

PROPOSTA DI UTILIZZO DELL'ANALISI DINAMICA DELLE CELLULE CARTILAGINEE (CONDROSCREEN®) NELLA DIAGNOSI DELL'ARTROSI DEL CANE: STUDIO PILOTA

ANNA MARIA PATTI, ANTONELLA VULCANO, GIOVANNI PETROCCIA^o, ANTONIO GABRIELE, CARLO DELLA ROCCA*, ALESSANDRA MARIA FROSI^o

Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica G. Sanarelli - Università di Roma La Sapienza

**Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia - Università di Roma La Sapienza*

^oMedico Veterinario, Libero Professionista in Roma

Riassunto

La possibilità di coltivare i condrociti ha permesso di mettere a punto per l'uomo un'analisi dinamica delle cellule cartilaginee (Condroscreen®) che, sfruttando l'osservazione di parametri relativi al loro comportamento in vitro, permette la diagnosi precoce di condropatia e può essere utile nella valutazione prognostica.

Scopo del presente lavoro è stato valutare l'impatto clinico del Condroscreen® sulla diagnosi dell'artrosi del cane.

Sono stati esaminati 6 campioni di cartilagine articolare prelevati da diverse articolazioni di 5 pazienti di età compresa tra 7 e 9 anni. I risultati sono stati valutati in base ad uno score e appaiati ai dati raccolti per ogni paziente.

I risultati hanno dimostrato che anche nel cane il Condroscreen®: 1) è utilizzabile nella diagnosi dell'artrosi; 2) ha valenza prognostica in quanto permette di valutare la capacità riparativa del tessuto.

Summary

In vitro cultivation of human chondrocytes has permitted to open up a new analysis (Condroscreen®) which, on the basis of dynamic observation of some parameters, allows to perform an early diagnosis of chondropathia and to make itself useful for prognosis.

The aim of this work was to verify clinical relevance of Condroscreen® in diagnosing canine arthrosis.

Six samples of articular cartilage obtained from five patients 7-9 years old were submitted to Condroscreen®. The results were scored and evaluated on the basis of patient data.

The results showed that Condroscreen® may be useful in the diagnosis of arthrosis in dogs and have prognostic relevance evaluating the possibility of tissue repair.

INTRODUZIONE

Il cane ha spesso rappresentato il modello animale per lo studio dell'artrosi dell'uomo in quanto l'evoluzione della patologia, caratterizzata inizialmente dalla degenerazione e infine dall'erosione del tessuto cartilagineo, è abbastanza simile nelle due specie.

Nell'uomo, fatta eccezione per l'artrosi secondaria a traumi, è spesso difficile distinguere la malattia dall'inevitabile e lento deterioramento dei tessuti legato all'invecchiamento. Per la comprensione della patogenesi

sarebbe quindi necessario poter seguire nel tempo i cambiamenti che si verificano a livello della cartilagine tenendo presente che si tratta di una patologia ad eziologia multifattoriale, in cui sia la predisposizione genetica, sia patologie concomitanti o squilibri metabolici hanno un peso non chiaramente definibile e che naturalmente influenzandosi a vicenda determinano modificazioni continue, difficili da rilevare e quantificare. L'esordio, non evidenziabile con l'attuale diagnostica per immagini, può essere anche molto precoce negli anni, anche se la mancanza di una sintomatologia conclamata impedisce in genere una diagnosi clinica. Spesso in giovani asintomatici l'artroscopia dell'articolazione del ginocchio evidenzia lesioni condrali, anche multiple e di grado IV¹. Sebbene le ricerche in campo genetico abbiano evidenziato alcune

¹ "Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 30/9/2003 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 11/12/2004".

mutazioni nei geni deputati alla sintesi dei componenti la matrice², queste sono piuttosto rare e non possono spiegare l'alta prevalenza della patologia in soggetti giovani in cui, d'altra parte, non si può invocare la senescenza dei tessuti come spiegazione del deterioramento della cartilagine.

