

A) verso l'Identificazione dei PROcessi patologici cellulari e molecolari coinvolti nell'insorgenza e progressione della coxARTrosi

B) Acronimo del progetto: I PRO ART

C) Settori ERC:

LS4_1 Organ and tissue physiology and pathophysiology

LS7_12 Health care, including care for the ageing population

LS1_9 Molecular mechanisms of signalling processes

D) Parole chiave:

artrosi dell'anca, cell signalling, ageing, biomarcatore, secretoma

E) Descrizione degli obiettivi del progetto di ricerca

L'articolazione coxo-femorale, costituita dall'acetabolo e dalla testa del femore, è fra le grandi articolazioni quella maggiormente sottoposta a sollecitazioni meccaniche, sia per l'elevata ampiezza di movimento seconda solo all'articolazione della spalla, che per il suo ruolo di trasduttore delle forze che dal rachide incidono sull'arto inferiore. L'invecchiamento e svariati fattori di rischio, sia meccanici che biologici, possono portare alla coxartrosi, una patologia infiammatoria cronica che coinvolge tutta l'articolazione dell'anca ed è provocata dal deterioramento del tessuto cartilagineo e del tessuto osseo subcondrale: il processo infiammatorio che ne scaturisce coinvolge a sua volta il tessuto di sinoviale e la capsula articolare.

L'artrosi all'anca rappresenta la forma di artrosi più comune e coinvolge circa il 10% della popolazione anziana. Con l'aumento dell'aspettativa di vita e l'incremento relativo della popolazione geriatrica all'interno della società, è atteso un ulteriore aumento di interventi di sostituzione protesica dell'anca, con un conseguente significativo impatto economico sul servizio sanitario nazionale. In questo contesto, uno studio che abbia come finalità la delineazione dei meccanismi cellulari e molecolari alla base dell'insorgenza e della progressione dell'artrosi dell'anca risulta di fondamentale importanza e potrebbe gettare le basi per aumentare le conoscenze attuali sull'evoluzione delle patologie degenerative articolari.

Gli obiettivi primari di questo progetto multidisciplinare consistono quindi nell'acquisizione di dati scientifici innovativi, non disponibili nella letteratura medica contemporanea, in merito alle caratteristiche cellulari e molecolari di tessuto cartilagineo ed osseo di pazienti affetti da coxartrosi. I tessuti verranno prelevati in corso di intervento di sostituzione protesica dell'acetabolo e della testa del femore, e studiati con la finalità di identificare biomarcatori molecolari alla base del processo degenerativo articolare. I dati acquisiti verranno correlati con i risultati clinici dell'intervento per comprendere il ruolo dei marcatori dell'artrosi nel risultato clinico, per prevenire o pianificare in maniera ottimale un intervento chirurgico quanto più appropriato per il singolo paziente, riducendo così i costi legati all'ospedalizzazione e a cure non specifiche.

Questo tipo di studio potrebbe quindi rappresentare uno step verso una medicina di precisione, basata sulle specifiche caratteristiche biologiche dei pazienti, e incentrata su nuove ed efficaci strategie terapeutiche atte a prevenire o attenuare lo sviluppo dell'artrosi. In questo modo, i pazienti affetti da coxartrosi potrebbero essere indirizzati in fase precoce verso terapie non chirurgiche o chirurgia articolare non protesica, determinando un miglioramento anche in termini di costo-beneficio, contrastando la progressione della patologia, incrementando la velocità di ripresa post-operatori, e migliorando nella globalità la qualità di vita del paziente.

Nello specifico, gli obiettivi di questo studio saranno di:

1. Raccogliere 10 campioni di tessuto osseo e cartilagineo da pazienti con coxartrosi e 10 campioni degli stessi tessuti da pazienti operati di frattura del collo del femore, che verranno utilizzati come campioni di controllo poiché non caratterizzati da artrosi [Y Xu, Osteoarthritis Cartilage 2012;20:1029-38]
2. Valutare la morfologia e il livello di degenerazione del tessuto osseo e cartilagineo attraverso analisi immunoistochimiche e microscopia elettronica

3. Valutare le principali vie del segnale alterate nei campioni di tessuto osseo e cartilagineo
4. Valutare l'apoptosi, l'autofagia e la senescenza nei campioni di tessuto osseo e cartilagineo
5. Valutare il rilascio di citochine pro- e anti-infiammatorie (secretoma), e l'espressione di componenti di vie del segnale in cellule primarie ossee e cartilaginee.

