di Buffer fosfato.
- ◇ Per lo standard: 150 µl di fluoresceina [10 nM] e 25 µl di trolox alla concentrazione scelta [12,5 µM].
- ◇ Per il campione: 150 µl di fluoresceina [10 nM] e 25 µl di campione.

Dopo 30 minuti di incubazione al buio vengono inserite in modo automatico tramite la pompa dello strumento 25 µl sono di AAPH [100 mM].

L'intensità della fluorescenza viene misurata ogni minuto per 35 minuti alle seguenti condizioni :

- pH = 7.4;
- 37 °C;
- λ di eccitazione = 485 nm;
- λ di emissione = 520 nm.

Se i campioni sono in grado di catturare i radicali, essi proteggono la fluoresceina dal decadimento; terminato questo effetto i radicali reagiscono con la fluoresceina che perde parte della sua fluorescenza.



Il tempo di decadimento della sonda fluorescente risulta proporzionale all'attività scavenger del composto. I risultati finali, calcolati usando la differenza delle AUC (Area Under Curve) di decadimento della fluoresceina tra il campione in esame, il bianco e lo standard, si esprimono in unità ORAC (1 unità ORAC = 1µM di equivalenti di Trolox), secondo la formula:

$$\text{AUC}_{\text{campione}} - \text{AUC}_{\text{bianco}} \setminus \text{AUC}_{\text{Trolox}} - \text{AUC}_{\text{bianco}}$$

Preparazione Tampone fosfato: si pesano 5,1 g di fosfato monobasico di sodio (NaH_2PO_4) in una bilancia elettronica e si disciolgono in 85 ml di acqua distillata, ottenendo una soluzione 0.5 M. Si pesano 5,68 g di fosfato bibasico di sodio (Na_2HPO_4) che vengono disciolti in 40 ml di acqua distillata, per ottenere una soluzione 0.1 M. Le due soluzioni vengono mescolate, ottenendo così un volume finale di 125 ml, il cui pH è 7. Poi si porta al volume di 500 ml con acqua distillata.

Preparazione della fluoresceina: pesare 0,4 mg di fluoresceina e diluire in 10 ml di buffer fosfato [133 μM]. Prelevare 10 μl e portarli a 100 ml [13,3 nM]. Conservare al buio.

Preparazione del Trolox (PM 250,29) : pesare 1 mg di Trolox e solubilizzarlo con 2,5 ml di buffer, si ottiene la stock solution da cui effettuare diluizioni scalari a 100 μM , 50 μM 25 μM e 12,5 μM in well.

Preparazione AAPH (PM 271,20): pesare 1,30 g di AAPH e solubilizzarli in 6 ml di buffer fosfato.

Preparazione dei campioni: pesare circa 1 mg di sostanza e diluirlo, in base al PM, in modo da avere in well la concentrazione di 12,5 μM . La prima diluizione è stata effettuata con una miscela 1:1 Buffer fosfato: DMSO.

6.4.3. Preparazione di colture di condrociti

L'allestimento di una coltura cellulare di condrociti richiede innanzitutto la dissezione di cartilagine umana, che proviene generalmente da pezzi operatori (testa di femore) in seguito ad interventi chirurgici di protesi. Essa viene ridotta in frammenti sottili di piccole dimensioni (circa 3 mm in lunghezza) utilizzando bisturi sterili. I frammenti vengono raccolti in una capsula Petri e pesati in una bilancia elettronica. Essi sono poi sminuzzati e trasferiti in una nuova capsula nella quale viene aggiunto medium completo senza Fetal Calf Serum (FCS). I campioni, infine, vengono tenuti in un incubatore a 37°C con 5% di CO_2 e 95% di aria umidificata per 24 ore. La procedura di isolamento viene condotta in condizioni asettiche sotto cappa sterile. Le cellule cartilaginee vengono isolate mediante tre passaggi sequenziali di digestione enzimatica della matrice extracellulare:

4. incubazione con ialuronidasi 0.1% (1mg/ml per 100 mg di cartilagine da digerire), (hyaluronidase Type III) per 30 min, a 37°C;
5. incubazione con pronasi 0.5% (5 mg/ml per 100 mg di cartilagine), (pronase type XIV), per 60 min a 37°C;
6. incubazione con collagenasi 0.2% (2 mg/ml per 100 mg di cartilagine); (collagenase type IA) per 45 min a 37°C in agitazione.

