

453284

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE**  
**Dottorato di Ricerca in Biochimica**  
**VII CICLO**

**CARATTERIZZAZIONE BIOCHIMICA**  
**DELLE FASI ORGANICA E MINERALE DEL**  
**TESSUTO OSSEO NEL RATTO**

Tesi di Dottorato di Ricerca in Biochimica  
Dott. Milena Romanello '65

CW

Tutore:  
Chiar.mo Prof. Luigi Moro,  
Università degli Studi di Trieste

Coordinatore:  
Chiar.mo Prof. Benedetto de Bernard,  
Università degli Studi di Trieste

Dipartimento di Biochimica, Biofisica e  
Chimica delle Macromolecole  
Università degli Studi di Trieste

TRIESTE 1996

DR060/4

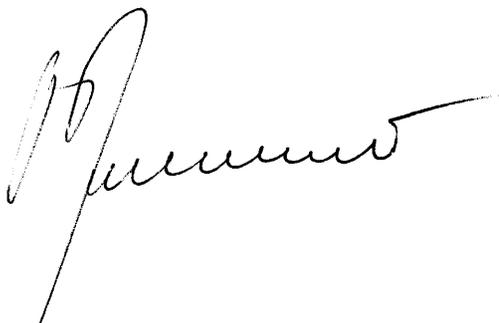
**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE**  
**Dottorato di Ricerca in Biochimica**  
**VII CICLO**

**CARATTERIZZAZIONE BIOCHIMICA  
DELLE FASI ORGANICA E MINERALE DEL  
TESSUTO OSSEO NEL RATTO**

Tesi di Dottorato di Ricerca in Biochimica  
Dott. Milena Romanello



Tutore:  
Chiar.mo Prof. Luigi Moro,  
Università degli Studi di Trieste



Coordinatore:  
Chiar.mo Prof. Benedetto de Bernard,  
Università degli Studi di Trieste

Dipartimento di Biochimica, Biofisica e  
Chimica delle Macromolecole  
Università degli Studi di Trieste

TRIESTE 1996

**Ad Antonio  
e ai miei genitori**

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>1</b>
1.1 Organizzazione strutturale dell'osso.....	1
1.1.1 Le cellule dell'osso.....	3
Gli osteoblasti.....	3
<i>Fattori ed ormoni che controllano la funzione degli osteoblasti.....</i>	8
Gli osteoclasti.....	9
<i>Fattori ed ormoni che controllano l'attività degli osteoclasti.....</i>	10
<i>Fattori sistemici.....</i>	13
<i>Fattori locali.....</i>	14
<i>Altri fattori.....</i>	17
Gli osteociti.....	19
1.1.2 La matrice.....	20
Il Collagene.....	22
<i>Struttura del collagene.....</i>	22
<i>Tipi di collagene.....</i>	26
<i>Biosintesi del collagene.....</i>	27
Le proteine non collageniche.....	39
<i>Proteine che mediano l'interazione cellulare.....</i>	40
<i>Proteoglicani.....</i>	40
<i>Proteine contenenti acido <math>\gamma</math>-carbossiglutammico.....</i>	41
<i>Fattori di crescita.....</i>	41
1.1.3 Il minerale.....	42
1.2 Modellamento e rimodellamento.....	54
1.2.1 Meccanismo di riassorbimento osseo.....	56
1.2.2 Meccanismo di formazione dell'osso.....	58
1.2.3 Processo di mineralizzazione.....	60
1.2.4 Regolazione del rimodellamento.....	62
Regolazione sistemica del rimodellamento osseo.....	68
Ormoni calciotropi.....	68
<i>Paratormone.....</i>	68
<i>Vitamina D.....</i>	69
<i>Calcitonina.....</i>	73
Insulina.....	73
Ormone della crescita (GH).....	74
Ormoni tiroidei.....	74

Glucocorticoidi.....	74
Estrogeni.....	75
Androgeni.....	77
Regolazione locale del rimodellamento osseo.....	80
Fattori di crescita sintetizzati dalle cellule ossee.....	80
<i>Insulin-like growth factors (IGFs)</i> .....	80
<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math> (TGF- <math>\beta</math>)</i> .....	82
<i>Fibroblast growth factor (FGF)</i> .....	82
<i>Platelet-derived growth factor (PDGF)</i> .....	83
Fattori di crescita sintetizzati da tessuti correlati all'osso.....	83
1.3 Funzioni fisiologiche di calcio, fosforo e magnesio.....	84
<i>Calcio</i> .....	85
<i>Fosforo</i> .....	87
<i>Magnesio</i> .....	88
1.4 Regolazione dell'omeostasi minerale ossea.....	88
<i>Assorbimento intestinale di calcio e fosfato</i> .....	89
<i>Autoregolazione dell'assorbimento di calcio e fosfato</i> .....	90
<i>Regolazione del riassorbimento renale di calcio e fosfato tramite il PTH</i> .....	90
<i>Autoregolazione dell'escrezione renale di calcio</i> .....	91
<b>2. IL RATTO COME MODELLO ANIMALE PER LO STUDIO DEL METABOLISMO DEL TESSUTO OSSEO.....</b>	<b>92</b>
<b>3. SCOPO DELLA RICERCA.....</b>	<b>97</b>
<b>4. TECNICHE IMPIEGATE.....</b>	<b>99</b>
4.1 Cromatografia.....	99
<i>Cromatografia di adsorbimento</i> .....	100
<i>Cromatografia di ripartizione</i> .....	100
<i>Cromatografia a scambio ionico</i> .....	101
<i>Cromatografia di coppia ionica</i> .....	102
4.1.1 Cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC).....	102
4.2 Spettrometria di massa.....	104
4.2.1 Spettrometria di massa "Fast Atom Bombardment" (FAB-MS)....	106
4.3 Analisi termogravimetrica.....	108
4.4 Diffrazione di raggi-X.....	110

4.5 Spettroscopia ad assorbimento infrarosso.....	115
4.6 Spettroscopia ad assorbimento atomico.....	118
<b>5. PROGETTI SVILUPPATI.....</b>	<b>122</b>
5.1 Caratterizzazione dell'attività fosfocitrato sintetasica.....	122
5.1.1 Introduzione.....	122
5.1.2 Materiali e Metodi.....	125
5.1.3 Risultati.....	129
5.1.4 Discussione.....	143
5.2 Studio delle modificazioni post-traduzionali del collagene di tipo I dell'osso corticale e trabecolare nel ratto.....	146
5.2.1 Introduzione.....	146
5.2.2 Materiali e Metodi.....	147
5.2.3 Risultati.....	155
5.2.4 Discussione.....	163
5.3 Caratterizzazione chimica e strutturale della fase minerale dell'osso corticale e trabecolare nel ratto.....	167
5.3.1 Introduzione.....	167
5.3.2 Materiali e Metodi.....	169
5.3.3 Risultati.....	172
5.3.4 Discussione.....	180
<b>6. CONCLUSIONI GENERALI.....</b>	<b>182</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>185</b>
<b>ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI E DELLE COMUNICAZIONI A CONGRESSI.....</b>	<b>215</b>
<b>RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>221</b>

## ABBREVIAZIONI

A	assorbanza
Arg	arginina
ATP	adenosina 5'-trifosfato
BCA	acido bicinconinico
BGP	Bone-gla-Protein (osteocalcina)
BSP	sialoproteina ossea
CAD	Collisionally Activated Decomposition
cAMP	adenilato 3',5'-ciclico (AMP ciclico)
CFU-GM	Colony Forming Units-Granulocyte Macrophage
CI-MS	spettrometria di massa a ionizzazione chimica
CORT	osso corticale
CSF	Colony Stimulating Factors
CT	calcitonina
DHLN	diidrossilisinonorleucina
DPD	deossipiridinolina
EDTA	acido etilendiamminotetracetico
EGF	Epidermal Growth Factor
EI-MS	spettrometria di massa a ionizzazione elettronica
FAB-MS	spettrometria di massa "fast atom bombardment"
FGF	Fibroblast-Growth Factor
FMOC-Cl	fluorenilmetossicarbonilcloruro
FN	fibronectina
G-OH-Lys	galattosilidrossilisina
GG-OH-Lys	glucosilgalattosilidrossilisina
GH	ormone della crescita
gla	acido $\gamma$ -carbossiglutammico
Gly	glicina
HA	idrossiapatite
HEPES	acido N-2-idrossietilpiperazino-N'-2-etansulfonico
HFBA	acido eptafluorobutirrico
HIS	istidina
HLN	idrossilisinonorleucina
<sup>1</sup> H-NMR	risonanza magnetica nucleare al protone
HPLC	High Liquid Chromatography
Hyl	idrossilisina

Hyp	idrossiprolina
Hys	istidina
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGFBPs	Insulin-like Growth Factor Binding Proteins
IL	interleuchina
IR	infrarosso
$K_M$	costante di Michaelis-Menten
MGP	Matrix-gla-protein (proteina della matrice contenente acido $\gamma$ -carbossiglutammico)
MIKE	Mass-Analysed Ion Kinetic Energy
MS	spettrometria di massa
m/z	rapporto massa/carica
OAFs	Osteoclast Activating Factors
OH-Lys	idrossilisina
OP	osteopontina
OPA	ortoftalaldeide
PC	fosfocitrato
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PG	proteoglicani
PID	piridinolina
PTH	paratormone
RER	reticolo endoplasmatico rugoso
T	trasmissione
TBV	volume trabecolare osseo
$\beta$ -TCMP	$\beta$ -tricalciofosfato magnesio sostituito
$\beta$ -TCP	$\beta$ -tricalciofosfato
TG	termogravimetria
TG-DTG	termogravimetria-termogravimetria differenziale
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAB	osso trabecolare
TSP	trombospondina
UV	ultravioletto
v/v	volume/volume
Vis	visibile

# Capitolo 1

## INTRODUZIONE

L'osso è un tessuto connettivo che, insieme alla cartilagine, costituisce lo scheletro. Il tessuto osseo, come tutti i tessuti connettivi, è costituito da poche cellule immerse in una matrice extracellulare. Quest'ultima è particolarmente abbondante nell'osso ed è composta da fibre di collagene e da una sostanza interstiziale ricca in glicosamminoglicani. La matrice extracellulare del tessuto osseo possiede la peculiare caratteristica di calcificare.

L'osso assolve tre importanti funzioni:

- 1) *meccanica*: costituisce l'impalcatura interna dell'organismo e serve da attacco ai muscoli e ai tendini;
- 2) *protettiva*: contiene i visceri nelle cavità cranica e toracica ed accoglie gli elementi emopoietici del midollo;
- 3) *metabolica*: è una riserva di ioni per l'intero organismo, in particolare di calcio e fosfato.

### 1.1 Organizzazione strutturale dell'osso

Nello scheletro si distinguono due tipi di ossa, le ossa piatte (ossa del cranio, scapola, mandibola, ileo) e le ossa lunghe (tibia, femore, omero) che originano da due distinti tipi di osteogenesi, rispettivamente intramembranosa ed encondrale, sebbene la crescita delle ossa lunghe involga entrambi i tipi.

Le ossa lunghe mostrano due ampie estremità, le *epifisi*, unite da una struttura approssimativamente cilindrica al centro, la *diafisi*, separate da un progressivo passaggio da una all'altra, la *metafisi*. Nel corso dell'accrescimento, l'epifisi e la diafisi sono fra loro separate da uno strato di cartilagine, la *cartilagine di coniugazione* (chiamata anche *piatto di crescita*), che prima prolifera e in seguito calcifica ed è responsabile della crescita longitudinale dell'osso. Essa diventa completamente calcificata al termine del periodo di crescita. La parte esterna delle ossa è formata da uno strato sottile e denso di tessuto calcificato, la *corteccia (osso compatto)* che, nella diafisi, racchiude la cavità midollare contenente il midollo emopoietico. Verso la metafisi e l'epifisi, l'osso corticale si assottiglia progressivamente e lo spazio interno è riempito da un intreccio di sottili trabecole calcificate che va a

costituire l'osso *spugnoso* od osso *trabecolare*. Gli spazi racchiusi da queste sottili trabecole sono anch'essi riempiti da midollo osseo emopoietico e continuano con la cavità midollare delle diafisi. In corrispondenza delle superfici articolari delle ossa lunghe, il sottile strato periferico di osso compatto è ricoperto da uno strato di cartilagine ialina, denominata *cartilagine articolare* o *d'incrostazione*.

L'osso è in contatto con i tessuti molli tramite due superfici: quella esterna (*superficie periostale*) e quella interna (*superficie endostale*). Queste sono ricoperte da cellule osteogeniche organizzate in strati: il *periostio* e l'*endostio*, rispettivamente.

Sia l'osso corticale che quello trabecolare sono costituiti dagli stessi elementi cellulari e dalla stessa matrice, tuttavia, tra i due tipi di osso esistono delle differenze sia strutturali che funzionali. Le differenze strutturali sono essenzialmente quantitative: l'80-90% del volume dell'osso corticale è calcificato, contro il 15-25% di quello trabecolare (il volume rimanente è occupato dal midollo osseo); ma il 70-85% del contatto con i tessuti molli si ha a livello della superficie endostale. Le differenze funzionali sono una conseguenza delle differenze strutturali e viceversa: l'osso corticale svolge principalmente (ma non esclusivamente) una funzione meccanica e protettiva, mentre quello trabecolare svolge soprattutto una funzione metabolica.

L'osso è formato da cellule (osteoblasti, osteociti e osteoclasti) e da una sostanza intercellulare costituita da una matrice di fibre di collagene, generalmente orientate in una direzione preferenziale, e da una sostanza fondamentale amorfa. Il collagene osseo è essenzialmente di tipo I e costituisce il 90% delle proteine totali della matrice ossea, il resto è costituito da proteine che genericamente si definiscono proteine non collageniche. Sulle fibre di collagene, tra di esse e nella sostanza fondamentale, si trovano cristalli di *idrossiapatite* ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) a forma di fuso. Di solito essi sono orientati nella stessa direzione delle fibre di collagene. La sostanza fondamentale amorfa contiene il liquido interstiziale, fondamentale per la nutrizione e gli scambi ionici e gassosi tra il sangue e le cellule; essa è essenzialmente composta da glicoproteine e proteoglicani. Questi complessi altamente anionici hanno una capacità molto alta di legare ioni e si ritiene giochino un ruolo importante nel processo di calcificazione e nella fissazione dei cristalli di idrossiapatite sulle fibre collageniche.

Recentemente [Termine, 1988] sono state purificate e sequenziate numerose proteine non collageniche presenti nella matrice ossea, ma il loro ruolo è stato

caratterizzato solo parzialmente. La maggior parte di queste proteine sono sintetizzate dalle cellule che formano l'osso, ma non tutte: un certo numero di proteine plasmatiche sono preferenzialmente assorbite dalla matrice ossea, come la  $\alpha$ -2-HS-glicoproteina che viene sintetizzata nel fegato.

Nell'embrione e nel bambino l'osso si sviluppa rimpiazzando la cartilagine precedentemente calcificata (ossificazione encondrale) o si forma senza una matrice cartilaginea (ossificazione membranosa). Il nuovo osso ha una struttura non ancora completamente organizzata (*osso a fibre intrecciate*); con il tempo le fibre si riarrangiano in una struttura *lamellare*, denominata *osteone*, formata da foglietti paralleli e concentrici disposti attorno a canali (*canali di Havers*) in cui si trovano i vasi sanguigni. Gli osteoni sono entità morfologiche di forma cilindrica e di dimensioni diverse, che in sezione trasversale appaiono come una serie di anelli concentrici disposti attorno ad un foro circolare. Essi sono costituiti da una sostanza interstiziale calcificata, la *matrice dell'osso*, contenente cavità a forma di lente biconvessa, denominate *lacune ossee*, ciascuna delle quali è occupata da una cellula ossea od *osteocita* e dalle quali si irradiano in tutte le direzioni canalicoli ramificati che penetrano nella sostanza fondamentale delle lamelle e si anastomizzano con quelli delle lacune vicine.

Come già detto, il tessuto osseo è formato da poche *cellule* e da molta sostanza interstiziale, denominata *matrice extracellulare*.

### 1.1.1 Le cellule dell'osso

Le principali cellule del tessuto osseo sono: gli *osteoblasti*, gli *osteoclasti* e gli *osteociti*.

#### **Gli osteoblasti**

Gli osteoblasti sono cellule di origine mesenchimale che sintetizzano e secernono la matrice organica; inoltre essi giocano una parte importante nel processo di calcificazione. Gli osteoblasti non appaiono mai isolati nel compimento della loro funzione, ma si presentano in agglomerati di cellule cuboidali lungo la superficie ossea (circa 100-400 cellule per sito formante l'osso). Le caratteristiche istologiche di un osteoblasta riflettono il fatto che esso è una cellula metabolicamente molto attiva. L'orientamento degli organelli è polarizzato (Figura 1).

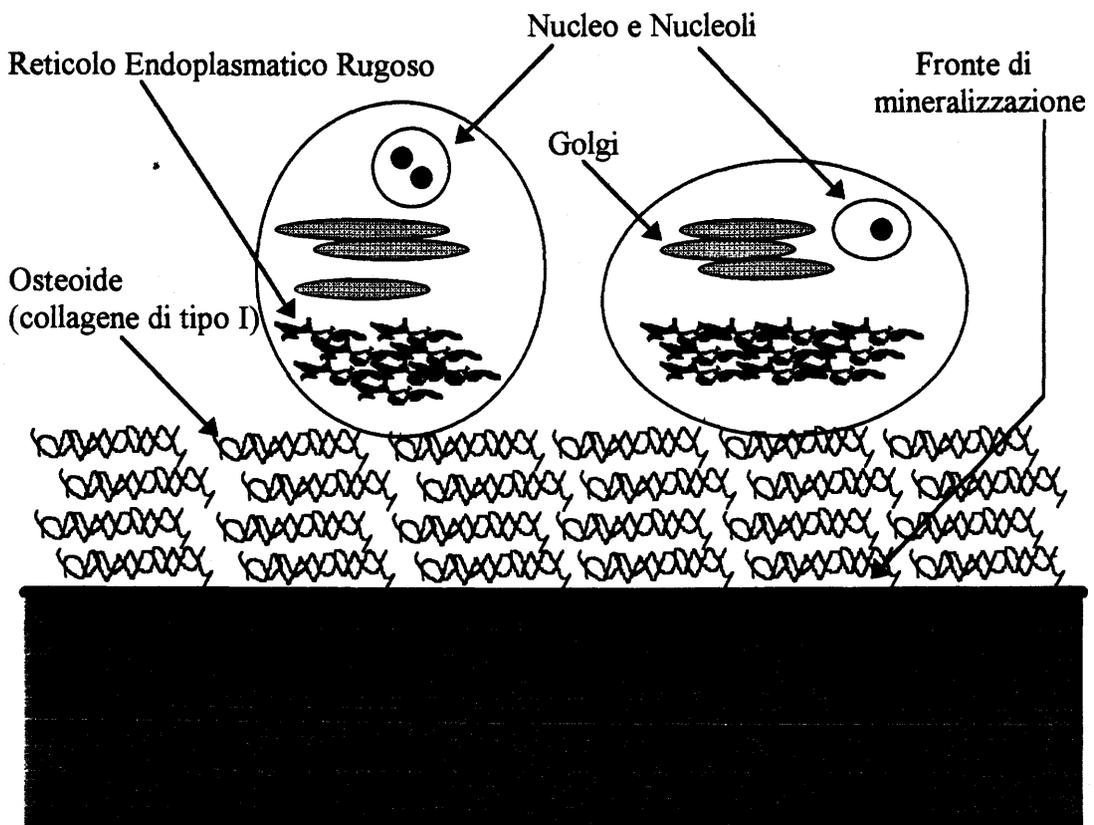


Figura 1: Osteoblasti orientati secernenti matrice.

Al microscopio ottico gli osteoblasti si caratterizzano per la presenza di un nucleo rotondo che sta alla base della cellula (al lato opposto rispetto alla superficie ossea), un citoplasma fortemente basofilo e uno sviluppato complesso di Golgi localizzato tra il nucleo e l'apice della cellula. Gli osteoblasti spesso delimitano uno strato di matrice ossea da essi prodotta e non ancora calcificata, detta *tessuto osteoide* (Figura 1). La presenza del tessuto osteoide è dovuta all'esistenza di un intervallo di tempo tra la formazione della matrice e la sua conseguente calcificazione (circa 10 giorni). In prossimità degli osteoblasti si trovano di solito uno o due strati di cellule, cellule mesenchimali attivate e preosteoblasti. Dal punto di vista ultrastrutturale, l'osteoblasta si caratterizza per gli aspetti di seguito elencati:

1) la presenza di un reticolo endoplasmatico rugoso (RER), vicino alla superficie dell'osso, particolarmente sviluppato, con cisterne dilatate contenenti granuli densi (Figura 1). Questo materiale si colora intensamente con coloranti basofili ed è più pronunciato nelle cellule che stanno attivamente formando l'osso. Come in tutte le cellule, il RER presenta in superficie un gran numero di ribosomi associati all'RNA messaggero. Il numero di queste strutture è strettamente associato alle attività di sintesi e di secrezione delle proteine. L'osteoblasta ha un reticolo endoplasmatico rugoso sviluppato perché produce attivamente collagene per la matrice extracellulare.

2) La presenza di un nucleo situato generalmente al lato opposto della cellula (Figura 1). Il materiale nucleare è simile a quello di altre cellule eucariotiche e rimane in uno stato diffuso e non condensato durante l'interfase. Di solito sono presenti da uno a tre nucleoli. Un osteoblasta maturo e funzionante non si divide. Le forme mitotiche di profase, metafase, anafase e telofase non appaiono negli osteoblasti. Se si osservano tali strutture, per convenzione, la cellula deve essere considerata un progenitore dell'osteoblasta o un osteoblasta che è regredito ad uno stato primitivo.

3) La presenza di un ampio complesso di Golgi di forma circolare, comprendente numerose cisterne, situato fra il nucleo e il RER (Figura 1). Questa struttura è presente poiché gli osteoblasti secernono una grande quantità di collagene di tipo I. Normalmente l'apparato di Golgi non si colora intensamente, quindi appare come una zona chiara al centro della cellula. I processi citoplasmatici sul lato secretorio della cellula si estendono in profondità nella matrice osteoide e sono in contatto con i

processi degli osteociti nei loro canalicoli. Spesso fra gli osteoblasti si ritrovano complessi giunzionali (*gap junctions*). Studi con  $^3\text{H}$ -prolina hanno dimostrato che il marcatore si ritrova prima nelle cisterne del RER, poi nel sistema di Golgi e, più tardi, nella matrice osteoide, dimostrando così direttamente che la matrice ossea viene sintetizzata e secreta dagli osteoblasti.

La membrana cellulare dell'osteoblasta è caratteristicamente ricca in *fosfatasi alcalina*, ancorata esternamente alla membrana tramite un fosfatidilinositolo (Figura 2). Per azione delle *fosfolipasi C e D* la fosfatasi alcalina può liberarsi nello spazio extracellulare. Sebbene questo enzima sia presente in grandi quantità sulla membrana plasmatica degli osteoblasti, la sua reale funzione non è ancora stata chiarita. Sin dal 1923 sono state pubblicate speculazioni sul suo ruolo nella mineralizzazione [Robinson, 1923] ed è chiaro che l'attività della fosfatasi alcalina correla con la formazione ossea (la fosfatasi alcalina serica è utilizzata come marcatore di formazione ossea), ma non è ancora stato dimostrato che essa sia un agente generante il processo di calcificazione. Altre teorie, riguardanti un possibile ruolo per la fosfatasi alcalina, si sono accentrate sulla regolazione della proliferazione cellulare, il trasporto di fosfato, ecc. [Puzas, 1986]. La membrana plasmatica degli osteoblasti presenta anche i recettori del paratormone (PTH) e della 1,25-diidrossi-vitamina  $\text{D}_3$  ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) ma non della calcitonina. I nuclei degli osteoblasti, inoltre, esprimono i recettori per gli estrogeni.

Gli osteoblasti si caratterizzano per la capacità di sintetizzare, oltre al collagene di tipo I, altre proteine specifiche della matrice, come l'osteocalcina e l'osteopontina.

Verso la fine del periodo di crescita, l'osteoblasta diventerà o una cellula piatta di rivestimento o un osteocita. Si possono riconoscere tre forme di cellule formanti l'osso appartenenti alla stessa linea cellulare: essi sono i preosteoblasti, gli osteoblasti maturi e gli osteociti.

Le caratteristiche che distinguono un preosteoblasta e che sono proprie di cellule non completamente differenziate, possono essere così riassunte:

- sono fisicamente adiacenti agli osteoblasti in attività secretiva;
- la forma è quella di una cellula allungata con nucleo allungato;
- hanno la capacità di dividersi, per cui si possono frequentemente osservare figure mitotiche;
- si colorano meno intensamente per la fosfatasi alcalina e il reticolo endoplasmatico rugoso non è ancora ben sviluppato.