F) Descrizione del carattere di originalità e innovatività della proposta progettuale

Nonostante siano stati pubblicati numerosi articoli sullo sviluppo e progressione della coxartrosi, non sono mai stati effettuati studi di identificazione di meccanismi cellulari e molecolari su biopsie e cellule primarie di osso e cartilagine. Infatti ad oggi, nessuno studio presente in letteratura medica è stato in grado di definire in modo preciso i processi molecolari che provocano l'insorgenza e la progressione del deterioramento dei suddetti tessuti, caratterizzanti appunto il processo artrosico all'anca.

Per questo motivo, i dati ottenuti in questo progetto potrebbero portare all'individuazione di possibili e affidabili marcatori molecolari coinvolti nella degenerazione dell'articolazione coxo-femorale, in grado a loro volta di portare allo sviluppo di nuove strategie sia preventive che terapeutiche altamente specifiche, basate su caratteristiche biologiche specifiche dei pazienti, arrivando quindi ad una medicina personalizzata.

Inoltre, l'individuazione di tali biomarcatori potrebbe fornire informazioni sulla possibile predisposizione individuale all'insorgenza di coxartrosi, permettendo programmi di screening e riconoscendo precocemente gli individui a rischio, trattandoli con terapia mediche o con interventi chirurgici non protesici, abbassando in questo modo il numero di interventi di protesi di anca, con conseguente contenimento della spesa sanitaria.

L'approccio multidisciplinare di questo progetto, che sfrutta sia l'expertise biologica e preclinica del PI che quella clinica del CO-PI, potrebbe infine avere un alto e rapido riscontro clinico nel quale i pazienti potrebbero essere indirizzati immediatamente verso terapie più adatte, con un miglioramento clinico ed in termini di costo-beneficio. Inoltre, analizzando la correlazione fra i marcatori dell'artrosi ed i risultati dell'intervento di protesi di anca, potrebbe essere possibile selezionare accuratamente i pazienti incrementando la velocità di ripresa post-operatori, e migliorandone la qualità di vita.

G) Linea di intervento A: Descrizione della coerenza con i temi di rilievo trasversale per il PNR 2021- 2027

Il presente progetto rientra nel tema di rilievo trasversale del Piano Nazionale di Ripresa e Resilienza specificatamente nella l'area della Salute, in particolar modo nella sezione Temi Generali, Articolazione 3: "Implementazione dei sistemi di diagnosi, terapia e follow-up per le malattie non trasmissibili e/o legate all'invecchiamento". Uno studio di caratterizzazione dei meccanismi cellulari e molecolari alla base dell'insorgenza e progressione della artrosi all'anca rientra in questo importante tema di ricerca visto che la coxartrosi è una patologia infiammatoria degenerativa legata all'invecchiamento, che coinvolge circa il 10% della popolazione. Da qui, l'importanza di individuare marcatori in grado di prevenire o rallentare il processo di deterioramento del tessuto osseo e cartilagineo dell'anca, e ritardare e/o migliorare le cure per pazienti che necessitano di un intervento. L'individuazione di biomarcatori che regolano o che attivano lo sviluppo dell'artrosi, attraverso uno studio di espressione di componenti di vie del segnale o di citochine ad esse associate, potrebbe giocare un ruolo chiave per il trattamento del paziente affetto da artrosi dell'anca.

Inoltre, la possibile individuazione di specifici biomarcatori rientra anche in uno degli impatti attesi di Horizon Europe, in particolar modo il n. 5, rappresentato dall'individuazione di "nuovi marcatori per la diagnosi e come target di terapia per le malattie legate all'invecchiamento".

Infine, sempre citato dal PNRR, "I maggiori temi di ricerca, quali quelli di promozione della salute, di prevenzione primaria e secondaria delle patologie, di identificazione di nuovi meccanismi molecolari, di gestione dell'ageing society, di garanzia per l'accesso alle migliori cure disponibili, amplificano il potenziale dell'innovazione" e "L'infiammazione cronica che caratterizza queste condizioni rappresenta non solo un elemento patogenetico comune, ma anche uno spunto per l'attività di ricerca di marker precoci di patogenesi, di diagnosi e di follow-up".

