



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE,
CLINICHE E SPERIMENTALI

INDIRIZZO SCIENZE REUMATOLOGICHE

CICLO XXVII

Ruolo dei cristalli di calcio nell'infiammazione. Studio del liquido sinoviale mediante Microscopia Elettronica a Scansione, in pazienti con artrosi del ginocchio

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'Indirizzo: Ch.mo Prof. Leonardo Punzi

Supervisore: Ch.mo Prof. Leonardo Punzi

Dottorando: Paola Frallonardo

A Leonardo, Giovanni, Angela

INDICE

- **RIASSUNTO** **Pag. 1**
- **SUMMARY** **Pag. 4**
- **INTRODUZIONE** **Pag. 7**
- **SCOPO DELLO STUDIO** **Pag. 30**
- **PAZIENTI E METODI** **Pag. 31**
- **RISULTATI** **Pag. 55**
- **DISCUSSIONE** **Pag. 60**
- **CONCLUSIONI** **Pag. 64**
- **BIBLIOGRAFIA** **Pag.62**
- **RINGRAZIAMENTI** **Pag 79**

RIASSUNTO

Introduzione

L'artrosi (OA) è una malattia articolare cronica, caratterizzata da lesioni degenerative e produttive a carico della cartilagine delle articolazioni diartrodiali. Tuttavia, grande interesse della comunità scientifica si è sviluppato attorno alla componente infiammatoria caratterizzata da una modesta sinovite. In questo ambito negli ultimi anni notevole interesse è stato rivolto al ruolo che possono svolgere i cristalli di calcio (CC) nella patogenesi dell'OA, ma se questi contribuiscano direttamente al danno cartilagineo o ne siano più semplicemente un epifenomeno è ancora argomento di dibattito. I CC più comuni nell'OA sono quelli di pirofosfato di calcio diidrato, dall'inglese *calcium pyrophosphate* (CPP) e quelli generalmente definiti di fosfato basico di calcio (BCP dall'inglese *basic calcium phosphate*) che comprendono idrossiapatite, octacalcio fosfato e tricalcio fosfato.

Scopo dello studio

Indagare con metodica ultrasensibile Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) la presenza di cristalli di CPP e di BCP nel liquido sinoviale (LS) di pazienti con artrosi del ginocchio (GOA) e sui loro rapporti con i principali indici di attività e di gravità di malattia.

Pazienti e metodi

Sono stati sottoposti ad artrocentesi del ginocchio ed esame del LS 120 pazienti, 84 femmine, età media $68 \pm 10,7$ anni (range 50-93). In ciascun paziente sono stati valutati i principali indici clinici di malattia attraverso i questionari WOMAC, Lequesne e VAS; su tutti è stato eseguito esame ultrasonografico (US) dell'articolazione colpita con tecnica power Doppler. Tutti i pazienti soddisfacevano i criteri dell'American College of Rheumatology per OA e avevano una diagnosi radiologica di GOA secondo i criteri di Kellgren e Lawrence (KL). Nel LS sono stati valutati la conta totale leucocitaria

(GB), la percentuale di polimorfonucleati (PMN), e la presenza di eventuali CC. La ricerca di CC é stata condotta con microscopio a luce polarizzata, utilizzando anche il compensatore rosso di I ordine; veniva eseguita la colorazione aspecifica con rosso di Alizarina. La microscopia a scansione elettronica (SEM) è stata utilizzata come tecnica ultrasensibile per meglio identificare e caratterizzare i CC.

Risultati

Il nostro studio ci ha consentito con metodica ultrasensibile (SEM) di rilevare i CC nel LS in 62/120 pazienti (51,6%). Da una prima valutazione delle differenze tra le due popolazioni, i pazienti con CC rispetto a quelli senza erano più anziani ($p=0,036$), avevano una maggior difficoltà di movimento ($p=0,0041$); presentavano una % di PMN nel LS superiore (0,0041) e una presenza di power Doppler statisticamente significativa ($p<0,0001$). I CPP sono stati evidenziati al SEM in 37/120 pazienti (30%). Nei pazienti con CPP+ abbiamo riscontrato una differenza significativa per età ($p=0,0002$), durata di malattia ($p=0,041$), dolore ($p=0,039$), grado KL ($p=0,0334$), power Doppler ($p=0,0001$). Nei pazienti con CPP+ abbiamo riscontrato una correlazione tra loro degli indici clinici: dolore, rigidità, difficoltà, WOMAC, Lequesne. Una correlazione inversa è stata rilevata tra il power Doppler e la conta totale di GB.

I BCP sono stati evidenziati al SEM in 33/120 pazienti (27,5%).

Nei pazienti con BCP+ abbiamo riscontrato una differenza significativa per WOMAC ($p=0,0001$), dolore ($p=0,0001$), rigidità ($p<0,0001$), difficoltà ($p<0,0001$), Lequesne ($p<0,0001$), VAS ($<0,0004$), power Doppler ($p<0,0001$); per l'età è stato riscontrato un trend positivo senza significatività statistica ($p=0,046$). Per quanto riguarda, inoltre, i pazienti con BCP+ abbiamo rilevato una correlazione tra KL e durata di malattia.

Abbiamo inoltre suddiviso i pazienti in 3 gruppi in base alla durata di malattia: I gruppo (49) con durata di malattia < 1 anno; II gruppo (27) tra 1-5 anni; III gruppo (44) con durata di malattia > 5 anni.

Le differenze principali fra i pazienti dei 3 gruppi sono state riscontrate per l'età, maggiore nel gruppo III, nella positività al power Doppler. La gravità del quadro radiografico erano peggiori nel III gruppo. Quando abbiamo suddiviso i tre gruppi per la

presenza di CPP e BCP, nel I gruppo differenze significative si osservavano per il Power Doppler ($p=0,0039$); al limite della significatività il dolore. Nel III gruppo non abbiamo riscontrato differenze significative tra la presenza e assenza di CPP. Considerando i BCP nel I gruppo sono state riscontrate differenze significative nei BCP+ nei confronti dei BCP- per il dolore ($p=0,0002$), la rigidità ($p=0,045$), la difficoltà ($p=0,0014$), il WOMAC ($p=0,0002$) e per il power Doppler ($p=0,0009$).

Conclusioni

Questo è il primo studio che permette di valutare il significato della presenza di CC nel LS di pazienti affetti da GOA, utilizzando metodica ultrasensibile come il SEM in una popolazione piuttosto ampia di pazienti.

Particolarmente intrigante risulta l'analisi di pazienti con BCP nel gruppo early. La presenza dei BCP è sicuramente associata a un grado maggiore di infiammazione e smentirebbe studi precedenti in cui veniva suggerito che i BCP fossero un epifenomeno e non influenzassero il tipo di malattia.

SUMMARY

Background

Osteoarthritis (OA) is a chronic joint disease characterized by a progressive loss of articular cartilage, osteophyte formation, thickening of the subchondral bone, along with frequent signs of intraarticular inflammation with moderate synovitis. The role of inflammation in the pathogenesis of OA is becoming increasingly evident especially in its early phases. The pathogenesis is not yet clear. In the last years the role of calcium crystals in structural progression of OA was considered. Calcium pyrophosphate (CPP) and basic calcium phosphate (BCP) are the most common calcium crystals detected in OA. The role of calcium crystals in synovial inflammation and their significance in OA progression in this context continues to be debatable.

Objective

The aim of this study was to evaluate the presence of calcium crystals in synovial fluid using ultrasensitive analysis with scanning electron microscopy (SEM) at early and later stages of symptomatic and radiographic knee OA (KOA), to investigate the presence of CPP and BCP crystals in synovial fluid (SF) of patients with KOA and their relationship with main indices of clinical and synovial activities.

Methods

SF was collected from 120 patients affected with KOA, 84 females, mean age 68 ± 10.7 yrs (range 50-93 yrs). All patients answered at three disease-specific questionnaires: WOMAC, Lequesne algofunctional index and VAS.

SF calcium crystals analysis was performed by regular and polarized light microscopy. Alizarin red stain was performed in all specimens.

As BCP crystals are more challenging to detect and are too small to be seen by light microscopy, SEM a highly specialized technique, has been used to define calcium-containing crystals. All patients underwent to knee ultrasound (US) with power

Doppler. Everyone were undergoing knee X-ray and they were classified according to the radiological grade of Kellgren and Lawrence (KL).

Results

CC were detected by SEM in 62/120 (51.6%) of the patients. The patients with CC were older ($p=0.036$), had a greater difficulty in moving ($p=0.0041$); they had a higher PMN percentage in SF (0.0041) and a positive power Doppler statistically significant ($p<0.0001$). CPP were positive in 37/120 patients (30%) by SEM. In patients with CPP, we found a significant difference with regard to age ($p=0.0002$), disease duration ($p=0.041$), pain ($p=0.039$), KL radiographic score ($p=0.0334$), US power Doppler ($p=0.0001$).

BCP were detected by SEM in 33/120 pazienti (27.5%).

In patients with BCP+ we found a significant difference with regard to WOMAC ($p=0.0001$), pain ($p=0.0001$), stiffness ($p<0.0001$), functional impairment ($p<0.0001$), Lequesne index ($p<0.0001$), Visual Analogic Scale (<0.0004), US power Doppler ($p<0.0001$). In the group of patients BCP+ we found a correlation between KL score and disease duration.

On the basis of disease duration, the patients were subdivided into three groups I <1 yr (49); II 1-5 yrs (27); III > 5 yrs (44). The main differences were found with regard to age, US power Doppler. The KL score were worse in III group. In the I group (early KOA) with CPP+ and BCP+ was found significant difference with regard to US Power Doppler ($p=0.0039$). In the III group we not found significant differences between CPP+ and CPP-.

In the I group (early KOA) in patients with BCP+ we found a significant difference with regard to pain ($p=0.0002$), stiffness ($p=0.045$), functional impairment ($p=0.0014$), WOMAC ($p=0.0002$) US power Doppler ($p=0.0009$).

Conclusion

In us study we evaluated the presence of CC in LS of patients with KOA, using ultrasensitive method as the SEM. CC+ was found to be correlated with severe clinical status and worse imaging findings, and PD resulted positive in patients with CC+ by

SEM. CC+ appeared to be an expression of worse evolution and aggressive KOA. Particularly intriguing BCP+in the early group. The presence of BCP is associated with a greater degree of inflammation.

INTRODUZIONE

DEFINIZIONE

L'artrosi (OA) per molti anni è stata considerata una malattia articolare cronica, caratterizzata da lesioni degenerative e produttive a carico della cartilagine delle articolazioni diartrodiali. Queste sono articolazioni mobili provviste di cartilagine, membrana sinoviale e liquido sinoviale, tutte strutture che, insieme all'osso subcondrale, possono essere coinvolte dal processo artrosico in qualsiasi fase della malattia, contribuendo al suo sviluppo ed alla sua evoluzione (1).

Tuttavia, grande interesse della comunità scientifica si è sviluppato attorno alla componente infiammatoria caratterizzata da una modesta sinovite.

La Società Italiana di Reumatologia (S.I.R.) nel 1999 ha proposto una classificazione dell'OA Tabella I (1).

Tabella I. Classificazione dell'artrosi proposta dalla SIR nel 1999 (1)

CLASSIFICAZIONE DELL'ARTROSI	
ARTROSI PRIMARIA	ARTROSI SECONDARIA
ARTROSI LOCALIZZATA: -articolazioni IFD (noduli di Heberden) -articolazioni IFP (noduli di Bouchard) -rizartriosi del pollice -altre	TRAUMATISMI ANOMALIE DI SVILUPPO TURBE BIOMECCANICHE
ARTROSI GENERALIZZATA	ALTERAZIONI DELLA STRUTTURA OSSEA
ARTROSI EROSIVA DELLE MANI	MALATTIE METABOLICHE ED ENDOCRINE -congenite -acquisite MALATTIE EREDITARIE DEL CONNETTIVO MALATTIE EMATOLOGICHE ARTRITI ARTROSI ENDEMICHE

PATOGENESI

Nella patogenesi dell'OA svolge un ruolo determinante lo squilibrio metabolico che si crea a livello del tessuto cartilagineo, con una sequenza di eventi che coinvolgono tutta la struttura articolare.

La cartilagine è un tessuto connettivale altamente specializzato. Le sue proprietà di resistenza al carico dipendono essenzialmente dalla complessa organizzazione della matrice extracellulare basata essenzialmente su tre componenti: acido ialuronico, proteoglicani e fibre collagene di tipo II. Queste ultime formano una trabecolatura tridimensionale all'interno delle cui maglie sono trattenuti gli aggregati proteoglicanici (aggrecano). Questi complessi macromolecolari sono in grado di richiamare e trattenere elevate quantità di acqua, garantendo al tessuto cartilagineo resistenza al carico, anche sotto considerevoli pressioni (2,3)

Il basso attrito è garantito dalla disposizione tangenziale alla superficie che assumono le macromolecole di collagene nello strato più superficiale della cartilagine e alla lubrificazione del liquido sinoviale. La sintesi e la distruzione di queste complesse macromolecole è regolata dall'unica componente cellulare del tessuto cartilagineo, i condrociti, che, impegnati in un metabolismo così complesso, posseggono scarsissime capacità metaboliche residue e altrettanto scarsa attività mitotica. In condizioni fisiologiche i condrociti sono comunque in grado di garantire un sia pur lento ricambio delle macromolecole danneggiate. Pertanto l'integrità morfologica e funzionale di questo complesso tessuto è affidata ad un equilibrio tra attività di sintesi e di degradazione che ha lo scopo di rimuovere le molecole usurate. A questa omeostasi contribuiscono in maniera determinante numerose citochine con attività metaboliche molto diverse tra loro didatticamente raggruppabili in citochine infiammatorie/distruttive, quali IL-1 α , IL-1 β , TNF α , TNF β , LIF, PGE-2, e citochine inibenti la distruzione della matrice quali IL-4, IL-6, IL-10, TGF β e fattori di crescita condrogenici quali IGF-1, PDGF, bFGF, TGF β , BMPs (4). Inoltre in risposta al danno provocato da eventi traumatici, l'espressione genica è globalmente attivata con aumento della sintesi di mediatori dell'infiammazione, proteinasi di degradazione cartilaginea e

fattori di risposta allo stress (5). I condrociti posseggono recettori di risposta a stimoli meccanici molti dei quali sono anche recettori per componenti della matrice extracellulare. Inclusi tra questi troviamo alcune integrine che servono come recettori per la fibronectina e per i frammenti di collagene di tipo II. L'attivazione di questi recettori può stimolare la produzione di proteinasi di degradazione della matrice e citochine e chemochine proinfiammatorie (6). Numerose sono le situazioni che possono interferire nelle varie fasi dell'intricato metabolismo cartilagineo; tra queste ricordiamo: fattori genetici che alterano la sintesi della matrice e il metabolismo del condrocita, fattori biomeccanici, come instabilità, sovrappeso, traumi, attività occupazionali e situazioni infiammatorie nelle quali si ha produzione di enzimi litici capaci di degradare i componenti della matrice, spingere all'apoptosi condrocitaria e portare ad una attivazione del metabolismo e ad una proliferazione dei condrociti. OA non è considerata una classica artropatia infiammatoria per le caratteristiche del LS e per l'assenza di manifestazioni sistemiche. Nonostante ciò, l'OA è frequentemente associata a sintomi di infiammazione locale (dolore, rossore, calore, tumefazione e impotenza funzionale). Resta da discutere circa il ruolo della membrana sinoviale, dell'infiltrato cellulare di B e T linfociti e della iperespressione di mediatori dell'infiammazione comuni agli stadi precoci e tardivi dell'OA (6). Nelle situazioni di natura infiammatoria si ha un'abbondante produzione di citochine rilasciate nello spazio sinoviale da parte dei sinoviociti e dei condrociti; tra queste l'IL-1 β e il TNF α sembrano essere tra le più attive nello stimolare i condrociti a sintetizzare alti quantitativi di metalloproteasi (MMP) come MMP-1 e MMP-3 con conseguente precoce perdita di proteoglicani, denaturazione e rottura del collagene e diffusa necrosi condrocitaria (7).

In una recente review Van den Berg riassume i risultati dello scorso anno, che gettano nuova luce su meccanismi e fattori coinvolti nella perdita della cartilagine nell'OA. È generalmente accettato che anche la membrana sinoviale attivata contribuisca al danno della cartilagine. Analogamente il cuscinetto di grasso infrapatellare, ad esempio, deve essere considerato come un tessuto capace di influenzare il metabolismo cartilagineo secernendo una serie di mediatori dell'infiammazione tra cui citochine e adipochine (8).

Il fattore inducibile ipossia 2α o Hypoxia-inducible Factor 2α (HIF- 2α) è stato identificato come principale fattore di trascrizione, altamente espresso nell'OA umana e a livello della cartilagine artrosica in modello sperimentale murino.

HIF- 2α è fortemente indotto da NF- κ B signaling con conseguente produzione di mediatori come IL-1 e TNF α . Il gruppo di Chun ha rilevato come la sovraespressione ectopica di HIF- 2α possa provocare un danno progressivo della cartilagine e un up-regulation di più enzimi di degradazione, compresa la MMP-13 (9). Inoltre, in topi transgenici con iperespressione di HIF- 2α condrocitaria specifica, la distruzione della cartilagine è aumentata. Un'ulteriore dimostrazione del ruolo centrale di HIF- 2α è stato fornito da due modelli murini in cui veniva indotta OA con destabilizzazione del menisco mediale oppure con iniezione di collagenasi; tali modelli animali, con delezione genetica di un allele per HIF-2 mostravano un blocco della patologia degenerativa articolare con riduzione di fattori catabolici. Il gruppo di Kawaguchi ha identificato HIF- 2α come regolatore del processo di ossificazione endocondrale nell'accrescimento osseo e nello sviluppo di OA (10). Vale la pena ricordare però che il controllo della normale omeostasi della cartilagine non dipende soltanto da HIF- 2α , ma riguarda soprattutto l'equilibrio di questo con l'attività del Hypoxia-inducible Factor 1α (HIF- 1α), coinvolto nella formazione e nel mantenimento della cartilagine; l'invecchiamento di questo tessuto è stato collegato alla riduzione del HIF- 1α (11). Per quanto riguarda il ruolo di potenziale target terapeutico di HIF- 2α la cautela sembra giustificata. Inoltre, è da sottolineare come HIF- 2α , si esprima soprattutto nelle prime fasi di OA (8).