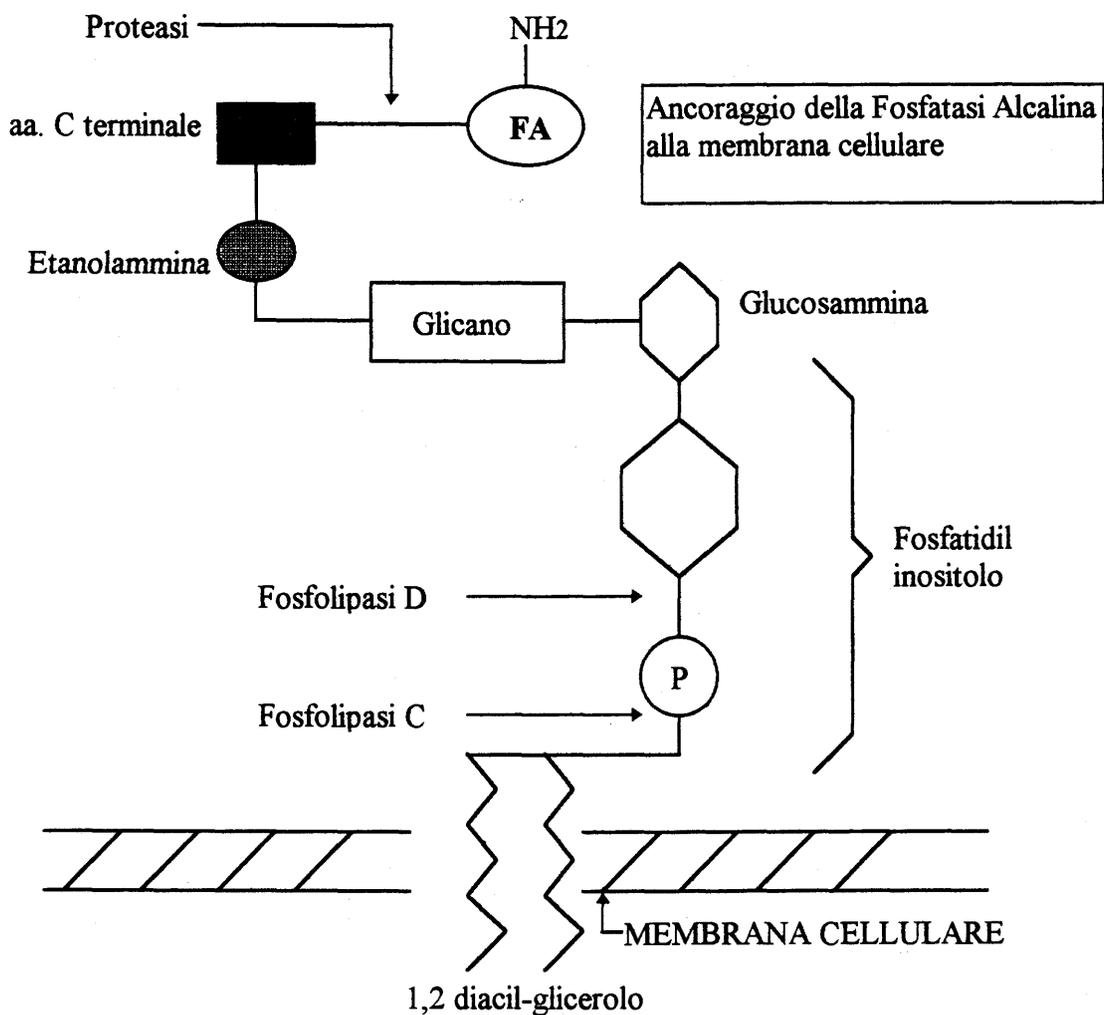


Figura 2: Fosfatasi alcalina (FA) ancorata tramite il fosfatidil inositolo alla membrana cellulare dell'osteoblasta. La glicoproteina viene liberata dal sistema di ancoraggio grazie all'azione della fosfolipasi C e D e di una proteasi che agisce sull'amminoacido carbossi terminale.

## **Fattori ed ormoni che controllano la funzione degli osteoblasti**

Per molti anni si era creduto che i due ormoni più importanti per l'osso fossero il paratormone (PTH) e l'1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub>. Era noto che entrambi questi ormoni sono ipercalcemizzanti, il primo per effetto della mobilitazione del calcio dall'osso, operata dal riassorbimento osseo, l'altro per effetto sull'assorbimento intestinale di calcio. Tuttavia, quando si considerava che solo gli osteoblasti sono dotati dei recettori per questi ormoni, non era chiaro come essi potessero indurre ipercalcemia. Per comprendere il fenomeno, l'unica spiegazione possibile era che entrambi gli ormoni agissero sull'osteoblasta rallentando la formazione di nuovo osso. Tale assunto era comunque palesemente inconsistente con il loro ruolo nel mantenimento dell'omeostasi calcemica.

Sperimentalmente si era potuto verificare che il PTH si lega ad un recettore specifico, media il trasporto di ioni ed amminoacidi all'interno della cellula, stimola il cAMP e regola la sintesi di collagene [Donahue et al., 1988; Lomri & Marie, 1988]. Analogie, come lo stimolo della sintesi di matrice e di fosfatasi alcalina, la sintesi di proteine specifiche dell'osso e la presenza di un recettore, si potevano riscontrare anche per il metabolita attivo della vitamina D<sub>3</sub> [Fritsch et al., 1985; Harrison & Clark, 1986]. Il problema nasceva dal quesito sul perché ormoni responsabili di elevare il calcio serico avessero tali marcati e diversi effetti sulle cellule osteosintetiche. Molte teorie vennero formulate per spiegare queste osservazioni, ma solamente in tempi recenti, quando vennero messe a punto e si svilupparono speciali tecniche di colture cellulari, si riuscì a comprendere il meccanismo di elevazione del tasso di calcio nel siero. Ora appare evidente come l'osteoblasta possa essere la cellula che controlla il riassorbimento e la formazione dell'osso. Ciò fu messo in luce da esperimenti che dimostrarono che l'effetto di riassorbimento dell'osso avviene solo in presenza sia di osteoblasti che di osteoclasti. Questa tecnica, chiamata di *cocoltura*, dimostrò l'interdipendenza tra le due popolazioni cellulari, che si realizza tramite fattori solubili sintetizzati e secreti dagli osteoblasti e che sono rilevabili nel mezzo di coltura. Infatti, l'effetto stimolatorio sugli osteoclasti può essere osservato anche con il solo mezzo di coltura in cui sono cresciuti gli osteoblasti. Appare quindi chiaro che la regolazione ormonale del riassorbimento osseo avviene tramite un meccanismo mediato dall'osteoblasta [Chambers et al., 1985].

Anche fattori locali contribuiscono alla regolazione dell'attività degli osteoblasti. È interessante notare, a questo proposito, che questi fattori,

sintetizzati e secreti dalle cellule, rimangono intrappolati nella matrice ossea e vengono liberati dall'attività riassorbitiva degli osteoclasti. Nel processo di rimodellamento, l'attività osteoclastica è seguita da quella osteoblastica e questa sequenza è regolata in modo spaziale e temporale attraverso un meccanismo accoppiato "riassorbimento-formazione" mediato da questi fattori locali [Parfitt, 1988]. Attraverso questo meccanismo lo scheletro tenta di conservare la sua massa ossea; interferenze con questo accoppiamento "riassorbimento-formazione" possono portare a regolazione inappropriata della massa ossea, in questo caso, infatti, sono state documentate sia condizioni di diminuita (osteoporosi) che di aumentata massa ossea (osteopetrosi).

### **Gli osteoclasti**

Gli osteoclasti sono cellule multinucleate derivate dalla fusione di precursori di cellule staminali emopoietiche di natura mononucleare-fagocitaria (*promonociti*). Il meccanismo di fusione è asincrono così, ad esempio, la cellula precursore può fondersi con un osteoclasta già differenziato. Gli osteoclasti possiedono sulla loro membrana recettori per la calcitonina e per gli estrogeni ma non per il PTH e per la vitamina D.

Gli osteoclasti sono le principali cellule responsabili del riassorbimento osseo, anche se altre cellule possono regolare, *in vivo*, la loro attività. Gli osteoblasti, ad esempio, potrebbero agire come cellule *helper* nel processo di riassorbimento osteoclastico, preparando la superficie ossea all'attacco successivo degli enzimi osteoclastici, sebbene ci siano ancora poche evidenze dirette che supportino questa teoria. Comunque, esperimenti di microscopia elettronica a scansione mostrano che gli osteoclasti possono riassorbire l'osso direttamente, senza l'assistenza di altre cellule [Jones et al., 1985].

Gli osteoclasti sono cellule uniche e altamente specializzate. Si tratta di cellule giganti multinucleate (da 4 a 20 nuclei, contenenti generalmente 1-2 nucleoli) che abitualmente si trovano in contatto con una superficie ossea calcificata o all'interno di una lacuna (*lacuna di Howship*), che è il risultato dell'attività riassorbitiva dello stesso osteoclasta. Si possono trovare fino a 4-5 cellule nello stesso sito di riassorbimento, anche se mediamente si osservano 1 o 2 per sito.

Al microscopio ottico i nuclei degli osteoclasti appaiono di forma diversa nella stessa cellula: possono essere rotondi ed eucromatici o a contorni molto irregolari ed eterocromatici, ciò riflette la fusione asincrona dei precursori mononucleari. Il citoplasma contiene numerosi vacuoli. La zona di contatto

con l'osso si caratterizza per la presenza di un orletto a spazzola, mentre i nuclei appaiono disposti nel lato opposto (Figura 3). La cellula, dunque, nel momento in cui attua la sua funzione riassorbitiva, appare polarizzata.

Le caratteristiche ultrastrutturali distintive di questa cellula sono:

- 1) l'abbondanza dei complessi di Golgi disposti in maniera caratteristica attorno ad ogni nucleo;
- 2) la presenza di numerosi mitocondri;
- 3) la presenza di numerose vescicole di trasporto contenenti enzimi lisosomiali.

La caratteristica più saliente, tuttavia, è l'esistenza di profonde invaginazioni della membrana plasmatica nell'area a contatto con la matrice ossea. Tali invaginazioni formano l'*orletto a spazzola* che è circondato da un anello di proteine contrattili che permettono l'attacco della cellula alla superficie dell'osso. L'attacco dell'osteoblasta alla matrice avviene attraverso un recettore che lega specifiche sequenze delle proteine della matrice (*recettore per le integrine*). La membrana plasmatica dell'orletto a spazzola contiene una proteina di 100 KD (una ATPasi) presente anche sulla membrana di lisosomi e organelli correlati, che si ritiene sia coinvolta nel meccanismo di acidificazione del mezzo, in associazione con le pompe protoniche. La membrana plasmatica basolaterale dell'osteoclasta è altamente e specificamente ricca di una  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasi}$  e di scambiatori  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .

L'orletto a spazzola rappresenta il sito in cui si verifica il riassorbimento osseo e in cui si forma la lacuna di Howship. Alcuni autori [Baron et al., 1983] hanno considerato lo spazio confinato e circoscritto tra l'orletto a spazzola e la superficie ossea come l'equivalente funzionale di un lisosoma secondario (Figura 3): esso possiede un pH acido (circa pH 5) ed enzimi lisosomiali, inoltre è in contatto con i substrati di varia natura. Il pH acido dissolve il minerale, esponendo la matrice; gli enzimi lisosomiali (collagenasi o catepsine), ora ad un pH ottimale, degradano i componenti della matrice. I prodotti di degradazione della digestione extracellulare vengono internalizzati e trasportati al polo basolaterale della cellula per essere rilasciati nel torrente circolatorio.

### **Fattori ed ormoni che controllano l'attività degli osteoclasti**

L'attività osteoclastica è stimolata da molti fattori ed ormoni. Il loro meccanismo d'azione differisce: il riassorbimento osteoclastico può essere stimolato da fattori che aumentano la proliferazione dei progenitori degli

osteoclasti, che causano il differenziamento dei precursori in cellule mature o l'attivazione di cellule mature multinucleate [Mundy & Roodman, 1987] (Figura 4). Similmente, gli osteoclasti potrebbero essere inibiti da agenti che bloccano la proliferazione dei precursori, che inibiscono il differenziamento o la fusione, o che inattivano la cellula multinucleata matura.

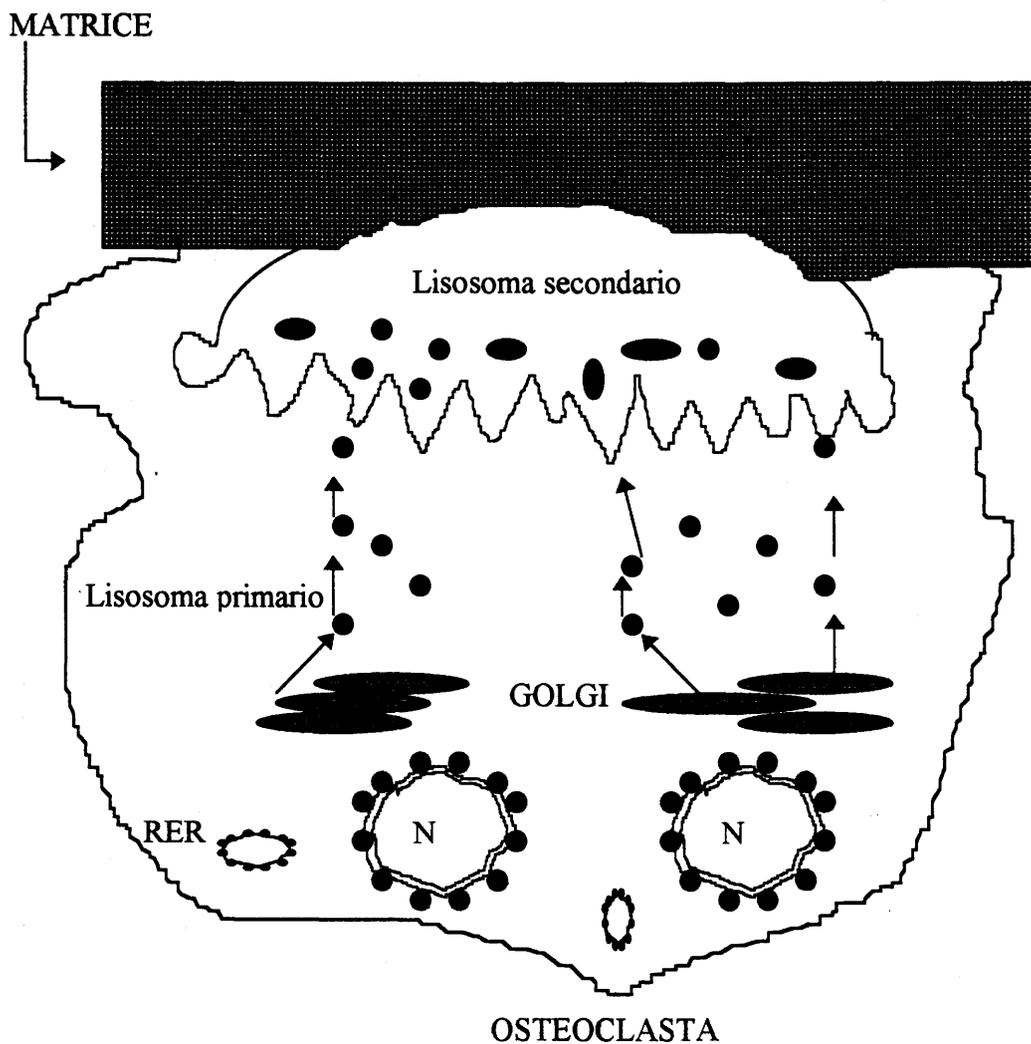


Figura 3: Schema di un osteoclasta polarizzato in attività riassorbitiva.

Gli enzimi trasportati nei lisosomi primari vengono secreti in un compartimento di riassorbimento acidificato, che rappresenta l'equivalente funzionale di un lisosoma secondario. (N: nucleo; RER: reticolo endoplasmatico rugoso che sintetizza enzimi lisosomiali).

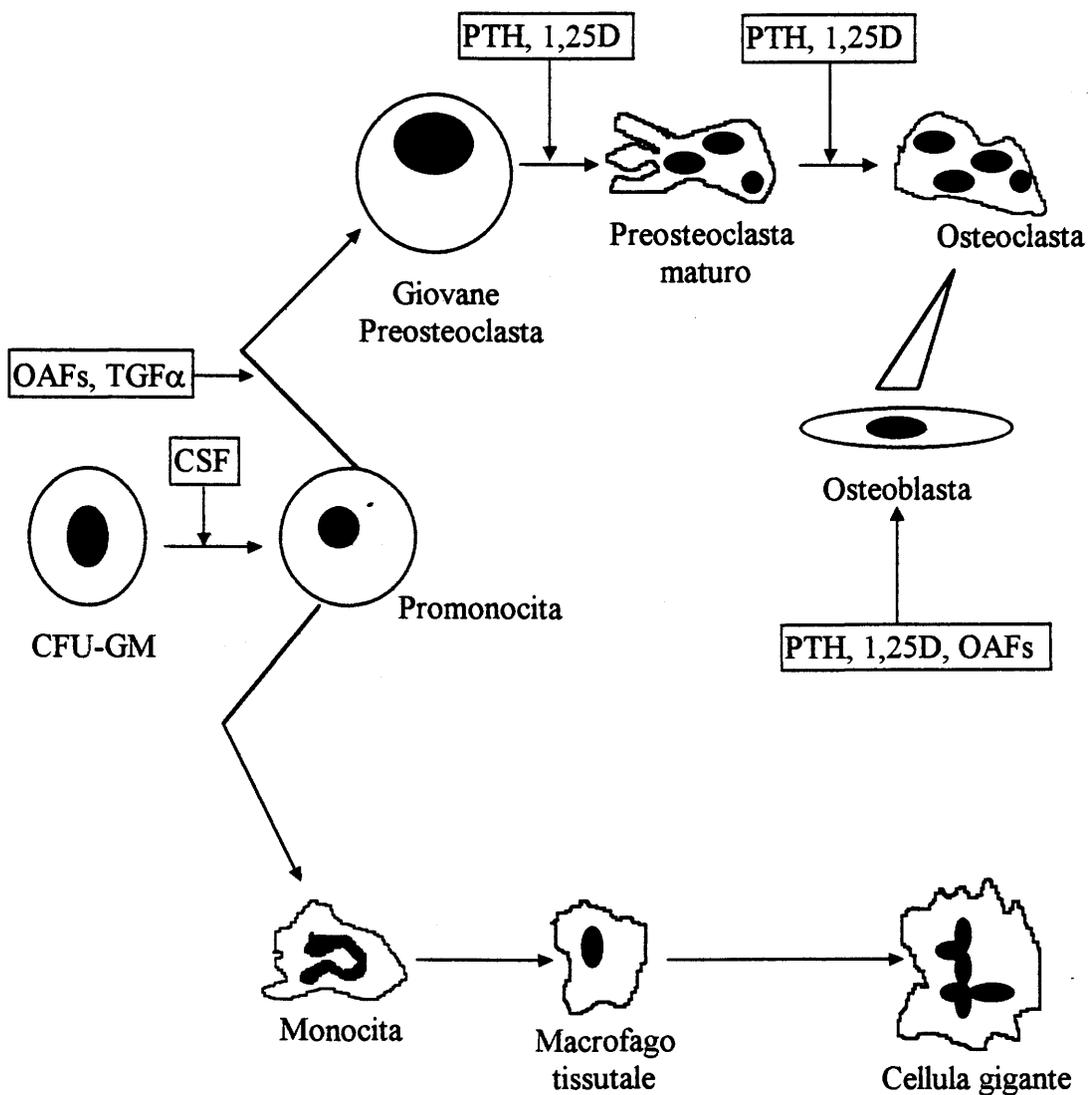


Figura 4: Differenziamento degli osteoclasti da precursori ematopoietici CFU-GM (*colony forming units-granulocyte macrophage*). Le CFU-GM sono cellule pluripotenti ad alta capacità proliferativa che possono differenziare nella linea granulocito-macrofagica o nella linea osteoclastica. Fattori come il CSF (*colony stimulating factor*), il TGF $\alpha$  (*tumor growth factor*) e gli OAFs (*osteoclast activating factors* come l'interleuchina-1 e il *tumor necrosis factor*) agiscono come fattori di regolazione della crescita di questi precursori degli osteoclasti. Ormoni sistemici influiscono a vari livelli sulla differenziazione delle cellule della linea osteoclastica. (1,25D: 1,25-diidrossivitamina D; PTH: ormone paratiroideo).

## **Fattori sistemici**

Tutti gli ormoni calciotropi, il paratormone, l' $1,25(\text{OH})_2$ -vitamina  $\text{D}_3$  e la calcitonina influenzano l'attività degli osteoclasti.

### *Paratormone (PTH)*

Il paratormone stimola la differenziazione dei progenitori degli osteoclasti a fondersi per formare osteoclasti maturi multinucleati ed attiva gli osteoclasti già preformati a riassorbire l'osso. L'azione del PTH sugli osteoclasti non è diretta, ma è mediata dall'interazione tra il PTH ed il suo recettore localizzato sulla membrana cellulare dell'osteoblasta. In risposta a questa interazione, si liberano dei fattori solubili che agiscono sulle cellule della linea osteoclastica, inducendo complessivamente un aumento del riassorbimento osseo.

### *$1,25(\text{OH})_2$ -vitamina $\text{D}_3$*

L' $1,25(\text{OH})_2$ -vitamina  $\text{D}_3$  è un potente stimolatore dell'attività osteoclastica: come il PTH, esso stimola i progenitori degli osteoclasti a differenziarsi e a fondere [Roodman GD et al., 1985]; lo stesso effetto viene osservato sui macrofagi polinucleati. Inoltre attiva gli osteoclasti maturi con un meccanismo probabilmente simile a quello del PTH. Gli effetti di questo ormone sull'osso sono anche indiretti, molteplici e piuttosto complessi. Per esempio, esso è un potente immunoregolatore, che inibisce la proliferazione dei linfociti T e la produzione di interleuchina-2 [Tsoukas et al., 1984]. In alcuni casi può incrementare la produzione di interleuchina-1 da cellule con caratteristiche monocitarie. Entrambi questi fattori (citochine) influenzano queste cellule.

### *Calcitonina*

La calcitonina è un ormone polipeptidico che è un potente inibitore dell'attività osteoclastica, ma i suoi effetti sono solo transitori. Gli osteoclasti, infatti, cessano di rispondere alla calcitonina dopo un breve periodo di esposizione a questo ormone [Wener et al., 1972]. Così, pazienti affetti da ipercalcemia e trattati con calcitonina dimostrano un abbassamento della calcemia per un periodo di circa 48-72 ore, prima che questa, a dispetto del trattamento in corso, risalga nuovamente. Lo stesso fenomeno si osserva nel morbo di Paget dopo prolungata terapia con calcitonina. Dal punto di vista microscopico, nella cellula a contatto con la calcitonina si osserva una contrazione citoplasmatica della membrana cellulare dell'osteoclasta, che viene posta in relazione con la sua capacità di inibire il riassorbimento osseo

[Chambers & Magnus, 1982]. Tuttavia la calcitonina agisce anche in altri stadi della formazione dell'osteoclasta, inibendone sia la proliferazione dei progenitori che la differenziazione dei precursori. Essa inoltre causa il dissolvimento degli osteoclasti maturi in cellule mononucleate. Gli effetti della calcitonina sugli osteoclasti sono mediati dal cAMP.

### **Fattori locali**

I fattori locali sembrano essere più importanti di quelli sistemici per l'inizio del riassorbimento osseo e per la normale sequenza di rimodellamento osseo. Ciò deriva dalla considerazione che il rimodellamento osseo avviene in diversi e distinti compartimenti dello scheletro, per cui sembra probabile che gli eventi cellulari che lo determinano siano controllati da fattori generati nello stesso microambiente. Recentemente, infatti, sono stati identificati un certo numero di potenti fattori locali di stimolazione e di inibizione dell'attività osteoclastica. Tra questi, i più importanti sono i seguenti:

#### *Interleuchina-1 (IL-1)*

Ci sono due molecole di interleuchina-1: l'interleuchina-1 $\alpha$  e -1 $\beta$ . I loro effetti sull'osso sembrano essere gli stessi, e sono mediati dallo stesso recettore. L'interleuchina-1 viene rilasciata dai monociti attivati, ma anche da altri tipi di cellule, tra le quali gli osteoblasti e le cellule tumorali. É un potente stimolatore degli osteoclasti ed agisce in tutte le fasi di formazione e attivazione degli stessi. L'interleuchina-1 stimola la proliferazione dei progenitori e la differenziazione dei precursori in cellule mature [Pfeilschifter et al., 1988]; inoltre attiva l'osteoclasta plurinucleato indirettamente, probabilmente attraverso una cellula indifferenziata dell'osso [Thomson et al., 1986].

L'interleuchina-1, quando somministrata *in vivo*, stimola il riassorbimento osseo mediato dagli osteoclasti e causa un sostanziale incremento della concentrazione plasmatica di calcio [Sabatini et al., 1988; Boyce et al., 1989]. É stata recentemente implicata come un potenziale mediatore di riassorbimento osseo e aumentato *turnover* osseo nell'osteoporosi [Pacifichi et al., 1989]. Essa può essere considerata responsabile dell'aumento del riassorbimento osseo che si osserva in alcune neoplasie, così come del riassorbimento osseo localizzato associato a processi infiammatori cronici, in malattie come l'artrite reumatoide. L'interleuchina-1 stimola la sintesi di

interleuchina-6, che aumenta il riassorbimento osseo probabilmente attraverso il reclutamento di cellule della linea osteoclastica.

### *Interleuchina-6 (IL-6)*

L'interleuchina-6 gioca un importante ruolo nella regolazione del riassorbimento osseo. Viene prodotta e secreta da cellule della linea osteoblastica in risposta a stimoli indotti da fattori locali e sistemici (IL-1, *tumor necrosis factor*,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  e PTH) ed è parte fondamentale del meccanismo omeostatico che regola il riassorbimento osseo. Così, in combinazione con l'IL-1 e l' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  stimola precocemente la formazione di precursori degli osteoclasti da cellule progenitrici di origine emopoietica, presenti nel midollo osseo. Ciò è stato dimostrato in modelli sperimentali sia *in vitro* che *in vivo*. Essa, infatti, stimola il reclutamento e la formazione degli osteoclasti e la liberazione di  $^{45}\text{Ca}$  da colture di osso fetale di topo, così come stimola il riassorbimento osseo in un ceppo di topi "nudi" transfettati con il gene dell'IL-6. Evidenze sperimentali dimostrano chiaramente che anche gli estrogeni influiscono sulla IL-6. Infatti, l'ovariectomia nella donna si accompagna ad un'aumentata produzione di citochine, che a loro volta stimolano la sintesi e la produzione di IL-6. D'altro canto, il  $17\text{-}\beta\text{-estradiolo}$  inibisce la produzione di IL-6 da parte delle cellule dello stroma e degli osteoblasti, suggerendo che il punto dove gli estrogeni esplicano il loro effetto antiriassorbitivo sull'osso possa essere la complessa rete di interconnessioni tra i vari fattori locali che controllano l'osteoclastogenesi [Jilka et al., 1992].

