

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Medicina e Chirurgia - Dipartimento di Medicina - DIMED

Corso di Laurea in

Tecniche di Laboratorio Biomedico

Presidente: Chiarissimo Prof. Matteo Fassan

TESI DI LAUREA

**EFFETTO DEL LIQUIDO SINOVIALE DI DIVERSE ARTROPATIE SUL METABOLISMO,
VITALITÀ E SENESCENZA DI CELLULE MONONUCLEATE.**

Relatore: Prof.ssa Francesca Oliviero

Correlatore: Dott.ssa Chiara Baggio

Laureanda: Beatrice Tosatto

2055812

Anno Accademico 2023 - 2024

Indice

1. Riassunto	1
2. Introduzione	3
2.1 Le artropatie.....	3
2.1.1 L'artrite psoriasica.....	3
2.1.2 L'artrite reumatoide	4
2.1.3 Gotta e pseudogotta	4
2.2 Sinovite nelle artropatie infiammatorie.....	5
2.3 Il liquido sinoviale.....	5
2.3.1 Analisi del liquido sinoviale.....	6
2.3.2 Citochine, chemochine, metalloproteasi e fattori di crescita nel liquido sinoviale.....	8
2.4 Infiammazione e senescenza	8
2.4.1 I processi di senescenza coinvolti nelle artropatie.....	8
3. Scopo della tesi	12
4. Materiali e Metodi	13
4.1 Analisi del liquido sinoviale.....	13
4.2 Analisi morfologica e citologica dei leucociti nei liquidi sinoviali.....	13
4.3 Estrazione dei PBMCs.....	15
4.4 Effetto dei liquidi sinoviali sulla vitalità cellulare - saggio di vitalità con Trypan blue....	15
4.5 MTT: effetto dei liquidi sinoviali sul metabolismo cellulare.....	16
4.6 Analisi delle citochine, chemochine e fattori di crescita presenti nei liquidi sinoviali ...	17

4.7 Saggio per valutare l'attività della β galattosidasi.....	18
4.8 Analisi statistica.....	19
5. Risultati	20
5.1 Analisi morfologica e citologica dei leucociti nel liquido sinoviale....	20
5.1.1 Caratteristiche dei liquidi sinoviali.....	20
5.1.2 Analisi citologica e morfologica dei neutrofili nel liquido sinoviale.....	20
5.1.3 Analisi citologica e morfologica dei monociti e linfociti nel liquido sinoviale.....	21
5.1.4 Morte cellulare e cellule di Reiter nel liquido sinoviale.....	22
5.2 Citochine, chemochine e fattori di crescita nei liquidi sinoviali.....	23
5.3 Effetto dei liquidi sinoviali sulla vitalità cellulare.....	23
5.4 Effetto dei liquidi sinoviali sul metabolismo cellulare.....	24
5.5 Attività della β galattosidasi.....	25
5.5.1 Valutazione dell'attività della β galattosidasi nei leucociti dei liquidi sinoviali.....	25
5.5.2 Effetto dei liquidi sinoviali sull'attività della β galattosidasi nei monociti umani.....	25
6. Discussione e conclusioni	26
7. Bibliografia	29
Ringraziamenti	31

1. Riassunto

Introduzione: L'ambiente infiammatorio che caratterizza la sinovite nelle patologie reumatologiche è ricco di citochine e fattori di crescita, e può contribuire a indurre senescenza nelle cellule dell'immunità e della matrice. Ad oggi, non è chiaro se questo meccanismo sia coinvolto nella cronicizzazione dell'infiammazione articolare.

Scopo dello studio: Valutare l'effetto di liquidi sinoviali (LS) provenienti da pazienti con diverse artropatie, sulla vitalità, metabolismo ed espressione della β -galattosidasi di monociti sani.

Materiali e metodi: Abbiamo analizzato i LS ($n = 25$) da pazienti con artrosi (OA), artrite reumatoide (AR), artrite psoriasica (AP), gotta (MSU) e pseudogotta (CPP), valutando il loro contenuto di citochine, chemochine e fattori di crescita tramite ELISA. L'analisi citologica è stata effettuata per ricercare la presenza di anomalie nucleari e per valutare la maturazione dei neutrofili. È stato valutato l'effetto dei LS sul metabolismo (MTT), vitalità (Trypan blue) e attività della β -galattosidasi di monociti sani.

Risultati: La percentuale di neutrofili (N) ipersegmentati era maggiore nei LS di pazienti con AP, AR, MSU e CPP rispetto ai pazienti con OA. La percentuale di morte cellulare era maggiore nei LS di AR, MSU e CPP rispetto a quella nei LS di OA. I livelli di IL-1 β , IL-6, TNF, IL-8 erano superiori nei LS dei pazienti AR, MSU e CPP rispetto ai LS di OA. Nei monociti trattati fino a 72h con i LS abbiamo osservato una diminuzione del metabolismo rispetto al basale, ma nessuna variazione della vitalità e dell'attività della β -galattosidasi.

Conclusioni: I diversi fattori contenuti nei LS possono influenzare il metabolismo dei monociti. Ulteriori studi valuteranno se queste alterazioni possano contribuire alla progressione delle artropatie analizzate.

1. Summary

Introduction: The inflammatory environment that characterizes synovitis in rheumatologic diseases is rich in cytokines and growth factors, and may contribute to inducing senescence in immunity and extracellular matrix cells. To date, it is unclear whether this mechanism is involved in the chronicity of joint inflammation.

Aim of the study: To evaluate the effect of synovial fluid (SF) from patients with different arthropathies on the vitality, metabolism and β -galactosidase expression in healthy monocytes.

Materials and Methods: We analyzed SFs (n = 25) from patients with osteoarthritis (OA), rheumatoid arthritis (RA), psoriatic arthritis (PA), gout (MSU) and pseudogout (CPP), assessing the level of cytokine, chemokine and growth factor content by ELISA. Cytologic analysis was performed in order to evaluate the presence of nuclear abnormalities and to assess neutrophil maturation. The effect of SF on metabolism (MTT), viability (Trypan blue) and β -galactosidase activity in healthy monocytes was evaluated.

Results: The percentage of hypersegmented neutrophils (N) was higher in SF of patients with PA, RA, MSU and CPP than in patients with OA. The percentage of cell death was higher in SF of RA, MSU and CPP than in SF of OA. The levels of IL-1 β , IL-6, TNF, IL-8 were higher in the SF of RA, MSU and CPP patients than in the SF of OA. In monocytes treated up to 72h with SFs, we observed a decrease in metabolism compared with baseline, but no change in viability and β -galactosidase activity.

Conclusions: Different factors contained in SF may influence monocyte metabolism. Further studies will evaluate whether these alterations may contribute to the progression of the arthropathies considered.

2. Introduzione

2.1 Le artropatie

Con il termine artropatie si indica un gruppo di malattie, di origine reumatologica, a carico di una o più articolazioni. Le artropatie vengono suddivise in due categorie: infiammatorie e degenerative. La più nota fra le forme degenerative è l'artrosi, malattia cronica molto frequente nella popolazione, causata dal deterioramento della cartilagine che riveste le superfici ossee all'interno delle articolazioni (1). Le artropatie infiammatorie vengono chiamate artriti. Con il termine artrite si intende una condizione infiammatoria cronica che può coinvolgere una o più articolazioni. Sono causate da diversi fattori (germi, cristalli, traumi, predisposizione genetica, fattori ormonali e ambientali). Per la maggior parte di queste, anche se l'eziologia non è sempre chiara, sono ormai noti i meccanismi che provocano lo sviluppo e la cronicizzazione dell'infiammazione. I principali sintomi dell'artrite sono tumefazione, rigidità articolare e dolore che può presentarsi in qualsiasi momento. Le più frequenti tra le artropatie infiammatorie sono l'artrite reumatoide (AR), l'artrite psoriasica (AP), la gotta o artrite indotta da cristalli di urato monosodico (MSU) e la pseudogotta o artrite indotta da cristalli di pirofosfato di calcio (CPP).

Queste patologie sono caratterizzate da una grave infiammazione che interessa principalmente la membrana sinoviale con conseguente aumento del liquido sinoviale (LS) che provoca gonfiore articolare e dolore. Se non diagnosticate e trattate precocemente, possono portare alla distruzione dell'articolazione e perdita della funzione (2).

Nonostante negli ultimi anni siano stati fatti diversi progressi nel trattamento delle artropatie reumatiche, una porzione considerevole di pazienti non riesce a controllare del tutto l'insorgenza di nuovi attacchi acuti e la sintomatologia ad essi associata.

2.1.1 L'artrite psoriasica

L'artrite psoriasica (AP) è una malattia infiammatoria cronica caratterizzata da infiammazione persistente che può portare alla distruzione articolare. La prevalenza di questa patologia nella popolazione è tra lo 0,1% e l'1%. I pazienti manifestano dolore, gonfiore articolare, rigidità mattutina e affaticamento. L'infiammazione può colpire diverse parti del corpo, ma principalmente sono coinvolte le articolazioni delle mani e della colonna vertebrale. Le cause dell'AP non sono ancora del tutto note. Tuttavia, si ritiene che una combinazione di fattori genetici, immunologici e ambientali giochino un ruolo

fondamentale nello sviluppo della malattia. Il trattamento dell'AP mira a controllare le eruzioni cutanee e a ridurre l'infiammazione articolare. Alcuni farmaci efficaci nel trattamento dell' AR, sono utilizzati anche per l'AP, in particolare i farmaci antinfiammatori non steroidi (FANS), farmaci antireumatici modificanti la malattia (csDMARD) e inibitori del TNF, di IL-17 e IL-12/23 (3).

2.1.2 L'artrite reumatoide

L'artrite reumatoide (AR) è caratterizzata da infiammazione sinoviale e iperplasia che causano nel paziente dolore, tumefazione e rigidità articolare. Questa patologia ha una prevalenza compresa tra il 0,5% e l'1%. Le donne inoltre hanno una probabilità maggiore di sviluppare questa patologia rispetto agli uomini. L'AR è associata alla presenza del fattore reumatoide e alla produzione di auto-anticorpi anti-proteina citrullina. Le cause che portano all'insorgenza dell' AR sono molteplici, tra queste troviamo fattori genetici predisponenti (HLA-DR1 e HLA-DR4), fattori ormonali, ambientali (fumo, inquinamento, alimentazione) e infezioni virali. I farmaci più comunemente utilizzati per l'AR sono i DMARD (metotrexato, leflunomide, ciclosporina e più raramente sulfasalazina) e i FANS per ridurre l'infiammazione e dolore. Vengono inoltre utilizzati farmaci biologici come: inibitori del TNF (adalimumab, infliximab e etanercept), dell' IL-6 (tocilizumab), dell'IL-1 (anakinra e canakinumab) ed i farmaci in che bloccano l'azione dei linfociti B (rituximab) o dei linfociti T (abatacept).