Nel processo di erosione della cartilagine artrosica un importante ruolo patogenetico, viene riconosciuto ormai da tempo all'enzima metalloproteinasi 13 (MMP-13) o collagenasi 3. Suggestivo è stato il risultato ottenuto in topi transgenici con sovraespressione postnatale dell'enzima e conseguente patologia artrosica focale nei siti esposti a carico (12). Di contro, è stata evidenziata, in un altro studio, la riduzione delle erosioni cartilaginee in OA di topi con deficienza di MMP-13 (13). L'OA era stata chirurgicamente indotta con destabilizzazione del menisco mediale; gli aspetti patologici della cartilagine sono stati studiati a 4 e 8 settimane. Le erosioni non erano

differenti tra il topo selvatico ed il topo MMP-13^{-/-} a 4 settimane; ma a 8 settimane le erosioni erano marcatamente sopresse nel topo knockout. Veniva considerata anche la perdita di aggrecano, che era già alta a 4 settimane in entrambi i gruppi ed è rimasta elevata a 8 settimane. Ciò ci porta a pensare che la carenza di MMP-13 può inibire l'erosione della cartilagine in presenza di una riduzione di aggrecano, e che la deplezione di quest'ultimo da sola non spinge verso l'erosione della cartilagine. Osservazioni precedenti in modelli murini avevano mostrato che ADAMTS-5 fosse la principale aggrecanasi causa di danno dell'aggrecano in OA, evento che si riduceva in topi ADAMTS-5 knockout. (14). Ciò implica che la perdita di aggrecano apre la via alla MMP-13 per attaccare il collagene di tipo II denudato. Entrambi ADAMTS-5 e MMP-13 rimangono interessanti bersagli terapeutici. Studi condotti su topi knockout per MMP-13 hanno mostrato che MMP-13 non possiederebbe, invece, un ruolo fondamentale nella formazione di osteofiti in OA, che si sviluppavano anche in assenza di MMP-13.

Il fattore di trascrizione per il Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT) è da tempo riconosciuto essere coinvolto nel processo di riassorbimento osseo mediato dagli osteoclasti (15,16). Uno studio recente ha dimostrato che topi carenti per *Nfat1*, un componente del NFAT, pur presentando uno sviluppo scheletrico normale, mostravano una perdita di collagene di tipo II e di aggrecano, con aumento della espressione di proteinasi di degradazione della matrice cartilaginea e di citochine proinfiammatorie come IL-1 β , IL-6, IL-17, e TNF α (17).

Il Trasforming growth factor- β (TGF β) è considerato fattore di crescita cruciale per la cartilagine ed è molto utilizzato come driver per la sua crescita in esperimenti in vitro. Interessante è la constatazione che, tuttavia, tale fattore di crescita possa avere un ruolo patogenetico nell'OA nella formazione degli osteofiti (18,19). Di recente, studi con l'impiego dei recettori per il TGF β hanno fornito ulteriori chiarimenti. Il ruolo protettivo di TGF β sulla cartilagine passa attraverso il legame con il recettore ALK5 e la via di segnale a valle SMAD2/3 (Small mother against decapentaplegic o SMAD è una classe di proteine che modulano l'attività dei ligandi del fattore di crescita TGF β). Ciò determina l'induzione di inibitori tissutali delle metalloproteinasi (tissue inhibitors

of metalloproteinases o TIMP), contrastando in definitiva l'azione dell'IL-1 con blocco dell'ipertrofia condrocitaria. Al contrario, quando il TGF β interagisce con il recettore ALK-1, il segnale passa attraverso SMAD1,5,8 con induzione di enzimi degradativi come MMP-13. In questo caso ALK-1 potrebbe rappresentare un bersaglio terapeutico migliore rispetto al TGF β (20). Il ruolo protettivo della via SMAD3 è ulteriormente sottolineato dalla dimostrazione di casi di ipertrofia aberrante in condrociti murini con deficit di SMAD3, ipertrofia che può essere recuperata attraverso il segnale del TGF β -chinasi attivata (TAK-1)/fattore di trascrizione attivato 2 (ATF-2) e dal ripristino dell'attivazione di p38 (mitogen-activated protein kinase o MAPK) (21). Inoltre, la mutazione genetica per il gene che codifica SMAD3 è stata trovata associata nell'uomo a OA dell'anca e del ginocchio (22). Alcuni autori ipotizzano che i condrociti rimangano in uno stato di quiescenza nella cartilagine sana e di soggetti giovani grazie all'effetto inibitore del TGF β , attraverso la via SMAD2/3, nella progressione della differenziazione condrocitaria. Durante l'invecchiamento e lo sviluppo di OA il segnale di trasduzione è sbilanciato a favore della via ALK1-SMAD1,5,8 il cui predominio, rispetto alla via ALK5-SMAD2/3, rappresenta un trigger per i condrociti ad abbandonare il loro stato quiescente verso l'ipertrofia. Questa ipotesi potrebbe spiegare l'enigmatico e contraddittorio ruolo sulla cartilagine articolare svolto dal TGF β , i cui effetti sui condrociti potrebbero essere determinati dalla espressione relativa di ALK5 e ALK1 (23). Inoltre, in questo ambito, Runx2, membro della famiglia Runt (fattori di trascrizione) è riconosciuto da tempo come fattore di trascrizione della linea cellulare osteogenica oltre che nella sostituzione di tessuto cartilagineo (24). Runx2 integra la via SMAD nel controllo della differenziazione terminale del condrocita. L'interazione di Runx2 con SMAD1 facilita la sua funzione nello stimolare tale differenziazione terminale, mentre l'interazione con SMAD3 la blocca (25).

Uno percorso che merita una certa attenzione è quello della via del segnale Wnt/ β catenina. La via di segnalazione Wnt è uno dei meccanismi fondamentali che dirige la proliferazione cellulare, la polarità delle cellule, i processi apoptotici e determina il destino cellulare durante lo sviluppo embrionale e l'omeostasi dei tessuti (26). Un recente lavoro ha dimostrato una maggiore espressione di β catenina umana nella

cartilagine di OA; studi su topi transgenici hanno identificato l'attivazione del segnale della della β catenina in condrociti di topi che porta a fenotipo artrosico (27).

Grande importanza viene attribuita al processo di autofagia, inteso come turnover degli organelli intracellulari e delle molecole che proteggono le cellule durante la risposta allo stress. Attualmente viene accettato che l'autofagia in condizioni normali è un meccanismo protettivo della cartilagine; la sua riduzione con l'invecchiamento è legata alla morte delle cellule, intesa come apoptosi ed all'OA. Il gruppo di Martin Lotz ha valutato l'espressione di un insieme di proteine correlate all'autofagia, ULK1, Beclin1 e LC3 in cartilagine articolare umana normale e con OA (28). L'espressione di tali proteine è stata riscontrata fortemente ridotta in condrociti con OA, ma sorprendentemente elevata in clusters di cellule. Ulteriori esperimenti su topi invecchiati hanno mostrato diminuita espressione dei marcatori dell'autofagia insieme con la perdita di proteoglicani, dato correlato con un aumento del marcatore di apoptosi p85 PARP. Un simile pattern è stato trovato in topi con OA indotta chirurgicamente (8). Un precedente lavoro di Bohensky et al. ha dimostrato che HIF-2 α sopprime l'autofagia dei condrociti, individuando un altro ruolo di HIF-2 α nel metabolismo della cartilagine artrosica. Interessante come la riduzione di HIF-2 α con la tecnica del siRNA, per sopprimerne l'espressione, con conseguente aumento di HIF-1 α , sottolinea ancora una volta l'equilibrio che sussiste tra questi due fattori della famiglia di HIF (29).

Altra sostanza che ha un ruolo nella patogenesi del danno articolare è l'ossido nitrico (NO). L'NO stimola in primo luogo la proliferazione di sostanze a livello articolare. In uno studio sulla cartilagine sono state localizzate proteasi inibitrici TIMP-1, TIMP-3, PAI-1, SLP1 soprattutto a livello dei condrociti della superficie articolare che svolgono un ruolo di protezione nei confronti dell'angiogenesi. Lo squilibrio che si crea nella cartilagine artrosica comporta l'invasione da parte dei vasi sanguigni per azione prevalente del VEGF (30). Per quel che riguarda gli effetti deleteri dell'NO sulla cartilagine, è stato dimostrato che l'induzione, IL-1 mediata, di sintesi di NO da parte dei condrociti può avere effetti proinfiammatori per la vasodilatazione operata sui vasi, contribuire al danno cartilagineo, riducendo la sintesi dei proteoglicani e promuovendo la sintesi di citochine e MMP e indurre apoptosi e necrosi cellulare (31). Oltre all'NO,

altri fattori inducenti apoptosi risultano il TNF α e il Fas-ligando, i quali agiscono stimolando alcuni recettori che azionano le cosiddette caspasi, direttamente responsabili dell'apoptosi cellulare. D'altronde sono stati individuati fattori anti-apoptotici come CD44, CD54 e IGF-1. È stato accertato che anche le chemochine MIP-1 α , RANTES, GRO α e altre, sottoclasse di citochine, sono in grado di regolare l'adesione e la migrazione delle cellule proinfiammatorie quali condrociti, PMN, monociti e sinoviociti, nonché di indurre in tali cellule la produzione di mediatori infiammatori, superossidi ed enzimi. Nelle patologie articolari esiste un diverso coinvolgimento dei tessuti che compongono l'articolazione riguardo la produzione citochinica; nell'artrite reumatoide ad esempio, la sinovia è la struttura principale, mentre nell'artrosi è la cartilagine maggiormente coinvolta nella produzione di sostanze proinfiammatorie. I principali sistemi di difesa della cartilagine dall'aggressione di sostanze dannose sono di due tipi: gli inibitori delle proteasi e gli inibitori delle citochine. Gli inibitori tissutali delle proteasi sono una famiglia di enzimi, di cui l'inibitore delle MMP (TIMP) è il più importante (32). Tutti quanti agiscono legandosi direttamente alle MMP determinandone il loro blocco. La regolazione di questi enzimi è attuata tramite il pool citochinico (IL-6 stimola la produzione di TIMP). Gli inibitori delle citochine intervengono più a monte, interrompendo il feedback positivo stimolante nei confronti delle cellule coinvolte nella infiammazione. Ciò si realizza in vari modi ad esempio con la presenza di proteine che legano il recettore per le citochine (sono inibitori competitivi per il recettore, come IL-1 receptor antagonist), con recettori solubili (sono degli spiazzanti), con anticorpi anticitochine o con citochine inibitrici (IL-4, IL-10, TGF β , IFN γ) (7).

Un altro aspetto particolarmente interessante è il rapporto che lega la degenerazione della matrice con le calcificazioni cartilaginee. Infatti, le lesioni che caratterizzano l'OA coesistono frequentemente con la presenza di cristalli di pirofosfato di calcio (*calcium pyrophosphate* o CPP) (33). e di fosfato basico di calcio (*basic phosphate calcium* o BCP) nella matrice cartilaginea, nel liquido sinoviale e nella membrana sinoviale (34).

Il significato del ruolo di tali calcificazioni nel causare l'OA o influenzarne l'evoluzione è stato per molti anni incerto e tuttora la comprensione dei meccanismi che collegano l'OA alla calcificazione della cartilagine articolare è incompleta. L'interpretazione del rapporto con i CC è stata rallentata dalle limitate conoscenze sulla patogenesi dell'OA e dell'artrite da CC e dalla difficoltà ad evidenziare i cristalli stessi. Infatti, anche usando i metodi più sensibili, i cristalli di CPP possono non essere visti perché diffusi in modo intermittente dalla cartilagine nel liquido sinoviale (35,36).

I cristalli di BCP sono ancora più difficili da scoprire perché hanno dimensioni submicroscopiche ed è pertanto necessario ricorrere a tecniche molto sofisticate e costose (37). È stato osservato che i cristalli di BCP e CPP spesso coesistono (38) e che pazienti con cristalli di CPP e OA hanno un'età più avanzata di quelli senza cristalli e tendono ad avere una malattia più grave. Nota da tempo è la correlazione tra l'artropatia da CPP, il numero e la gravità degli osteofiti con dati che confermano come la presenza di cristalli di BCP nel liquido sinoviale artrosico correli con il grado radiografico di degenerazione (39,40). La presenza di cristalli sembra indicare una tendenza anormale della cartilagine artrosica a mineralizzare; tale concezione trova ulteriori conferme che invocano una rottura dell'equilibrio inibitori/attivatori della mineralizzazione a livello cartilagineo. La calcificazione della matrice nell'OA e, viceversa, la degenerazione della cartilagine associata a condrocalcosi, riflettono processi unificati che attivamente inducono pattern di danno tissutale culminante nella calcificazione all'interno della cartilagine degenerata (7,41).

OA e calcificazione della matrice sarebbero, quindi, meccanismi convergenti: processi patologici fondamentali all'interno della cartilagine, comprendenti una alterata differenziazione e vitalità condrocitaria, un disregolato metabolismo dell'ATP e del pirofosfato, e gli effetti di specifici mediatori dell'infiammazione, che promuovono da ultimo OA e calcificazione della matrice (42, 43).

Da un lato l'attivazione preminente della MMP senza sostanziale ipertrofia condrocitaria o turbe del metabolismo dell'ATP e del pirofosfato inorganico, favorirebbero lo sviluppo dell'OA senza calcificazione della matrice. Al contrario, un'elevata ipertrofia condrocitaria senza progressione verso l'apoptosi può portare a

risposte riparative della cartilagine e a calcificazione della matrice, favorendo il deposito di CPP. Inoltre differenze nel processo patogenetico dell'OA promuovono un deposito cristallino differenziato. Così un'abbondante produzione cartilaginea di NO può indurre deplezione di ATP extracellulare del condrocita, che favorisce il deposito dei cristalli di BCP sopra quello di CPP (44,45). Ulteriori studi hanno dimostrato che i condrociti nella cartilagine artrosica "up regolano" la sintesi di enzimi proteolitici, suggerendo che la perdita della matrice nell'OA riflette l'azione di questi enzimi. Da questi dati si è concluso che i condrociti nella zona superiore della cartilagine artrosica umana iniziano un'inappropriata differenziazione terminale, che porta a morte cellulare e a perdita della struttura e della funzione della cartilagine articolare. I condrociti nella zona superiore della cartilagine umana artrosica inoltre, non solo attivano l'espressione delle molecole che sono in prevalenza espresse da condrociti ipertrofici, ma iniziano il processo di mineralizzazione (46).

Queste cellule assomigliano ad un fenotipo simile a condrociti differenziati a termine, mineralizzanti dopo ipertrofia del piano di crescita epifisario. Essi attivano l'espressione della fosfatasi alcalina delle vescicole della matrice, componenti che giocano ruoli importanti nella fase iniziale della mineralizzazione (47). L'inappropriata differenziazione terminale dei condrociti nell'OA non solo porta alla morte cellulare e al fallimento della riparazione del tessuto, ma è anche accompagnata dal deposito di cristalli di BCP. Così la prevenzione della differenziazione terminale e della mineralizzazione della matrice nella cartilagine artrosica dell'uomo potrebbe essere un nuovo target terapeutico nell'OA. I cristalli di calcio possono inoltre direttamente danneggiare la cartilagine. Il loro deposito può portare ad infiammazione e a stimolo della produzione di MMP (48,49), che potrebbero accelerare la differenziazione terminale dei condrociti articolari e la distruzione della cartilagine. In aggiunta alla produzione di citochine che aggravano l'OA, numerosi studi hanno rilevato che i cristalli di calcio inducono mitogenesi dei condrociti articolari, stimolano la produzione di PGE2 attraverso la via fosfolipasi A2/cicloossigenasi, attivano la fosfolipasi C e idrolisi inositolo fosfolipide, inducono la sintesi di collagenasi e proteasi neutre, ed

espressione di proto-oncogene (42). I cristalli di calcio inducono anche PGE2 e cicloossigenasi-2 nei sinoviociti OA e nei fibroblasti umani (50,51).

ANATOMIA PATOLOGICA

L'OA è caratterizzata da una perdita progressiva di cartilagine con riduzione dello spazio articolare, formazione di osteofiti e geodi e, inoltre, sclerosi dell'osso subcondrale. Questo processo degenerativo è sostenuto da molteplici fattori meccanici, biochimici, genetici, il cui bersaglio comune è rappresentato dal condrocita che perde la capacità di mantenere l'omeostasi della matrice cartilaginea. Il primum movens è da ricercare nella riduzione ed alterazione dei proteoglicani che subiscono una depolimerizzazione delle catene di glicosaminoglicani. Ciò comporta una diminuzione di resistenza della matrice della cartilagine articolare (7).

Non protette dalla matrice, anche le fibrille di collagene si spezzano e, di conseguenza, la cartilagine, persa la sua naturale elasticità, si usura e va incontro a processi di rimaneggiamento, nel tentativo di riparare le microfratture che si verificano a causa del carico eccessivo o come conseguenza del suo diminuito spessore. La cartilagine articolare perde, progressivamente, le sue proprietà elastiche ammortizzanti e ciò si ripercuote soprattutto a livello della giunzione osteocondrale. L'osso subcondrale e, successivamente, la spongiosa sottostante, divengono addensati, sclerotici, ischemici, innescando un ulteriore processo di usura della cartilagine articolare; quando questa è del tutto usurata si verifica l'eburnizzazione dell'osso sottostante, che si presenta molto compatto e lucente e assume il ruolo di superficie articolare. La formazione di osteofiti dovrebbe compensare il carico eccessivo che si viene a determinare sui capi articolari, in quanto, aumentando la superficie di contatto si riduce il carico unitario.

La formazione di geodi (pseudocisti subcondrali, riscontrabili più a livello femorale e acetabolare) è da attribuirsi alla presenza di microfratture nell'osso subcondrale, per eccessiva sollecitazione e riassorbimento delle trabecole o alla presenza di vere e proprie zone di necrosi asettica su base ischemica.

La membrana sinoviale presenta alterazioni flogistiche di varia intensità che vanno da un'iniziale fase di danno essudativo a quadri finali di sclerosi dei tessuti; inoltre, la

membrana sinoviale di molti soggetti affetti da OA presenta depositi di microcristalli di calcio che stimolano con meccanismo interleuchina-mediato il rilascio, da parte di cellule sinoviali, di proteasi responsabili di ulteriori danni alla cartilagine articolare.

L'OA, sia primitiva che secondaria, presenta modificazioni qualitative e quantitative del liquido sinoviale. In particolare, la liberazione di ialuronidasi causa una carenza dell'azione lubrificante con alterazioni della nutrizione della cartilagine articolare. A questi meccanismi non sfugge l'OA del ginocchio (gonartrosi) che rappresenta l'oggetto di studio della presente dissertazione (1).

EPIDEMIOLOGIA E SEDI ARTICOLARI COLPITE

Le patologie dell'apparato muscolo scheletrico sono la causa più nota e più comune di malattie croniche ad alto potenziale di disabilità ed handicap con centinaia di milioni di persone che ne soffrono nel mondo. L'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) indica le malattie reumatiche come prima causa di dolore e disabilità in Europa. Da sole rappresentano infatti la metà delle malattie croniche che colpiscono la popolazione al di sopra di 65 anni (52).