Gli enzimi vengono disciolti tutti in medium senza siero. Questi enzimi che agiscono rispettivamente su proteoglicani, molecole proteiche non collagene e fibre collagene, consentono una degradazione progressiva dei frammenti, poiché grazie all'azione diretta su ciascun costituente specifico della cartilagine permettono lo smascheramento e, quindi, l'accessibilità di nuove strutture per l'azione enzimatica della fase successiva. La sospensione cellulare così ottenuta viene filtrata con filtri da 100 µm e 70 µm in modo da eliminare i residui della digestione e gli aggregati cellulari per ottenere una sospensione condrocitaria monocellulare. Si aggiunge una uguale quantità di medium completo con FCS, si centrifuga a 1700 rpm per 7 minuti a 25° C. Si aspira il surnatante e lo si butta, si utilizza il pellet a cui si aggiungono altri 5 ml di medium completo con FCS e si risospende. Si mette in una fiasca da 5 ml e si osserva se le cellule siano fluttuanti. Si effettua l'incubazione a 37°C per 48 h.

Preparazione del medium completo senza FCS: per preparare 200ml di medium occorrono:

Dulbecco's Modified Egle's Medium (DMEM)	192mL
Hepes (1M)	2mL
Sodio piruvato	2mL
Antibiotici (penicillina/streptomicina)	2mL
Glutammina	2mL

Preparazione del medium completo con FCS: la composizione è la medesima, ma vengono usati 172 mL di DMEM ed addizionati di 20 ml di FCS.

Preparazione del composto di riferimento: si solubilizza il composto di riferimento con DMSO per ottenere una soluzione 10^{-3} M. Si diluisce in rapporto 1:100 con medium di coltura.

Preparazione dei tiazolidinoni : i composti vengono solubilizzati in DMSO per ottenere una concentrazione di 10^{-3} M. Successivamente si diluiscono con medium alle concentrazioni di 10 μ M e 2,5 μ M.

6.4.4. Saggio di vitalità cellulare (MTT)

La vitalità cellulare si è misurata attraverso il saggio colorimetrico ai sali di tetrazolio, [106] che valuta la capacità delle cellule di ridurre, per mezzo della succinato deidrogenasi mitocondriale, il bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT). L'MTT entra nelle cellule e passa nei mitocondri dove è ridotto in un prodotto colorato ed insolubile, il formazano. Per rendere visibile il colore si solubilizzano i granuli colorati di formazano tramite l'aggiunta di DMSO. La reazione MTT-cleavage richiede la completa integrità della cellula ed è proporzionale al grado di attività metabolica della stessa. Dopo incubazione delle cellule per tre ore, in 5% CO₂ a 37°C, con 20 μ l della soluzione del sale di tetrazolio, solubilizzato in medium (5 mg/ml), e 180 μ l di medium, si rimuove il surnatante e si aggiungono 100 μ l di DMSO. Per ogni campione si allestiscono prove in triplicato e su ognuna viene misurata la densità ottica a $\lambda=550$ nm con uno spettrofotometro per micropiastre (Titertek Multiscan, Flow Laboratories). La vitalità cellulare viene espressa come in % Abs rispetto a quella del controllo non trattato.

6.4.5. Western Blot: NF κ B ed ICAM

L'espressione di ICAM-1 e di NF- κ B è stata valutata tramite analisi Western blot. I condrociti, trattati e non trattati, sono stati lavati due volte con PBS a freddo e sono stati raccolti con un tampone di lisi contenente 10 mM di Tris-HCl, 10 mM di KCl, 2 mM di MgCl₂, 0,6 mM di PMSF e 1 % di SDS a pH 7,4.

Dopo raffreddamento per 30 minuti a 0°C, le cellule sono state sonicate. Sessanta microgrammi di proteine totali, presenti nel surnatante, sono state caricate in ogni lane e poi separate tramite un gel Bis-Tris 4-12 % Novex per elettroforesi (NuPAGE, Invitrogen). Le proteine sono state quindi trasferite in una membrana di nitrocellulosa (Invitrogen, Italia) in ambiente umido.

Il trasferimento delle proteine è stato verificato colorando le membrane di nitrocellulosa con il Ponceau S e il gel Bis-Tris Novex con il Brilliant blue R.

Le membrane sono state messe in blocking con un tampone salino contenente 0,01% di Tween-20 (TBST) e 5% di latte in polvere senza grassi a 4°C per tutta la notte. Gli anticorpi monoclonali anti-ICAM-1 (1H4:sc-51632, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA) (1:200), gli anticorpi murini anti-NF-κB (Abnova antibodies full length, Sigma, Milano, Italia) (1:1000) e gli anticorpi monoclonali murini anti-α-tubulina (Sigma, Milano, Italia) (1:5000) sono stati diluiti con TBST e le membrane sono state incubate per 24 ore a temperatura ambiente.

Gli anticorpi sono stati rivelati con un anticorpo secondario coniugato con la perossidasi, usando per la chemiluminescenza il substrato Supersignal West Pico Chemiluminescent (Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

La densità delle singole bande per ogni campione è stata messa in relazione a quella dell'α-tubulina e i valori riportati (corrispondenti all'intensità di segnale) sono stati espressi come unità densitometriche arbitrarie.