2.1.3 Gotta e Pseudogotta

Nella gotta e pseudogotta l'infiammazione è causata rispettivamente dal deposito di cristalli di urato monosodico (MSU) e dai cristalli di pirofosfato di calcio (CPP), che causano l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 con conseguente rilascio di interleuchina-1 β (IL-1 β). La gotta è una tra le artriti infiammatorie più comuni (2 - 4% di prevalenza), colpisce maggiormente gli uomini, sebbene l'incidenza nelle donne aumenti drasticamente dopo la menopausa. I principali sintomi riportati dai pazienti durante un attacco acuto sono: dolore intenso a livello articolare, gonfiore e infiammazione. Tra i fattori di rischio causa di iperuricemia (conseguente ad una ridotta escrezione di acido urico) troviamo una dieta scorretta, alcolici, obesità e alcuni farmaci. La pseudogotta colpisce soprattutto pazienti in età avanzata e, le donne, hanno una maggiore probabilità di essere affette rispetto agli uomini. Le manifestazioni articolari sono simili a quelle

riscontrate nei pazienti con gotta anche se l'attacco acuto tendenzialmente ha una durata maggiore e una risoluzione non spontanea. Nei pazienti affetti da gotta si utilizzano terapie volte ad abbassare i livelli di acido urico (inibitori della xantina ossidasi, gli uricosurici, e gli inibitori di URAT1). Durante un attacco acuto nei pazienti con gotta e pseudogotta si utilizzano FANS, colchicina e glucocorticoidi. Qualora i pazienti risultassero intolleranti o refrattari ai farmaci tradizionali, si può optare per un trattamento di seconda linea, il quale prevede l'uso di inibitori dell'IL-1 (canakinumab, anakinra).

2.2 Sinovite nelle artropatie infiammatorie

La membrana sinoviale è un sottile strato di tessuto connettivo, che copre la superficie interna della capsula articolare, le guaine tendinee e le borse sierose. La sua funzione principale è quella di nutrire la cartilagine articolare attraverso la produzione di liquido sinoviale (LS).

Le sinoviti sono infiammazioni croniche, proliferative che coinvolgono la membrana sinoviale ma si possono estendere anche alla cartilagine e ai tendini. La sinovite è caratterizzata da tre diversi aspetti patologici: essudazione, infiltrazione e proliferazione cellulare.

1. L'essudato è dovuto alla congestione vasale, fenomeno tipico dell'infiammazione in fase acuta, che causa l'accumulo di liquidi e proteine nella membrana sinoviale.
2. L'infiltrazione cellulare è regolata da una serie di mediatori e inibitori (citochine, chemochine, fattori di crescita, metalloproteasi) a loro volta rilasciati dai leucociti.
3. La proliferazione cellulare avviene a carico dei vasi (angiogenesi), delle cellule sinoviali e dei fibroblasti nella membrana sinoviale. Questo nell'AR e AP porta ad una grave alterazione anatomica dell'articolazione con la formazione del "panno sinoviale". L'iperplasia della membrana sinoviale è supportata dall'angiogenesi che promuove a livello locale sinovite, favorendo l'infiltrazione delle cellule dell'immunità innata e adattativa (6).

2.3 Il liquido sinoviale

Il liquido sinoviale (LS) è un ultrafiltrato del plasma, generalmente privo di alcune proteine di grosso peso molecolare (fibrinogeno ed aptoglobina). Contiene invece diverse macromolecole, prodotte localmente, fra le quali spicca per importanza soprattutto l'acido ialuronico (AI), responsabile della maggior parte dei caratteri fisici e chimici del LS. Il LS è

un liquido viscoso, giallo pallido od incolore, relativamente povero di cellule. Riempie la cavità articolare che, in condizioni normali, è molto piccola e contiene una minima quantità di LS. Il LS inoltre svolge funzioni di filtro-barriera, di nutrimento e protezione della cartilagine. In condizioni fisiologiche, la quantità del LS è minima, può variare da 0 a 4 mL, a seconda dell'articolazione e dei soggetti ma, può aumentare in modo considerevole in numerose artropatie (7).

2.3.1 Analisi del liquido sinoviale

In presenza di edema articolare il LS viene prelevato tramite artrocentesi e trasferito in una provetta priva di additivi per essere esaminato nel più breve tempo possibile per evitare modifiche cellulari e la formazione di artefatti. L'analisi del LS consiste in una indagine macroscopica, dove si valutano le caratteristiche chimico-fisiche del LS (quantità, colore, aspetto, viscosità) e indagini microscopiche volte a caratterizzare la popolazione dei leucociti presenti (conta totale e differenziale) e a valutare la presenza di microcristalli (permette la diagnosi di artropatia gottosa e di pseudogotta). All'occorrenza può essere anche richiesta un'analisi microbiologica per ricercare la presenza di microrganismi patogeni.

La quantità estratta di LS può essere indicativa del grado di flogosi, soprattutto in caso di grandi quantità (> 30mL). Il colore e la torbidità del LS risultano legati al grado di flogosi articolare. In condizioni fisiologiche il LS ha un aspetto trasparente e, il colore varia dal giallo tenue al giallo paglierino. Con l'aggravarsi della flogosi esso assume una tonalità più intensa, diventando giallo citrino, talvolta xantocromico, come ad esempio si può osservare nei liquidi di AP, AR e nelle artriti da microcristalli, fino ad assumere un colore giallo verdastro con sfumature grigiastre in corso di artrite settica. Un liquido dal colore lattiginoso o bianco gessoso, invece, può derivare da affezioni causate da microcristalli. La viscosità è una proprietà peculiare del LS ed è dovuta alla quantità dell' AI presente nel liquido. Per poterne capire il grado è possibile effettuare uno String test, dove direttamente dalla siringa, si verifica la lunghezza del filamento prodotto dal liquido. Una lunghezza del filamento di 3-6 cm, indica uno stato non infiammatorio, viene mantenuta la viscosità. Un filamento di lunghezza < 3 cm, suggerisce uno stato infiammatorio, la viscosità non viene mantenuta.

La conta dei leucociti nel LS è l'elemento discriminante per valutare gli stati infiammatori e non. Il LS normalmente contiene poche cellule, costituite essenzialmente da monociti

(45% - 50%), linfociti (20% - 25%), macrofagi (10%), polimorfonucleati (5% - 7%) e sinoviociti isolati (4% - 5%). Una conta leucocitaria inferiore alle 2000 cellule/mm³ si considera in genere di natura “non infiammatoria” e si osserva con maggiore frequenza in patologie di tipo degenerativo-artrosico; un numero superiore a 2000 cellule/mm³ depone per un quadro infiammatorio. Un numero di leucociti compreso tra i 5000 e i 50000 cellule/mm³ è uno stato francamente infiammatorio, e coinvolge patologie come AR, AP, gotta e pseudogotta. Nel caso in cui i leucociti superino i 50000 cellule/mm³ (con presenza di polimorfonucleati neutrofili maggiore del 90%) vi è forte sospetto di artrite settica.

I linfociti sono le cellule prevalenti nel LS normale e nei versamenti non infiammatori. Durante un processo infiammatorio si possono osservare linfociti (L) e monociti (M) di dimensioni maggiori del normale (attivati). I neutrofili (N) sono quasi assenti nei LS normali ma sono di frequente riscontro in tutti i processi infiammatori articolari (7). Recentemente il mio gruppo di ricerca ha dimostrato che nei LS di AR, AP, gotta e pseudogotta l'infiammazione è correlata alla presenza di neutrofili immaturi, anomalie nucleari (ipersegmentazione dei nuclei, micronuclei) e morte cellulare (picnosi, cariolisi e carioressi) (8).

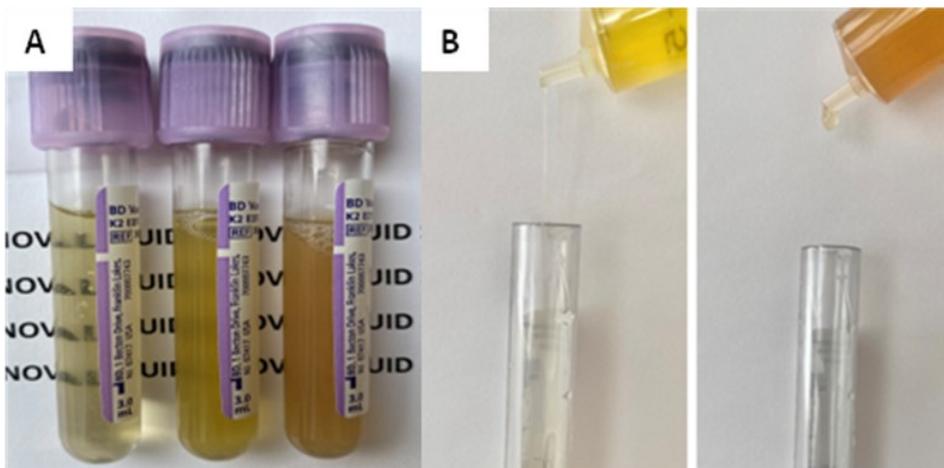


Figura 1. Caratteristiche chimico-fisiche del LS **A.** Colore e torbidità dei campioni di LS a diversi gradi di infiammazione **B.** *Pannello di sinistra.* String test eseguito su un LS fresco, non infiammatorio (OA) dove si può vedere che viene mantenuta la viscosità. *Pannello di destra.* String test eseguito utilizzando un LS fresco, da un'artropatia infiammatoria. In questo caso non viene mantenuta la viscosità.

2.3.2 Citochine, chemochine, metalloproteasi e fattori di crescita nel liquido sinoviale

Nel LS vengono rilasciati diversi fattori che contribuiscono al processo infiammatorio: chemochine, citochine, fattori di crescita e metalloproteasi. Le chemochine inducono la migrazione dei leucociti e dei macrofagi nel tessuto coinvolto dall'infiammazione. Vengono prodotte da cellule di matrice (fibroblasti, cellule endoteliali) e dai leucociti. Tra le chemochine maggiormente presenti nelle diverse patologie prese in analisi troviamo l'IL-8 e l'MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1). Le citochine, rilasciate da leucociti e da cellule della matrice durante l'infiammazione, sono coinvolte in diversi meccanismi che caratterizzano il processo infiammatorio: infiltrazione e attivazione dei leucociti, attivazione dell'endotelio, processi riparativi.

Tra le citochine maggiormente espresse nei LS di AR, AP, gotta e pseudogotta troviamo l'IL-1 β , il TNF α (fattore di necrosi tumorale), l'IL-6, l'IL-10, IL-17, IL-18 e l'IL-4. L' IL-1 β promuove l'attivazione dei leucociti, delle cellule endoteliali, dei condrociti e degli osteoclasti. Il TNF α è prodotto principalmente dai macrofagi ed è coinvolto nel promuovere l'attivazione dei leucociti e nella formazione di nuovi vasi. L'IL-6 è un mediatore solubile con un effetto pleiotropico nell'infiammazione e nella risposta immunitaria. Gli effetti pro-infiammatori di queste citochine possono essere controbilanciati da citochine considerate anti-infiammatorie, quali IL-10, IL-13 e IL-4. Nel LS sono espressi diversi fattori di crescita, coinvolti nella proliferazione delle cellule endoteliali (angiogenesi), dei fibroblasti e in processi riparativi. Tra questi troviamo: il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), l'angiopoietina-1 (Ang-1), l'angiopoietina-2 (Ang-2), il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) e il fattore di crescita trasformante beta TGF β (7 - 8). Le metalloproteasi maggiormente presenti nei LS e coinvolte nella degradazione enzimatica del tessuto articolare sono: MMP-1, MMP-3, MMP-2, MMP-9 (7).