Nel cane, oltre all'artrosi secondaria ad artropatie congenite e/o dello sviluppo o a traumi, si può osservare anche artrosi primaria (idiopatica) che si sviluppa spontaneamente in modo non correlato con l'età. Ciò è evidente nel Boxer, razza geneticamente predisposta allo sviluppo della spondiloartrosi deformante³. Nei cani di razza piccola (razze condrodistrofiche) a fattori costituzionali e genetici si somma uno sviluppo tissutale precoce che ha come contraccampo un sovraccarico funzionale delle articolazioni da cui può derivare instabilità, lassità legamentosa ed incongruità, prodromi funzionali di artrosi⁴.

Nel cane adulto e/o anziano l'artrosi è distinguibile con difficoltà dall'involuzione senile delle articolazioni, ove non vi sia un dato anamnestico di traumatismi (fratture, rotture legamentose) di diversa natura ed entità e comunque è praticamente impossibile risalire alla data di esordio. In ogni caso una volta innescato, il meccanismo patogenetico porta alla malattia cronica, caratterizzata da un circolo vizioso in cui la reazione delle cellule cartilaginee porta alla produzione di metalloproteasi e radicali liberi che sostengono i processi degenerativi e innescano anche la reattività sinoviale, alterando in modo sempre più pesante non solo l'omeostasi del tessuto cartilagineo ma quella dell'intero ambiente articolare⁵.

Recenti osservazioni sottolineano però che potrebbero esistere pattern diversi nell'evoluzione della degradazione della matrice e nel tentativo più accentuato di riparazione del danno nel caso dell'artrosi legata, per esempio, alla chirurgia del crociato⁶.

L'osservazione è stimolante in quanto mantenimento dello stato fisiologico della cartilagine o, viceversa, degenerazione dipendono in eguale misura dall'attività della cellula cartilaginea (condrocita) e dall'equilibrio o dalla perdita di equilibrio tra anabolismo e catabolismo⁷.

Anche nel cane comunque i primi stadi passano inosservati e la diagnosi clinica viene posta a patologia conclamata.

Si rende quindi necessario, anche in medicina veterinaria, un approccio diagnostico differente che consenta di cogliere i cambiamenti che preludono o accompagnano il danno tissutale seguendo le indicazioni che derivano dalla ricerca di base che sempre più tenta di cogliere gli aspetti sistemici di questa patologia. Per l'uomo, ed in una certa misura anche per l'animale, le ricerche si sono focalizzate sulla individuazione di marcatori urinari o sierici, in grado di evidenziare precocemente le alterazioni dell'omeostasi del tessuto cartilagineo.

I candidati markers sono molteplici e sono o marcatori del metabolismo scheletrico o dell'infiammazione⁸⁻¹⁰. Essi hanno il vantaggio di essere facilmente determinati con metodiche minimamente invasive, ma la loro specificità e soprattutto la loro capacità predittiva non è ancora del tutto soddisfacente e sembrano più utili per la monitoraggio del danno che per una diagnosi.

Se si parte dalle ipotesi 1) che l'artrosi primaria sia un disordine metabolico nel quale fattori sistemici inducono cambiamenti nei tessuti scheletrici, alterando il normale

funzionamento delle cellule che non riescono a mantenere la naturale omeostasi dell'intero tessuto e 2) che fattori biomeccanici o traumatici si possano inserire in un contesto in cui diventano il fattore scatenante della patologia, si deve allora ritenere un'alternativa valida analizzare direttamente le cellule cartilaginee. Nell'uomo, la possibilità di coltivare cellule cartilaginee da tessuto articolare di pazienti diversi ha permesso di osservare una differenza individuale del comportamento delle colture primarie di condrociti¹¹. Simili osservazioni possono essere fatte su cartilagine canina. È chiaro però che per passare dall'osservazione sull'uomo all'applicazione sul cane è necessario valutare casistiche sufficientemente ampie e rappresentative.

Scopo del presente studio, che può essere definito uno studio pilota, è stato quello di valutare la possibilità di applicare alla diagnosi dell'artrosi del cane l'analisi dinamica delle cellule cartilaginee (Condroscreen®) correlando i risultati ai dati segnaletici e clinici dei pazienti in esame e ai risultati della diagnostica per immagine, segnatamente l'artrosopia.

MATERIALI E METODI

Sono stati esaminati 6 campioni di cartilagine articolare prelevati da 5 soggetti (4 femmine ed 1 maschio): 5 prelievi sono stati effettuati durante indagine artroscopica dell'articolazione del ginocchio (di cui 2 dallo stesso soggetto, Iris, ginocchio sinistro e destro). Un campione proveniva dalla testa femorale di un soggetto sottoposto a intervento di resezione della stessa.

