

Deep In



**OSTEOARTICOLARE**



# Unsulfated biotechnological chondroitin by itself as well as in combination with high molecular weight hyaluronan improves the inflammation profile in osteoarthritis in vitro model

La condroitina biotecnologica non solfata da sola e in combinazione con hyaluronan ad alto peso molecolare migliora il profilo infiammatorio in modelli *in vitro* di osteoartrosi

## *Gli autori*

Valentina Vassallo, Antonietta Stellavato, Donatella Cimini, Anna V. A. Pirozzi, Alberto Alfano, Marcella Cammarota, Giovanni Balato, Alessio D'Addona, Carlo Ruosi, Chiara Schiraldi

Pubblicato in *J Cell Biochem.* 2021 May 31;1-16.

# Background 1/4



- ▶ Diversi studi suggeriscono che **l'infiammazione riveste un ruolo fondamentale** durante la progressione dell'**osteoartrosi (OA)**, identificando nelle **citochine** i principali **mediatori di processo (figura 1)**.
- ▶ Nel corso dell'OA, la **membrana sinoviale influenza il metabolismo della cartilagine riducendo la produzione di glicosaminoglicani (GAGs)** da parte dei condrociti.
- ▶ **Condrociti e sinoviociti** producono **citochine**, mediatori biologici che giocano un ruolo chiave nella **progressione dell'infiammazione**.
- ▶ In aggiunta, **l'infiammazione sinoviale** è stata recentemente associata all'attivazione di **eventi flogistici e catabolici** che, nella cartilagine articolare, portano **all'attivazione dei recettori toll-like (TLR)** espressi sui condrociti.

# Background 2/4

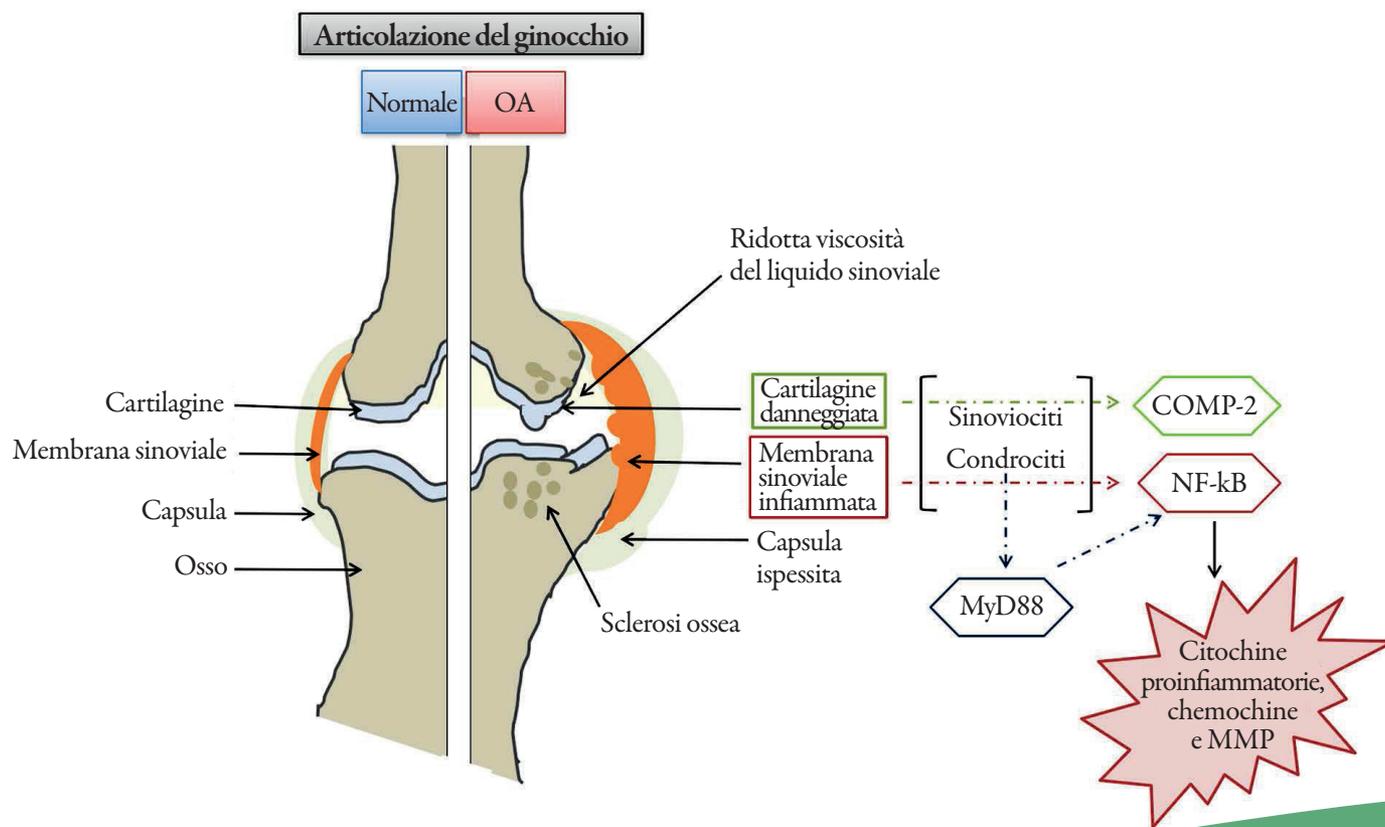


- ▶ I recettori TLR-2 e 4 attivati favoriscono l'espressione genica di fattori catabolici (ad esempio, MMP-13) e promuovono il signaling del fattore di trascrizione nucleare NF- $\kappa$ B attraverso l'adattatore citosolico **fattore di differenziazione mieloide 88 (MyD88)**.
- ▶ Un altro ruolo importante nella cartilagine articolare è giocato dalla **proteina della matrice oligomerica della cartilagine (COMP)**, che **fornisce supporto alle fibre di collagene di tipo II**, stabilizzandone i legami.
- ▶ L'elevata **produzione** di questa proteina è **associata a condizioni degenerative, ma anche a eventi riparativi della cartilagine articolare dopo un danno**. COMP è sintetizzata dai condrociti e dai sinoviociti.

# Background 3/4



**Figura 1.** Rappresentazione schematica del processo degenerativo articolare esplorato ed evidenziazione dei biomarcatori selezionati analizzati.