### *Linfotossina e Tumor necrosis factor (TNF)*

La linfotossina e il TNF sono molecole funzionalmente correlate all'interleuchina-1. Molte delle loro proprietà biologiche si sovrappongono a quelle dell'IL-1. La linfotossina e il TNF condividono lo stesso recettore, che è distinto da quello dell'interleuchina-1. I loro effetti sull'osso sono sinergici con quelli dell'IL-1. La linfotossina viene rilasciata dai linfociti T attivati ed il TNF dai macrofagi attivati. Il TNF è uno dei mediatori degli effetti sistemici dello *shock* da endotossine. Esso inoltre causa cachessia e deprime l'eritropoiesi. La linfotossina e il TNF stimolano la proliferazione dei progenitori degli osteoclasti, inducono la fusione dei precursori a formare le cellule multinucleate e attivano le cellule multinucleate (attraverso cellule della linea osteoblastica) a riassorbire l'osso [Bertolini et al., 1986; Thomson et al., 1987;

Johnson et al., 1989]. La linfotossina può essere un importante mediatore di riassorbimento osseo nel mieloma [Garrett et al., 1987]. Quando vengono infusi o iniettati *in vivo*, la linfotossina e il TNF causano ipercalcemia da aumentato riassorbimento osteoclastico [Garrett et al., 1987; Tashjian et al., 1987; Johnson et al., 1989].

### *γ-Interferone*

Il  $\gamma$ -interferone è una linfochina multifunzionale prodotta dai linfociti T attivati. In contrasto con altre molecole prodotte dalle cellule del sistema immunitario, esso inibisce il riassorbimento osseo osteoclastico [Gowen et al., 1986]. Il suo effetto principale sembra essere l'inibizione della differenziazione del precursore dell'osteoclasta in cellula matura [Takahashi et al., 1987]. Il  $\gamma$ -interferone ha anche effetti sulla proliferazione del precursore dell'osteoclasta, seppure meno potenti. A differenza della calcitonina, non causa la contrazione del citoplasma degli osteoclasti isolati.

### *Transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )*

Il TGF- $\beta$  è un polipeptide multifunzionale prodotto dalle cellule immunitarie, ma che viene anche rilasciato dalla matrice ossea durante il riassorbimento. Il TGF- $\beta$  ha effetti unici sugli osteoclasti. Nella maggior parte dei sistemi, esso inibisce la formazione degli osteoclasti inibendo sia la proliferazione che la differenziazione dei precursori di queste cellule [Chenu et al., 1988; Pfeilschifter et al., 1988]. Inoltre esso inibisce direttamente l'attività degli osteoclasti maturi diminuendo la produzione di anione superossido; inibisce altresì l'accumulo di fosfatasi acida tartrato resistente negli osteoclasti. Poiché il TGF- $\beta$  ha un potente effetto sugli osteoblasti (stimola la proliferazione e la sintesi di proteine, aumenta la formazione di osso mineralizzato) [Noda & Camilliere, 1989; Kalu et al., 1993a], esso può avere un ruolo fondamentale nel processo di rimodellamento osseo. Per esempio, potrebbe essere rilasciato durante il processo di riassorbimento e quindi rendersi disponibile come un inibitore endogeno dell'attività osteoclastica. Allo stesso tempo, cooperando con altri fattori presenti nell'osso, può indurre la formazione di nuovo osso attivando l'osteoblasta. In ogni caso, gli effetti del TGF- $\beta$  sono complessi e diversi nelle diverse specie. Nell'osso calvaria di topo neonato, per esempio, stimola la sintesi di prostaglandine, che inducono il riassorbimento osseo, effetto, in questo caso, opposto a quello osservabile nel topo adulto e nell'uomo [Tashjian et al. 1986].

## Altri fattori

Ci sono numerosi altri fattori il cui preciso ruolo nel riassorbimento fisiologico e patologico dell'osso deve ancora essere delineato. La vitamina A è l'unico fattore completamente caratterizzato che ha un effetto stimolatorio diretto sugli osteoclasti [Fell & Mellanby, 1952]. L'eccesso di vitamina A può portare, *in vivo*, ad un aumentato riassorbimento osseo e a ipercalcemia. Non è noto se gli effetti della vitamina A sugli osteoclasti abbiano un significato fisiologico.

Il *transforming growth factor- $\alpha$*  (TGF- $\alpha$ ), come il correlato *epidermal growth factor* (EGF), è un potente stimolatore del riassorbimento osseo osteoclastico [Ibbotson et al., 1985; Stern et al., 1985; Ibbotson et al., 1986; Tashjian et al., 1986]. Il TGF- $\alpha$  è prodotto da molti tumori ed è probabilmente implicato nell'aumentato riassorbimento osseo associato al cancro. Probabilmente viene prodotto durante la vita embrionale. Esso stimola la proliferazione dei progenitori degli osteoclasti e probabilmente agisce anche su cellule multinucleate non ancora mature. Le sue azioni sugli osteoclasti sono comparabili a quelle dei *colony stimulating factors* (CSF) su altre cellule ematopoietiche [Takahashi et al., 1986]. Gli effetti del *transforming growth factor- $\alpha$*  sulle cellule ossee sono mediati dal recettore dell'EGF, sebbene esso sia più potente dell'EGF sul riassorbimento osseo. Iniezioni o infusioni di *transforming growth factor  $\alpha$*  aumentano il calcio plasmatico in vivo [Tashjian, 1986].

Il fosfato inibisce l'attività osteoclastica nelle colture d'organo [Raisz & Niemann, 1969]. Il modo preciso in cui agisce non è chiaro. Il fosfato è un'utile forma di terapia nei pazienti con aumentato riassorbimento osseo, affetti da cancro o iperparatiroidismo, sebbene esso possa avere altri effetti oltre a quelli di inibire il riassorbimento osseo, come la diminuzione dell'assorbimento di calcio dall'intestino.

Numerosi agenti farmacologici sono stati usati come inibitori del riassorbimento osseo e rappresentano utili terapie in pazienti affetti da tumori associati a ipercalcemia. Questi includono la plicamicina (mitramicina), il nitrato di gallio e i bisfosfonati [Mundy & Roodman, 1987]. Tutti questi composti inibiscono l'attività osteoclastica, sebbene il loro meccanismo d'azione sia ancora sconosciuto. Nel caso dei farmaci citotossici plicamicina e nitrato di gallio, è possibile che le loro azioni siano mediate da effetti citotossici sugli osteoclasti o dall'inibizione della proliferazione dei progenitori degli osteoclasti.

Le prostaglandine hanno effetti complessi e molteplici sugli osteoclasti a seconda delle specie. Le prostaglandine sono state correlate all'ipercalcemia e all'aumentato riassorbimento osseo associato a tumori e a infiammazioni croniche [Tashjian et al., 1972]. Comunque, i loro effetti non sono ancora stati chiariti. Le prostaglandine della serie E stimolano il riassorbimento osseo nelle colture d'organo. Inoltre, alcuni fattori di riassorbimento osseo, e in particolare i fattori di crescita, sembrano mediare i loro effetti attraverso la produzione di prostaglandine nelle ossa di topo. Le prostaglandine inibiscono la formazione di osteoclasti umani e causano la contrazione citoplasmatica di osteoclasti isolati, sostanzialmente nello stesso modo della calcitonina. Comunque, le prostaglandine stimolano la formazione degli osteoclasti multinucleati murini dai progenitori midollari. L'effetto complessivo delle prostaglandine dipende dalla specie studiata. Quale sia il loro effetto globale sul riassorbimento osseo nell'uomo è ancora un mistero.

Gli ormoni tiroidei, tiroxina e triiodotironina, stimolano il riassorbimento osseo osteoclastico nelle colture d'organo [Mundy et al., 1976]. Alcuni pazienti con ipertiroidismo presentano aumentata perdita ossea, aumentata attività osteoclastica e ipercalcemia. Gli ormoni tiroidei agiscono direttamente sul riassorbimento osseo osteoclastico, ma il loro preciso modo d'azione non è ancora noto.

I glucocorticoidi inibiscono la formazione degli osteoclasti *in vitro* e il riassorbimento osseo in colture d'organo. La loro efficacia dipende dalla stimolazione del riassorbimento osseo. Essi sono meno efficaci nell'inibire il riassorbimento osseo stimolato dall'ormone paratiroideo di quanto lo siano in quello stimolato dalle citochine come l'interleuchina-1 [Mundy et al., 1978]. *In vivo*, la somministrazione di glucocorticoidi è associata ad un aumentato riassorbimento osseo. Questo è un effetto indiretto, dovuto alla capacità dei glucocorticoidi di inibire l'assorbimento intestinale di calcio. Come conseguenza, viene stimolata l'attività della ghiandola paratiroidea e l'iperparatiroidismo secondario porta ad un generalizzato aumento di riassorbimento osseo.

La carenza di estrogeni è associata con l'aumentato riassorbimento osseo che si osserva nei dieci anni successivi alla menopausa [Lindsay et al., 1980]. Il meccanismo è completamente sconosciuto, ma probabilmente non è diretto. Si è visto che gli estrogeni non influenzano l'attività osteoclastica *in vitro*. I loro effetti *in vivo* sono presumibilmente mediati da fattori secondari che non sono stati ancora identificati.

## Gli osteociti

Nella matrice ossea calcificata sono incastonate profondamente, in piccole lacune osteocitiche ( $25'000/\text{mm}^3$ ), cellule chiamate *osteociti*. Essi in origine erano osteoblasti, rimasti intrappolati nella matrice mineralizzata. Approssimativamente il 10-20% degli osteoblasti diventano osteociti e, sebbene si possa sostenere che non tutti gli osteoblasti sopravvivano come osteociti, si può dire che tutti gli osteociti derivano dagli osteoblasti.

Queste cellule possiedono numerosi e lunghi processi cellulari ricchi in microfilamenti che sono in contatto con i processi cellulari di altri osteociti (frequenti *gap junctions*) o di cellule che rivestono la superficie ossea (osteoblasti o cellule piatte di rivestimento nell'endostio o nel periostio). Questi processi si organizzano durante la formazione della matrice e prima della sua calcificazione, formando una rete di sottili canalicoli permeanti la matrice ossea. Questa rappresenta l'unica via attraverso la quale i nutrienti ed i gas possono essere scambiati fra le cellule ossee ed il sangue, dato che questi scambi non possono effettuarsi a livello della matrice, essendo essa calcificata.

Tra la membrana osteocitaria e la matrice ossea, sia nelle lacune che nei canalicoli, esiste uno spazio, detto *spazio periosteocitario*, riempito di liquido extracellulare.

Il significato fisiologico di questo sistema è facilmente spiegabile da alcuni numeri: la superficie ossea totale dei canalicoli e delle lacune, in un individuo adulto, è dell'ordine di  $1000-1500 \text{ m}^2$  ( $140 \text{ m}^2$  per i capillari polmonari); il volume del liquido extracellulare contenuto nello spazio periosteocitario è di 1.0-1.5 litri; il calcio di superficie, depositato sui cristalli di minerale osseo, è di 5-20 grammi, che renderebbero conto di una significativa percentuale del calcio osseo totale scambiabile. Il fatto che la concentrazione di calcio nel liquido extracellulare dello spazio periosteocitario (0.5 mM) sia più bassa che nel plasma (1.5 mM), suggerisce che vi sia un costante flusso di ioni calcio dall'osso al plasma.

La morfologia degli osteociti varia a seconda della loro età e della loro attività funzionale. Un osteocita giovane, essendo derivato dagli osteoblasti, conserva molte delle caratteristiche ultrastrutturali di queste cellule, ma con un volume diminuito e con un minor numero di organelli coinvolti nella sintesi proteica (reticolo endoplasmatico rugoso e apparato di Golgi). Un osteocita più vecchio, localizzato più in profondità nell'osso calcificato, mostra un'accentuazione di questa tendenza, oltre che un accumulo di glicogeno nel

suo citoplasma. Queste cellule sono capaci di sintetizzare nuova matrice ossea alla superficie della lacuna osteocitaria, che può in seguito calcificare.

Assieme agli osteoblasti, gli osteociti regolano le concentrazioni locali di calcio, fosfato ed altri ioni, in modo da avere un rapporto tra ioni che li fa precipitare in forma di cristalli. Gli osteociti hanno, inoltre, un ruolo primario nel mantenimento dell'omeostasi calcemica, che attuano tramite un processo di osteolisi propriamente definito "*osteolisi osteocitaria*".

Il destino dell'osteocita è quello di essere fagocitato e digerito assieme agli altri componenti dell'osso, durante il riassorbimento effettuato dagli osteoclasti.

### **1.1.2 La matrice**

La matrice organica dell'osso è formata per circa il 90% da *collagene*, essenzialmente di tipo I, il resto è costituito da proteine che genericamente si definiscono *proteine non collageniche* (Figura 5). Più del 95% del collagene presente nell'osso è di tipo I, il restante 5% è costituito da collagene di tipo III e VI.

Nel feto o nel bambino, in cui si osserva una formazione ossea accelerata, il collagene osseo è depositato secondo un andamento casuale. Questo collagene "*intrecciato*" consiste di fasci di grandezza variabile orientati casualmente. Il collagene intrecciato si ritrova anche in condizioni patologiche caratterizzate da accelerata formazione ossea, come la riparazione di una frattura, che alla fine sarà sostituita dalla sua controparte "*lamellare*", più ordinata. L'osso a struttura lamellare, che comprende virtualmente l'intero scheletro osseo normale dalla seconda metà della prima decade, è caratterizzato da fasci di collagene di dimensioni uniformi, orientati in maniera omogenea. Eccettuati casi particolari, come a livello dei siti di inserzione dei tendini e negli alveoli dentali, nell'adulto la presenza di osso a fibre intrecciate indica un processo patologico.

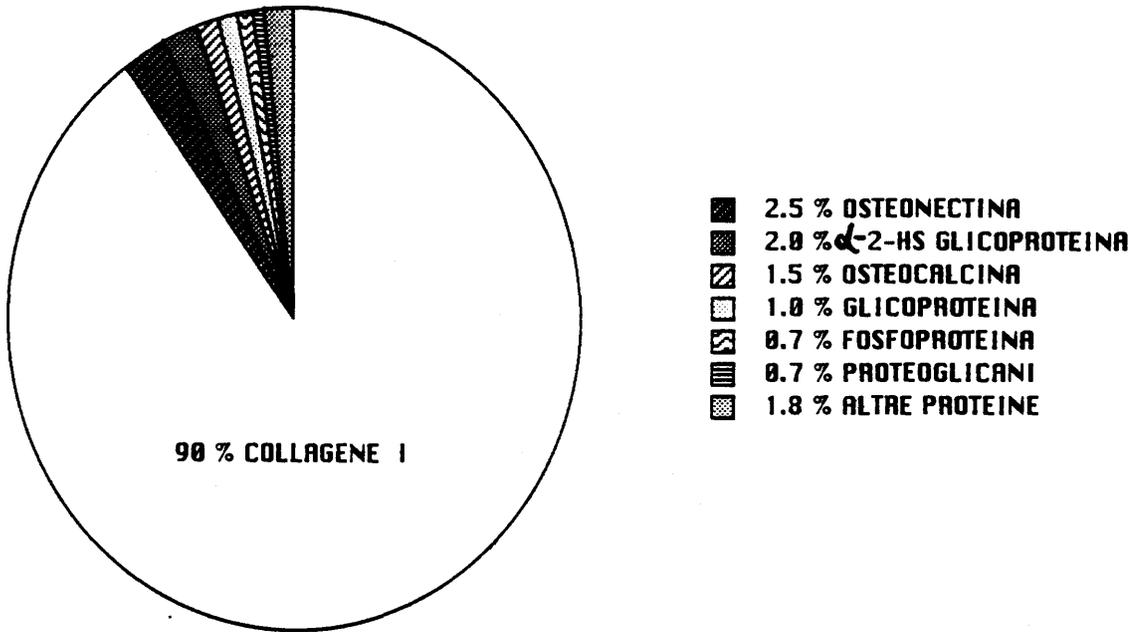


Figura 5: Composizione della matrice ossea.

## Il collagene

### Struttura del collagene

Il collagene, proteina fibrosa ad alta resistenza meccanica, rappresenta la componente principale del tessuto connettivo e, nei vertebrati, costituisce circa il 25% di tutte le proteine corporee.

È la sequenza degli amminoacidi, in una catena polipeptidica, a determinare l'avvolgimento della stessa in una conformazione tridimensionale che è essenziale per l'attività biologica della proteina. Nel caso del collagene, la sequenza degli amminoacidi determina la struttura a due livelli di organizzazione. Al primo livello, tre catene polipeptidiche sono avvolte in una molecola a tripla elica lunga circa 300 nm e con un diametro di soli 15 nm. Ognuna di queste catene è avvolta a spirale in un'elica destrorsa di circa tre amminoacidi per giro. Poiché le eliche polipeptidiche e la superelica sono avvolte secondo direzioni opposte, lo svolgimento delle prime è impedito dalla seconda. Sullo stesso principio si basa la costruzione dei cavi d'acciaio dei ponti sospesi e di altre strutture che richiedono fibre resistenti e, allo stesso tempo, leggere. Le tre catene polipeptidiche sono chiamate catene  $\alpha$ , contengono circa 1000 residui amminoacidici e, con l'eccezione di una corta sequenza alla fine delle catene, in ogni catena vi è una glicina ogni terzo amminoacido. La formula della molecola di una catena  $\alpha$  può essere così approssimata:  $(X-Y-Gly)_n$ , dove X e Y rappresentano amminoacidi diversi dalla glicina, che spesso sono residui di prolina e di idrossiprolina. La presenza della glicina, l'amminoacido più piccolo, in ogni terza posizione è fondamentale: dal momento che ogni catena di collagene ha una struttura ad elica con tre residui per giro, il terzo residuo in ogni catena è molto vicino alle altre due catene polipeptidiche. Questi stretti contatti, che hanno luogo lungo l'asse centrale dell'elica tripla, lasciano spazio solo per l'atomo di idrogeno che costituisce la catena laterale della glicina: qualsiasi gruppo più ingombrante provocherebbe un allontanamento reciproco delle tre catene di collagene. Legami idrogeno intermolecolari sono presenti fra l'idrogeno ammidico del residuo di glicina di una catena e l'ossigeno carbonilico di un residuo amminoacidico, spesso di prolina, di una catena adiacente, nella posizione X della tripletta che si ripete.

La conformazione dell'elica tripla dipende anche dalla presenza di prolina e idrossiprolina nelle catene  $\alpha$ . Nel collagene di mammiferi e uccelli, circa 100 delle posizioni X sono costituite da prolina e circa 100 delle posizioni Y da

idrossiprolina. Dato che prolina e idrossiprolina sono amminoacidi rigidi, essi limitano la rotazione dell'asse centrale del polipeptide, costringendolo ad assumere una struttura ad elica sottile e distesa: ciò contribuisce alla stabilità dell'elica tripla [Bornestein & Traub, 1979; Miller & Gay, 1982].

L'idrossiprolina (Figura 6) è un amminoacido specifico e caratteristico del collagene ed è stato ritrovato solamente in altre due proteine dei vertebrati, la porzione C1q del complemento [Reid, 1974; Porter & Reid, 1978] e la sequenza terminale simil-collagenica dell'acetilcolinesterasi [Rosenberry & Richardson, 1977]. Il gruppo idrossilico dell'idrossiprolina ha un ruolo fondamentale nello stabilizzare l'elica tripla del collagene, in quanto partecipa alla formazione di legami idrogeno tra le catene; tratti di collagene che mancano di idrossiprolina possono avvolgersi nella conformazione a elica tripla a basse temperature, ma l'elica tripla così formata non è stabile a temperatura corporea [Miller & Gay, 1982].

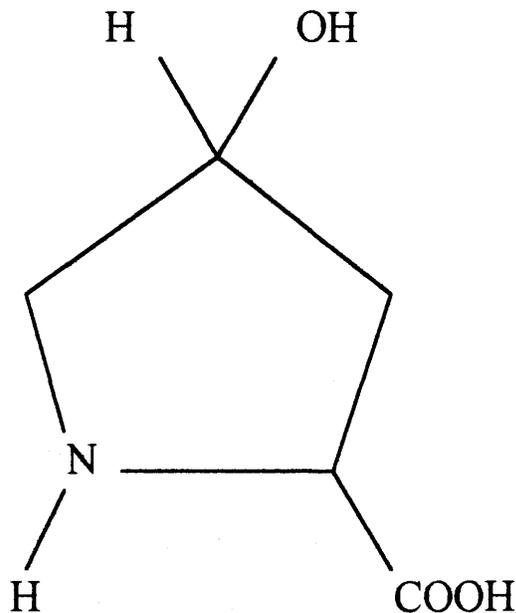


Figura 6: Struttura della 4-idrossiprolina.

Nel collagene dei mammiferi circa due terzi delle posizioni X e Y sono occupate da una varietà di amminoacidi diversi che diminuiscono la stabilità dell'elica tripla ma sono essenziali per l'organizzazione della proteina nel livello successivo, cioè per l'assemblaggio delle molecole a elica tripla nelle fibrille di collagene. Questi amminoacidi tendono ad essere riuniti in gruppi di residui carichi e idrofobici e, siccome le loro catene laterali si orientano fuori dal centro della tripla elica, essi determinano il modo in cui le molecole di collagene individuali si associano l'una con l'altra. Le molecole di collagene si dispongono testa contro coda in fasci paralleli. Le teste delle molecole di collagene sono sfalsate lungo la lunghezza delle fibre e sono responsabili della caratteristica spaziatura di 64 nm delle striature trasversali della maggior parte dei collageni [Prockop & Kivirikko, 1979]. Lo sfalsamento longitudinale delle molecole, determina la formazione di un "buco" tra la fine di un'elica tripla e l'inizio di una seguente, che probabilmente funge da sito di deposizione dei cristalli di idrossiapatite nella formazione dell'osso [Weiner & Traub, 1986; Christoffersen & Landis, 1991].

La resistenza e la rigidità delle fibre di collagene dipendono non solo dai legami idrogeno fra le singole eliche, ma anche da legami covalenti che si formano sia internamente a singole molecole, che tra molecole diverse che compongono una microfibrilla.

Bisogna inoltre aggiungere che il collagene è una glicoproteina [Pinnell et al., 1971], in quanto alcuni residui di idrossilisina sono legati, tramite legame  $\beta$ -glicosidico, al galattosio (Figura 7) o al glucosilgalattosio (Figura 8). La glicosilazione del collagene è catalizzata da due enzimi che agiscono in successione: la galattosiltransferasi e la glucosiltransferasi [Kivirikko & Myllyla, 1982]. La funzione degli zuccheri legati alla proteina non è stata ancora chiarita.

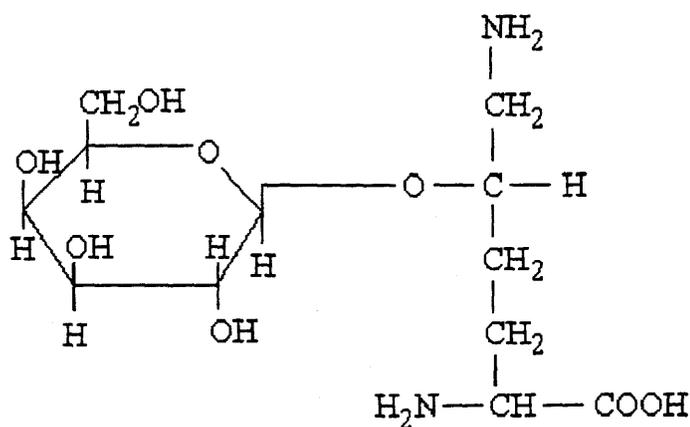


Figura 7: Struttura della galattosilidrossilisina (G-OH-Lys).

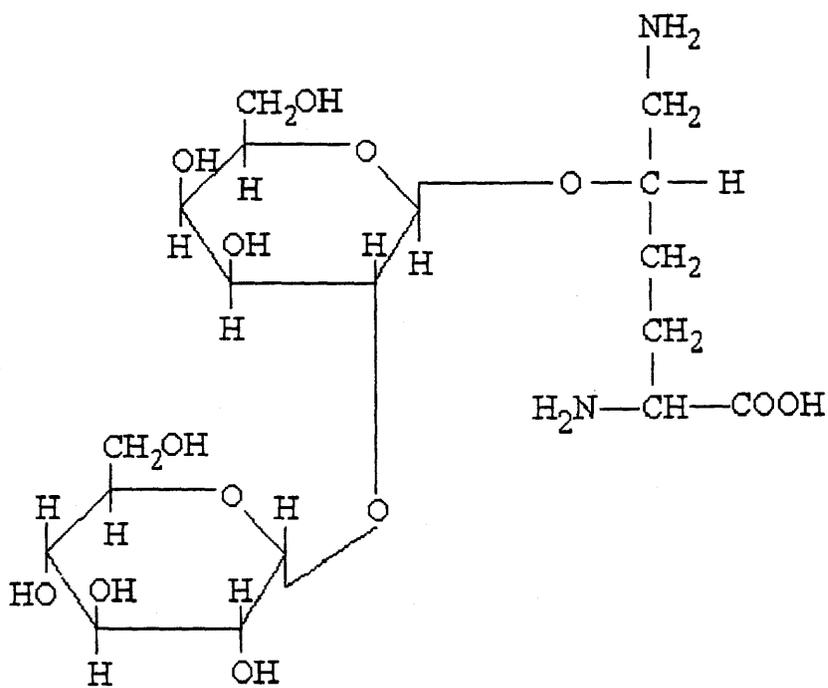


Figura 8: Struttura della glucosilgalattosilidrossilisina (GG-OH-Lys).

## Tipi di collagene

Nell'uomo sono presenti almeno 19 tipi di collagene, più altre 10 proteine che hanno domini simil-collagenici (Tabella 1). La maggior parte di essi forma fibrille extracellulari o strutture reticolari, ma gli altri svolgono un gran numero di funzioni biologiche [Miller, 1984; Kuhn, 1987; Mayne & Burgeson, 1987; Dixit et al., 1988; Prockop & Kivirikko, 1995]. Tutte queste molecole sono formate da sequenze simili ma non identiche che presentano la struttura generale  $(X-Y-Gly)_n$  che si ripete.

Il collagene di tipo I è la proteina presente in maggiore quantità nel tessuto connettivo di pelle, ossa, dentina, tendini e di numerosi altri tessuti: costituisce il 90% del collagene totale dell'organismo. Esso consiste di due catene polipeptidiche identiche chiamate  $\alpha 1(I)$  e di una catena leggermente differente chiamata  $\alpha 2(I)$ , avvolte tra di loro, in rapporto 2:1. Ha un basso contenuto di idrossilisina e di carboidrati [Treslad, 1982].

La cartilagine ialina contiene collagene di tipo II, che consta di tre catene identiche chiamate  $\alpha 1(II)$ : esso è stato trovato anche nella cornea, nel corpo vitreo, nei tessuti neuronali della retina e nei dischi intervertebrali; è formato da fibrille sottili ad alto contenuto di carboidrati e di idrossilisina [Yang et al., 1993a].

