



# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA**

**Dottorato di Ricerca in**

**"ORTOPEDIA DEGLI ANIMALI DOMESTICI"**

**XXV Ciclo**

## **L'ARTROPATIA DEGENERATIVA SU BASE TRAUMATICA RISENTE FAVOREVOLMENTE DELL'USO TOPICO DI ACIDO IALURONICO E CURCUMINA?**

**Coordinatore:**

**Chiar.mo Prof. Stefano Zanichelli**

**Tutor:**

**Chiar.mo Prof. Stefano Zanichelli**

**Co-Tutor:**

**Chiar.mo Prof. Ferdinando Gazza**

**Dottorando:**

**Dott.ssa Benedetta Botti**

## INTRODUZIONE

Le articolazioni sono entità anatomiche complesse, cui è demandata la mobilità dei diversi segmenti scheletrici contigui e, nel loro insieme, permettono il movimento armonico del corpo animale.

Le articolazioni si dividono in sinoviali e non sinoviali.

Un'articolazione sinoviale tipo è costituita da due capi ossei contigui rivestiti da cartilagine ialina, da una capsula, circoscrivente la cavità articolare, da legamenti, elementi di stabilizzazione articolare, nonché da terminazioni nervose (Fig. 1).

Le articolazioni non sinoviali comprendono le sinfisi e le sinartrosi, costituite da ossa contigue stabilmente unite fra loro da robuste e brevi strutture legamentose (sindesmose), da tessuto cartilagineo (sincondrosi) o da tessuto osseo (sinostosi).

Le articolazioni più importanti nell'economia del movimento sono quelle sinoviali o diartrosi. In conseguenza degli stress meccanici e non solo meccanici, le diartrosi possono essere soggette a patologie proprie dei diversi componenti articolari e, conseguentemente, necessitano di interventi terapeutici.

### *OSSO E CARTILAGINE ARTICOLARE*

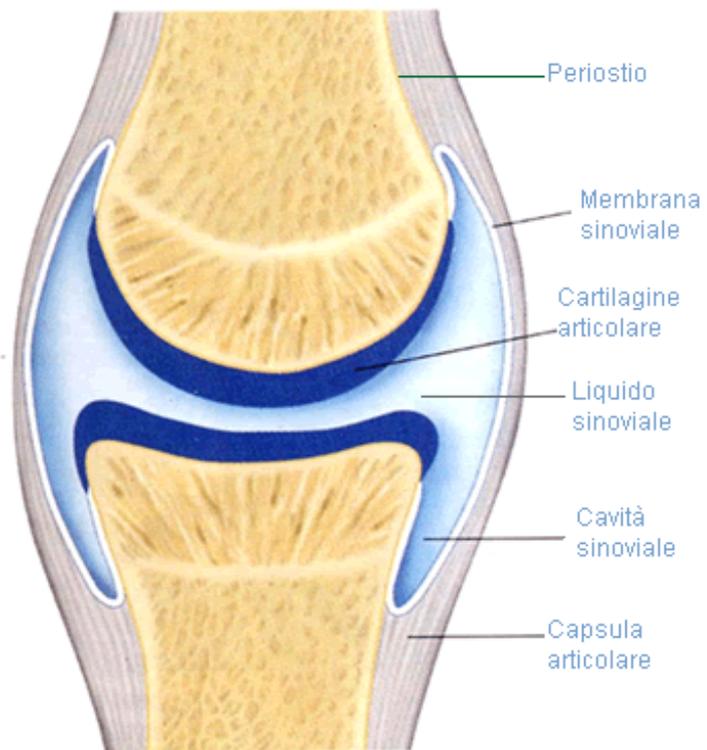
Relativamente all'osso, consideriamo la sola epifisi e non tutto il segmento osseo.

Le epifisi ossee costituiscono l'impalcatura su cui, a livello articolare, si esercitano carichi e pressioni di ogni genere, fisiologici e non. L'epifisi è costituita da osso cortico-spugnoso, di norma modellato per adattarsi all'osso contiguo e con esso articolarsi. L'osso è rivestito da cartilagine ialina, di aspetto traslucido, quasi vitreo, dovuto alla grande quantità di acqua contenuta (70% del peso nella cartilagine dell'animale maturo; 80% nella cartilagine del neonato) ed alla disposizione delle fibre collagene.

Il peso secco della cartilagine ialina è rappresentato per il 50% da collagene, per il 35% da proteoglicani, per il 10% da glicoproteine (fibronectina, condronectina, lisozima, inibitori delle proteasi), per il 3% da sostanze minerali, per l'1% da lipidi, per l'1-2% da condrociti.

La morfologia della cartilagine ialina varia nelle diverse articolazioni in funzione della zona e del carico, nonché dell'età del soggetto. In animali adulti la disposizione è più uniforme.

La cartilagine articolare è suddivisibile in 4 zone: le prime tre non mineralizzate e la quarta, la più profonda, calcificata.



**Figura 1: articolazione sinoviale**

La ZONA I, detta superficiale o tangenziale, presenta la maggior densità cellulare: i condrociti sono piccoli e piatti, con l'asse maggiore parallelo alla superficie; le fibre collagene hanno andamento tangenziale alla superficie.

La ZONA II, zona di transizione, ha cellule più globose e di dimensioni maggiori; le fibre collagene tendono ad incrociarsi con direzioni oblique.

La ZONA III, zona radiale, ha cellule più grandi con l'asse maggiore disposto perpendicolarmente alla superficie; le fibre collagene hanno disposizione radiale.

La ZONA IV, zona calcificata, è divisa dalle tre precedenti da una zona di addensamento e si fonde con l'osso subcondrale.

I condrociti delle zone più profonde hanno un aspetto rotondeggiante, con reticolo endoplasmatico ed apparato del Golgi ben sviluppati, vacuoli secretori, lisosomi e mitocondri, mentre quelli più superficiali hanno un aspetto più appiattito e di tipo fibroblastico.

### *CAPSULA ARTICOLARE*

La capsula articolare è costituita da uno strato fibroso, esterno e robusto, che assolve in gran parte al contenimento dei capi articolari e da uno strato mesenchimale modificato, membrana sinoviale, che tappezza la superficie interna della parete capsulare.

Lo strato fibroso della capsula ed alcuni legamenti ad essa associati si uniscono lungo tutto il perimetro dell'epifisi ossea a livello della zona di transizione fra il periostio fibroso e la cartilagine articolare, cioè a livello dell'anello pericondrale. L'anello pericondrale è pericondrio e mantiene la sua capacità di produrre cartilagine. Se un trauma determina strappamenti inserzionali della capsula fibrosa o dei legamenti annessi a livello di anello pericondrale, si verifica una produzione di cartilagine e di osso per ossificazione endocondrale. Vengono così a formarsi osteofiti periarticolari nel tentativo di garantire nuova stabilità alle fibre di Sharpey, disinserite dal trauma (le fibre di Sharpey sono fibre collagene, rimaste incorporate nell'osso durante i processi di sviluppo, che ancorano all'osso capsule fibrose, legamenti e tendini).

I sinoviociti, cellule dell'intima, hanno funzioni secretorie quelle di tipo B o cellule fibroblastiche e funzioni fagocitarie quelle di tipo A o cellule macrofagiche.

Il liquido sinoviale è un dialisato o ultrafiltrato del plasma, contenente ioni e molecole presenti nel plasma, con esclusione delle proteine di dimensioni maggiori. Il liquido sinoviale, contiene cellule mononucleate, per il 90% monociti e linfociti, mentre il restante 10% è rappresentato da leucociti polimorfo nucleati. Il liquido sinoviale ha tre funzioni essenziali: nutrimento della cartilagine, lubrificazione delle superfici articolari e protezione delle superfici articolari.

### *LEGAMENTI ARTICOLARI*

I legamenti articolari possono ricondursi essenzialmente a due gruppi: capsulari e funicolari.

I legamenti capsulari sono strutture che stabilizzano l'articolazione e sono praticamente una stessa unità funzionale con lo strato fibroso della capsula come per esempio i legamenti collaterali.

I legamenti funicolari (crociati, rotondo) sono, invece, legamenti intraarticolari ma extrasinoviali, cioè avvolti dalla membrana sinoviale, quindi isolati dalla cavità articolare.

### *INNERVAZIONE DELLE ARTICOLAZIONI*

L'innervazione delle articolazioni è data da rami articolari indipendenti dei nervi periferici e da nervi aspecifici provenienti dai muscoli correlati. I nervi entrano nello spessore della capsula con i vasi sanguigni e si distribuiscono alla capsula articolare fibrosa e ai legamenti

associati. I nervi sono deputati alla propriocezione ed al controllo del movimento dell'articolazione. Il movimento articolare può essere così governato entro limiti fisiologici.

Ogni nervo articolare contiene un insieme di fibre mieliniche ed amieliniche piccole, medie e grosse.

Le fibre di piccolo calibro sono costituite da fibre dolorifiche afferenti (nocicettive) e fibre simpatiche amieliniche. Le fibre nocicettive sono costituite da piccole fibre A-delta, mieliniche, ad alta soglia che innervano i meccanocettori e da fibre amieliniche C, ad alta soglia e a lento adattamento. Le fibre nocicettive sono localizzate nella capsula fibrosa, nei legamenti, nei cuscinetti adiposi, nei tendini e nel periostio.

Le fibre mieliniche di spessore medio innervano grossi meccanocettori crepuscolari. Sono presenti nella capsula fibrosa, nei legamenti, nel periostio pararticolare, nei cuscinetti adiposi e nei tendini.

La cartilagine articolare non è innervata, mentre l'osso subcondrale è innervato da rami endostali. Sono presenti fibre mieliniche ed amieliniche con funzioni sensitive ed autonome.

I recettori nervosi, deputati alla propriocezione ed alla sensibilità dolorifica, sono intrinseci all'articolazione; possono essere a bassa o alta soglia ed a lento o rapido adattamento.

La propriocezione è demandata, con ogni probabilità, ad un insieme di meccanocettori a lento adattamento principalmente posizionati nello spessore della capsula fibrosa: segnalano i cambiamenti di pressione dentro ed intorno all'articolazione e sono correlati a fusi neuromuscolari ubicati nel tessuto muscolare e tendineo periarticolare. Questi recettori sono più attivi nel momento in cui l'articolazione raggiunge i suoi limiti fisiologici massimi di flessione ed estensione.

I recettori a rapido adattamento sono invece sensibili alla velocità e all'accelerazione.

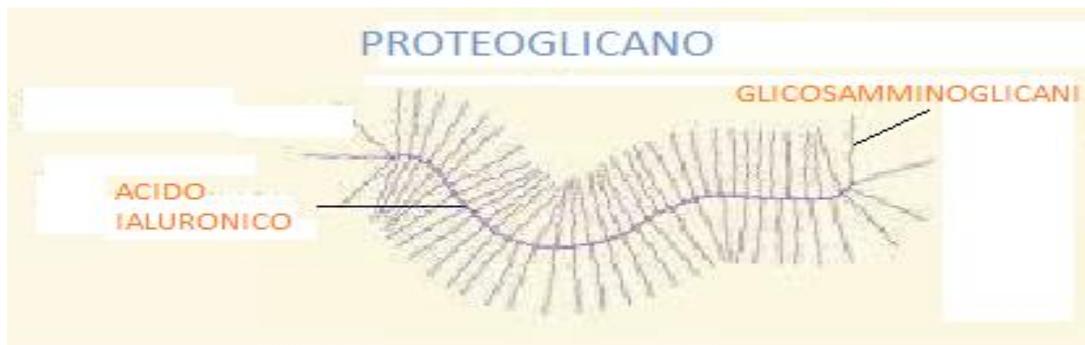
È ovvia l'importanza dell'innervazione sensitiva e propriocettiva per la buona funzionalità di ogni articolazione.

### *BIOCHIMISMO ARTICOLARE*

La parte fibrosa della capsula, dei legamenti e dei menischi è principalmente formata da tessuto connettivo composto da una matrice di collagene, proteoglicani ed acqua. La parte fibrosa della capsula contiene collagene per circa il 75% del peso secco. Il collagene maggiormente rappresentato è quello di tipo I.

Il collagene (Fig. 4) presente nella cartilagine articolare è precipuamente di tipo II (85-90%) e di tipo V, VI, IX e XI per il restante 10-15%.

I proteoglicani, l'altra componente principale della matrice cartilaginea, consistono di una proteina principale e di catene laterali di glicosamminoglicani legate covalentemente, che nell'insieme formano il monomero o subunità. I monomeri della cartilagine matura sono polidispersi. La proteina centrale lega ialuronano (sodio ialuronato) ed il legame è stabilizzato da una proteina di legame (Fig. 2). Nella cartilagine si formano grossi aggregati di proteoglicani. I glicosamminoglicani sono rappresentati dal condroitin 4/6-solfato e dal keratan solfato. Nella cartilagine ialina sono presenti piccole quantità di dermatan-solfato ed eparan-solfato. Il contenuto di cheratan-solfato nella cartilagine articolare aumenta con l'età e la profondità, mentre il contenuto di condroitin 4/6-solfato decresce con l'età.



**Figura 2: struttura di un proteglicano**

### *ARTICOLAZIONE DIARTROIDALE E MOVIMENTO*

Il normale movimento articolare deve essere indolore e la valutazione deve essere fatta eseguendo i movimenti passivi estremi dell'articolazione e quelli abitualmente al di fuori del normale campo fisiologico. Il movimento è sotto il controllo attivo dei muscoli e dei tendini e passivo della capsula e dei legamenti associati. Il movimento è, quando l'articolazione è sana, ripetibile indefinitamente e senza attrito. Le articolazioni prossimali degli arti si possono muovere su più di un piano e la loro stabilità è garantita dalle grandi masse muscolari che le circondano; la stabilità delle articolazioni distali degli arti, invece, è affidata al profilo osteo-cartilagineo dei capi ossei, alla robustezza della capsula e dei legamenti ed in minima parte dei tendini giustapposti. Altro fattore che in qualche modo sembra intervenire nella stabilità di una articolazione è la modesta pressione negativa intraarticolare (da 2 a 6 cm di H<sub>2</sub>O inferiore di quella atmosferica).

I legamenti tendono ad opporsi al movimento lungo il piano su cui giacciono e non a quelli paralleli al loro asse maggiore.

Un'articolazione non si usura ai normali movimenti, ma soffre per gli impatti ripetuti. Durante la normale attività motoria, se tutte le forze si scaricassero a livello articolare, si produrrebbero danni gravissimi ed irreparabili. Possono essere trasmesse al suolo pressioni superiori al peso corporeo già durante il passo, mentre durante la corsa o durante il passaggio dal decubito alla stazione si possono scaricare a terra pressioni da 5 a 10 volte superiori al peso corporeo. Gran parte di queste forze, generate durante il movimento, sono assorbite dalle ossa e dai muscoli, mentre solo in parte gravano direttamente sulle superfici articolari, grazie ai meccanismi di trasmissione delle forze. È per questo che le articolazioni possono sopportare indenni attività motorie molto onerose. Comunque le forze non assorbite e disperse dai tessuti molli devono essere sopportate dalle cartilagini articolari e trasmesse all'osso subcondrale.

La cartilagine articolare è soggetta, durante l'attività motoria, a 3 tipi di deformazione: compressione, tensione e sollecitazione trasversale. Le differenti componenti della matrice cartilaginea sono in grado di opporsi adeguatamente a ciascun tipo di forza.

Le superfici cartilaginee contrapposte di una diartrosi, in stato di riposo, non sono perfettamente congruenti, mentre all'aumentare del carico la superficie di contatto aumenta per la reciproca deformazione da schiacciamento. Sebbene le pressioni di contatto articolare non siano uniformi, le forze vengono trasmesse in modo pressoché omogeneo per la presenza di acqua imprigionata nella matrice, capace di trasmettere le pressioni uniformemente in tutte le direzioni. Se la cartilagine viene compressa in un settore, le zone adiacenti, subiscono tensione o sollecitazione trasversale, quindi stress. La capacità della cartilagine articolare a sostenere stress meccanici è legata alla capacità di mantenere

l'idratazione sotto pressione, riconducibile alla scarsa permeabilità per l'acqua ed all'alta pressione osmotica dei proteoglicani della matrice cartilaginea articolare. La pressione osmotica dei proteoglicani varia da 0,3 a 2,5 atmosfere ed è dovuta alla loro concentrazione nella cartilagine articolare da 5 a 10 volte superiore rispetto agli altri tessuti connettivi. La pressione osmotica dei proteoglicani è principalmente legata (75-85% del totale) alla presenza dei gruppi solfato, carichi negativamente, dei glicosamminoglicani e dei controioni associati (equilibrio ionico o di Gibbs-Donnan). L'acqua è attratta all'interno della cartilagine dalla densità di carica. La pressione di turgore della cartilagine per la pressione osmotica è bilanciata dalla tensione della rete di collagene. Le variazioni della pressione di turgore dipendono da: 1) densità di carica dei proteoglicani, 2) distribuzione lungo le ramificazioni dei proteoglicani dei gruppi carichi elettricamente, 3) conformazione molecolare dei proteoglicani.

La gamma delle forze di resistenza dipende da: 1) organizzazione strutturale, 2) rigidità alla tensione, 3) robustezza della rete di collagene.

Le proprietà liquido-solido della cartilagine determinano un'efficiente capacità di carico, la resistenza all'usura e la possibilità di lubrificazione durante il movimento articolare. Le proprietà viscoelastiche (la viscosità si riferisce al passaggio del liquido interstiziale attraverso la matrice extracellulare e l'elasticità è di pertinenza della matrice solida) della cartilagine determinano umidificazione quando vengono applicate forze compressive e di tensione, dovute alla compressione ed al rilassamento (modificazioni della lunghezza per unità di lunghezza).

Un metodo per descrivere il modo in cui la cartilagine risponde all'applicazione di una pressione è di vedere la cartilagine come materiale bifasico: 1) una matrice solida che si considera essere elastica linearmente e incomprimibile e 2) un liquido interstiziale che si considera sia di viscosità molto bassa e incomprimibile. La matrice solida è porosa e permeabile e gran parte del liquido interstiziale della cartilagine può essere liberamente scambiato con il liquido sinoviale. Con l'applicazione di una pressione, il liquido interstiziale si muove attraverso la matrice, ma è frenato dall'attrito con le pareti porose della matrice. I pori sono le zone fra gli aggregati di proteoglicani e perciò non sono veri e propri fori. Il modello si basa sull'assunto che la dissipazione di energia nell'interfaccia fra le pareti porose e il liquido interstiziale è maggiore della dissipazione all'interno del liquido stesso mentre attraversa gli interstizi. A seconda della velocità di compressione l'attrito associato al flusso di liquido interstiziale può essere responsabile di più del 90% della rigidità alla compressione.

Con una progressiva deformazione della cartilagine si assiste alla estrusione del liquido interstiziale con una contemporanea riduzione della tensione della rete di collagene, senza una significativa riduzione della idratazione. Il liquido interstiziale è estruso dalla matrice finché non si raggiunge una posizione di equilibrio, quando la maggior concentrazione dei proteoglicani anionici o la densità di carica fissa è equilibrata dall'aumento della pressione osmotica di turgore dei proteoglicani. Quando cessa il movimento relativo del liquido rispetto alla parte solida, il carico rimanente è sopportato dalla matrice solida extracellulare. In questa posizione di equilibrio il collagene è responsabile della resistenza intrinseca alla tensione.

### *LUBRIFICAZIONE*

Una compressione della cartilagine determina una trasudazione della fase liquida dalla stessa e si produce un film fluido fra le due superfici articolari contrapposte. Si determina, quindi, una lubrificazione per trasudazione. Secondo Walker et al. (1968), il liquido spremuto dalla cartilagine viene raccolto ed intrappolato in aree ristrette sulla superficie articolare, riducendo così il coefficiente di attrito (lubrificazione sovralimentata). Il

coefficiente di attrito è adimensionale e viene utilizzato per quantificare la resistenza al movimento; per la cartilagine è stimato fra 0,02 e 0,002, mentre per la plastica su plastica è da 0,1 a 0,3 e per il metallo su metallo da 0,3 a 0,8.

La lubrificina, proteina polidispersa, garantisce una lubrificazione superficiale della cartilagine. La lubrificina sembra essere importante per la lubrificazione articolare a bassi carichi applicati, mentre all'aumentare del carico sulla superficie articolare diviene più importante la lubrificazione per trasudazione o spremitura.