6.4.6. Determinazione dei livelli di NO

L'NO è una molecola altamente reattiva con emivita brevissima che in condizioni fisiologiche si ossida spontaneamente in un composto stabile: NO²⁻. Pertanto, il rilascio di NO può essere valutato per via indiretta attraverso la determinazione dei suoi metaboliti NO²⁻ (metodo di Griess). La concentrazione di NO²⁻ viene misurata mediante un dosaggio spettrofotometrico in micropiastra a 96 pozzetti in cui ad ogni 100 μl di surnatante vengono aggiunti 100 μl di sulfanilamide (SA), ponendo al riparo dalla luce per 5 minuti, e 100 μl di 0.1% N-(1-naftil) etilendiamina cloruro (NED) (Sigma) in 5% di acido cloridrico per 10 min. a temperatura ambiente e sempre al riparo dalla luce. La reazione di Griess consente di ottenere a partire dai NO²⁻ un composto dotato di un ponte azoico che assorbe fra 520 e 590 nm. L'assorbanza dei campioni viene determinata su un lettore multiskan a λ=570 nm e la concentrazione di NO²⁻ (μM) viene ricavata utilizzando una curva di riferimento con concentrazione note di NaNO₂ (0-500 μM) in acqua distillata.

Preparazione del reattivo di Griess: poco prima di iniziare il saggio si pesano in una bilancia elettronica 0.1g di SA che vengono portati in soluzione con 10 ml di HCl 3 M e 0.1 g di NED che si solubilizzano in 10 ml di acqua bidistillata.

6.4.7. Dosaggio dei GAGs

La concentrazione totale di GAGs nel medium di coltura viene misurata attraverso un dosaggio spettrofotometrico quantitativo (metodo di Farndale) in micropiastro a 96 pozzetti in cui ad ogni 4 μ l di surnatante vengono aggiunti 250 μ l di 1,9-dimethylemethylene blue (DMB). L'assorbanza dei campioni viene determinata su un lettore multiskan a $\lambda=535$ nm. Questo metodo richiede la costruzione preliminare di una curva standard di riferimento per concentrazioni di GAGs comprese tra i 100-500 μ g. A tale scopo sono pesati 0.2 mg di condroitina solfato e vengono solubilizzati in 0.2 ml di tampone fosfato ottenendo una soluzione standard di riferimento (stock solution o SS) di 1 mg/ml.

Tampone formiato : in una bilancia elettronica si pesa 1 gr di sodio formiato anidro che viene disciolto in 20 ml di acqua distillata sotto agitazione (questa soluzione ha un pH pari a 9). Si aggiunge 250 μ l di acido formico al 98% (pH=4,47) e sodio formiato solido sino ad ottenere un pH di 5.48. Aggiungendo acqua distillata il tampone viene portato ad un volume finale di 500 ml.

6.5 ANALISI STATISTICA

Per ciascun test sono stati allestiti esperimenti indipendenti della durata di 48 ore. Ogni risultato è stato riportato negli istogrammi rappresentanti le medie \pm l'errore standard di tre esperimenti realizzati in triplicato. I risultati sono stati comparati al controllo e all'IL-1 β . Il t-test di Student e l'Anova sono stati impiegati per calcolare la significatività delle differenze tra le medie.

CAPITOLO 7- CONCLUSIONI

L'OA è una malattia ad eziologia multifattoriale caratterizzata da fenomeni degenerativi, ossidativi ed infiammatori che concorrono alla progressione dell'evento patologico.

I tiazolidinoni in esame, valutati sui parametri maggiormente coinvolti nell'insorgenza del danno osteoartritico, hanno mostrato differente attività.

In particolare, dai risultati ottenuti, è emerso come la sostituzione dell'atomo di ossigeno in posizione 2 con un atomo di zolfo e la presenza dei gruppi 3-fenossibenzilidene e 4-benzilossibenzilidene hanno interagito positivamente sull'attività antiossidante, come confermato dal saggio ORAC.

Analogamente, per quanto riguarda l'attività nei confronti delle MMPs, abbiamo rilevato come i 2-tiosso-4-tiazolidinoni, rispetto ai loro osso-derivati presentino una migliore attività sia nei confronti della MMP-13 che della MMP-3.

Inoltre, modifiche della porzione arilica dei composti, relative alla posizione ed alla lunghezza della catena, hanno interferito in maniera differente sull'inibizione delle MMPs coinvolte, pur mantenendo una buona capacità inibente.

Per quanto concerne gli altri parametri esaminati, NFκB, ICAM-1, NO e GAGs, essendo interconnessi al processo ossidativo/infiammatorio che caratterizza l'OA, è stato dimostrato come ciascun composto presenta una sua peculiare attività, indipendente da quella esercitata sia nei confronti delle MMPs che dall'attività antiossidante.