Il collagene di tipo III è composto da tre catene  $\alpha$  identiche, chiamate  $\alpha 1(III)$ . Il collagene di tipo III ammonta a circa il 10-50% del collagene totale dei tessuti adulti, come ad esempio le grandi arterie, i muscoli, i polmoni, il fegato, l'utero e la pelle. È caratterizzato da un basso contenuto di carboidrati e da un alto contenuto di idrossilisina e idrossiprolina [Epstein, 1974; Keene et al., 1991].

La membrana basale della capsula del cristallino, la membrana di Descemet della cornea e i glomeruli renali contengono collagene di tipo IV, costituito da tre catene identiche chiamate  $\alpha 1(IV)$ , ad alto contenuto di carboidrati e di idrossilisina [Keene et al., 1991].

Un altro tipo di collagene, quello di tipo V, che può derivare da membrane basali, è stato isolato da pelle, placenta e, in piccole quantità, da molti altri tessuti. Questo collagene consta di due catene polipeptidiche chiamate  $\alpha A$  e  $\alpha B$ : certe preparazioni di collagene di tipo V contengono inoltre un'altra catena, designata  $\alpha C$  [Brock et al., 1985].

Diversi altri tipi di collagene sono stati ritrovati nelle membrane basali; alcuni di questi possono avere dei domini simil collagenici relativamente corti,

intercalati a domini globulari. Il numero e la natura di questi collagene sono ancora incerti.

I vari tipi di collagene (Tabella 1) differiscono nel loro contenuto di idrossiprolina, idrossilisina e idrossilisina glicosilata, componenti che vengono sintetizzati da modificazioni post-traduzionali intracellulari.

### **Biosintesi del collagene**

Il collagene del tessuto osseo viene sintetizzato e secreto dagli osteoblasti (Tabella 2). Così come tutte le cellule, anche gli osteoblasti sintetizzano le molecole di collagene sotto forma di precursore chiamato procollagene (Figura 9) [Fessler & Fessler, 1978]. Il polipeptide, dopo la sintesi a livello ribosomiale, va incontro a diverse modificazioni post-traduzionali sia all'interno che all'esterno della cellula. All'interno del reticolo endoplasmatico rugoso circa un centinaio di residui di prolina e circa un terzo dei residui di lisina per catena vengono idrossilati da parte di idrossilasi specifiche (prolil e lisilidrossilasi), con la formazione di residui di idrossiprolina e idrossilisina [Prockop et al., 1976]. Circa il 30% dei residui di idrossilisina così formati, vengono poi ulteriormente modificati con l'attacco, da parte di glicosiltransferasi specifiche, di residui di galattosio e di glucosio [Kivirikko & Myllyla, 1979]. Tali reazioni determinano la formazione di residui di galattosilidrossilisina (G-OH-Lys) (Figura 7) e di glucosilgalattosilidrossilisina (GG-OH-Lys) (Figura 8). Nel caso del procollagene di tipo I, quando un centinaio di residui di prolina sono stati idrossilati, due catene di procollagene  $\alpha 1(I)$  ed una catena di procollagene  $\alpha 2(II)$  si avvolgono l'una sull'altra, formando una molecola di procollagene, che viene così secreta nello spazio extracellulare.

Recentemente sono stati clonati alcuni degli otto enzimi altamente specifici coinvolti nelle modificazioni post-traduzionali del collagene. Più di 400 mutazioni in 6 diversi tipi di collagene, causano una grande quantità di malattie come l'*Osteogenesis imperfecta*, alcune forme di osteoporosi e di osteoartrite, e la sindrome renale di Alport. Molti dei fenotipi di queste malattie sono stati prodotti in topi transgenici. Gli specifici enzimi coinvolti nelle modificazioni post-traduzionali del collagene potrebbero fungere da *targets* per inibire specificamente le reazioni fibrotiche eccessive che si hanno in un gran numero di malattie. Numerosi esperimenti suggeriscono che potrebbe essere possibile inibire la sintesi di collagene con oligonucleotidi o con geni antisense [Prockop & Kivirikko, 1995].

Tabella 1: Principali tipi di collagene

Tipo	Catene	Composizione	Struttura molecolare	Distribuzione nei tessuti
I	$\alpha 1(I), \alpha 2(I)$	Basso contenuto in idrossilisina, basso contenuto in carboidrati, fibrille grosse	300 nm	Tendini, ossa, cute, legamenti, cornea, organi interni (costituisce il 90% del collagene totale dell'organismo)
II	$\alpha 1(II)$	Alto contenuto in carboidrati, alto contenuto in idrossilisina, fibrille sottili	300 nm	Cartilagine, corpo vitreo dell'occhio, dischi intervertebrali
III	$\alpha 1(III)$	Basso contenuto in carboidrati, alto contenuto in idrossilisina	300 nm	Vasi sanguigni, cute, organi interni
IV	$\alpha 1(IV), \alpha 2(IV)$	Alto contenuto in idrossilisina, alto contenuto in carboidrati	390 nm C dominio globulare	Lamina basale
V	$\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V)$	Alto contenuto in carboidrati, alto contenuto in idrossilisina	300 nm N dominio globulare	In piccole quantità in molti tessuti
VI	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI)$		150 nm N+C dominio globulare	In piccole quantità in molti tessuti
VII	?		450 nm	Fibrille ancoranti
VIII	$\alpha 1(VIII)$		?	Cellule endoteliali
IX	$\alpha 1(IX), \alpha 2(IX), \alpha 3(IX)$		200 nm N dominio globulare	Cartilagine
X	$\alpha 1(X)$		150 nm C dominio globulare	Cartilagine ipertrofica e mineralizzante
XI	$\alpha 1(XI), \alpha 2(XI), \alpha 3(XI)$		300 nm	Cartilagine

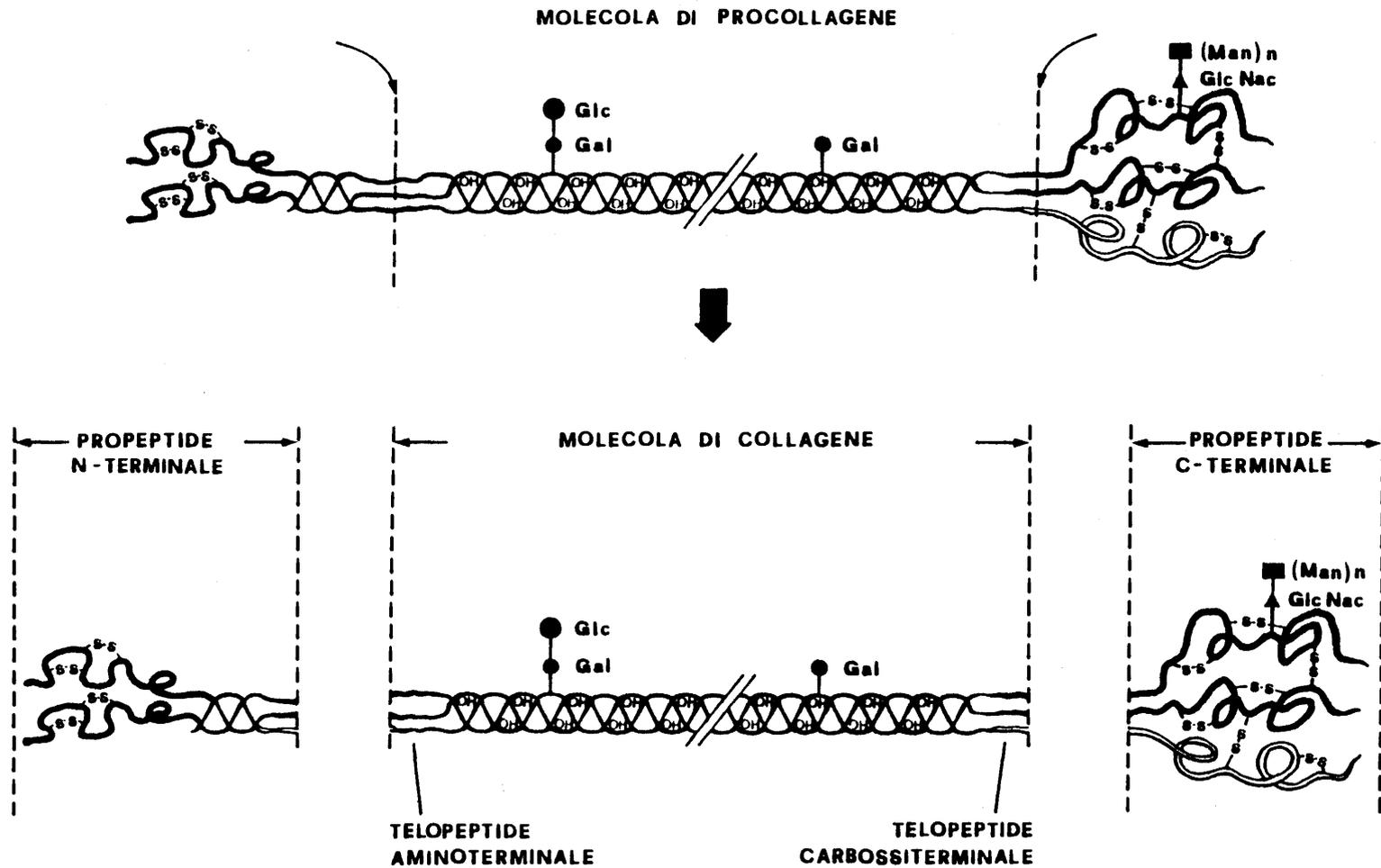


Figura 9: Rappresentazione schematica della struttura della molecola del procollagene, del collagene e dei propeptidi ammino- e carbossi-terminale. (Glc: glucosio; Gal: galattosio; Man: mannosio; Gic Nac: N-acetilglucosammina).

Nello spazio extracellulare, due proteasi specifiche tagliano le porzioni, per lo più globulari, presenti alle estremità ammino e carbossi terminali della porzione ad  $\alpha$  elica (Figura 9) [Fessler et al., 1985]. Questo processo determina la formazione della molecola di collagene vera e propria che, in assenza delle estremità globulari, non è più solubile e precipita nella matrice connettivale preesistente. In tale matrice il collagene va poi incontro ad ulteriori modificazioni che permettono di organizzare la molecola neosecreta secondo la rigida architettura della matrice connettivale. Tra queste modificazioni la più importante è la formazione dei ponti intra ed intermolecolari tra le molecole di collagene [Robins, 1982; Eyre et al., 1984; Eyre et al., 1988; Yamauchi et al., 1989]. La formazione di legami crociati intermolecolari implica la formazione di legami covalenti (basi di Schiff e i più complessi *cross-links*) che possono legare tra loro due o più molecole di collagene. Tra i *cross-links* intermolecolari si possono distinguere quelli formati nel collagene appena sintetizzato (detti *cross-links* riducibili, in quanto possono venire ridotti in vitro con  $\text{NaBH}_4$ ) e quelli costituenti il prodotto finale della loro maturazione (*cross-links* del 3-idrossipiridinio). Nella maggior parte dei tessuti, i *cross-links* riducibili con  $\text{NaBH}_4$  scompaiono gradualmente man mano che il collagene matura, suggerendo che essi sono prodotti intermedi ad emivita breve. Eccezioni sono costituite dall'osso e dalla dentina, dove i residui riducibili persistono in concentrazioni apprezzabili lungo tutto l'arco della vita, apparentemente perché la rapida mineralizzazione delle fibre di collagene appena sintetizzate, inibisce ulteriori riarrangiamenti molecolari. I *cross-links* intermolecolari dei tessuti maturi non possono essere ridotti con  $\text{NaBH}_4$ , sono stabili ad alte temperature e a pH bassi [Prockop & Tuderman, 1982]. L'enzima lisilossidasi agisce sulle fibre di collagene appena processate e precipitate nella matrice extracellulare per produrre i derivati aldeidici della lisina o dell'idrossilisina, che costituiscono i precursori dei *cross-links* (Figura 10) [Light & Bailey, 1982; Eyre et al., 1984; Eyre, 1987]. La via dell'allisina (Figura 10a) predomina nella pelle, nella cornea e nel tendine della coda del ratto, mentre la via dell'idrossiallisina (Figura 10b) prevale nell'osso, nella cartilagine, nei legamenti e in numerosi altri tessuti. Si ritiene che variazioni nelle proprietà meccaniche e fisiche fra differenti tessuti connettivi siano dovute in parte a differenze nei *cross-links* del collagene. In generale, la via dell'idrossiallisina predomina nei tessuti connettivi che supportano grandi carichi meccanici e sembra essere governata esclusivamente dal fatto che

residui di lisina siano idrossilati in quegli specifici siti della molecola di collagene dove la lisilossidasi formerà più tardi i residui aldeidici.

Tabella 2: Biosintesi del collagene.

1. TRASCRIZIONE GENICA
2. TRADUZIONE
3. IDROSSILAZIONE DELLA PROLINA \*
4. IDROSSILAZIONE DELLA LISINA \*
5. GLICOSILAZIONE \*
6. FORMAZIONE DELL'ELICA
7. TRASPORTO INTRACELLULARE
8. SECREZIONE
9. TRASPORTO EXTRACELLULARE
10. CONVERSIONE DEL PROCOLLAGENE IN COLLAGENE \*
11. FORMAZIONE DELL'ALDEIDE \*
12. FORMAZIONE DELLA FIBRILLA
13. FORMAZIONE DEI LEGAMI CROCIATI

\* Modificazioni post-traduzionali che richiedono enzimi specifici.

Nel collagene di tipo I, II e III questi residui sembra che siano largamente o esclusivamente localizzati nelle sequenze ammino e carbossi terminali che mancano della struttura ripetitiva  $(\text{Gly-X-Y})_n$ . I prodotti finali nelle fibre mature sono sconosciuti per quanto riguarda la via dell'allisina, mentre quelli che si formano nella via dell'idrossiallisina sono stati identificati e denominati *cross-links* del 3-idrossipiridinio. Lungo la via dell'idrossiallisina sono evidenziati due *cross-links* riducibili con  $\text{NaBH}_4$  (Figura 10b): essi sono costituiti dalle basi di Schiff (aldimmine) tra l'idrossiallisina e l'idrossilisina (diidrossilisinonorleucina quando ridotta, DHLN) o la lisina (idrossilisinonorleucina quando ridotta, HLN). Il gruppo  $\alpha$  idrossilico fa sì che queste aldimmine ( $-\text{CHOH}-\text{CH}=\text{N}-$ ) si riarrangino spontaneamente in chetoammine ( $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ), la forma predominante nelle fibre di collagene. Questo riarrangiamento di Amadori è completo ed irreversibile. I prodotti finali della via dell'idrossiallisina (*cross-links* del 3-idrossipiridinio) sono composti trivalenti: la idrossilisilpiridinolina o piridinolina (PID), formata da tre residui di idrossilisina, e la lisilpiridinolina o deossipiridinolina

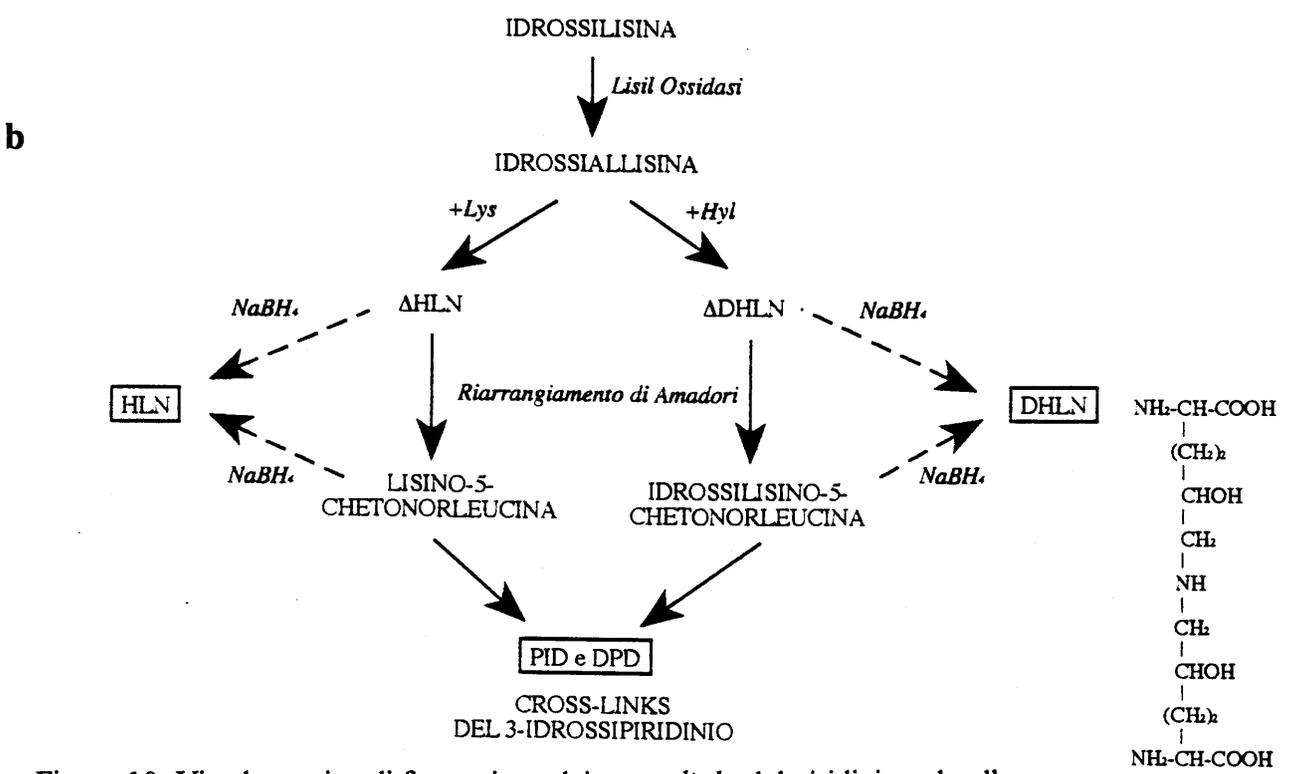
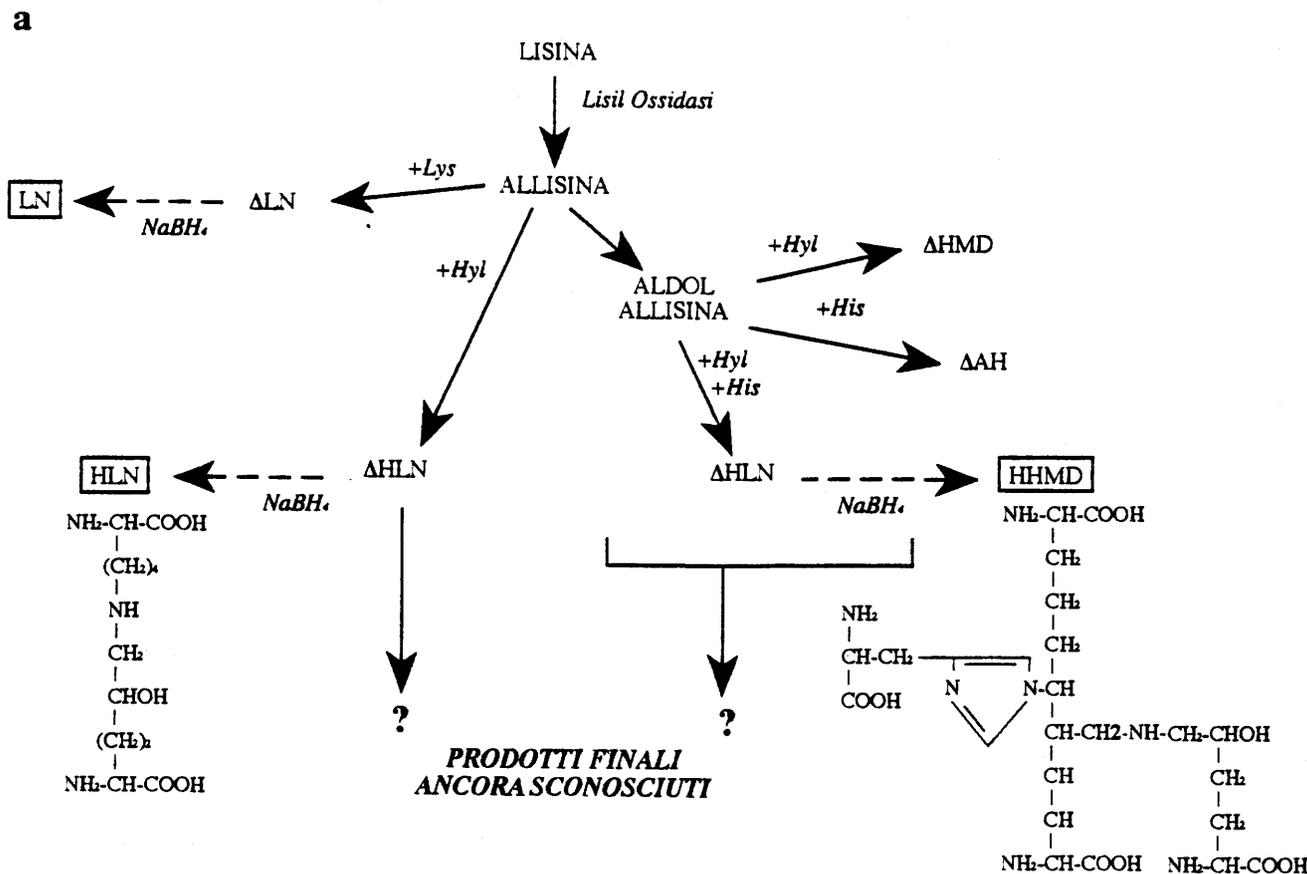


Figura 10: Vie alternative di formazione dei *cross-links* del piridinio nel collagene.  
 a. Prodotti che si formano dalla deaminazione ossidativa della lisina (pelle, cornea, tendine della coda di ratto). (HLN: idrossilisinonorleucina; HHMD: istidino-idrossimerodesmosina; LN: lisinonorleucina; HMD: idrossimerodesmosina; AH: aldolistidina; LN, HMD e AH sono componenti minori).  
 b. Prodotti che si formano dalla deaminazione ossidativa della idrossilina (molti tessuti). (DHLN: diidrossilisinonorleucina; PID: piridinolina; DPD: deossipiridinolina).

(DPD), formata da due residui di idrossilisina e uno di lisina (Figura 11). Entrambi i composti sono naturalmente fluorescenti e presentano le stesse caratteristiche negli spettri di eccitazione ed emissione ( $\lambda_{\text{ecc}}=297$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=395$  nm). È stato proposto un meccanismo di formazione di questi composti in cui due chetoammine interagiscono tramite condensazione aldolica, seguita da chiusura dell'anello e ossidazione (Figura 12).

La maggior parte delle aldimmine e chetoammine che portano alla formazione dei *cross-links* nei collagene della pelle, dell'osso e della cartilagine, sono glicosilate, in quanto si formano a partire da residui di idrossilisina glicosilata (Figura 13). Il *pattern* di glicosilazione dei *cross-links* varia nei diversi tessuti. Nei tendini, i *cross-links* riducibili sono in gran parte non glicosilati. Il significato dei residui zuccherini non è noto, per esempio essi potrebbero facilitare o inibire particolari azioni di *cross-linking*. I *cross-links* del piridinio nell'osso sono glicosilati, ma l'instabilità alcalina dell'anello fa sì che sia difficile misurare il loro grado di glicosilazione. Inoltre, l'idrossilisina glicosilata non sembra poter agire come substrato per la lisilossidasi, quindi non può formare aldeidi. I dati a questo proposito sono quindi discordanti.

Le molecole di collagene di tipo I, II e III hanno conservati gli stessi siti omologhi di *cross-linking*. Sono state stabilite solo quattro localizzazioni per la formazione dei *cross-links*, due siti telopeptidici (uno ad ogni estremità della molecola) e due siti a elica tripla. Le loro localizzazioni sono mostrate in Figura 14. Le catene  $\alpha 1(\text{I})$ ,  $\alpha 1(\text{II})$ ,  $\alpha 1(\text{III})$  hanno una lisina che può formare l'aldeide alle due estremità N e C terminali, mentre la catena  $\alpha 2(\text{I})$  manca del sito aldeidico all'estremità C terminale. Due sequenze simili di *cross-linking* (–Gly–X–Hyl–Gly–His–Arg–) sono presenti nella regione a elica tripla, simmetricamente a  $0.4 D$  ( $D = 67$  nm, o 234 residui amminoacidici) da ciascuna estremità della molecola. La catena  $\alpha 2(\text{I})$  mostra differenze soprattutto al sito carbossi terminale, ma probabilmente contiene un'idrossilisina in una posizione tale da formare comunque un legame crociato. L'idrossilisina dentro ciascuna di queste sequenze ad elica interagisce con un'aldeide telopeptidica posta in una molecola di collagene adiacente, sfalsata di una distanza pari a  $4 \times D$ . Gli amminoacidi che costituiscono i *cross-links* del piridinio uniscono due aldeidi telopeptidiche ad un sito ad elica. Non è ancora stato stabilito se le due aldeidi telopeptidiche siano localizzate in due diverse molecole di collagene sfalsate tra di loro (Figura 15) o in due catene

diverse della stessa molecola, quindi non è ancora noto se i *cross-links* del piridinio leghino tra loro due o tre molecole di collagene.