# Background 4/4



- ▶ Il **condroitin solfato (CS)** è un **polisaccaride lineare anionico**, ampiamente diffuso nel trattamento dell'OA del ginocchio, dell'anca e della mano, costituito da unità disaccaridiche ripetitive di **N-acetil-D-galattosammina** e **acido D-glucuronico**.
- ▶ La **tipologia di solfatazione**, che riflette le differenti origini di provenienza animale del CS, **dipende dalla qualità della materia prima**, in quanto il peso molecolare (PM) e il grado di purezza ne influenzano gli effetti biologici, tra cui la capacità di promuovere la riparazione delle ferite, di sostenere la proliferazione cellulare e l'attività antinfiammatoria.
- ▶ I processi di purificazione del CS potrebbero pertanto indirizzare la progressione della patologia dell'OA verso una inibizione o, al contrario, verso una stimolazione dei fenomeni catabolici a livello della cartilagine, con un impatto variabile sulla sintesi di collagene di tipo II.
- ▶ La **condroitina non solfata** o **condroitina biotecnologica (BC)** si è rivelata in studi condotti su modelli *in vitro* di condrociti nasali umani superiore al CS per l'**attività antinfiammatoria**, per gli effetti **favorevoli** sul **tasso di proliferazione dei condrociti** e per il **mantenimento del fenotipo condrocitario** in termini di dimensioni cellulari e dell'espressione del collagene di tipo II.
- ▶ In aggiunta, le indagini sul profilo dei secretomi **hanno mostrato per la BC un'attività antinfiammatoria più pronunciata rispetto al CS** in modelli *in vitro* di sinoviociti umani, aprendo la strada a ricerche future volte a svelare la **potenziale efficacia della BC nel contrastare i processi patologici correlati all'OA**.

# Obiettivi dello studio



- 
- ▶ Indagare e confrontare, nei modelli *in vitro* di condrociti e sinoviociti primari isolati da cartilagine danneggiata di pazienti con OA, la **capacità di modulazione dei principali biomarker infiammatori di un nuovo dispositivo in gel** costituito da complessi ibridi di acido ialuronico ad alto peso e condroitina non solfata (H-HA/BC), rispetto al solo trattamento con H-HA e BC.

# Materiali e metodi



- ▶ Le colture di condrociti e sinoviociti primari isolati da campioni di cartilagine proveniente dalle ginocchia di 3 pazienti sottoposti a chirurgia sostitutiva sono state incubate per 48 ore o 8 ore con 3,2 mg/ml di ciascuno dei seguenti preparati, rispettivamente:
  - H-HA (Shyalt, Altergon Srl), acido ialuronico ad alto PM ( $1400 \pm 200$  KDa) biofermentativo, derivato da *Streptococcus equi* ssp, di grado farmaceutico;
  - BC: condroitina sodica ottenuta per biofermentazione da ceppo ricombinante di *E. coli* (EcK4r3);
  - H-HA/BC complessi ibridi di acido ialuronico ad alto PM con BC ottenuti attraverso un processo termochimico brevettato.
- ▶ Per la valutazione dell'attività antinfiammatoria *in vitro* è stata eseguita un'analisi Western Blot (WB) sui campioni dopo l'esposizione a ciascun trattamento, misurando i livelli di NF-kB, COMP-2, MyD88, MMP-13 attraverso densitometria ottica.
- ▶ Tramite Bio-Plex Assay era prevista l'analisi del profilo di un ampio intervallo di citochine individuate come biomarcatori specifici dell'OA (IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ ) nel liquido sinoviale di 5 pazienti affetti da OA, in un'indagine comparativa di 27 mediatori biologici *vs* controlli non patologici (**tabella 1**).
- ▶ Per lo studio della morfologia e della proliferazione cellulare di sinoviociti e condrociti è stata utilizzata la tecnica video-microscopia time-lapse.
- ▶ Infine, è stata condotta anche un'analisi istologica sui campioni di cartilagine danneggiata e su quella collaterale non danneggiata prelevati da 2 pazienti e impiegati, rispettivamente, nelle analisi comparative come riferimento per il controllo patologico (p-CTRL) e per quello sano (h-CTRL) (**figura 2**).

# Risultati 1/12



## Caratterizzazione del liquido sinoviale dei pazienti con OA (Bio-Plex Assay)

Come si evince dalla **tabella 1**, nei campioni di liquido sinoviale dei pazienti affetti da OA è stato riscontrato un incremento dei principali mediatori proinfiammatori, in particolare IL-6, IL-8, IL-15 e IL-17.

(A) Citochine pro-infiammatorie (pg/ml)	Campioni sani	Campioni OA
IL-1 $\beta$	1 $\pm$ 2*	25 $\pm$ 2.42
IL-1Ra	0 $\pm$ 6.9 <sup>^</sup>	25.5 $\pm$ 2.12
IL-2	0 $\S$	35 $\pm$ 2.82
IL-5	0*	7 $\pm$ 0.70
IL-6	64 $\pm$ 120*	2008.8 $\pm$ 160.86
IL-7	0 $\S$	19 $\pm$ 0.80
IL-9	0*	76.3 $\pm$ 2.47
IL-12 p70	4.8 $\pm$ 1.7 <sup>^</sup>	147 $\pm$ 19.79
IL-13	1 $\pm$ 2*	21.5 $\pm$ 0.70
IL-15	9.9 $\pm$ 6.6 <sup>^</sup>	123.8 $\pm$ 8.13
IL-17	0**	144.5 $\pm$ 9.19
INF- $\gamma$	47 $\pm$ 17*	17.5 $\pm$ 0.79
TNF- $\alpha$	0*	25 $\pm$ 0.24
(B) Citochine anti-infiammatorie (pg/ml)	Campioni sani	Campioni OA
IL-4	0*	17 $\pm$ 1.41
IL-10	1 $\pm$ 6*	51.8 $\pm$ 2.47

(C) Chemochine (pg/ml)	Campioni sani	Campioni OA
IL-8	25 $\pm$ 29*	162 $\pm$ 5.65
Eotaxin	14.6 $\pm$ 39.6 <sup>^</sup>	74.3 $\pm$ 1.06
IP-10	302.1 $\pm$ 280.8 <sup>^</sup>	862.5 $\pm$ 16.26
MCAF	4.8 $\pm$ 0 <sup>^</sup>	41.5 $\pm$ 1.12
MIP-1a	5.2 $\pm$ 0.4 <sup>^</sup>	41.5 $\pm$ 2.12
MIP-1b	9.6 $\pm$ 2.4 <sup>^</sup>	170.5 $\pm$ 2.12
RANTES	15.6 $\pm$ 28.1 <sup>^</sup>	86.5 $\pm$ 10.60
(D) Fattori di crescita (pg/ml)	Campioni sani	Campioni OA
G-CSF	34.8 $\pm$ 1.51 <sup>^</sup>	25.3 $\pm$ 1.06
GM-CSF	0 $\S$	83 $\pm$ 4.24
FGFbasic	37.2 $\pm$ 70.4 <sup>^</sup>	30 $\pm$ 1.41
PDGF-bb	43.2 $\pm$ 42.9 <sup>^</sup>	17.3 $\pm$ 0.35
VEGF	19 $\pm$ 11*	757.8 $\pm$ 34.29