CAPITOLO 8- BIBLIOGRAFIA

- [1] E.H. Yelin et al, *Arthritis Rheum*, **1995**, 38, 1351-62.
- [2] L.M. Verbrugge, D.L. Patrick, *Am J Public Health*, **1995**, 85, 173-82.
- [3] A. Ciocci, T. Mauceri, *Reumatismo* **1994**, 46, 14-20.
- [4] A. Mulay, G. Mangesh, A.P. Nikalje, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **2009**, 1(1), 47-64.
- [5] Rao et al., *IL Farmaco*, **2002**, 57, 747-751.
- [6] P. Monforte P et al, *Bioorg Med Chem Letters*, **2001**, 11, 1793–1796.
- [7] Rao et al., *IL Farmaco*, **2004**, 59, 33-39.
- [8] J. Balzarini, B. Orzeszko, J.K. Maurin, A. Orzeszko, *Eur J Med Chem*, **2007**, 42, 993-1003.
- [9] a) R. Shyam, R.C. Tiwari, *Bull Chem Soc of Japan*, **1972**, 49, 171. b) R. Kumar, T.K. Gupta, S.S. Parmar, *J Practical Chem*, **1970**, 312, 201. c) C. Dwivedi, S.S. Gupta, S.S. Parmar, *J Med Chem*, **1972**, 15, 553. d) S.S. Parmar, C. Dwivedi, A. Chaudhari, T.K. Gupta, *J Med Chem*, **1972**, 15, 99. e) B. Malawska, *Current Topics in Medicinal Chem*, **2005**, 5, 69-85.
- [10] Chen et al., *Carbohydrate Research*, **2008**, 343, 3015-3020.
- [11] a) N.H. Metwally, M.A. Abdalla, M.A. Mosselhi, E.A. El-Desoky, *Carbohydr Res*, **2010**, 16, 345 (9), 1135-1141. b) W.A. El-Sayed, Y.K. Abdel-Monem, N.M. Yousif, N. Tawfek, M.T. Shaaban, A.A. Abdel-Rahman, *Z Naturforsch C*, **2009**, 64(11-12), 785-789.
- [12] D.P. Bhoot, R.C. Khunt, V.K.-Shankhvara, H.H. Parekh, *Journal of Sciences* **2006**, 17 (4), 323-325.
- [13] S. G. Patila, R. R. Bagula, M. S. Swamia, S. N. Hallalea, V.M. Kamblea, N. S. Kotharkar and K. Daradeb, *J. Chem. Pharm. Res.*, **2011**, 3(3), 69-76.
- [14] P. Vicini, A. Geronikaki, K. Anastasia, M. Incerti, F. Zani, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2006**, 14, 3859–3864.
- [15] D. Maclean et al., *J Comb Chem*, **2004**, 6, 196-204.
- [16] A. C. L. Leite, L. M. F. Santos, F. F. Barbosa, M. V. de Oliveira Cardoso, D. R. M. Moreira, I. A. de Souza, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2006**, 60, 121–126.