Il liquido della matrice cartilaginea, durante il movimento sotto carico, è espulso dalla parte che progressivamente va sotto carico e riassorbito da quello ove il carico si esaurisce. La fase liquida cessa di essere riassorbita dalla matrice cartilaginea nel momento in cui si ripristina l'equilibrio interno delle forze nella matrice extracellulare, cioè quando la pressione di turgore dei proteoglicani intrappolati è bilanciata dalla tensione della rete di collagene.

La lubrificazione della superficie della membrana sinoviale è necessaria per ottenere un movimento indolore e con basso attrito. Lo ialuronano (ialuronato di sodio) si adsorbe alla membrana sinoviale consentendo facili movimenti. Le resistenze al movimento legate ai tessuti molli articolari e paraarticolari sono circa 100 volte superiori alle resistenze offerte dalla cartilagine articolare.

### *CARTILAGINE*

Il condrocita presiede all'omeostasi della cartilagine, regolando alternativamente e più o meno direttamente le fasi di sintesi (anabolismo) e di distruzione (catabolismo) della matrice. L'attivazione del condrocita in senso anabolico o catabolico è strettamente legata ai messaggi chimico-enzimatici e fisici che riceve. L'equilibrio fra processi anabolici e catabolici della cartilagine è, quindi, da ricercare nell'interazione e di interdipendenza di alcune citochine, di fattori di crescita, di enzimi proteolitici e loro inibitori, di radicali liberi e di prostaglandine. Molte di queste sostanze sono prodotte a livello condrocitario o sono presenti, come molecole preformate, all'interno dei mastociti. Se stimolato, il mastocita degranula e libera queste molecole insieme ad altre sostanze neo formate al momento stesso della stimolazione. Le citochine sono definite come fattori peptidici di regolazione, agendo sull'attività della cellula; sono proteine solubili, non immunoglobuliniche, prodotte a livello cellulare ed attive a concentrazioni pico/nano-molecolari.

Le citochine che interagiscono con il condrocita per la regolazione dei processi anabolici e catabolici della matrice cartilaginea sono: Interleuchina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), Interleuchina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleuchina-6 (IL-6), Interleuchina-8 (IL-8), Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

I fattori di crescita agenti sul metabolismo condrocitario sono: Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Insuline-like Growth Factor-1 (IGF-1), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Growth Hormon (GH).

Gli enzimi ad attività proteolitica, interagenti sull'omeostasi dei proteoglicani della matrice, sono: Metalloproteinasi (Collagenasi, Protepglicanasi, Gelatinasi), Serinoproteinasi (Elastasi, Catepsina G), Cisteinoproteinasi (Catepsina B, Catepsina L, Catepsina H, Catepsina D).

Gli inibitori degli enzimi proteolitici sono: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP: inibitore tissutale delle Metalloproteinasi), Plasminogen Activator Inhibitor (PAI: inibitore dell'attivatore del plasminogeno).

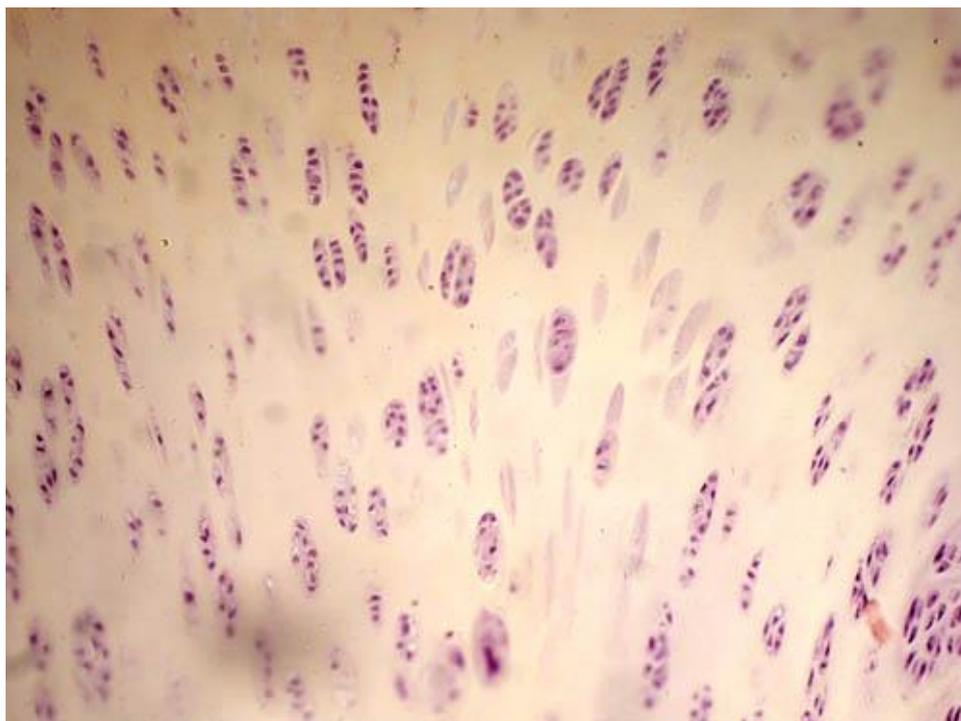
I radicali liberi sono: Nitrossido o Monossido di Azoto (NO), Reactive Oxygen Species (ROS: radicali liberi dell'ossigeno).

La prostaglandina in causa è la Prostaglandina E<sub>2</sub>.

Le interleuchine, il  $\text{TNF-}\alpha$ , il  $\text{TGF-}\beta$  e l'IGF-1 sono normalmente sintetizzate dai condrociti, mentre gli altri, quali il bFGF, il GH e il fattore stimolante le colonie di granulociti e di macrofagi, sono di derivazione mastocitaria e/o sinoviale.

L'omeostasi della cartilagine è garantita dal perfetto succedersi di fasi anaboliche e cataboliche legate all'attività del condrocita: il condrocita, d'altra parte, è strettamente regolato dal corretto e sequenziale succedersi della liberazione, in appropriate quantità, dei diversi fattori appena ricordati. Naturalmente l'attività metabolica di tutti i componenti articolari è dipendente dagli agenti fisici, chimici ed infettivi interagenti.

Il condrocita è l'unità operativa della cartilagine: è destinato a produrre e mantenere in efficienza la matrice extracellulare della cartilagine. La buona salute del condrocita è condizione essenziale per il buon funzionamento articolare. Il condrocita potrebbe essere paragonato ad un attento restauratore che valuta il materiale: lo ricondiziona, quando possibile, lo sostituisce con materiale analogo, quando necessario. L'attività del condrocita è di produrre matrice, ma anche di demolire quella alterata e non più utile alla funzione. Il condrocita, disperso nella matrice extracellulare avascolare e priva di innervazione, è dotato di scarsissima mobilità, restando quasi ancorato al suo punto d'origine. Il condrocita, una volta formati i gruppi isogeni (Fig. 3), inoltre, è dotato di scarsa capacità mitotica, quindi ne deriva una scarsissima o nulla probabilità di rigenerazione, se danneggiato.



**Figura 3: immagine istologica di gruppi isogeni condrocitari**

Il condrocita riceve le sostanze nutritive, ossigeno compreso, per diffusione dal liquido sinoviale, dove scarica i propri cataboliti. Gli stimoli chimici e ormonali arrivano al condrocita attraverso il liquido sinoviale. Il condrocita è, inoltre, condizionato dalle modificazioni della matrice e dagli stimoli fisici.

I condrociti della cartilagine ialina, rappresentano l'1-2% del volume cartilagineo, ma sovrintendono alla secrezione ed al mantenimento della matrice extracellulare della cartilagine, relativamente lontana da nervi, vasi sanguigni e linfatici.

Il metabolismo cartilagineo è essenzialmente anaerobico; il consumo di ossigeno della cartilagine è circa il 2% di quello dei tessuti vascolarizzati. La diffusione di tutte le sostanze nutritive (glucosio, ossigeno, aminoacidi per la sintesi del collagene e delle proteine strutturali) avviene attraverso il liquido sinoviale dove sono disperse. Le dimensioni, la forma e la carica delle molecole, oltre alla concentrazione dei proteoglicani nella cartilagine, condizionano la diffusibilità delle sostanze nella cartilagine stessa, probabilmente legata anche all'azione di pompaggio intermittente determinata dal carico.

I condrociti secernono collagene, proteoglicani, glicoproteine non collageniche, condronectina, piccoli polipeptidi cationici ed enzimi.

Il collagene secreto a livello di cartilagine articolare è di tipo II, V, VI, IX, XI. I collagene minori (V, VI, IX e XI) sono probabilmente importanti nella organizzazione della matrice. Il turnover del collagene è estremamente lento. Le fibrille di collagene sono relativamente poco allineate nella cartilagine a riposo, mentre durante una compressione tendono ad allinearsi parallelamente alla superficie articolare, conferendo una maggiore resistenza alla tensione di tutta la struttura. La stabilità della rete di collagene è riconducibile ai legami crociati interfibrillari, anche se potrebbe essere dovuta al collagene di tipo IX, che agirebbe come una colla.

L'interazione fra il collagene ed i proteoglicani è prevalentemente di tipo elettrostatico.

L'attività anabolica dei condrociti, oltre alla regolazione della parte colla genica della matrice, permette la continua integrazione dei proteoglicani della matrice extracellulare grazie a processi di secrezione e di successiva aggregazione. I proteoglicani, prodotti a livello endoplasmatico del condrocita e successivamente estrusi, hanno la capacità di formare grossi aggregati (peso molecolare  $5 \times 10^6$ ) e di migrare nelle aree dove si è verificato un danno della matrice. L'aggregazione dei proteoglicani dipende dallo ialuronano (ialuronato di sodio), capace, in funzione del proprio peso molecolare, di legare un numero elevatissimo di proteoglicani. Il ricambio dei proteoglicani della matrice è continuo e relativamente rapido, grazie all'incessante attività dei condrociti. Gli aggregati di proteoglicani, in sostanza, svolgono tre funzioni nella cartilagine: 1) stabilizzazione della matrice, 2) definizione del volume della matrice, 3) resistenza alla compressione della matrice.

La degradazione dei proteoglicani della matrice cartilaginea è legata ad enzimi secreti sia da cellule della membrana sinoviale che dagli stessi condrociti; il punto di attacco enzimatico è soprattutto a livello dell'estremità distale della molecola (terminale C) ed in siti di fessurazione presenti nella molecola. Tale fisiologica attività catabolica determina il rilascio di frammenti di proteoglicani utili alla regolazione della secrezione compensatoria di nuovi proteoglicani da parte dei condrociti.

In condizioni di omeostasi cartilaginea vi è un perfetto equilibrio tra sintesi (anabolismo) e degradazione (catabolismo) della matrice, così da lasciare costantemente integra la superficie articolare. I condrociti posti negli strati più profondi della cartilagine articolare hanno un'attività di sintesi dei proteoglicani molto più attiva rispetto a quelli degli strati più superficiali.

I proteoglicani sono esclusi dagli spazi intrafibrillari del collagene e la loro concentrazione effettiva negli spazi extrafibrillari determina la concentrazione degli ioni, la pressione osmotica prevalente nella matrice e la permeabilità selettiva ai soluti macromolecolari. La concentrazione dei proteoglicani aumenta con la distanza dalla superficie articolare, mentre le fibrille di collagene sono più rappresentate a livello superficiale, dove sono necessarie per resistere alla tensione durante il carico. La maggiore concentrazione di proteoglicani negli strati cartilaginei più profondi è, verosimilmente, legata alla necessità di resistere alle forze compressive.

Il controllo del metabolismo del condrocita è complesso: implica fattori genetici e ambientali che interagiscono con il condrocita, determinando la sintesi o la degradazione della matrice. Le concentrazioni dei substrati, dei cofattori, degli enzimi e degli inibitori, il potenziale ossido-riduttivo della cellula e la concentrazione di ossigeno possono influenzare la sintesi di proteoglicani e collagene.

Gli stimoli meccanici sono importantissimi per il metabolismo dei condrociti: sono in gioco sia nella fisiologia condrocitaria sia nell'eziopatogenesi di diverse artropatie. Se un'articolazione viene scaricata per un periodo sufficientemente lungo da ogni carico meccanico, si osservano anomalie riconducibili a forme artrosiche: 1) diminuzione dello spazio articolare, 2) osteofitosi ed entesiofitosi, 3) osteosclerosi sub-condrale, 4) sfibramento, ulcerazioni ed ispessimento capsulare, 5) riduzione del contenuto in proteoglicani della cartilagine, 6) modificazioni degenerative dei tessuti periarticolari.

Il condrocita risponde in modo differente allo stimolo meccanico: se si valuta la matrice cartilaginea di un'articolazione in punti diversi, in quelli più sottoposti a carico si osserva una maggiore quantità di condroitin-solfato e di ialuronano (ialuronato di sodio), mentre il numero dei condrociti nelle zone superficiali dei medesimi punti è minore, circa la metà, delle aree meno sottoposte a carico meccanico. La morte condrocitaria da stress meccanico sembra essere la causa di questa riduzione numerica.

#### *MEMBRANA SINOVIALE E LIQUIDO SINOVIALE*

L'intima sinoviale è l'esile barriera fra il plasma/liquido interstiziale ed il liquido sinoviale. La mancanza di una membrana basale e la vicinanza al letto capillare (5-10 micron dalla superficie) facilitano lo scambio di soluti. Lo scambio di liquidi fra il plasma ed il liquido sinoviale è regolato dalle diverse pressioni idrostatiche e colloidio-osmotiche. L'endotelio impedisce l'uscita dai capillari capsulari delle molecole più grandi.

La viscosità del liquido sinoviale è determinata dal contenuto in ialuronano (ialuronato di sodio), secreto dai sinoviociti di tipo B; i sinoviociti di tipo A sono deputati alla fagocitosi ed alla pinocitosi (cellule macrofagiche).

#### *OSSO E FUNZIONE ARTICOLARE*

La cartilagine articolare e l'osso cortico-spongioso sub-condrale sono intimamente connessi attraverso lo strato calcificato, IV zona, della cartilagine. Le forze che agiscono su una articolazione vengono trasmesse dall'osso alla cartilagine e viceversa. Gran parte delle forze legate al movimento articolare vengono sopportate dai tessuti molli (tendini, muscoli e legamenti) annessi all'articolazione, tuttavia una parte viene a scaricarsi sull'osso. L'osso spugnoso meta-epifisario è circa 10 volte più rigido della cartilagine e circa 100 volte meno rigido dell'osso corticale.

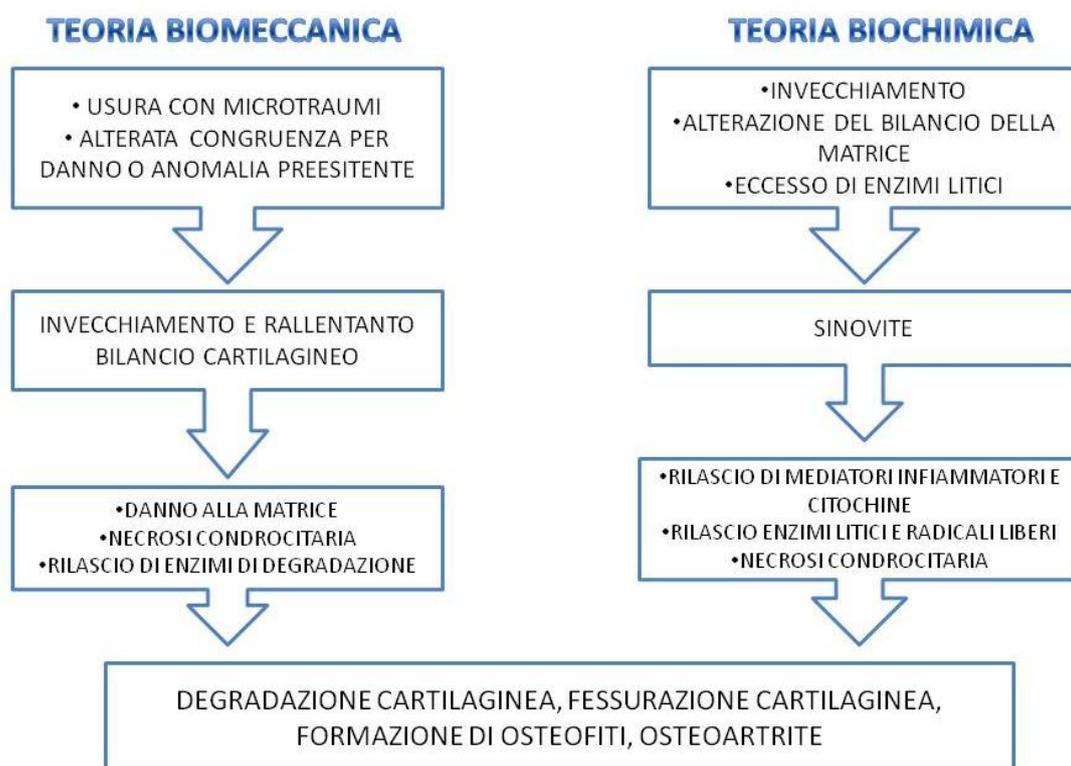
L'allargamento/appiattimento delle ossa a livello meta-epifisario aumenta le superfici di carico trasversali e rende l'osso più idoneo a sopportare il carico, riducendo lo stress. Anche le trabecole ossee meta-epifisarie si rimodellano, com'è ovvio, sotto lo stimolo meccanico del carico funzionale.

## **FISIOPATOLOGIA DELLE DIARTROSI**

Prima di entrare nel dettaglio della fisiopatologia articolare è necessario ricordare che:

- tutte le artropatie implicano sempre, primitivamente o secondariamente, la compartecipazione di tutti i componenti articolari, tessuti molli e duri;
- tutte le artropatie sono caratterizzate, almeno in alcune fasi evolutive, da una flogosi capsulare, quindi da artrosinovite;
- tutte le artropatie, anche quelle di grado modesto se croniche, conducono alla malattia articolare degenerativa (MAD o DJD, Degenerative Joint Disease degli anglosassoni).

In sintesi, le patologie articolari non infettive possono generarsi attraverso due vie: meccanica e biochimica.



### **ARTROSINOVITE**

Per artrosinovite si intende una flogosi della capsula articolare. Spesso è su base traumatica ed è caratterizzata da una infiltrazione di cellule infiammatorie nella capsula e da qui nel liquido sinoviale, da vasodilatazione, da iperpalsia ed ipertrofia delle cellule di rivestimento sinoviale e, successivamente, da proliferazione vascolare e fibrosi (Fig. 4).

Ogni processo di natura infiammatoria a carico della capsula articolare comporta



**Figura 4: immagine di un'articolazione affetta da artrosinovite**

l'ingresso in cavità di leucociti e mastociti che, degranulando, liberano mediatori chimici dell'infiammazione, autoalimentando il processo; anche la produzione e liberazione di mediatori flogistici quali le citochine e l'aumentata attività di enzimi catabolici, destinati ad aumentare l'attività condrocitaria verso la degradazione della matrice, sono causa ed effetto dell'alterazione dell'omeostasi articolare, aumentando il danno.

Per comodità si riportano nuovamente le molecole ad attività biologica in grado di regolare l'attività del condrocita:

- le citochine che interagiscono con il condrocita per la regolazione dei processi anabolici e catabolici della matrice cartilaginea sono: Interleuchina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), Interleuchina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleuchina-6 (IL-6), Interleuchina-8 (IL-8), Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ );
- i fattori di crescita agenti sul metabolismo condrocitario sono: Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Insuline-like Growth Factor-1 (IGF-1), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Growth Hormone (GH);
- gli enzimi ad attività proteolitica, interagenti sull'omeostasi dei proteoglicani della matrice, sono: Metalloproteinasi (Collagenasi, Proteoglicanasi, Gelatinasi), Serinoproteinasi (Elastasi, Catepsina G), Cisteinoproteinasi (Catepsina B, Catepsina L, Catepsina H, Catepsina D);
- gli inibitori degli enzimi proteolitici sono: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP), Plasminogen Activator Inhibitor (PAI);
- i radicali liberi sono: Nitrossido o Monossido d'Azoto (NO), Reactive Oxygen Species (ROS);
- la prostaglandina in causa è la Prostaglandina E<sub>2</sub>.