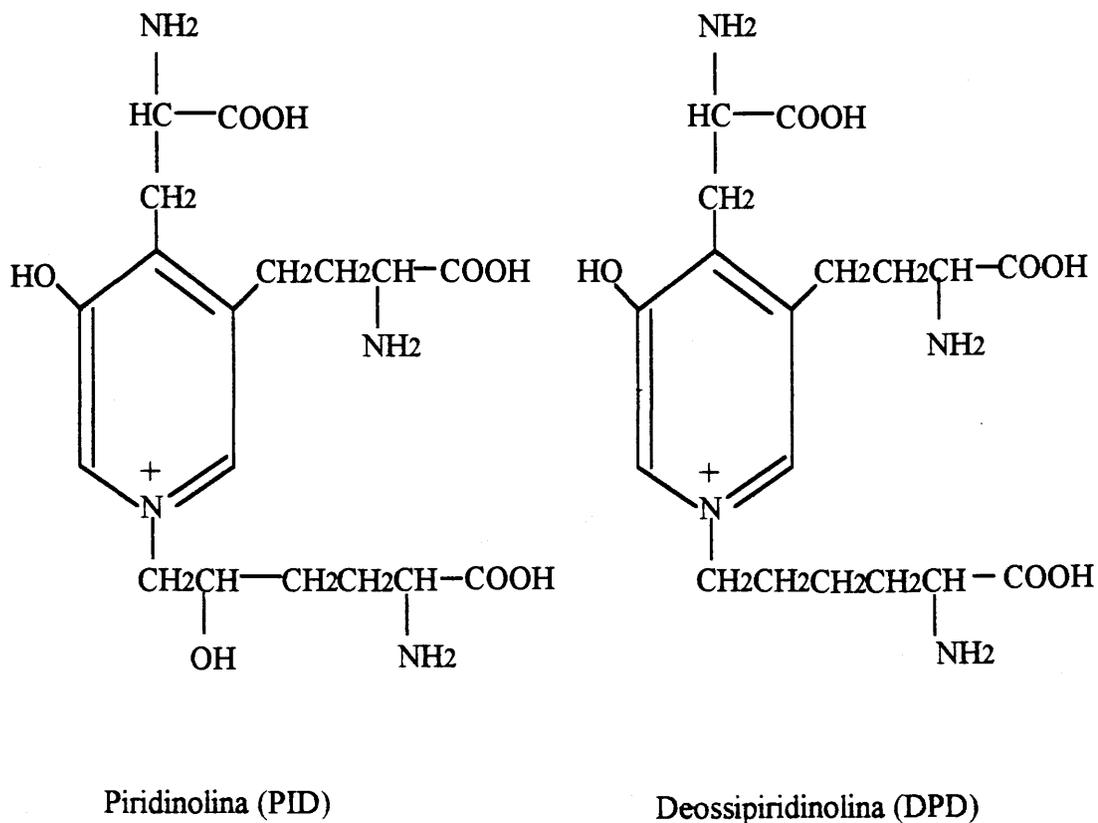


Figura 11: Struttura dei *cross-links* del piridinio: piridinolina (PID) e deossipiridinolina (DPD).

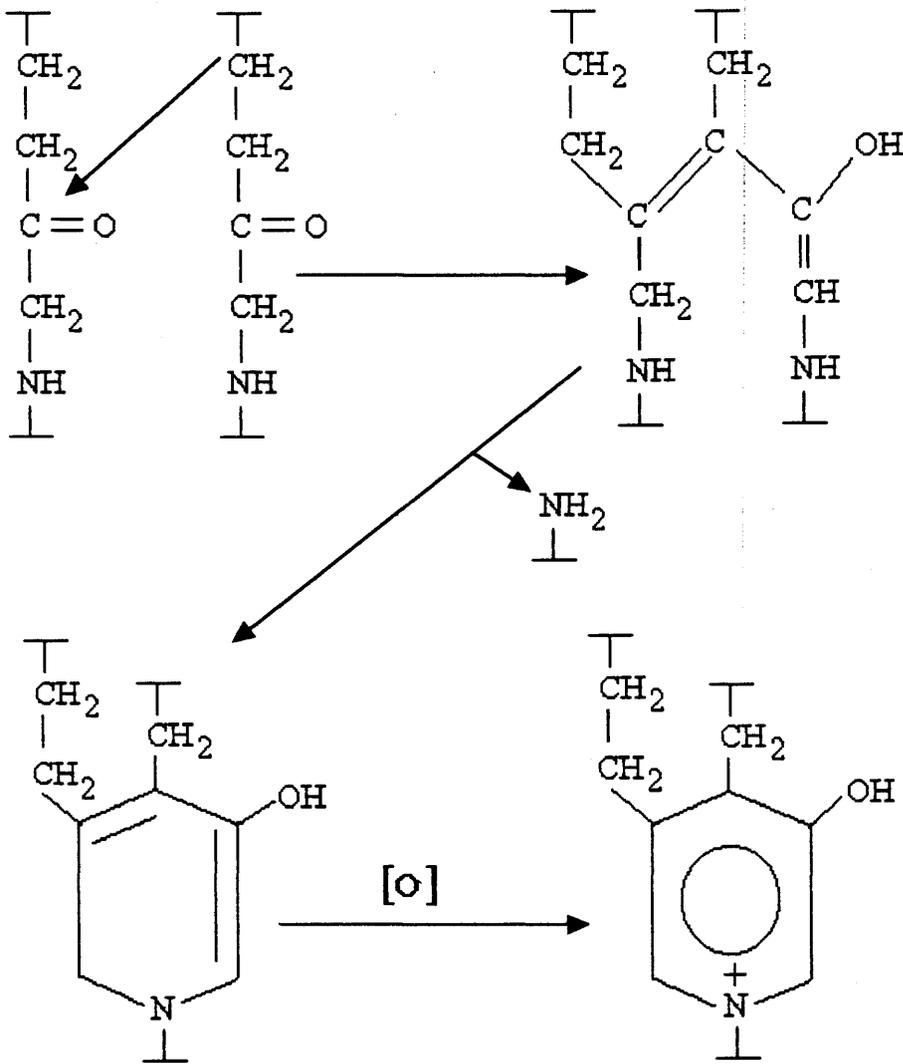
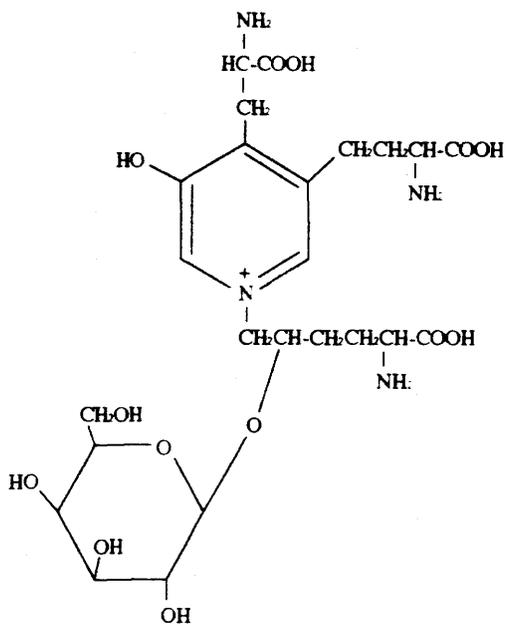
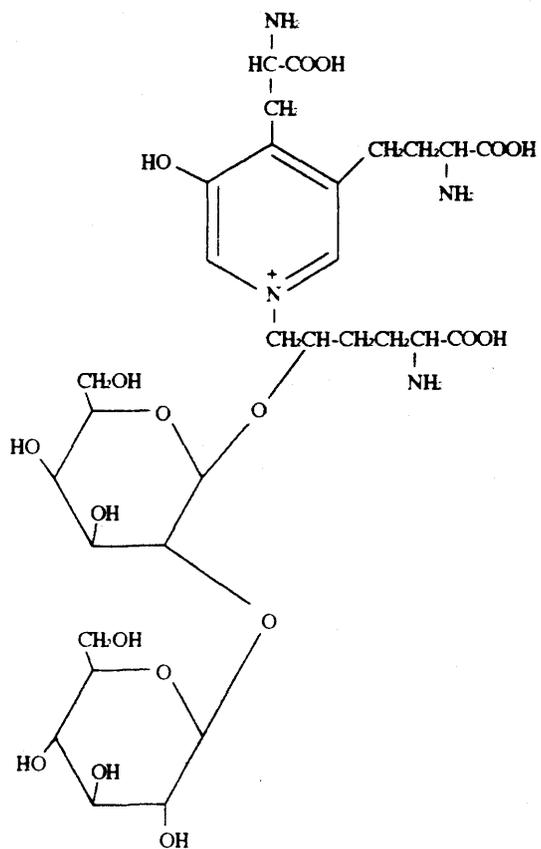


Figura 12: Schema di reazione in cui due chetoammine interagiscono per produrre un *cross-link* del 3-idrossipiridinio.



Galattosilpiridinolina



Glucosilgalattosilpiridinolina

Figura 13: Derivato mono e disaccaridico della piridinolina.

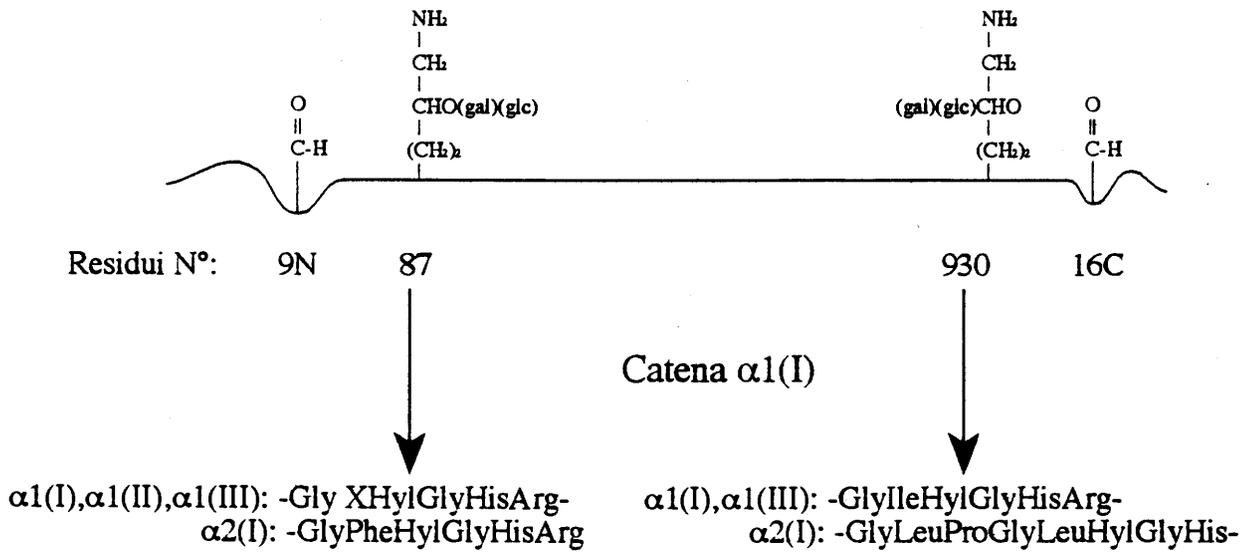


Figura 14: Le quattro principali localizzazioni per la formazione dei *cross-links* del piridinio nelle molecole di collagene di tipo I, II, III.

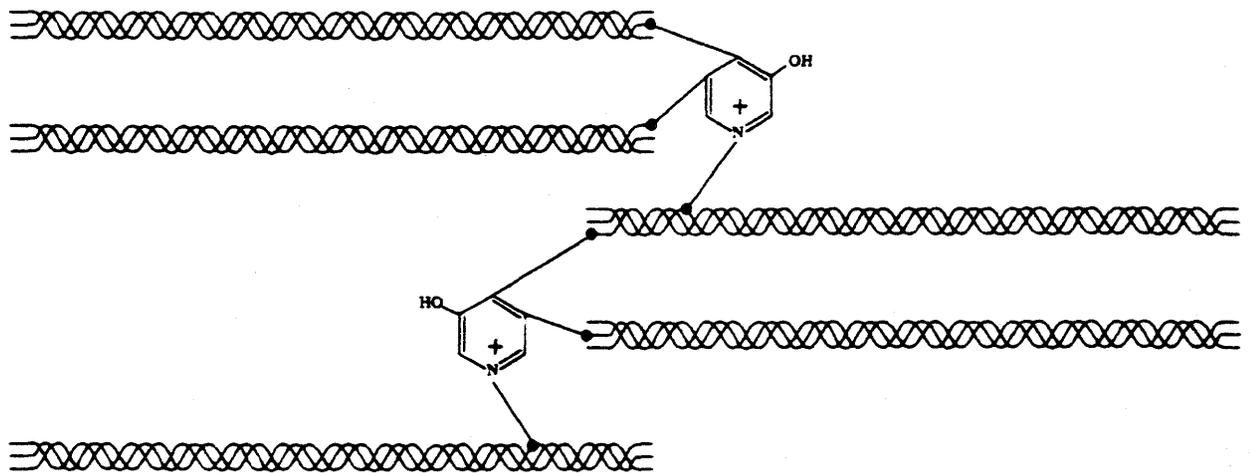


Figura 15: Postulato meccanismo di formazione e siti molecolari dei *cross-links* del piridinio nelle fibre di collagene. Ciascuna molecola di *cross-links* unisce due aldeidi telopeptidiche ad un sito ad elica. Non è ancora noto se le due aldeidi telopeptidiche siano localizzate in molecole diverse non sfalsate tra loro (come mostrato in questa figura) o su due catene di una stessa molecola.

## Le proteine non collageniche

Le proteine non collageniche costituiscono il 10-15% del contenuto totale di proteine ossee (Figura 5). Circa un quarto delle proteine non collageniche ha un'origine esogena, esse vengono assorbite o intrappolate negli spazi della matrice ossea. Le proteine di origine serica sono ampiamente rappresentate perché, essendo proteine acide, interagiscono con la componente minerale dell'osso, l'idrossiapatite. Alcune di queste proteine possono essere utili al tessuto. Ad esempio, i fattori di crescita intrappolati (ad es. il *platelet-derived growth factor*, *PDGF*) potrebbero facilmente contribuire alla rigenerazione dell'osso in seguito a una frattura [Termine, 1988].

Le proteine non collageniche possono essere suddivise in quattro gruppi:

- proteine che mediano l'interazione cellulare;
- proteoglicani;
- proteine contenenti acido  $\gamma$ -carbossiglutammico (gla);
- fattori di crescita.

Queste classi sono spesso sovrapponibili e la maggior parte dei ruoli fisiologici dei singoli costituenti proteici dell'osso resta ancora indefinita (Tabella 3).

Tabella 3: Principali proteine non collageniche della matrice ossea.

Nome	Peso molecolare	Potenziale funzione
Trombospondina	450'000 (trimero)	Adesione cellulare
Fibronectina	440'000 (dimero)	Adesione cellulare, diffusione cellulare
Biglicano (proteoglicano I)	170'000 (monomero)	Sconosciuta
Decorina (proteoglicano II)	120'000 (monomero)	Fibrillogenesi del collagene
Sialoproteina ossea	75'000 (monomero)	Adesione cellulare, altre sconosciute
Osteopontina	50'000 (monomero)	Adesione cellulare, diffusione cellulare
Osteonectina	35'000 (monomero)	Legame del $Ca^{2+}$ , altre sconosciute
Proteina della matrice contenente gla	9'000 (monomero)	Sconosciuta
Osteocalcina	6'000 (monomero)	Legame del $Ca^{2+}$ , rimodellamento osseo

### **Proteine che mediano l'interazione cellulare**

Le cellule dei tessuti connettivi, stimulate da fattori che ne inducono o coordinano specifiche funzioni (ad es. la proliferazione, la migrazione e la differenziazione), interagiscono con il loro ambiente extracellulare. Queste particolari interazioni necessitano l'attacco e l'adesione delle cellule alle macromolecole extracellulari. Questo si attua attraverso le *integrine*, proteine con funzioni recettoriali, che trasmettono i segnali al citoscheletro [Ruoslahti & Pierschbacher, 1987]. Le cellule dell'osso sintetizzano quattro proteine che sono coinvolte nel processo di interazione cellula-cellula e cellula matrice: la *fibronectina* (FN), la *trombospondina* (TSP), l'*osteopontina* (OP) e la *sialoproteina ossea* (BSP) [Gehron et al., 1988; Somerman et al., 1988]. Tre di queste, TSP, OP e BSP legano fortemente lo ione calcio. Soltanto la BSP si trova quasi esclusivamente nello scheletro, le altre sono presenti anche in altri tessuti [Fisher et al., 1987b; Gehron et al., 1988; Mark et al., 1988; Somerman et al., 1988]. L'OP e la BSP legano gli osteoclasti tramite le integrine, consentendo lo svolgimento della funzione di riassorbimento osseo in quanto consentono all'osteoclasta di polarizzarsi e formare l'orletto a spazzola.

### **Proteoglicani**

I proteoglicani (PG) sono macromolecole che contengono catene di polisaccaridi acidi (*glicosamminoglicani*) attaccati ad un *core* centrale proteico. Nell'osso si trovano due tipi di glicosamminoglicani: il *condroitin solfato* (la forma predominante), un polimero di N-acetilgalattosammina solfatata e di acido glucuronico; e l'*eparan solfato*, un polimero di N-acetilglucosammina solfatata e di acido glucuronico.

L'eparan solfato è associato alla membrana e probabilmente facilita l'interazione dell'osteoblasta con macromolecole extracellulari (alcune delle quali sono proteine che mediano l'interazione cellulare come FN o TSP) e con fattori di crescita leganti l'eparina [Hook et al., 1986; Beresford et al., 1987].

Il condroitin solfato, nella matrice ossea, si attacca a tre diversi *core* proteici [Beresford et al., 1987]. Uno di questi, del peso di circa 300'000 D, chiamato *versicano*, sembra importante nel mantenimento dell'integrità dell'ambiente circostante la cellula [Krusius et al., 1987].

La maggior parte dei glicosamminoglicani sono attaccati a due piccoli *core* proteici di circa 40'000 di peso molecolare, espressione della sintesi di geni distinti. In base alle loro migrazioni elettroforetiche, essi sono chiamati *PG-1*, che ha attaccate due catene di condroitin solfato di 50'000 D di peso

molecolare e *PG-2*, con attaccata un'unica catena di condroitin solfato dello stesso peso molecolare [Fisher et al., 1987b]. Il *PG-1*, detto *biglicano*, è più abbondante nelle ossa fetali e in quelle giovani rispetto alle ossa adulte, mentre il *PG-2*, chiamato *decorina*, si trova in tutti gli stadi di sviluppo osseo. Quest'ultimo è chiamato *decorina* perché si lega alle fibrille di collagene e sembra implicato nella regolazione della fibrillogenesi [Ruoslahti, 1988]. Sebbene l'esatta funzione di questi piccoli proteoglicani non sia completamente chiarita, essi sono considerati importanti per l'integrità della matrice dei connettivi. Inoltre essi sono in grado di legarsi e inattivare il *transforming growth factor-β* (*TGF-β*) influenzando così la proliferazione e la differenziazione delle cellule del tessuto osseo.

### **Proteine contenenti acido $\gamma$ -carbossiglutammico**

L'*osteocalcina* (*bone-gla-protein*, BGP) e la *proteina della matrice contenente acido  $\gamma$ -carbossiglutammico* (*matrix-gla-protein*, MGP) sono due proteine non collageniche della matrice dell'osso. La BGP è specifica per l'osso, mentre la MGP è presente anche nella cartilagine [Price, 1987].

La sintesi di osteocalcina nell'osso è fortemente stimolata dall' $1,25(\text{OH})_2$ -vitamina  $\text{D}_3$  e sembra essere un segnale nella cascata di eventi che regola il rimodellamento osseo [Glowacki & Lian, 1985]. La BGP e la MGP presentano omologie strutturali, ma non è chiaro se in condizioni fisiologiche la loro azione sia congiunta o separata. L'osteocalcina serica viene utilizzata come *marker* di *turnover* osseo [Price et al., 1980].

### **Fattori di crescita**

Nella matrice ossea sono presenti diversi fattori di crescita, che influenzano sia il ciclo cellulare che la funzionalità degli osteoblasti. Queste proteine sono: il *transforming growth factor-β* (*TGF-β*) e l'*insulin-like growth factor-I* (*IGF-I*); essi vengono sintetizzati e secreti dagli osteoblasti e ne stimolano la crescita numerica in modo autocrino e/o paracrino [Gehron et al., 1987; Canalis et al., 1988a].

Altre molecole sono associate non solo all'aumento del numero degli osteoblasti, ma anche al loro differenziamento in cellule mature, con un meccanismo indiretto o comunque ancora non definito come, ad esempio, la fosfatasi alcalina, che l'osteoblasta sintetizza in grandi quantità. Questo enzima, presente sulla membrana plasmatica dell'osteoblasta (Figura 2), viene in parte liberato e assorbito negli spazi mineralizzati della matrice ossea.

Tuttavia, resta ancora da chiarire la funzione della fosfatasi alcalina sulla biologia cellulare dell'osso.

L'*osteonectina*, una glicoproteina fosforilata che costituisce circa il 2% delle proteine totali dell'osso, rappresenta la proteina non collagenica più abbondante prodotta dall'osso. Essa ha una grande affinità di legame per gli ioni calcio e per l'idrossiapatite [Termine et al., 1981]. Si lega anche al collagene [Termine et al., 1981] e alla trombospondina [Cleazardin et al., 1988]. Questa proteina si trova anche in tessuti diversi dall'osso che si caratterizzano per una rapida proliferazione o che subiscono profondi cambiamenti nella loro architettura [Holland et al., 1987; Wewer et al., 1988]. Le funzioni dell'*osteonectina* sono probabilmente molteplici, essendo potenzialmente associata con la crescita e la proliferazione degli osteoblasti, e con la mineralizzazione della matrice.

### 1.1.3 Il minerale

La fase minerale è composta essenzialmente da un fosfato di calcio basico, che viene idealizzato come *idrossiapatite* ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) (HA), ma con un rapporto molare calcio/fosfato pari a 1.2, inferiore a quello dell'idrossiapatite che è 1.67. La fase minerale si trova in intima relazione con le fibrille di collagene, depositata negli spazi vuoti tra una fibrilla e l'altra.

Altri fosfati di calcio, quali la *bruscite* ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), l'*octacalcio fosfato* ( $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), il  $\beta$ -*tricalciofosfato* ( $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) ( $\beta$ -TCP), il *fosfato di calcio amorfo* ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), sono stati identificati, da soli o in associazione con l'apatite, come costituenti di calcificazioni patologiche. Inoltre, questi fosfati sono indicati come possibili precursori dell'apatite biologica in quanto si ritrovano all'inizio della mineralizzazione, nelle ossa giovani. Man mano che la mineralizzazione progredisce, la fase solida assume la struttura dell'idrossiapatite scarsamente cristallizzata con il tipico, relativamente basso, rapporto molare calcio/fosfato. Con l'età il grado di cristallinità aumenta così come aumenta il rapporto calcio/fosfato.

In tale contesto, la conoscenza della struttura dell'idrossiapatite è di primaria importanza. Essa appartiene al gruppo spaziale  $P6_{3/m}$  che è caratterizzato dai seguenti elementi di simmetria:

- 1) un asse senario elicogiro, parallelo all'asse *c*, di periodo 1/2;
- 2) due piani di riflessione paralleli al piano *ab*, ad 1/4 e 3/4 di *c*.

L'idrossiapatite cristallizza in forma esagonale e nella cella unitaria (Figura 16) contiene due unità stechiometriche [Kay et al., 1964]. Le dimensioni della cella unitaria sono:

$$\begin{array}{ll} \mathbf{a} = 9.419 \text{ \AA} & \alpha = 90^\circ \\ \mathbf{b} = \mathbf{a} & \beta = \alpha \\ \mathbf{c} = 6.880 \text{ \AA} & \gamma = 120^\circ \end{array}$$

La struttura è costituita da strati di ioni fosfato tetraedrici fra cui sono inseriti gli ioni calcio; questi si trovano in due siti cristallograficamente indipendenti: un sito è sui filari paralleli all'asse *c* (sito 1) e l'altro costituisce i vertici di triangoli equilateri (sito 2).

La disposizione relativa dei triangoli citati genera dei canali, detti *canali X*, che rappresentano la via di accesso più probabile per le sostituzioni ioniche (Figura 17). Gli ossidrili si trovano al centro dei canali *X* e, assimilando il legame O-H ad un vettore, risultano orientati senza un ordine preciso nel verso positivo o negativo dell'asse *c*.

Le caratteristiche principali dei depositi apatitici riscontrati nelle calcificazioni biologiche sono, oltre al sopra citato rapporto Ca/P diverso dal valore stechiometrico di 1.67, la bassa cristallinità e la presenza di quantità significative di ioni estranei che possono essere semplicemente adsorbiti sulla superficie apatitica o entrare a fare parte del reticolo cristallino.

In Tabella 4 è riportata la composizione ionica di alcuni tessuti calcificati fisiologicamente.