Le ultime rilevazioni, riportate dall'Annuario Statistico Italiano 2010, mostrano che l'OA colpisce circa il 17% della popolazione, precedendo ipertensione arteriosa (16%) e malattie allergiche (9,8%). L'analisi per genere mostra, inoltre che la prevalenza di questi disturbi è maggiore nelle donne rispetto agli uomini (22,1% di artrite/artrosi vs 12,1%). Inoltre, l'andamento della prevalenza in rapporto all'età è decisamente a svantaggio delle persone più anziane: il 67,9% delle donne ed il 49,6% degli uomini oltre i 75 anni lamentano "artrite/artrosi".

Il numero degli italiani affetti da queste patologie è peraltro destinato ad aumentare nel prossimo futuro, a causa del progressivo invecchiamento della popolazione (53).

Gli studi epidemiologici sistematici riguardanti le malattie reumatiche in Italia non sono molto diffusi. Lo studio più ampio è stato condotto nelle Marche nel 2004 (Studio MAPPING), su un campione di 4000 soggetti di età ≥ 18 anni. La prevalenza delle malattie muscolo scheletriche nella popolazione adulta è risultata essere pari al 26,7%, con rapporto maschi/femmine di 1:1,6 e significativamente più elevata tra le persone più

anziane. La forma morbosa più comune è rappresentata dall'OA periferica (prevalenza 8,95%) (54).

L'OA è la più frequente tra le patologie reumatiche. In Italia ne risultano affette circa 4000000 di persone, con una prevalenza maggiore nel sesso femminile, rispetto al maschile (53). Nello studio PROVA (Progetto Veneto Anziani) la prevalenza dell'OA sintomatica, in 1854 soggetti di sesso femminile e 1245 di sesso maschile, con età >65 anni, si conferma rilevante, con una distribuzione secondo i dati presenti in Tabella II (55).

Tabella II. Prevalenza dell' OA della mano, anca e ginocchio in pazienti ambo sessi di età >65 anni (55)

MASCHI	FEMMINE
16% mano	21% mano
8% anca	14% anca
12% ginocchio	26% ginocchio

Lo studio epidemiologico dell'OA costituisce motivo di particolare interesse, sia per la notevole diffusione dell'affezione, per la cronicità del quadro clinico, ma anche per i costi sociali elevatissimi che essa determina. L'importanza di tali costi acquisisce maggior rilievo tenendo conto che l'OA colpisce soprattutto la popolazione anziana, particolarmente sensibile a tutti i fattori che possono influenzare la qualità di vita, già di per sé gravata da un'elevata comorbidità (55,56).

È stato calcolato che, nel 2020, negli USA i soggetti in età >65 anni rappresenteranno il 22% della popolazione, per tanto, il costo presumibile dell'OA, valutato secondo gli attuali parametri, può essere stimato nell'ordine di 100 miliardi di dollari (57).

In Italia i costi, attualmente, ammontano a circa 7000000 di Euro con una spesa globale annua, pro capite, di 455 Euro, a cui contribuiscono le spese di diagnosi, terapia, e di prevenzione e cura delle gastropatie; la metà, infatti, di tutto il consumo di FANS, i

farmaci più prescritti dai Medici di Medicina Generale, ma anche quelli gravati da maggiori effetti indesiderati, è dovuto all'OA (58) .

Per quanto attiene la frequenza della GOA, questa è valutata, nell'ambito dell'OA, pari al 27%; segue a quelle più consistenti della lomboartrosi (33%), della cervicoartrosi (30%) e precede la coxartrosi (25%), la poliartrosi (se colpite sono più di 3 articolazioni) (14%), l'artrosi delle mani (11%), l'artrosi del piede (9%), altre sedi (8%) (56).

La frequenza della GOA sintomatica in Italia riflette quella riscontrata in altri Paesi, confermando l'importanza di questa affezione nell'ambito dell'OA a causa, soprattutto, della sua gravità. È stato calcolato, infatti, che la prevalenza dei soggetti con età > 65 anni sottoposta ad artroprotesi del ginocchio varia nei Paesi Europei fra 0,5-0,7/1000 (59).

Età, sesso, distribuzione geografica

E' noto come l'artrosi vada progressivamente aumentando di frequenza con il progredire dell'età. Lawrence e coll. in un loro studio epidemiologico (60) hanno potuto constatare che le frequenze dell'artrosi in tre gruppi di pazienti, con età diversa, di entrambi i sessi, erano distribuite secondo i dati riportati in Tabella III.

Tabella III. Frequenza dell' artrosi in soggetti ambo sessi secondo l' età (60)

ETA'	FEMMINE	MASCHI
< 45anni	2%	3%
fra 45 e 64 anni	30%	24,5%
> 65 anni	68%	58%

Questi dati sono sovrapponibili a quelli dello studio di Framingham (61) che, in pazienti di età compresa tra 63 e 94 anni, ai quali fu eseguito un esame clinico e radiologico dell'articolazione del ginocchio, fu riscontrato un incremento graduale altamente significativo dell'artrosi più spiccato nelle donne.

Secondo Buratti e coll. (62) che hanno esaminato una casistica di pazienti di età compresa tra i 31 e gli 80 anni, risulta colpito dalla malattia il 15% della popolazione fino a 50 anni.

Dopo i 60 le percentuali sono:

- a 60 anni: 61%
- a 70 anni: 75%
- a 80 anni :86%

Questi dati risultano sovrapponibili a quelli di un recente studio anglo-americano (63).

La precocità di insorgenza del quadro clinico dell'OA nell'uomo può essere ricondotta all'attività lavorativa; nelle donne il più frequente riscontro dell'affezione dopo i 55 anni può dipendere da alterazioni del metabolismo osseo riconducibili alle alterazioni ormonali della menopausa. Per quanto riguarda la distribuzione geografica, gli studi condotti sono oltremodo contraddittori. Si è parlato di un "gradiente nord-sud" con il quale si sottolineava la maggiore frequenza della patologia nelle zone a clima temperato o caldo rispetto ai Paesi nordici (64).

Ulteriori ampi studi non hanno però confermato tale dato, e in particolare su 17 popolazioni diverse che vivono in latitudini comprese fra l'Alaska e il Sud Africa non sono state rinvenute differenze significative. Si ritiene quindi, che le differenze climatiche non siano da annoverare tra i fattori di rischio, i quali invece sono oltremodo conosciuti e studiati.

FATTORI DI RISCHIO

I fattori di rischio per l'artrosi si possono suddividere in primo luogo in due grandi categorie: fattori di rischio non modificabili, quali ad es. l'età, il sesso, la genetica e fattori di rischio modificabili, quali ad es. quelli meccanici, quelli associati ad altre malattie e, in accordo con l'argomento oggetto di questa tesi, l'infiammazione, più o meno legata alla presenza di cristalli di calcio.

Età

L'età rappresenta senza alcun dubbio il fattore di rischio non modificabile più importante per l'OA. Tuttavia, si può affermare che l'invecchiamento non risulta, di per sé, causa di OA (1), come dimostra l'evidenza epidemiologica secondo cui la maggior parte degli anziani non ne soffre. La senescenza è comunque una condizione che favorisce il rischio, in quanto si associa ad una progressiva perdita di elasticità e resistenza alle sollecitazioni che favorisce l'azione lesiva di altri fattori patogenetici (57) come la senescenza dei condrociti, l'invecchiamento della matrice cartilaginea, lo stress ossidativo (65). Inoltre, l'età rappresenta la logica conseguenza della maggiore durata dell'esposizione agli altri fattori di rischio.

Sesso

Il sesso femminile è chiaramente associato con l'OA particolarmente in alcune sedi (55). Sopra i 55 anni l'OA è più comune nelle donne nelle quali colpisce in modo più aggressivo soprattutto le articolazioni interfalangee, la prima metacarpale delle mani e il ginocchio (57). Alcuni studi epidemiologici hanno evidenziato, inoltre, un effetto protettivo della terapia sostitutiva con estrogeni nei confronti dell'OA della mano e del ginocchio (66,67).

Genetica ed ereditarietà

Va sempre più affermandosi il concetto della predisposizione ereditaria. L'associazione con l'HLA e fenotipi α 1- antitripsina furono studiati per primi da Patrich e coll. (68) che evidenziarono in soggetti con OA la presenza del fenotipo HLA A1 e B8 e MZ α 1- antitripsina. Una recente review di Loughlin J. riporta tre loci associati con OA: 7q22 locus, GDF5 e DIO2 (69,70). Una meta-analisi su un campione di 6709 casi e 44439 controlli, ha evidenziato come il locus 7q22 sia significativamente correlato ad una elevata suscettibilità per OA del ginocchio (71). Per quel che riguarda la forma erosiva, studi recenti sono risultati significativi per una maggiore frequenza di antigene HLA DRB1*01 (72).

Fattori meccanici

I fattori meccanici sono i più importanti fra i fattori di rischio “modificabili”, soprattutto se si include il sovraccarico legato all’obesità. Essi possono configurarsi come:

- malformazioni o malposizioni articolari rilevanti nella coxartrosi (insufficienza cotiloidea, coxa valga, coxa plana) e nella GOA (ginocchio varo e valgo); instabilità articolare come quelle osservate nell’iperlassità legamentosa benigna, anche senza arrivare a vere e proprie patologie del tessuto connettivo tipo s. di Ehlers-Danlos o s. di Marfan;;
- attività professionali e sportive, quali in particolare quelle che colpiscono gli addetti ai martelli pneumatici, le danzatrici, ma soprattutto gli autisti professionisti;
- traumi o microtraumi: le fratture possono generare un’OA per via indiretta, per instabilità, per incongruenza; ma anche alla semplice contusione sulla cartilagine si può ascrivere una certa responsabilità; i microtraumi ripetuti possono essere anche coinvolti nell’OA delle piccole articolazioni, come accade alle cuoche.

Sovrappeso ed obesità

È noto come il sovrappeso e ancor più l’obesità costituiscano il principale fattore di rischio modificabile dell’OA, per il carico eccessivo sulle articolazioni, con microfratture della cartilagine ed esposizione del collagene di tipo 2 e dei suoi prodotti di degradazione. Nella GOA si associa un aumentato rischio di lesioni degenerative meniscali (73). Tuttavia prove convincenti a favore della relazione tra GOA e BMI sono emerse solo riguardo la GOA nella donna (74,75).

Per quanto riguarda articolazioni non soggette a carico, come IFD, si è riscontrata, sempre nel sesso femminile, associazione significativa tra OA e BMI ipotizzando fattori metabolici e/o endocrini. Un recente studio ha messo in evidenza come contribuiscano al degrado della cartilagine, sia direttamente o modulando fattori anabolizzanti, la MMP-13, ma anche il fattore insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) (76).

Infiammazione

La reazione flogistica nell'OA si estrinseca a livello della membrana sinoviale, dove detriti cartilaginei potrebbero innescare un processo immunitario date le proprietà antigeniche di numerosi componenti. Talora, possono essere chiamati in causa microcristalli, come quelli di CPP e di BCP (42). In taluni casi la componente flogistica è così spiccata da indurre erosioni che ricordano le artriti.

ASPETTI CLINICI DELL'ARTROSI

Il quadro clinico dell'OA si caratterizza per il suo polimorfismo. Il dolore è il sintomo principale dell'OA. L'associarsi o meno della malattia ad una sintomatologia dolorosa, nell'ambito dei diversi sintomi e segni (Tabella IV) che la caratterizzano, dipende da numerose circostanze legate sia al tipo di artrosi che a problematiche di natura psicologica, familiare, sociale (77).

Tabella IV. Sintomi e segni dell'OA

	SINTOMI	SEGNI
Dal	Dolore	Andatura anomala
	Rigidità	Dolore alla palpazione
	Tumefazione	Capi ossei allargati
	Deficit funzionale	Crepitio
	Astenia	Movimento limitato
	Deformazione	Deformità
	Rumore da attrito	Dolorabilità
	Debolezza muscolare	

punto di vista della sintomatologia dolorosa, se è vero che la cartilagine non è dotata di terminazioni dolorifiche, l'osso subcondrale (per i citati fenomeni di edema ed ischemia) e la membrana sinoviale possono produrre stimoli dolorosi che, unitamente a quelli provenienti dai tessuti molli (capsula articolare, periostio, menischi, dischi, tendini, fasce, muscoli e legamenti), contribuiscono a costituire il pool algogeno di

questa malattia. È stata evidenziata, inoltre, una componente centrale del dolore in pazienti affetti da GOA e lombalgia (78).

Alcuni studi riportati da Bradley del 2004 hanno, infatti, dimostrato che pazienti con GOA sottoposti a stimoli dolorosi di intensità crescente presentavano una più elevata sensibilizzazione al dolore rispetto ai controlli (79). Lo stesso autore sottoponendo gli stessi pazienti alla SPECT con Xenon 133 ha dimostrato che le aree cerebrali attivate da uno stimolo doloroso sono più ampie e numerose rispetto ai controlli. Le variabili in gioco sono molteplici e rendono, quindi, ragione del fatto che, a parità di lesioni anatomiche e radiologiche, la risposta dolorosa, qualora presente, sia così diversa da paziente a paziente (80).

Il dolore è definito di tipo “meccanico” (1) in quanto viene risvegliato dal movimento ed è alleviato dal riposo, spesso fino a scomparire. Tuttavia, con l’aggravarsi della malattia, il dolore può talvolta manifestarsi anche a riposo e di notte, soprattutto in presenza di infiammazione sinoviale o di contrattura muscolare. Il dolore è generalmente il primo sintomo nel paziente con OA. All’inizio è sordo e si rivela solo dopo una prolungata attività. Poi si aggrava progressivamente, manifestandosi anche dopo movimenti minimi o in seguito a particolari posture obbligate.

La rigidità mattutina o post-inattività è di breve durata, generalmente di 10-15 minuti, senza comunque quasi mai superare la mezz’ora. La limitazione funzionale è progressiva, ma talvolta può comparire solo negli stati più avanzati. Peraltro la limitazione non è giustificata soltanto dalla riduzione dello spazio articolare, nel qual caso può attribuirsi a contrattura muscolare riflessa.

Fra i segni la tumefazione è l’espressione più rilevante. Essa è generalmente dura ed è dovuta agli osteofiti ed alla riduzione dello spazio articolare. Può sovrapporsi una tumefazione molle in caso di versamento articolare il quale, non essendo flogistico, raramente si accompagna ad una cute sovrastante calda al tatto e arrossata. Può essere presente dolorabilità, generalmente associata ad un coinvolgimento delle strutture periarticolari. Caratteristico segno dell’OA è il crepitio, che si avverte durante la palpazione, durante il movimento attivo e passivo. Esso è dovuto all’irregolarità delle superfici articolari, tra loro ravvicinate per la riduzione della rima articolare e

probabilmente poco lubrificate. Un evento temibile è l'instaurarsi di un'ipotrofia dei muscoli interessati dal movimento dell'articolazione affetta, che in alcuni casi di coxartrosi o di GOA può essere sorprendentemente rapida (81,82)

ASPETTI CLINICI della GONARTROSI

La GOA è particolarmente frequente e invalidante. Colpisce soprattutto soggetti di sesso femminile (55) e, a differenza, della coxartrosi, è meno frequentemente secondaria. Può interessare sia l'articolazione femoro-tibiale che la femoro-rotulea. Il quadro clinico è inizialmente dominato dal dolore in sede anteriore o antero-mediale, caratteristicamente di tipo meccanico. Dopo una lunga inattività, per es. al mattino o dopo essere stati seduti a lungo, può aversi una contrattura dolorosa post-inattività ("gelling" degli anglosassoni). Essa ha comunque breve durata e si attenua con la marcia. Il dolore può essere risvegliato da alcune posture particolari, quali quelle che si adottano per salire e, maggiormente, scendere le scale, accovacciarsi, spingere la pedaliera dell'auto nella guida prolungata. All'esordio si può trovare una certa dolorabilità delle zone periarticolari ed un modesto versamento. Successivamente il dolore può interessare tutta l'articolazione, accompagnarsi a ripetuti versamenti articolari, e insorgere anche di notte. L'impotenza funzionale si manifesta solo tardivamente, e non raggiunge mai i gradi che caratterizzano la coxartrosi, pur in presenza di un notevole disassamento in varismo od in valgismo. All'esame obiettivo si riscontra una limitazione funzionale dolorosa dei movimenti di flessione e di estensione forzata, segni di scroscio e dolorabilità dei legamenti periarticolari. Nel caso di OA femoro-rotulea si possono evocare crepitio o scrosci facendo scivolare sagittalmente la rotula sul femore con la pressione delle dita della mano sul femore (segno della "pialla") (81)

RUOLO DEI CRISTALLI DI CALCIO NELL'OA

Negli ultimi anni notevole interesse è stato rivolto al ruolo che possono giocare i microcristalli di calcio nella patogenesi dell'OA. Circa il 60% dei liquidi sinoviali (LS) di pazienti con OA contiene CC (83,49) ma se questi cristalli contribuiscano

direttamente al danno cartilagineo o ne siano più semplicemente un epifenomeno è ancora argomento di dibattito (84, 85). Alcuni studi suggeriscono che vi sia una stretta e specifica associazione tra cristalli di calcio e OA e che più probabilmente i cristalli possano avere un ruolo attivo nelle riaccensioni che caratterizzano la malattia (86).

I cristalli di calcio più comuni nell'OA sono quelli di pirofosfato di calcio diidrato (CPP, dall'inglese *calcium pyrophosphate*) e quelli generalmente definiti di fosfato basico di calcio (BCP dall'inglese *basic calcium phosphate*) che comprendono idrossiapatite, octacalcio fosfato e tricalcio fosfato.

Studi istologici suggeriscono che questi cristalli si formino in strutture extracellulari della matrice cartilaginea chiamate vescicole (87), in prossimità di condrociti ipertrofici che producono eccessive quantità di pirofosfato inorganico (88). La presenza dei cristalli di CPP e di BCP nell'articolazione artrosica è associata ad una maggiore degradazione cartilaginea, con una evoluzione più aggressiva della malattia e con versamenti più abbondanti (89). È stato dimostrato che i cristalli di calcio attivano delle vie di trasduzione del segnale intracellulare (c-Jun NK, ERK-1/ERK-2, p38 MAP-K) (90) che portano all'aumentata espressione di citochine infiammatorie tra cui l'IL-8 (91) e mediatori tra cui le metalloproteasi (MMP). L'aumento della concentrazione delle MMP, in particolare delle collagenasi MMP-1 e MMP-13 (49), sembra essere legato all'azione del TGF- β i cui livelli sono marcatamente aumentati nelle articolazioni artrosiche in presenza di cristalli di CPP (92). Alcuni autori hanno dimostrato che i cristalli di CPP sopprimono l'apoptosi spontanea o indotta dei neutrofilii attraverso l'inibizione della caspasi-3 promuovendo un loro eccessivo accumulo nei tessuti ed un rallentamento della risoluzione del processo infiammatorio (93).

I cristalli di BCP esercitano in coltura effetti simili ai fattori di crescita; tra questi, la stimolazione della produzione di PGE₂, attraverso la via della PLA₂/COX (50), l'attivazione della PLC e della MAP chinasi; la stimolazione di collagenasi (MMP-1, MMP-13) e stromelina (MMP-3) (94).