La rottura dell'equilibrio metabolico del condrocita, quindi dell'omeostasi cartilaginea ed articolare in toto, è da ricondurre ad eventi fisici, chimici od infettivi in qualche modo capaci di innescare quella cascata di eventi in grado di rompere l'equilibrio fra le citochine (fattori peptidici di regolazione), i fattori di crescita, gli enzimi ed i loro inibitori, i radicali liberi e le prostaglandine.

Le artrosinoviti possono essere essudative o produttive. Quelle caratterizzate da un quadro di tipo essudativo possono essere suddivise in base all'essudato in: sierose, siero-emorragiche, emorragiche, siero-fibrinose, purulente. In funzione del tipo di essudato si parlerà allora di artrosinovite sierosa, di artrosinovite siero-emorragica, di artrosinovite emorragica, di artrosinovite siero-fibrinosa e di artrosinovite purulenta. Quelle produttive sono dominate da fenomeni proliferativi sinoviali e/o capsulari e dei tessuti duri.

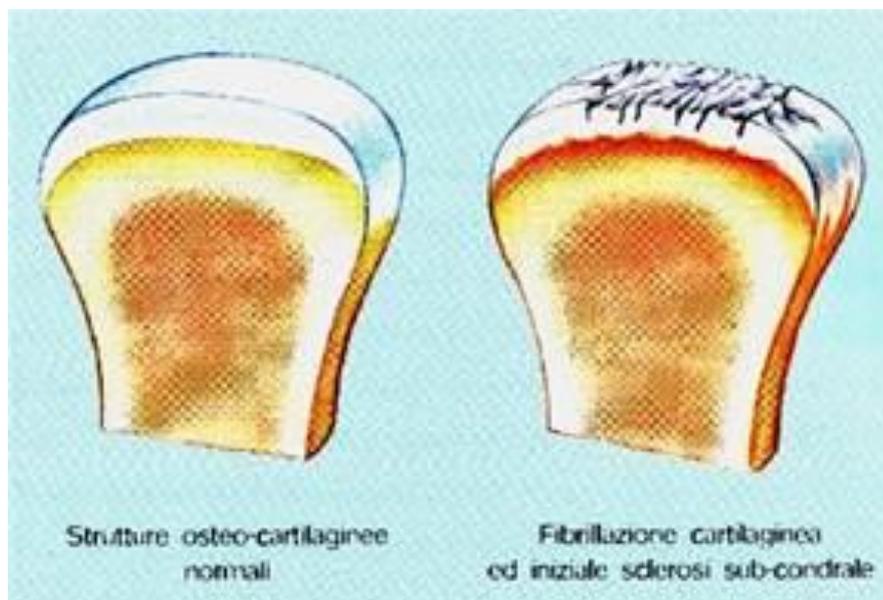
Un processo infiammatorio della capsula articolare, se non dominato precocemente, tende a coinvolgere ben presto (5-7 giorni) tutte le strutture articolari, comportando una flogosi articolare diffusa ed identificabile come pan-artrite o più semplicemente artrite. Meno frequentemente si osserva un processo infiammatorio articolare in partenza esclusivamente dal complesso osteo-cartilagineo o desmico.

Le artrosinoviti possono essere definite come primarie o secondarie.

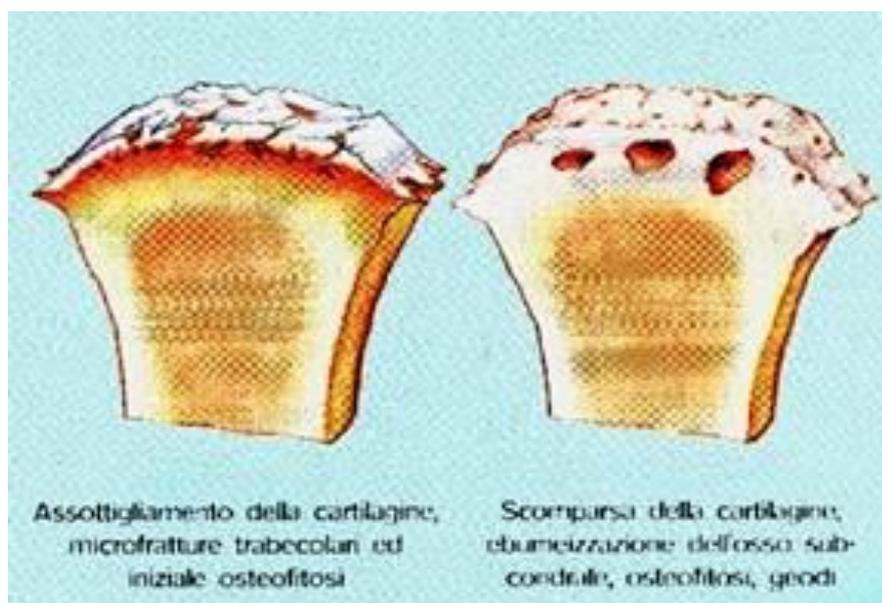
L'artrosinovite primaria o artrite traumatica di tipo I è caratterizzata da una infiammazione della capsula articolare senza grandi alterazioni della cartilagine articolare o dell'osso sub-condrale. Per diagnosticare un'artrosinovite primaria è necessario che non vi siano alterazioni radiograficamente evidenti o alterazioni evidenti ad una artroscopia diagnostica. L'artrosinovite primaria riconosce principalmente cause traumatiche, quali ripetute sovradistensioni, o chimiche, quali infiltrazioni topiche di farmaci.

L'artrosinovite secondaria o artrite traumatica di tipo II è caratterizzata da fatti degenerativi della cartilagine articolare e dell'osso sub-condrale, con segni radiograficamente ben evidenti ed evidenziabili con artroscopia diagnostica od artrotomia

esplorativa (Figg. 5 e 6). L'artrosinovite secondaria è l'esito di traumi intensi e ripetuti, di fratture parcellari e distacchi osteocondrali, di malformazioni articolari (displasie ossee e/o legamentose), causa di osteoartrite o osteoartrosi.



**Figura 5: esiti di artrosinovite secondaria, fibrillazione cartilaginea e sclerosi sub-condrale**



**Figura 6: esiti di artrosinovite secondaria, assottigliamento cartilagine articolare fino a sua scomparsa, osteofitosi, eburnizzazione dell'osso sub-condrale**

Normalmente, come già detto prima, le patologie articolari coinvolgono contemporaneamente tessuti molli e duri.

In corso di artrosinovite vi è liberazione di istamina, di 5-idrossitriptamina, l'attivazione della chinina del complemento e dei sistemi di coagulazione; inoltre vi è la liberazione dei metaboliti dell'acido arachidonico (Fig. 7), proveniente dalle membrane cellulari, così come di alcune citochine ed enzimi, tutti potenti mediatori endogeni della flogosi. Tali sostanze interagiscono con il condrocita, comportando la prevalenza dei fenomeni

catabolici su quelli anabolici, con la naturale e conseguente distruzione della matrice cartilaginea per demolizione e non sostituzione dei proteoglicani, nonché provocando degradazione dello ialuronato di sodio e conseguente scadimento delle sue proprietà.

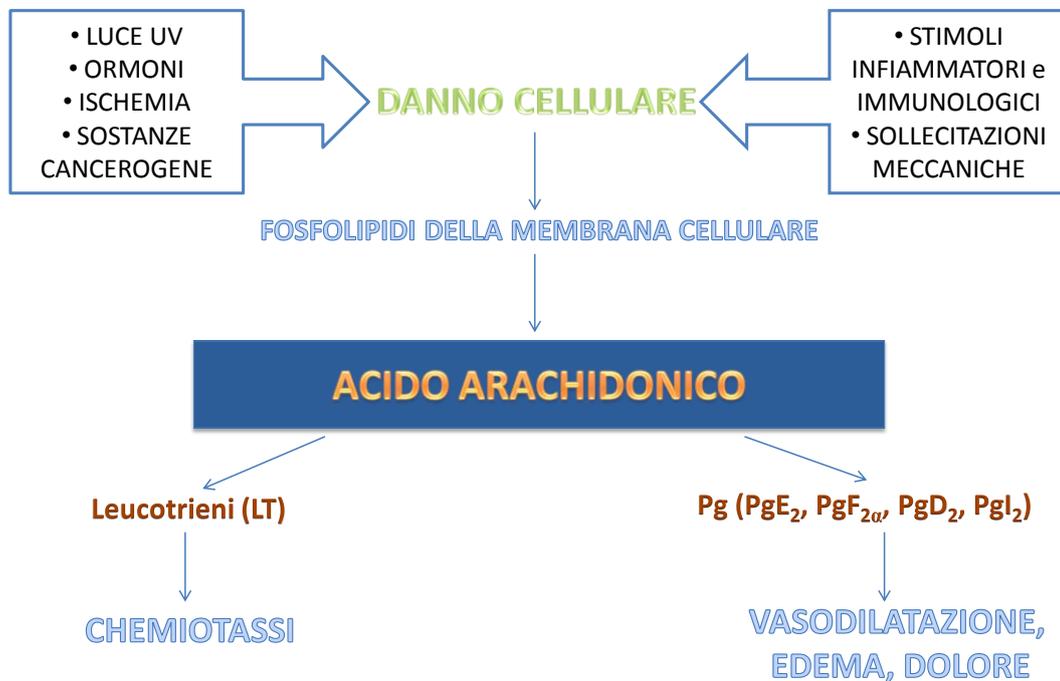


Figura 7: cascata dell'acido arachidonico

#### ARTROSINOVITE INFETTIVA

L'artrosinovite infettiva è evenienza particolarmente grave per i danni irreversibili indotte alle strutture articolari.

L'esame del liquido sinoviale in corso di artrosinovite settica, già dopo 3-5 giorni, denota una grave leucocitosi (da 30.000 a 150.000 leucociti per microlitro) ed aumento del contenuto proteico.

Le artrosinoviti infettive possono essere suddivise in settiche e purulente.

Le artrosinoviti settiche riconoscono diversi agenti eziologici: Salmonella, Klebsiella, Gram-negativi, Gram-positivi, Micoplasmi, ecc..

L'andamento delle artropatie settiche è caratterizzato, inizialmente, da una flogosi dei tessuti molli con essudato di tipo sieroso, siero-emorragico, siero-fibrinoso o fibrinoso e, successivamente, da degenerazione dei condrociti e della matrice extra-cellulare a causa di quelle citochine, modulatrici della flogosi.

Le artrosinoviti purulente sono riconducibili abitualmente ad impianto di germi piogeni banali come lo stafilococcus nelle sue varietà o lo streptococcus.

L'andamento delle forme suppurative è estremamente rapido, grave ed invalidante in modo irreversibile. L'azione proteolitica del pus e degli enzimi liberati in cavità articolare provocano, infatti, danni condrocitari, alla matrice extracellulare della cartilagine, all'intima sinoviale e reazione fibroblastica della capsula. L'articolazione, internamente, si riveste di tessuto di granulazione e si trasforma in un classico empiema (Fig. 8).



**Figura 8: effetti di un'artrite settica, articolazione del ginocchio**

L'impianto dell'agente causale di un'artrosinovite infettiva può avvenire fondamentalmente:

- per via ematogena;
- per contiguità;
- per via diretta, in caso di ferita penetrante;
- per via iatrogena, in seguito ad intervento chirurgico o per artrocentesi.

In caso di infezione articolare, già 24-48 ore dopo l'impianto batterico, vi è una grandissima flogosi con quadro essudativo imponente. Si osserva una infiltrazione di linfociti polimorfo nucleati della capsula ed all'interno della cavità articolare, congestione vasale e proliferazione delle cellule sinoviali superficiali. Dopo una settimana è presente una infiltrazione monocitaria, tessuto di granulazione ed iperplasia capsulo-intimale. I detriti della parete batterica sostengono la risposta flogogena, attivando i macrofagi e la via alternativa del complemento. Le cellule del rivestimento sinoviale ed i leucociti polimorfo nucleati fagocitano i batteri, determinando un aumento del contenuto lisosomiale e degli enzimi capaci di sostenere il processo flogistico. Si instaura un circolo vizioso autoalimentante con la liberazione di fosfatasi acida, betaglucuronidasi, lisozima, collageneasi, proteinasi simili, elastasi e catepsine, capaci di stimolare il processo infiammatorio con ipertrofia/iperplasia della membrana sinoviale, sfaldamento delle cellule sinoviali superficiali e degradazione della matrice cartilaginea.

#### *ARTROSINOVITE PRODUTTIVA*

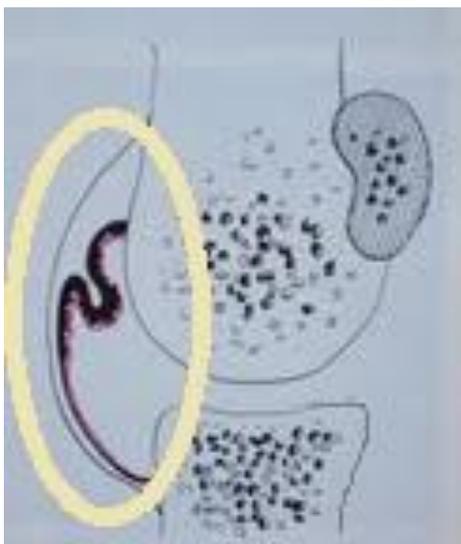
L'artrosinovite produttiva è un processo infiammatorio asettico caratterizzato da fenomeni produttivi degli elementi sottointimali, che portano alla formazione di vegetazioni verso il cavo articolare (Fig. 9); gli elementi di rivestimento non mostrano alterazioni importanti.

L'artrosinovite proliferante riconosce cause traumatiche e ha la tendenza all'obliterazione della cavità articolare, determinando anche uno sfiancamento della parete sinoviale.

In base all'aspetto delle proliferazioni, si riconoscono tre diverse forme:

- papillare;
- villonodulare;

- tuberosa.



**Figura 9: artrosinovite produttiva**

La forma papillare è caratterizzata da proliferazioni più o meno diffuse a forma di papille con limitata tendenza all'occupazione della cavità articolare.

La forma villonodulare è così definita per la presenza di vegetazioni villose semplici o ramificate per gemmazione di villi secondari o terziari. A livello dei villi possono essere presenti formazioni nodulari di limitata entità; le formazioni villonodulari fluttuano nella cavità articolare, mosse dai movimenti della sinovia come la vegetazione marina adesa a uno scoglio in balia del moto ondoso.

La forma tuberosa è data da un processo proliferativo di forma globosa, in cui le proliferazioni tendono ad occupare la cavità articolare adattandosi l'una all'altra.

#### *ARTROSINOVITE SCLEROSANTE*

L'artrosinovite sclerosante è un processo flogistico asettico dominato da imponenti fenomeni produttivi fibro-sclerotici in partenza dagli elementi fibrosi periferici della capsula sinoviale, a volte accompagnati da produzione villosa; più spesso gli elementi sinoviali non presentano alcuna alterazione.

L'andamento è cronico e il processo produttivo ha direzione centrifuga e riconosce cause traumatiche.

#### *OSTEOCONDRITE DISSECANTE*

Consiste in un focolaio di necrosi asettica a carico di un settore cartilagineo e dell'osso sub-condrale corrispondente, con tendenza alla separazione e caduta in cavità articolare. È una forma tipica dell'animale giovane in rapido accrescimento.

Eziopatogenicamente si invocano disturbi vascolari, legati al momento di grande attività metabolica a livello dei dischi cartilaginei metafisari, disturbi nutrizionali dei condrociti, cause ormonali, cause traumatiche su un substrato geneticamente predisposto. Altra causa sarebbe un'incapacità dei condrociti ad una normale evoluzione: i condrociti dei gruppi isogeni proliferano ma non maturano, non si ipertrofizzano e non degenerano, comportando un progressivo allungamento delle colonne condrocitarie, con ispessimento locale della cartilagine per attività apposizionale e interstiziale. Tale ispessimento determinerebbe una necrosi degli strati più profondi della cartilagine con fessurazioni e distacco dei frammenti osteocondrali. Anche fattori alimentari sono invocati fra le cause:

diete iperproteiche nella fase di accrescimento sono capaci di indurre rapidi accrescimenti ponderali su uno scheletro immaturo ed incapace di sostenere i nuovi carichi, compromettendo così i distretti osteocondrali di alcune articolazioni, quali la spalla, il gomito, il ginocchio ed il tarso. Oggi, comunque, si tende a definire l'osteochondrosi come malattia ad eziologia multifattoriale.

Le patologie osteocondrali, proprie del periodo di accrescimento, colpiscono precipuamente gli animali di sesso maschile; questo sarebbe riconducibile ad ipersecrezione di testosterone che, in sinergismo con l'ormone della crescita, stimola l'accrescimento epifisario.

Qualunque sia la causa, comunque, si determina un problema vascolare a livello di zona festonata della cartilagine (4° strato) od all'osso immediatamente sottostante e conseguente separazione di un lembo (flap) osteocondrale di dimensione variabile ma mai di scarso interesse ai fini dell'omeostasi articolare. Tale forma, infatti, è capace di indurre flogosi articolare diffusa e comportare malattia degenerativa articolare (MAD o DJD).

### *DISPLASIE*

Oggi le displasie sono inquadrabili in patologie ad eziologia genetica a penetranza variabile a cui si sovrappongono e si associano uno o più fattori esterni. Questo inquadramento vuole indicare che, affinché si manifesti la displasia in tutta la sua devastante gravità, si devono creare delle condizioni particolari di tipo alimentare, ambientale, di abitudini di vita, di esercizio fisico, capaci di interagire con un substrato articolare geneticamente predisposto. Naturalmente i gradi di displasia sono variabili e diverse sono le sintomatologie riscontrabili, anche in relazione ai diversi momenti di evoluzione della patologia in essere.

Le displasie determinano sempre come esito finale malattia degenerativa articolare (MAD o DJD), dopo aver comportato il passaggio attraverso un crescendo di fenomeni patologici a carico dell'articolazione interessata. È quindi da considerare come una patologia ingravescente e fortemente invalidante.

### *ARTROPATIA DEGENERATIVA*

La malattia articolare degenerativa (MAD o DJD) è caratterizzata da alterazioni osteocondrali importanti. È indicata come patologia articolare cronica non infiammatoria, anche se spesso è associata a flogosi dei diversi componenti articolari.

L'artrosinovite è spesso presente nei momenti iniziali ed evolutivi della DJD ed è da annoverare fra le cause stesse della patologia.

L'artropatia degenerativa è patologia osteocondrale a lenta progressione, ingravescente, riconducibile a diverse cause, suddivisibili in predisponenti e determinanti.

Cause predisponenti sono:

- ereditarietà;
- carenze alimentari di Calcio, Fosforo, Vitamina D, Rame, Manganese;
- avvelenamenti (Fluoro).

Cause determinanti sono:

- senescenza;
- sovraccarico meccanico, artrosi primitiva, soprattutto in animali sportivi;
- irregolari sollecitazioni funzionali, artrosi secondaria (displasie ossee, capsulari e legamentose, osteocondrite dissecante, rotture legamentose, lussazioni, sublussazioni, distorsioni gravi e ripetute, fratture articolari, deviazioni angolari di segmenti ossei).

Da un punto di vista clinico le alterazioni in corso di DJD sono fibrillazioni e distacchi cartilaginei, denudamento dell'osso sub-condrale, con conseguente sclerosi (eburneazione) e formazioni cistiche, osteofitosi marginali ed entesiofitosi, fibrosi capsulare e sinovite iperplastica.

Comunque la conditio sine qua non per parlare di DJD è il danno cartilagineo e dell'osso sub-condrale denudato.

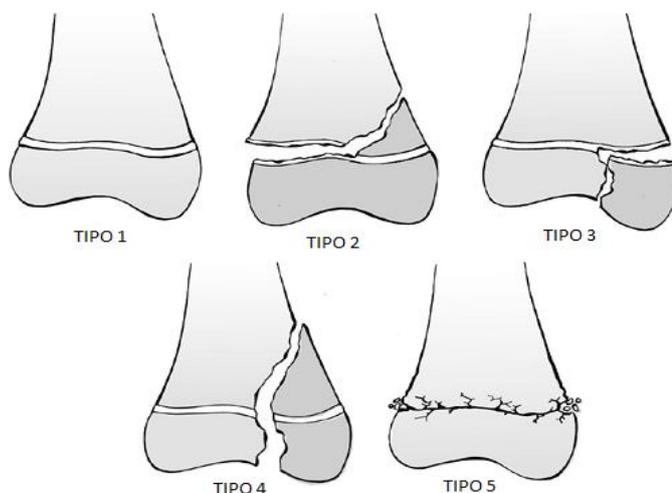
### *FRATTURE*

Un cenno particolare è necessario per le soluzioni di continuo traumatiche delle epifisi ossee che, nell'animale sportivo, sono causa di artropatie gravi o gravissime. Le fratture articolari possono essere parcellari o di tipo Salter-Harris.