2.4 Infiammazione e senescenza

2.4.1 I processi di senescenza coinvolti nelle artropatie

La senescenza cellulare è un processo biologico irreversibile in cui le cellule in presenza di determinati stimoli, smettono di replicarsi (arresto irreversibile del ciclo cellulare nella fase G1) e vanno incontro a variazioni caratteristiche sia nella forma che nell'attività. Questo meccanismo permette di evitare la proliferazione di cellule danneggiate,

prevenendo la trasformazione di queste in cellule maligne. Tra gli stimoli che inducono senescenza troviamo:

- Danni al DNA derivati dall'accorciamento dei telomeri o dall'esposizione ai radicali liberi dell'ossigeno (ROS).
- Disfunzione mitocondriale.
- Modifiche del metabolismo della cellula indotte da molecole che promuovono una replicazione continua.
- Attivazione di geni che favoriscono l'insorgenza di tumori.

Le cellule senescenti producono molecole specifiche, la maggior parte di queste ad azione pro-infiammatoria (SASP, fenotipo secretorio associato alla senescenza) che promuovono la formazione di un ambiente infiammatorio **(9)**.

Nelle artropatie prese in esame, diversi fattori rilasciati durante l'infiammazione (citochine, chemochine, fattori di crescita, ROS) possono promuovere la senescenza di cellule di matrice e dell'immunità. Diversi studi riportano come nell'AR lo stress ossidativo e il TNF α inducano senescenza nei fibroblasti e mettono in relazione la senescenza prematura in queste cellule con l'infiammazione. È possibile inoltre che questo meccanismo comprometta la risoluzione dell'infiammazione attraverso il rilascio, da parte dei fibroblasti senescenti, di fattori SASP (IL-6, IL-8, MCP-1 and MMP-3) contribuendo a promuovere l'infiammazione cronica e il danno articolare.

Nell' artrosi la maggiore parte degli studi si è focalizzata sui condrociti e la cartilagine. La progressione dell'OA è stata correlata all'aumento del numero di cellule senescenti, indotte da disfunzione mitocondriale e stress ossidativo nei tessuti articolari. La senescenza di queste cellule contribuisce alla degradazione cartilaginea attraverso il rilascio di IL-1, IL-6 e MMP-3. Inoltre, alcuni fattori del SASP possono richiamare nel sito di interesse cellule dell'immunità, amplificando il processo infiammatorio. È stato inoltre riportato come nell'OA, cellule dello stroma senescenti, possano aumentare nei macrofagi l'espressione della β -galattosidasi e di altri marker associati alla senescenza. I macrofagi senescenti hanno una ridotta capacità di eliminare altre cellule senescenti, favorendone così l'accumulo e l'aumento di chemochine e citochine pro-infiammatorie correlate al SASP **(10 - 11)**.

Nell'AR, la formazione di cellule immunitarie senescenti, incapaci di rispondere adeguatamente a specifici antigeni e stimoli, può destabilizzare le funzioni delle cellule immunitarie portando alla perdita della tolleranza (autoimmunità) **(12)**.

Monociti e neutrofilii giocano un ruolo importante nello sviluppo della sinovite. Nell'AR sono stati trovati monociti senescenti associati ad un fenotipo infiammatorio non classico (CD14^{dim}CD16^{bright}) caratterizzati da una aumentata capacità di migrare nei tessuti. I neutrofilii invece, sono stati identificati come cellule capaci di indurre senescenza, anche nei monociti, attraverso la loro capacità di rilasciare ROS e indurre accorciamento dei telomeri nelle cellule circostanti.

2.4.2 Caratteristiche delle cellule senescenti

Ad oggi non esiste un marcatore univoco per identificare le cellule senescenti in vitro, quindi è necessario indagare diversi aspetti per identificarle. Tra i marcatori utili alla loro identificazione troviamo (Figura 2):

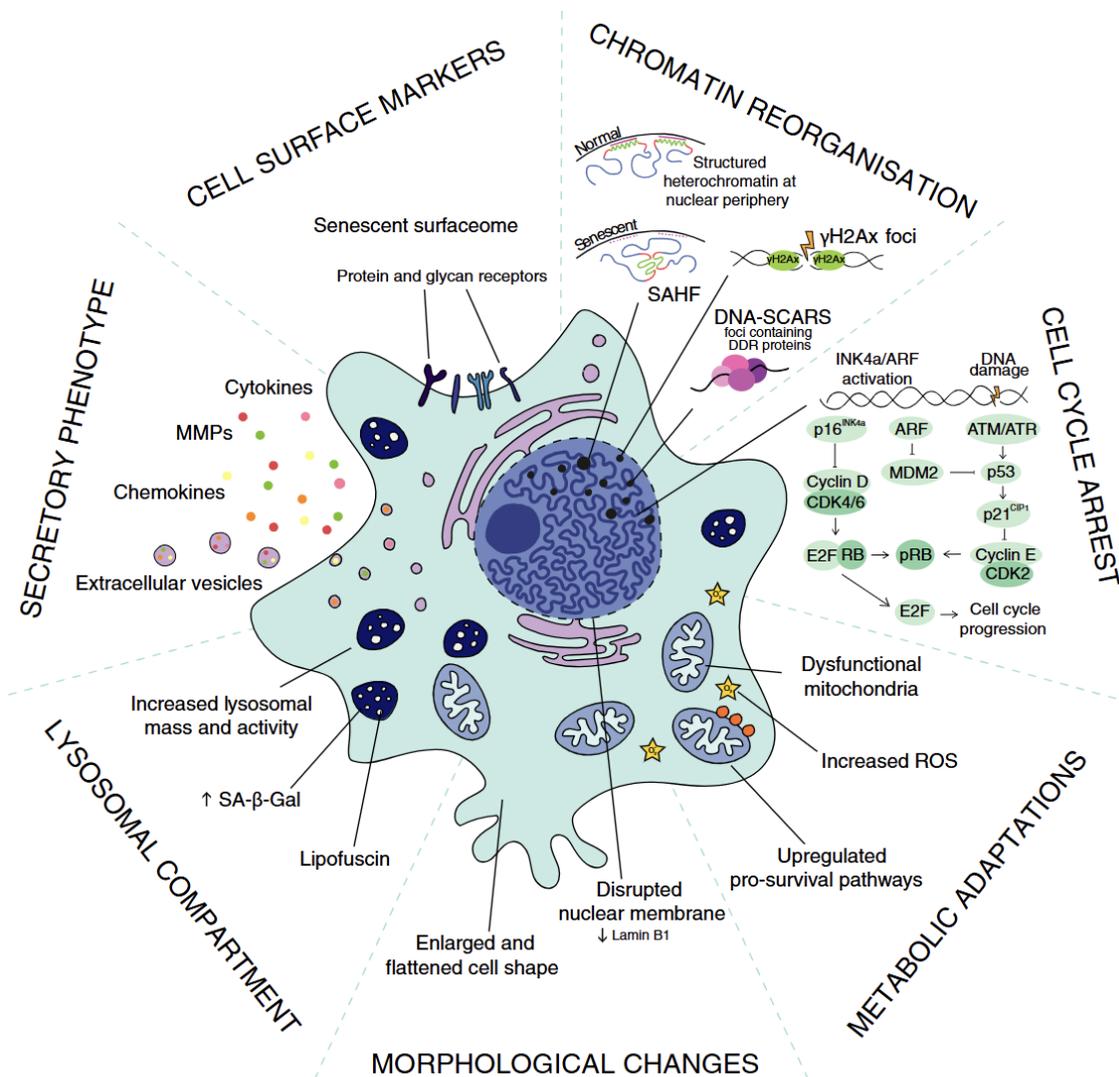


Figura 2. Marcatori che identificano una cellula senescente.

1. Tra le caratteristiche distintive delle cellule senescenti è presente l'arresto del ciclo cellulare.

Il gene oncosoppressore p53 ha un'attività anti-proliferativa e può causare l'arresto del ciclo cellulare in fase G1 o indurre apoptosi. Il target trascrizionale di p53 è la proteina p21, che inibisce l'attività del complesso ciclina E-Cdk2, causando il blocco della trascrizione nella fase G1/fase S.

2. Cambiamenti strutturali rilevanti come l'aumento dei lisosomi (β -galattosidasi), nuclei multipli, foci associate alla senescenza, aumento del numero di vacuoli, perdita della laminin B1 e morfologia allargata.

La β -galattosidasi è un enzima appartenente alla famiglia delle idrolasi acide, contenuto nelle cellule a livello dei lisosomi. Normalmente, la proteina esprime la sua massima attività in un range di pH tra 4,0 e 4,5. In condizioni di senescenza cellulare, si verifica un aumento del pH lisosomiale, del numero e dell'attività dei lisosomi. Questo fa sì che tale enzima risulti sovraespresso a pH 6,0 nelle cellule in fase di senescenza, e che sia definita come SA- β gal (senescence-associated β -galattosidasi).

3. Aumento del rilascio di fattori associati a senescenza (SASP). Il SASP è costituito da un'insieme di citochine (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-13, IL-15, IL-18; TNF- α), chemochine (CCL-17, -20; CXCL-1, -2; IL-8/CXCL-8; IP-10/CXCL10; Eotaxin-3; GRO-a, -b, -g; HCC-4; MCP-1/CCL2, MCP-2, -4; MIP-1a, -3), fattori di crescita (EGF, FGF2, HGF, VEGF, PDGF) e proteasi. Attraverso la secrezione del SASP, le cellule senescenti influenzano in modo critico molti processi biologici, tra cui la guarigione delle ferite, la riparazione dei tessuti, la tumorigenesi. Inoltre il SASP promuove l'infiammazione (**10, 13**).

3. Scopo della tesi

Studi recenti riportano come l'infiammazione, a carico della membrana sinoviale, generi un microambiente ricco di diversi fattori, (citochine, fattori di crescita, stress ossidativo) capaci di indurre senescenza nelle cellule circostanti. Ad oggi, non è stato ancora ben chiarito se la senescenza di cellule di matrice e immunitarie, attraverso il rilascio del SASP, possa contribuire a sostenere il processo infiammatorio ed a promuovere il danno articolare in queste patologie.

Pertanto, l'obiettivo generale di questo lavoro è stato quello di valutare se l'infiammazione in AR, AP, gotta e pseudogotta può essere promossa e sostenuta da processi di senescenza delle cellule immunitarie.

In particolare, abbiamo iniziato questo studio valutando l'influenza dei LS, specchio dell'ambiente infiammatorio che si genera a carico della membrana sinoviale, su monociti derivati da donatori sani. Abbiamo preso in considerazione diversi aspetti (Figura 3):

1. La citologia dei leucociti presenti nei LS, soffermandoci in particolare sulla presenza di anomalie nucleari (cellule binucleate, neutrofili ipersegmentati). Inoltre, abbiamo caratterizzato i LS sulla base del profilo di citochine, chemochine e fattori di crescita rilasciati.
2. L'influenza dei LS sulla vitalità, metabolismo e attività della β galattosidasi nei monociti.
3. L'attività della β galattosidasi nei leucociti dei LS.