**Tabella 1.** Bio-Plex Assay: valutazione comparativa dei 27 mediatori biologici presenti nel liquido sinoviale di cinque pazienti affetti da OA *vs* campioni sani. I valori medi per ciascun mediatore ricercato nei campioni OA sono espressi in pg/ml. I valori dei mediatori dei campioni sani sono stati estrapolati dalla letteratura [1-4]. *Abbreviazioni:* IL = interleuchina; INF = interferone; MCAF = fattore chemiotattico e attivante i monociti; TNF- $\alpha$  = fattore di necrosi tumorale  $\alpha$ .

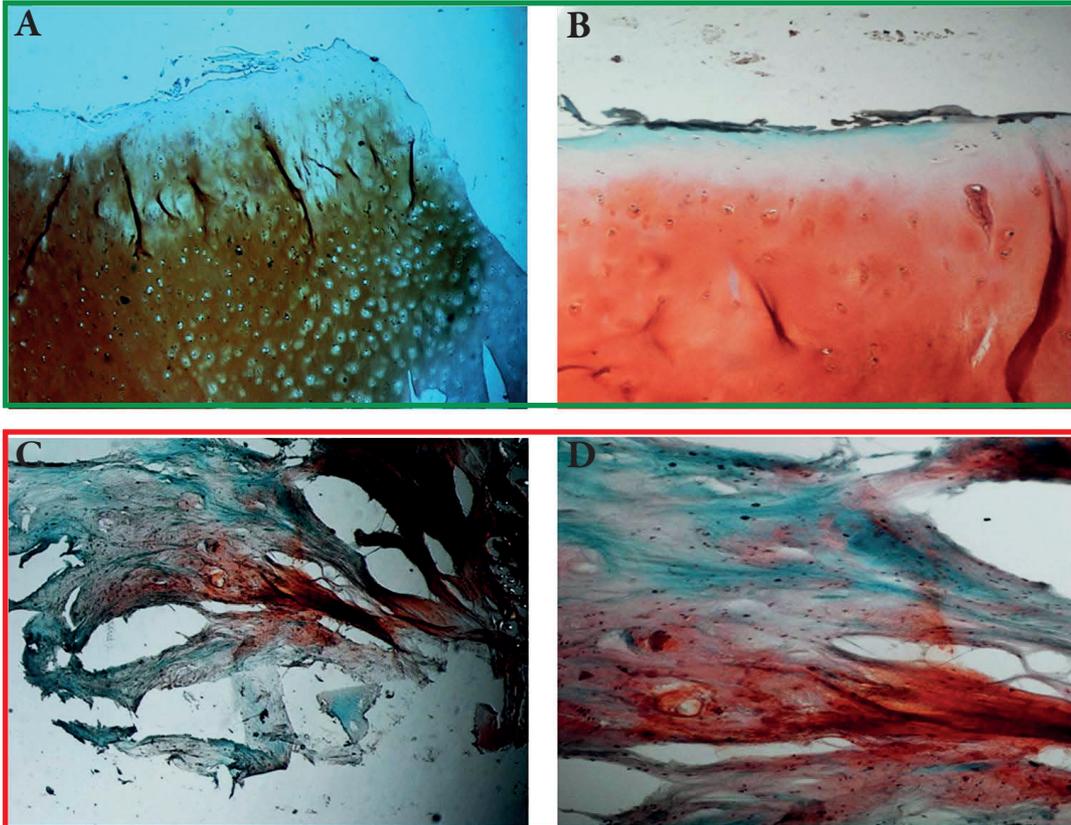
[1] \* Tsuchida AI, Beekhuizen M, 't Hart MC *et al.* Cytokine profiles in the joint depend on pathology, but are different between synovial fluid, cartilage tissue and cultured chondrocytes. Arthritis Res Ther. 2014 Sep 26;16(5):441.

[2] \*\* Chen B, Deng Y, Tan Y, Qin J, Chen LB. Association between severity of knee osteoarthritis and serum and synovial fluid interleukin 17 concentrations. J Int Med Res. 2014 Feb;42(1):138-44.

[3]  $\S$  Teunis T, Beekhuizen M, Kon M, Creemers LB, Schuurman AH, van Minnen LP. Inflammatory mediators in posttraumatic radiocarpal osteoarthritis. J Hand Surg Am. 2013 Sep;38(9):1735-1740.

[4] <sup>^</sup> Beekhuizen M, Gierman LM, van Spil WE *et al.* An explorative study comparing levels of soluble mediators in control and osteoarthritic synovial fluid. Osteoarthritis Cartilage. 2013 Jul;21(7):918-22.

# Risultati 2/12



**Figura 2.** Analisi istologica: valutazione microscopica con quantificazione dei GAGs tramite Safranin O/ Fast Green. I pannelli inferiori C e D sono relativi alle sezioni di cartilagine maggiormente danneggiata (**p-CTRL**), che presentano una colorazione poco intensa, a conferma del minor contenuto in proteoglicani, e discontinuità nella zona superficiale. Al contrario, nei pannelli A e B le sezioni di cartilagine articolare, presentando una colorazione rossa/arancio più intensa, sono meno danneggiate e mostrano una superficie intatta della cartilagine collaterale (**h-CTRL**), con alcuni raggruppamenti cellulari apprezzabili. Ingrandimento sezioni osservate al microscopio: x 4 (A e C), x 10 (B, D).