Bai e coll hanno dimostrato che i cristalli di BCP inibiscono la produzione di inibitori tissutali delle MMP (TIMP-1 e TIMP-2) in colture di fibroblasti umani promuovendo lo

sbilanciamento delle attività MMP/TIMP in favore della degenerazione della matrice (95).

Di recente uno studio in vitro ha dimostrato il ruolo dei BCP nell'indurre la produzione di IL-1 β mediata dall'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 al pari di quanto stimolato dall'UMS nell'attacco acuto di gotta (96).

Pertanto il ritrovamento dei CC nel LS dell'OA rappresenta un passaggio fondamentale nell'inquadramento clinico del paziente. Mentre l'identificazione dei cristalli di CPP è una procedura relativamente semplice, la ricerca di quelli di BCP, in quanto di dimensioni submicroscopiche e privi di birifrangenza, richiede un esame più approfondito (97).

L'associazione tra CC, OA e distruzione articolare è oramai consolidata. L'ipertrofia sinoviale è verosimilmente la risposta agli effetti mitogeni dei cristalli mentre la degradazione della cartilagine il risultato dell'attività delle MMP indotta dai cristalli nei sinoviociti e nei condrociti. Ad oggi non esistono farmaci in grado di incidere significativamente sulla patogenesi dell'OA prevenendo o trattando gli effetti di questi cristalli. Tuttavia l'approfondimento della conoscenza dei meccanismi molecolari responsabili delle azioni destruenti di CPP e BCP è essenziale per lo sviluppo di un approccio terapeutico nella prevenzione della deposizione di questi cristalli nell'articolazione artrosica

SCOPO DELLO STUDIO

Il ruolo dell'infiammazione nell'OA è considerato in maniera sempre più crescente, anche se rimangono oscure le ragioni che portano alle riaccensioni flogistiche, non spiegabili con cause traumatiche, infettive o di altra natura.

Una delle ipotesi è che queste riaccensioni possono essere determinate da cristalli formati in ambito articolare. Alcuni tra questi cristalli, contenenti calcio, sono frequentemente ritrovati nel LS di pazienti con OA.

Tuttavia pochi studi hanno valutato il rapporto tra presenza di cristalli da un lato e infiammazione sinoviale, attività clinica e alterazioni funzionali dall'altro soprattutto nella fase early di malattia.

La rarità di questi studi è data dalla nota difficoltà di individuare cristalli di dimensioni submicroscopiche, come quelli di BCP, che non possono essere messi in evidenza con le comuni tecniche di microscopia ottica a luce polarizzata.

Per approfondire questi aspetti, abbiamo analizzato il LS di pazienti affetti da GOA, utilizzando, oltre alle comuni tecniche di microscopia ottica a luce polarizzata e compensata, anche il SEM e la diffrattometria a raggi X, così da permettere una più accurata ricerca sulla percentuale di questi CC nel liquido sinoviale e per quanto possibile chiarire il ruolo che i cristalli svolgono nell'articolazione artrosica. A tal scopo abbiamo indagato il rapporto fra la presenza di questi cristalli nel LS ed altri indici di infiammazione del liquido stesso e, inoltre, con alcuni indici di attività clinica e di gravità nelle varie fasi di artrosi sintomatica del ginocchio.

PAZIENTI E METODI

PAZIENTI

Sono stati studiati 120 pazienti, 84 femmine, età media $68 \pm 10,7$ anni (range 50-89) (Tabella V), affetti da artrosi sintomatica del ginocchio, pervenuti presso l'ambulatorio di "Analisi del Liquido Sinoviale ed Ecografia articolare" dell'UOC di Reumatologia-Università di Padova, con versamento articolare, per approfondimento diagnostico.

Tabella V. Principali caratteristiche della popolazione in studio

Pazienti n°	120
Femmine n°	84
Maschi n°	36
Etá (anni)	$68 \pm 10,7$
Range (anni)	50-93
Altezza	$166,10 \pm 8,76$
Peso	$74,63 \pm 13,88$
BMI (Kg/m²)	$27,10 \pm 3,60$
Durata di malattia (mesi)	$62,01 \pm 64,54$
Durata del versamento (mesi)	$11,15 \pm 24,92$
Volume LS (ml)	$24,08 \pm 27,91$
GB (mm³)	$373,10 \pm 373,76$
PMN (%)	$10,05 \pm 16,71$
WOMAC total index	$1262,65 \pm 360,00$
Lequesne	$8,96 \pm 2,79$
VAS	$61,17 \pm 19,37$
Score di Kellgren	$2,08 \pm 1,03$

Tutti, previo consenso informato, sono stati sottoposti ad artrocentesi del ginocchio secondo le raccomandazioni della Società Italiana di Reumatologia (SIR) (98) ed a successivo esame del LS. Sono stati inclusi nello studio solo pazienti che soddisfacevano i criteri per l'OA dell'American College of Rheumatology (ACR) (99) e che, all'analisi del LS, presentavano, secondo la classica suddivisione in LS non infiammatorio, infiammatorio e settico (100) un LS classificabile come non infiammatorio, con una conta totale di globuli bianchi nel LS $< 2.000/\text{mm}^3$ (100,101).

Sono stati esclusi dallo studio i pazienti che avevano diagnosi per altre malattie reumatiche. Nessun paziente assumeva farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) da almeno 7 giorni e non aveva assunto farmaci di fondo per l'OA da meno di 3 mesi. Nessun paziente era stato sottoposto ad infiltrazioni di cortisone negli ultimi 3 mesi o di acido ialuronico nell'ultimo mese.

In questi pazienti sono state effettuate valutazioni algofunzionali, avvalendoci di alcune indicazioni metodologiche dello Studio M.I.D.A. (Misurazione del Dolore nell'Artrosi), sotto forma di questionario Indice algo-funzionale di Lequesne, WOMAC, VAS (102) (Figg 1-3)

Criteri di Inclusione ACR (99)

I pazienti affetti da gonartrosi sintomatica erano stati inclusi nello studio se presentavano dolore ed almeno tre delle sei caratteristiche seguenti:

- età > 50 anni
- rigidità mattutina < 30 minuti
- scrosci articolari
- dolorabilità dell'osso
- tumefazione ossea
- termotatto normale

METODI

A) INDICI CLINICI

Indice algo-funzionale di LEQUESNE (103) (Fig 1) comprende la valutazione di due componenti: dolore o fastidio in attività ed in condizioni di riposo– e massima distanza percorsa. Il punteggio massimo teorico è 24.

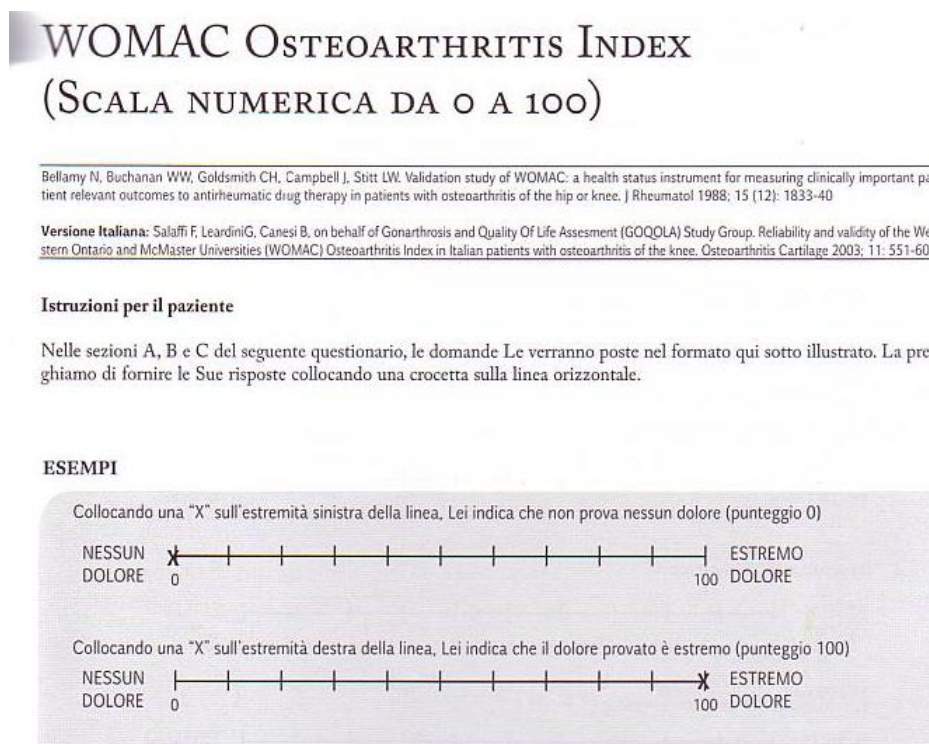
INDICE ALGO-FUNZIONALE DI LEQUESNE PER LA GONARTROSI		
<small>Lequesne MG, Mery C, Samson M, Gerard P. Indexes of severity for osteoarthritis of the hip and knee. Validation-value in comparison with other assessment tests. Scand J Rheumatol 1987;65:85-9</small>		
1) Dolore o fastidio		
A) Riposo notturno		
- Nessuno o insignificante	0	<input type="checkbox"/>
- Solo al movimento o in alcune posizioni	1	<input type="checkbox"/>
- Anche senza movimento	2	<input type="checkbox"/>
B) Rigidità mattutina		
- Meno di un minuto	0	<input type="checkbox"/>
- Minore di 15 minuti	1	<input type="checkbox"/>
- 15 minuti o più	2	<input type="checkbox"/>
C) Aumento del dolore rimanendo in piedi più di 30 minuti	0	<input type="checkbox"/> NO 1 <input type="checkbox"/> SI
D) Dolore al movimento		
- Nessuno	0	<input type="checkbox"/>
- Solo dopo aver percorso una certa distanza	1	<input type="checkbox"/>
- Subito dopo aver iniziato a camminare	2	<input type="checkbox"/>
E) Dolore o fastidio nella posizione seduta prolungata (2 ore)	0	<input type="checkbox"/> NO 1 <input type="checkbox"/> SI
2) Massima distanza percorsa		
- Illimitata	0	<input type="checkbox"/>
- Poco più di un chilometro, ma con limitazioni	1	<input type="checkbox"/>
- Circa un chilometro (circa 15 minuti)	2	<input type="checkbox"/>
- Da 500 a 900 metri (circa 8-15 minuti)	3	<input type="checkbox"/>
- Da 300 a 500 metri	4	<input type="checkbox"/>
- Da 100 a 300 metri	5	<input type="checkbox"/>
- Meno di 100 metri	6	<input type="checkbox"/>
- Con l'aiuto di un bastone o stampella	+1	<input type="checkbox"/>
- Con l'aiuto di due bastoni o stampelle	+2	<input type="checkbox"/>

Figura 1 Indice algo-funzionale di LEQUESNE (103) da Salaffi F, Carotti M. Clinimetria delle malattie muscolo scheletriche. Scale e Punteggi. Mattioli 1885. 2007;pp 365-6

Western Ontario and McMaster Universities (WOMAC) (104).

Il questionario WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities) comprende 24 domande che rilevano, con una scala da 1 a 100, il grado di dolore, rigidità e difficoltà (disabilità fisica funzionale) di pazienti affetti da OA nello svolgimento di alcune delle più comuni attività quotidiane.

I pazienti devono rispondere alle domande, riferendosi alle ultime 48 ore, riguardo dolore, rigidità e difficoltà, imputabili all'artrosi del ginocchio (Figura 2)



Le sarà richiesto di indicare su questo tipo di scala l'intensità del dolore, la rigidità o l'invalidità da Lei provati nel corso delle ultime 48 ore.

Nel fornire le risposte alle nostre domande, dovrà pensare al Suo ginocchio (o anca). Indichi l'intensità del dolore, della rigidità e dell'invalidità fisica che imputa all'artrosi che affligge il Suo ginocchio (o anca).

Figura 2 WOMAC (104) da Salaffi F, Carotti M. Clinimetria delle malattie muscolo scheletriche. Scale e Punteggi Scale e Punteggi. Mattioli 1885. 2007;pp 355-60
VAS (scala analogica visiva del dolore) (105).

Il paziente è invitato a quantificare, in una scala da 1 a 100 mm, quanto è forte il suo dolore (Figura 3)

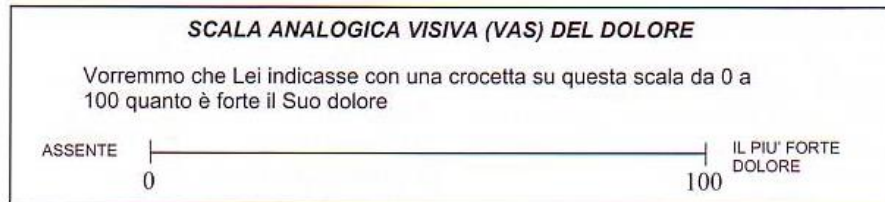


Figura 3 Scala Analogica Visiva (VAS) del dolore (105) da Salaffi F, Stancati A. Valutazione del dolore nelle malattie reumatiche: aspetti biometrici e semantici. In Scale di valutazione e Malattie Reumatiche. 2001 Mattioli 1885. p31.

B) INDAGINI STRUMENTALI

Ultrasonografia

Negli ultimi anni la tecnica ultrasonografica (US) viene impiegata sempre più frequentemente in campo reumatologico per la sua rapida esecuzione, la non invasività, per il basso costo, la ripetibilità e la buona compliance da parte del paziente. Nello studio dell'OA, in particolare della mano, dell'anca e del ginocchio, l'US ci permette di evidenziare specificamente i cambiamenti a cui va incontro la cartilagine, la conseguente riduzione della rima articolare, gli osteofiti, l'infiammazione e l'eventuale versamento. Un gruppo di studio dell'EULAR (European League Against Rheumatism), ha pubblicato dati interessanti riguardo la sensibilità dell'US rispetto alla radiologia convenzionale nell'OA della mano (106).

Nella GOA comunemente il versamento e la sinovite sono di moderata entità; l'US è più sensibile rispetto all'esame clinico nel rilevare la sinovite e correla bene con la RMN. Inoltre la presenza di sinovite o di versamento articolare all'US correla con il dolore, clinicamente rilevato, nella GOA (107, 108).

Il color Doppler ed il power Doppler completano l'esecuzione dell'esame ultrasonografico, evidenziando il grado di vascolarizzazione sinoviale che in alcuni

studi é risultato correlato alla sinovite rilevata e confermata con esame istologico in pazienti con GOA (109).

Su tutti i pazienti è stato condotto un esame ultrasonografico del ginocchio con sonda lineare a frequenza 7,5 Mhz, utilizzando l'apparecchio "Technos MP ESAOTE", per rilevare la presenza di versamento articolare e di segnale power Doppler come positivo/negativo per valutare l'attività di malattia.

Radiologia convenzionale

Tutti i pazienti avevano una diagnosi radiologica di GOA secondo i criteri di Kellgren e Lawrence (110).

C) PRELIEVO ED ESAME DEL LS

Artrocentesi

Tutti i pazienti venivano sottoposti ad artrocentesi del ginocchio per la raccolta del LS secondo le Raccomandazioni della Società Italiana di Reumatologia per l'esecuzione dell'artrocentesi (111).

Un ginocchio normale può contenere da 1 a 4 ml di LS. Un versamento articolare patologico del ginocchio è clinicamente evidenziabile mediante la manovra del *ballottamento rotuleo*, soprattutto quando vi è una raccolta abbondante di LS. In caso di minime quantità e/o di piccole articolazioni viene utilizzata la tecnica US, per mettere in evidenza il versamento e, talvolta, effettuare l'artrocentesi ecoguidata.

Muniti di guanti monouso, è stato individuato il punto di reperi. Dopo aver accuratamente disinfettato la cute con Braunol® al 7,5% (polivinilpirrolidone complesso iodico), l'artrocentesi è stata eseguita con siringa sterile monouso munita di ago sterile monouso 21G. Il liquido aspirato è stato posto immediatamente in provette pulite, non necessariamente sterili, senza additivi. ; 2ml di LS in una provetta contenente un anticoagulante (EDTA), necessario per la conta totale leucocitaria, mentre il resto è stato posto in una o più provette senza additivi per la conta differenziale delle cellule e la ricerca dei microcristalli.

Analisi del liquido sinoviale

Dopo l'artrocentesi sono state valutate le principali caratteristiche macroscopiche del LS: la quantità, l'aspetto, il colore e la viscosità. L'analisi citologica del LS è stata effettuata attraverso la conta totale e differenziale dei leucociti. La conta totale leucocitaria è stata effettuata mediante camera emocitometrica di Burkner, diluendo il campione con una soluzione di blu di metilene allo 0,1%, mentre la conta differenziale è stata eseguita con una colorazione sopravviale (Testsimplets®) che permette la distinzione di tutti i tipi cellulari presenti nel LS. La conta totale è stata espressa come numero di cellule per mm^3 , mentre la conta differenziale come percentuale. Come cut-off di LS non infiammatorio/infiammatorio è stato considerato il limite di 2000 globuli bianchi/ mm^3 (99,100).

Ricerca dei microcristalli al microscopio ottico

Il LS per la ricerca dei microcristalli è stato raccolto in una provetta priva di additivi ed esaminato nel più breve tempo possibile (112).

La ricerca dei microcristalli è stata effettuata con un microscopio a luce polarizzata dotato di un compensatore rosso di I ordine e di obiettivi 10x, 40x e 100x (ad immersione) (113). Una goccia di LS è stata posta su un vetrino precedentemente pulito con alcool a 70°. Il vetrino è stato così osservato dapprima a luce ordinaria, per permettere di distinguere la forma e la grandezza dei cristalli e poi a luce polarizzata e compensata per identificare i cristalli in base alla loro birifrangenza. Le loro caratteristiche vengono così studiate ruotando il polarizzatore e l'analizzatore l'uno rispetto all'altro.

La maggior parte dei cristalli di CPP presenta forma "a parallelepipedo" (CPP monoclino), ma si possono osservare anche forme cuboidi od ovoidali. Più rari sono invece gli aghiformi (CPP triclinico). Le dimensioni variano da 1 a 20 μm . Hanno birifrangenza debolmente positiva (114,115) (Figura 4a, 4b).