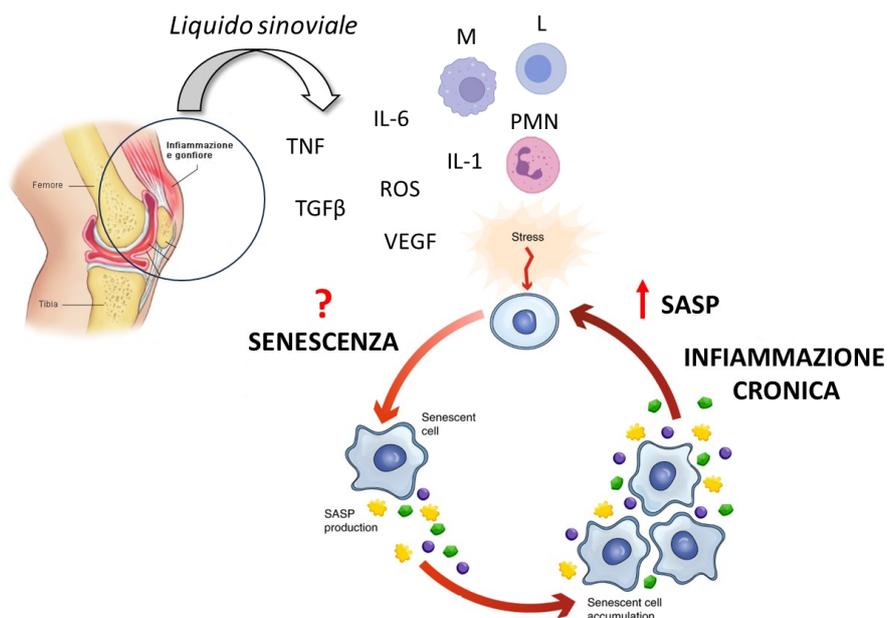


Figura 3. Scopo del lavoro

4. Materiali e Metodi

4.1. Analisi del liquido sinoviale

I liquidi sinoviali (LS) sono stati prelevati tramite artrocentesi da articolazioni infiammate di pazienti con artrosi (OA) (n = 5), artrite reumatoide (AR) (n = 5), artrite psoriasica (AP) (n = 5), artrite indotta da microcristalli di urato monosodico MSU (n = 5) e pirofosfato di calcio CPP (n = 5) seguiti presso l'ambulatorio dell'unità di Reumatologia dell'Università di Padova. L'artrocentesi è una procedura medica che consiste nell'estrazione del liquido sinoviale, impiegata sia a scopo diagnostico che terapeutico.

Il liquido sinoviale, raccolto sia in provette addizionate con EDTA che in provette prive di anticoagulante, è stato analizzato mediante microscopia a luce ordinaria e polarizzata. La conta totale dei globuli bianchi (GB) è stata eseguita utilizzando la camera di Burker.

L'analisi dei cristalli richiede un microscopio ottico a luce polarizzata dotato di un polarizzatore e di un compensatore rosso di I ordine. Il vetrino viene osservato dapprima alla luce ordinaria che permette di distinguere la forma e la grandezza dei cristalli, e poi alla luce polarizzata compensata che ne permette l'identificazione in base alla loro birifrangenza. Sono stati distinti i cristalli MSU e CPP. I cristalli di MSU hanno una caratteristica forma allungata, spesso aghiforme, con una lunghezza che può superare i 40 μm . Alla luce polarizzata appaiono bianchi e lucenti. La maggior parte dei cristalli CPP presenta una particolare forma a "parallelepipedo" e la loro dimensione varia da 1 a 20 μm . 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. Nei cristalli MSU se l'asse maggiore è parallelo all'asse del compensatore il cristallo apparirà giallo. Nei cristalli CPP le colorazioni sono invertite (14).

4.2 Analisi morfologica e citologica dei leucociti nei liquidi sinoviali

Per lo studio della morfologia cellulare e della citologia è stata utilizzata la colorazione May-Grünwald-Giemsa (MGG). Il colorante May-Grünwald (MG) è composto da una miscela di due coloranti (eosina e blu di metilene) e permette di colorare i nuclei in blu e il citoplasma basofilo in rosa. Il colorante Giemsa (eosina e azuril), aumenta l'intensità della colorazione nucleare ed evidenzia gli elementi cellulari. Una volta preparato lo striscio di LS, questo viene fatto essiccare all'aria e successivamente fissato con il colorante May-Grünwald puro (contenente metanolo). A seguire, tramite l'aggiunta di acqua mQ, il

colorante MG è stato diluito 1:1 per 3 minuti, l'eccesso della colorazione è stato fatto defluire su carta da filtro. Lo striscio è stato trasferito in una soluzione Giemsa (diluita 1:9 in H₂O mQ) per 5 minuti, infine è stato lavato con acqua corrente per 30 secondi e lasciato ad asciugare all'aria. Ogni vetrino è stato valutato tramite microscopia a immersione in olio con ingrandimento 1000x. In ogni vetrino sono stati letti almeno 200 leucociti, identificati sulla base della morfologia.

Ogni vetrino è stato valutato per la presenza di anomalie nucleari (NA) e alterazioni citologiche come i vacuoli. Tra le NA è stata valutata la presenza di micronuclei (MN), ipersegmentazione nucleare, cellule binucleate e, infine, condensazione e frammentazione del nucleo (tipica di processi di morte cellulare).

I MN, definiti come un'inclusione citoplasmatica rotonda con un diametro compreso tra un decimo e un terzo di quello del nucleo primario, sono considerati indicatori di danno genotossico.

La morfologia apoptotica è stata identificata secondo i criteri tipici di condensazione nucleare e frammentazione (corpi apoptotici). Tramite questo tipo di colorazione è stato possibile apprezzare cellule in cariolisi, carioressi e picnosi. Nella carioressi il nucleo della cellula subisce una frammentazione, caratteristica principalmente riscontrata nei processi di morte per necrosi, ma può essere osservata anche nell'apoptosi. La cariolisi rappresenta uno stadio molto avanzato del processo di morte cellulare. Le cellule assumono una colorazione uniforme rosa causata dalla completa dissoluzione della cromatina. Infine, nelle cellule in picnosi, si osserva la condensazione e restringimento del nucleo.

I neutrofili (N) sono stati classificati sulla base del loro stadio di maturazione. Il criterio principale per differenziare lo stadio di maturazione dei N è la forma e la segmentazione del loro nucleo (normalmente presenta dai tre ai quattro nuclei). Classifichiamo come cellule immature i N band e i N iposegmentati. I N band non presentano segmentazione del nucleo (nucleo a forma di ferro di cavallo) mentre i N iposegmentati presentano nuclei con due segmenti. I N che presentano uno stadio di maturazione più avanzato possono invece presentare una maggiore segmentazione del nucleo e vengono definiti N ipersegmentati (8).

4.3. Estrazione dei PBMCs

I PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) sono cellule mononucleate del sangue periferico, comprendono monociti e linfociti. L'estrazione dei PBMC è stata fatta utilizzando buffy coat di donatori sani ($n = 5$). Il sangue è stato diluito con PBS (1:1) a temperatura ambiente (T) e mescolato per inversione. Successivamente, 20 mL di sangue diluito sono stati stratificati molto lentamente (per non mescolare le due fasi) su 10 mL di Ficoll-Paque (Merk). Il campione è stato centrifugato a 400 g senza freno per 25 minuti a T ambiente. Terminata questa procedura, si osservano all'interno della falcon quattro diversi strati: plasma nella parte superiore, l'anello di PBMC, il Ficoll-Paque, e nella parte inferiore, neutrofili ed eritrociti (Figura 4B). L'anello di PBMC è stato raccolto tramite l'utilizzo di una pipetta sterile evitando di raccogliere il Ficoll-Paque sottostante. Le cellule sono state lavate per due volte con 40 mL di PBS e centrifugate a 520 g per 10 minuti. Al termine dell'ultimo lavaggio, è stato scartato il PBS e il pellet di PBMC è stato risospeso in terreno RPMI completo (10% FBS, 1% Penicillina, 1% Glutammina). Infine, i PBMC sono stati contati utilizzando la camera di Burker (diluizione 1:20 in terreno e 1:1 con colorante Trypan). In 1 mL di sangue da buffy coat si dovrebbero ottenere circa 10 milioni di PBMC.

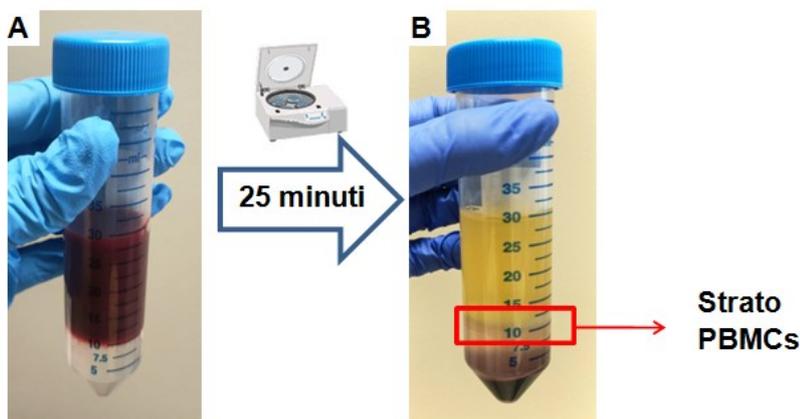


Figura 4. Estrazione dei PBMCs A. Sangue diluito stratificato su 10 mL di Ficoll-Paque. B. Strato di PBMCs dopo centrifugazione.

4.4. Effetto dei liquidi sinoviali sulla vitalità cellulare - saggio di vitalità con Trypan blue

Il colorante Trypan blue si utilizza per studiare la mortalità cellulare. Le cellule non vitali permettono l'ingresso del colorante attraverso la membrana, e assumono quindi una

caratteristica colorazione blu-violacea (15). I PBMCs (250.000 cellule/pozzetto) sono stati seminati in piastre da 96 pozzetti in terreno RPMI completo ed incubati per 24h a 37°C, 5% CO₂. Il giorno successivo, tramite un lavaggio con PBS, sono stati rimossi i linfociti mantenendo in coltura solamente i monociti. Le cellule sono state trattate per 24 - 72h con il 10% LS di OA (n = 5), AR (n = 5), AP (n = 5), MSU (n = 5) e CPP (n = 5) in terreno RPMI 0% FBS. Al termine del tempo di incubazione, la sospensione cellulare è stata diluita con il colorante Trypan (1:1). Sono state contate 200 cellule consecutive registrando la percentuale di morte cellulare. I valori graficati sono la percentuale di cellule vive a 24h - 72h. Ogni dato rappresenta la media ± SEM di quattro esperimenti indipendenti (5 donatori sani differenti per l'estrazione dei PBMC e 5 pazienti differenti per ogni tipologia di LS presa in esame).

4.5. MTT: effetto dei liquidi sinoviali sul metabolismo cellulare

Il saggio MTT si utilizza per misurare l'attività metabolica delle cellule, indicatore della proliferazione, vitalità cellulare e della citotossicità. Questa analisi colorimetrica si basa sulla riduzione dell' MTT, un sale di tetrazolio giallo (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio bromuro) a cristalli viola di formazano insolubili da parte di cellule metabolicamente attive (principalmente a livello mitocondriale) (Figura 5). Le cellule vitali infatti contengono enzimi reduttasi NAD(P)H-dipendenti che riducono l'MTT (16).