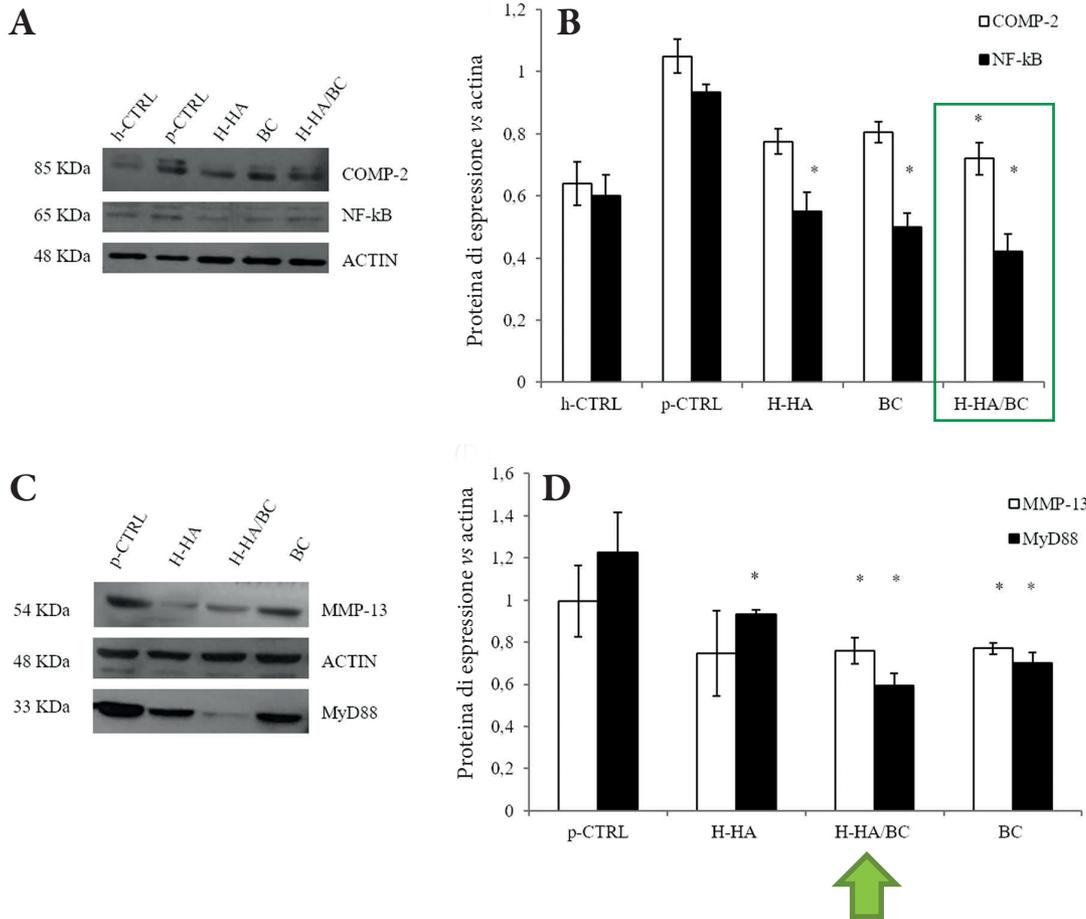
# Risultati 3/12



## *Espressione proteica sui condrociti OA umani (analisi WB)*

- ▶ L'analisi WB ha evidenziato livelli significativamente più elevati ( $p < 0,05$ ) di espressione dei mediatori NF-kB e COMP-2 in p-CTRL rispetto a h-CTRL (**figure 3A e 3B**).
- ▶ Dopo 48 ore di esposizione, i livelli di espressione di NF-kB, marcatore chiave dell'infiammazione, si sono significativamente ridotti, rispettivamente di 1,72 e 1,86 volte con H-HA e BC rispetto a p-CTRL (**figura 3B**).
- ▶ Analogamente, l'espressione proteica di COMP-2 è stata significativamente ridotta, rispettivamente di 1,36 e 1,31 volte con H-HA e BC rispetto a p-CTRL (**figura 3B**).
- ▶ Il complesso ibrido H-HA/BC ha mostrato un effetto antinfiammatorio più pronunciato rispetto a quello registrato con i singoli componenti, **riducendo il livello di espressione di NF-kB di 2,21 volte rispetto a p-CTRL e quello di COMP-2 di 1,45 volte (figura 3B)**.
- ▶ Tutti i trattamenti hanno ridotto i livelli proteici di espressione di MyD88 e MMP-13 rispetto a p-CTRL, con una **maggiore riduzione** registrata con i complessi ibridi H-HA/BC (**figure 3C e 3D**).

# Risultati 4/12



**Figura 3.** Analisi WB dei livelli di COMP-2, NF-kB, MMP-13 e MyD88 nei condrociti articolari primari trattati per 48 ore con H-HA, BC e H-HA/BC 0,32% p/v.

- A. Bande WB specifiche per COMP-2, NF-kB e actina (normalizzatore) di campioni h-CTRL, p-CTRL, e dopo esposizione a H-HA, BC e H-HA/BC.
- B. Analisi densitometrica normalizzata verso actina delle bande A, per quantificare i livelli di espressione di COMP-2 e NF-kB.
- C. Bande WB specifiche per MMP-13, MyD88 e actina (normalizzatore) di campioni p-CTRL e dopo esposizione a H-HA, BC e h-HA/BC.
- D. Analisi densitometrica normalizzata verso actina delle bande C, per quantificare i livelli di espressione di MMP-13 e MyD88.

\*=p<0,05.