Per ogni paziente sono stati raccolti segnalamento e anamnesi, il sito del prelievo, la diagnosi iniziale e quella artroscopica (fatta eccezione per il cane sottoposto alla resezione femorale), il grado di condropatia, secondo una classificazione elaborata ad hoc che tiene conto delle principali classificazioni internazionali elaborate per l'uomo ed è in linea con quanto previsto dall'ICRS¹² anche se più dettagliata nel numero di livelli e sottolivelli (Fig. 1).

Il Condroscreen® è stato effettuato come da protocollo: ogni campione è stato sottoposto a digestione enzimatica liberando le cellule che sono state coltivate come già descritto¹¹. In breve, dopo 16 ore di incubazione con collagenasi, le cellule ottenute sono state inoculate in fiaschette, sottoposte ad osservazione microscopica e mantenute a 37° fino ad un massimo di trenta giorni. Il terreno è stato cambiato a giorni alterni e quotidianamente è stata effettuata l'osservazione microscopica, in modo da seguire la replicazione.

I parametri osservati ai fini della formulazione di un giudizio sulla capacità riparativa sono stati: i tempi di adesione al substrato, di inizio di proliferazione, di raggiungimento della confluenza in monostrato, la produzione di matrice ed il livello di differenziazione condrocitaria espresso dalla produzione della proteina S-100.

Adesione, replicazione e confluenza del monostrato sono parametri che permettono di valutare la capacità replicativa; produzione di matrice e proteina S-100 sono parametri che permettono di valutare la capacità riparativa. I risultati sono stati valutati in base ad uno score che tiene conto della valutazione (-, +, ++, +++) attribuita ai singoli parametri.

I risultati sono stati appaiati ai dati raccolti per ogni paziente. Per la valutazione statistica dei risultati è stato effettuato il test del χ^2 .

RISULTATI

Quattro dei soggetti esaminati erano giunti all'indagine artroscopica a causa di una zoppia grave causata dalla rottura del legamento crociato anteriore (pazienti: Minou, XX, Iris e Nero); il paziente Nuvola invece presentava displasia dell'anca accertata radiologicamente. Nel caso del cane Nero bisogna sottolineare che il paziente è stato sottoposto a visita ortopedica per un trauma acuto al ginocchio destro con conseguente rottura del legamento crociato anteriore; il soggetto presentava altresì un'anamnesi positiva per displasia dell'anca confermata con reperto radiografico. Nella Tabella 1 vengono riportati i profili dei pazienti ed i risultati dell'analisi. I cani erano quattro femmine ovario-isterectomizzate ed un maschio, di età compresa tra 7 e 9 anni. Gli esami ematochimici non presentavano alterazioni di rilievo mentre l'esame del liquido sinoviale presentava un alterato rapporto di glucosio liquido sinoviale/siero nei cani Iris e Nero.

Il sito del prelievo era il margine cartilagineo laterale del solco trocleare (superficie non di carico) del ginocchio in-

to



Tabella 1
Dati segnaletici, clinico-artroscopici e risultati dell'analisi dinamica delle cellule cartilaginee (Condroscreen®)
effettuata su 5 pazienti con diverso grado di condropatia