I PBMCs (250.000 cellule/ pozzetto) sono stati seminati in piastre da 96 pozzetti in terreno RPMI completo. Ogni condizione è stata riprodotta in sestuplicato al fine di diminuire la variabilità. Il giorno successivo, tramite un lavaggio con PBS, sono stati rimossi i linfociti mantenendo in coltura solamente i monociti. Le cellule sono state trattate per 24-72h con il 10% di liquido sinoviale (LS) di OA (n = 4), AR (n = 4), AP (n = 4), MSU (n = 4) e CPP (n = 4) in terreno RPMI 0% FBS. Il controllo interno è stato trattato con terreno RPMI completo. Quattro ore prima della fine del tempo di incubazione sono stati messi 10 µL di soluzione MTT (5 mg/mL sciolto in PBS) in ogni pozzetto e la piastra è stata incubata per 4h a 37°C, 5% CO₂. Infine è stato rimosso il mezzo di coltura da ogni pozzetto e i cristalli di formazano sono stati solubilizzati grazie all'aggiunta di 100 µL di DMSO (dimetilsolfossido) a pozzetto. La riduzione dell'MTT in formazano è stata quantificata misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 570 - 630 nm tramite l'utilizzo di uno spettrofotometro. I valori di assorbanza del solo DMSO sono stati sottratti ad ogni misurazione. I valori graficati sono stati espressi come densità ottica (OD), funzione della

concentrazione dei cristalli di formazano presenti nella coltura cellulare. Ogni dato è la media \pm SEM di quattro esperimenti indipendenti (4 donatori sani differenti per l'estrazione dei PBMC e 4 pazienti differenti per ogni tipologia di LS presa in esame).

Nel mettere a punto questa metodica abbiamo tenuto in considerazione alcuni aspetti fondamentali che avrebbero potuto interferire con la riproducibilità del metodo. Tra questi i più importanti sono stati:

- La densità cellulare, la concentrazione dell'MTT e il tempo di incubazione tali da non avere un segnale che raggiungesse il plateau o indurre citotossicità data dall'MTT.
- L'aspirazione del terreno RPMI contenente rosso fenolo, che seppur in piccola misura poteva interferire con la lettura alla lunghezza d'onda di 570 nm.
- L'aspirazione del terreno contenente i liquidi sinoviali che potevano contenere diversi fattori capaci di ridurre l'MTT indipendentemente dall'attività metabolica delle cellule.

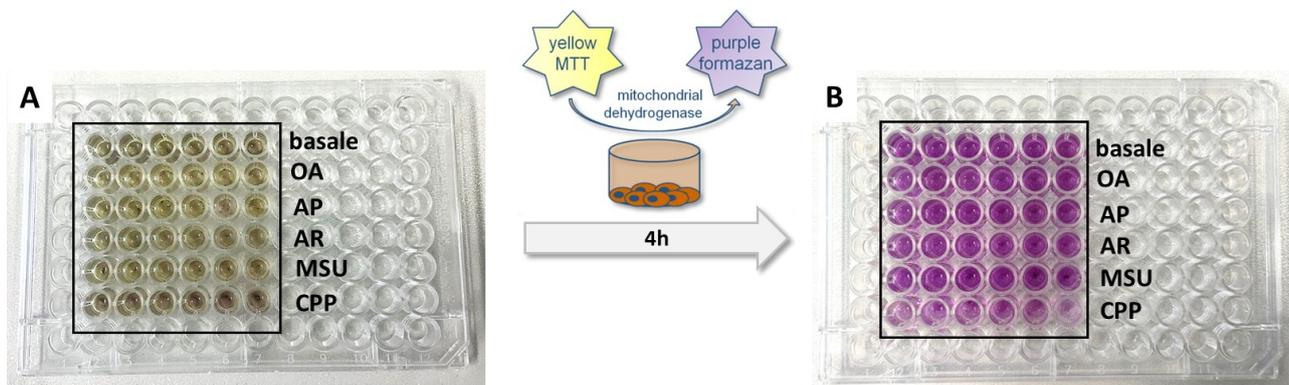


Figura 5. Saggio dell'MTT. **A.** Colorazione gialla dei pozzetti della piastra a seguito dell'aggiunta di MTT al terreno di coltura. **B.** Formazione dei cristalli viola di formazano risolubilizzati in DMSO.

4.6. Analisi delle citochine, chemochine e fattori di crescita presenti nei liquidi sinoviali

La concentrazione di IL-1 β , TNF (Biolegend), IL-6, IL-10, IL-8 e TGF β (Invitrogen) è stata valutata tramite saggio ELISA. Il saggio è stato eseguito seguendo le istruzioni del produttore.

Il primo giorno è stato effettuato il coating della piastra da 96 pozzetti con 100 μ L a pozzetto di anticorpo capture opportunamente diluito in PBS (coating buffer). La piastra sigillata è stata incubata per una notte a 4°C. Il secondo giorno la piastra è stata lavata 4 volte con 300 μ L di wash buffer (PBS 0.05% Tween-20). I pozzetti sono stati trattati per 1h a T ambiente con 200 μ L di PBS - BSA 1% per bloccare i siti aspecifici. Successivamente,

sono stati fatti 4 lavaggi (come descritto in precedenza). In ciascun pozzetto sono stati aggiunti per 2h a T ambiente i campioni (IL-1 β diluizione 1:3, IL-6 diluizione 1:200, IL-8 diluizione 1:30, IL-10 diluizione 1:1, TGF β diluizione 1:30, TNF diluizione 1:1) e lo standard, opportunamente diluito per ricavare la retta di taratura. Al termine dell'incubazione, eseguiti i lavaggi, in ciascun pozzetto sono stati aggiunti 100 μ L di anticorpo detection opportunamente diluito. Trascorsa 1h di incubazione, dopo aver eseguito 4 lavaggi, sono stati aggiunti 100 μ L a pozzetto di streptavidina perossidasi. La piastra è stata incubata a T ambiente, al buio per 20 - 30 min. Eseguiti i lavaggi finali, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 μ L di soluzione tetrametilbenzidina (TMB) per 15 minuti al buio. Per bloccare la reazione si aggiungono 100 μ L a pozzetto di soluzione bloccante 2N H₂SO₄. L'assorbanza è stata letta a 450 nm entro 15 minuti tramite l'utilizzo di uno spettrofotometro (8).

4.7 Saggio per valutare l'attività della β -galattosidasi

Il saggio della β -galattosidasi è un saggio colorimetrico che viene impiegato per individuare le cellule senescenti all'interno di una popolazione cellulare. Valuta l'espressione dell'enzima β -galattosidasi che catalizza l'idrolisi dei residui terminali di β -D-galattosio nei polisaccaridi. Tale enzima risulta sovra espresso a pH 6.0 nelle cellule in fase di senescenza.

L'attività di questo enzima è stata misurata grazie al kit colorimetrico Mammalian beta-Galactosidase Assay (Thermofisher). Per misurare l'attività di questo enzima sono stati adottati 2 protocolli, uno per i monociti trattati con i LS e, il secondo, per il pellet dei LS. Nel primo caso i PBMCs (250.000 cellule / pozzetto) sono stati seminati in piastre da 96 pozzetti in terreno RPMI completo. Il giorno successivo, tramite un lavaggio con PBS, sono stati rimossi i linfociti mantenendo in coltura solamente i monociti. Le cellule sono state trattate per 24 (n = 3) - 72h (n = 1) con il 10% di LS di OA (n = 3), AR (n = 3), AP (n = 3), MSU (n = 3) e CPP (n = 3) in terreno RPMI 0% FBS. Il controllo interno è stato trattato con terreno RPMI completo. Trascorse le 24h - 72h è stato eseguito un lavaggio con PBS, e sono stati aggiunti 100 μ L di β -Galactosidase Assay Reagent a pozzetto. La piastra è stata incubata per 30 minuti a 37°C. Infine, la reazione è stata bloccata tramite l'aggiunta di 100 μ L di β -Galactosidase Assay Stop Solution a pozzetto. L'attività dell'enzima β -galattosidasi è stata quantificata misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 405 nm tramite l'utilizzo di uno spettrofotometro. Nel secondo protocollo sono stati processati i

pellet (4 milioni di cellule) dei LS (n = 3). Ogni pellet è stato lisato grazie al reagente M-PER presente nel kit e centrifugato per 15 minuti a 27000g. Successivamente, sono stati aggiunti 50 μ L di lisato in una piastra da 96 pozzetti con 50 μ L di β Galactosidase Assay Reagent.

4.8 Analisi statistica

I risultati presentati sono espressi come media \pm errore standard (SEM) di almeno tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata effettuata mediante l'uso di GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). L'analisi statistica delle differenze tra i gruppi sperimentali è stata determinata, per i dati con distribuzione normale, tramite il test ANOVA (one-way ANOVA) seguito da post hoc test. Mentre, per i dati con distribuzione non normale, è stato utilizzato il test Kruskal Wallis seguito dal test di Dunnet. Le variabili categoriche sono state comparate utilizzando il Chi-square test. Le differenze sono state considerate significative per i valori di $p < 0.05$.

5. Risultati

5.1 Analisi morfologica e citologica dei leucociti nel liquido sinoviale

5.1.1 Caratteristiche dei liquidi sinoviali

Le caratteristiche dei LS sono state riportate nella *Tabella 1*. Tutti i LS sono stati raccolti durante la fase attiva della malattia e, la conta dei globuli bianchi totale (GB), ad eccezione dei liquidi di OA, era maggiore di >2000 cell/mm³. Il numero di GB risulta maggiore nei LS di RA ($p<0.05$) e CPP ($p<0.01$) rispetto ai LS di OA. Nonostante la differenza osservata non sia significativa a causa della bassa numerosità, anche i LS di AP e CPP presentano mediamente una conta dei GB maggiore rispetto a quella dei LS di OA. I pazienti con AP avevano un'età media inferiore rispetto agli altri gruppi di pazienti presi in esame.

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti presi in esame

	OA	AP	AR	MSU	CPP	p
Pazienti, n	5	5	5	5	5	
Sesso, n	F: 4; M: 1	F: 3; M: 2	F: 3; M: 2	F: 1; M: 4	F: 3; M: 2	ns
Età, anni (IQR)	61 (56 - 66)	34 (23 - 70)	60 (49 - 72)	70 (53 - 78)	65 (53 - 90)	ns
GB, n/mm³ (SEM)	180 (80)	7100 (2261)	10200 (3473)*	8540 (2728)	13880 (3637)**	0.008

I dati sono espressi come mediana e IQR (età) o come media \pm SEM (GB). p è stato calcolato grazie al test Kruskal Wallis e post hoc test Dunn: * $p<0.05$ vs OA, ** $p<0.01$ vs OA. Il test del X^2 è stato utilizzato per valutare le differenze nella distribuzione dell'età e del sesso: ns. Abbreviazioni: OA, artrosi; AP, artrite psoriasica; AR, artrite reumatoide; MSU, artrite indotta da cristalli di urato; CPP, artrite indotta da cristalli di pirofosfato di calcio; ns, non significativo.