H) Illustrazione dei profili di interdisciplinarietà della ricerca e complementarità di competenze tra PI e CO-PI

Da una collaborazione esistente tra l'Istituto di Anatomia e la I Clinica Ortopedica dell'Istituto Ortopedico Rizzoli, entrambi afferenti al Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie (DIBINEM), è nata l'idea di sviluppare un progetto in grado di rappresentare un esempio di ricerca traslazionale mirato alla sinergia e alla valorizzazione delle diverse competenze cliniche e precliniche, e focalizzato sull'attività di ricercatori da anni attivi in questi campi di ricerca.

Questo progetto verrà infatti sviluppato dalla collaborazione fra la Dott.ssa Camilla Evangelisti, PI del progetto e ricercatore a tempo determinato di tipo B nel settore BIO/16 e il Prof. Alberto Di Martino, CO-PI del progetto e professore associato nel settore MED/33.

La Dott.ssa Evangelisti ha svolto e svolge la sua attività di ricerca nell'ambito del coinvolgimento e dell'alterazione di diverse vie del segnale in diverse patologie. Inizialmente, si è focalizzata sull'individuazione di componenti di vie del segnale con un ruolo chiave nella insorgenza e nella progressione di diversi tumori come le leucemie acute e tumori ossei. In seguito, si è dedicata allo studio del ruolo svolto da differenti vie di trasduzione del segnale coinvolte in patologie come le laminopatie, le distrofie muscolari e le tendinopatie legate all'età.

Il Prof. Di Martino è dirigente medico ortopedico presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli, nonché professore associato dell'Università di Bologna. I suoi studi sono volti prevalentemente alla patologia artrosica dell'anca, con particolare riferimento ai risultati clinici degli impianti con accoppiamento ceramico nella chirurgia protesica dell'anca, a studi sui risultati a lungo termine della protesi di anca nel paziente affetto da esiti di poliomielite, e di tecniche di gestione del sanguinamento nel paziente operato di protesi di anca. È autore inoltre di studi sulle tecniche di salvataggio articolare nei pazienti affetti da necrosi avascolare della testa del femore trattata con impianti innovativi, e sulle tecniche di osteotomia nei pazienti pediatrici con esiti di epifisiolisi.

Il progetto proposto è quindi altamente interdisciplinare poiché unisce il mondo preclinico della ricerca di base col mondo clinico in modo da approfondire lo studio dei meccanismi cellulari e molecolari alla base della coxartrosi.

i) Linea di intervento A: Illustrazione dell'impatto della ricerca

L'artrosi all'anca presenta numerose implicazioni di tipo socio-economico, vista la crescente incidenza di pazienti affetti da tale patologia causata da un progressivo invecchiamento della popolazione e da errati stili di vita che ne promuovono l'insorgenza, come ad esempio il fumo, la sedentarietà e l'obesità.

I numerosi interventi di sostituzione protesica dell'anca per coxartrosi, che vengono effettuati ogni anno a livello Regionale e Nazionale, hanno un elevato costo per la spesa pubblica, rappresentando l'artrosi all'anca il 40% dei casi di artrosi in totale, ed una delle maggiori voci di spesa del Servizio Sanitario Nazionale italiano.

I possibili risultati di questo progetto potrebbero permettere di caratterizzare nuove strategie preventive o specifici biomarcatori in modo da prevenire o supportare la riabilitazione e l'ospedalizzazione del paziente operato di protesi di anca per coxartrosi, riducendo i costi connessi a cure non specifiche, e rappresentando uno step verso la medicina di precisione paziente-specifica.

Il raggiungimento degli obiettivi prefissati da questo progetto potrebbero apportare informazioni significative sulle diverse caratteristiche cellulari e molecolari tipiche del tessuto osseo e cartilagineo coinvolti nello sviluppo dell'artrosi all'anca, portando progressi di carattere preventivo, diagnostico e/o terapeutico, ed associandosi ad un rapido potenziale di traslazione nella clinica. Infatti, l'obiettivo che si prefigge questo progetto è di poter facilitare l'individuazione di indicatori predittivi utilizzabili nelle valutazioni cliniche di pazienti affetti da coxartrosi già prima di un intervento di sostituzione protesica dell'anca.