<i>codice</i>	minou	xx	nuvola	iris	nero
<i>razza</i>	yorkscire terrier	meticcica	meticcica	rottweiler	meticcica
<i>età</i>	nove	sette	sette	nove	sette
<i>sexso</i>	femmina	femmina	femmina	femmina	maschio
<i>interv. pregressi</i>	ovar-isterectomizzata	ovar-isterectomizzata	ovar-isterectomizzata	ovar-isterectomizzata	
<i>tipo alimentazione</i>	corretta casalinga	corretta casalinga	corretta casalinga	commerciale	corretta casalinga
<i>peso</i>	normopeso	normopeso	normopeso	obesa	normopeso
<i>esami ematochimici</i>	nella norma	nella norma	nella norma	nella norma	nella norma
<i>manif. clinica</i>	zoppia + algia	zoppia + algia	zoppia	zoppia+algia bilaterale gin	zoppia + algia
<i>diagnosi iniziale</i>	sospetta rottura legamento crociato	sospetta rottura legamento crociato	displasia anca	sospetta rottura legamento crociato	sospetta rottura legamento crociato
<i>esame liq. sinoviale</i>	–	–	–	alterato glucosio ls/s°	alterato glucosio ls/s°
<i>diagnosi artroscopica</i>	rottura legamento crociato	rottura legamento crociato	displasia anca	rottura legamento crociato	rottura legamento crociato
<i>sede prelievo</i>	ginocchio dx	ginocchio dx*	testa femorale	ginocchio dx - sn	ginocchio dx
<i>condropatia[§]</i>	5C	1B	1A	3D sia dx che sn	4C
<i>cristalli</i>	–	–	cristalli di calcio	cristalli di calcio	cristalli di calcio
Condroscreen®					
<i>capacità replicativa</i>	parzialmente mantenuta	presente	presente	presente a dx e sn	assente
<i>capacità riparativa[#]</i>	assente*	presente	presente	presente a dx e sn	assente

*segni precoci di degenerazione della cartilagine.

°ls/s = liquido sinoviale/siero.

la capacità riparativa non correla con il grado di condropatia ($p>0.05$).

§ livello di condropatia stabilito durante l'artroscopia; per il cane Nuvola valutazione macroscopica durante l'intervento di resezione della testa femorale.

teressato alla ricostruzione del legamento crociato, fatta eccezione per il cane Nuvola, in cui la resezione della testa femorale ha permesso di ottenere un campione di cartilagine dalla zona meglio conservata all'esame macroscopico.

Il grado di condropatia variava da 1A a 5C; in 3 campioni erano presenti cristalli.

La capacità replicativa della cartilagine in esame era più o meno presente in tutti i campioni ad eccezione del cane meticcio Nero; la capacità riparativa era presente solo in 3/6 campioni.

Nella valutazione della capacità riparativa si è tenuto conto dello score ottenuto dalla valutazione dei singoli parametri in modo da distinguere una residua capacità replicativa delle cellule in coltura (Fig. 2) dalla capacità di formare un monostrato o addirittura una complessa struttura simil-tessuto con elementi cellulari differenziati (Fig. 3). Quest'ultima proprietà è stata definita capacità riparativa. La capacità riparativa non correlava né con l'età né con il grado di condropatia ($p>0.05$).

DISCUSSIONE

Lo sviluppo delle scienze di base ha consentito di mettere in evidenza che le lesioni della cartilagine possono dipendere da alterazioni di uno o più componenti la matrice, come anche da un'alterazione degli stessi condrociti. Se le cause che hanno comportato una lesione non hanno coinvolto le cellule del tessuto cartilagineo, esse possono replicare e sintetizzare nuova matrice con il risultato di una riparazione della lesione con cartilagine ialina di neoforma-

zione o almeno, nei casi meno fortunati, di fibrocartilagine comunque funzionalmente utile. Ne deriva una interpretazione della patologia cartilaginea di ampio respiro che tiene presente il complicato e ancora poco chiarito rapporto tra i vari fattori di rischio. In ogni caso, al centro di un approccio diagnostico diverso bisogna mettere la cellula cartilaginea e desumere dalle sue potenzialità, correlate all'anamnesi del paziente, lo stato del tessuto e l'evoluzione in positivo o in negativo nei confronti di una lesione.

Su questo presupposto si è basata la messa a punto del Condroscreen®. I risultati ottenuti nel presente studio dimostrano la corretta impostazione di questa filosofia diagnostica.

A nostro parere i punti di discussione riguardano fondamentalmente:

- l'età, fattore di rischio non modificabile in quanto il progressivo invecchiamento dei tessuti comporta un deterioramento lento ma inesorabile. È ovvio che il potenziale replicativo delle cellule di tutti i tessuti e, nello specifico, del tessuto cartilagineo diminuisca passando dall'infanzia alle età più avanzate. Tuttavia un potenziale replicativo viene mantenuto anche dai soggetti più anziani. Per quel che riguarda però la capacità di riparare un danno cartilagineo importa sì la capacità di replicazione delle cellule, ma è importante soprattutto la loro capacità di differenziarsi, di produrre i componenti della matrice, di riformare in ultima analisi cartilagine ialina con caratteristiche normali. E questo non necessariamente va di pari passo con l'età. I risultati del presente studio dimostrano che cani all'incirca della stessa età e con una patologia appa-