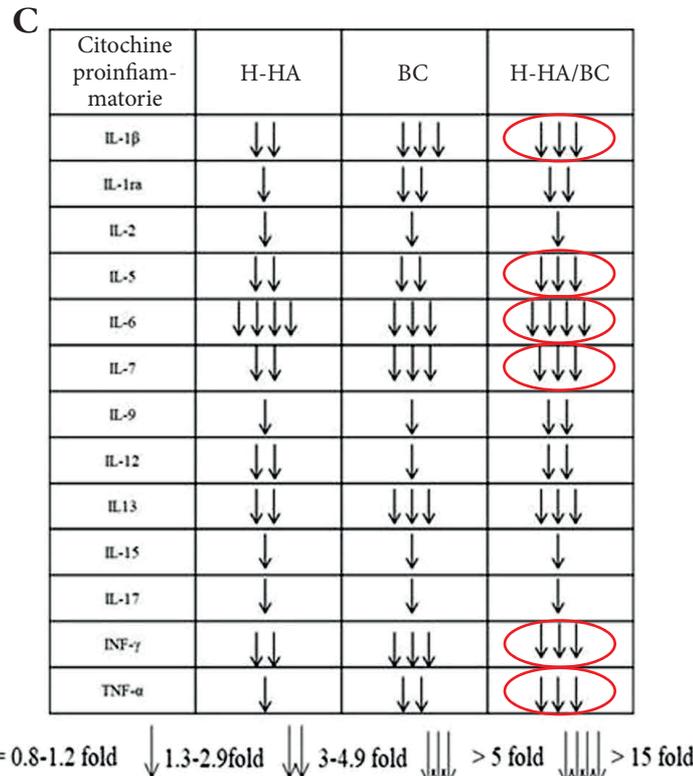
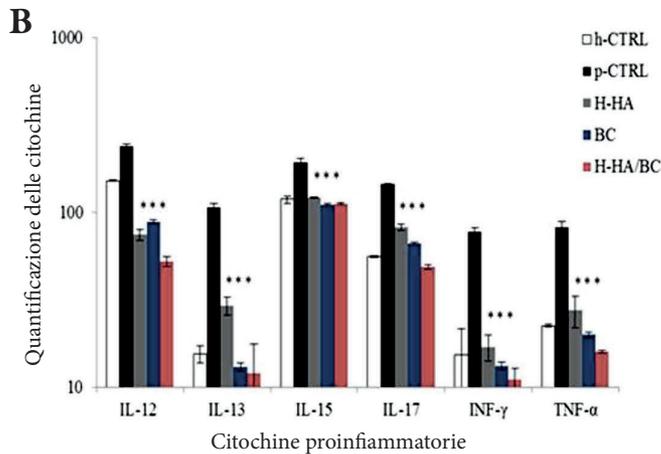
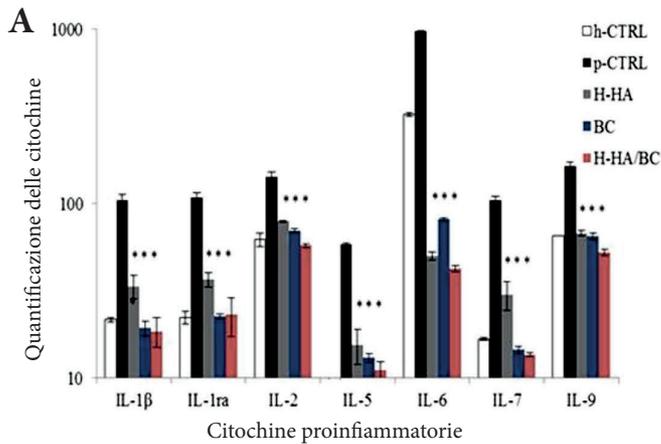
# Risultati 5/12



## *Modulazione dei mediatori biologici nei condrociti OA umani (Bio-Plex Assay)*

- ▶ Complessivamente, per ciascun trattamento sono state rilevate modulazioni negative delle citochine proinfiammatorie di almeno il 30% in meno rispetto al controllo p-CTRL, con significatività statistica all'analisi t-test ( $p < 0,05$ ).
- ▶ BC si è rivelata superiore a H-HA nella downregolazione di tutti i biomarcatori flogistici, ad eccezione di IL-6 e IL-12, per le quali entrambi i trattamenti hanno mostrato un effetto paragonabile (**figura 4**).
- ▶ Il complesso ibrido H-HA/BC si è rivelato superiore nel ridurre IL-6, IL-7, INF- $\gamma$ , IL1 $\beta$ , IL-5, e TNF- $\alpha$ , con una diminuzione, rispettivamente, di ~23; 7,6; 7; 5,7; 5,3 e 5,12 volte rispetto al controllo p-CTRL.
- ▶ In analogia a BC, il complesso ibrido H-HA/BC ha ridotto il livello di espressione delle citochine IL-4 e IL-10 rispetto a p-CTRL, con livelli paragonabili a quelli del controllo sano h-CTRL; inoltre, si è rivelato più efficiente nel ridurre i livelli di chemochine – in particolare IL-8 e MCAF (rispettivamente di ~9 e 22 volte inferiori rispetto a p-CTRL) – e tutti i fattori di crescita analizzati (**figura 5**).

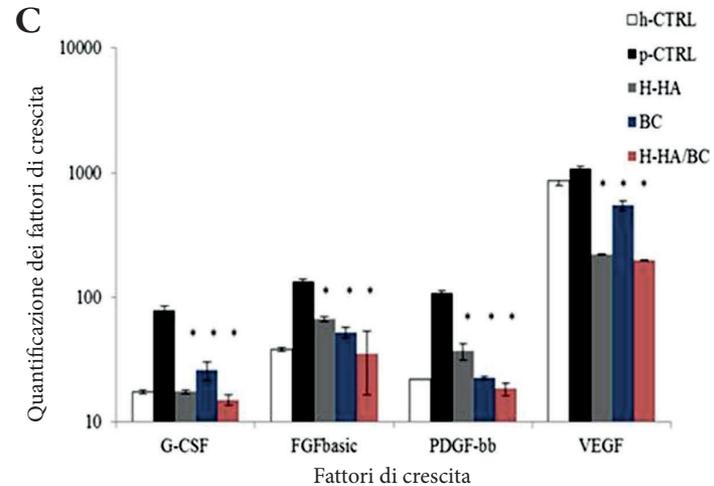
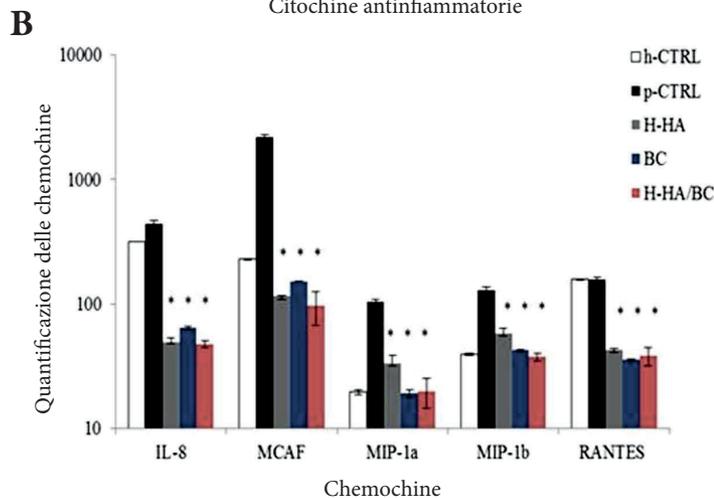
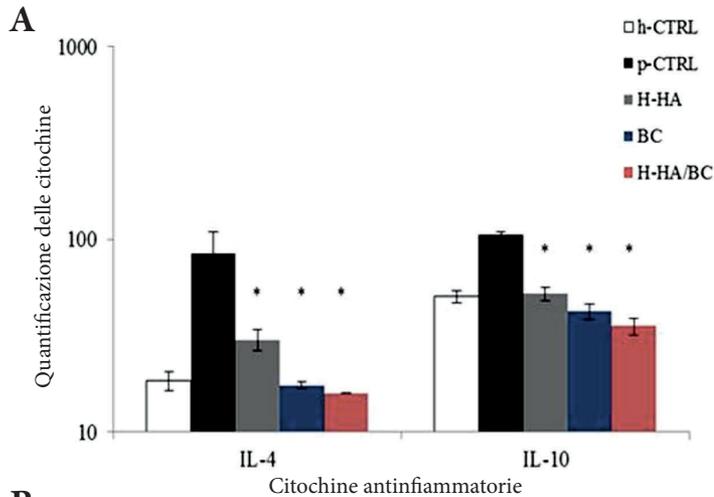
# Risultati 6/12