Ne consegue che l'impatto sociale ed economico potrebbe essere molto elevato, visto l'elevata percentuale di pazienti che devono operarsi di protesi all'anca e le problematiche correlate alla chirurgia di revisione nel lungo periodo. Infatti, se l'intervento di sostituzione protesica dell'anca è genericamente un intervento affidabile e associato ad un buon risultato clinico, non è possibile ad oggi prevedere quali pazienti andranno incontro ad un intervento di revisione protesica per fallimento, condizione associata ad una disabilità del

paziente e ad un rischio aumentato di complicanze nel perioperatorio. L'incremento della nostra capacità di predire il rischio di fallimento dell'impianto diviene quindi uno strumento estremamente utile in ambito clinico che può permettere al medico di informare appropriatamente il paziente sui rischi specifici del suo intervento rispetto a fattori biologici individuali, fornendo al paziente gli elementi decisionali per accettare o meno il rischio chirurgico. Inoltre, da un punto di vista economico sanitario, può permettere di guidare la pianificazione della spesa sanitaria a livello locale e regionale, per destinare puntualmente le risorse economiche richieste per la gestione del paziente a rischio.

Illustrazione dell'implementazione della ricerca (attività, work plan, ecc.), con particolare riferimento alla fattibilità e sostenibilità in relazione al finanziamento erogato

Fra le grandi articolazioni dello scheletro, l'anca è l'articolazione che viene maggiormente colpita da artrosi, in quanto maggiormente sottoposta a sollecitazioni meccaniche durante la deambulazione. Essa è formata dalla cavità acetabolare, rivestita internamente da cartilagine, che può andare incontro a degenerazione progressiva. Nella regione subcondrale, le ossa coxali possono andare incontro a sclerosi, cioè ad una condizione di ispessimento spesso irreversibile, causato da ipertrofia della matrice ossea che genera la formazione di nuovo tessuto osteoide in risposta all'alterato carico a cui esso è sottoposto nel momento in cui il processo degenerativo articolare compromette l'integrità anatomica della cartilagine. L'artrosi è una comune malattia degenerativa caratterizzata da una condizione infiammatoria di tipo cronico che coinvolge maggiormente l'anca, rappresentando circa il 10% di tutte le patologie artrosiche ad evoluzione progressiva (fig. 1).



Con questo studio, ci si propone di identificare *i)* le alterazioni morfologiche, cellulari e molecolari di materiale osseo e cartilagineo prelevato in seguito ad intervento di protesi dell'anca; *ii)* le vie di segnale coinvolte in tali alterazioni *iii)* l'attivazione di processi cellulari come apoptosi, autofagia e senescenza *iv)* il secretoma prodotto dalle cellule primarie per identificare possibili biomarcatori predittivi.

In particolar modo, in relazione agli obiettivi precedentemente citati, verranno effettuati i seguenti studi:

1. Raccolta campioni. Verranno prelevati 10 campioni di tessuto osseo e cartilagineo dalla testa del femore dal Prof. Di Martino durante interventi di sostituzione dell'anca e 10 campioni dei medesimi tessuti verranno prelevati dal collo del femore durante intervento in seguito a frattura.
2. Studio morfologico per evidenziare il livello di degenerazione del tessuto osseo e cartilagineo attraverso esperimenti di istochimica e microscopia elettronica. Su sezioni di tessuto osseo e cartilagineo, attraverso tecniche tintorie, verrà identificata il livello di degenerazione tessutale. I campioni precedentemente prelevati intraoperatoriamente dal Prof. Di Martino verranno infatti fissati e successivamente inclusi, tagliati e colorati. Dopo una prima analisi morfologica (attraverso colorazione con ematossilina-eosina), verranno effettuate colorazioni specifiche per evidenziare le alterazioni tipiche del deterioramento osseo e cartilagineo che caratterizzano l'artrosi, come ad esempio le colorazioni con Alcian blue/Hematoxylin-Orange G (ABH) e Safranin O/Fast green. Verrà poi effettuata un'analisi immunoistochimica per identificare l'alterazione dei principali targets molecolari tessuto-specifici. Verrà poi eseguiti esperimenti di microscopia elettronica per valutare l'altra struttura cellulare.
3. Sugli stessi campioni di tessuto osseo e cartilagineo prelevati, verranno effettuati studi di *cellular signaling*, andando ad analizzare l'alterazione e le possibili interazioni fra diverse vie di trasduzione del segnale, fra cui Notch, PI3K/Akt e Wnt/ β -catenina. È stato infatti precedentemente osservato che *signaling pathways*, fra cui