Le apatiti biologiche sono generalmente carbonato apatiti. Gli ioni carbonato possono occupare due posizioni diverse nella struttura apatitica: si sostituiscono agli ioni OH<sup>-</sup> [sito A] o agli ioni PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> [sito B]. Le idrossiapatiti carbonatate di tipo A e B risultano distinguibili sia dalla posizione delle bande relative allo ione carbonato, negli spettri di assorbimento all'infrarosso [LeGeros et al., 1967; Bonel, 1972], sia dal parametro *a* della cella elementare. La sostituzione al sito A provoca un allargamento del parametro *a*, contrariamente a quanto si verifica per la sostituzione al gruppo fosfato. In quest'ultimo caso, inoltre, per rispettare le condizioni di elettroneutralità deve verificarsi una delle seguenti ipotesi:

- a) lo ione calcio viene sostituito da uno ione monovalente;
- b) esiste una vacanza di ione calcio per ogni due fosfati che vengono sostituiti;
- c) per ogni carbonato che sostituisce uno ione fosfato, ne esiste un altro che sostituisce uno ione ossidrile

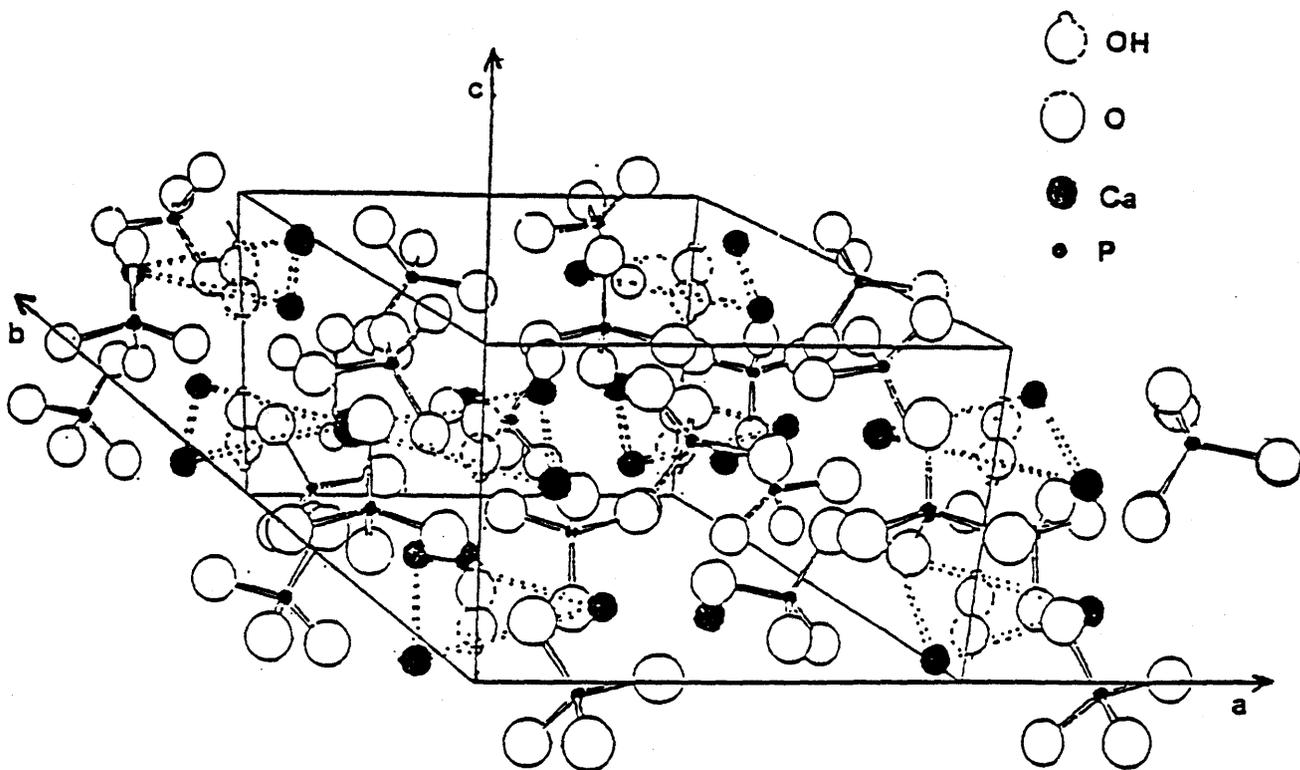


Figura 16: Idrossiapatite (forma esagonale):

$a = 9.419 \text{ \AA}$	$\alpha = 90^\circ$
$b = a$	$\beta = \alpha$
$c = 6.800 \text{ \AA}$	$\gamma = 120^\circ$

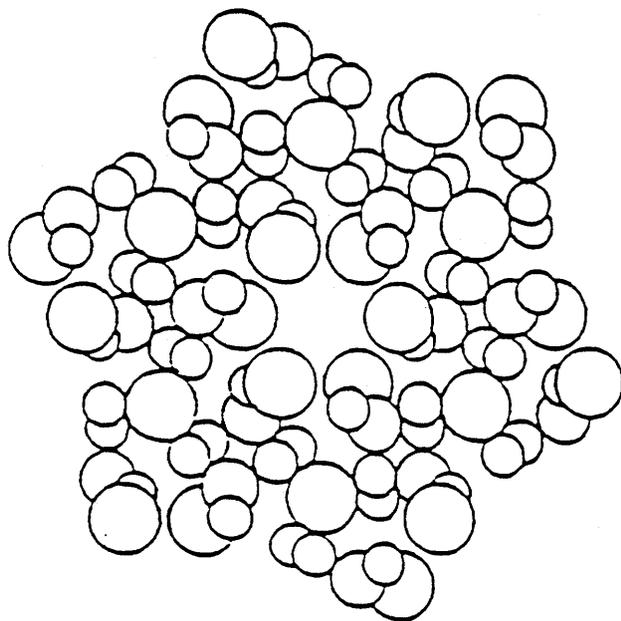


Figura 17: Idrossiapatite: proiezione sul piano ab, in cui è evidenziato un canale X.  
(Gli ioni  $\text{OH}^-$  sono omessi per chiarezza).

Tabella 4: Composizione ionica di smalto, dentina e osso.

Composizione*	Smalto	Dentina	Osso
Ca <sup>2+</sup>	36.5	27.5	24.5
P	17.1	13.0	11.5
(Ca/P) in peso	2.06	2.12	2.33
(Ca/P) molare	1.58	1.6	1.80
Na <sup>+</sup>	0.3	0.6	0.7
K <sup>+</sup>	0.08	0.05	0.02
Mg <sup>2+</sup>	0.34	0.81	0.10
Zn <sup>2+</sup>	0.015-0.21	0.010-0.015	0.003
Elementi in tracce: Sr <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Be <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , etc.	-	-	-
CO <sup>3-</sup>	3.5	5.0	6.0
F <sup>-</sup>	0.01	0.02	0.02
Cl <sup>-</sup>	0.30	0.01	0.10
Ceneri (tot.inorg.)	97.0	70.0	65.0
Totale organico	1.0	20.0	25.0
H <sub>2</sub> O adsorbita	2.0	10.0	10.0

\* La composizione è espressa come % del tessuto secco.

L'effetto della sostituzione del carbonato sulla stabilità della fase apatitica non è chiaro: nel caso delle apatiti sintetiche si ha una destabilizzazione, mentre per le apatiti naturali, per lo più di tipo B [Apfelbaum et al., 1992], si osserva un aumento di cristallinità. Tra i cationi estranei alla struttura apatitica ed associati alla fase minerale, il magnesio riveste un'importanza notevole, sia per il suo contenuto relativo abbastanza elevato nei tessuti calcificati, sia per il ruolo particolare svolto sulla sintesi e cristallizzazione della fase apatitica. Infatti, a differenza di altri cationi quali il cadmio, lo stronzio e il piombo, che possono sostituirsi completamente allo ione calcio nella struttura dell'idrossiapatite sintetica [Heijligers, et al., 1979; Bigi et al., 1984; Bigi et al., 1986b; Bigi et al., 1989], la presenza di magnesio in soluzione promuove la formazione del  $\beta$ -TCP a spese della HA [LeGeros et al., 1980; Baravelli et al., 1984]. Nonostante i numerosi tentativi riportati in letteratura di incorporare il magnesio all'interno della struttura apatitica, questo ione sembra essere respinto dal reticolo cristallino e la sua sostituzione al calcio, se avviene, è in quantità molto modesta [Terpstra & Driessens, 1986]. Ciò è in accordo con il principio generale secondo cui ioni con raggio ionico maggiore del calcio possono sostituire ampiamente questo ione, mentre ioni con raggio più piccolo trovano maggiore difficoltà.

I risultati di uno studio condotto su apatiti sintetizzate in presenza di diverse concentrazioni di magnesio in soluzione, indicano che il magnesio inibisce la crescita dei cristalli apatitici probabilmente attraverso il suo adsorbimento sulla superficie dei primi nuclei apatitici, che disordina le strutture cristalline prevenendone così l'ulteriore crescita [Bigi et al., 1993]. La sintesi in presenza di magnesio produce una fase apatitica solo per concentrazioni di magnesio inferiori a 30 atomi %. Tuttavia, la massima quantità di magnesio che può entrare nella struttura dell'idrossiapatite è di circa 7 atomi % e la sostituzione al calcio avviene esclusivamente nel sito 2 del reticolo cristallino. Il magnesio rimanente è localizzato nella componente amorfa e adsorbito sulla superficie dei cristalli. L'inclusione del magnesio nella fase apatitica, indipendentemente dalla sua localizzazione, promuove la conversione dell'HA in  $\beta$ -TCP magnesio sostituito ( $\beta$ -TCMP) [Bigi et al., 1993].

Analogamente, l'idrossiapatite sintetica, sottoposta a fluttuazioni cicliche di pH in presenza di soluzioni contenenti magnesio, dà origine ad una fase apatitica che per trattamento termico si converte parzialmente in  $\beta$ -TCMP. La quantità di conversione termica aumenta con l'incremento del magnesio adsorbito sulla struttura apatitica [Baravelli et al., 1984; Bigi et al., 1993].

L'influenza del magnesio sui depositi biologici e, in particolare, sulla stabilità relativa dell'HA e del  $\beta$ -TCP è forse ancora più evidente. Il trattamento termico dei depositi apatitici dell'osso e di numerose calcificazioni biologiche e patologiche che a temperatura ambiente presentano un diffrattogramma di raggi X caratteristico di una fase apatitica poco cristallina, provoca non solo un aumento nel grado di cristallinità, ma anche una parziale conversione in  $\beta$ -TCMP (Figura 18).

La fase apatitica, che si deposita all'inizio del processo di calcificazione della valvola mitrale umana in cui c'è un alto contenuto di magnesio, si converte completamente in  $\beta$ -TCMP per trattamento termico a 1000°C. D'altra parte, la fase apatitica isolata dalle valvole molto calcificate, che contengono magnesio in quantità molto ridotte, ha un'elevata stabilità termica e non dà origine ad alcuna conversione per trattamento termico a 1000°C [Bigi et al., 1988a], (Figura 19). Inoltre, in tutte le biomineralizzazioni in cui è stata evidenziata la presenza di  $\beta$ -TCP, come nelle carie dentali, nella tonaca media della parete aortica di soggetti affetti da arteriosclerosi, nei calcoli salivari e renali, questa fase risulta parzialmente sostituita in magnesio [Rowles, 1968; Bigi et al., 1980]. In particolare, la fase inorganica depositata nella tonaca media dell'aorta è costituita da  $\beta$ -TCMP molto cristallino (Figura 20).

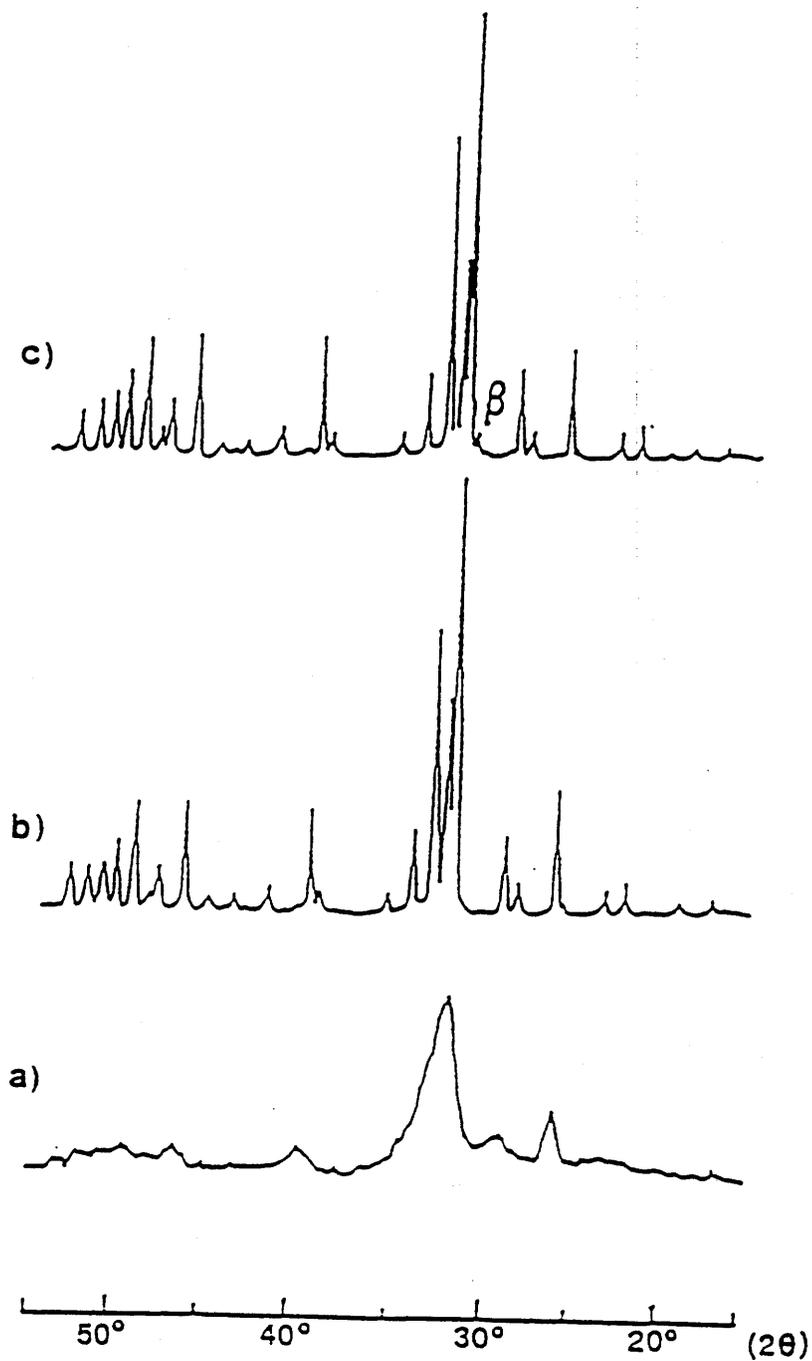


Figura 18: Diagrammi di diffrazione di raggi-X di polveri di idrossiapatite ossea:  
 a) dopo trattamento termico a 500°C;  
 b) dopo trattamento termico a 700°C;  
 c) dopo trattamento termico a 900°C.

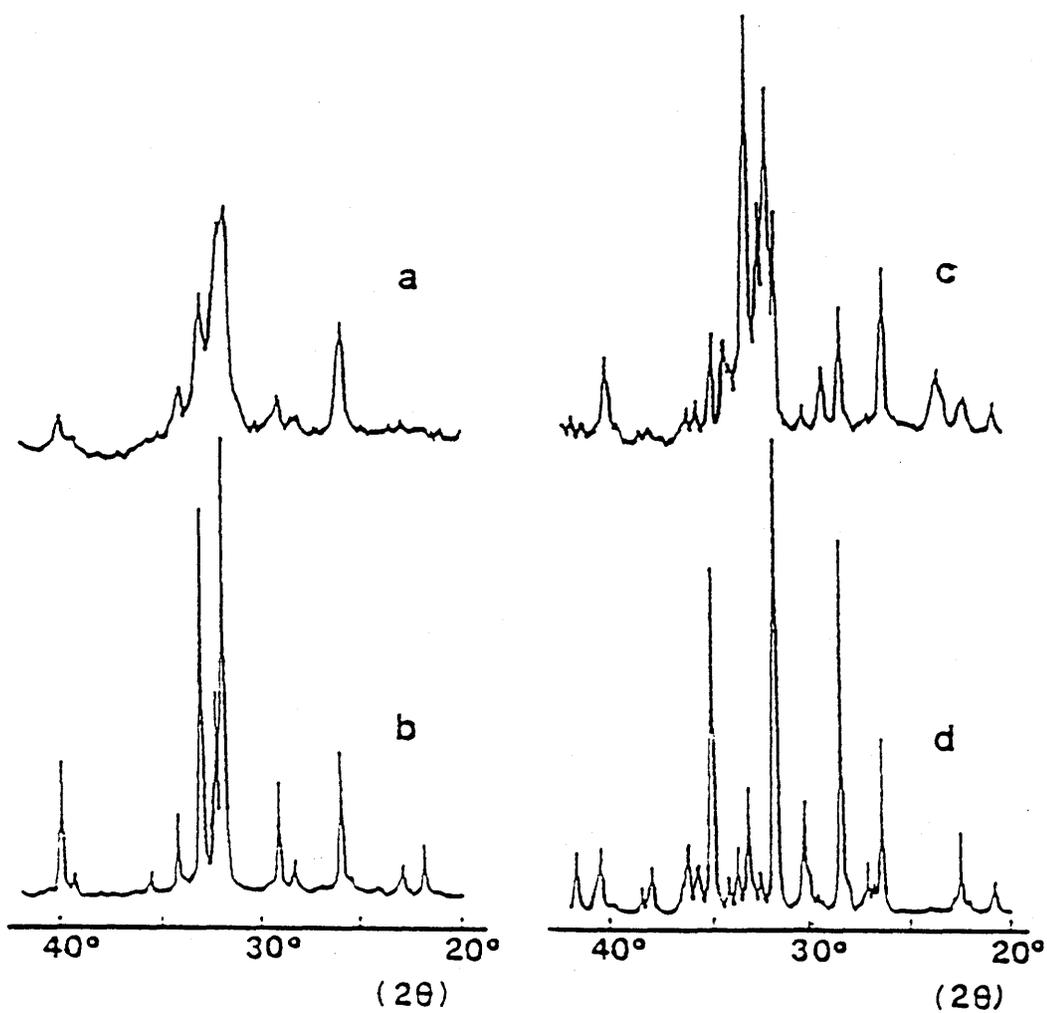


Figura 19: Diagrammi di diffrazione di raggi-X di polveri di depositi inorganici isolati da una valvola mitrale altamente calcificata esaminata a 25°C (a), e dopo trattamento termico a 600°C (b); (c) e (d) mostrano i diagrammi delle ceneri ottenute da una valvola mitrale poco calcificata a 600°C e dopo trattamento termico a 1000°C, rispettivamente.

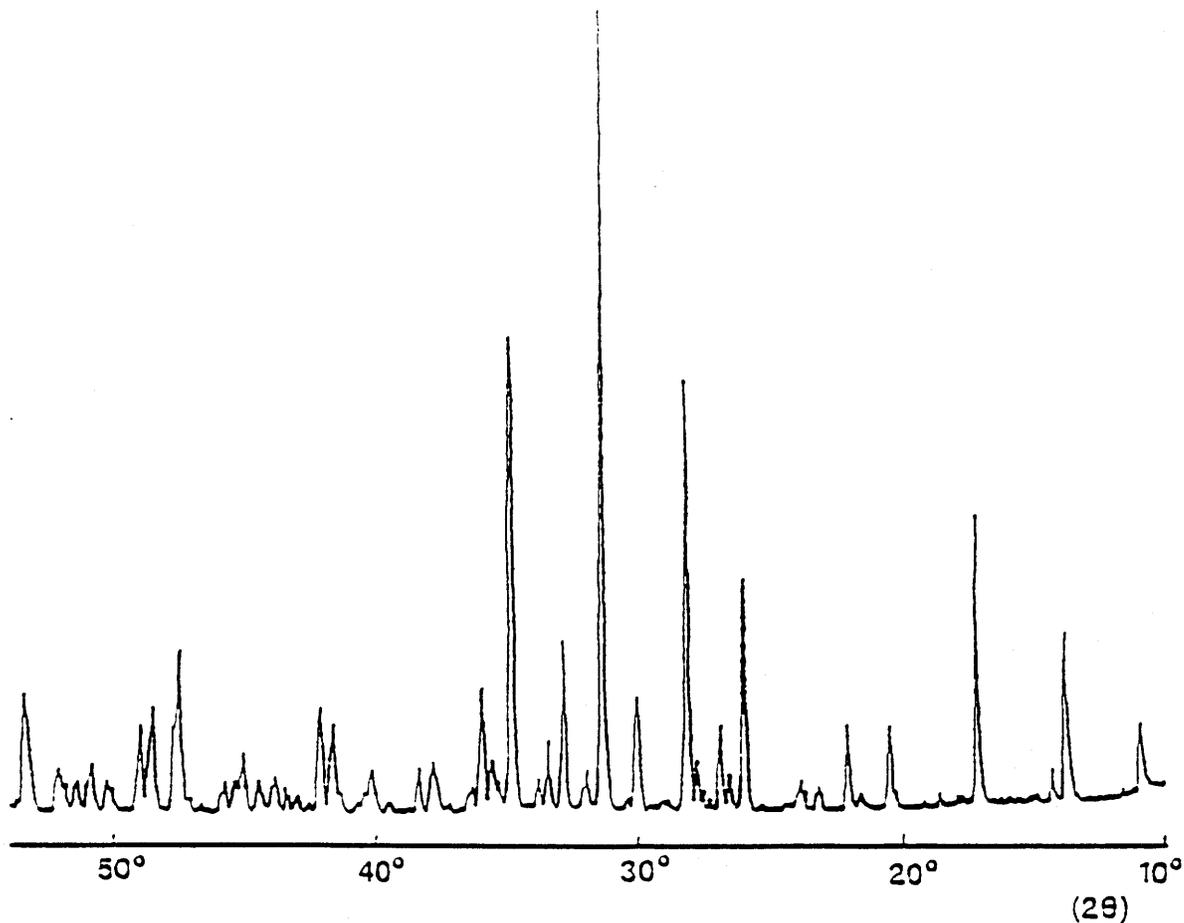


Figura 20: Diagramma di diffrazione di raggi-X di  $\beta$ -TCMP.

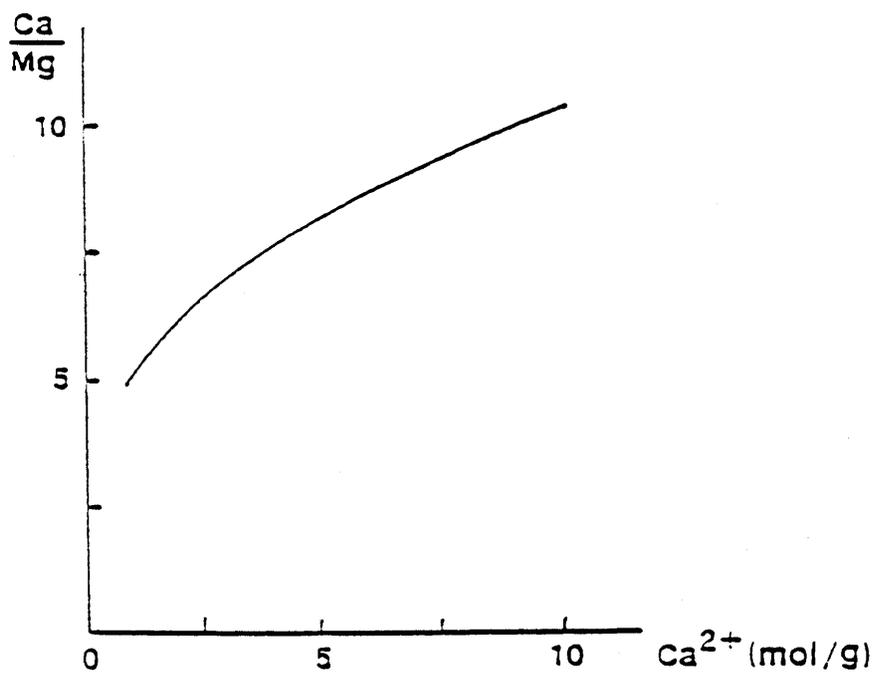


Figura 21: Rapporto molare Ca/Mg delle ceneri della tonaca media dell'aorta riportato in funzione del grado di calcificazione espresso in moli di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  per grammo di tessuto secco.

Il contenuto di magnesio di questa fase è molto elevato (circa 17 atomi %) e cala all'aumentare del grado di calcificazione (Figura 21).

Nel  $\beta$ -TCP sintetico il magnesio può sostituire il calcio fino al 20%, provocando una variazione molto particolare dei parametri reticolari. Come si può osservare in Figura 22, sia *a* che *c* calano linearmente all'aumentare della concentrazione di magnesio, fino a che è stato sostituito circa l'11% degli ioni calcio; a concentrazioni maggiori *a* continua a contrarsi, anche se più lentamente, mentre l'andamento di *c* si inverte [Bigi et al., 1988].

Per la localizzazione del magnesio nell'apatite ossea sono state avanzate le seguenti ipotesi [Sigel & Sigel, 1990]:

- 1) potrebbe sostituirsi al calcio nell'apatite poco cristallizzata;
- 2) potrebbe occupare un sito sulla superficie cristallina nello strato di idratazione;
- 3) potrebbe essere presente in una fase non apatitica;
- 4) potrebbe essere associato alla matrice organica.

Comunque, qualsiasi sia la sua localizzazione, è evidente che il magnesio gioca un ruolo molto importante sulla stabilità delle apatiti biologiche.

C'è un limite per la concentrazione di ioni calcio e fosfato nel liquido extracellulare al di sotto del quale la mineralizzazione non avviene. Tuttavia, il prodotto di solubilità è difficile da calcolare, in quanto la stessa fase minerale è di composizione variabile e la reale natura delle specie in soluzione che governano tale prodotto non è nota. In ogni caso, quando le concentrazioni di calcio e fosfato nei liquidi extracellulari sono molto elevate, si può osservare la precipitazione di minerale in tessuti che normalmente non mineralizzano.

La fase inorganica, depositata durante i primi stadi della calcificazione, consiste di granuli apatitici regolarmente distribuiti a livello della zona meno densa della struttura fibrillare del collagene. Durante gli ultimi stadi della calcificazione si ha la deposizione preferenziale di cristalliti apatitici allungati, che crescono tra le microfibrille, con il loro asse *c* pressoché parallelo alle fibrille di collagene [Bigi et al., 1988b; Bigi et al., 1991] (Figura 23).