- [17] D.L. Dexter, J.A. Barbosa, P. Calabresi, *Cancer Res*, **1979**, 39, 1020. b) M.G. Brattain, W.D. Fine, F.M. Khaled, J. Thompson, D.E. Brattain, *Cancer Res*, **1981**, 41, 1751. c) J. Fogh, G. Trempe, J.I. Fogh, *Human Tumor Cells in Vitro*, **1975**, 115, 119. d) W.A. Tompkins, A.M. Watrach, J.D. Schmale, R.M. Schultz, J.A. Harris, *J. Natl. Cancer Inst*, **1974**, 52, 1101.
- [18] NCI-Navy Medical Oncology Branch cell line supplement, *J Cell Biochem Suppl*, **1996**, 24.
- [19] I. Vazzana, E. Terranova, F. Mattioli, F. Sparatore, *Arkivoc*, **2004**, 5, 364-374.
- [20] R. Ottaná, E. Mazzon, L. Dugo, F. Monforte, R. Maccari, L. Sautebin, G. De Luca, M.G. Vigorita, S. Alcaro, F. Ortuso, *Eur. J. Pharmacol*, **2002**, 448, 71-80.
- [21] M. Di Rosa, D.A. Willoughby, *J Pharm Pharmacol*, **1971**, 23, 297-298.
- [22] S. Cuzzocrea, B. Zingarelli, E. Gilard, P. Hake, A. L. Salzman, C. Szabo C, *Free Radical Biol Med.*, **1998**, 24, 450-459.
- [23] A. Geronikaki *et al.*, *J Med Chem*, **2008**, 51(6), 1601-1609.
- [24] Tonghui M *et al.*, *J. Clinical Investigation*, **2002**, 110 (11), 1651-1658.
- [25] a) A. A. Geronikaki, P. Vicini, M. Incerti, D.J. HAdjipavlou-Litina, *Arzneim-Forsch./Drug Res*, **2004**, 54(9), 530-537. b) R. Ottanà, R. Maccari, M. Giglio, A. Del Corso, M. Cappiello, U. Mura, S. Cosconati, L. Marinelli, E. Novellino, S. Sartini, C. La Motta, F. Da Settimo, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2011**, 46, 2797-2806.
- [26] M. Stumvoll, *Expert Opin Investig Drugs*, **2003**, 12 (7), 1179-1183.
- [27] a) G. M. Bursavich, A. M. Gilbert, S. Lombardi, K. E. Georgiadis, E. Reifenberg, C. R. Flannery, E. A. Morris, *Bioorganic & Med. Chem*, **2007**, 17, 1185-1188. b) A. Amadasi, P. Cozzini, M. Incerti, E. Duce, E. Fisicaro, P. Vicini, *Bioorg. & Med. Chem*, **2007**, 15, 1420-1429.
- [28] A. Pawe1czyk, L. Zaprutko, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2006**, 41, 586-591.
- [29] G. Ambrosi, G. Anastasi, D. Cantino *et al*, *Edi-ermes* **2001**, 52-63.
- [30] G. Chietta, *Articolo scientifico*, **2007**, 1-7.
- [31] L. Kjellen, U. Lindahl, *Annu Rev Biochem*, **1991**, 60, 443-445.
- [32] F.G. Albergati, A. Bacci, S. Mancini, *Minelli editore*, **2004**.
- [33] D. Nelson, M. Cox, *Zanichelli*, 165-166, 299-300.
- [34] A.G. Telser, J.K. Young, K.M. Baldwin, *Elsevier*, **2008**, 105-114.

- [35] S. Standring, *Elsevier*, **2009**, 87-88-
- [36] A.R. Poole, *Piccin*, **1995**, 1,332-397.
- [37] D.R. Eyre, M. A. Weis, J.J.Wu, *Eur Cell Mater*, **2006**, 12, 57-63.
- [38] a) J.A. Buckwalter, H.J. Mankin, *Instr Course Lect*, **1998**, 47, 477-486. b) J.A. Martin, J.A. Buckwalter, *Sports Med Arthrosc Rev*, **1996**, 4, 263-275.
- [40] L. Sokoloff, *J Rheumatol*, **1987**, 14 (14), 7-10.
- [41] M.B. Goldring, *Arthritis Rheum*, **2000**, 43, 1916-1926.
- [42] P.S. Burrage, C.E. Brinckerhoff, *Current drug targets*, **2007**, 8, 293-303.
- [43] U. Teodori, P. Gentilini, *Società editrice universo-Roma* 5^a ed., 1015-1023.
- [44] A. Fioravanti, G. Leo, M. Fabbroni, M. Galgani, *49° congresso nazionale della Società italiana di gerontologia e geriatria firenze*, 3-7 novembre **2004**.
- [45] F. Iannone, G. Lapadula, *Aging Clin Exp Res*, **2003**, 15, 364-372. b) M. J. Benito, D.J. Veale, O. FitzGerald, W.B. van den Berg, B. Bresnihan, *Ann Rheum Dis*, **2005**, 64, 1263-1267.
- [46] L. Punzi, R. Ramonda, *Conoscere l'artrosi. A cura di A.Ma.R.V. ONLUS. www.corriere.it/salute/reumatologia/Conoscere_artrosi.pdf*
- [47] A. Facchini, G. Lisignoli, G. Desando, C. Cavallo, C. Manferdini, B. Grigolo, XVIII International Congress on sportsrehabilitation and traumatology.
- [48] B.L. Kidd, R.M. Langford, T. Wodehouse, *Arthritis Research & Therapy*, **2007**, 9, 214.
- [49] J.A. Buckwalter, H.J. Mankin, *J Bone Joint Surg.*, **1997**, 79, 600-611.
- [50] T. Yasuda, *Mod. Rheumatol.*, **2006**, 16, 197-205.
- [51] Z.P. Lum, B.E. Hakala, J.S. Mort & A.D. Recklies. *Journal of Cellular Physiology*, **1996**, 166, 351-359.
- [52] a) J.F. Middleton & J.A. Tyler JA. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **1992**, 51, 440-447. b) Z. Mi, S. C. Ghivizzani, E.R. Lechman et al., *Arthritis and Rheumatism*, **2000**, 43, 2563-2570.
- [53] A. Janelle-Montcalm, C. Boileau, F. Poirier, *Arthritis Research & Therapy*, **2007**, 9, 20.
- [54] A. J. Teichtahl, A. E. Wluka, J. Proietto, F.M. Cicuttini, *Medical Hypotheses*, **2005**, 65, 312-315.
- [55] M. Otero, R. Lago, F. Lago, *Arthritis Research & Therapy*, **2005**, 7, 581-591.