PI3K/Akt e Wnt/ β -catenina, interagiscono fra loro influenzando notevolmente la crescita, lo sviluppo e la degenerazione di diversi tessuti, fra cui l'osso e la cartilagine [Xu Y. *Osteoart Cart* 2012; 20: 1029-1038]. Inoltre, la deregolazione delle vie di PI3K/Akt e Wnt/ β -catenina può portare a senescenza, apoptosi, autofagia e degenerazione inducendo anche la produzione di fattori infiammatori che acuirebbero i processi degenerativi caratteristici della artrosi. Inoltre, verrà valutata l'espressione di modulatori chiave di vie del segnale che si è visto giocare un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'artrosi come ad esempio il TGF β , Wnt3, Smad3 e HIF2a [Yang X, *J Cell Biol* 2001; 153: 35–46; Zhu M, *J Bone Miner Res* 2009; 24: 12–21; Saito T, *Nat Med* 2010; 16: 678–686].

Tali studi verranno effettuati sia a livello genico (RT-qPCR) che proteico (western blot).

4. Caratterizzazione del livello di degenerazione del tessuto osseo e cartilagineo, attraverso studi di apoptosi, autofagia e senescenza in campioni di tessuto osseo e cartilagineo affetti da coxartrosi.

Per quel che riguarda l'apoptosi, verranno effettuate analisi citofluorimetriche attraverso colorazione con ioduro di propidio e analisi di Annessina V-FITC. Per analizzare l'autofagia verrà utilizzata la microscopia elettronica e l'analisi mediante western blot dei marker autofagici (LC3A/B, Beclina-1). Da notare che l'autofagia può esercitare un effetto protettivo sulle cellule e che è inibita da mTOR, componente chiave della via di PI3K/Akt. Infine, per valutare la senescenza verranno effettuati esperimenti colorimetrici per rilevare la SA-beta-GAL, marcatore tipico dell'insorgenza della senescenza.

5. Verranno infine allestite colture di cellule cartilaginee e ossee sulle quali saranno effettuate analisi d'espressione di modulatori chiave di vie del segnale e analisi quantitative della secrezione di citochine infiammatorie (secretoma). È noto che il rilascio di citochine pro- e anti-infiammatorie possa contribuire alla progressione e nella gravità di patologie degenerative infiammatorie come l'artrosi [Kapoor M et al. *Nat Rev Rheumatol* 2011; 7: 33–42] e che tali citochine possano alterare importanti *signaling pathways* [Nishimura R, *Int J Mol Sci.* 2020;21:1340; Early *JO Front Immunol.* 2021, 12:695257]. Le cellule di tessuto osseo e cartilagineo prelevate da paziente verranno opportunamente isolate e messe a crescere in terreno di coltura in modo da poter poi valutare sia le citochine prodotte (attraverso il Bio-Multiplex, uno strumento in grado di valutare la variazione di 47 citochine contemporaneamente) che l'espressione (a livello genico e proteico attraverso RT-pPCR e western blot, rispettivamente) di vari componenti delle principali vie del segnale attive in cellule di osso e cartilagine come Notch, PI3K/Akt e Wnt/ β -catenina.

PIANO DI ATTIVITÀ DI FORMAZIONE DELL'ASSEGNISTA

L'assegnista, per poter eseguire la fase sperimentale del progetto intitolato “**verso l'Identificazione dei PROcessi patologici cellulari e molecolari coinvolti nell'insorgenza e progressione della coxARTrosi**”, dovrà essere in possesso di alcune tecniche fondamentali:

- Raccolta campioni cellule e tessuto osseo e cartilagineo
- Coltura di linee cellulari e cellule primarie e loro trasduzione
- Estrazione di RNA e DNA da cellule
- Real Time PCR
- Estrazione di proteine nucleari e citoplasmatiche da cellule per analisi in Western Blotting
- Preparazione di campioni per immunofluorescenza
- Preparazione di campioni per immunistochimica
- Preparazione di campioni per analisi citofluorimetriche
- Analisi di immagine mediante software dedicati