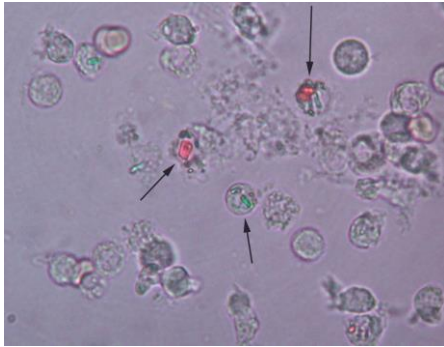


Figura 4a Cristalli di CPP a luce polarizzata e compensata. Ingrand 40x

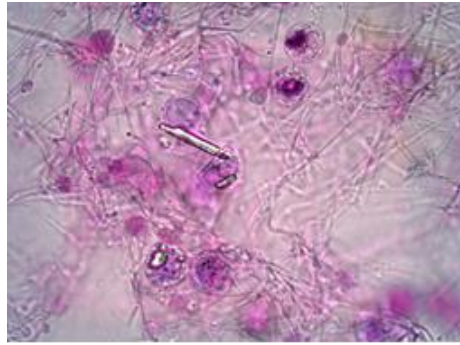


Figura 4b Cristalli polimorfi di CPP. Ingrand 40x

Le proprietà ottiche dei cristalli di CPP sono schematizzate nella Figura 5

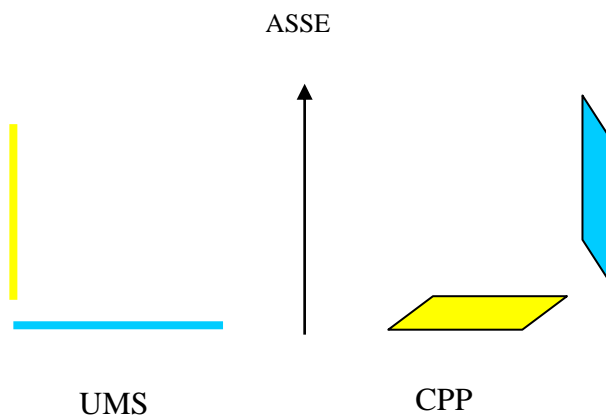


Figura 5 Rappresentazione schematica del colore dei cristalli di urato monosodico (UMS) e CPP alla luce polarizzata e compensata. Il cristallo esibisce colore giallo o blu a seconda dell'orientamento del suo asse maggiore rispetto all'asse del compensatore.

Colorazione con rosso di alizarina S

Il rosso di alizarina S è un colorante che in presenza di sali di calcio forma dei precipitati birifrangenti, dal colore rosso vivo. Questo test non è specifico potendo risultare positivo in presenza di altri cristalli come l'ossalato di calcio (116, 117). È stata preparata una soluzione di rosso di alizarina S al 2% pH 4,1-4,3 filtrata attraverso

un filtro Millipore da 0,22 μm e conservata al riparo dalla luce. Il test è stato eseguito depositando su un vetrino pulito una goccia di LS e una goccia di soluzione di alizarina, rifiltrata al momento dell'utilizzo, come si vede in Figura 6. Si mescola con l'aiuto di una pipetta Pasteur, si copre con un vetrino coprioggetto e si osserva immediatamente alla luce polarizzata. I cristalli di BCP, quando sono presenti, formano dei precipitati ovoidali di colore rosso bruno dal contorno netto e con una caratteristica forma a lamelle concentriche (Figura 7).

Alla luce polarizzata appaiono di un colore rosso arancio vivo e fortemente birifrangenti. Il risultato della lettura è interpretabile a seconda del numero di precipitati osservati in tutto il vetrino. E' considerato debolmente positivo (+) se i precipitati sono presenti solo in qualche campo del vetrino; mediamente positivo (++) quando sono presenti in almeno il 50% dei campi osservati; fortemente positivo (+++) quando vengono identificati in tutti i campi. È importante che la lettura venga eseguita entro pochi minuti dalla colorazione dato che il rosso alizarina colora anche altri cristalli di calcio quali PFCD ed ossalato di calcio che però richiedono un tempo maggiore (>10min).



Figura 6 Preparazione del campione per la colorazione con rosso di Alizarina. Una goccia di LS viene mescolata con il colorante filtrato per eliminare i precipitati della soluzione madre

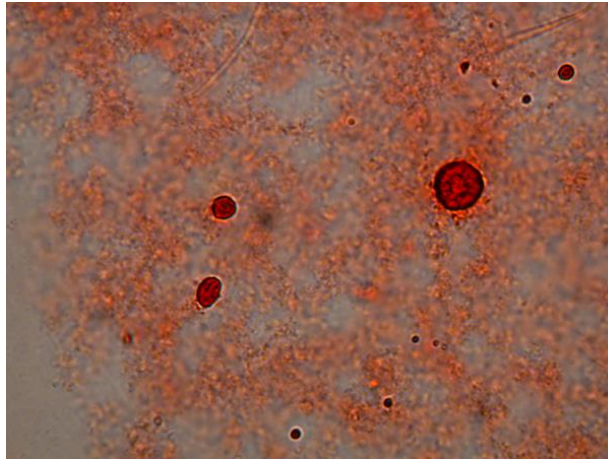


Figura 7 Colorazione con rosso di Alizarina al MO. Ingrandimento 40x

Analisi del liquido sinoviale al microscopio elettronico a scansione (SEM)

L'analisi del LS al SEM è stata effettuata con la collaborazione del Dipartimento di Geoscienze e Georisorse dell'Università - CNR di Padova. (Figura 8),



Figura 8 SEM Camscan MX 2500. Dipartimento di Geoscienze e Georisorse dell'Università - CNR di Padova.

Il Microscopio Elettronico a Scansione, SEM Camscan MX 2500 è uno strumento elettro-ottico che permette, in seguito all'emissione di un fascio di elettroni, di analizzare i vari segnali prodotti dall'interazione degli elettroni stessi con il campione in esame. Dall'elaborazione di questi segnali si ottiene un'ampia gamma di informazioni non solo morfologiche, ma anche compositive e strutturali

Il SEM è schematicamente costituito dai seguenti elementi, rappresentati nella Figura 9:

- una colonna elettronica, dove viene creato il fascio di elettroni mediante un filamento (comunemente di esaboruro di Lantano) che, portato ad elevata temperatura, produce elettroni per effetto termoionico;
- una camera da vuoto, ove il fascio elettronico interagisce con il campione da analizzare
- vari tipi di rivelatori acquisiscono i segnali dell'interazione fascio-campione e li trasferiscono agli elaboratori;
- un schermo, in cui si ricostruisce l'immagine dal segnale.

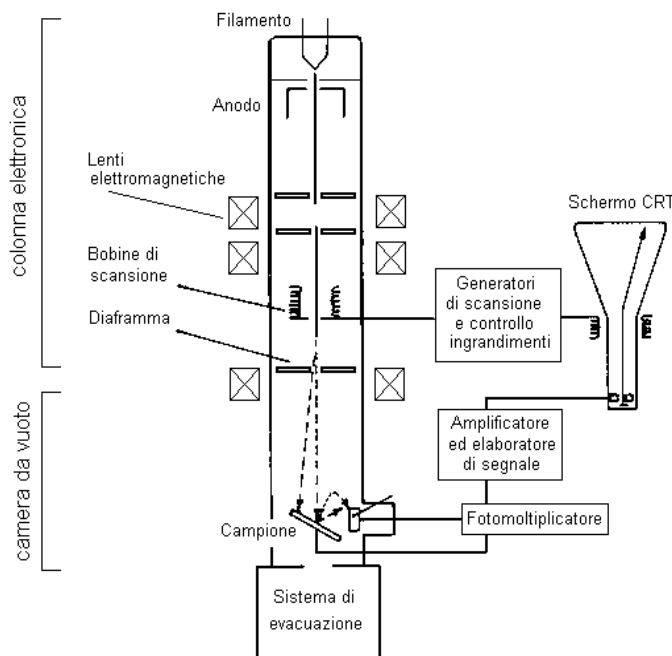


Figura 9 Schema generale di un SEM.

Gli elettroni sono accelerati ad energia variabile tra alcune centinaia ed alcune decine di migliaia di eV (in genere da 200 eV a 30 keV) grazie ad un anodo posto sotto il filamento. Il fascio che emerge dalla sorgente è divergente, ma viene fatto riconvergere ed è focalizzato da una serie di lenti elettromagnetiche e di fenditure all'interno della colonna. All'estremità inferiore della colonna, una serie di bobine di scansione deflette il fascio fornendogli un movimento alternato lungo linee parallele ed equidistanti, in modo che, una volta raggiunta la superficie del campione, vada a ricoprirne un'area predefinita. Il fascio, infine, focalizzato dalla lente finale, esce dalla colonna e va a colpire il campione all'interno della camera da vuoto. Come gli elettroni del fascio penetrano all'interno del campione, essi perdono energia, che viene riemessa dal campione sotto varie forme. Ogni tipo di emissione è potenzialmente un segnale dal quale creare un'immagine.

Il fascio elettronico colpisce la superficie del campione e gli elettroni del fascio iniziano ad interagire con le nuvole elettroniche degli atomi di cui è costituito il campione, attraverso due meccanismi principali: diffusione elastica ed anelastica.

Il risultato di questi processi è la produzione di una notevole varietà di segnali costituiti da elettroni secondari, retrodiffusi, assorbiti, e trasmessi, elettroni Auger, coppie elettrone-lacuna, radiazione elettromagnetica (nello spettro UV-IR) e radiazione X.

La regione del campione da cui originano i segnali di interazione con il fascio e da cui questi escono per venire rivelati è chiamata volume di interazione. La forma e le dimensioni di tale volume dipendono dalle caratteristiche del fascio incidente e dalla composizione del campione e, in molti casi, risultano più estese del diametro del fascio determinando così il limite di risoluzione, che nel caso del microscopio utilizzato è di 50 Å. dall'interazione fascio-campione.

a) Formazione dell'immagine

A differenza del microscopio ottico, che fornisce un'immagine reale del preparato in esame, il SEM, grazie alla scansione del fascio elettronico, restituisce un'immagine

virtuale a partire dai segnali emessi dal campione. Tali segnali raccolti dagli appositi rivelatori, da analogici vengono poi convertiti in segnali digitali per poter essere elaborati opportunamente.

Per visualizzare in un'immagine i segnali attraverso uno schermo a tubo catodico (CRT), la deflessione del fascio avviene in sincronia con il pennello del CRT, che è modulato con l'intensità del segnale. In questo modo il sistema riporta il segnale punto per punto sul monitor, facendo corrispondere ad ogni punto un pixel, creando così l'immagine.

Ad eccezione di poche operazioni che possono essere compiute anche meccanicamente dall'operatore (ad es.: il movimento del campione), il controllo dello strumento è completamente automatizzato ed avviene attraverso alcuni software specifici installati su diversi computer.

Variabili sono il movimento laterale e verticale, la messa a fuoco e la scelta dell'ingrandimento da utilizzare, per quanto riguarda il campione. Il fascio elettronico può essere adeguatamente configurato a seconda del tipo di analisi da effettuare e i parametri che possono essere modificati sono sostanzialmente due: l'accelerazione (agendo sulla differenza di potenziale, variabile da alcune centinaia di Volt a 30kV) e il diametro finale o spot-size (che può variare da circa un micron ad alcuni micron, intervenendo sulle lenti elettromagnetiche). Possono essere considerate variabili anche la natura del materiale, la sua preparazione, la distanza tra l'uscita del fascio e il campione (Working Distance), la posizione del rivelatore e la sua configurazione.

Il SEM, in esercizio presso il Dipartimento di Geoscienze dell'Università di Padova è dotato di tre diversi rivelatori (Figura 10) per l'acquisizione di tre dei segnali prima elencati, ed esattamente:

- elettroni secondari (Secondary Electrons, SE)
- elettroni retrodiffusi (Backscatter Electrons, BSE)
- radiazione X.

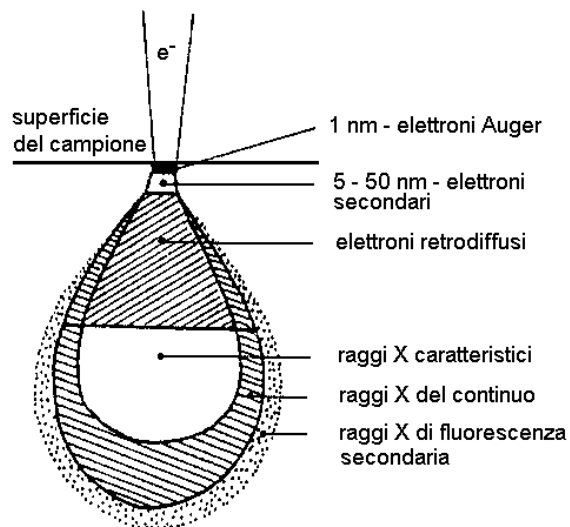


Figura 10 Zone del campione in cui si originano alcuni tipi di segnale prodotti dall'interazione fascio-campione.

Gli elettroni secondari sono elettroni a bassa energia (fino a poche decine di eV) e provengono dalla porzione più superficiale del campione (pochi nm). La proprietà principale di questo tipo di segnale è quella di essere fortemente controllato dalla morfologia del campione, pertanto l'immagine risultante sarà l'immagine in bianco e nero dell'area interessata dalla scansione del fascio in cui il contrasto delle tonalità di grigio metterà in risalto l'aspetto tridimensionale dell'oggetto in esame. L'utilizzo di questo tipo di segnale, è intuitivo, sarà rivolto allo studio delle caratteristiche morfologiche di oggetti tridimensionali o dei loro rapporti strutturali.

Gli elettroni retrodiffusi sono elettroni ad alta energia (da 50 eV all'energia degli elettroni del fascio) prodotti fino ad una certa profondità del campione (pochi micron). La loro energia dipende direttamente dall'energia del fascio incidente e dalla composizione chimica (più precisamente, dal peso atomico medio) del materiale di cui è costituito il campione, così risulteranno relativamente più chiare le parti composte da un materiale a peso atomico medio elevato e più scure le parti a peso atomico medio inferiore; il caso estremo è il nero che corrisponde a non emissione (parti vuote del campione).

La radiazione RX permette un'analisi chimica puntuale, in cui il fascio può essere posizionato a piacere su un qualsiasi punto dell'area da analizzare. L'immagine risultante sarà uno spettro di Raggi X da cui si può risalire alla composizione chimica del materiale analizzato. Ogni picco dello spettro è riconducibile ad una ben precisa specie atomica (Figura 11).

Poiché il bombardamento elettronico genera non solo lo spettro caratteristico, ma anche uno spettro continuo (radiazione di fondo), dovuto all'interazione fra gli elettroni primari e i nuclei degli atomi, è necessario far uso di opportuni sistemi di rivelazione (spettrometro EDS, nel nostro caso) che permettano di analizzare e separare le diverse energie delle radiazioni, per poterne poi fare una misura, da cui infine sarà possibile ricavare la composizione del campione (118)

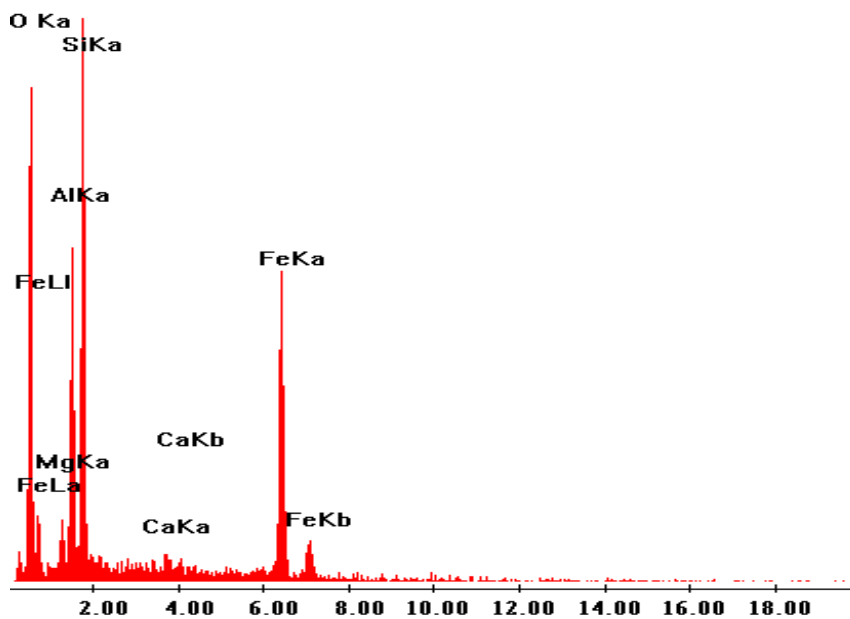


Figura 11 . Spettro di Raggi X: i vari picchi identificano le diverse specie atomiche di cui è costituito il punto analizzato del campione.

b) Preparazione del campione

Per concentrare i cristalli, eventualmente presenti nel LS, abbiamo sottoposto i campioni a 8 cicli, di 3 minuti ciascuno, di ultracentrifugazione mediante Ultracentrifuga EPPENDORF 5414. Ad ogni ciclo, eliminato il sovrantante, è stata aggiunta nella provetta acqua deionizzata al fine di purificare il pellet dai residui organici ed evitare la cristallizzazione del cloruro di sodio responsabile di artefatti.

I pellets così ottenuti sono stati posti su supporti di biadesivi di carbonio (conduttivo) a loro volta incollati sui vetrini portacampione opportunamente siglati (Figura 12). È stato preparato un campione *in bianco*, con la stessa metodica di purificazione, con acqua deionizzata, per evidenziare eventuali contaminazioni.

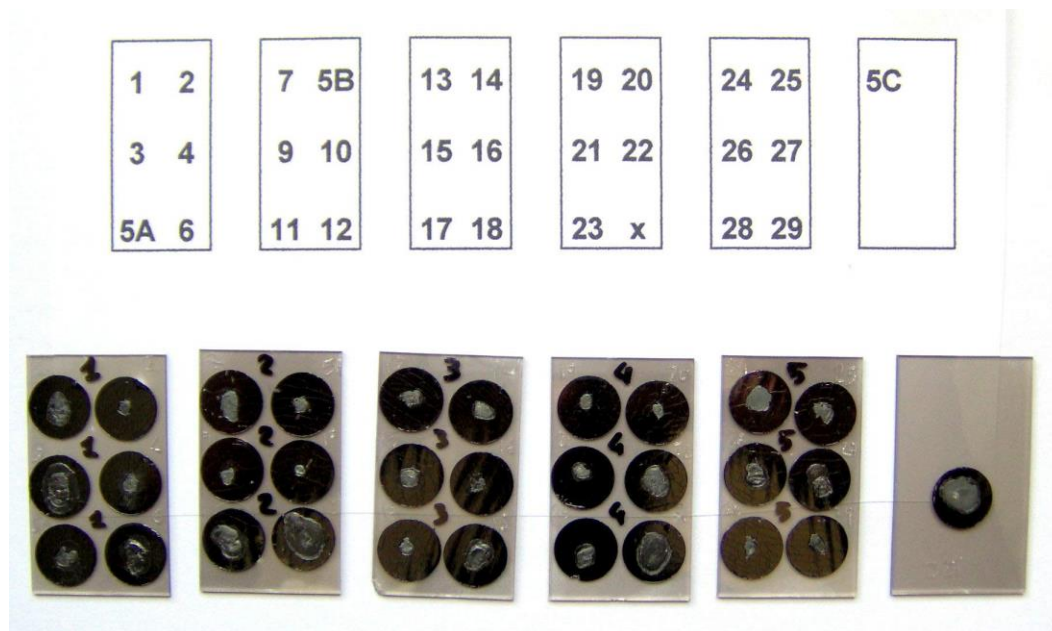


Figura 12. Alcuni campioni posti su biadesivi di carbonio a loro volta incollati sui vetrini portacampione opportunamente siglati per l'analisi al SEM

Dopo una accurata asciugatura del campione in campana da vuoto a temperatura ambiente, i vetrini sono stati metallizzati a carbonio, con il metallizzatore in dotazione presso il laboratorio di Microscopia Elettronica del Dipartimento di Geoscienze dell'Università di Padova.