I frammenti osteocondrali delle fratture parcellari diventano abitualmente liberi nell'articolazione e si trasformano in corpi estranei in balia dei flussi e delle correnti generate dal liquido sinoviale in continuo moto vorticoso. In questo modo i frammenti diventano causa di blocco meccanico dell'articolazione per intrappolamento degli stessi fra le superfici contrapposte e stimolo flogogeno per la membrana sinoviale. Inoltre l'osso, rimasto scoperto nel punto di frattura, va incontro a processi flogistici, sostenuti dal liquido sinoviale e dai mediatori chimici in esso dispersi, volti a limitare il danno.

I frammenti osteocondrali liberi hanno una scarsa tendenza al riassorbimento per l'azione trofica espletata proprio dal liquido sinoviale, mezzo fisiologico di trasporto, di tutti i metaboliti, ossigeno compreso, necessari alla sopravvivenza dei condrociti e quindi della matrice cartilaginea. Da ricordare che il metabolismo del condrocita comporta uno scarso consumo di ossigeno: circa il 2% di quanto necessario alle cellule dei tessuti vascolarizzati.

Le fratture articolari più importanti, tipo Salter-Harris (Fig. 11), hanno quadri clinici ben evidenti con impotenza funzionale immediata e tale da non avere evoluzioni subdole come in quelle parcellari. Le conseguenze di fratture siffatte è spesso una malattia degenerativa articolare anche quando la riduzione del focolaio sembra soddisfacente: bastano, infatti, piccole incongruità sulla superficie articolare o piccole diastasi dei monconi per determinare deficit cartilaginei e, di conseguenza, processi infiammatori sub-acuti tali da determinare problemi ad andamento ingravescente.



**Figura 11: fratture di tipo Salter-Harris**

### *LUSSAZIONI, SUB-LUSSAZIONI E DISTORSIONI*

Le lussazioni sono la perdita completa e duratura dei normali rapporti di organi di movimento. Le lussazioni articolari sono, senza dubbio, le paratopie più importanti in traumatologia. Le sub-lussazioni sono la perdita incompleta e duratura dei normali rapporti fra organi di movimento, mentre le distorsioni o distrazioni articolari sono la perdita anche completa ma momentanea dei normali rapporti di contiguità (Mensa, 1951).

Le lussazioni possono essere aperte o chiuse: le aperte comportano il contatto diretto dell'articolazione con il mondo esterno e quindi l'impropria esposizione delle strutture agli agenti fisici, chimici ed infettivi con un ulteriore aggravamento della patologia, mentre quelle chiuse sono caratterizzate da importanti danni capsulari e legamentosi, qualche volta pure accompagnati da neuroprassia per stiramenti e/o compressioni di tronchi nervosi prossimi, ma godono sempre della protezione almeno del tegumento comune, quindi, di norma, non soggette ad ulteriori complicanze. Ancora le lussazioni possono essere recenti, se accadute da poco tempo e generalmente riducibili in modo incruento, oppure inveterate o croniche, se verificatesi da giorni o addirittura settimane e di norma irriducibili se non chirurgicamente.

Nelle lussazioni e sub-lussazioni è necessaria, per ridurre la paratopia, l'applicazione di una forza uguale e contraria a quella che ha determinato la dislocazione, mentre nelle distrazioni, al cessare della forza, la dislocazione si risolve da sola per l'elasticità dei tessuti. In tutti i casi si riscontrano comunque danni all'omeostasi dell'articolazione che sono prodromici ad artropatie croniche con quadri di malattia articolare degenerativa.

### ***SINTOMATOLOGIA IN CORSO DI ARTROSINOVITE***

L'artrosinovite è il comune denominatore di tutte le artropatie, almeno in ben determinati momenti evolutivi. Può essere quindi utile ricordarne la sintomatologia.

Un'artrosinovite essudativa si manifesta essenzialmente con: 1) rubor, arrossamento della parte per vasodilatazione; 2) tumor, aumento di volume della parte per l'essudazione articolare e paraarticolare; 3) calor, calore per l'aumento dell'afflusso di sangue; 4) dolor, dolore per stimolazione meccanica e chimica delle terminazioni nervose nocicettive; 5) functio laesa, disfunzione della parte per impedimento meccanico ed algico soprattutto con zoppia di grado variabile. Anche a riposo, l'animale tende a sottrarre l'arto al carico, mantenendolo addotto o abdotto, nel tentativo di avere una riduzione del dolore.

Questo corredo sintomatologico, immediatamente presente, tende alla regressione via via che si ha la rimozione dei mediatori della flogosi, se non si ripete o perdura la causa scatenante. In queste condizioni si ha la restitutio ad integrum e quoad functionem. Per quanto concerne le artrosinoviti infettive si può sperare in un recupero funzionale solo nei primi stadi delle forme cosiddette settiche, mentre in quelle suppurative il danno è sempre irreversibile ed invalidante. In queste ultime, di norma, si arriva sempre ad un'anchilosi totale o sub-totale dell'articolazione colpita.

Da un punto di vista clinico non si possono differenziare capsuliti, flogosi dello strato fibroso della capsula, e sinoviti, flogosi della sola intima: per la stretta colleganza dei due strati si osserva ben presto e comunque una flogosi di entrambi per continuità-contiguità.

Un'artrosinovite essudativa è denominata idrartrosi (aumento del contenuto liquido dell'articolazione) con conseguente ectasia capsulare. Ectasia ben evidente se l'articolazione non è coperta da grandi masse muscolari, come nelle parti distali degli arti. L'idrartrosi è determinato da uno squilibrio tra la produzione e il riassorbimento del liquido sinoviale. In corso di artrosinovite essudativa l'aumento della quantità di liquido è riconducibile all'azione dei mediatori chimici della flogosi che aumentano la permeabilità vasale e l'attività metabolica dei sinoviociti. In questa fase aumenta pure la quantità di cellule sinoviali ed ematiche. L'ectasia articolare determina un assottigliamento della parete, un aumento della superficie di scambio ed un avvicinamento dei capillari capsulari al lume articolare. Tutto questo influenza la permeabilità, con un aumento della velocità di scambio delle molecole di piccole dimensioni per aumentata diffusibilità, ma anche molecole di grandi dimensioni come il fibrinogeno e le proteine globulari, accumulate

nella membrana sinoviale infiammata, possono passare in cavità articolare e disperdersi. L'aumento del contenuto proteico e cellulare del liquido sinoviale, ne aumenta la pressione osmotica con un ulteriore richiamo d'acqua a livello articolare. Tutto questo determina un peggioramento dell'idrartro.

Il diminuito assorbimento del liquido sinoviale è imputabile alla congestione e/o ostruzione venosa e linfatica. L'alterazione degli strati fosfolipidici della membrana cellulare e l'attivazione locale delle piastrine inducono un aumento della sintesi di acido arachidonico e della cascata dei suoi metaboliti.

Il liquido sinoviale è il veicolo di trasporto delle sostanze nutritive per la cartilagine: un aumento della pressione intraarticolare comporta un alterato scambio nutrizionale a livello di cartilagine, nonché una difficile rimozione di cataboliti articolari per lo schiacciamento dei vasi sub-intimali e per la conseguente precoce fibrosi della capsula sinoviale. L'idrartro riduce indirettamente la vascolarizzazione della capsula e dei legamenti, determinando ipossia, acidosi ed ipoglicosi del liquido sinoviale e conseguenti disturbi nutrizionali della cartilagine articolare.

Il dolore è dimostrato dalla zoppia, di grado variabile in funzione dell'artropatia. La prova di flessione (flexion test), da effettuarsi sempre in sospetto di artropatia, esasperando la flessione dell'articolazione ipotizzata patologica per un tempo di 90 secondi, può implementare dolori articolari che si manifestano solo dopo sforzi intensi. La positività del test di flessione ci può aiutare nella diagnosi di patologie subdole. Il dolore è correlato alla pressione endo-articolare e la prova di flessione determina un aumento della pressione per una riduzione del volume dell'articolazione stessa. La sensazione algica, infatti, si genera quando stimoli meccanici, termici o chimici attivano i recettori delle fibre dolorifiche periferiche. La bradichinina, le prostaglandine ed altri mediatori chimici della flogosi, inoltre, abbassano la soglia dei recettori dolorifici.

Anche il sistema nervoso contribuisce alla flogosi: il neurone primario afferente trasmette al sistema nervoso centrale lo stimolo e libera perifericamente nei tessuti interessati neuromediatori flogogeni simili alla sostanza-P, neuro chinine A e B ed il peptide correlato al gene della calcitonina. In sintesi, il sistema nervoso non solo percepisce gli stimoli dolorifici in corso di artrosinovite, ma contribuirebbe anche alla flogosi.

La *functio laesa* è il più eclatante dei sintomi ed è strettamente legato al disturbo meccanico generato dall'idrartrosi e, soprattutto, al dolore derivante dal carico statico e dinamico.

Il dolore è imputabile a stimolazione meccanica e chimica, mediata dalle prostaglandine della serie E e della serie I, capaci anche di aumentare la risposta dei nocicettori alla bradichinina. I leucotrieni e prodotti intermedi della via del complemento attraggono chemiotatticamente nell'area infiammata neutrofili e macrofagi. Gli enzimi lisosomi ali elaborati dai sinoviociti ed i radicali liberi prodotti dai neutrofili e dai macrofagi determinano la degradazione dello ialuronano (sodio ialuronato) all'interno del liquido sinoviale ed interstiziale. Si osserva anche iperplasia ed ipertrofia della membrana sinoviale, con aumento del numero delle cellule sinoviali disperse nel liquido sinoviale stesso.

### ***PATOGENESI ED EVOLUZIONE DEL DANNO CONDRALE***

Ora interessa puntualizzare quello che avviene a livello articolare e che porta ai danni condrali, e non solo condrali, irreversibili propri delle artropatie degenerative. Per capire questi fenomeni dobbiamo focalizzare la nostra attenzione sui costituenti della cartilagine, quindi sul condrocita e sul distretto di matrice di pertinenza. Una volta compresi i

fenomeni patologici a livello di una o di un gruppo ristretto di cellule, diventa più facile capire quello che avviene a carico della superficie articolare.

La cartilagine è suscettibile di danni per cause traumatiche o metaboliche.

Il condrocita può andare incontro a sofferenza e morte, con conseguente condrodegenerazione del territorio di competenza, per un trauma diretto e localizzato oppure per azione di quelle molecole ad attività biologica (citochine, fattori di crescita, enzimi e loro inibitori, radicali liberi e prostaglandine) che, se liberate a livelli fisiologici, sono deputate a modulare i processi anabolici e catabolici e concorrono a mantenere l'omeostasi cartilaginea, ma capaci di innescare una cascata di eventi negativi, fino alla completa condrodegenerazione, se non più controllate reciprocamente.

Il condrocita, come tutte le cellule, ha un range entro il quale è in grado di adattare il proprio metabolismo e quindi superare il momento critico, riportando il "sistema articolazione" nella norma. Se si supera il valore soglia, il condrocita non è più in grado di rispondere adeguatamente agli stimoli e si innesca una cascata di eventi che porta a condrodegenerazione, ad osteosclerosi sub-condrale, a sinovite e/o capsulite.

Il complesso articolare, sotto l'azione di agenti fisici, chimici o infettivi, può andare incontro alla rottura dell'equilibrio biochimico instabile su cui poggia la sua omeostasi.

Molto sinteticamente si può dire che la liberazione di quantità improprie di citochine trovano un'inadeguata risposta inibitoria con attivazione degli enzimi litici (metalloproteinasi, serinoproteinasi, cisteinoproteinasi), a loro volta in eccesso rispetto ai loro inibitori. Gli enzimi litici, insieme a prostaglandine e radicali liberi, non più regimentati, determinano la depolimerizzazione dei proteoglicani di matrice, la frammentazione del collagene e, infine, il denudamento dell'osso sub-condrale.

La prima risposta del condrocita ad uno stimolo che ne altera l'omeostasi, qualunque sia la causa, è una fase reattiva di tipo compensatorio. In questa prima fase si assiste ad un aumento di tutte le attività del condrocita, sia in senso anabolico che catabolico: 1) mitosi condrocitaria, 2) liberazione di fattori di crescita (TGF- $\beta$ , FGF, IGF-1, GH), 3) liberazione di metalloproteinasi (collagenasi, proteoglicanasi, gelatinasi), 4) attivazione di inibitori di metalloproteinasi (TIMP), 5) aumento della sintesi di proteoglicani, 6) osteofitosi periferica a livello di anello pericondrale, 7) aumento dell'attività dei sinoviociti B della membrana e conseguente aumento dello ialuronato di sodio (HA).

La fase reattiva tenta di opporsi ai processi degenerativi promuovendo un ispessimento focale della matrice.

La fase successiva, seconda fase, è quella dello scompenso. Si verifica la prevalenza dei fenomeni catabolici su quelli anabolici: 1) aumentano gli enzimi litici (metalloproteinasi, serinoproteinasi, cisteinoproteinasi); 2) aumentano le citochine, le prostaglandine E, i radicali liberi dell'ossigeno, il nitrossido (monossido d'azoto); 3) diminuiscono i fattori di crescita (TGF- $\beta$ , FGF, IGF-1, GH); 4) diminuiscono gli inibitori delle metalloproteinasi (TIMP); 5) si ha la sintesi di proteoglicani modificati; 6) inizia un'attività osteoclastica a carico dell'osso sub-condrale; 7) diminuisce la sintesi dello ialuronato di sodio (ialuronano) per depressione dell'attività dei sinoviociti B.

L'ultima fase, terza fase, è quella della degenerazione: 1) caduta della produzione dei proteoglicani; 2) depolimerizzazione dei proteoglicani di matrice; 3) ulteriore aumento delle metalloproteinasi; 4) aumento ulteriore di citochine, prostaglandine E, radicali liberi dell'ossigeno, nitrossido (monossido d'azoto); 5) fibrillazione e fessurazione della cartilagine; 6) sclerosi dell'osso sub-condrale; 7) microfratture di trabecole ossee sub-condrali; 8) sinovite e capsulite.

Sulla scorta del razionale interpretativo della condrodegenerazione da un punto di vista biochimico, è possibile interpretare quello che avviene a livello cartilagineo, all'inizio solo visibile istologicamente ed in seguito anche macroscopicamente.

Le alterazioni iniziali sono legate alla perdita di fibre collagene, prima le più superficiali e poi anche le profonde, per azione enzimatica diretta. Di conseguenza diminuisce la capacità della rete di collagene di opporsi ad un ulteriore richiamo d'acqua da parte dei proteoglicani della matrice (diminuzione delle forze di resistenza del collagene) e così aumenta la quantità d'acqua contenuta nella matrice stessa; peraltro, i proteoglicani sono maggiormente prodotti dal condrocita in questa fase reattiva iniziale compensatoria. L'aumento di spessore della cartilagine, tipico di questa fase iniziale, è dovuto all'edema. I proteoglicani prodotti, tuttavia, non hanno caratteristiche normali: gli aggrecani sono ben presto carenti e sostituiti da proteoglicani piccoli (ad esempio il biglicano) funzionalmente inadatti. Il rilascio di frammenti cartilaginei, stimolando l'intima sinoviale e il microcircolo, determina il richiamo in cavità articolare, quindi anche a livello di cartilagine, di neutrofili, mastociti e cellule infiammatorie in genere. Queste cellule, a loro volta, liberano ancora altri enzimi ad attività catabolica con ulteriore aggravamento della degenerazione condrale.

Ogni fattore che interagisca con una cartilagine in grave sofferenza può determinare ulteriori danni: il trauma, inteso anche come solo carico statico, può essere causa di distacchi condrali od osteocondrali di varia entità.

### ***RIPARAZIONE DEL DANNO CARTILAGINEO***

Già si è detto che il condrocita è disperso in una matrice avascolare e priva di innervazione: da qui nasce la difficoltà di riparazione del danno condrale. Se si considera poi che il condrocita è come imprigionato nella rete collagenica della matrice e non vi è possibilità di rigenerazione dei gruppi isogeni, se distrutti, si evince che solo piccoli danni condrali possono essere riparati, per secrezione compensatoria, da proteoglicani di nuova formazione ed ivi migrati dalle zone adiacenti, mentre questo non è possibile per problemi diffusi. Un danno a tutto spessore della cartilagine, purché molto limitato, può avere una certa riparazione per scivolamento e ripiegamento della matrice residua all'interno del danno; questo tipo di riparazione, tuttavia, esita sempre un'area di minor resistenza ed un carico intenso può determinare nuova degenerazione.

Se il danno cartilagineo è diffuso, si assiste a processi riparativi in partenza dall'osso sub-condrale denudato, che, attraverso il reclutamento di cellule mesenchimali e neoangiogenesi di provenienza ossea, portano in loco fibroblasti capaci di produrre fibrocartilagine. La fibrocartilagine, tuttavia, non ha caratteristiche morfologiche e funzionali simili alla cartilagine ialina: è caratterizzata da grossolani fasci di fibre collagene di tipo I, disposti più o meno parallelamente, con cellule frammiste e scarsa presenza di proteoglicani. Ne risulta una struttura rigida ed inadatta a sopportare il normale carico articolare: rapidamente si osserva il disseccamento della fibrocartilagine con denudamento dell'osso. La distruzione della fibrocartilagine comporta la liberazione di nuovi mediatori della flogosi con ulteriore danno articolare: eburnizzazione dell'osso, formazione di osteofiti marginali, fratture trabecolari dell'osso sub-condrale, ispessimenti capsulari, riduzione della mobilità articolare.

## RAZIONALE DELLA RICERCA SPERIMENTALE

Le artropatie in genere ed in particolare l'artropatia degenerativa su base traumatica rivestono, sia in campo umano che veterinario, un'importanza di prim'ordine. Sono tanti gli atleti e non, uomini ed animali, che per insulti traumatici articolari subiscono trattamenti chirurgici, farmacologici e fisioterapici lunghi ed incerti nell'esito. Lo studio di nuove molecole volte a spegnere la flogosi rapidamente ed a contrastare la degenerazione condrocitaria e della matrice extracellulare della cartilagine ialina è sempre di grande attualità.

La resezione del legamento crociato anteriore del ginocchio, modello di Pond-Nuki (1973), è da tempo ampiamente accettata come modello sperimentale per lo studio dell'artropatia traumatica indotta. Su una siffatta artropatia è poi possibile la valutazione dell'efficacia di molecole volte al contrasto del deterioramento della matrice extra-cellulare per degenerazione e morte condrocitaria della cartilagine ialina articolare, conseguente al processo artritico e poi artrosico legato all'instabilità sperimentalmente indotta a carico di ginocchio.

Lo studio qui proposto vuole studiare le capacità antiflogistiche della curcumina ed eutrofiche per i condrociti articolari della associazione curcumina/ialuronato di sodio.

### Molecola da studiare e risultati aspettati

Le sostanze fitochimiche, cioè componenti biologicamente attivi, derivati da differenti porzioni di piante e privi di caratteri nutrizionali, sta richiamando negli ultimi anni un grosso interesse scientifico in quanto l'assunzione attraverso la semplice alimentazione di componenti con attività terapeutica è una prospettiva nuova e allettante.

Studi epidemiologici hanno dimostrato elevate potenzialità di queste sostanze nel combattere tumori e altre malattie croniche derivanti da stress ossidativi legati a un eccesso di radicali liberi (Liu, 2004). Altri studi epidemiologici (Mohandas e Desai, 1999) indicano una bassa incidenza di adenomi del piccolo e del grosso intestino nelle popolazioni dell'India dell'est, per contro un aumento dei tumori intestinali nelle popolazioni dell'ovest. Questi studi suggeriscono un ruolo protettivo degli antiossidanti naturali largamente utilizzati nella cucina dell'est India.