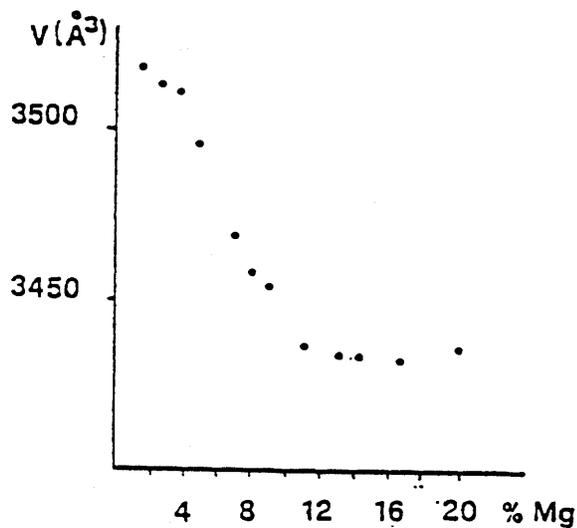
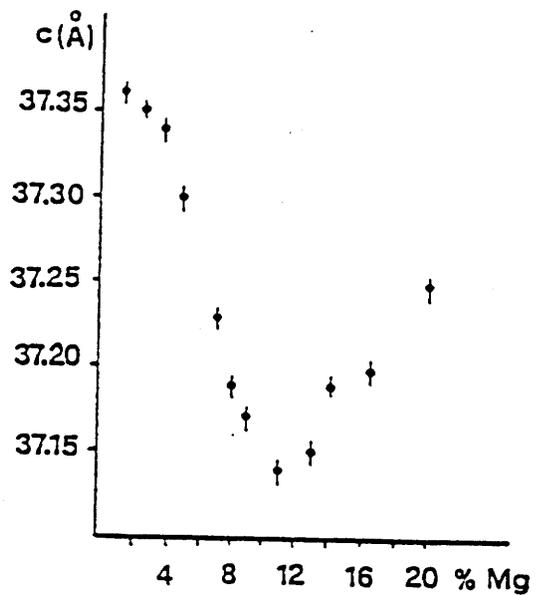
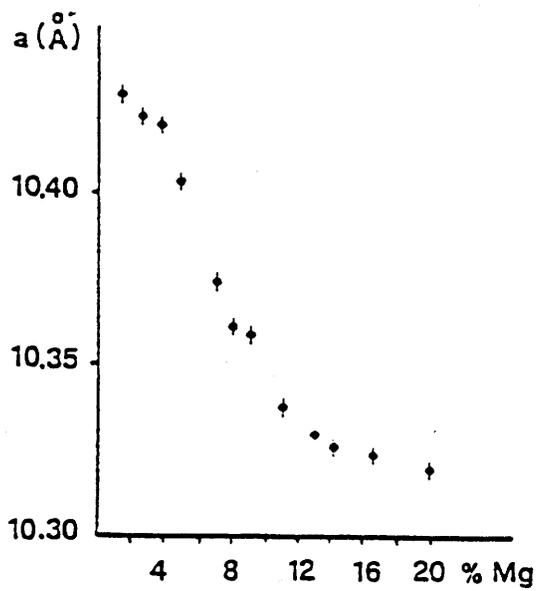
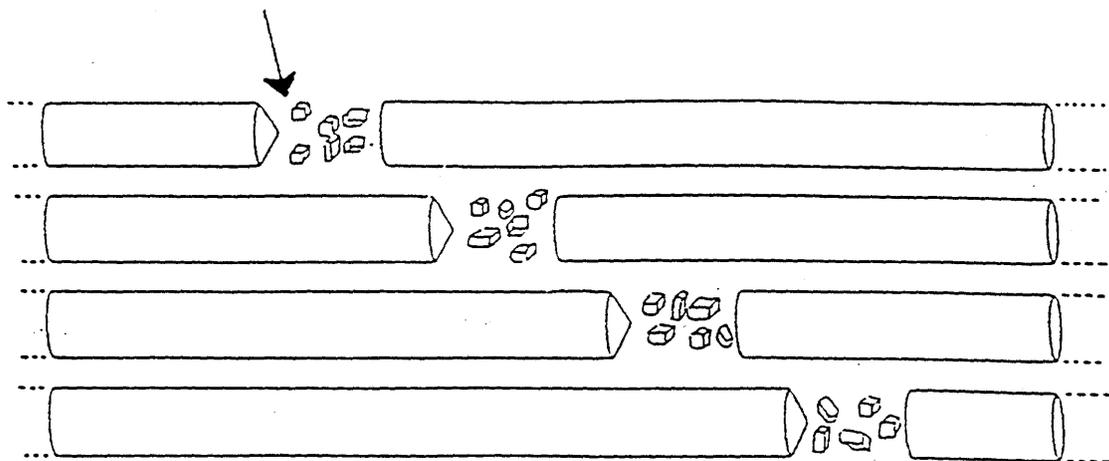
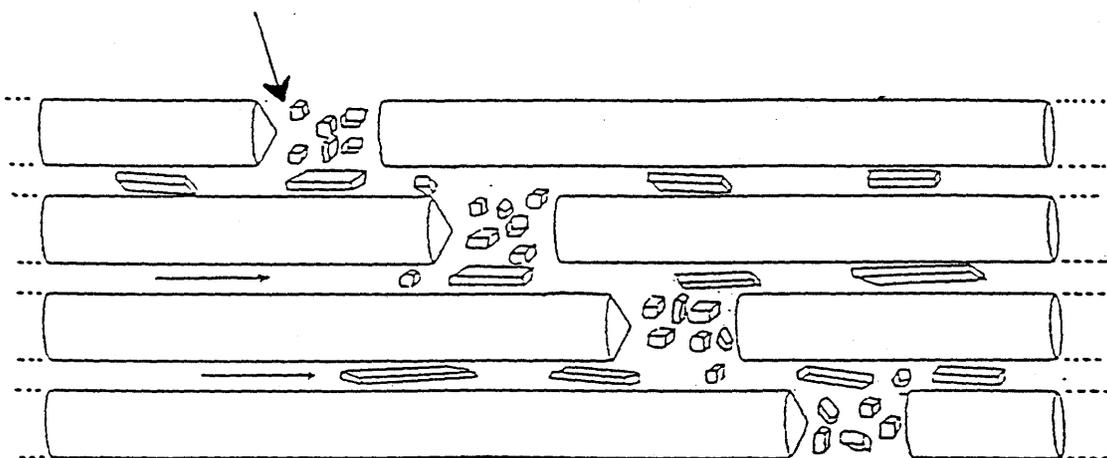


Figura 22:  $\beta$ -TCP magnesio sostituito: variazione dei lati della cella elementare e del volume, in funzione della concentrazione di Mg.



a)



b)

Figura 23: Rappresentazione schematica della distribuzione dei cristalli di idrossiapatite durante i primi (a) e gli ultimi (b) stadi della calcificazione.

## 1.2 Modellamento e rimodellamento

Il tessuto osseo si rimodella costantemente nel corso della vita. Le modalità secondo le quali il tessuto osseo viene rimaneggiato dipendono dall'attività di osteoblasti ed osteoclasti e variano nei diversi momenti di vita. Nella fase di sviluppo corporeo il tessuto osseo va incontro a processi di crescita e modellamento; il risultato è il conseguimento di uno scheletro adulto con forma e massa ossea normali. La massa ossea che viene raggiunta al termine della fase di modellamento osseo è detta "picco di massa ossea". Il picco di massa ossea viene raggiunto in momenti diversi nei diversi distretti scheletrici; nel compartimento trabecolare sembra che tale picco si abbia già al termine della pubertà, mentre nell'osso corticale si ha un ulteriore aumento di circa il 10% della massa ossea tra la fine della pubertà ed i 30-35 anni di età.

Il picco di massa ossea dipende da diversi fattori. Oltre ai fattori genetici, che risultano predominanti, fattori meccanici e nutrizionali partecipano alla determinazione dell'entità del picco di massa ossea. Quando il picco di massa ossea è stato raggiunto, la massa ossea ad ogni tempo è rappresentata dalla differenza tra il picco di massa e la perdita di massa ossea che è avvenuta in questo intervallo di tempo.

Dal momento del conseguimento del picco di massa ossea, il tessuto osseo viene rimodellato al fine di sostituire tessuto osseo vecchio con tessuto neoformato, con caratteristiche biomeccaniche più adatte allo svolgimento delle funzioni dello scheletro. Nelle fasi di rimodellamento osseo gli osteoblasti e gli osteoclasti agiscono in maniera accoppiata e formano una vera e propria *unità di rimodellamento osseo*. Il ciclo di rimodellamento (Figura 24) inizia con l'attivazione di quest'ultima e il primo evento è la retrazione delle cellule ossee quiescenti (*lining cells*) che rivestono la matrice mineralizzata che deve essere sostituita. Tale retrazione permette agli osteoclasti attivati di entrare in diretto contatto con la matrice ossea e di riassorbirla (*fase di riassorbimento*) producendo una lacuna di riassorbimento chiamata *lacuna di Howship*. A questa fase segue la cosiddetta *fase di reversione*, caratterizzata dall'assenza di cellule nella lacuna di riassorbimento. Successivamente, nella lacuna di Howship, si nota la comparsa di osteoblasti che iniziano a sintetizzare matrice. Questa fase viene chiamata *fase di formazione*. Il ciclo si completa con una fase cosiddetta *di quiescenza*, in cui si notano le *lining cells* che si dispongono a forma di tappeto sulla matrice neoformata.

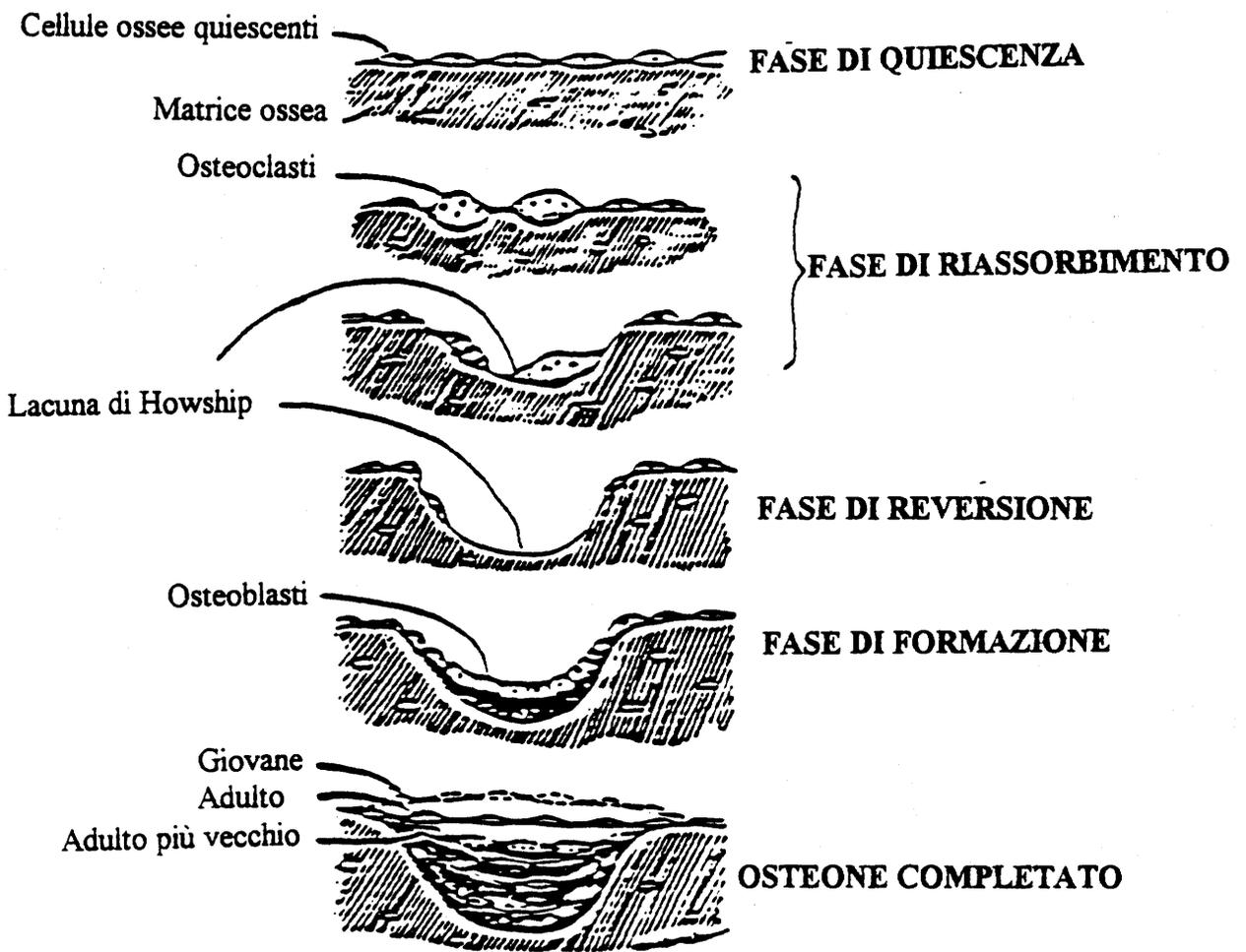


Figura 24: Il rimodellamento osseo.

Da studi cinetici condotti con  $^{47}\text{Ca}$  risulta che ogni anno viene depositato e rimosso il 18% dello scheletro. Il rimodellamento dell'osso avviene lungo linee di forza determinate dallo stress meccanico e tradotte in risposta biologica. Il riassorbimento è un fenomeno più intenso e veloce rispetto alla formazione. Se i processi di crescita e modellamento ossei determinano, in situazioni fisiologiche, un aumento della massa ossea, i processi di rimodellamento osseo in situazioni fisiologiche possono solo mantenere la massa ossea raggiunta al termine delle fasi di crescita, tramite un equilibrio tra l'attività riassorbitiva degli osteoclasti e l'attività neoformativa degli osteoblasti. In realtà, tale equilibrio si ha solo nei primi anni dopo il raggiungimento del picco di massa ossea. A partire dalla quarta-quinta decade di vita nell'uomo e dal periodo perimenopausale nella donna, l'accoppiamento tra osteoclasti ed osteoblasti risulta sbilanciato in favore dei processi riassorbitivi, con quella diminuzione della massa ossea che è correntemente documentata in uomini e donne sani.

Riassorbimento e formazione sono, dunque, fenomeni tra di loro accoppiati, anche se possono risultare sbilanciati. Infatti, fintanto che la quota di osso riassorbita viene completamente riformata, la massa ossea rimane immodificata. Quando invece il riassorbimento prevale sulla neoformazione, la massa ossea diminuisce.

Questo processo ciclico si realizza anche con il contributo dei fattori locali di crescita, che tramite la loro attività *autocrina* e *paracrina*, immediata e ritardata, attuano quella regolazione reciproca tra le due popolazioni cellulari (osteoblasti ed osteoclasti) che consente il susseguirsi delle diverse fasi. In conclusione, la plasticità dell'osso è dovuta alla risposta delle cellule che interagiscono sia tra di loro che con l'ambiente circostante.

### 1.2.1 Meccanismo di riassorbimento osseo

Il riassorbimento osseo inizia con l'acidificazione del compartimento extracellulare, operata dall'osteoclasta, per secrezione di protoni attraverso la membrana del suo orletto a spazzola. Recenti evidenze suggeriscono la presenza, su questa cellula, di una pompa di protoni ATP dipendente, che assomiglia a quella presente sui tubuli renali. I protoni sono prodotti dall'attività dell'*anidrasi carbonica*, presente in grande concentrazione nel citoplasma dell'osteoclasta; l'anidride carbonica e l'ATP necessari sono di origine mitocondriale. La membrana basolaterale scambia attivamente bicarbonati con cloruri, impedendo in tal modo l'alcalinizzazione del citosol.

Altri scambiatori di ioni possono essere coinvolti in un trasporto attivo di calcio e/o protoni in associazione con scambiatori di  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  e/o  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$ .

Enzimi lisosomiali sono attivamente sintetizzati dagli osteoclasti e si trovano nel reticolo endoplasmatico, nell'apparato di Golgi e in numerose vescicole di trasporto. Questi enzimi vengono secreti, attraverso l'orletto a spazzola, nel compartimento extracellulare. Gli ioni  $\text{H}^+$  prodotti dalla pompa protonica forniscono un ambiente ottimale per la degradazione della matrice ossea attuata da questi enzimi proteolitici. L'osteoclasta inoltre secreta l'enzima collagenasi.

Il compartimento osseo extracellulare nel quale si attua il riassorbimento è, come già detto parlando degli osteoclasti, l'equivalente di un lisosoma secondario (Figura 3). Cronologicamente, i cristalli sono mobilizzati dalla digestione dei loro legami con il collagene (tramite proteine non-collageniche) e dissolti dall'ambiente acido; le fibre di collagene residue sono digerite sia dall'attivazione della collagenasi latente che dall'azione delle catepsine a pH acido.

L'osteoclasta è una cellula mobile. Esso riassorbe l'osso per formare una lacuna, poi si muove lungo la superficie ossea per riassorbire un'altra area di osso. I periodi di locomozione non sono associati con il riassorbimento: solo quando la cellula smette di muoversi, essa di solito inizia a riassorbire l'osso.

Numerosi altri processi possono essere coinvolti nel complesso fenomeno di riassorbimento osseo. Alcuni autori suggeriscono che la superficie ossea viene preparata all'azione degli osteoclasti dall'attività della collagenasi secreta dalle cellule ossee quiescenti o dagli osteoblasti. Questo meccanismo è possibile, poiché gli osteoblasti hanno la capacità di produrre enzimi, come l'attivatore del plasminogeno, che potrebbero attivare la collagenasi latente. Gli osteoclasti quindi producono protoni ed enzimi lisosomiali che completano il processo. Tuttavia studi di microscopia elettronica a scansione mostrano che gli osteoclasti non richiedono la "preparazione" della superficie ossea da parte degli osteoblasti per attuare il riassorbimento: osteoclasti isolati possono riassorbire superfici ossee senza l'apparente supporto di altre cellule.

Recentemente, sono stati riportati dati che suggeriscono che nel processo di riassorbimento osseo attuato dagli osteoclasti siano implicati radicali liberi derivati dall'ossigeno [Garrett et al., 1990]. Questo non sorprende se si tiene presente che molti altri processi degradativi da parte di cellule fagocitiche sono associati con la produzione di radicali. L'uso di sistemi generanti radicali sia *in vitro* che *in vivo*, mostra che gli enzimi che privano i tessuti dai radicali, come

la superossido dismutasi, bloccano il riassorbimento osseo stimolato dall'ormone paratiroideo o dall'interleuchina-1. Reazioni di colorazione con il blu di nitro-tetrazolio mostrano che negli osteoclasti si ha generazione di radicali. Radicali potrebbero essere implicati nella degradazione ossea sotto l'orletto a spazzola. Comunque, la dimostrazione che la generazione radicalica è associata con la sintesi degli osteoclasti suggerisce che i radicali hanno anche un effetto cellulare sulla formazione degli osteoclasti [Garrett et al., 1990].

### 1.2.2 Meccanismo di formazione dell'osso

La formazione dell'osso segue delle tappe sequenziali che possono essere così schematizzate:

- sintesi e modificazioni intracellulari del collagene di tipo I;
- secrezione e modificazioni extracellulari del collagene;
- formazione di microfibrille, fibrille e fibre di collagene;
- maturazione del collagene e successiva nucleazione e crescita dei cristalli di idrossiapatite.

Tutte queste funzioni sono sotto il controllo degli osteoblasti (Figura 1) e l'osso completamente calcificato è formato per il 35% di matrice organica e per il 65% di materiale inorganico cristallino.

Nel cosiddetto processo di "*maturazione della matrice osteoide*" si possono riconoscere tre diversi momenti. Nel primo, il collagene si deposita rapidamente e si produce un sottile strato di tessuto non mineralizzato chiamato *osteoide*. Nel secondo, la velocità di sintesi del collagene e di mineralizzazione dell'osteoide si pareggiano e la quantità di matrice non mineralizzata rimane costante; nel terzo la velocità di sintesi del collagene diminuisce e la mineralizzazione continua finché l'osteoide sparisce. Questi tre processi sono diagrammaticamente dimostrati in Figura 25. Questa maturazione della fibra di collagene deve avvenire prima che la matrice sia competente per supportare la mineralizzazione.

La maturazione della matrice viene espressa come il rapporto tra la velocità di mineralizzazione ( $\mu\text{m}/\text{giorno}$ ) e la larghezza dello strato di osteoide ( $\mu\text{m}$ ), quindi ha come unità di misura il tempo (giorni). Il cosiddetto *tempo di mineralizzazione* misura il tempo necessario alla matrice osteoide per acquisire le caratteristiche atte alla sua mineralizzazione. Nell'individuo adulto esso è dell'ordine di 5-10 giorni e la valutazione dell'ampiezza di questo parametro assume un significato diagnostico nelle malattie metaboliche dell'osso. Da un punto di vista biochimico, il tempo di mineralizzazione rimane indefinito.

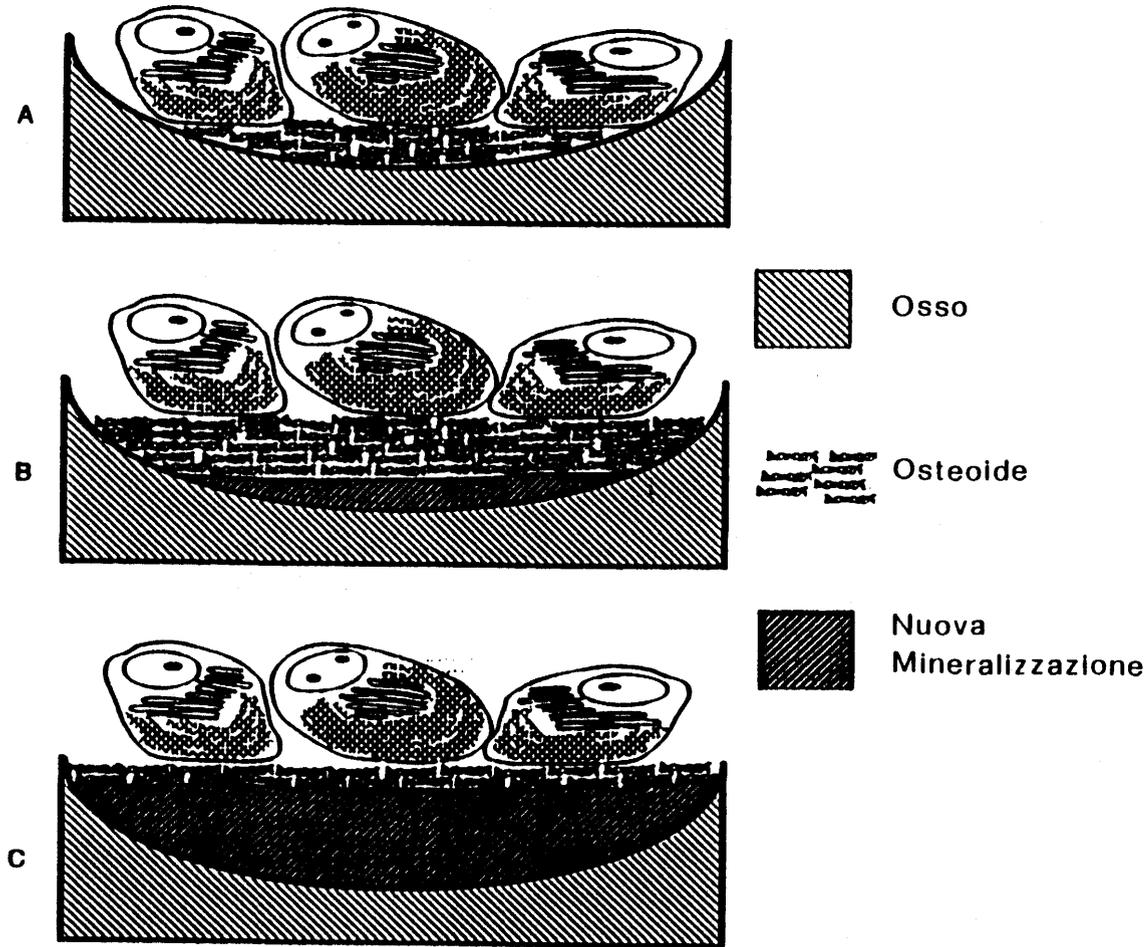


Figura 25: Fasi di maturazione dell'osteotide.

A. Osteoblasti che sintetizzano attivamente collagene. La sintesi di matrice procede senza mineralizzazione per cui lo spessore dello strato di osteotide aumenta.

B. Punto di massima mineralizzazione: la velocità di mineralizzazione è uguale alla velocità di sintesi dell'osteotide, di conseguenza lo spessore dello strato di osteotide rimane costante.

C. Diminuzione della sintesi di osteotide e costanza della velocità di mineralizzazione. Lo strato di osteotide tende a diminuire fino a sparire.

Alcune teorie individuano come momento biochimico della maturazione della matrice la formazione dei legami crociati (*cross-links*) del collagene, altri considerano il tempo necessario alla rimozione di molecole che inibiscono la formazione e la crescita dei cristalli. Comunque, qualunque sia il meccanismo della maturazione dell'osteoido, è chiaro che il collagene appena sintetizzato non può fornire un substrato per la normale mineralizzazione finché non è "maturato".

### 1.2.3 Processo di mineralizzazione

La mineralizzazione è un altro fenomeno sotto il controllo degli osteoblasti. Sebbene la natura di questo processo non sia completamente chiarita, sono stati definiti alcuni importanti dettagli sulla natura e sulla forma del minerale. Per esempio si sa che nell'osso completamente calcificato il minerale è organizzato in cristalli di idrossiapatite carbonatata, a forma di ago o di bastoncino, con diametro di 30-50 Å e lunghezza fino a 300 Å, che sono adagiati lungo le fibrille di collagene o che penetrano nelle fibre più ampie [Weiner & Traub, 1986].

Alcuni punti dell'intimo meccanismo che conduce alla deposizione e all'organizzazione del minerale sono stati chiariti con l'ausilio di modelli sperimentali di calcificazione. Per esempio, è dimostrato che una volta che il cristallo di idrossiapatite si è formato, la sua crescita avviene in assenza di ogni attività cellulare. Questa è un'osservazione paradossale, che ha fatto prima supporre e poi dimostrare l'esistenza di una vera barriera ionica tra osso e sangue, unico mezzo per impedire la precipitazione in forma ordinata, sul preesistente cristallo, di tutto il calcio e il fosfato contenuti nel sangue e nel liquido extracellulare. Questo dimostra che il processo di mineralizzazione è controllato sia allo stadio iniziale di formazione del cristallo, che nel momento della sua crescita.

Sono stati descritti due meccanismi per la mineralizzazione ossea, uno predominante sia nella cartilagine che calcifica che nell'osso primitivo (*osso a fibre intrecciate*), l'altro nell'*osso lamellare*.

La cartilagine che calcifica e l'osso primitivo sembrano mineralizzare attraverso le *vescicole della matrice* [Bonucci, 1971], formazioni legate alla membrana che si staccano per esocitosi dalla membrana plasmatica e migrano nello spazio extracellulare della matrice. La membrana interna di queste vescicole, ricca di lipidi, diviene il sito per la formazione dei cristalli di idrossiapatite. La cristallizzazione procede fino alla distruzione della membrana

della vescicola, producendo uno sferulita di cristalli piccoli e raggruppati ( $50\text{\AA}$  x  $200\text{\AA}$  x  $400\text{\AA}$ ). Questi sferuliti conglomerano finché si forma una massa mineralizzata compatta in tutta la matrice. Questo processo sembra essere guidato dagli stessi microcristalli che sono prima associati con la membrana della vescicola della matrice. La velocità di mineralizzazione, sia nell'osso primitivo che nell'osso lamellare, sembra dipendere dalla presenza di molecole di inibitori (come pirofosfato e proteine non collageniche acide), che in soluzione sembrano regolare la cinetica del processo di mineralizzazione [Termine et al., 1980]. Così, in questo tipo di mineralizzazione, la cellula fa crescere organelli capaci di accumulare minerale e poi sintetizza proteine che possono controllare la velocità a cui procede la cristallizzazione.