I campioni sono stati inseriti nella camera del SEM dove successivamente è stato creato l'alto vuoto necessario per l'accensione del filamento di esaboruro di Lantanio.

Gli elettroni sono stati accelerati a 20 KeV con uno spot-size di 2.

La working-distance utilizzata per questo studio variava tra 15 e 35 mm al fine di ottenere una migliore definizione dell'immagine e contestualmente un buon conteggio per l'analisi edax. I campioni sono stati esaminati sia con il rivelatore di elettroni retrodiffusi (Backscatter Electrons, BSE) che con il rivelatore di elettroni secondari (Secondary Electrons, SE) a diversi, ma prestabiliti ingrandimenti; a 20x, per mettere in evidenza il campione nel suo insieme; a 200x per metter in evidenza la numerosità dei cristalli presenti; a 1000x per il riconoscimento strutturale e l'analisi EDS

Analisi al diffrattometro a raggi X

A differenza del SEM che svolge un'analisi qualitativa puntiforme, la diffrattometria a raggi X è una metodica che consente la determinazione di tutte le fasi mineralogiche che compongono il materiale in esame attraverso la misurazione delle distanze tra i piani reticolari delle fasi stesse.

Un fascio di raggi X, approssimativamente monocromatico, che colpisce un cristallo e vi penetra, subisce il fenomeno della diffrazione quando viene "riflesso" in fase con il raggio incidente dai piani reticolari in accordo con la legge di Bragg.

La legge di Bragg mette in relazione la lunghezza d'onda della radiazione con il percorso all'interno del cristallo e l'angolo di incidenza secondo la seguente equazione:

$$n\lambda = 2d \sin\theta$$

dove:

λ è la lunghezza d'onda della radiazione incidente

d è la distanza reticolare tra piani paralleli

n è l'ordine di riflessione

L'equazione di Bragg mette in relazione la distanza tra i piani reticolari (d) e l'angolo di diffrazione theta (θ).

Come è possibile notare in Figura 13 il fascio di raggi X, di una certa lunghezza d'onda, sarà diffratto dalla famiglia di piani P, caratterizzati da una distanza interplanare d , solo

quando le onde saranno in fase tra loro, cioè quando la differenza di cammino dei raggi ($GE+EH=2d\sin\theta$) sarà uguale ad un numero intero di lunghezze d'onda $n\lambda$ (n lambda).

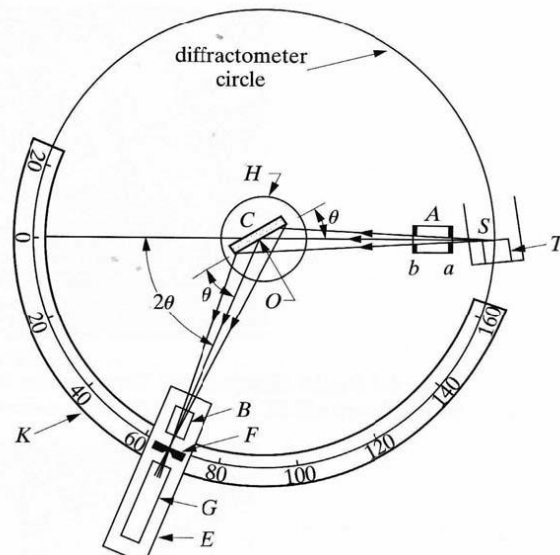


Figura 13. Schema del processo di acquisizione dei picchi

Quindi conoscendo la radiazione incidente, e misurando l'angolo di diffrazione, si può risalire al valore di d/n di quella determinata famiglia di piani reticolari. Il risultato di una analisi diffrattometrica è rappresentato da una curva in un diagramma cartesiano, dove in ascissa sono riportati i valori di 2θ e in ordinata le intensità dei raggi riflessi. I diagrammi che si ottengono sono costituiti da una successione di picchi con massimo in corrispondenza dell'angolo 2θ a cui si è verificata la diffrazione. Ogni fase mineralogica è caratterizzata da un insieme di famiglie di piani reticolari e quindi da una serie di valori di d/n che corrisponderanno ad altrettanti valori di θ e di intensità dei picchi. I dati relativi a tutte le specie mineralogiche studiate sono raccolti in database. Misurando sperimentalmente gli angoli 2θ a cui si verificano gli effetti di diffrazione, per un campione cristallino, con le relative intensità, e confrontandoli con i valori riportati nel database si può risalire alle specie mineralogiche presenti. (119)

Preparazione del campione e condizioni di misura

Il campione adeguatamente preparato e disidratato viene depositato su un porta campione *zerobackground* di silicio.

L'analisi è stata condotta sul diffrattometro Panalytical X'Pert Pro equipaggiato con tubo a raggi X con anodo in rame (settaggio tubo 40kV e 40mA) e rivelatore veloce Pixcel (Figura 14)

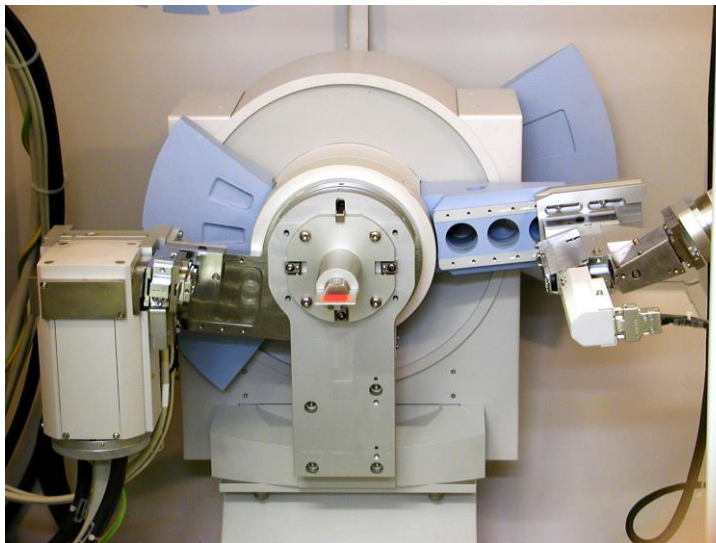


Figura 14. Diffrattometro Panalytical X'Pert Pro equipaggiato con tubo a raggi X con anodo in rame (settaggio tubo 40kV e 40mA) e rivelatore veloce Pixcel. Dipartimento di Geoscienze dell'Università di Padova

Per poter evidenziare meglio la presenza di fasi cristalline su quantità minime di materiale (<mg) è stata fatta un'analisi particolarmente lenta (400s x 0,02° di 2theta) sul campione in rotazione (spinning).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il Software GraphPad Prism® versione 5.

Le correlazioni nei gruppi sono state analizzate mediante test non parametrico di Spearman.

Il test non parametrico di Mann-Whitney è stato utilizzato per mettere a confronto i gruppi suddivisi per presenza/assenza di cristalli di calcio evidenziati al SEM.

Il confronto tra più gruppi suddivisi in base alla durata di malattia e in base al grado radiologico è stato effettuato mediante ANOVA, seguito da test post hoc di Dunn.

La positività del power Doppler nei gruppi suddivisi in base alla durata di malattia e in base al grado radiologico per presenza/assenza di cristalli al SEM è stata valutata mediante test del χ^2 con correzione di Fisher per campioni < 50 . È stata considerata significativa una $p < 0,05$.

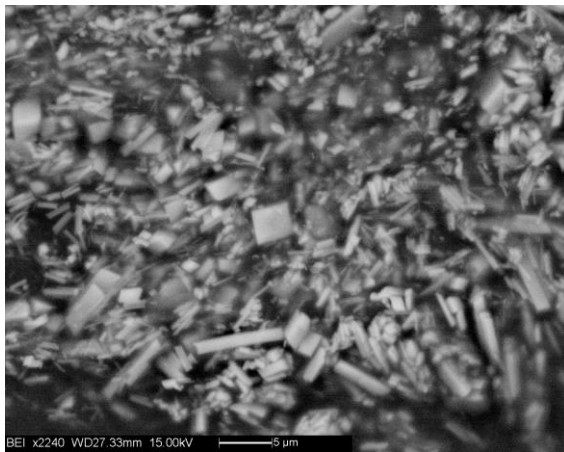


Figura 15. Foto al SEM di cristalli di CPP. Ingrandimento 2000x.

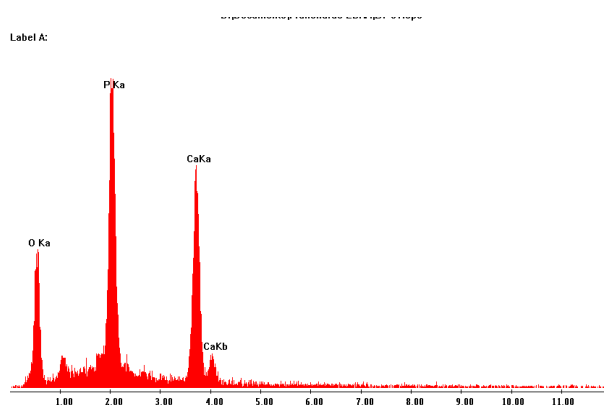


Figura 16. Spettro di emissione a raggi X di un cristallo di CPP.



Figura 17. Foto al SEM di cristalli di BCP e piccoli CPP. Ingrandimento 2400x

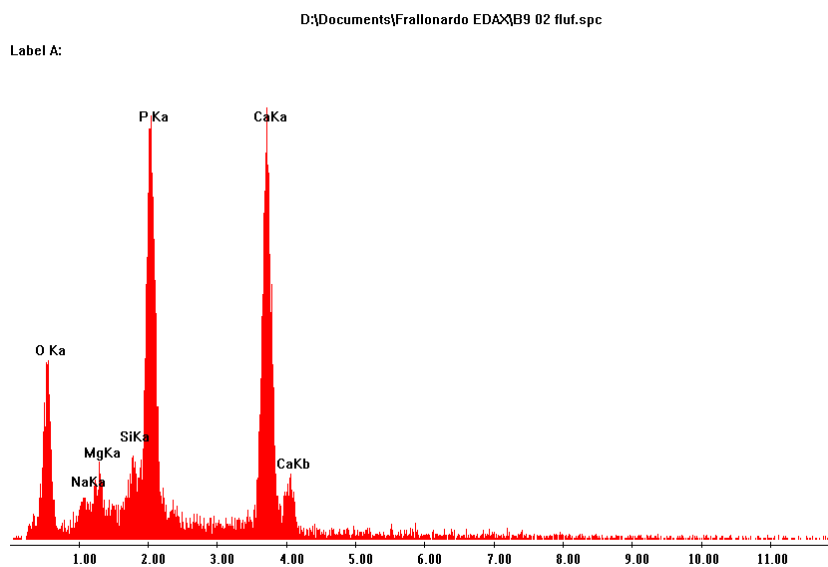


Figura 18. Spettro di emissione a raggi X di cristalli di BCP.

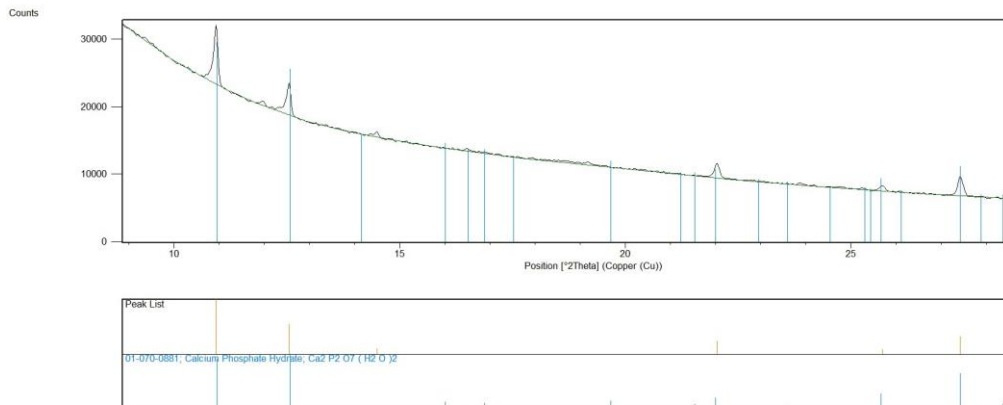


Figura 19. Diffrattogramma a raggi X di un campione di CCP

RISULTATI

L'analisi al SEM (Figg 15-18) ci ha consentito di rilevare i cristalli di calcio nel LS in 62/120 pazienti (51,6%).

Da una prima valutazione delle differenze tra le due popolazioni, i pazienti con cristalli di calcio rispetto a quelli senza erano più anziani ($p=0,036$), avevano una maggior difficoltà di movimento ($p=0,0041$); presentavano una % di PMN nel LS superiore (0,0041) e una presenza di power Doppler statisticamente significativa ($p=<0,0001$). (Tabella VI).

Tabella VI. Pazienti divisi per presenza/assenza di CC al SEM

CRISTALLI DI CALCIO AL SEM			
120 pazienti	positivi (62)	negativi (58)	Mann-Whitney p
Età (in anni)	71,54 (10,92)	64,13 (8,97)	0.036
BMI (Kg/m²)	27,40 (3,78)	26,20 (3,18)	n.s.
durata di malattia (mesi)	70,46 (67,19)	50,35 (55,69)	n.s.
volume LS (ml)	22,82 (26,17)	26,53 (30,89)	n.s.
GB (mm³)	411,29 (386,28)	331,03 (333,09)	n.s.
PMN (%)	13,12 (18,76)	6,42 (13,37)	0,0041
dolore	242,17 (110,63)	197,98 (98,77)	n.s.
rigidità	108,27 (50,74)	86,67 (44,12)	n.s.
difficoltà	1194,80 (1317,51)	871,15 (223,57)	0,0041
WOMAC	1377,38 (354,07)	1146,03 (317,15)	n.s.
Lequesne	9,80 (2,78)	8,03 (2,54)	n.s.
VAS	63,37 (18,02)	58,27 (20,74)	n.s.
Power Doppler	0,77 (0,42)	0,08 (0,28)	<0,0001
Kellgren	2,17 (1,03)	1,96 (1,00)	n.s.

L'analisi ultrasensibile al SEM ci ha permesso di individuare con precisione le differenti tipologie di CC.

I CPP sono stati evidenziati in 37/120 pazienti (30%).

Nei pazienti con CPP+ abbiamo riscontrato una differenza significativa per età ($p=0,0002$), durata di malattia ($p=0,041$), dolore ($p=0,039$), grado KL ($p=0,0334$), power Doppler ($p=0,0001$).

Per quanto riguarda, inoltre, nei pazienti con CPP+ abbiamo riscontrato una correlazione tra loro degli indici clinici: dolore, rigidità, difficoltà, WOMAC, Lequesne. Una correlazione inversa è stata riscontrata tra il power Doppler e la conta totale di GB.

I BCP sono stati evidenziati in 33/120 pazienti (27,5%).

Nei pazienti con BCP+ abbiamo riscontrato una differenza significativa per WOMAC ($p=0,0001$), dolore ($p=0,0001$), rigidità ($p<0,0001$), difficoltà ($p<0,0001$), Lequesne ($p<0,0001$), VAS ($<0,0004$), power Doppler ($p<0,0001$); per l'età è stato riscontrato un trend positivo senza significatività statistica ($p=0,046$). Per quanto riguarda, inoltre, i pazienti con BCP+ abbiamo riscontrato una correlazione tra KL e durata di malattia.

In accordo con uno degli obiettivi principali dello studio, che era quello di osservare l'influenza della presenza di CC nelle varie fasi di malattia, in particolare nella fase early, abbiamo suddiviso i pazienti in 3 gruppi:

	n° pazienti	durata di malattia
I gruppo	49	< 1 anno
II gruppo	27	1-5 anni
III gruppo	44	> 5 anni

Le differenze principali fra i pazienti dei 3 gruppi (Tabella VII) consistevano nell'età, ovviamente maggiore nel gruppo con più lunga durata di malattia, nella positività al power Doppler. Com'era logico aspettarsi, la gravità del quadro radiografico erano peggiori nel III gruppo, con maggiore durata di malattia

Tabella VII. Differenze principali fra i pazienti dei 3 gruppi suddivisi per durata di malattia

	DURATA DI MALATTIA				
	I (<1 anno)	II (1-5 anni)	> 5 anni	Anova* p	
età (in anni)	63 (7,94)	63 (9,6)	72 (8,3)	0,0038	III vs I p<0.001
BMI (Kg/m²)	27,36(3,1)	27,30 (4,12)	25,98 (3,81)	n.s.	n.s
volume LS (ml)	22,68 (21,30)	17,72 (15,89)	11,94 (10,64)	n.s	n.s
GB (mm³)	567,56 (600,95)	363,63 (353,95)	342,85(334,02)	n.s.	n.s.
PMN (%)	10,75 (16,82)	22,80 (26,76)	19,05 (19,41)	n.s.	n.s.
dolore	215,24 (90,69)	222,04 (104,82)	239,85 (80,36)	n.s.	n.s.
rigidità	96,32 (52,32)	85,77 (40,32)	128,90 (58,43)	n.s	n.s
difficoltà	930,45 (235,27)	969,86 (245,48)	976,76(243,29)	n.s.	n.s
WOMAC	1242,13 (324,95)	1277,68 (307,82)	1345,52(326,7)	n.s	n.s
Lequesne	8,86 (2,47)	8,13 (2,21)	10,23 (2,38)	n.s	n.s
VAS	63,62 (18,75)	66,95 (15,27)	71,04 (15,64)	n.s.	n.s.
Kellgren	1,62 (0,79)	1,90 (1,06)	2,85 (1,10)	0,0003	III vs I p<0,001 II vs I p<0,05
Power Doppler	1,02 (1,0)	1,90 (1,06)	2,85 (1,10)	0,020	I vs III p<0,05 I vs II p<0,0001

Inoltre abbiamo ulteriormente suddiviso i tre gruppi per la presenza di CPP e BCP. In Tabella VIII sono riassunti i dati numerici e le percentuali dei cristalli di CPP e BCP nei tre gruppi suddivisi per durata di malattia.

Tabella VIII.