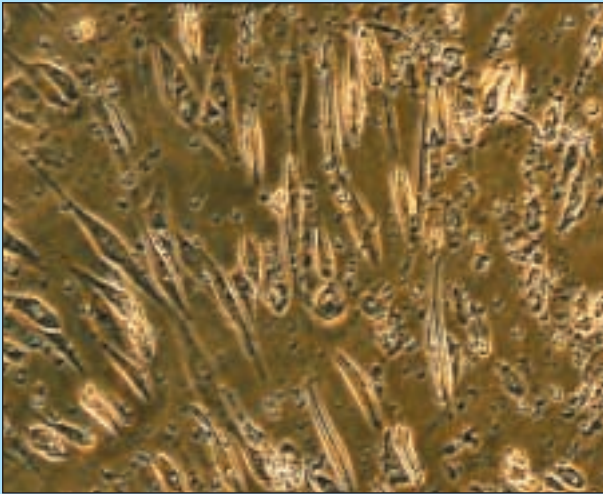


Figura 2A

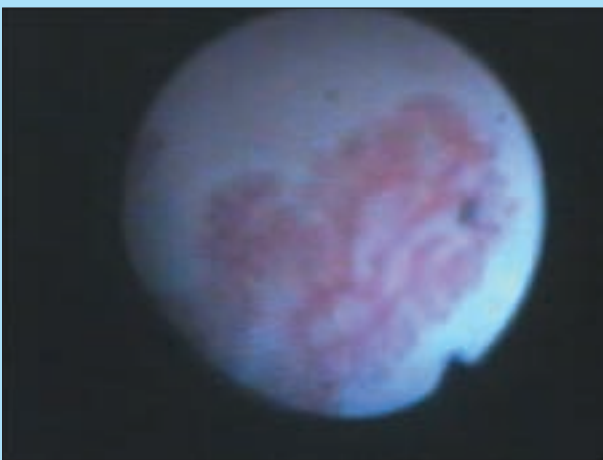


Figura 2B

FIGURA 2 - Cellule cartilaginee provenienti dal campione di tessuto del cane Minou: la capacità replicativa è parzialmente mantenuta ma è assente la capacità riparativa (A); si nota in B la grave erosione del tessuto cartilagineo (grado VC).

rentemente simile (rottura del legamento crociato) presentano differente capacità replicativa e soprattutto riparativa;

- b) capacità riparativa: se si considera che sulla patologia cartilaginea insistono fattori genetici, metabolici, oltre naturalmente ai fattori biomeccanici, si comprende come difficilmente a priori possa essere valutata la capacità di riparazione di un danno. Infatti la valutazione statistica dei risultati ottenuti dimostra che la capacità riparativa non correla con l'età né con il grado di patologia cartilaginea macroscopicamente rilevato. Questo a testimonianza che la capacità riparativa è caratteristica individuale del singolo paziente. In termini pratici ciò vuol dire che nella valutazione della condropatia artrosica bisogna prendere in considerazione dati clinici e anamnestici che consentano di valutare il rischio che il paziente ha di sviluppare una condropatia grave.

Per quel che riguarda l'analisi proposta, la sua utilità diventa evidente ove si consideri il dato aggiuntivo della capacità riparativa della lesione cartilaginea, dato questo che non può essere valutato in nessun altro modo, nep-

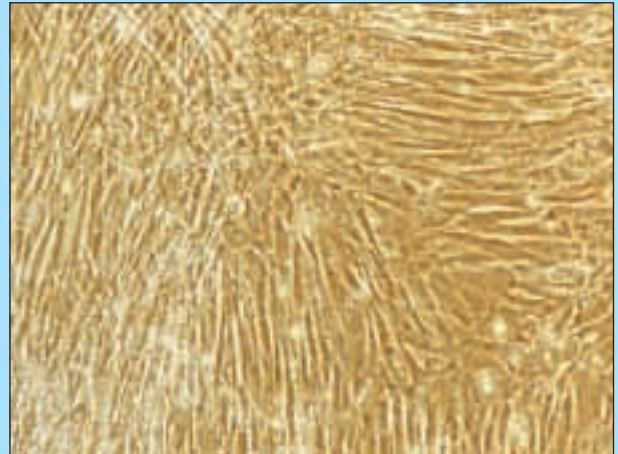


Figura 3A



Figura 3B

FIGURA 3 - Cellule cartilaginee con buona capacità replicativa e riparativa provenienti dal campione prelevato dal cane Iris. Le cellule riacquistano in vitro una morfologia condrocita-simile ed esprimono i determinanti tipici (A); in B condropatia di grado IIID.