Alla luce di quanto detto, assume grande importanza la curcumina. La curcumina o diferuloilmetano è un polifenolo estratto dalla *Curcuma Longa* Linn. (Fig. 12) ed è considerata da FDA nella categoria GRAS (Generally Recognised as Safe). Questa molecola è accreditata di notevoli azioni farmacologiche, che vanno da prevenzione e cura di



Figura 12: *Curcuma Longa*

particolari degenerazioni cancerose (NCI, DCPC, 1996) ad inibizione del fenomeno infiammatorio. Quest'ultima azione è particolarmente interessante perché si sviluppa mediante l'inattivazione dei fattori di trascrizione quali NFκB, Ap-1 e la riduzione o l'annullamento della produzione di citochine pro-infiammatorie quali Tumor Necrosis Factor α (TNFα), Inter Leukin-1β, Inter Leukin-8 e la correlata Inducibile Nitric Oxide Synthase (iNOS) (Chan et al., 1998). Dal punto di vista chimico sembra essere un ottimo substrato per accomodare elettroni, infatti è in grado di interagire con il radicale superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) che risulta implicato nella patofisiologia di alterazioni quali ad esempio diabete, aterosclerosi, neoplasie, infiammazioni croniche. Curcumina esplica la sua azione farmacologica inattivando NF-kappaB, con conseguente mancata trascrizione del gene che codifica per l'enzima iNOS (Pan et al., 2000) che provoca a sua volta uno stress ossidativo, una delle principali cause della fase di iniziazione tumorale e dell'infiammazione. Le caratteristiche di completa atossicità e le proprietà antiinfiammatorie e antiossidanti di curcumina rendono la molecola estremamente interessante nell'ambito del controllo dell'infiammazione e del dolore.

Inoltre, curcumina ha mostrato notevole abilità di quencher di ioni O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Martelli et al., 2002).

Ora, l'infiammazione, anche di carattere non infettivo, risulta essere la causa più frequente delle varie patologie articolari che portano ad invalidità, più o meno temporanee, attraverso una serie di reazioni biochimiche che, liberando enzimi catabolici, sconvolgono l'ambiente della cavità articolare (Pezzoli et al., 1984; Botti et al., 1986; Pezzoli et al., 1988; Abatangelo et al., 1989; Schiavinato et al., 1989). Numerose ricerche mostrano che l'infiammazione porta al degrado dei proteoglicani (acido ialuronico e/o ialuronato di sodio) ma questo è solo il primo stadio per il successivo degrado della cartilagine articolare, segnatamente la matrice extracellulare. La nostra ricerca si inserisce su questo scenario e ha voluto valutare se l'associazione ialuronato di sodio-curcumina sia in grado di bloccare la degenerazione cartilaginea, creando condizioni eutrofiche per i condrociti. Nel nostro caso, lo ialuronato di sodio serve sia per rimpiazzare l'eventuale glicosaminoglicano endogeno degradato, sia per veicolare la curcumina con la quale forma un addotto molecolare (M. Martelli, L. Martelli, P. Botti, risultati da pubblicare). Questi studi partono da una valutazione su animali sperimentali, ma il trasferimento dei risultati in campo clinico, umano e veterinario, è facilmente intuibile.

Brevemente è giusto ricordare che l'acido ialuronico (HA) o ialuronato di sodio ha dimostrato in 40 anni e più di impiego clinico le proprie doti di eutrofizzante per la cartilagine (Rydell et al., 1970; Asheim e Lindblad, 1976; Busetto (1980), Rose, 1979; Auer et al., 1979; Del Bue e Botti, 1980; Gingerich et al., 1981; Pezzoli et al., 1983; Pezzoli et al., 1984; Pezzoli et al., 1985; Botti e Del Bue, 1986; Botti et al., 1986; Pezzoli et al., 1988; Abatangelo et al., 1988; Pezzoli et al., 1989; Botti et al., 1989; McIlwraith, 1997) mettendo a disposizione dei condrociti un elemento fondamentale per la formazione della matrice extracellulare – HA è l'“asse centrale e portante” su cui vengono legati i glicosaminoglicani con le proteine ponte -, e con notevoli doti viscoelastiche ed antifrizione, soprattutto se ad alto o altissimo peso molecolare (Gotoh et al., 1993; Aviad e Houpt, 1994; Asari et al. 1998; Botti, 1998; White et al., 1999).

L'attuale ricerca, focalizzata su HA addizionato a Curcumina, è nata come naturale evoluzione delle esperienze sperimentali (Abatangelo et al., 1989; Schiavinato et al., 1989; Schiavinato et al., 1991 ) e cliniche sull'impiego dell'acido ialuronico (HA) effettuate presso l'allora Istituto di Clinica Chirurgica Veterinaria dell'Università di Parma tra il 1980 e 1991 (Del Bue e Botti, 1980; Pezzoli et al., 1983; Pezzoli et al., 1984; Pezzoli et al.,

1985; Botti e Del Bue, 1986; Botti et al., 1986; Pezzoli et al., 1988; Abatangelo et al., 1988; Pezzoli et al., 1989; Botti et al., 1989).

I risultati allora ottenuti avevano validato la registrazione di un prodotto a base di HA, prima in campo veterinario e poi umano, da parte di un'industria farmaceutica italiana.

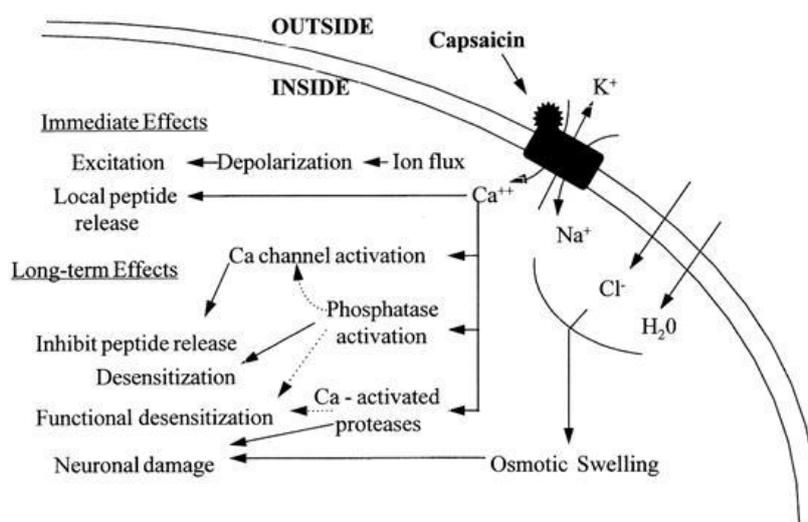
Un buon risultato, tuttavia, è sempre migliorabile.

Da questo assunto è nata l'idea di aggiungere all'HA la curcumina, sostanza capace di occupare, quindi inibire, i recettori vanilloidi e promuovendo l'inattivazione dei fattori di trascrizione quali NFkB, Ap-1 e la riduzione o l'annullamento della produzione di citochine pro-infiammatorie quali Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Inter Leukin-1 $\beta$ , Inter Leukin-8 e la correlata Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) (Chan et al., 1998).

A questo punto nascono le domande: a) cosa sono i recettori vanilloidi? b) che importanza hanno nel processo flogistico?

I recettori vanilloidi di tipo 1 (TRPV1) sono recettori espressi dai neuroni periferici sensitivi e giocano un ruolo importante nell'integrazione di diversi stimoli e nella modulazione dell'eccitabilità cellulare. Essi sono associati alle fibre afferenti primarie nocicettive a conduzione lenta e sono coinvolti in molteplici funzioni fisiologiche cellulari e in meccanismi patofisiologici di diverse malattie. Danni tissutali associati a infezioni, infiammazione o ischemia determinano la liberazione di mediatori chimici che attivano o sensibilizzano i terminali nocicettivi dei recettori.

Il TRPV-1 è un canale non selettivo cationico di natura eccitatoria (Fig. 13) e può essere attivato da diversi stimoli nocicettivi quali il calore, pH acidi, irritanti chimici, protoni e agonisti vanilloidi, così chiamati per la presenza nella loro struttura di un nucleo vanillico, come per esempio la capsaicina, alcaloide responsabile della piccantezza del peperoncino, oppure lo



**Figura 13: TRPV-1, canale selettivo cationico**

zingerone presente nello zenzero o la piperina nel pepe nero.

Come regola generale, i vanilloidi esercitano un'azione bifasica sui nervi sensoriali: un'iniziale eccitazione seguita da un duraturo periodo refrattario. L'esposizione alla capsaicina porta inizialmente una sensazione di bruciore dovuta all'eccitazione neuronale, successivamente si assiste a un periodo di analgesia, in cui il neurone mostra una desensibilizzazione funzionale e non riesce a rispondere a stimoli nocicettivi di qualsiasi natura. Questa proprietà analgesica ha stimolato la ricerca di derivati della capsaicina che mantenessero l'azione analgesica con minimo o meglio nullo effetto eccitatorio. Il coinvolgimento del TRPV-1 nella sensazione dolorifica e l'evidenza che, durante condizioni infiammatorie o infettive o ancora tumorali, l'espressione di questi stessi recettori aumenta, ha portato a ricercare e studiare nuove molecole antagoniste dei recettori vanilloidi. Abbiamo pensato di proporre la curcumina che agisce, così come altre molecole, come agonista dei recettori TRPV-1: tali molecole, funzionalmente, vanno ad

inattivare le fibre nocicettive dei nervi periferici e hanno dimostrato un potenziale terapeutico negli stati di dolore cronico ed iperalgesia.

L'importanza dei recettori vanilloidi nel processo flogistico risulta, quindi, essere importantissimo e da quanto sopra detto è evidente l'utilità di una loro inattivazione per ridurre gravità e durata del processo infiammatorio.

## **PROTOCOLLO SPERIMENTALE DEPOSITATO AL MINISTERO DELLA SALUTE E SEGUITO IN QUESTA RICERCA**

### **Preparazione della soluzione di curcumina**

Le soluzioni di curcumina da iniettare in articolazione, unitamente ad HA, avevano una concentrazione di curcumina pari a 1 mg/ml in una miscela 50:50 di acqua e polietilenglicole 200 (PEG 200). Dette soluzioni sono state preparate disciogliendo la curcumina nella miscela di acqua per preparazioni iniettabili e PEG 200. Quindi, sotto cappa a flusso laminare, la soluzione è stata filtrata attraverso un filtro con porosità nominale di 0,22 micronmetri e ripartito in flaconi precedentemente sterilizzati in autoclave secondo le indicazioni della Farmacopea Ufficiale XII ed. (121 °C per 15 minuti).

### **Animale prescelto**



La pecora sarda si presta alle necessità sperimentali:

1. ha un peso adeguato (kg.  $42\pm 5$ );
2. è abituata alle manipolazioni da parte dell'uomo;
3. è di facile reperimento;
4. è stata già utilizzata in studi sperimentali di ortopedia e traumatologia.

### **Provenienza delle pecore**

Essendo le pecore animali di interesse zootecnico e non essendo ricomprese nell'allegato 1 della legge 116/92, sono state acquistate presso allevamento zootecnico all'uopo autorizzato dalla AUSL competente, come previsto dalle normative vigenti, e sono state annotate sui registri della sperimentazione animale della sezione di Clinica Chirurgica Veterinaria e Medicina d'Urgenza dell'allora dipartimento di Salute Animale dell'Università degli studi di Parma, così come previsto dalla legislazione in tema di ruminanti.

### **Centro in cui si è eseguito lo studio sperimentale**

Gli esperimenti sono stati eseguiti presso le sale operatorie della sezione di Clinica Chirurgica Veterinaria dell'allora dipartimento di Salute Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Parma. Tali strutture erano state approvate, per quanto attiene gli aspetti igienico-sanitari, dalla AUSL 4 di Parma (competente sul territorio del comune di Parma) nonché alla visita ispettiva effettuata da funzionario dell'U.V.A.C. Emilia-Romagna, poi autorizzate dal competente Ministero della Sanità (oggi della Salute) – Direzione Generale Servizi Veterinari, Divisione VIII – con decreto ministeriale n. 26/94-A, rilasciato all'Università degli Studi di Parma in data 27 gennaio 1994.

### **Stabulazione e cura degli animali**

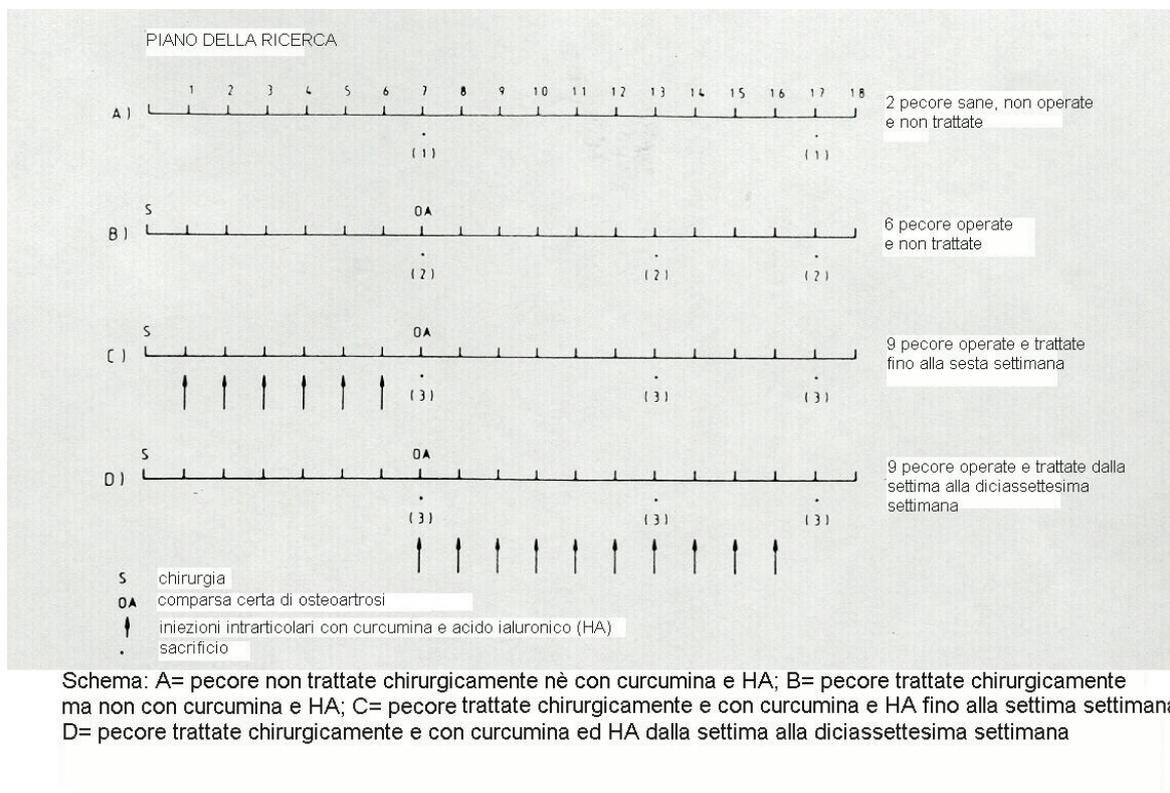
Gli animali sono stati stabulati presso le strutture del Dipartimento di Salute Animale, sezione di Clinica Chirurgica e Medicina d'Urgenza, della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Parma, già approvate, per quanto attiene gli aspetti igienico-sanitari, dalla AUSL 4 di Parma (competente sul territorio del comune di Parma) nonché alla visita ispettiva effettuata da funzionario dell'U.V.A.C. Emilia-Romagna ed infine autorizzate dal competente Ministero della Sanità – Direzione Generale Servizi Veterinari, Divisione VIII – con decreto ministeriale n. 26/94-A, rilasciato all'Università degli Studi di Parma in data 27 gennaio 1994.

I tecnici addetti ed i medici veterinari della sezione di Clinica Chirurgica Veterinaria hanno prestato le cure del caso durante tutto il periodo di osservazione.

### **Materiali e metodi.**

- Alle competenti Autorità fu chiesto di utilizzare fino ad un massimo di 32 pecore.
- 26 pecore adulte con le articolazioni delle ginocchia clinicamente e radiograficamente sane potevano essere immesse nello studio (le 6 mancanti per arrivare al numero complessivo sopra indicato di 32 erano tenute come riserva e sarebbero state introdotte nello studio solo in caso di eventuali incidenti intra-, peri- o post-operatori per avere la garanzia, a fine studio, del possibile utilizzo delle 26 unità preventivate).
- Resezione del legamento crociato anteriore per via artrotomica con tecnica chirurgica asettica in 26 pecore, previa anestesia generale inalatoria.
- 2 (due) pecore, non operate e non trattate con le molecole da testare, erano destinate a fungere da controlli e sacrificate 1 (una) alla 7<sup>a</sup> settimana e 1 (una) alla 17<sup>a</sup> settimana;
- 6 (sei) pecore, operate e non trattate con le molecole da testare, dovevano essere utilizzate per testimoniare l'andamento della patologia ed i relativi danni articolari senza alcun trattamento specifico e sacrificate 2 (due) alla 7<sup>a</sup> settimana, 2 (due) alla 11<sup>a</sup> settimana, 2 (due) alla 17<sup>a</sup> settimana;
- 9 (nove) pecore, operate, dovevano essere trattate, iniettando intraarticularmente con tecnica asettica e con cadenza settimanale, con il nuovo composto da testare per 6 volte iniziando 7 giorni dopo la resezione del legamento crociato craniale e sacrificate 3 (tre) alla 7<sup>a</sup> settimana, 3 (tre) alla 11<sup>a</sup> settimana, 3 (tre) alla 17<sup>a</sup> settimana;
- 9 (nove) pecore, operate, dovevano essere trattate, iniettando intraarticularmente con tecnica asettica e con cadenza settimanale, con il nuovo composto da testare per 10 volte iniziando dalla 7<sup>a</sup> settimana dopo la resezione del legamento crociato craniale e sacrificate 3 (tre) alla 7<sup>a</sup> settimana, 3 (tre) alla 11<sup>a</sup> settimana, 3 (tre) alla 17<sup>a</sup> settimana.

Per una rapida visualizzazione e miglior comprensione dello studio si riporta di seguito lo schema generale del piano della ricerca:



### Resezione del legamento crociato craniale secondo Pond-Nuki

Per indurre un'artropatia degenerativa nelle nostre pecore sperimentali è stata scelta la resezione del legamento crociato craniale secondo il modello di Pond-Nuki (1973), allora proposto nel cane. La resezione del legamento crociato craniale, nel cane come negli altri animali, provoca la destabilizzazione, in modo sempre riproducibile, dell'articolazione del ginocchio ed induce cambiamenti progressivi di tipo degenerativo a livello articolare.

I dati allora raccolti da Pond-Nuki - segni clinici, radiografici ed anatomico-patologici - permisero di stabilire che la progressione del danno articolare sperimentalmente indotto ha un percorso analogo a quello che si può osservare naturalmente in corso di una qualsiasi patologia articolare e ciò che ne deriva, in entrambi i casi, è un'osteoartrite più o meno grave.

Per il nostro studio abbiamo voluto e dovuto trasferire sulla pecora il modello di Pond-Nuki: la normativa vigente (L. 116/92), infatti, vieta l'utilizzo del cane a scopi sperimentali, se non in deroga. La nostra scelta è stata suggerita dal fatto che la pecora era stata già utilizzata in studi sperimentali di ortopedia e traumatologia.

### Anestesia

Tutte le pecore sottoposte a chirurgia sono state anestetizzate secondo il seguente protocollo:

- preanestesia sedativo-analgésica: Acepromazina 0,1 mg/kg + Xilazina 0,1 mg/kg p.v. i.m.;
- miorilassante: etere guaiacol glicerico (EGG) 8% ml 10/10 kg p.v. e.v.;
- induzione anestesia: tiopentone sodico 5% mg 10-15/1 kg p.v. e.v.;

- mantenimento: intubazione oro-tracheale con tubo di Magill e somministrazione O<sub>2</sub> al 40%, N<sub>2</sub>O al 57-58%, Alotano 2-3%.

### **Analgesia post-operatoria**

L'unico trattamento è stato l'impiego topico delle molecole da testare, tuttavia, qualora il dolore post-operatorio fosse stato giudicato eccessivo, con compromissione della qualità di vita del singolo, il protocollo sperimentale prevedeva la somministrazione di sostanze atte a dominare il dolore (esempio: buprenorfina al dosaggio di 10 µg/kg p.v. i.m.), tuttavia in nessun soggetto si rese necessario un trattamento di questo tipo.

### **Trattamenti farmacologici post-operatori**

Tutte le pecore trattate chirurgicamente sono state trattate peri- e post-operatoriamente con penicillina 2.000.000 U.I. e diidrostreptomina g. 1,0 ritardo ogni 72 ore per 3 volte, iniziando il giorno dell'intervento.