**Figura 4.** Bio-Plex Assay: valutazione della modulazione dei mediatori biologici nel surnatante (pg/ml) di condrociti trattati per 48 ore con H-HA, BC e H-HA/BC 0,32% p/v. I grafici A e B illustrano gli effetti di ciascun trattamento sui livelli misurati di citochine proinfiammatorie [Log(pg/ml)]. La tabella C mostra modulazioni negative di almeno il 30% in meno rispetto a p-CTRL per ciascun trattamento.

\* con significatività statistica all'analisi t-test ( $p < 0,05$ ).

# Risultati 7/12



**Figura 5. Bio-Plex Assay.**

A. Effetti di ciascun trattamento sui livelli misurati delle citochine antinfiammatorie [Log(pg/ml)].

B. Effetti di ciascun trattamento sui livelli misurati delle chemochine [Log(pg/ml)].

C. Effetti di ciascun trattamento sui livelli misurati dei fattori di crescita [Log(pg/ml)].

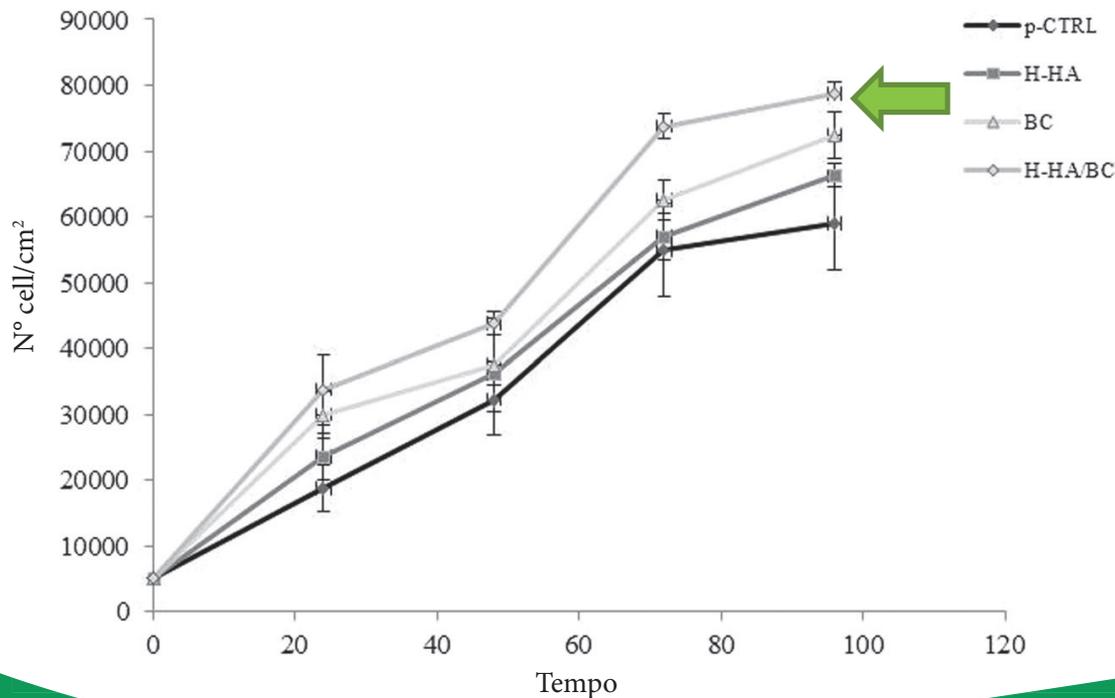
\* con significatività statistica all'analisi t-test ( $p < 0,05$ ) rispetto a p-CTRL.

# Risultati 8/12



## Test di proliferazione dei sinoviociti umani

- ▶ H-HA/BC e BC si sono rivelati entrambi attivi nel promuovere *in vitro* la proliferazione cellulare dopo 24 ore di esposizione, **con un trend a favore del complesso ibrido**.
- ▶ Le curve di crescita rivelano, **dopo 96 ore, un aumento della densità cellulare di circa  $73 \pm 6\%$  rispetto al basale** nel caso di esposizione a H-HA/BC, di  $61 \pm 4\%$  nel caso di H-HA e di  $67 \pm 3\%$  nel caso di BC (**figura 6**).



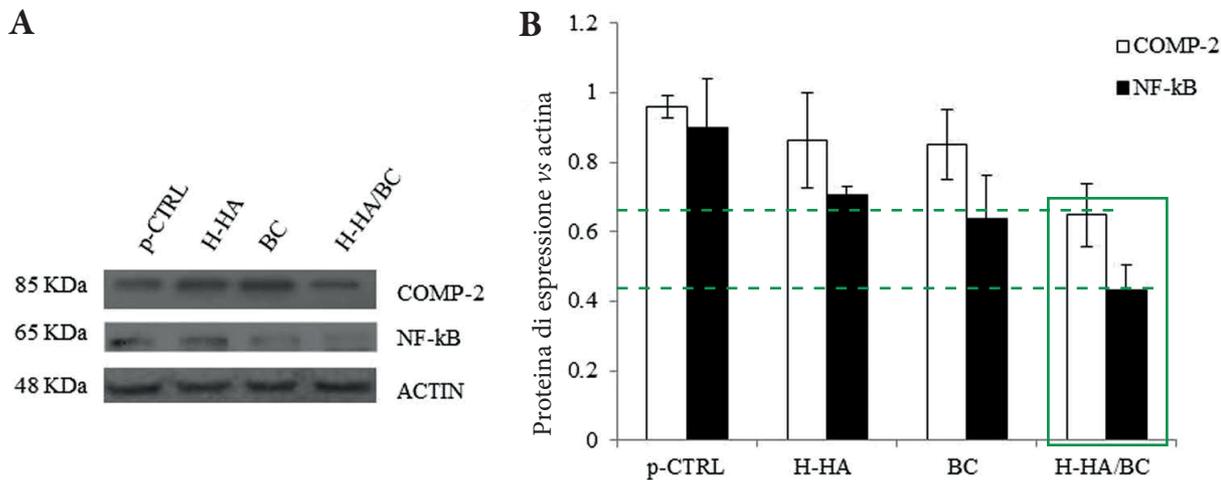
**Figura 6.** Curve di crescita cellulare del test di proliferazione condotto sui sinoviociti umani.