Durata di malattia	I gruppo	II gruppo	III gruppo
CPP +	12 (24,5%)	6 (22,3)	19 (43,2 %)
CPP -	37 (75,5%)	21 (77,7%)	25 (56,8%)
BCP +	14 (28,6%)	3 (11,1%)	16 (36,6 %)
BCP -	35 (71,4%)	24 (89,9%)	28 (63,6%)

Quando le caratteristiche dei tre gruppi suddivisi in base alla durata di malattia venivano confrontate per presenza o assenza di CPP nel I gruppo differenze significative si osservavano per il Power Doppler ($p=0,0039$) (Fig.20); anche se al limite della significatività, tendenzialmente più elevato, risultava il dolore. Nel III gruppo non abbiamo riscontrato differenze significative tra la presenza e assenza di CPP.

Considerando i BCP nel I gruppo sono state riscontrate differenze significative nei BCP+ nei confronti dei BCP- per il dolore ($p=0,0002$), la rigidità ($p=0,045$), la difficoltà ($p=0,0014$), il WOMAC ($p=0,0002$) e per il power Doppler ($p=0,0009$) (Figg.21 a-b-c)

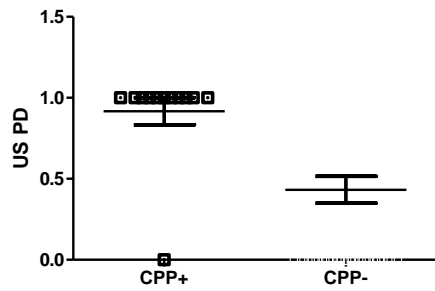
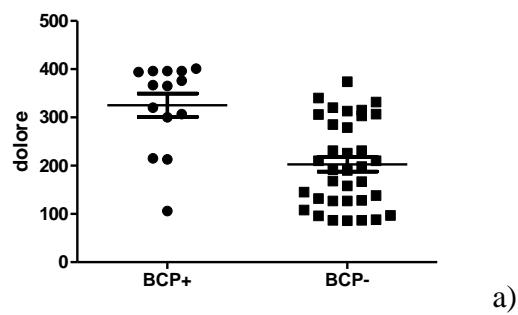
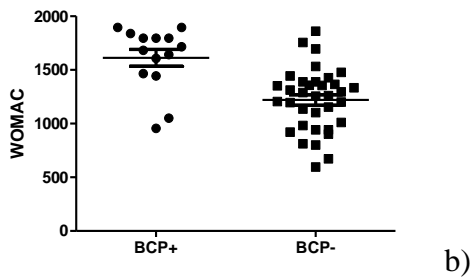


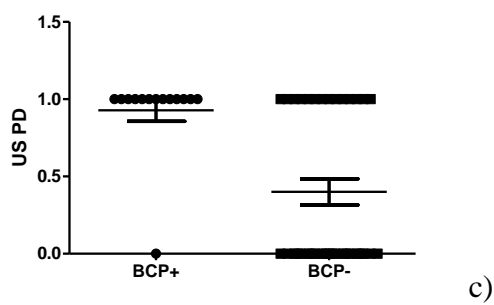
Figura 20. Confronto tra CPP+ e CPP-nel I gruppo (early GOA) per US Power Doppler



a)



b)



c)

Figura 21 a-b-c

Confronto tra BCP+ e BCP-nel I gruppo (early GOA) per dolore, WOMAC, US Power Doppler

DISCUSSIONE

Date le evidenze del potente ruolo proinfiammatorio dei CC, sia CPP che BCP, in precedenti studi in vitro e sull'animale, era sorprendente che la loro presenza nell'uomo fosse indifferente. Com'è noto, dopo la costatazione del ruolo dei cristalli di urato monosodico (UMS) nell'attivazione della piattaforma intracellulare detta *inflammasoma* anche i cristalli di calcio possono agire con lo stesso meccanismo, come messo in evidenza da studi in vitro e nell'animale.

Va comunque ribadito come difficilmente, a differenza di quanto accade nella gotta con cristalli di UMS, raramente i BCP induca quadri clinici così infiammatori. Quindi è probabile, come già suggerito ampiamente, che la presenza in sé dei cristalli non sia sufficiente per scatenare da sola una reazione infiammatoria potente, rendendosi necessaria la presenza di altri cofattori. Ad esempio sia per UMS che per CPP l'attacco acuto, rispettivamente, di gotta e di artrite acuta da pirofosfato di calcio, vengono seguiti da periodi intercritici caratterizzati da un'inflammazione subclinica che ha, tuttavia, un suo valore ed una sua attività anche nello sviluppo di comorbidità, data le ripercussioni sistemiche. La stessa ipotesi si può formulare per i BCP i quali raramente esprimono una reazione potente, ma che possono sussistere in maniera latente, dando luogo ad un'inflammazione di ridotta entità, spesso subclinica, ma rilevante dal punto di vista del coinvolgimento nei disturbi della malattia.

Il nostro studio ci ha permesso di confermare che la presenza dei cristalli di calcio nel liquido sinoviale di pazienti affetti da artrosi del ginocchio sintomatica, è piuttosto comune.

Nel nostro studio, in effetti, i cristalli di calcio sono stati ritrovati in oltre il 50% circa dei liquidi esaminati con tecnica ultrasensibile, di cui CPP 30% e BCP 27,5 % in accordo con i dati di precedenti studi. In 7 pazienti abbiamo riscontrato la contemporanea presenza di entrambi di cristalli di calcio.

Va però rilevato che la percentuale della loro presenza è risultata differente nei due tipi di cristalli di calcio se consideriamo la durata di malattia. Infatti dal confronto tra *early*

(durata di malattia < 1 anno = I gruppo) e *late* (durata di malattia > 5 anni = III gruppo) GOA i CPP risultano nettamente maggiori nei pazienti con più lunga durata di malattia (I = 24,5%; III = 43,2%); mentre tale differenza non è così marcata per i BCP (I = 28,56%; III = 36,6%).

Tenuto conto delle ipotesi patogenetiche riguardanti la presenza di cristalli di calcio, questa viene considerata come una conseguenza del danno cartilagineo.

Nel nostro studio, suddividendo la popolazione secondo la durata di malattia i CPP sono risultati più numerosi nel gruppo con durata di malattia maggiore; nel gruppo early, tuttavia la presenza di cristalli di calcio non è irrilevante. Questo dato è particolarmente intrigante tenendo conto che è difficilmente ascrivibile alla degenerazione cartilaginea vista l'appartenenza di questi pazienti ad un grado radiologico KL di I e II grado.

Peraltro un ulteriore elemento particolarmente interessante è che la positività dei cristalli di calcio si associa ad un maggior grado di infiammazione. Ciò era stato già segnalato in passato dal nostro gruppo, dall'analisi del LS, con riscontro di leucocitosi sinoviale. Nel nostro studio vi è la conferma di questo aspetto, utilizzando una metodica strumentale sensibile come il power Doppler ecografico.

Prendendo in considerazione i due gruppi di cristalli di calcio, i CPP nella popolazione generale correlano con la durata di malattia, con il danno radiografico e con gli indici clinici. I cristalli di BCP risultano in correlazione con gli indici clinici. Ciò non è sorprendente in quanto la possibilità di un'evoluzione più grave di malattia era già stata suggerita per OA associata a CPP o per l'artropatia da pirofosfato di calcio radiologicamente rilevata. È interessante comunque il rapporto con la positività dei cristalli di calcio e il power Doppler considerato un indice sensibile di infiammazione sinoviale. Sia la presenza di cristalli di calcio in generale, che nei due sottogruppi CPP e BCP è correlata con il power Doppler positivo. Quindi non vi è alcun dubbio che pazienti affetti da GOA, con presenza di cristalli di calcio nel LS hanno una forma più infiammatoria rispetto ai soggetti negativi. Osservando i risultati ottenuti riguardo la popolazione generale questo studio ci ha offerto spunti di riflessione rilevanti. In particolare nei soggetti CPP negativi al SEM il power Doppler positivo correla con gli indici clinici e radiologico KL; ciò si conferma anche quando si prende in

considerazione i pazienti con CPP+, a considerazione del fatto che la presenza/assenza dei CPP appare indifferente rispetto alla gravità di malattia.

Spostando la nostra attenzione sull'elemento più innovativo che è quello di cercare di interpretare il significato dei cristalli di BCP è che questi sono senza alcun dubbio associati ad un maggior grado di infiammazione e di conseguenza di una maggiore espressione dei sintomi. Ciò che è sorprendente rispetto ai CPP è che non sembrano contribuire al danno strutturale. Da questo punto visto era molto interessante indagare la loro associazione con l'infiammazione sinoviale per cercare di indagare sul loro ruolo patogenetico come possibile induttore del processo artrosico andando ad osservare il loro comportamento nel gruppo *early*:

In questo gruppo intanto è sorprendente la loro frequenza in quasi un terzo dei pazienti. Questo è un risultato originale, in quanto non segnalato in letteratura. Inoltre la mancanza di riscontro di danno cartilagineo si potrebbe ipotizzare che gli stessi condrociti possano essere sedi di formazione di CC oppure che i CC si formino più precocemente rispetto all'alterazione condrocitaria e poi contribuiscano allo sviluppo di un processo infiammatorio localizzato che porta potenzialmente all'insorgenza dell'artrosi. Il ruolo dell'infiammazione come possibile causa di insorgenza dell'artrosi e un'acquisizione piuttosto recente.

Quindi se si ammette che i BCP sono più associati ad un maggiore grado di infiammazione non è possibile non prendere in considerazione il ruolo nella insorgenza ma anche nell'evoluzione dell'OA.

Peraltra è anche interessante constatare che l'infiammazione più marcata con BCP è anche associata con una maggiore espressione sintomatologica sia per quanto riguarda il dolore che la rigidità e la ridotta funzione articolare. È sorprendente che non vi sia differenza significativa nella conta leucocitaria totale, per cui si può ipotizzare che l'infiammazione si estrinsechi più a livello di attività leucocitaria che non di chemiotassi, diversamente per quanto osservato per i CPP.

Questo è rilevabile nella popolazione generale ma anche prendendo in considerazione i singoli sottogruppi.

Questo è il primo studio che ha preso in considerazione il significato della presenza dei cristalli di calcio in pazienti in fase precoce di malattia sintomatica, con riscontro nel gruppo early di un'inflammatione significativamente più marcata nei pz con cristalli di calcio.

CONCLUSIONI

Questo è il primo studio che permette di valutare il significato della presenza di cristalli di calcio nel LS di pazienti affetti da GOA, utilizzando metodica molto sofisticata come il SEM in una popolazione piuttosto ampia di pazienti.

Elemento più innovativo ed originale del nostro lavoro è stato la possibilità di suddividere i pazienti in base alla durata di malattia. Ciò ha permesso di rilevare per la prima volta che i cristalli di calcio sono presenti già nella fase precoce di malattia in una percentuale rilevante suggerendo considerazioni importanti dal punto di vista nel ruolo nella patogenesi e nell'evoluzione della malattia.

Particolarmente intrigante risulta l'analisi di pazienti con BCP nel gruppo early. La presenza dei BCP è sicuramente associata a un grado maggiore di infiammazione e smentirebbe studi precedenti in cui veniva suggerito che i BCP fossero un epifenomeno e non influenzassero il tipo di malattia.

A parte la rilevanza di un eventuale ruolo patogenetico dovuto alla presenza di questi cristalli di calcio vi sono senza dubbio importanti ripercussioni terapeutiche con la possibilità di intervenire con agenti terapeutici che siano in grado di agire non solo sull'infiammazione della membrana sinoviale, ma anche sull'azione flogogena dei cristalli di calcio che possono condizionare l'evoluzione della malattia. In ultima analisi lo stesso svuotamento dell'articolazione dal LS presente nei pazienti con artrosi, così come osservabile nell'artropatia da CPP, può essere considerata come manovra terapeutica auspicabile alla luce della presenza dei cristalli di calcio e forse potrebbe spiegare l'efficacia del placebo nei trial clinici con l'impiego di farmaci per via intrarticolare.

BIBLIOGRAFIA

1- Punzi L, Ramonda R. Artrosi In Punzi L, Doria A. Core Curriculum Reumatologia., Mc Grew and Hill, Ed 2014, pp216-40).

2-Masuda I. Calcium crystal deposition diseases: lessons from histochemistry. Curr Opin Rheum 2004;16:279-81

3-Hollander AP, Dickinson SC, Kafienah W. Stem Cells and Cartilage Development: Complexities of a Simple Tissue. Stem Cells 2010;28:1992-6

4-Facchini A, Paletti S, Mazzetti I. Citochine, chemochine e condrociti. Reumatismo 2000;2:92-4

5-Kurz B, Lemke AK, Fay J, Pufe T, et al. Pathomechanisms of cartilage destruction by mechanical injury. Ann Anat 2005;187:473-85

6-Goldring MB and Goldring SR. Osteoarthritis. J. Cell. Physiol. 2007;213:626-34.

7-Pesce E, Frizziero L, Facchini A, Murgo A, De Lucia O, Limonta C. Ambiente articolare e danno cartilagineo. In Artroscopia Vol.III, N2, 2002, pp 92-97

8-WB van den Berg. Osteoarthritis year 2010 in review: pathomechanisms. Osteoarthritis Cartilage 2011;19:338-41

9-Yang S, Kim J, Ryu JH, Oh H, Chun CH, Kim BJ, et al. Hypoxia inducible factor-2 α is a catabolic regulator of osteoarthritic cartilage destruction. Nat Med 2010;16:687-94

10-Saito T, Fukai A, Mabuchi A, Ikeda T, Yano F, Ohba S, et al. Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2 α during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med* 2010;16:678-86

11-Husa M, Liu-Bryan R, Terkeltaub R. Shifting HIFs in osteoarthritis. *Nat Med* 2010;16:641-4

12-Neuhold LA, Killar L, Zhao W, Sung ML, Warner L, Kulik, et al. Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *J Clin Invest* 2001;107:35-44

13-Little CB, Barai A, Burkhardt D, Smith SM, Fosang AJ, Werb Z, et al. Murine metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis Rheum* 2009;60:3723-33

14-Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, et al. Deletion of ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* 2005;434:644-8

15-Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, de Crombrughe B, Nakashima K, et al. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat Med* 2005; 11:880-5

16-Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*. 2002; 3:889-901

17-Wang J, Gardner BM, Lu Q, Rodova M, Woodbury BG, Yost JG, et al. Transcription factor NFAT1 deficiency causes osteoarthritis through dysfunction of adult articular chondrocytes. *J Pathol* 2009;219:163-72

18-Van Beuningen HM, Glansbeek HL, van der Kraan PM, van den Berg WB. OA-like changes in the murine knee joint resulting from intra-articular TGF β injections. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8:25-33

19-Scharstuhl A, Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Inhibition of endogenous TGF β during experimental OA prevents osteophyte formation and impairs cartilage repair. *J Immunol* 2002;169:507-14

20-Blaney Davidson EN, Remst DF, Vitters EL, van Beuningen HM, Blom AB, Goumans MJ, et al. Increase in ALK1/ALK5 ratio as a cause for elevated MMP-13 expression in osteoarthritis in humans and mice. *J Immunol* 2009;182:7937-45

21-Li TF, Gao L, Sheu TJ, Sampson ER, Flick LM, Kontinen YT, et al. Aberrant hypertrophy in Smad3-deficient murine chondrocytes is rescued by restoring TGF-activated kinase 1/activating transcription factor 2 signaling: a potential clinical implication for osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62: 2359-69

22-Valdes AM, Spector TD, Tamm A, Kisand K, Doherty SA, Dennison EM, et al. Genetic variation in the SMAD3 gene is associated with hip and knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:2347-52

23-Van der Kraan P, Blaney Davidson EN, Van den Berg WB. A role for age-related changes in TGF β signaling in aberrant chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *Arth Res* 2010, 12:201

24-Coffman JA Runx transcription factors and the developmental balance between cell proliferation and differentiation. *Cell Biol. Int.* 2003;27:315-24

- 25-Schroepel JP, Crist JD, Anderson HC and Wang J. Molecular regulation of articular chondrocyte function and its significance in osteoarthritis *Histol Histopathol* 2011;26:377-94
- 26-Nusse R, Fuerer C, Ching W, Harnish K, Logan C, Zeng A, ten Berge D, Kalani Y. Wnt signaling and stem cell control. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2008;73:59-66
- 27-Zhu M, Tang D, Wu Q, Hao S, Chen M, Xie C, et al. Activation of β -catenin signaling in articular chondrocytes leads to OA-like phenotype in adult b-catenin conditional activation mice. *J Bone Min Res* 2009;24:12-21
- 28-Carames B, Taniguchi N, Otsuki S, Blanco FJ, Lotz M. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage and its agingrelated loss is linked with cell death and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:791-801
- 29-Bohensky J, Terkhorn SP, Freeman TA, Adams CS, Garcia JA, Shapiro IM, et al. Regulation of autophagy in human and murine cartilage: HIF2 suppresses chondrocyte autophagy. *Arthritis Rheum* 2009;60:1406-15
- 30-Fransès RE, McWilliams DF, Mapp PI, Walsh DA. Osteochondral angiogenesis and increased protease inhibitor expression in OA. *Osteoarth Cart* 2010;18(4):563-71
- 31-Mazzetti I, Gigolo B, Pulsatelli L, Dolzani P, Silvestri T, Roseti L, Meliconi R, Facchini A: Differential roles of nitric oxide and oxygen radicals in chondrocytes affected by osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Clin Sci (Lond).* 2001;101:593-9
- 32-Tchetverikov I, Lohmander LS, Verzijl N, Huizinga TWJ, TeKoppele JM, Hanemaaijer R, DeGroot J. MMP protein and activity levels in synovial fluid from

patients with joint injury, inflammatory arthritis, and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:694-8

33-Zhang W, Doherty M, Bardin T, Barskova V, Guerne P-A, Jansen TL, 5 Leeb BF, Perez-Ruiz F, Pimentao J, Punzi L, Richette P, Sivera F, Uhlig T, Watt I, Pascual E. European League Against Rheumatism recommendations for calcium pyrophosphate deposition. Part I: terminology and diagnosis. *Ann Rheum Dis* 2011;70:563-70

34-Ru Liu-Bryan, Liotè F. Monosodium urate and calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) crystals, inflammation and cellular signaling. *Joint Bone Spine*. 2005 ;72 :295-302).