5.1.2 Analisi citologica e morfologica dei neutrofili nel liquido sinoviale

La percentuale dei N è significativamente più elevata nei LS di pazienti con MSU ($p<0.01$) e CPP ($p<0.05$) rispetto ai pazienti con OA. Nonostante le differenze non siano significative, la percentuale di N nei LS di RA e PS è maggiore rispetto a quella riscontrata nei LS di OA (Figura 6A). La percentuale dei N immaturi (band e iposegmentati) tende ad essere più elevata nei LS di RA, MSU e CPP rispetto ai LS di OA e PS (differenza significativa solo per quanto riguarda i LS di MSU e CPP vs OA) (Figura 6B - C). Abbiamo osservato una percentuale di N ipersegmentati maggiore nei LS di MSU ($p<0.05$) e CPP ($p<0.05$) rispetto ai LS di OA (Figura 6D). Infine, anche se la differenza non raggiunge la

significatività statistica, il numero di N con vacuoli è maggiore nei LS di RA, MSU e CPP rispetto ai LS di OA e PS (Figura 6E).

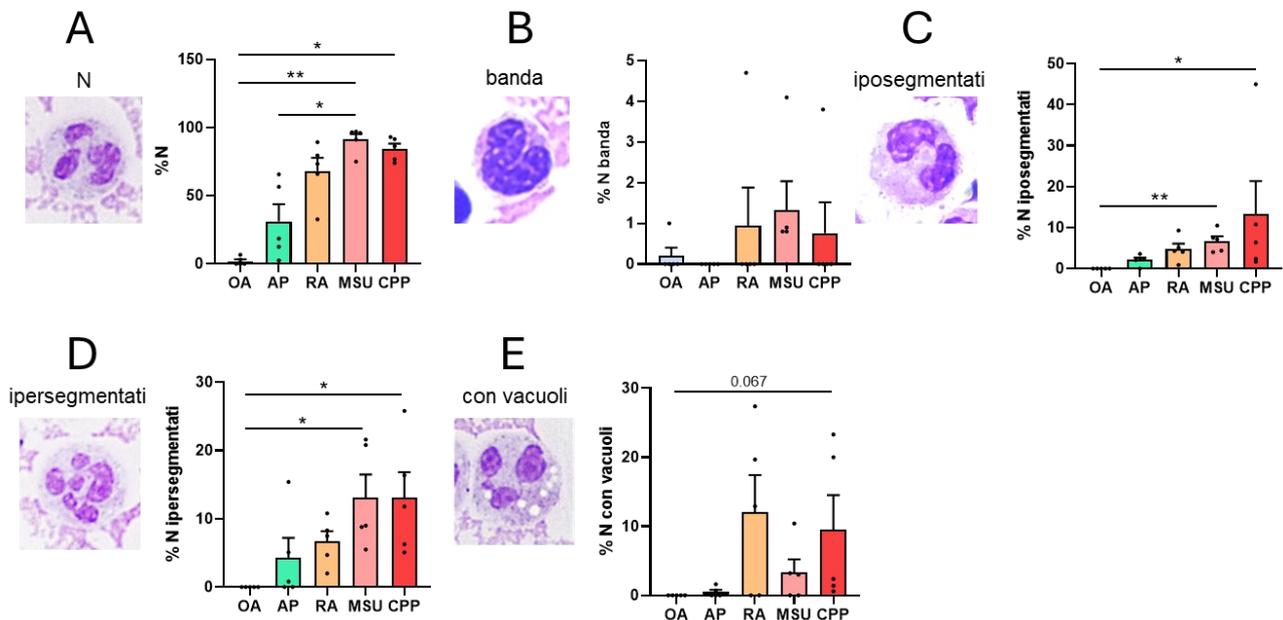


Figura 6. Analisi citologica e morfologica dei N nel LS. I LS di OA (n = 5), AP (n = 5), AR (n = 5), MSU (n = 5) e CPP (n = 5) sono stati analizzati come descritto nei Materiali e Metodi dopo colorazione con MGG. **A.** % N totali **B.** % N banda **C.** % N iposegmentati **D.** % N ipersegmentati **E.** % N con vacuoli. I dati sono espressi come la media \pm SEM. La p è stata calcolata con test di Kruskal-Wallis, Dunn's post hoc test: *p<0.05, **p<0.01. Abbreviazioni: N, neutrofili; LS, liquido sinoviale; OA, artrosi; AP, artrite psoriasica; AR, artrite reumatoide; MSU, artrite indotta da cristalli di urato; CPP, artrite indotta da cristalli di pirofosfato di calcio.

5.1.3 Analisi citologica e morfologica dei monociti e linfociti nel liquido sinoviale

La percentuale dei M è significativamente più elevata nei LS di pazienti con OA rispetto ai pazienti con MSU (p<0.001) (figura 7A). La percentuale dei M con vacuoli non è differente nelle varie patologie prese in esame (Figura 7B). Abbiamo osservato una percentuale di L maggiore nel LS di OA (p<0.05) e AP (p<0.01) rispetto ai LS di CPP. Anche se la differenza non è significativa, si nota una percentuale maggiore di L nei LS di AP rispetto ai LS di MSU (Figura 7C).

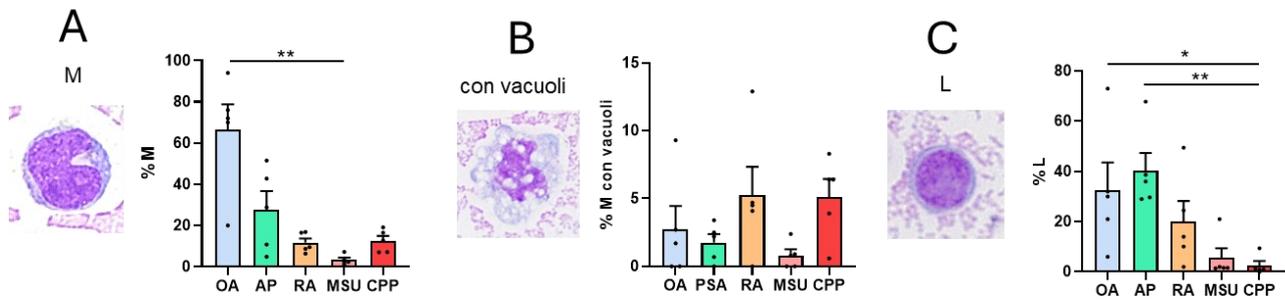


Figura 7. Analisi citologica e morfologica dei M e L nel LS. I LS di OA (n = 5), AP (n = 5), AR (n = 5), MSU (n = 5) e CPP (n = 5) sono stati analizzati come descritto nei Materiali e Metodi dopo colorazione con MGG. **A.** % M **B.** % M con vacuoli **C.** % L. I dati sono espressi come la media \pm SEM. La p è stata calcolata con test di Kruskal-Wallis, Dunn's post hoc test: *p<0.05, **p<0.01. Abbreviazioni: L linfociti; M, monociti; LS, liquido sinoviale; OA, artrosi; AP, artrite psoriasica; AR, artrite reumatoide; MSU, artrite indotta da cristalli di urato; CPP, artrite indotta da cristalli di pirofosfato di calcio.

5.1.4 Morte cellulare e cellule di Reiter nel liquido sinoviale

Abbiamo esaminato i diversi campioni registrando le percentuali di morte cellulare, in particolare valutando la presenza di picnosi, carioliisi e carioressi. La percentuale di cellule morte nei LS di MSU, CPP e AR è maggiore rispetto a quella riscontrata nei LS di OA (p<0.05) (Figura 8A). Come è possibile osservare dal grafico, sono state trovate poche cellule reiter nei LS di AP, RA e MSU (Figura 8B).

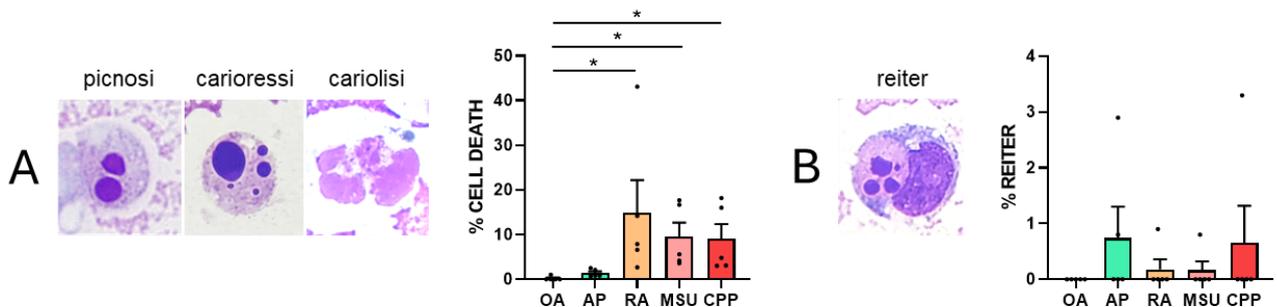


Figura 8. Morte cellulare e cellule di Reiter nel LS. I LS di OA (n = 5), AP (n = 5), AR (n = 5), MSU (n = 5) e CPP (n = 5) sono stati analizzati come descritto nei Materiali e Metodi dopo colorazione con MGG. **A.** % cellule morte (picnosi, carioliisi, carioressi) **B.** % cellule di Reiter. I dati sono espressi come la media \pm SEM. La p è stata calcolata con test di Kruskal-Wallis, Dunn's post hoc test: *p<0.05. Abbreviazioni: LS, liquido sinoviale; OA, artrosi; AP, artrite psoriasica; AR, artrite reumatoide; MSU, artrite indotta da cristalli di urato; CPP, artrite indotta da cristalli di pirofosfato di calcio. ns, non significativo.

5.2 Analisi delle citochine, chemochine e fattori di crescita presenti nei liquidi sinoviali

Le citochine, chemochine e fattori di crescita nei LS sono state riportate nella *Tabella 2*. I livelli di IL-1 β sono maggiori nei LS dei pazienti con gotta rispetto ai LS dei pazienti con OA. Nonostante le differenze non siano significative, i valori dell' IL-1 β sono maggiori anche nei LS di AP, AR e CPP rispetto ai valori riscontrati nell'OA. Inoltre, i valori dell' IL-1 β tendono ad essere inferiori nei LS di AP, rispetto ai valori riscontrati nei LS di AR, MSU e CPP. I valori di IL-6, tendono ad essere maggiori nei LS di AP, AR, MSU, CPP, rispetto ai valori misurati nell'OA, inoltre i valori dell'IL-6 tendono ad essere inferiori nei LS di AP, rispetto ai valori misurati nei LS di AR, MSU, CPP; anche in questo caso le differenze non sono significative. Nonostante non vi siano differenze significative i valori di IL-8, sono maggiori nei LS di AP, AR, MSU, CPP, rispetto ai valori riscontrati nell'OA. I valori di IL-10, risultano essere significativamente maggiori nei LS di AR ($p < 0.01$) rispetto ai valori misurati nei LS di OA, AP, MSU, CPP. Non ci sono differenze tra i valori del TGF β nei LS di OA, AP, AR, MSU e CPP. I valori del TNF α , tendono ad essere maggiori nei LS di AP, AR, MSU, rispetto ai valori riscontrati nell'OA.