# Risultati 9/12



## Espressione proteica sui sinoviociti OA umani (analisi WB)

- ▶ Il complesso ibrido H-HA/BC ha mostrato anche sui sinoviociti OA un effetto più pronunciato rispetto a quello dei singoli componenti, **riducendo**, dopo 48 ore di esposizione, **il livello di espressione di NF-kB di 2 volte rispetto a p-CTRL** e quello di **COMP-2 di 1,48 volte** (**figura 7**).



**Figura 7.** Analisi WB dei livelli di COMP-2 e NF-kB misurati nei sinoviociti trattati per 48 ore con H-HA, BC e H-HA/BC 0,32% p/v.

- A.** Bande WB specifiche per COMP-2, NF-kB e actina (normalizzatore) di campioni p-CTRL e dopo esposizione a H-HA, BC e H-HA/BC.
- B.** Analisi densitometrica normalizzata verso actina delle bande A, per quantificare i livelli di espressione di COMP-2 e NF-kB.

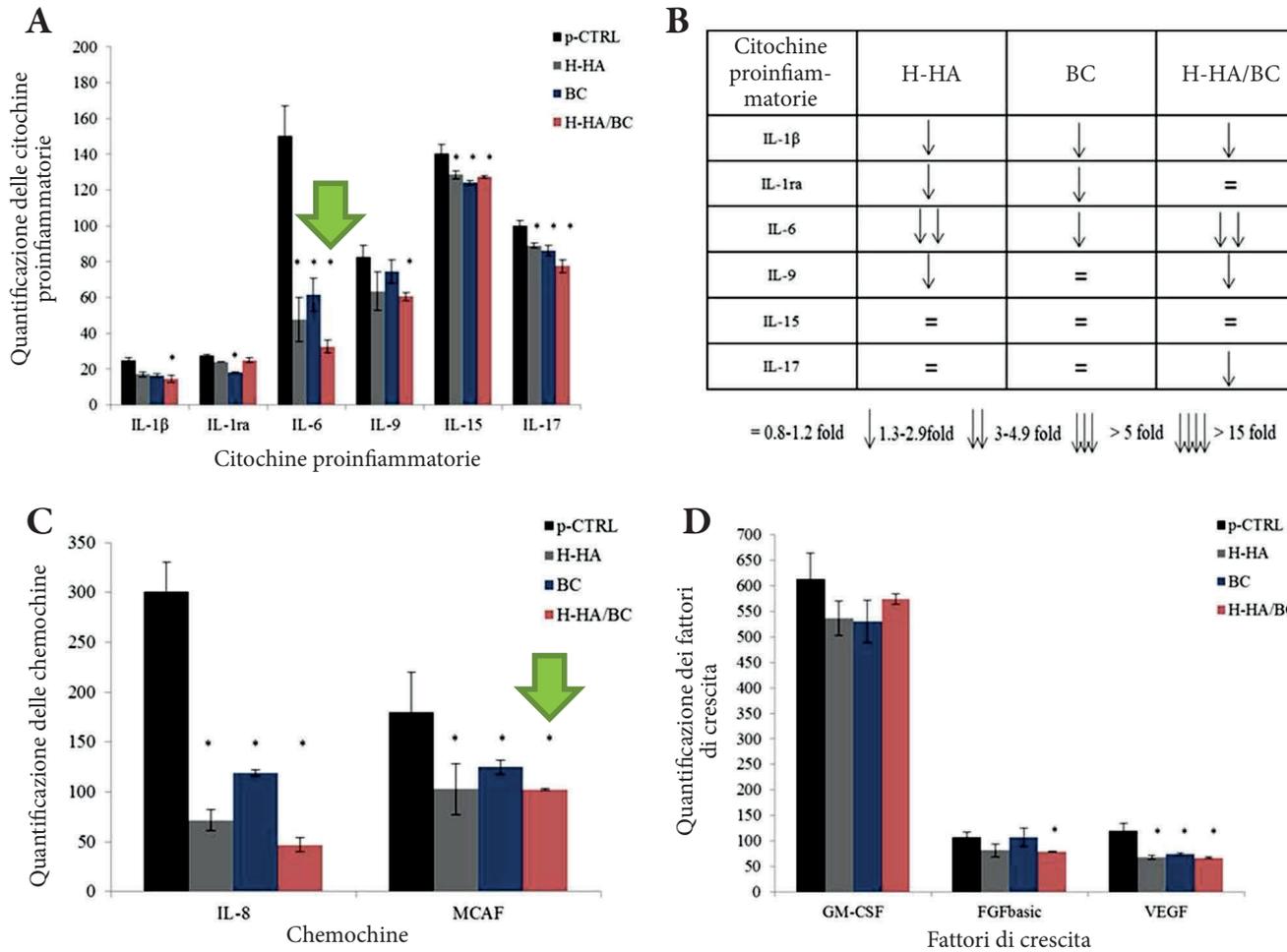
# Risultati 10/12



## *Modulazione dei mediatori biologici nei sinoviociti OA umani (Bio-Plex Assay)*

- ▶ Nel breve termine, l'effetto di downregolazione della IL-6 risultava maggiore con il complesso H-HA/BC rispetto ai singoli componenti, con un'espressione ridotta di 4,62 volte rispetto a p-CTRL dopo 8 ore di incubazione (**figura 8A**).
- ▶ Tale effetto veniva mantenuto anche **dopo un'esposizione prolungata** (48 ore), ma in questo caso **la riduzione di espressione** del suddetto mediatore **era maggiore con BC** rispetto al complesso H-HA/BC (13,8 *vs* 7,8 volte inferiore rispetto a p-CTRL) (**figura 9A**).
- ▶ **Le chemochine** che risultavano **significativamente modulate** dopo esposizione breve e prolungata ai GAGs erano IL-8 e MCAF, **con una riduzione**, in quest'ultimo caso, **maggiore sia nel breve che nel lungo termine con il complesso ibrido H-HA/BC e con un effetto più marcato nel lungo termine con BC per quanto riguarda la riduzione della secrezione di IL-8** (**figure 8C e 9C**).
- ▶ 3 fattori di crescita su 5 risultavano modulati con i trattamenti studiati sia nel breve che nel lungo termine: i dettagli sono rappresentati nelle **figure 8D e 9D**.