### **Sacrificio**

L'eutanasia era da effettuarsi, alla fine di ciascun periodo di osservazione, iniettando Tanax in ragione di ml 1/10 kg p.v. e.v..

Dopo il sacrificio, si procedeva al prelievo delle ginocchia per eseguire gli esami di laboratorio necessari alla valutazione degli effetti indotti dall'impiego delle sostanze oggetto di studio.

### **Smaltimento delle carcasse**

Terminata la sperimentazione su ciascuna pecora, è stata data comunicazione al Servizio Medico Veterinario della AUSL di Parma dell'avvenuto sacrificio dell'animale per gli opportuni provvedimenti previsti dalle normative vigenti. Le carcasse sono state temporaneamente poste in un congelatore all'uso destinato e successivamente smaltite attraverso ditta autorizzata alla distruzione come previsto dal regolamento CEE 1744/02, previa certificazione del Servizio Medico Veterinario della AUSL di Parma ed esecuzione, sempre da parte del Servizio Medico Veterinario della AUSL di Parma, dei prelievi per il controllo della *scrapie* secondo le normative vigenti.

### **Soggetti utilizzati e considerati in questa tesi di Dottorato**

Per questa ricerca sono state utilizzate n. 4 pecore di tutte quelle autorizzate a suo tempo. La ricerca, infatti, ha avuto una interruzione dovuta alla ristrutturazione di tutti gli stabulari, anche di quelli sperimentali, in preparazione della visita della Commissione EAEVE alla Facoltà. Durante questo periodo di forzata interruzione si è potuto meglio valutare i risultati ottenuti su questo esiguo numero di soggetti, raggiungendo il convincimento che quanto ottenuto poteva sì essere prodromico ad eventuali ulteriori prove ed approfondimenti, ma ugualmente questi riscontri erano già capaci di dimostrare l'utilità della associazione proposta e testata ancora su pochi soggetti sperimentali. L'HA, infatti, è in uso da quarant'anni e più con buoni risultati sia in campo umano che veterinario, mentre la curcumina è una molecola naturale, priva di tossicità, che non necessita di sperimentazione specifica.

Le quattro pecore immesse nello studio sono state utilizzate nel modo seguente:

- 1- pecora con marca auricolare n. 948, contrassegnata con "Nec. 6/2009", non è stata sottoposta ad alcun trattamento ed utilizzata come controllo normale;
- 2- pecora con marca auricolare n. 1113, contrassegnata con "Nec. 14/2009", operata secondo protocollo sperimentale al ginocchio destro, è stata trattata ad entrambe le ginocchia alla fine della seduta operatoria con *H<sub>2</sub>O sterile ml. 1.2 : PEG 200 (50 :*

50) ed utilizzata come controllo del solo *medium* (medium utilizzato per preparare la Curcumina per uso intraarticolare di questo studio);

- 3- pecora con marca auricolare n. 728, contrassegnata con “Nec. 12/2009”, operata secondo protocollo sperimentale al ginocchio destro, è stata trattata con infiltrazione settimanale al ginocchio operato con acido ialuronico (HA) mg. 10 + ml. 1 di soluzione contenente Curcumina alla concentrazione di 1 mg/ml (50:50 acqua e polietilenglicole 200 (PEG 200) a partire da 7 giorni dopo l’intervento per 6 volte in tutto (periodo osservazione: 7 settimane);
- 4- pecora con marca auricolare n. 958, contrassegnata con “Nec. 13/2009”, operata secondo protocollo sperimentale al ginocchio destro, è stata trattata con infiltrazione settimanale al ginocchio operato con acido ialuronico (HA) mg. 10 + ml. 1 di soluzione contenente Curcumina alla concentrazione di 1 mg/ml (50:50 acqua e polietilenglicole 200 (PEG 200) a partire da 7 giorni dopo l’intervento per 6 volte in tutto (periodo osservazione: 7 settimane).

Ovviamente ogni infiltrazione ha richiesto la preventiva estrazione di liquido articolare nella maggior quantità possibile onde poter introdurre la soluzione da iniettare.

### **Rilievi clinici nel periodo di osservazione post-chirurgica**

La pecora con marca auricolare n. 728 e quella con n. 958 hanno mostrato un andamento clinico più favorevole rispetto alla pecora con marca auricolare n.1113: hanno presentato una zoppia meno marcata ed in progressiva riduzione fino al momento dell’eutanasia (zoppia di 1° grado). Si è evidenziata, soprattutto, una minore risposta infiammatoria al trauma chirurgico ed alla instabilità del ginocchio conseguente alla resezione del legamento crociato craniale: l’edema infiammatorio è stato molto contenuto. Questa riduzione della flogosi è, a parere del nostro gruppo di ricerca, di grandissimo interesse e, già da solo, capace di giustificare l’impiego di curcumina, vista l’assoluta mancanza di effetti collaterali indesiderati riconducibili alla sostanza stessa.

La pecora con marca auricolare n. 1113 ha mostrato, invece, un andamento clinico meno favorevole rispetto alle altre due pecore: zoppia più marcata che si è ridotta ad una zoppia di 2° grado al momento dell’eutanasia ed edema infiammatorio legato all’artrotomia per la resezione del legamento crociato craniale più evidente e perdurante (15 giorni). La persistente presenza dell’edema infiammatorio, pur andando incontro ad una riduzione progressiva, anche se incompleta, ha comportato un inevitabile ispessimento della capsula articolare.

La pecora con marca auricolare n. 948, ovviamente, non ha mostrato alcun disturbo non essendo stata trattata in alcun modo e mantenuta solo come controllo.

### **Referto anatomoistopatologico di articolazioni del ginocchio dei quattro ovini sperimentali**

Le articolazioni femoro-tibio-rotulee sono state osservate macroscopicamente, fotografate e successivamente sezionate e sottoposte a prelievi per indagini istopatologiche. Sono stati prelevati campioni di condilo femorale mediale e laterale, di troclea femorale, di superficie articolare tibiale, comprendenti la cartilagine articolare e l’osso sub-condrale, quindi immersi in formalina neutra tamponata al 4% P/V a pH 7.4 per un periodo di 4-7 giorni.

I campioni di tessuto osseo sono stati poi decalcificati con Decalcifer II (Surgipath) per 7 giorni, successivamente disidratati, inclusi in paraffina e tagliati al microtomo per ottenere sezioni istologiche di 5µm di spessore su cui sono state effettuate le colorazioni istologiche di base (Ematossilina Eosina e Tricromica di Masson).

Anche i campioni di capsula e membrana sinoviale sono stati prontamente fissati in formalina neutra tamponata al 4% P/V, pH 7.4 per 24-48 ore; successivamente sono state

allestite sezioni istologiche paraffiniche (5µm di spessore), colorate con Ematossilina Eosina e con la Tricromica di Masson.

Sono state sottoposte agli esami sopra descritti le ginocchia di quattro ovini femmine di razza sarda:

1. pecora con marca auricolare n. 948, sacrificata il 02/02/2009 e contrassegnata con il numero di registro 06-2009 della sezione di Anatomia Patologica Veterinaria;
2. pecora con marca auricolare n. 728, sacrificata il 16/03/2009 e contrassegnata con il numero di registro 12-2009 della sezione di Anatomia Patologica Veterinaria;
3. pecora con marca auricolare n. 958, sacrificata il 16/03/2009 e contrassegnata con il numero di registro 13-2009 della sezione di Anatomia Patologica Veterinaria;
4. pecora con marca auricolare n. 1113, sacrificata il 16/03/2009 e contrassegnata con il numero di registro 14-2009 della sezione di Anatomia Patologica Veterinaria.

### ***PECORA CON MARCA AURICOLARE N. 948, CONTRASSEGNAZIONE NEC. 6/2009***

---

#### **REFERTO MACROSCOPICO:**

**Ginocchio destro:** sono state osservate le membrane sinoviali e le cartilagini articolari dei vari segmenti ossei componenti l'articolazione del ginocchio:

- **cavità articolare:** assenza di liquidi patologici.
- **membrane sinoviali:** non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **condili femorali:** non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **troclea femorale:** non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **piatto tibiale:** non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **menischi:** non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **legamenti crociati:** non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.

**Ginocchio sinistro:** sono state osservate le membrane sinoviali e le cartilagini articolari dei vari segmenti ossei componenti l'articolazione del ginocchio:

- **cavità articolare:** assenza di liquidi patologici.
- **membrane sinoviali:** appaiono nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **condili femorali:** appaiono nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **troclea femorale:** appare nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **piatto tibiale:** appare nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.

- **menischi:** appaiono nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **legamenti crociati:** appaiono nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.

## REFERTO ISTOLOGICO:

**Ginocchio destro:** sono state osservate istologicamente le membrane sinoviali e le cartilagini articolari dei vari segmenti ossei componenti l'articolazione del ginocchio:

- **membrane sinoviali:** si presentano normostrutturate.
- **condili femorali:** si presentano normostrutturati.
- **troclea femorale:** si presenta normostrutturata.
- **piatto tibiale:** si presenta normostrutturato.
- **menischi:** si presentano normostrutturati.
- **legamenti crociati:** si presentano normostrutturati.

**Ginocchio sinistro:** sono state osservate istologicamente le membrane sinoviali:

- **membrane sinoviali:** si presentano normostrutturate.
- **condili femorali:** si presentano normostrutturati.
- **troclea femorale:** si presenta normostrutturata.
- **piatto tibiale:** si presenta normostrutturato.
- **menischi:** si presentano normostrutturati.
- **legamenti crociati:** si presentano normostrutturati.

*PECORA CON MARCA AURICOLARE N. 728,  
CONTRASSEGNAZIONE NEC. 12/2009*

---

## REFERTO MACROSCOPICO:

**Ginocchio destro:** sono state osservate le membrane sinoviali e le cartilagini articolari dei vari segmenti ossei componenti l'articolazione del ginocchio:

- **cavità articolare:** presenza di circa 2 ml di liquido sinoviale sieroso, lievemente ematico.
- **membrane sinoviali:** le membrane sinoviali si presentano modicamente iperemiche, soprattutto in corrispondenza della porzione laterale della patella.
- **condili femorali:** la cartilagine articolare si presenta biancastra, lucida e la superficie appare liscia. Non si evidenziano ispessimenti, aree di erosione e/o proliferazioni macroscopicamente apprezzabili.
- **troclea femorale:** la cartilagine articolare si presenta biancastra, lucida e la superficie appare uniformemente liscia. Il labbro mediale presenta una piccola area di forma tondeggiante, lievemente depressa e di color giallo chiaro. Non si evidenziano ispessimenti, aree di erosione e/o proliferazioni macroscopicamente apprezzabili.

- **piatto tibiale:** la cartilagine articolare si presenta biancastra, lucida e la superficie appare liscia. Non si evidenziano ispessimenti, aree di erosione e/o proliferazioni macroscopicamente apprezzabili.
- **menischi:** le superfici articolari si presentano modicamente corrugate e di color giallo chiaro. Non si rilevano aree di erosione e/o proliferazione macroscopicamente evidenti.
- **legamenti crociati:** si presentano modicamente iperemici. Non si rilevano altre alterazioni macroscopicamente apprezzabili.

**Ginocchio sinistro:** sono state osservate le membrane sinoviali e le cartilagini articolari dei vari segmenti ossei componenti l'articolazione del ginocchio:

- **cavità articolare:** assenza di liquidi patologici.
- **membrane sinoviali:** appaiono nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **condili femorali:** appaiono nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **troclea femorale:** appare nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **piatto tibiale:** appare nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **menischi:** appaiono nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **legamenti crociati:** appaiono nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.

## REFERTO ISTOLOGICO:

**Ginocchio destro:** sono state osservate istologicamente le membrane sinoviali e le cartilagini articolari dei vari segmenti ossei componenti l'articolazione del ginocchio:

- **membrane sinoviali:** la membrana sinoviale si presenta normostrutturata con superficie liscia o con diverse formazioni villose (con uno o più strati di cellule sinoviali che poggiano sullo strato sottostante); sono inoltre presenti, a livello di strato sub-intimale, rare cellule mononucleate e macrofagi contenenti emosiderina. In corrispondenza del menisco laterale, in alcune aree, si evidenziano aree di fibrosi sub-intimale con presenza di macrofagi contenenti granuli di emosiderina. Si rileva inoltre, a carattere focale, iperplasia dei sinoviociti.
- **condili femorali:** nel condilo laterale la cartilagine presenta uno spessore normale, non si rilevano lesioni significative a livello dei diversi strati. Nel condilo mediale lo spessore della cartilagine si presenta nella norma; la superficie si presenta lievemente corrugata, è inoltre presente una modica disorganizzazione dei condrociti nei diversi strati cartilaginei. La porzione più distale del condilo (a contatto con il menisco) mostra anche fenomeni di necrosi condrocitaria a carattere focale e la presenza, soprattutto nello strato superficiale, di lacune condrocitarie vuote.
- **piatto tibiale e menisco:** la superficie articolare si presenta corrugata e la matrice fondamentale appare rigonfia. A carattere focale si rilevano frammentazioni del menisco.

**Ginocchio sinistro:** sono state osservate istologicamente solo le membrane sinoviali:

- **membrane sinoviali:** si evidenziano sinoviociti normostrutturati disposti in monostrato che poggiano su tessuto adiposo. Si rileva inoltre la presenza, nello strato subintimale, di alcuni aggregati perivascolari di linfociti ed iperplasia dei sinoviociti a carattere focale.

***PECORA CON MARCA AURICOLARE N. 958,  
CONTRASSEGATA NEC. 13/2009***

---

## **REFERTO MACROSCOPICO:**

**Ginocchio destro:** sono state osservate le membrane sinoviali e le cartilagini articolari dei vari segmenti ossei componenti l'articolazione del ginocchio:

- **cavità articolare:** presenza di circa 2ml di liquido sinoviale torbido e di colore giallastro.
- **membrane sinoviali:** le membrane sinoviali si presentano iperemiche.
- **condili femorali:** appaiono lucidi e di color biancastro. Il condilo mediale presenta un'area irregolare depressa (erosa) di circa 1cmx0,5cm di color giallastro. La fossa intercondiloidea e la porzione distale della troclea appaiono traslucide, di color aranciato con formazioni tondeggianti rossastre (aree emorragiche).
- **piatto tibiale:** la cartilagine articolare si presenta biancastra, lucida e la superficie appare liscia. Non si evidenziano ispessimenti, aree di erosione e/o proliferazioni macroscopicamente apprezzabili.
- **menischi:** le superfici articolari si presentano modicamente corrugate e di color giallo chiaro. Non si rilevano aree di erosione e/o proliferazione macroscopicamente evidenti.
- **legamenti crociati:** appaiono iperemici, edematosi ed avvolti da tessuto adiposo modicamente iperemico.

**Ginocchio sinistro:** sono state osservate le membrane sinoviali e le cartilagini articolari dei vari segmenti ossei componenti l'articolazione del ginocchio:

- **cavità articolare:** assenza di liquidi patologici.
- **membrane sinoviali:** appaiono nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **condili femorali:** appaiono nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **troclea femorale:** appare nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **piatto tibiale:** appare nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **menischi:** appaiono nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **legamenti crociati:** appaiono nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.

## REFERTO ISTOLOGICO:

**Ginocchio destro:** sono state osservate istologicamente le membrane sinoviali e le cartilagini articolari dei vari segmenti ossei componenti l'articolazione del ginocchio:

- **membrane sinoviali:** i sinoviociti appaiono per lo più in monostrato. In corrispondenza dello strato sub-intimale si rileva un lieve aumento della componente fibroblastica e aggregati nodulari di plasmacellule. Nella porzione più superficiale dello strato subintimale si osserva un modico aumento delle cellule mononucleate, di mastociti, macrofagi e fibroblasti. Nello strato profondo si evidenziano macrofagi contenenti pigmento giallastro (emosiderina). In corrispondenza dell'area del menisco laterale dell'arto destro i sinoviociti appaiono in monostrato, si osserva inoltre, a livello di strato subintimale, la presenza di pigmenti.
- **condili femorali:** nel condilo laterale si osserva la diminuzione dello spessore della cartilagine articolare, rigonfiamento e degenerazione dei condrociti.
- **troclea femorale:** si rileva minor spessore della cartilagine e, a carattere focale, frammentazioni dello strato superficiale della cartilagine articolare.
- **rotula:** rare frammentazioni a livello di superficie articolare e fissurazioni che interessavano i primi strati cartilaginei.
- **piatto tibiale:** la cartilagine articolare appare in parte atrofica con fenomeni focali di necrosi condrocitaria e presenza di fissurazioni verticali profonde.

**Ginocchio sinistro:** sono state osservate istologicamente le membrane sinoviali:

- **membrane sinoviali:** i sinoviociti appaiono per lo più in monostrato; scarsi appaiono gli infiltrati perivascolari di linfociti nello strato subintimale profondo.

*PECORA CON MARCA AURICOLARE N. 1113,  
CONTRASSEGNAZIONE NEC. 14/2009*

---

## REFERTO MACROSCOPICO:

**Ginocchio destro:** sono state osservate le membrane sinoviali e le cartilagini articolari dei vari segmenti ossei componenti l'articolazione del ginocchio:

cavità articolare: presenza di circa 4 ml di liquido sinoviale sieroso di color giallastro.

- **membrane sinoviali:** si presentano modicamente iperemiche.
- **condili e troclea femorale:** appaiono lucidi e di color biancastro. La superficie articolare dei condili, in corrispondenza della porzione rivolta all'interno dell'articolazione, presenta incipienti fenomeni erosivi. La fossa intercondiloidea e la porzione distale della troclea appaiono di colore rosato e mostrano anch'essi fenomeni erosivi.
- **patella:** la porzione prossimale della faccia articolare della patella, mostra la presenza di un'area di erosione in cui la superficie articolare appare di color giallastro.

- **piatto tibiale:** la cartilagine articolare si presenta biancastra, lucida e la superficie appare liscia. Non si evidenziano ispessimenti, aree di erosione e/o proliferazioni macroscopicamente apprezzabili.
- **menischi:** le superfici articolari si presentano modicamente corrugate e di color giallo chiaro. Non si rilevano aree di erosione e/o proliferazione macroscopicamente evidenti.
- **legamenti crociati:** appaiono modicamente iperemici ed edematosi.

**Ginocchio sinistro:** sono state osservate le membrane sinoviali e le cartilagini articolari dei vari segmenti ossei componenti l'articolazione del ginocchio:

- **cavità articolare:** assenza di liquidi patologici.
- **membrane sinoviali:** appaiono nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **condili femorali:** appaiono nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **troclea femorale:** appare nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **piatto tibiale:** appare nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **menischi:** appaiono nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.
- **legamenti crociati:** appaiono nei limiti della normalità, non si osservano alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti.

## REFERTO ISTOLOGICO:

**Ginocchio destro:** sono state osservate istologicamente le membrane sinoviali e le cartilagini articolari dei vari segmenti ossei componenti l'articolazione del ginocchio:

- **membrane sinoviali:** i sinoviociti per lo più in monostrato sono appoggiati su tessuto connettivo denso. Si rileva un modico aumento dei mononucleati nello strato subintimale. Si osserva inoltre atrofia e degenerazione dei fasci muscolari sottostanti.
- **condili femorali:** nei condili la superficie articolare si presenta irregolare con fissurazioni verticali, si rileva inoltre la presenza di un'area emorragica nel tessuto osseo subcondrale.
- **troclea femorale:** si osservano fenomeni regressivi che interessano soprattutto lo strato superficiale della cartilagine articolare: minor metacromasia della sostanza fondamentale, fissurazioni a decorso verticale, frammentazioni, iperplasia dei condrociti a carattere focale, fenomeni di fibrosi dello strato superficiale della cartilagine articolare.
- **rotula:** rare frammentazioni a livello di superficie articolare e fissurazioni anche profonde che interessavano gli strati cartilaginei.
- **piatto tibiale:** la cartilagine articolare si presenta atrofica con fenomeni focali di necrosi condrocitaria. Nella porzione caudale del piatto tibiale si evidenzia la diminuzione dello spessore e la presenza di fissurazioni anche profonde.