Tabella 2. Citochine, chemochine e fattori di crescita nei LS

	OA	AP	AR	MSU	CPP	p
IL-1 β , pg/mL (SEM)	0.3 (0.1)	1.6 (0.6)	11.3 (6.9)	62.7 (51.8)**	8.0 (4.0)	0.006
IL-6, pg/mL (SEM)	108 (22)	762 (520)	2122 (1240)	17054 (14962)	29720 (11007)	ns
IL-8, pg/mL (SEM)	71 (61)	299 (175)	2794 (1683)	433 (137)	737 (313)	ns
IL-10, pg/mL (SEM)	1.2 (0.2)	9.7 (4.9)	37 (12)**	7.0 (0.6)	18 (2.9)	0.006
TGF β , ng/mL (SEM)	1199 (237)	1377 (328)	2208 (661)	2925 (2454)	1042 (148)	ns
TNF α , pg/mL (SEM)	8.4 (2.1)	28 (13)	27 (15)	24 (15)	6.4 (1.9)	ns

I dati sono espressi come media \pm SEM. p è stato calcolato grazie al test Kruskal Wallis e post hoc test Dunn: ** $p < 0.01$ vs OA. Abbreviazioni: OA, artrosi; AP, artrite psoriasica; AR, artrite reumatoide; MSU, artrite indotta da cristalli di urato; CPP, artrite indotta da cristalli di pirofosfato di calcio; LS, liquido sinoviale; TNF α , fattore di necrosi tumorale; TGF β , fattore di crescita trasformante; IL, interleuchina; ns, non significativo.

5.3 Effetto dei liquidi sinoviali sulla vitalità cellulare

L'effetto dei LS sulla vitalità cellulare è stato valutato attraverso il saggio Trypan. Nella Figura 9 è riportata la vitalità delle cellule trattate con LS dopo 24h, 48h e 72h. La vitalità non varia tra i diversi gruppi presi in esame.

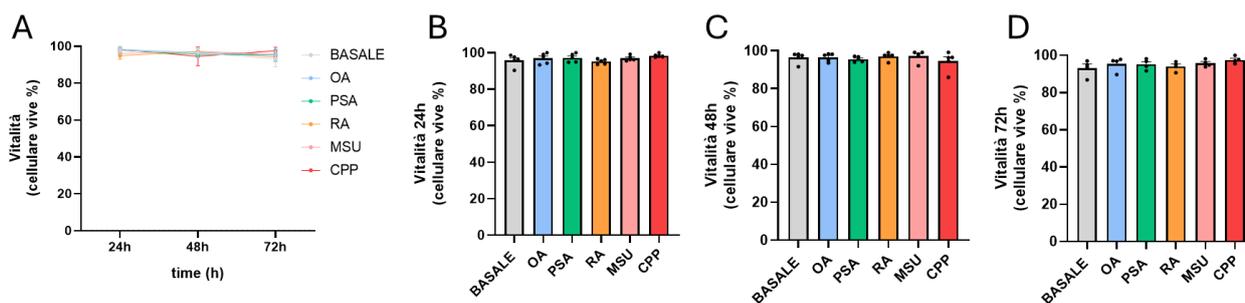


Figura 9. Effetto dei liquidi sinoviali sulla vitalità cellulare valutata nelle 24h - 72h. I monociti sono stati stimolati con i LS di OA (n = 5), AP (n = 5), AR (n = 5), MSU (n = 5) e CPP (n = 5) per 24h-72h come descritto nei Materiali e Metodi. **A.** vitalità cellulare a 24h - 72h **B.** % di cellule vive a 24h **C.** % di cellule vive a 48h **D.** % di cellule vive a 72h. I dati sono espressi come la media \pm SEM di 5 esperimenti indipendenti. La p è stata calcolata con test One Way Anova: ns. Abbreviazioni: LS, liquido sinoviale; OA, artrosi; AP, artrite psoriasica; AR, artrite reumatoide; MSU, artrite indotta da cristalli di urato; CPP, artrite indotta da cristalli di pirofosfato di calcio; ns, non significativo.

5.4 Effetto dei liquidi sinoviali sul metabolismo cellulare

L'effetto dei LS sul metabolismo dei monociti è stato valutato attraverso il saggio MTT. La Figura 8 mostra l'assorbanza legata alla riduzione dell'MTT nei monociti stimolati con i LS per 24h - 72h. Abbiamo osservato una diminuzione della D.O. (densità ottica) nel tempo, inoltre, la D.O. nei monociti stimolati con i LS di OA, AP, AR, MSU e CPP è inferiore rispetto alla D.O. misurata nel basale (Figura 10A). A 24h la D.O. è significativamente più elevata nel basale ($p < 0.05$) rispetto alla D.O. dei monociti stimolati con i LS di CPP (Figura 10B). A 48h la D.O. è significativamente più elevata nel basale rispetto alla D.O. dei monociti stimolati con i LS di OA ($p < 0.01$), di AR ($p < 0.01$), e di CPP ($p < 0.001$) (Figura 10C). Abbiamo osservato una differenza significativa tra la D.O. dei monociti stimolati con i LS di AP ($p < 0.05$) rispetto alla D.O. dei monociti stimolati con i LS di CPP (Figura 10C). A 72h la D.O. è significativamente più elevata nel basale rispetto alla D.O. dei monociti stimolati con i LS di OA ($p < 0.05$) e CPP ($p < 0.01$). Anche se le differenze non sono significative, abbiamo osservato in tutti i campioni una diminuzione della D.O. rispetto al basale (Figura 10D).

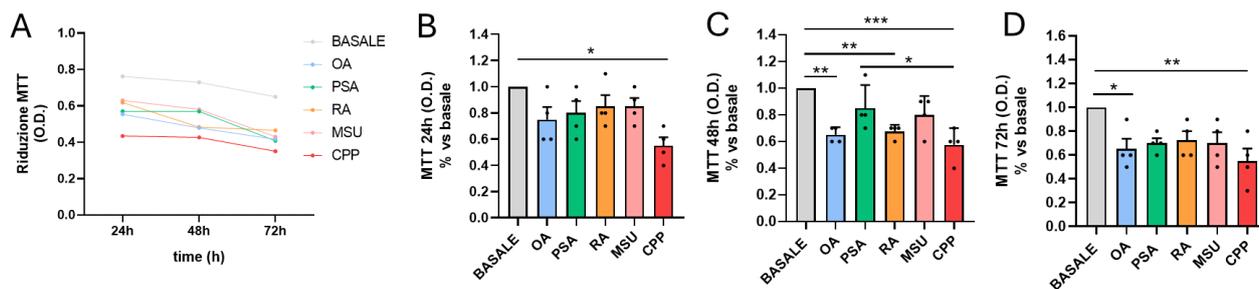


Figura 10. Effetto dei liquidi sinoviali sul metabolismo dei monociti nelle 24h - 72h. I monociti sono stati stimolati con i LS di OA (n = 4), AP (n = 4), AR (n = 4), MSU (n = 4) e CPP (n = 4). **A.** Assorbanza legata alla riduzione dell'MTT (formazione dei cristalli di formazano) nelle 24h-72h **B.** % della riduzione dell'MTT nelle 24h **C.** % della riduzione dell'MTT nelle 48h **D.** % della riduzione dell'MTT nelle 72h. I dati sono espressi come la media \pm SEM di 4 esperimenti indipendenti. La p è stata calcolata con test One Way Anova: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Abbreviazioni: LS, liquido sinoviale; OA, artrosi; AP, artrite psoriasica; AR, artrite reumatoide; MSU, artrite indotta da cristalli di urato; CPP, artrite indotta da cristalli di pirofosfato di calcio; O.D., densità ottica.

5.5 Attività della β galattosidasi

L'effetto dei LS sull'attività della β -galattosidasi nei monociti umani è stato valutato tramite il saggio della β -galattosidasi. La Figura 11 mostra l'assorbanza legata all'attività della β -galattosidasi nei monociti trattati con i LS fino a 72h. L'attività di questo enzima non varia tra i diversi gruppi presi in esame. (Figura 11A).

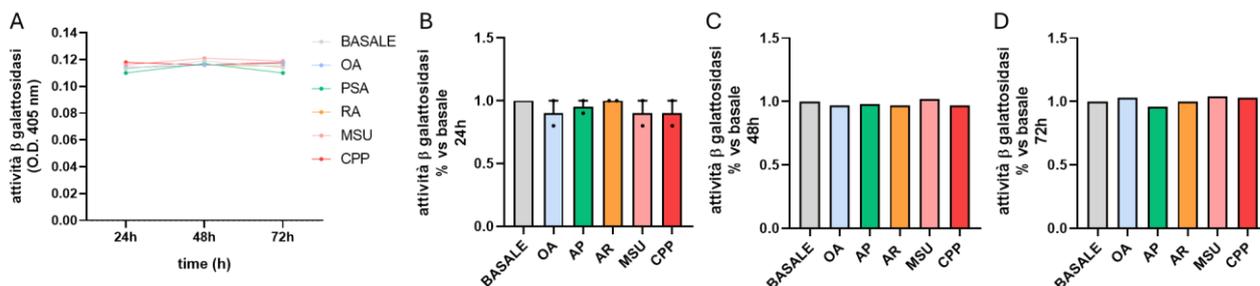


Figura 11. Effetto del liquido sinoviale sull'attività della β galattosidasi nei monociti umani. I monociti sono stati stimolati con i LS di OA (n = 3), AP (n = 3), AR (n = 3), MSU (n = 3) e CPP (n = 3) per 24h-72h come descritto nei Materiali e Metodi. **A.** assorbanza legata all'attività della β galattosidasi a 24h - 72h **B.** % dell'attività di β -galattosidasi nelle 24h **C.** % dell'attività di β -galattosidasi nelle 48h **D.** % dell'attività di β -galattosidasi nelle 72h. I dati sono espressi come la media \pm SEM di 2 esperimenti indipendenti per le 24h, e di 1 esperimento per le 48h-72h. Abbreviazioni: LS, liquido sinoviale; OA, artrosi; AP, artrite psoriasica; AR, artrite reumatoide; MSU, artrite indotta da cristalli di urato; CPP, artrite indotta da cristalli di pirofosfato di calcio.

Infine, non abbiamo riscontrato alcun segnale relativo all'attività della β -galattosidasi valutata nei leucociti presi dalle diverse artropatie infiammatorie.

6. Discussione e Conclusioni

Lo scopo dello studio è stato quello di valutare se l'infiammazione in AR, AP, gotta e pseudogotta può promuovere e sostenere processi di senescenza delle cellule immunitarie e di come questa influenzi il profilo metabolico dei monociti.

Abbiamo innanzitutto caratterizzato i LS di diverse artropatie infiammatorie attraverso la conta totale e differenziale dei leucociti, l'analisi citologica e il contenuto di fattori proinfiammatori (citochine, chemochine e fattori di crescita) rilasciati dalle cellule immunitarie durante l'infiammazione, che potrebbero promuovere cambiamenti nel profilo metabolico di queste cellule.

Dalla conta totale dei GB è emerso che i LS provenienti da pazienti con pseudogotta, gotta, AR e AP erano caratterizzati da un numero maggiore di GB rispetto all'OA. Inoltre, i liquidi di OA presentavano pochi N rispetto alle artropatie infiammatorie analizzate.

L'analisi citologica ha permesso di caratterizzare alterazioni che riflettono lo stato infiammatorio dei LS (vacuolizzazioni, neutrofilii immaturi, morte cellulare) e di valutare aspetti della morfologia dei leucociti che potrebbero essere marcatori aspecifici riscontrati anche in cellule senescenti (ipersegmentazione dei nuclei).