# Risultati 11/12



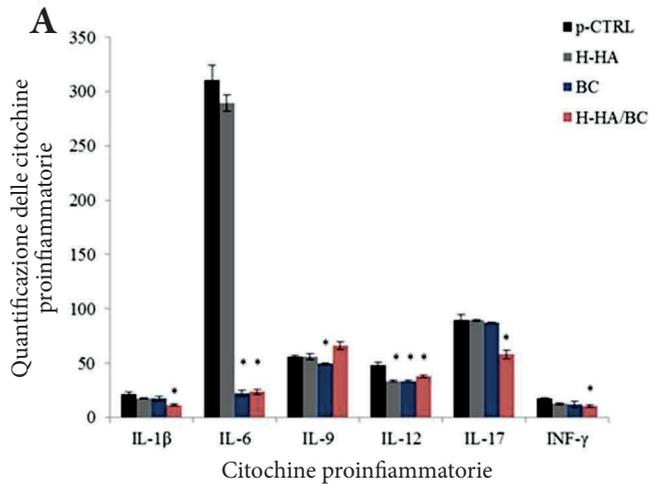
**Figura 8.** Bio-Plex Assay: valutazione della modulazione dei mediatori biologici nel surnatante (pg/ml) dei sinoviociti **trattati per 8 ore** con H-HA, BC e H-HA/BC 0,32% p/v.

I grafici A, C e D mostrano gli effetti di ciascun trattamento sui livelli misurati di citochine proinfiammatorie, chemochine e fattori di crescita (pg/ml).

La tabella B mostra modulazioni negative di almeno 30% in meno di citochine proinfiammatorie rispetto a p-CTRL per ciascun trattamento.

\* con significatività statistica all'analisi t-test ( $p < 0,05$ ) rispetto a p-CTRL.

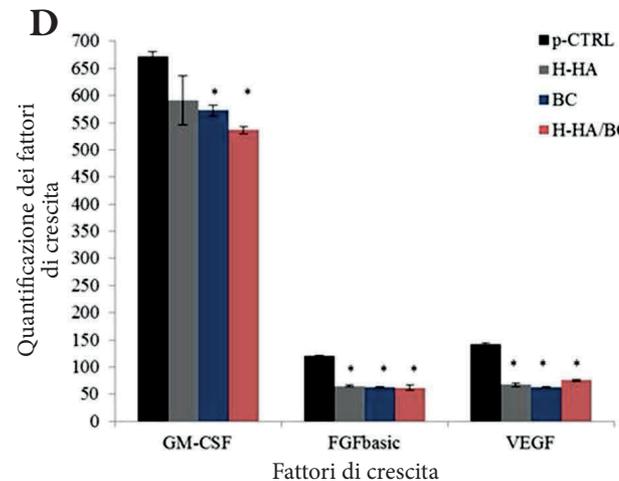
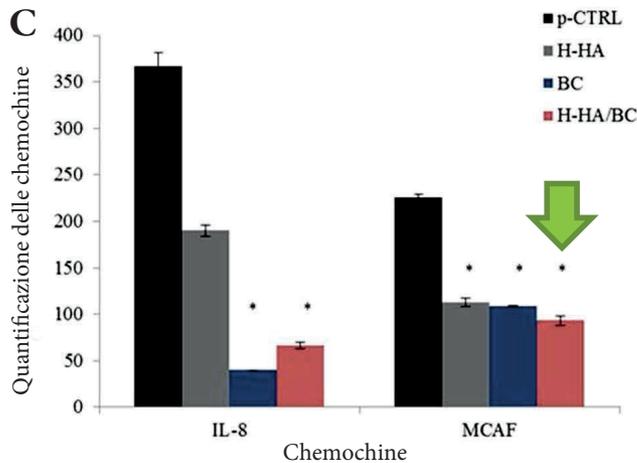
# Risultati 12/12



**B**

Citochine proinfiammatorie	H-HA	BC	H-HA/BC
IL-1 $\beta$	=	=	↓
IL-6	=	↓↓↓	↓↓↓
IL-9	=	=	=
IL-12	↓	↓	↓
IL-17	=	=	↓
INF- $\gamma$	↓	↓	↓

= 0.8-1.2 fold   ↓ 1.3-2.9fold   ↓↓ 3-4.9 fold   ↓↓↓ > 5 fold   ↓↓↓↓ > 15 fold



**Figura 9.** Bio-Plex Assay: valutazione della modulazione dei mediatori biologici nel surnatante (pg/ml) dei sinoviociti **trattati per 48 ore** con H-HA, BC e H-HA/BC 0,32% p/v.

I grafici A, C e D mostrano gli effetti di ciascun trattamento sui livelli misurati di citochine proinfiammatorie, chemochine e fattori di crescita (pg/ml).

La tabella B mostra modulazioni negative di almeno 30% in meno di citochine proinfiammatorie rispetto a p-CTRL per ciascun trattamento.

\* con significatività statistica all'analisi t-test ( $p < 0,05$ ) rispetto a p-CTRL.

# Conclusioni e considerazioni



- ▶ Le cellule isolate della cartilagine articolare danneggiata hanno mostrato un evidente stato di infiammazione, come rivelato da un alto livello dei principali biomarker flogistici.
- ▶ Tutti i trattamenti testati hanno svolto un ruolo nella modulazione delle principali citochine coinvolte nella patologia dell'OA, con un effetto potenziato rispetto ai singoli componenti del complesso ibrido H-HA/BC nella riduzione di diverse citochine.
- ▶ Rispetto a ciascuno dei singoli componenti H-HA e BC, **il complesso ibrido H-HA/BC ha rivelato *in vitro* una maggiore capacità nel ridurre l'espressione dei mediatori COMP-2, NF-kB e MyD88, intervenendo sia nella modulazione del processo infiammatorio che in quello del rimodellamento cartilagineo osservati *in vitro* in entrambi i modelli cellulari utilizzati, suggerendo per il complesso un effetto sinergico positivo dei componenti sia nel breve che nel lungo termine, da confermare anche *in vivo*.**