**Ginocchio sinistro:** sono state osservate istologicamente solo le membrane sinoviali:

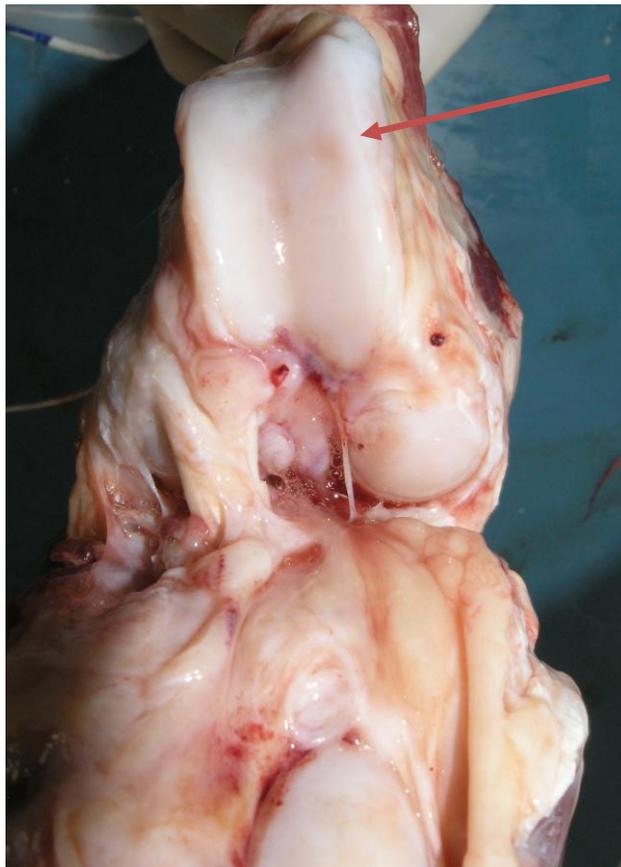
- **membrane sinoviali:** si rilevano sinoviociti in monostrato che poggiano su tessuto adiposo. Sono inoltre presenti scarsi infiltrati perivascolari di linfociti nello strato sub-intimale profondo.

## ESAME ANATOMOPATOLOGICO: OSSERVAZIONI E COMMENTO

Lo studio dei quadri istopatologici delle articolazioni di ginocchio della pecora con numero d'orecchio 748 (nec. 06/2009) non ha portato alla evidenziazione di alcuno stato patologico, come era ovvio, essendo una pecora di controllo in bianco.

L'osservazione istopatologica dell'articolazione del ginocchio destro dei tre soggetti (contrassegnati dal numero 728, 958, 1113) e sottoposti a sperimentazione, ha evidenziato soprattutto fenomeni degenerativi di diversa gravità a carico delle cartilagini articolari, dei condili femorali, del piatto tibiale, della rotula e in misura minore coinvolgimento delle membrane sinoviali che mostrano lievi quadri di infiammazione cronica.

In particolare, la **pecora con marca auricolare n. 728 (nec. 12/2009)** presentava all'esame macroscopico lesioni erosive modeste e localizzate solo a livello di troclea femorale (piccola area di forma tondeggiante, lievemente depressa e di color giallo chiaro a livello di labbro mediale).

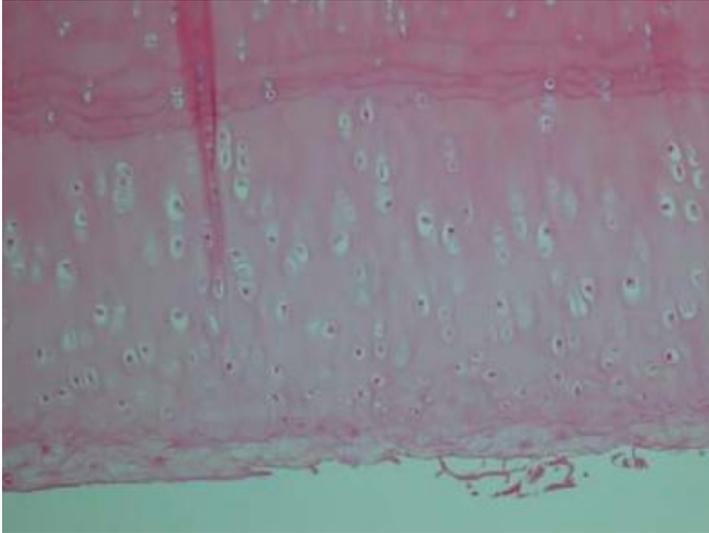


**Ginocchio destro: lesione erosiva a livello di troclea femorale.**

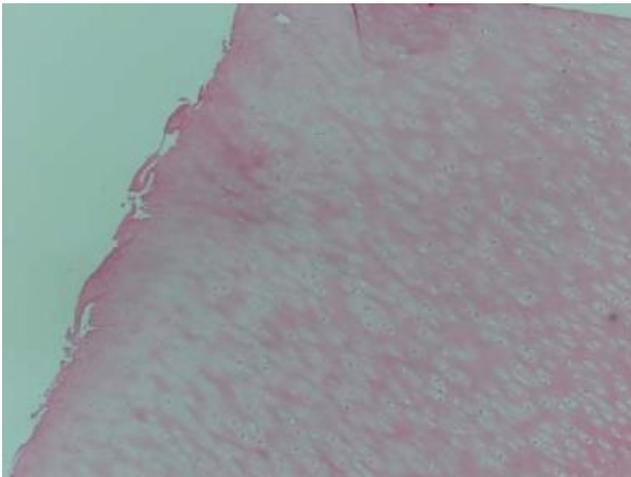
Istologicamente si rileva a livello di cartilagine articolare del condilo mediale femorale una modica disorganizzazione dei condrociti nei diversi strati cartilaginei.

La porzione più distale del condilo (a contatto con il menisco) mostra anche fenomeni di necrosi condrocitaria a carattere focale e la presenza, soprattutto nello strato superficiale, di lacune condrocitarie vuote.

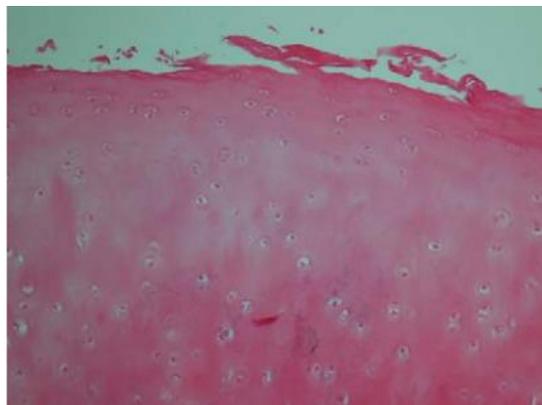
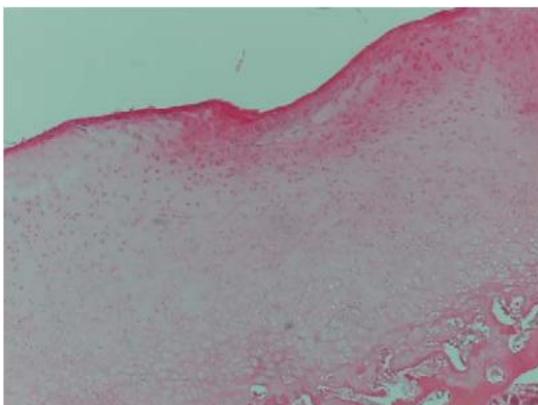
Piatto tibiale e menisco: la superficie articolare si presenta corrugata e la matrice fondamentale appare rigonfia. A carattere focale si rilevano frammentazioni superficiali del menisco.



Piatto tibiale (rigonfiamento della matrice fondamentale, EE 4X)

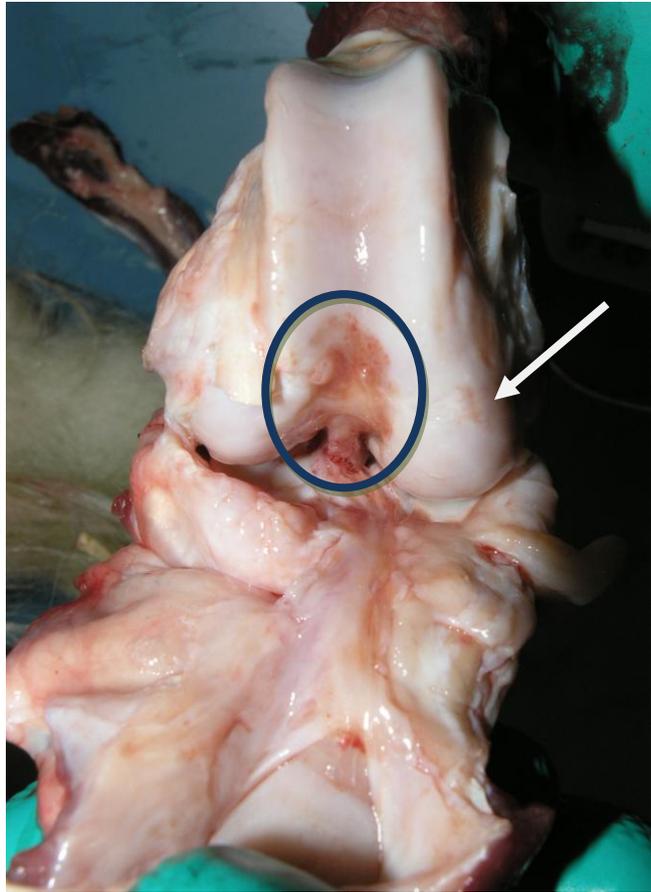
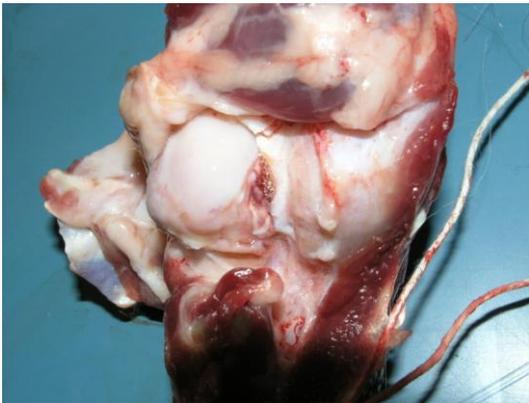


Rotula (frammentazioni superficiali della cartilagine articolare, EE 4X)



Condilo femorale con frammentazioni, corrugamenti e disorganizzazione condrocitaria degli strati superficiali della cartilagine articolare, EE 4, 10X.

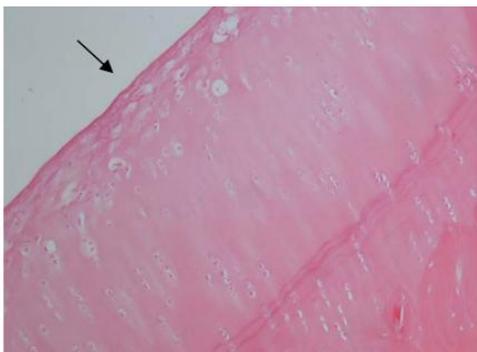
Nella **pecora contrassegnata dalla marca auricolare n. 958 (nec. 13/2009)** si osservano macroscopicamente lesioni erosive solo a carico del condilo femorale mediale in cui si evidenzia un'area irregolare depressa di circa 1 cm X 0,5 cm di color giallastro, mentre nella fossa intercondiloidea e nella porzione distale della troclea si evidenziano formazioni tondeggianti rossastre (aree emorragiche). Le superfici articolari dei menischi si presentano modicamente corrugate e di color giallo chiaro.



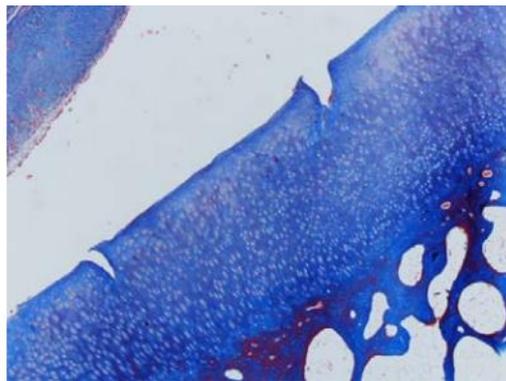
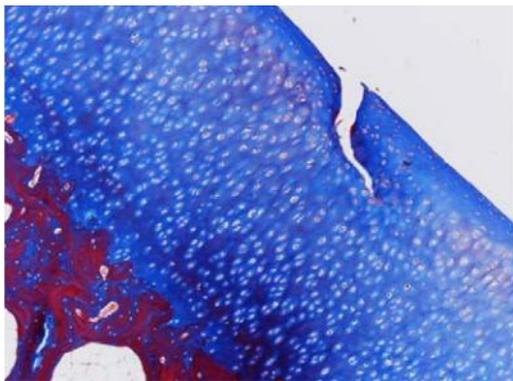
Istologicamente nel condilo femorale laterale si osserva la diminuzione dello spessore della cartilagine articolare, rigonfiamento e degenerazione dei condrociti. A livello di troclea femorale si rileva minor spessore della cartilagine e a carattere focale frammentazioni dello strato superficiale della cartilagine articolare.

Nelle sezioni istologiche della rotula si osservano rare frammentazioni a livello di superficie articolare e fessurazioni che interessavano i primi strati cartilaginei.

Nel piatto tibiale la cartilagine articolare appare in parte atrofica con fenomeni focali di necrosi condrocitaria e presenza di fessurazioni verticali profonde.



Condilo femorale con necrosi condrocitaria, EE 4X (Ematossilina-Eosina).



Fessurazioni verticali e iperplasia condrocitaria (Tricromica di Masson 4X, 2X)

Nella **pecora contrassegnata dalla marca auricolare n. 1113 (nec. 14/2009)** i fenomeni erosivi sono maggiormente pronunciati e interessano prevalentemente i condili e la troclea femorale. La superficie articolare dei condili, in corrispondenza della porzione rivolta all'interno dell'articolazione, presenta fenomeni erosivi. La fossa intercondiloidea e la porzione distale della troclea appaiono di colore rosato e mostrano anch'essi fenomeni erosivi. La rotula (la porzione prossimale della faccia articolare) mostra la presenza di un'area di erosione di color giallastro.

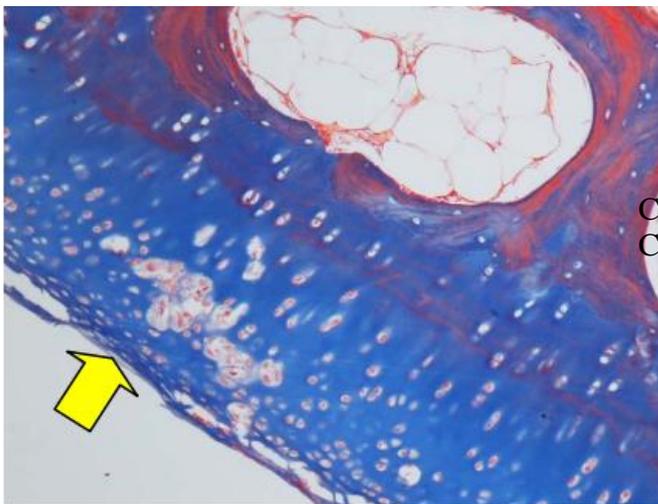


Dal punto di vista microscopico nei condili femorali la superficie articolare si presenta irregolare con fessurazioni verticali, si rileva inoltre la presenza di un'area emorragica nel tessuto osseo sub-condrale.

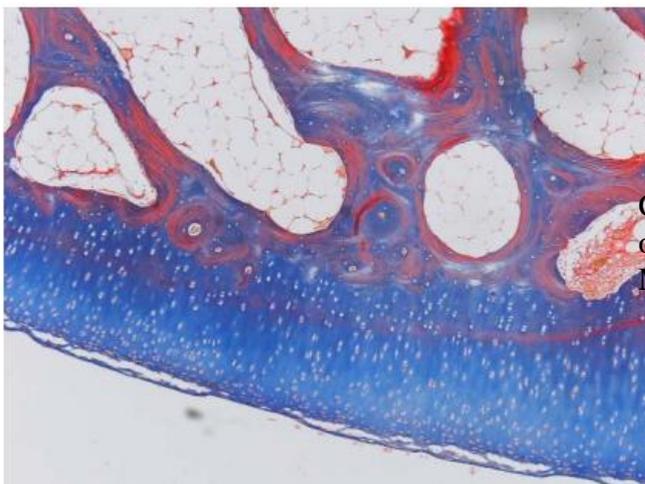
Nelle sezioni istologiche della troclea femorale si osservano fenomeni regressivi che interessano soprattutto lo strato superficiale della cartilagine articolare: minor metacromasia della sostanza fondamentale, fessurazioni a decorso verticale, frammentazioni cartilaginee, iperplasia dei condrociti a carattere focale, fenomeni di fibrosi dello strato superficiale della cartilagine articolare.

Nella rotula sono evidenti rare frammentazioni a livello di superficie articolare e fessurazioni anche profonde che interessano gli strati cartilaginei.

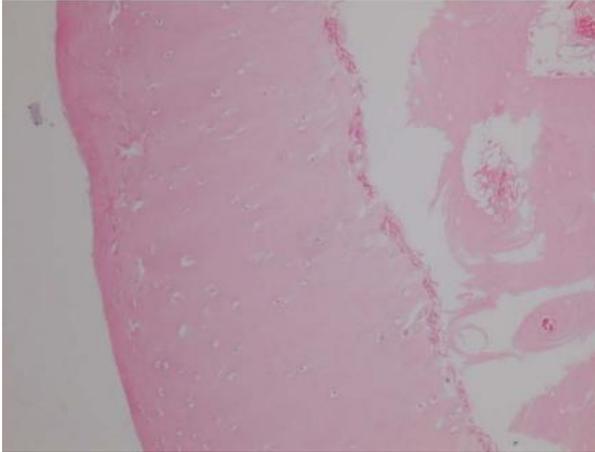
La cartilagine articolare del piatto tibiale si presenta atrofica con fenomeni a carattere focale di necrosi condrocitaria. Nella porzione caudale del piatto tibiale si evidenziano fessurazioni verticali anche profonde della cartilagine articolare.



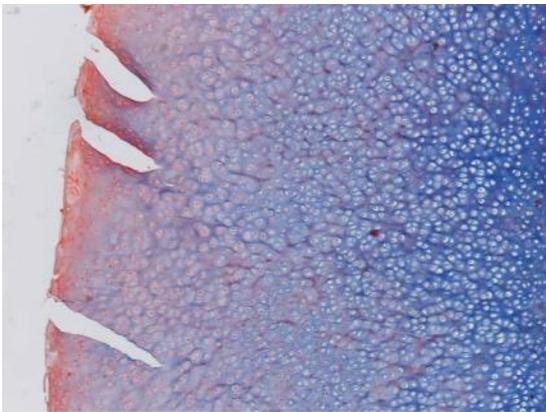
Condilo femorale: lacune condrocitarie. Colorazione Tricromica di Masson, 4X.



Condilo femorale: fessurazioni orizzontali. Colorazione Tricromica di Masson, 2X.



Troclea femorale: atrofia e necrosi condrocitaria, EE 4X.



Piatto tibiale: fessurazioni verticali profonde e iperplasia condrocitaria. Colorazione Tricromica di Masson, 10 X.

### *Sintesi dello studio e sintesi diagnostica*

---

Sono state sottoposte a sperimentazione numero 4 pecore femmine di razza sarda. Prima di avviare la sperimentazione, le pecore erano state visitate clinicamente e le ginocchia pure valutate radiograficamente. La ricerca ha potuto aver inizio solo dopo che le 4 pecore qui considerate furono giudicate sane sia da un punto di vista clinico che radiografico. Le pecore furono mantenute, per tutta la durata della ricerca, nelle medesime condizioni di stabulazione, libere di muoversi a proprio piacimento in un box di circa 16 m<sup>2</sup> e con uno spazio esterno di eguale dimensione.

La prima pecora, con marca auricolare n. 748, sacrificata il 2/02/2009 e contrassegnata con il numero di registro 06/2009, era sana, non operata, non trattata e destinata a fungere da controllo.

Le restanti tre pecore, marche auricolari n. 728, 958, 1113, con il numero di registro rispettivamente 12/2009, 13/2009 e 14/2009, sono state sacrificate il 16/03/2009.

A queste tre pecore era stato resecato il legamento crociato craniale del ginocchio per via artrotomica secondo il modello di Pond-Nuki.

La pecora n. 1113 è stata trattata ad entrambe le ginocchia, alla fine della seduta operatoria, con 1,2 ml H<sub>2</sub>O sterile e polietilenglicole (PEG) 200 (50:50) ed utilizzata come controllo del solo medium in cui per le altre era stata disciolta la curcumina.