Nei LS infiammatori abbiamo riscontrato una percentuale maggiore di N immaturi (band e iposegmentati) rispetto all'OA. Inoltre, questa percentuale era maggiore nei LS di gotta e pseudogotta. Il rilascio di forme immature di N è indice di infiammazione acuta. I N infatti vengono richiamati nel sito d'infiammazione senza raggiungere un grado di maturazione completo. L'analisi citologica ha evidenziato inoltre una percentuale maggiore di N ipersegmentati nei LS infiammati rispetto a quelli non infiammatori. Inoltre, le percentuali maggiori erano presenti nei LS di gotta e pseudogotta. I N ipersegmentati sembrano corrispondere a delle cellule che sono sopravvissute più a lungo nel sito dell'infiammazione (stadio di maturazione più avanzato) (17). Studi precedenti, hanno messo in relazione l'aumentata sopravvivenza dei N con i livelli dei mediatori proinfiammatori. La permanenza di queste cellule nel LS potrebbe promuovere e sostenere l'infiammazione a carico della membrana sinoviale (cronicizzazione dell'infiammazione).

Attraverso l'analisi citologica abbiamo distinto diverse figure relative alla morte cellulare (cariolisi, carioressi e picnosi). La percentuale di morte cellulare era significativamente maggiore nei LS di AR, MSU, e CPP rispetto ai LS di OA e AP. È noto come i cristalli di CPP e MSU causino l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 con conseguente rilascio IL-

1 β , IL-18 e induzione, attraverso la gasdermina D, di una forma infiammatoria di morte cellulare detta piroptosi (19). I cristalli inoltre possono indurre danni del DNA e aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno, stimoli capaci di indurre apoptosi (8).

L'apoptosi è inoltre funzionale nel limitare l'attacco infiammatorio, riducendo la presenza dei leucociti nel sito d'infiammazione.

La percentuale di cellule con vacuoli era maggiore nei LS di AR e artrite da CPP. La vacuolizzazione può corrispondere al risultato di diversi meccanismi che si instaurano durante l'infiammazione. Tra questi troviamo l'aumento dello stress ossidativo (promosso dai cristalli, dall'infiammazione) e processi di fagocitosi.

I LS contengono diversi fattori rilasciati dai leucociti che rispecchiano l'infiammazione a carico della membrana sinoviale. Nel nostro studio abbiamo valutato la presenza di diverse citochine, chemochine e fattori di crescita. I LS provenienti da pazienti con OA presentavano valori nettamente inferiori nei livelli di IL-1 β , L-8, IL-6, IL-10, e TNF α rispetto ai liquidi provenienti dalle artropatie infiammatorie. Inoltre i LS di pazienti con AR, gotta e pseudogotta erano caratterizzati da livelli più elevati di IL-1, IL-6 e IL-8 rispetto ai LS di pazienti con AP. I mediatori dell'infiammazione esaminati possono prolungare la sopravvivenza delle cellule immunitarie sostenendo il processo infiammatorio attraverso diversi meccanismi ancora non del tutto noti. Pertanto, abbiamo deciso di valutare come i LS influenzassero il metabolismo, la vitalità e l'attività della β -galattosidasi di monociti provenienti da donatori sani. I nostri dati mostrano una riduzione del metabolismo, senza riduzione della vitalità, nei monociti trattati con i LS rispetto al basale. L'alterazione del metabolismo potrebbe essere causato da diversi fattori presenti nei LS come il contenuto di mediatori proinfiammatori e la presenza di ROS, NOS. Studi relativi all'infiammazione riportano che questa modifichi l'omeostasi metabolica delle cellule in maniera diversa a seconda della fase infiammatoria (18). Questo aspetto sarà oggetto di studi futuri, per comprendere se la riduzione del metabolismo possa essere promossa anche da processi di senescenza.

Abbiamo infine eseguito il saggio per valutare l'attività della β -galattosidasi nei monociti stimolati con i LS di AR, AP, gotta e pseudogotta e nei leucociti provenienti dai LS. Nei monociti stimolati fino a 72h con i LS l'attività della β -galattosidasi è rimasta invariata rispetto al basale. Nei leucociti dei LS non è stato possibile valutare l'attività della β -galattosidasi, probabilmente perché l'infiltrato leucocitario analizzato apparteneva alla fase acuta dell'infiammazione e non ad uno stato infiammatorio cronico.

Inoltre, la sensibilità del kit utilizzato per valutare l'attività di questo enzima nel nostro modello sperimentale, potrebbe non essere sufficiente per valutare il segnale. Per avere un'ulteriore conferma, in futuro, sarebbe interessante utilizzare la citofluorimetria per valutare la β -galattosidasi. Inoltre, sarebbe interessante isolare i neutrofilii ipersegmentati, per valutare in questi l'attività della β -galattosidasi e determinare quindi se l'ipersegmentazione dei nuclei è dovuta a meccanismi di senescenza. Infine, gli stessi studi verranno condotti su altri tipi cellulari (endotelio e fibroblasti), coinvolti attivamente nella sinovite e formazione del panno sinoviale.

7. Bibliografia

1. Krishnan Y, Grodzinsky AJ. Cartilage diseases. *Matrix Biol.* 2018; 71-72:51-69.
2. Baggio C, Boscaro C, Oliviero F, Trevisi L, Ramaschi G, Ramonda R, Bolego C, Cignarella A. Gender differences and pharmacological regulation of angiogenesis induced by synovial fluids in inflammatory arthritis. *Biomed Pharmacother.* 2022 ;152:113181.
3. Azuaga AB, Ramírez J, Cañete JD. Psoriatic Arthritis: Pathogenesis and Targeted Therapies. *Int J Mol Sci.* 2023; 3:24(5)-4901.
4. Jang S, Kwon EJ, Lee JJ. Rheumatoid Arthritis: Pathogenic Roles of Diverse Immune Cells. *Int J Mol Sci.* 2022; 4:23(2)-905.
5. Oliviero F, Bindoli S, Scanu A, Feist E, Doria A, Galozzi P, Sfriso P. Autoinflammatory Mechanisms in Crystal-Induced Arthritis. *Front Med (Lausanne).* 2020; 30:7-166.
6. Doria A, Fiocco U, Gambari PF, Todesco S, Gambari PF, Punzi L. Reumatismi infiammatori (artriti) In: *Malattie Reumatiche.* eds McGraw-Hill Publ, Milano.2007; pp 137-148.
7. Punzi L, Frallonardo P, Lo Nigro A, Gava A, Oliviero F, Pozzuoli A, Pianon M, Ramonda R, Scanu A Schiavon F, Sfriso P, Valvason C. *Manuale di Analisi del Liquido Sinoviale.* Edizioni Medico-Scientifiche-Pavia. 2010; 33-99.
8. Baggio C, Luisetto R, Boscaro C, Scanu A, Ramonda R, Albiero M, Sfriso P, Oliviero F. Leucocyte Abnormalities in Synovial Fluid of Degenerative and Inflammatory Arthropathies. *Int J Mol Sci.* 2023;13-24(6):5450.
9. Dodig S, Čepelak I, Pavić I. Hallmarks of senescence and aging. *Biochem Med (Zagreb).* 2019 ;15-29(3):030501.
10. Del Rey MJ, Valín Á, Usategui A, Ergueta S, Martín E, Municio C, Cañete JD, Blanco FJ, Criado G, Pablos JL. Senescent synovial fibroblasts accumulate prematurely in rheumatoid arthritis tissues and display an enhanced inflammatory phenotype. *Immun Ageing.* 2019; 5-16:29.

11. Coryell PR, Diekman BO, Loeser RF. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2021;47-57:17(1)
12. Cunha ALS, Perazzio SF. Effects of immune exhaustion and senescence of innate immunity in autoimmune disorders. *Braz J Med Biol Res*. 2024;17-57:13225.
13. Herranz N, Gil J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest*. 2018;128(4)-1238:1246.
14. Oliviero F, Pascual E, Punzi L. Detection and identification of crystals in synovial fluid. 2005; 57(3):208-211.
15. Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr Pharm Biotechnol*. 2016;17(14):1213-1221.
16. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci*. 2021 26;22(23):12827
17. Tomay F, Wells K, Duong L, Tsu JW, Dye DE, Radley-Crabb HG, Grounds MD, Shavlakadze T, Metharom P, Nelson DJ, Jackaman C. Aged neutrophils accumulate in lymphoid tissues from healthy elderly mice and infiltrate T- and B-cell zones. *Immunol Cell Biol*. 2018;96(8):831-840.
18. Yin F, Sancheti H, Patil I, Cadenas E. Energy metabolism and inflammation in brain aging and Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*. 2016;100:108-122.
19. Rao Z, Zhu Y, Yang P, Chen Z, Xia Y, Qiao C, Liu W, Deng H, Li J, Ning P, Wang Z. Pyroptosis in inflammatory diseases and cancer. *Theranostics*. 2022; 16;12(9):4310-4329.

Ringraziamenti

Non è facile citare e ringraziare, in poche righe, tutte le persone che hanno contribuito alla nascita e allo sviluppo di questo elaborato. Non è stato un percorso semplice per me, ho affrontato tante difficoltà. Tante volte ho avuto momenti di sconforto, durante i quali ho pensato di non farcela. Ma è proprio grazie a questi momenti non che ho capito che nella vita è normale cadere, a volte cadendo ci si può fare male, l'importante però è rialzarsi sempre e continuare a dare il meglio di se.

Vorrei ringraziare innanzitutto la mia relatrice, la professoressa Francesca Oliviero per la sua disponibilità nell'incontrarmi, e per avermi permesso di svolgere questo progetto di tesi.

Ringrazio i miei genitori per avermi permesso di studiare e per avermi fatto il regalo più bello che io potessi desiderare, ovvero mio fratello Leo. In questi anni ho capito che un fratello è l'unico vero amico che non ti lascerà mai sola, so che sarai sempre in prima fila a fare il tifo per me, come io farò sempre con te.

Ringrazio mio nonno Romeo venuto a mancare un anno fa. Lo ringrazio per avermi donato dei ricordi che custodirò per sempre. Non dimenticherò mai l'amore immenso che hai sempre dimostrato a me e mio fratello.

Ringrazio Elena, la mia ex titolare, perché se ho potuto mantenere il mio lavoro durante questo ultimo anno, è solo grazie a lei. Con la sua semplicità e dolcezza ha reso l'Osteria numero 5 una seconda casa. Colgo l'occasione per ringraziare anche Martina, Carla, Michela, Albana, le mie colleghe, avrete sempre un posto speciale nel mio cuore.

Infine ringrazio la mia correlatrice, la dottoressa Chiara Baggio. A Chiara vorrei poter dedicare una pagina intera, ma dovrò limitarmi a usare poche righe per esprimere l'immensa gratitudine che provo nei suoi confronti. Questi sette mesi grazie a te sono stati grande fonte di ispirazione per me. Le giornate passate assieme tra chiacchiere e risate rimarranno per sempre un ricordo bellissimo, certo i rimproveri non sono mancati, ma sono infinitamente grata di averli ricevuti. Farò di questi mesi un tesoro da portare sempre con me.