- [56] G. A. Homandberg, C. Wen, F. Hui, *Osteoarthritis and Cartilage*, **1998**, 6, 231–244.
- [57] G. A. Homandberg, R. Meyers J.M. Williams, *The Journal of Rheumatology*, **1993**, 20, 1378–1382.
- [58] R.F. Loeser, *Arthritis Rheum*, **2006**, 54, 1357-1360.
- [59] N. Saha, F. Moldovan, G. Tardif, *Arthritis and Rheumatism*, **1999**, 42, 1577–1587.
- [60] U. Fo'rstermann, *Brit. Med. Journ*, **2009**,9 ,(7).
- [61] S.E. Christensen, I. Youn , *Eur Cell Mater*, 2007, 13, 56–65.
- [62] a) X. Li, H. Afif, S. Cheng et al. , *The Journal of Rheumatology*, **2005**, 32, 887–895. b) F. Kojima, H. Naraba, S. Miyamoto et al, *Arthritis Research & Therapy*, **2004**, 6, 355–365.
- [63] K. Masuko-Hongo, F. Berenbaum, L. Humbert et al. *Arthritis and Rheumatism*, **2004**, 50, 2829–2838.
- [64] A.S. Baldwin Jr, *Annu Rev Immunol*, **1996**, 14,649–683.
- [65] H.L. Pahl, *Oncogene*, **1999**, 18, 6853–6866.
- [66] L.A. Hart, V.L .Krishnan, I.M. Adcock, P.J. Barnes, K.F. Chung, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **1998**, 158,(5), 1585-1592. b) B. Milterski, S. Böhringer, W. Klein, E. Sindern, M. Haupts, S. Schimrigk, J. T. Epplen, *Genes and Immunity*, **2002**, 3, 211–219. c) X.F. Sun, H. Zhang, *Histol Histopathol* , **2007**, 22,1387-1398. d) R. Marok , P.G. Winyard, A. Coumbe, M.L. Kus, K. Gaffney, S. Blades, P. I. Mapp, C. J. Morris, D. R. Blake, C. Kaltschmidt, P.A. Baeuerle, *Arthritis Rheum*, **1996**, 39, 583–589.
- [67] K. Brand, S. Page, G. Rogler, A. Bartsch, R. Brandl, R. Knuechel, M. Page, C. Kaltschmidt, P.A. Baeuerle, D. Neumeier, *J. Clin. Invest*, **1996**, 97 (7), 1715-1722.
- [68] M. Karin, Y. Ben Neriah, *Annu Rev Immunol*,**2000**, 18, 621–663.
- [69] H.L. Pahl, *Oncogene*, **1999**, 18, 6853–6866.
- [70] A. V. Stolpe, P.T. Saag, *Journal of Molecular Medicine*, **1996**, 74, 13-33.
- [71] P. Shrikant, I.Y. Chung, M.E. Ballestas, E.N. Benveniste, *Journal of Neuroimmunology*, **1994**, 51,209-220.
- [72] C.A. Janeway, P. Travers, M. Walport, M.J. Shlomchik. , *Garland Publishing*, **2001**.
- [73] J.L. Jones, R.A. Walker , *J Pathol*, 1997,183, 377-379.