pure con l'artroscopia che permette solo una valutazione macroscopica. L'osservazione del comportamento delle cellule in vitro, in particolare della capacità di produrre matrice e di differenziarsi, fornisce indicazioni preziose che possono fare dell'analisi dinamica delle cellule cartilaginee uno strumento di diagnosi precoce.

CONCLUSIONI

I risultati del presente studio, sebbene limitato a pochi casi, indicano che le analogie tra la patologia umana e quella del cane permettono di applicare senza modifiche l'analisi dinamica delle cellule cartilaginee come strumento di diagnosi, anche precoce. Inoltre, sembra chiara anche una certa valenza prognostica della metodica e, soprattutto, la sua capacità di rappresentare lo stato generale delle cartilagini del soggetto, sebbene per la conferma di questi ultimi dati sia auspicabile un aumento mirato della casistica da ottenere anche tramite protocolli multicentrici. Solo uno studio di ampia portata potrà, infatti, validare questi risultati preliminari.

Parole chiave

Cane, artrosi, cellule cartilaginee.

Key words

Dog, osteoarthritis, chondrocytes.

Bibliografia

1. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG. Cartilage injuries: a review of 31, 516 knee arthroscopies. *Arthroscopy*; 13(4):456-60, 1997.
2. Baldwin CT, Cupples LA, Joost O, Demissie S, Chaisson C, Mcalindon T, Myers RH, Felson D. Absence of linkage or association for osteoarthritis with the vitamin D receptor/type II collagen locus: the Framingham Osteoarthritis Study. *Rheumatol* 29(1):161-5, 2002.
3. Mortellaro C. M. Dall'età dello sviluppo all'articolazione anziana: inquadramento clinico. *Innovation in Veterinary Medicine* 1(4)Mar 2001 - International symposium on Canine Osteoarthritis.
4. Miolo A: Artrosi nel cane di piccola taglia: nuove opzioni di trattamento. Pre congress SITOV - Congresso Nazionale AIVPA 27-10 - 2000.
5. Miolo A, Mortellaro CM: Artrosi del cane e stress ossidativo-infiammatorio: dalla clinica al meccanismo. *Veterinaria*, 17(1):17-33, 2003.
6. Wenhua L, Burton-Wurster N, Glant TT, Tashman S, Sumner DR, Rajesh VK, Lust G, Rimura JH, Cs-Szabo G: Spontaneous and experimental osteoarthritis in dog: similarities and differences in proteoglycan levels. *J Orthopaedic research* 21:730-737, 2003.
7. Goldring MB: The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 43(9):1916-1926, 2000.
8. Christgau S, Garnero P, Fledelius C, Moniz C, Ensig M, Gineyts E, Rosenquist C, Qvist P. Collagen type II C-telopeptide fragments as an index of cartilage degradation. *Bone* 2001 Sep; 29(3):209-15.
9. Garnero P, Piperno M, Gineyts E, Christgau S, Delmas PD, Vignon E. Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. *Ann Rheum Dis* 2001; 60(6):619-26.
10. Young-Min SA, Cawston TE, Griffiths ID. Markers of joint destruction: principles, problems, and potential. *Ann Rheum Dis* 2001; 60(6):545-8.
11. Patti AM, Gabriele A, Della Rocca C. Human chondrocyte cell lines from articular cartilage of metatarsal phalangeal joints. *Tissue Cell*. 1999; 31(6):550-4.
12. ICRS Cartilage Injury Evaluation Package. www.cartilage.org; 18/09/02.

VETLINK
Lista telematica
A.N.M.V.I.

collegati con la tua professione
per iscriverti
<http://www.anmvi.it/servizi/liste/index.html>