35-Jaovisidha K, Rosenthal AK. Calcium crystals in osteoarthritis. *Curr Opin Rheum* 2002; 14: 298-302

36-Fuerst M, Lammers L, Schäfer F, Niggemeyer O, Steinhagen J, Lohmann CH, Rütter W. Investigation of calcium crystals in OA knees. *Rheumatol Int* 2010;30:623-31

37-Yavorsky A, Hernandez-Santana A, McCarthy G, and McMahon G. Detection of calcium phosphate crystals in the joint fluid of patients with osteoarthritis analytical approaches and challenges. *Analyst*. 2008 March;133: 302-18

38-Rosenthal AK. Calcium Crystal Deposition and Osteoarthritis. *Rheum Dis Clin* 2006;32:401-12

39-McCarthy GM, Augustine JA, Baldwin AS, Christopherson PA, Cheung HS, Westfall PR, Scheinman RI. Molecular mechanism of basic calcium phosphate crystal-induced activation of human fibroblasts. *J Biol Chem*, 1998;273:35161-9

40-Neame RL, Carr AJ, Muir K, Doherty M. UK community prevalence of knee chondrocalcinosis: evidence that correlation with osteoarthritis is through a shared association with osteophyte. *Ann Rheum Dis* 2003;62:513-18

41-Fuerst M, Bertrand J, Lammers L, Dreier R, Echtermeyer F, Nitschke Y, Rutsch F, Schäfer FKW, Niggemeyer O, Steinhagen J, Lohmann CH, Pap T, and. Rütter W. Calcification of Articular Cartilage in Human Osteoarthritis. *Arthritis & Rheum* 2009 vol 60, pp 2694-703

42-Cheung HS. Biologic effects of calcium-containing crystals. *Curr Opin Rheum* 2005; 17: 336-40

43-MacMullan PA and McCarthy GM. The meniscus, calcification and osteoarthritis: a pathologic team. *Arthritis Research & Therapy* 2010;12:116

44-Terkeltaub RA. What does cartilage calcification tell us about osteoarthritis *J Rheum* 2002;29: 411-5

45-Liu YZ, Jackson AP, Cosgrove SD. Contribution of calcium-containing crystals to cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis. *Osteoarth and Cartil* 2009;17:1333-40

46-Wang Xu J, Kirsch T. Annexin V and terminal differentiation of growth plate chondrocytes *Exp Cell Res* 2005;305: 156-65

47-Rosenthal AK, Gohr CM, Ninomiya J and. Wakim BT. Proteomic Analysis of Articular Cartilage Vesicles From Normal and Osteoarthritic Cartilage. *Arthritis & Rheum* 2011 Vol. 63, No. 2 pp 401-11

48-Cheung HS, Devine TR, Hubbard W. Calcium phosphate particle induction of metalloproteinase and mitogenesis: effect of particle sizes. *Osteoarthritis Cartilage*. 1997;5: 145-51

49-Molloy ES, Morgan MP, McDonnell BA, O'Byrne J and McCarthy GM. BCP crystals increase prostacyclin production and upregulate the prostacyclin receptor in OA synovial fibroblasts: potential effects on mPGES1 and MMP-13. *Osteoarthritis and Cartilage* 2007;15:414-20

50-Molloy ES, Morgan MP, Doherty GA, McDonnell B, Hilliard M, O'Byrne J, Fitzgerald DJ, And McCarthy GM. Mechanism of basic calcium phosphate crystal-stimulated cyclo-oxygenase-1 up-regulation in osteoarthritic synovial fibroblasts. *Rheumatology* 2008;47:965-71

51-Molloy ES, Morgan MP, Doherty GA, McDonnell B, O'Byrne J, Fitzgerald DJ and McCarthy GM. Microsomal prostaglandin E2 synthase 1 expression in basic calcium phosphate crystal-stimulated fibroblasts: role of prostaglandin E2 and the EP4 receptor. *Osteoarthritis and Cartilage* 2009 17, 686-92

52-Atti parlamentari - 52 - Doc. XVII, n. 9 XVI Legislatura - Disegni di Legge e Relazioni Documenti. Documento approvato dalla 12^a Commissione Permanente (Igiene e sanità) nella seduta dell'8 marzo 2011

53-Ministero della Salute - Popolazione e malattie croniche Marzo 2008

54-Salaffi F, De Angelis R, Grassi W. MARCHE Pain Prevalence INVESTIGATION Group (MAPPING) study. Prevalence of musculoskeletal conditions in an Italian population sample: results of a regional community-based study. I. The MAPPING study. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23:819-28

55-Corti MC, Guralnik JM, Sartori L, Baggio G, Manzato E, Pezzetti P, Barbato G, Zambon S, Ferrucci L, Minervini S, Musacchio E, Crepaldi G. The effect of cardiovascular and osteoarticular diseases on disability in older Italian men and women: rationale, design, and sample characteristics of the Progetto Veneto Anziani (PRO.V.A.) study. *J. Am Geriatric Soc.* 2002; 50: 535-40

56-Ciocci A: Epidemiologia e costi sociali. *Reumatismo* 2005;57:133

57-Crepaldi G, Punzi L. Aging and Osteoarthritis. *Aging Clin Exp Res* 2003;15:355-8

58-Frallonardo P, Ramonda R, Campana C, Modesti V, Punzi L. Indagine conoscitiva sull'approccio terapeutico all'artrosi da parte dei Medici di Medicina Generale e degli Specialisti delle malattie dell'apparato locomotore. *Reumatismo* 2010;62: 253

59-Dieppe P, Basler HD, Chard J, Croft P, Dixon J, Hurley M. Knee replacement surgery for osteoarthritis: effectiveness, practice variations, indication and possible determinants of utilisation. *Rheumatology (Oxford)* 1999; 38: 73-83

60-Lawrence JS, Bremner, Biers F. Osteoarthritis. Prevalence in the population and relationship between symptoms and X-ray changes. *Ann of Rheum Dis* 1996; 322: 526-30

61-Felson DT. The epidemiology of the Knee Osteoarthritis: result from the Framingham Osteoarthritis Study. *Semin Arthritis Rheum* 1990; suppl. 1: 42-50

62-Buratti L, Ciocci A, Coari G, Serio A. Sulle localizzazioni dell'artrosi. Rilievi statistici e ipotesi classificative. *Arch Ortop Reum* 1995;108: 267-78

63-Arden N, Nevitt MC. Osteoarthritis: Epidemiology. *Best Pract & Res* 2006; vol 20, pp3-25

64-Centers for Disease Control. Arthritis prevalence and activity limitations-United States, 1994. MMWR 43: 433-8

65-Anderson AS and Loeser RF. Why is Osteoarthritis an Age-Related Disease? Best Pract Res Clin Rheumatol. 2010;24:15

66-Spector TD, Mandra D, Hart DJ, Doyle DV. Is Hormone Replacement Therapy Protective for Hand and Knee in Osteoarthritis in woman? The Chingford Study. Ann Rheum Dis 1997;56: 432-4

67-Nevit MC, Cummings SR, Lane NE, Hochberg MC, Scott JC, Pressman AR et al. Association of estrogen replacement therapy with the risk of osteoarthritis of the hip in elderly white women, Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Arch Inter Med 1996;156: 2073-80

68-Patrick M, Manhire A, Ward MA. HLA-A,B Antigens and 1-antitrypsin phenotypes in nodal generalised osteoarthritis. Ann Rheum Dis 1989,48: 470-5

69-Loughlin J. Osteoarthritis year 2010 in review: genetics. Osteoarthritis Cartilage. 2011;19:342-5

70-Loughlin J. Genetics of osteoarthritis. Curr Opin Rheumatol. 2011;23:479-83

71-Evangelou E, Valdes AM, Kerkhof HJ, Stykarsdottir U, Zhu Y, Meulenbelt I, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies confirms a susceptibility locus for knee osteoarthritis on chromosome 7q22. Ann Rheum Dis. 2011;70:349-55

72-Ramonda R, Musacchio E, Campana C, Frigato M, Frallonardo P, Barbieri V, Piccoli A, Valvason C, Bronte V, Zanovello P, Punzi L. "Immunogenetic aspects of erosive osteoarthritis of di hand in patients from northern Italy. Scand J Rheum 2010.

73-Lesi C, Zoni L, Valeriani L, Giaquinto E. L'obesità come fattore di rischio dell'osteartrosi del ginocchio" Reumatismo 2005; 57: 140-1

74-Kulie T, Slattengren A, Redmer J, Counts H, Eglash A, Schragger S. Obesity and Women's Health: An Evidence-Based Review JABFM Jan-Feb 2011 Vol. 24 No. 1

75-Sowers MF, Yosesf M, Jamadar D, Jacobson J, Karvonen-Gutierrez C, Jaffe M. BMI vs. body composition and radiographically defined osteoarthritis of the knee in women: a 4-year follow-up study. Osteoarthritis Cartilage 2008;16:367-72

76-Tardif G, Hum D, Pelletier JP, Duval N and Martel-Pelletier J. Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human osteoarthritic chondrocyte. BMC Musculoskeletal Disorders 2009, 10:148

77-Altman RD. The clinical syndrome of osteoarthritis, Reumatismo 2005 Vol.57 (Numero Speciale 1) pp 42-4

78-Reimann F, Cox JJ, Belfer I, Diatchenko L et al. Pain perception is altered by a nucleotide polymorphism in SCN9A. PNAS March 16, 2010 vol. 107 no. 11

79-Bradley LA. Recent approaches to understanding osteoarthritis pain. J Rheum 2004;31: supp. 70:54-60

80-Carrabba M, Sarzi Puttini P, Atzeni F, Marrazza MG, Randisi G, Vulpio L, Mutti A. Fisiopatologia del dolore artrosico. Reumatismo Vol 57 (Numero Speciale 1) 2005 pp 34-7

81-Punzi L, Ramonda R, Podswiadek M. La diagnosi dell'artrosi. In AL Catapano. Fisiopatologia e terapia dell'artrosi. Dicembre 2004; 16-27

82-Lequesne M, Punzi L. Experimental and clinical aspects of osteoarthritis. Conclusions and perspectives. In “Experimental and clinical aspects of osteoarthritis”. Reginster J-Y, Henrotin Y, Martel-Pelletier J-P Eds. Springer- Verlag, Heidelberg, 1999, pp480-509

83-Gibilisco PA, Schumacher HR Jr, Hollander JL, Soper KA. Synovial fluid crystals in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1985;28: 511-5

84-O’Shea FD and McCarthy GM. Basic calcium phosphate deposition in the joint: a potential therapeutic target in osteoarthritis. *Curr Opin in Rheum* 2004; 16: 273-8

85-Rosenthal AK. Crystals, inflammation, and osteoarthritis. *Curr Opin Rheum* 2011;23:170-3

86-McCarthy GM, Westfall PR, Masuda I, Christopherson PA, Cheung HS, Mitchell PG. Basic calcium phosphate crystals activate human osteoarthritic synovial fibroblasts and induce matrix metalloproteinase-13 (collagenase-3) in adult porcine articular chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 2001;60: 399-406

87-Derfus BA, Rachow JW, Mandel NS, Boskey AL, Buday M, Kushnaryov VM, Ryan LM. Articular cartilage vesicles generate calcium pyrophosphate dihydrate-like crystals in vitro. *Arthritis Rheum* 1992;35: 231-40

88-Hirose J, Ryan LM, Masuda I. Up-regulated expression of cartilage intermediate-layer protein and ANK in articular hyaline cartilage from patients with calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease. *Arthritis Rheum* 2002;46: 3218-29

89-Nalbant S, Martinez JA, Kitumnuaypong T, Clayburne G, Sieck M, Schumacher HR Jr. Synovial fluid features and their relations to osteoarthritis severity: new findings from sequential studies. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:50-4

90-Ea HK, Uzan B, Rey C and Lioté F. Octacalcium phosphate crystals directly stimulate expression of inducible nitric oxide synthase through p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in articular chondrocytes. *Arth Res & Ther* 2005;**7**:915-26

91-Halverson PB, Derfus BA. Calcium crystal-induced inflammation. *Curr Opin Rheum* 2001;**13**: 221-4

92-Punzi L, Oliviero F, Ramonda R. Transforming growth factor-beta levels in synovial fluid of osteoarthritis with or without calcium pyrophosphate dihydrate crystals. *J Rheum* 2003;**30**: 420

93-Tudan C, Fong D, Duronio V, Burt HM, Jackson JK. The inhibition of spontaneous and tumor necrosis factor-alpha induced neutrophil apoptosis by crystals of calcium pyrophosphate dihydrate and monosodium urate monohydrate. *J Rheum* 2000;**27**: 2463-72

94-Reuben PM, Brogley MA, Sun Y, Cheung HS. Molecular mechanism of the induction of metalloproteinases 1 and 3 in human fibroblasts by basic calcium phosphate crystals. Role of calcium-dependent protein kinase C alpha. *J Biol Chem* 2002 ;**277**: 15190-9850

95-Bai G, Howell DS, Howard GA, Roos BA, Cheung HS. Basic calcium phosphate crystals up-regulate metalloproteinases but down-regulate tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in human fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;**9**: 416-22

96-Pazàr B, Ea HK, Narayan S, Kolly L, Bagnoud N, Chobaz V, Roger T, Liote´ F, So A and Busso N. Basic Calcium Phosphate Crystals Induce Monocyte/ Macrophage IL-

1b Secretion through the NLRP3 Inflammasome In Vitro. *J Immunol* 2011;186:2495-502

97-Oliviero F. La ricerca dei microcristalli. In: Punzi L editor. *Manuale di Analisi del Liquido Sinoviale*, 3a ed. Pavia: Edimes, 2010:62-81

98-Raccomandazioni della Società Italiana di Reumatologia per l'esecuzione dell'artrocentesi. L. Punzi, M.A. Cimmino, L. Frizziero, V. Gerloni, W. Grassi, V. Modena, C. Montecucco, R. Ramonda, F. Schiavon, A. Spadaro, F. Trotta. *Reumatismo*, 2007; 59:227-34

99-Altman R, Alarcon G, Appelrouth D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K, Brown C, Cooke TD, Daniel W, Feldman D. The American college of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* 1991;34: 505-14

100-Ropes M, Bauer W. *Synovial fluid changes in joints diseases*. Harvard University Press, Cambridge, 1953

101-Damiano J, Bardin T. Liquide synovial normal et pathologique. *Encyclopédie Medico-Chirurgicale* 2004;14-001-L 50

102-Cimmino MA, Salaffi F, Olivieri I, Trotta F, Frizziero L, Sarzi Puttini P, Grassi W, Modena V, Cantatore EP, Bombardieri S, Adami S, Punzi L, Lapadula G. Caratteristiche del dolore in pazienti italiani con artrosi: risultati preliminari dello studio MI.D.A. (Misurazione del dolore nell'Artrosi) *Reumatismo* 2004;56: 253-61

103-Lequesne MG, Mery C, Sarnson M, Gerard P. Indexes of severità for osteoarthritis of the hip and knee. Validation-value in comparison with other assessment tests. *Scand J Rheum* 1987; 65: 85-9

104-Salaffi F, Leardini G, Canesi B, Mannoni A, Fioravanti A, Caporali R, Lapadula G, and Punzi L, on behalf of GONarthrosis and Qualità Of Life Assessment (GOQOLA) Reliability and validity of The Western Ontario and McMaster Universities (WOMAC) Osteoarthritis Index in Italian patients with osteoarthritis of the knee- OsteoArthritis and Cartilage 2003;11:551-60

105-Scott-Huskinson EC. Graphic Representation of pain. Pain 1976; 2: 175-84

106-Keen HI, Wakefield RJ, Grainger AJ, Hensor EM, Emery P, Conaghan PG. Can ultrasonography improve on radiographic assessment in osteoarthritis of the hands? A comparison between radiographic and ultrasonographic detected pathology. Ann Rheum Dis 2008;67:1116-20

107-De Miguel E, Cobo T, Uson J, Bonilla G, Martin-Mola E. Clinical and ultrasonographic findings related to knee pain in osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage 2006;14:540-4

108-Moller I, Naredo E, Moragues C, De Agustin J, Acebes C, Uson J et al. Ultrasonographic findings in knee osteoarthritis. A Nation-wide study in Spanish patients. Osteoarthritis and Cartilage 2007;15. P286:C159

109-Walter M, Harás H, Krenn V, Radke S, Faehndrich T, Gohlke F. Correlation of the power Doppler sonography with the synovial tissue of the knee joint in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2001;44:331-8

110-Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteoarthritis. Ann Rheum Dis 1957;16:494-502

111-Raccomandazioni della Società Italiana di Reumatologia per l'esecuzione dell'artrocentesi. Punzi L, Cimmino MA, Frizziero L, Gerloni V, Grassi W, Modena V, Montecucco C, Ramonda R, Schiavon F, Spadaro A, Trotta F. *Reumatismo*, 2007;59:227-34

112-Dieppe P, Hornby J, Swan A, Hutton C, Preece A. Laboratory handling of crystals. *Ann Rheum Dis* 1983;42:60-3

113-Gordon C, Swan A, Dieppe P. Detection of crystals in synovial fluids by light microscopy: sensitivity and reliability. *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 737-42

114-Schumacher HR, Reginato AJ. Atlas of synovial fluid analysis and crystal identification. Philadelphia: Lea et Febiger; 1991

115-Ivorra J, Rosas J, Pascual E. Most calcium pyrophosphate appear as non birifrangent. *Ann Rheum Dis* 1999;58: 582-4

116-Paul H, Reginato AJ, Schumacher HR. Alizarin red S staining as a screening test to detect calcium compounds in synovial fluid. *Arthritis Rheum.*1983;26:191-200

117-Bardin T, Bucki B, Lansaman J, Ortiz-Bravo E, Ryckewaert A, Dryll A. Coloration par le rouge alizarine des liquides articulaire. *Rev Rheum* 1987;54:149-54

118-Goldstein JI, Newbury D, Joy D, Lyman C, Echlin P, Lifshin E, Sawyer L and Michael J. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis -*, Third Edition 2003-New York

119-Bish DL & Post JE. Modern powder diffraction. Reviews in Mineralogy. Mineralogical Society of America. 1990 Washington Vol 20

120-Derfus BA, Kurian JB, Butler JJ, Daft LJ, Carrera GF, Ryan LM, Rosenthal AK. The high prevalence of pathologic calcium crystals in pre-operative knees. J Rheumatol. 2002;29:570-4

121-Jin C, Frayssinet P, Pelker R, Cwirka D, Hu B, Vignery A, Eisenbarth SC, Flavell RA. NLRP3 inflammasome plays a critical role in the pathogenesis of hydroxyapatite-associated arthropathy. Proc Natl Acad Sci USA. 2011 Aug 19. Epub ahead of print

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Leonardo Punzi, mio Maestro da oltre 10 anni, per avermi offerto la possibilità di crescere professionalmente e umanamente e di aver sempre guidato i miei passi nella Ricerca.

Ringrazio la Dott.ssa Roberta Ramonda per la sua fiducia, per avermi seguito in qualità di Tutor, per aver sempre garantito la sua presenza e il suo appoggio in tutto il mio percorso formativo.

Un grazie particolare va a tutto il gruppo del Liquido Sinoviale

Un ringraziamento speciale a Francesca Oliviero per la sua costante, valida e silenziosa collaborazione nella realizzazione di questo lavoro, per tutti i suoi preziosi consigli, ma grazie soprattutto per la sua amicizia e vicinanza.

Ringrazio il Dott. Luca Peruzzo, il Dott. Leonardo Tauro, ed il Dott. Federico Zorzi del Dipartimento di Geoscienze dell'Università – CNR di Padova.

Un ringraziamento particolare va alla mia famiglia a mio marito Dino e ai miei figli Giovanni e Angela che con me hanno condiviso sempre le soddisfazioni e le ansie della mia professione