- [74] M.D. Sternlicht, Z. Werb , *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **2001**, 17, 463-516.
- [75] J. Gross, C.M. Lapiere, *Physio*,**1962**, 48, 1014-1022.
- [76] A. Page-McCaw, A.J. Ewald, Z. Werb, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **2007**, 8(3), 221–233. [77] Remacle et al., *J. Biol. Chem.*, **2011**.
- [78] G. Murphy , H. Nagase, *Mol Aspects Med*, **2008**, 29 (5), 290–308.
- [79] C.B. Forsyth et al, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*,**2005**, 60(9), 1118–1124.
- [80] H. Takaishi et al, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **2008**, 9, 47-54.
- [81] H. Nagase, J.F. Woessner, *J Biol Chem* **1999**, 274.
- [82] K. Brew, D. Dinakarandian , H.Nagase, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2000**, 1477, 267-283.
- [83] a) B. Pirard, *Drug Discovery Today*, **2007**, 12, 640-646. b) P.R. Beckett, A.H Davidson A.H, DDT, 1996, 1, 16-26.
- [84] E. Paroli et al., *Drugs Exp Clin Res.*, **1991**, 17 (1), 9-20.
- [85] W.B. Van den Berg. *Arthritis Res.*, **2001**, 3, 18-26.
- [86] K. Notoya, D.V. Jovanovic, P. Reboul, et al. , *J Immunol.*, **2000**, 165, 3402-3410.
- [87] E.V. Tchetina, *Arthritis*, **2011**,1-16.
- [88] T. Aigner, S. Soeder, J. Haag, *European cells and Material*, **2006**,12,49-56.
- [89] a) J. Martel-Pelletier, C. Boileau, *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, **2008**, 22, 2, 351–384. b) J.Martel-Pelletier., *Best Practice & ResearchClinical rheumatology*, **2001**, 15, 805-829.
- [90] H.W. Walling, L.J. Raggatt, D.W. Irvine, O.Y. Barina, J.E. Toledano, M.B. Goldring, K.A. Hruska, H.D. Adkisson,R.E. Burdge, C. J. Gatt, D.A. Harwood, N.C. Partridge, *Osteoarthritis and Cartilage*, **2003**, 11, 854-863.
- [91] a) A. Kuhad , M. Bishnoi , V. Tiwari , K. Chopra, *Pharmacol Biochem Behav*, **2009**, 92 (2), 251-259. b) R. Ottanà, R. Maccari, R.Ciurleo, P. Paoli, M. Jacomelli, G. Manao, G. Camici, C. Laggner, T. Langer, *Bioorganic & Med. Chem*, **2009**, 17, 1928-1937. c) R. Maccari, P. Paoli, R. Ottana`, M. Jacomelli, R. Ciurleo, G. Manao, T. Steindl, T. Langer, M G. Vigorita, G. Camici, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2007**, 15, 5137–5149.
- [92] Bertini I., Calderone V., Fragai M., Giachetti A., Loconte M., Luchinat C., Maletta M., Nativi C., Yeo K. J. Exploring the Subtleties of Drug-Receptor Interactions: The Case of Matrix Metalloproteinases, *Jacs articles.*, **2007**.

- [93] R. Ottana, R. Maccari, R. Ciurlo, M.G. Vigorita, A.M. Panico, V. Cardile F. Grufi, S. Ronsisvalle, *Bioorganic & Med. Chem*, **2007**, 15, 7618-7626.
- [94] Vicini et al., *Bioorganic & Med. Chem*, **2007**, 15, 1420-29.
- [95] Panico et al. *ChemMedChem*, **2007**, 2, 113 – 119.
- [96] R. Maccari, R. Ottanà, C. Curinga, M.G. Vigorita, D. Rakowitz, T. Steindlb, T. Langer, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2005**, 13, 2809–2823.
- [97] J. M. Zabolotny, Y.B. Kim, L. A. Welsh, E. E. Kershaw, B.G. Neel, B. B. Kahn, *The journal of biological Chemistry*, **2008**, 283(21), 14230-14242.
- [98] a) K. Vuolteenaho, A. Koskinen, M. Kukkonen, R. Nieminem, U. Ppaivarinta, T. Moilanem, E. Moilanem, *Mediators of Inflammation*, **2009**. b) J.P. Bao, W.P. Chen, J. Feng, P.F. Hu, Z.L. Shi, L.D. Wu, *Mol Biol Rep*. **2010**, 37 (7), 3265-3272.
- [99] M. Brownlee, *Diabetes*, **2004**, 54, 1615-1625.
- [100] K.V. Ramana, S. K. Srivastava, *Int J Biochem Cell Biol.*, **2010**, 42 (1), 17-20.
- [101] S.K. Srivastava, K.V. Ramana, A. Bhatnagar, *Endocr Rev.*, **2005**, 26(3),:380-392
- [102] a) J.J. Li, J. Nahra, A.R. Johnson, A. Bunker, P. O'Brien, W.S. Yue, D.F. Ortwine, C.F. Man, V. Baragi, K. Kilgore, R.D. Dyer, H.K. Han, *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 835-841. b) R.P. Verma, C. Hansch, *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 2223-2268
- [103] Sorgi M. L., *Gestione farmacologica delle malattie osteoarticolari*.
- [104] Maccari R. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 3886.
- [105] T. Mossmann, *J. Immunol, Methods*, **1983**, 65, 55-63.
- [106] R. W. Farndale, C. A. Sayers, A. J. Barrett, *Connect. Tissue Res.*, **1989**, 2, 247-248.
- [107] L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, D. J. Reis, *Anal. Biochem.*, **1982**, 126, 131-138.
- [108] M. G. Bursavich, A. M. Gilbert, S. Lombardi, K.E. Georgiadis, E. Reifenberg, C. R. Flannery, E. A. Morris, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 1185-1188.
- [109] a) R.M. Clancy, P.F. Gomez, S.B. Abramson, *Osteoarthritis Cartilage*, **2004**, 12, 552-558. b) I. Mazzetti, B. Grigolo, L. Pulsatelli, P. Dolzani, T. Silvestri, L. Roseti, R. Meliconi, A. Facchini, *Clinical Science*, **2001**, 101, 593–599. c) A.F.