Le pecore n. 728 e 958, invece, sono state trattate con infiltrazioni settimanali al ginocchio destro, ginocchio operato, con mg 10 di HA e 1 ml di soluzione contenente curcumina alla concentrazione di 1 mg/ml (50:50 H<sub>2</sub>O sterile e PEG 200) a partire dal 7° giorno dell'intervento chirurgico per 6 volte.

L'esame post-mortem delle ginocchia dell'ovino contrassegnato con marca auricolare n. 748 e numero di registro 06/2009, controllo in bianco non operato e non trattato farmacologicamente, è stato ovviamente negativo: le strutture articolari di entrambe le ginocchia, sia macroscopicamente che istologicamente, risultarono indenni da alterazioni significative.

La gravità delle lesioni riscontrate negli altri tre ovini sperimentali, sottoposti a resezione del legamento crociato craniale, può essere così sintetizzata:

- il soggetto con le lesioni più estese e gravi era contrassegnato dalla marca auricolare numero 1113 (necropsia numero 14/2009) e sottolineo che non era stato mai trattato con HA e curcumina. Il ginocchio destro, operato e sottoposto alla sola infiltrazione del medium [*H<sub>2</sub>O sterile e polietilenglicole (PEG) 200 (50:50)*], presentava fenomeni erosivi piuttosto evidenti e pronunciati che interessavano prevalentemente i condili femorali, la troclea femorale e la rotula: le immagini della porzione prossimale della faccia articolare della rotula mostravano la presenza di un'area di erosione di colore giallastro. Mentre al ginocchio sinistro, non operato e trattato anch'esso col solo medium, non si era evidenziata alcuna alterazione a testimonianza della innocuità della soluzione stessa e della sua perfetta tollerabilità.
- il soggetto contrassegnato dalla marca auricolare numero 728 (necropsia numero 12/2009) presentava lesioni limitate per estensione e gravità, in particolare si sono osservate macroscopicamente lesioni erosive limitate e modeste, localizzate solo a livello di troclea femorale.
- il soggetto contrassegnato dalla marca auricolare numero 958 (necropsia numero 13/2009) presentava lesioni intermedie tra quelle rilevate nella pecora numero 1113 e quelle rilevate alla numero 728, sia per estensione che per gravità. In particolare, si sono osservate macroscopicamente lesioni erosive solo a carico del condilo femorale mediale in cui si evidenziava un'area irregolare depressa di circa 1 cm x 0,5 cm di color giallastro, mentre nella fossa intercondiloidea e nella porzione distale della troclea si evidenziavano formazioni tondeggianti rossastre (aree emorragiche).

Da sottolineare il fatto che in tutti e tre i soggetti sottoposti a resezione del legamento crociato craniale i quadri istologici hanno confermato, per gravità, quanto osservato clinicamente prima e macroscopicamente dopo il sacrificio dei soggetti.

### **Conclusioni**

In sintesi, le pecore n. 958 e 728, trattate con l'associazione HA e curcumina settimanalmente dopo resezione del legamento crociato craniale del ginocchio destro, hanno mostrato un andamento del quadro clinico più favorevole nelle 7 settimane di osservazione ed i quadri istologici hanno dimostrato danni di minore gravità rispetto a quanto osservato nella pecora n. 1113, operata ma non trattata farmacologicamente. La pecora n. 948 è stata tenuta come controllo in bianco e, come ovvio, non ha mostrato alterazione alcuna delle ginocchia agli esami post-mortem.

Da quanto sopra esposto, mi sento nel giusto affermando che l'associazione **curcumina** e **acido ialuronico** (HA) è attiva nel ridurre i danni articolari legati, in questa sperimentazione, ad instabilità del ginocchio. Tale considerazione è senz'altro estensibile a gran parte delle artropatie non infettive. L'infiltrazione endoarticolare di acido ialuronico esogeno, infatti, rende disponibile la sostanza fondamentale su cui si legano i glicosaminoglicani (condroitin 4/6-solfato, keratan-solfato e piccole quantità di dermatan-solfato ed eparan-solfato), estrusi dai condrociti, per "restaurare" e/o rimpiazzare la matrice extracellulare gravemente alterata da un qualsivoglia processo patologico, mentre la **curcumina** garantisce effetti antiinfiammatori ed antiedemigeni inattivando i fattori di trascrizione quali NFkappaB, Ap-1 e riducendo o annullando la produzione di citochine pro-infiammatorie quali Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Inter Leukin-1 $\beta$ , Inter Leukin-8 e la correlata Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) (Chan et al., 1998). Inoltre, la curcumina ha mostrato notevole abilità di quencher di ioni O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Martelli et al., 2002) e come tale in grado di ridurre i danni causati dai radicali liberi dell'ossigeno (ROS).

L'infiammazione asettica è causa frequente, anzi frequentissima, di danni articolari con invalidità, più o meno temporanea, attraverso una serie di reazioni biochimiche che, liberando enzimi catabolici, sconvolgono l'ambiente della cavità articolare (Pezzoli et al., 1984; Botti et al., 1986; Pezzoli et al., 1988; Abatangelo et al., 1989; Schiavinato et al., 1989). Numerose ricerche mostrano che l'infiammazione porta al degrado dei glicosaminoglicani, ma questo è solo il primo stadio per il successivo degrado della cartilagine articolare in toto con la scomparsa più o meno estesa della cartilagine ialina e la sua sostituzione con fibrocartilagine.

Questa ricerca, seppure avvalorata da pochissime osservazioni, ci ha confermato nella convinzione che l'associazione HA-curcumina è in grado di bloccare la degenerazione cartilaginea, creando condizioni eutrofiche per i condrociti grazie all'HA, ma pure spegnendo o riducendo in modo significativo il processo infiammatorio attraverso l'azione della curcumina.

La conclusione finale che mi sento di trarre da questa esperienza è che l'azione sinergica della associazione proposta, **HA-curcumina**, è un possibile e valido aiuto nella prevenzione/riduzione del danno articolare per la sostituzione dell'HA endogeno degradato e per la riduzione dell'intensità e durata del processo flogistico, nonché per l'effetto analgesico, garantiti dalla curcumina.

## BIBLIOGRAFIA

- Abatangelo G., Botti P., Del Bue M., Gei G., Samson J.C., Cortivo R., De Galateo A., Martelli M.: “Intraarticular sodium hyaluronate injections in the Pond-Nuki experimental model of osteoarthritis in dogs: I”, *Biochemical results. Clin. Orthop.* 241:278-285, 1989.
- Abatangelo G., Schiavinato A., Del Bue M., Botti P., Cortivo R., De Galateo A., Gei G., Samson J.: “Effetto dell’acido ialuronico su colture di condroblasti e nell’osteoartrosi sperimentale nel cane secondo il modello di Pond-Nuki”, Società Italiana di Reumatologia, Incontri Reumatologici Romani, Roma, 5-8 ottobre 1988.
- Asari A., Miyauchi S., Matsuzaka S., Ito T., Kominami E., Uchiyama Y.: “Molecular weight-dependent effects of hyaluronate on the arthritic synovium”, *Arch. Histol. Cytol.*, 61:125–135, 1998.
- Asheim A., Lindblad G.: “Intra-articular treatment of arthritis in race-horses with sodium hyaluronate”, *Acta Vet. Scand.*, 17:379–394, 1976.
- Auer J.A., Fackelman G.E., Gingerich D.A., Fetter A.W.: “Effect of hyaluronic acid in naturally occurring and experimentally induced osteoarthritis”, *Am. J. Vet. Res.*, 41:568–575, 1979.
- Aviad A.D., Houpt J.B.: “The molecular weight of therapeutic hyaluronan (sodium hyaluronate): How significant is it?”, *J. Rheum.*, 21:297–301, 1994.
- Balazs E.: “Viscosupplementation for treatment of osteoarthritis: from initial discovery to current status and results”, *Surg. Technol. Int.*, 12:278–289, 2004.
- Barone R.: “Anatomia comparata dei mammiferi domestici”, Edagricole, Bologna, 2004.
- Botti P.: “Argomenti di patologia chirurgica veterinaria”, Editrice Esculapio, Bologna, 1984.
- Botti P., Del Bue M., Gei G., Martelli M., Pezzoli G., Samson J.C., Schiavinato A., Abatangelo G.: “The Cartilage Response to Intra-articular Sodium Hyaluronate Injection in Experimental Canine Osteoarthritis”, *Italy-Usa Joint Meeting on Advances in Orthopaedic Surgery and Traumatology, Basic Science: Pathogenesis of Osteoarthritis*, 58, 1986.
- Botti P., Del Bue M.: “Use of High Molecular Weight Hyaluronic Acid (HA) in Equine Joint Disease in Trotters”, *Italy-Usa Joint Meeting on Advances in Orthopaedic Surgery and Traumatology, Basic Science: Pathogenesis of Osteoarthritis*, 57, 1986.
- Botti P., Del Bue M., Pezzoli G., Schiavinato A., Gei G., Samson J., Abatangelo G.: “Risposta della cartilagine alla somministrazione intraarticolare di ialuronato di sodio nell’osteoartrosi sperimentale del cane”, *POSTER, Atti IX Congresso Nazionale Società Italiana di Ippologia*, vol. IX, 252, 1989.
- Botti P.: “Clinical aspects and diagnostic approach to equine DJD / Inquadramento clinico e approccio diagnostico delle DJD del cavallo atleta”, *Conferenza tenuta nell’ambito della giornata “Condroid degenerazione nelle DJD del cavallo atleta”*, San Patrignano, 15 marzo 1998; *Innovation in Veterinary Medicine*, n. 1 (3), 2-6, 1998.
- Busetto R.: *Tattamento delle artropatie del cavallo da corsa con ialuronato di sodio. Atti S.I.S.Vet.*, vol. XXXIV, 212, 1980.
- Caterina M. J., Julius D.: “The Vanilloid Receptor: A Molecular Gateway to the Pain Pathway”, *Annu. Rev. Neurosci.*, 24: 487-517, 2001.

- Chan M.M.Y., Ho C.T., Huang, H.I.: "Effects of three dietary phytochemicals from tea, rosemary and turmeric on inflammation-induced nitrite production", *Cancer Lett.*, 96:23-29, 1995.
- Chan M.M.Y., Huang H.I., Fenton M.R., Fong D.: "In vivo inhibition of nitric oxide synthase gene expression by curcumin, a cancer preventive natural product with anti-inflammatory properties", *Biochem. Pharmacol.*, 55 (12): 1955-1962, 1998.
- Cortright D.N., Szallasi A.: "Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1", An update. *Eur. J. Biochem.*, 2004 May; 271(10):1814-9.
- Cotran R.S., Kumar V., Robbins S.L.: "Le basi patologiche delle malattie", Piccin, Nuova Libreria s.p.a., Padova, 1992.
- Dean G., Hoyland J.A., Denton J., Donn R.P., Freemont A.J.: "Mast Cell in synovium and synovial fluid in osteoarthritis", *British Journal of Rheumatology*, 32 (8), 671-675, 1993.
- Del Bue M., Botti P.: "L'impiego dell'acido ialuronico nelle affezioni articolari del cavallo", *Nota preliminare. La Clin. Vet.*, 103, 651, 1980.
- Ghosh P, Guidolin D.: "Potential mechanism of action of intra-articular hyaluronan therapy in osteoarthritis: are the effects molecular weight dependent? ", *Semin. Arthritis. Rheum.*, 32:10–37, 2002.
- Gingerich D.A., Auer J.A., Fackelman G.E.: "Effect of exogenous hyaluronic acid on joint function in experimentally induced equine osteoarthritis: dosage titration studies", *Res. Vet. Sci.*, 30:192–197, 1981.
- Gotoh S., Onaya J., Abe M.: "Effects of the molecular weight of hyaluronic acid and its action mechanisms on experimental joint pain in rats", *Ann. Rheum. Dis.*, 52:817–822, 1993.
- Hilbert B.J., Rowley G., Antonas K.N., McGill C.A., Reynoldson J.A., Hawkins C.D.: "Changes in the synovia after the intra-articular injection of sodium hyaluronate into normal horse joints and after arthrotomy and experimental cartilage damage", *Aust. Vet. J.*, 62:182–185, 1985.
- Konttinen Y.T., Saari H.T., Nordstrom D.: "Effect of interleukin-1 on hyaluronate synthesis by synovial fibroblast cells", *Clin. Rheum.*, 10:151–154, 1991.
- Kotevoglou N., Iyibozkurt P.C., Hiz O., Toktas H., Kuran B.: "A prospective randomized controlled clinical trial comparing the efficacy of different molecular weight hyaluronan solutions in the treatment of knee osteoarthritis", *Rheum. Int.*, 26:325–330, 2006.
- Liu R. H.: "Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action", *J. Nutr.*, 134: 3479S-3485S, 2004.
- Martelli M. et al., *Ann. Chim.*, 92, 281-88, 2002.
- McIlwraith C.W.: "Use of sodium hyaluronate (Hyaluronan) in equine joint diseases", *Equine Vet. Educ.*, 9: 296–304, 1997.
- McNeil H.P.: "The Mast Cell and inflammation", *Australian, New Zeland Journal of Medicine*, 26: 216-225, 1995.
- Mensa A.: "Patologia speciale e clinica chirurgica veterinaria", UTET, Torino, 1951.
- Mohandas K.M., Desai D.C.: "Epidemiology of digestive tract cancers in India, V: large and small bowel", *Indian J. of gastroenterology*, 18: 118-121, 1999.
- Murrell G.A., Doland M.M., Jang D., Szabo C., Warren R.F., Hannafin J.A.: "Nitric Oxide: an important articular free radical", *Journal of Bone and Joint Surgery*, 78 (2), 264-274, 1996.
- NCD, DCPC: "Clinical Development Plant: Curcumin", *J. Cell. Biochem.*, 1996.

- Palmer J.L., Bertone A.L.: "Joint structure, biochemistry and biomechanical disequilibrium in synovitis and equine joint disease", *Equine Veterinary Journal*, 26, 263-277, 1994.
- Pan M.H., Lin-Shiau S.Y., Lin J.K.: "Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of IkappaB kinase and NFkappa B activation in macrophages", *Biochem. Pharmacol.*, 60:1665-1676, 2000.
- Pezzoli G., Botti P., Peri P.: "Topical use of hyaluronic acid in the treatment of equine arthropathy", *Proceedings of the 6th National Convention of the Italian Society of Hyppology. Salsomaggiore Terme, Italy, June 8-9, 1983.*
- Pezzoli G., Botti P., Del Bue M., Martelli M., Abatangelo G., Cortivo R., De Galateo A., Gei G., Samson J.C.: "Hyaluronic Acid Treatment in Canine Experimental Arthropathy", *Proceed. 15<sup>th</sup> Congr. Europ. Soc. Vet. Surg., Berne, 150, 1984.*
- Pezzoli G.: "Role of hyaluronic acid in equine arthropathies", *Proc. of the International Congress on Hyaluronic Acid in the Treatment of Equine Arthritis/Arthrosis, Parma, Italy, May 19, 1984.*
- Pezzoli G., Martelli M., Abatangelo G., Botti P., Del Bue M., Gei G., Samson J.C.: "Behandlung mit Natriumhyaluronat von chirurgisch verursachter Arthropaties in Hunde", *EULAR Symposium, 187, Wien, 9-12 Oktober 1985.*
- Pezzoli G., Botti P., Zanichelli S., Scrollavezza P.: "Chirurgia articolare in cavalli sportivi: impiego di acido ialuronico ad alto peso molecolare", *Atti IX Congresso Nazionale Società Italiana di Ippologia, vol. IX, 137-142, 1989.*
- Pezzoli G., Botti P., Del Bue M., Martelli M., Cortivo R., De Galateo A., Abatangelo G., Gei G., Samson J.C.: "Hyaluronic Acid Treatment in Canine Experimental Arthropaty", *6<sup>th</sup> SEAPAL Congress of Rheumatology, W13-8, Tokio, 5-10 settembre 1988.*
- Pond M. J., Nuki G.: "Experimentally-induced osteoarthritis in the dog", *Ann. Rheum. Dis.* 32:387, 1973.
- Rose R.J.: "The intra-articular use of sodium hyaluronate for the treatment of osteoarthrosis in the horse", *New Zeland Vet. J.*, 27:5-8, 1979.
- Rydell N.W., Butler J., Balazs E.A.: "Hyaluronic acid in synovial fluid", *Acta Vet. Scand.*, 11:139-155, 1970.
- Schiavinato A., Abatangelo G., Pezzoli G., Botti P., Perbellini A., Govoni E.: "Intra-Articular NA-Hyaluronate Injection. An Experimental Study in Dogs", *The 3<sup>rd</sup> ASEAN Congress of Rheumatology, Bangkok, 1991.*
- Schiavinato A., Lini E., Guidolin D., Pezzoli G., Botti P., Martelli M., Coltivo R., De Galateo A., Abatangelo G.: "Intraarticular sodium hyaluronate injections in the Pond-Nuki experimental model of osteoarthritis in dogs: II. Morphological findings", *Clin. Orthop.* 241, 286-299, 1989.
- Sterner O., Szallasi A.: "Novel natural vanilloid receptor agonists: new therapeutic targets for drug development", *Trends Pharmacol. Sci.*, 20:459-465, 1999.
- Szallasi A., Blumberg P. M.: "Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms", *Pharmacol. Rev.*, 51 (2): 159-212, 1999.
- Szallasi A., Appendino G.: "Vanilloid receptor TRPV1 antagonists as the next generation of painkillers. Are we putting the cart before the horse", *J. Med. Chem.*, 47:2717-2723, 2004.

- Tulamo R.M., Heiskanen T., Salonen M.: “Concentration and molecular weight distribution of hyaluronate in synovial fluid from clinically normal horses and horses with diseased joints”, *Am. J. Vet. Res.*, 5:710–715, 1994.
- Tulamo R.M., Houttu J., Tupamaki A., Salonen M.: “Hyaluronate and large molecular weight proteoglycans in synovial fluid from horses with various arthritides”, *Am. J. Vet. Res.*, 6:932–937, 1996.
- Walker P.S., Dowson D., Longfield M.D., Wright V.: ““Boosted Lubrication” in synovial joints bt fluid entrapment and enrichment”, *Ann. Rheum. Dis.*, 27:512, 1968.
- White G.W., Sittes T., Hamm J., Pool R.: “Evaluation of the efficacy of various sodium hyaluronate preparations in an induced equine carpitis model”, *J. Equine Vet. Sci.*, 19:331–337, 1999.
- Wobig M., Bach G., Beks P., Dickut A., Runzheiner J., Schwieger G., et al.: “The role of elastoviscosity in the efficacy of viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a comparison of Hylan G-F 20 and a lower molecular weight hyaluronan”, *Clin. Ther.*, 21:1549–1562, 1999.

## **RINGRAZIAMENTI**

Giunta al termine di questo studio sperimentale e di questa mia esperienza nel Dottorato di Ricerca in “Ortopedia degli animali domestici” mi corre l’obbligo di ringraziare quanti mi hanno aiutato e sostenuto in questo percorso:

- Prof. Stefano Zanichelli, coordinatore del Dottorato e mio Tutor, per la pazienza con cui mi ha seguito ed incoraggiato sempre e soprattutto in questi tre anni di Dottorato;
- Prof. Ferdinando Gazza, mio co-Tutor in questo triennio, per il sostegno ed i consigli dati;
- Prof. Attilio Corradi e prof.ssa Anna Cantoni della sezione di Anatomia Patologica Veterinaria del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell’Università di Parma per le valutazioni post-mortem dei soggetti sperimentali;
- Il Personale docente e non docente delle sezioni di “Clinica Chirurgica Veterinaria e Medicina d’Urgenza” e della sezione di “Anatomia degli Animali di Interesse Medico Veterinario” per la disponibilità offertami;
- Prof. Mario Martelli, già professore ordinario di Chimica nell’Università di Padova, ispiratore di questa ricerca ed instancabile nello stimolare a sempre meglio fare;
- Dott.ssa Laura Martelli, PhD nell’Università di Padova, per la sua disponibilità ed aiuto nella acquisizione di dati e bibliografia sui recettori vanilloidi e non solo;
- La mia famiglia, come sempre punto saldo della mia vita, sostegno e aiuto anche in questi tre anni di Dottorato.