Mendes, M.M. Caramona, A.P. Carvalho, M.C. Lopes, *J Cell Biochem*, **2003**, 88, 783-793.

[110] G. Cao, C.P. Alessio, R.G. Cutler, *Free Radic Biol Med*, **1993**, 14, 303–311.

[111] a) N. Canas, R. Gorina, A.M. Planas, E. Montell, A.G. Garcia, M.G. Lopez, *Neuroscience*. **2010**, 19, 167 (3), 872-879. b) R. Largo, M. A. Alvarez-Soria, I. Díez-Ortego, E. Calvo, O. Sa´nchez-Pernaute, J. Egido, G. Herrero-Beaumont, *OsteoArthritis and Cartilage*, **2003**, 11, 290–298.

[112] D. T. Puerta, M. O. Griffin, J.A. Lewis, D.Romero-Perez, R. Garcia, F. J. Villarreal, S. M. Cohen, *J. Biol Inorg Chem*, **2006**, 11, 131-138.

[113] a) G. Dormain, S. Cseh, I. Hajdu, L. Barna, D. Konya, K. Kupai, L. Kovacs, P. Ferdinandy, *Drugs* ., **2010**, 70, 949–96. b) P. Vicini, L. Crasci, M. Incerti, S. Ronsisvalle, V.Cardile, and A.M. Panico, *ChemMedChem.*, **2011**, 6, 1199 – 1202. c) B. Pirard, *Drug Discovery Today*,**2007**, 12,640-646

[114] A. Agrawal, D.Romero-Perez, J.A. Jacobsen, F. J. Villarreal, S. M. Cohen,*Chem Med Chem*, **2008**, 3, 812-820.

[115] a) C.L. Haskin, S.B. Milam, I.L. Cameron, *Crit Rev Oral Biol Med*, **1995**, 6(3),248-277. b) D.R. Blake, P.G. Winyard, R. Marok, *Ann NY Acad Sci*, **1994**, 723, 308-317. c) M.J. Hooiveld, G. Roosendaal, H.M. van den Berg, F.P. Lafeber, J.W. Bijlsma, ,*47th Annual Meeting of the Orthopaedi, Research Society, San Francisco*, **2001**. d) A.R. Moore, H. Iwamura, J.P. Larbre, D.L. Scott, D.A. Willoughby, *Ann Rheum Dis*, **1993**, 52, 27-31.

[116] M. Del Carlo, Jr. and R.F. Loeser, *Arthritis & Rheumatism*, **2003**, 48(12), 3419-3430.

[117] a) H.L. Pahl, *Oncogene*, **1999**, 18, 6853–6866. b) R. Marok, P.G. Winyard, A. Coumbe, M.L. Kus, K. Gaffney, S. Blades, P.I. Mapp, C.J. Morris, D. R. Blake, C. Kaltschmidt, P.A. Baeuerle, *Arthritis Rheum*, **1996**, 39, 583–589. c) P. Shrikant, I.Y. Chung, M.E. Ballestas, E.N. Benveniste, *Journal of Neuroimmunology* 1994, 51, 209-220.

[119] T. Yasuda, *Mod. Rheumatol.*, **2006**, 16, 197-205.

[118] J.C. Epinat, T.D. Gilmore, *Oncogene*, **1999**, 18, 6896–6909.

[120] T. Yasuda, *Mod. Rheumatol.*, 2006, 16, 197-205

[121] a) A.V. Stolpe, P.T. Saag, *Journal of Molecular Medicine*, **1996**, 74, 13-33. b) C.A. Janeway, P. Travers, M. Walport, M.J. Shlomchik. *Immunobiology* 5 ,**2001**.

[122] a) M.Jr Del Carlo, R.F. Loeser, *RF Arthritis Rheum*, **2002**, 46, 394-403. b) R.E. Huie, S. Padmaja, *Free Radic Res Commun*, **1993**, 18, 195-199. c) G.A.C.

Murrell, D. Jang, R.J. Williams, *Biochem Biophys Res Comm*, **1995**, 206, 15-21.
d) S.B. Abramson, *Arthritis Research & Therapy*, **2008**, 10 (2).

[123] a) A.J. Farrell, D.R. Blake, R.M. Palmer, S. Moncada, *Ann Rheum Dis*, **1992**, 51, 1219-1222. b) K. Vuolteenaho, T. Moilanen, R.G. Knowles, E Moilanen, *Scand J Rheumatol*, **2007**, 36, 247-258.

[124] S. Tanigawa, Y. Aida, T. Kawato, K. Honda, G. Nakayama, M. Motohashi, N. Suzuki, K. Ochiai, H. Matsumura, M. Maeno, *Cytokine*. **2011**, 56 (2), 376-86.