Il secondo meccanismo si riferisce all'osso adulto, cioè all'osso lamellare. Nell'osso lamellare la matrice extracellulare è strettamente impaccata con fibrille di collagene ben allineate a cui si legano proteine non collageniche complesse, come alcuni proteoglicani e l'osteonectina. Le vescicole della matrice si trovano raramente nell'osso lamellare, sia perché non c'è spazio sufficiente per esse, sia per ragioni di sviluppo. Comunque, la mineralizzazione sembra essere associata alla formazione di complessi tra collagene e proteine non collageniche. È interessante osservare la presenza di una maggiore quantità di minerale nelle regioni delle fibre di collagene che presentano spazi liberi, veri "buchi" (canali tridimensionali risultanti dagli spazi tra monomeri di collagene associati longitudinalmente), nei quali si depositano gli ioni inorganici [Weiner & Traub, 1986]. Non è chiaro se la forza che guida la mineralizzazione sia il collagene di per sé stesso, o la sua associazione con le proteine non collageniche. Il collagene purificato sembra essere un iniziatore di deposizione di cristalli molto debole e potrebbe svolgere un ruolo puramente meccanico a questo riguardo. Il grado di mineralizzazione della matrice ossea sembra essere limitato dal volume di osso occupato dalle sue proteine fibrose.

In condizioni di scarsità di ioni minerali si ha un'incompleta mineralizzazione dell'osteotide. Questa condizione, definita *osteomalacia*, può essere efficacemente trattata con interventi terapeutici atti ad aumentare la concentrazione ionica del liquido extracellulare. La fosfatasi alcalina è un *marker* degli osteoblasti e il suo livello cellulare correla con il loro potenziale di mineralizzazione. Infatti, individui con diminuiti livelli di fosfatasi alcalina (*ipofosfatasia*), sono affetti da osteomalacia non correggibile da terapie volte ad aumentare la concentrazione ionica del liquido extracellulare. Nonostante

sia indubbio il ruolo della fosfatasi alcalina nel processo di mineralizzazione, la sua esatta funzione non è stata ancora completamente chiarita. Per spiegare come, in alcuni casi, il collagene di tessuti che normalmente non mineralizzano possa favorire la nucleazione di una fase inorganica da soluzioni simili al normale liquido extracellulare, è stata suggerita la presenza di attivatori o di inibitori che modulano la deposizione del minerale sulla matrice extracellulare. Il pirofosfato appartiene a quest'ultima categoria di composti, perché è un potente inibitore del processo di mineralizzazione. Poiché la fosfatasi alcalina osteoblastica è in grado di catalizzare l'idrolisi di questo composto a pH fisiologico, si suppone che questo enzima possa regolare la mineralizzazione controllando la concentrazione del pirofosfato. Altre molecole giocherebbero ruoli molto importanti nel processo di mineralizzazione. Tra queste il fosfocitrato (PC), che è il più potente inibitore conosciuto della formazione di cristalli di idrossiapatite, appare essere un substrato naturale per questo enzima. Altre molecole ancora, come gli aggregati di proteoglicano, sembrano essere inibitori in grado di influenzare sia la velocità che le dimensioni del processo di mineralizzazione.

#### **1.2.4 Regolazione del rimodellamento**

Il rimodellamento osseo è un processo complesso che coinvolge numerose funzioni cellulari volte a coordinare il processo di riassorbimento e formazione del nuovo osso [Manolagas & Jilka, 1995].

Il rimodellamento è regolato da fattori sistemici (ormoni polipeptidici, steroidei ed altri, (Figura 26) e da fattori locali (Figura 27), che agiscono sulle cellule della linea osteoblastica ed osteoclastica influenzando sulla:

- replicazione di cellule indifferenziate;
- sul reclutamento delle cellule;
- sul differenziamento funzionale delle cellule.

Il risultato finale del rimodellamento è la formazione della matrice ossea mineralizzata, il cui principale componente organico è il collagene. La regolazione del metabolismo osseo da parte degli ormoni è stata studiata estensivamente, ma ora sembra chiaro che fattori locali, non sistemici, giochino un ruolo diretto ed importante nel rimodellamento osseo. I fattori di crescita sono polipeptidi che aumentano la replicazione cellulare, sebbene essi influenzino anche il differenziamento funzionale delle cellule. Questi fattori hanno effetto su cellule della stessa classe (*fattori autocrini*) o su altre cellule del tessuto scheletrico (*fattori paracrini*) (Figura 28). Le prostaglandine sono

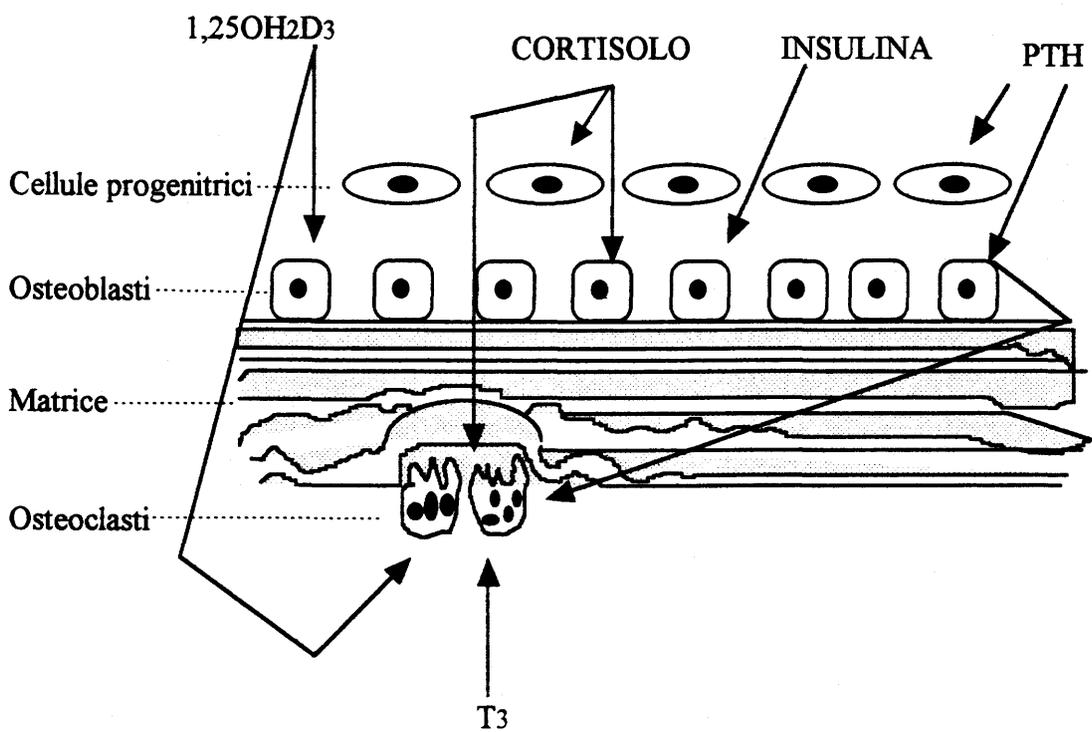


Figura 26: Regolazione della formazione e del riassorbimento osseo ad opera degli ormoni. (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>: 1,25-diidrossivitamina D<sub>3</sub>; PTH: ormone paratiroideo; T<sub>3</sub>: L-triiodotironina).

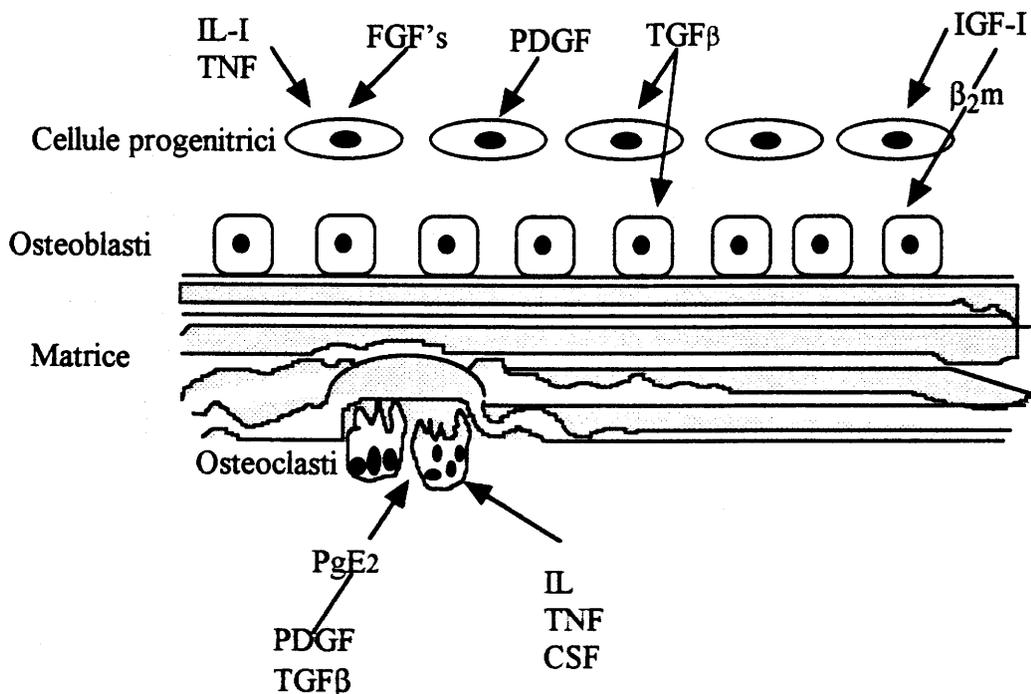


Figura 27: Regolazione della formazione e del riassorbimento osseo ad opera di fattori di crescita e di citochine. (FGF's: *fibroblast growth factors*; PDGF: *platelet-derived growth factor*; TGFβ: *transforming growth factor β*; IGF: *insulin-like growth factor*; β<sub>2</sub>m: β<sub>2</sub> *microglobulina*; IL: *interleuchina*; TNF: *tumor necrosis factor*; CSF: *colony stimulating factor*; PGE<sub>2</sub>: *prostaglandina E2*).

attualmente gli unici regolatori locali di rimodellamento osseo noti che non abbiano una struttura polipeptidica. L'esistenza di fattori locali non è specifica del sistema scheletrico, poiché anche altri tessuti sintetizzano e sono influenzati da fattori di crescita locali. La specificità tissutale di un dato fattore può essere determinata dalle sue interazioni con ormoni e altri fattori locali. Inizialmente, i fattori di crescita erano considerati regolatori sistemici del metabolismo scheletrico e non scheletrico, ma attualmente si ritiene che essi agiscano principalmente a livello locale [Canalis, 1983a; Canalis et al. 1988b]. Gli ormoni possono agire sulle cellule dello scheletro sia direttamente che indirettamente, modulando la sintesi o gli effetti di un fattore locale, che a sua volta stimola o inibisce la formazione o il riassorbimento osseo. La funzione dei fattori locali non è stata ancora interamente chiarita; è probabile che mentre gli ormoni forniscano un ambiente non specifico atto a mantenere la normale funzione tissutale, i fattori locali determinino la regolazione precisa della crescita tissutale. Questi fattori possono giocare un ruolo critico nel processo di accoppiamento "formazione-riassorbimento osseo" e in processi sia patologici che fisiologici. Il rimodellamento osseo è regolato da ormoni polipeptidici, steroidei e tiroidei e da fattori locali, come mostrato nella Tabella 5).

In sintesi, il riassorbimento osseo è un processo complesso regolato da fattori sistemici (ormoni) e da fattori locali. Gli ormoni regolano la sintesi e gli effetti dei fattori locali, che hanno un'azione diretta sul metabolismo cellulare, e modificano la replicazione o il differenziamento funzionale degli osteoblasti o degli osteoclasti. È possibile che il ruolo degli ormoni sia quello di fornire specificità tissutale ad un dato fattore di crescita, poiché la maggior parte di questi fattori sono sintetizzati da una varietà di sistemi scheletrici e non scheletrici. L'esatto ruolo fisiologico dei fattori associati all'osso non è certo: alcuni possono giocare una funzione più significativa nella guarigione da ferite e fratture e in altri processi patologici, piuttosto che in normali eventi fisiologici.

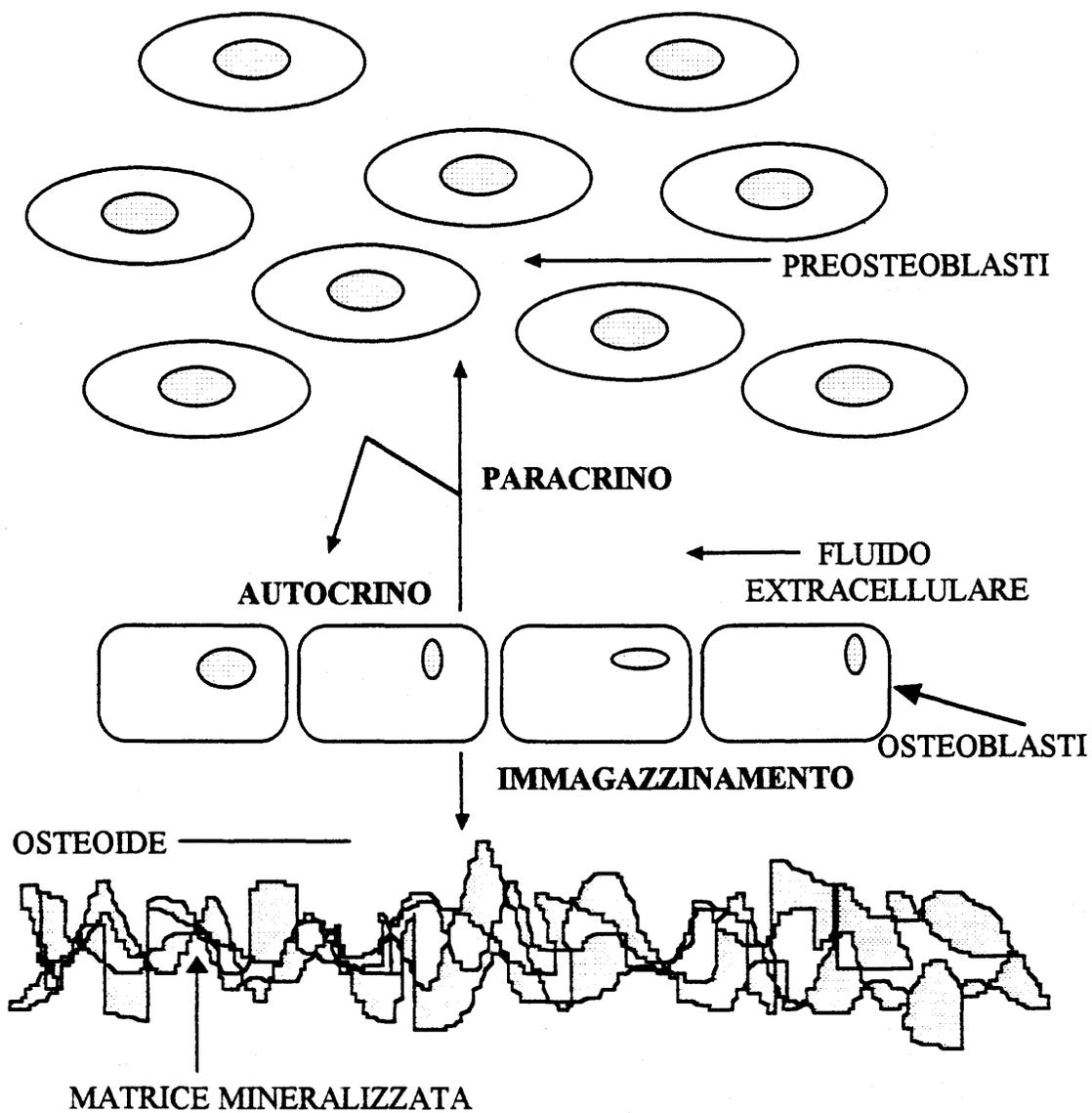


Figura 28: Attività autocrina e paracrina dei fattori di crescita. Gli osteoblasti sintetizzano fattori di crescita in grado sia di influenzare la loro attività (azione autocrina), che di stimolare il reclutamento e la proliferazione dei preosteoblasti (azione paracrina). Questi fattori in parte restano inglobati nella matrice mineralizzata e vengono liberati dagli osteoclasti: in questo caso l'azione autocrina e paracrina sono ritardate.

Tabella 5: Regolatori sistemici e locali del rimodellamento osseo.

**Ormoni**

**1. Ormoni polipeptidici**

Ormone paratiroideo (PTH)

Calcitonina (CT)

Insulina

Ormone della crescita (GH)

**2. Ormoni steroidei**

1,25-diidrossi-vitamina D<sub>3</sub> [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>]

Glucocorticoidi

Ormoni sessuali

**3. Ormoni tiroidei**

**Fattori locali**

**1. Sintetizzati (o presumibilmente sintetizzati) da cellule ossee**

*Insulin-like growth factor-I* (IGF-I)

$\beta_2$ Microglobulina ( $\beta_2$  m)

*Transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ )

*Fibroblast growth factor* (FGF)

*Platelet-derived growth factor* (PDGF)

**2. Sintetizzati da tessuti relazionati all'osso**

Derivati dalla cartilagine

IGF-I, FGF basico, TGF- $\beta$

Derivati dalle cellule del sangue

Interleuchina-1 (IL-1)

*Tumor necrosis factor* (TNF)

**3. Altri fattori**

Prostaglandine

Proteine di legame

## Regolazione sistemica del rimodellamento osseo

### Ormoni calciotropi

Gli ormoni calciotropi sono deputati al mantenimento dell'omeostasi calcemica. Gli organi bersaglio di questi ormoni sono il tratto gastrointestinale, il rene e lo scheletro (Figura 29).

### Paratormone

Il PTH è un ormone polipeptidico ad azione ipercalcemizzante il cui effetto si esplica in modo diretto sull'osso e sul rene, e in modo indiretto sull'intestino, influenzando la sintesi del metabolita attivo della vitamina D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>-coleciferolo). Come già detto parlando degli osteoclasti, il suo effetto sul riassorbimento osseo non è diretto, poiché l'osteoclasta non possiede recettori per il PTH; per osservare questa azione è necessaria la presenza di osteoblasti o di fattori derivati dagli osteoblasti. Il PTH ha effetti complessi sulla formazione ossea; mentre *in vitro* esso inibisce la sintesi osteoblastica di collagene, *in vivo* esso stimola la formazione ossea. Il meccanismo della risposta anabolica è incerto. Esso può essere mediato da altri ormoni o può essere secondario alla stimolazione della replicazione delle cellule ossee, che potrebbe risultare in un aumento del numero di cellule sintetizzanti matrice. È possibile che l'effetto mitogenico del PTH sia mediato da fattori locali, poiché esso aumenta il legame del TGF-β al suo recettore osteoblastico e la sintesi di IGF da parte delle cellule ossee. Possibilmente queste interazioni sono importanti nell'accoppiamento formazione-riassorbimento osseo [Parfitt, 1978].

Il PTH viene secreto dalle ghiandole paratiroidi in risposta alla diminuzione del tasso di calcio ionizzato presente nel siero, realizzando un processo di controllo della calcemia per *feedback* negativo. Ogni diminuzione della calcemia, come per esempio può accadere in conseguenza a diete povere di calcio, è contrastata da un aumento della concentrazione in circolo di PTH. L'aumento del PTH in circolo ha come conseguenza: 1) l'incremento del riassorbimento osseo, con immediata mobilitazione del calcio dall'osso al sangue; 2) l'aumento del riassorbimento di calcio e l'inibizione del riassorbimento di fosfato dal filtrato glomerulare; 3) la stimolazione della sintesi renale di 1,25 diidrossi-vitamina D, aumentando perciò l'assorbimento di calcio a livello intestinale. Tuttavia, il meccanismo di aumento rapido della calcemia, per contrastare l'ipocalcemia, sembra derivare prima di tutto e

soprattutto dal riassorbimento osseo e solo successivamente, ed in minore misura, dal riassorbimento tubulare renale [Talmage & Elliott, 1958]. Il mantenimento del bilancio calcico, invece, è probabilmente dovuto all'effetto dell'ormone sulla sintesi dell' $1,25(\text{OH})_2$  colecalciferolo, quindi sull'efficienza dell'assorbimento del calcio a livello intestinale.

L'effetto del paratormone sull'osso è duplice: esso induce una sostituzione del calcio sull'osso, tramite lo scambio del calcio tra il compartimento osseo ed il sangue, ed un aumento della velocità di rimodellamento osseo. Il primo effetto è osservabile nell'animale da esperimento già 30-60 minuti dopo la somministrazione dell'ormone, mentre il secondo è osservabile dopo ore dalla sua somministrazione. Quest'ultimo ha effetti più persistenti nel tempo e si accompagna ad un incremento del numero di osteoclasti. Gli osteoclasti sono privi di recettori per il PTH e la sua azione è mediata dagli osteoblasti, che invece lo possiedono, tramite le citochine (Figura 29) [McSheehy & Chambers, 1986]. L'effetto del PTH a livello cellulare, dopo l'avvenuta interazione con il suo recettore, è la stimolazione dell'adenilato ciclasi e della fosfolipasi C, con conseguente aumento del cAMP e dei prodotti del metabolismo del polifosfoinositolo, che sono dei messaggeri intracellulari [Meltzer et al., 1982; Bringhurst et al., 1989].

## Vitamina D

La vitamina D è un derivato del 7-deidrocolesterolo (l'immediato precursore del colesterolo) che, avendo funzioni ormonali, deve essere considerata non una vitamina, bensì un ormone.

Quando la cute è esposta alla luce solare, o a certe fonti di luce artificiale, le radiazioni ultraviolette penetrano nell'epidermide e causano una serie di eventi, tra i quali la trasformazione del 7-deidrocolesterolo in vitamina  $\text{D}_3$ . Una volta sintetizzata, la vitamina  $\text{D}_3$  viene traslocata dall'epidermide al circolo tramite una proteina di legame che successivamente la veicola al fegato. Nel fegato la vitamina  $\text{D}_3$  è metabolizzata a 25-idrossi-vitamina  $\text{D}_3$  ( $25(\text{OH})\text{D}_3$ ), ad opera di enzimi mitocondriali e microsomiali che vengono regolati con *feedback* negativo dal prodotto della reazione. Tale regolazione non è molto precisa: infatti un aumento della produzione endogena di vitamina D o una sua elevata assunzione con la dieta, aumenta il tasso di  $25(\text{OH})\text{D}_3$  nel siero. Una volta sintetizzata, questa molecola si lega con legame ad alta affinità ad una specifica proteina di legame prodotta dal fegato che la veicola

nel sangue fino al rene, ove verrà ulteriormente idrossilata in posizione 1. La  $25(\text{OH})\text{D}_3$ -1- $\alpha$ -idrossilasi renale, localizzata nel mitocondrio, è attivata dal PTH che a sua volta viene secreto in circolo in risposta ad una diminuzione del tasso ematico di calcio. Dunque, la velocità di conversione del  $25(\text{OH})\text{D}_3$  in  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  è regolata dalla calcemia. Il meccanismo di attivazione dell'idrossilasi renale non è noto, anche se si rileva una correlazione tra produzione di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ed effetto del PTH nel diminuire la concentrazione ematica di fosfato. L' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , inoltre, diminuisce l'attività della  $25(\text{OH})\text{D}_3$ -1- $\alpha$ -idrossilasi renale ed aumenta la sintesi di  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .

Il  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  è un metabolita del  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , circolante nel siero a concentrazioni 1-10 nM (contro le 12-200 nM del  $25(\text{OH})\text{D}_3$ ) [Norman et al., 1982]. Esso può essere substrato dell'1- $\alpha$ -idrossilasi renale che lo converte in un altro metabolita tri-idrossilato l' $1,24,25,(\text{OH})_3\text{D}_3$ . Il ruolo esatto di questi metaboliti non è completamente chiarito, anche se alcune evidenze sperimentali inducono a pensare che l'idrossilazione in posizione 24 porti all'inattivazione della molecola. Sono stati identificati più di 20 metaboliti, tutti derivati dal  $25(\text{OH})\text{D}_3$  e dall' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , gran parte dei quali sembrano essere prodotti di degradazione delle molecole da cui derivano [Henry & Norman, 1984].

L' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , prodotto dal rene e dalla placenta, trasportato nel sangue legato ad una specifica proteina di legame, appare essere l'unico metabolita attivo della vitamina  $\text{D}_3$ . A livello cellulare esso interagisce con uno specifico recettore nucleare; il complesso ormone-recettore che si forma, attiva la trascrizione del gene che induce nella cellula del duodeno la sintesi di una proteina intracellulare legante il calcio [Leathers et al., 1990] e, nell'osso, la sintesi di osteocalcina, un peptide che viene sintetizzato esclusivamente dall'osteoblasta, indicando che l' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ha effetti stimolatori diretti su questa cellula. Sebbene si sia postulato che l'osteocalcina sia importante per il reclutamento degli osteoclasti e per la formazione ossea, il suo esatto ruolo nel rimodellamento osseo non è ancora noto. Perciò, il significato fisiologico della regolazione dell'osteocalcina da parte dell' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  resta ancora incerto [DeLuca, 1980; Lian et al., 1985].

L'effetto a livello dell'intestino tenue è di stimolare il trasporto di calcio e fosfato dal lume intestinale al circolo, mentre quello a livello osseo appare più complesso. L'azione dell' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sul riassorbimento osseo è sinergica con quella del PTH e la sua azione sull'osteoclasta maturo è indiretta in

quanto questi non esprime il recettore per l'ormone (Figura 29). L'azione dell' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sull'osso (come quella del PTH) è dovuta all'aumento del numero degli osteoclasti maturi. Esso infatti, interagendo con gli osteoblasti, induce la sintesi e la liberazione di citochine che stimolano la differenziazione dei preosteoclasti in osteoclasti (Figura 29). Dati piuttosto recenti suggerirebbero anche la presenza di un meccanismo diretto, indipendente dagli osteoblasti, in quanto è stata rilevata la presenza di recettori per l' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  e per il PTH sui preosteoclasti [Amano et al., 1992]. Sugli osteoblasti, invece, l'ormone avrebbe un effetto di modulazione del loro differenziamento e della loro attività sintetica.

L'influenza dell'ormone sulla *clearance* renale del calcio e dei fosfati non è molto chiara, mentre assume sempre maggiore importanza la rilevazione che recettori per l' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sono presenti anche in tessuti ed organi diversi dagli organi bersaglio sopra ricordati. L'elenco di questi è piuttosto numeroso e comprende cute, mammella, ghiandola pituitaria, paratiroidi, cellule  $\beta$  delle isole pancreatiche, gonadi, cervello, muscolo scheletrico, monociti circolanti, e linfociti B e T attivati [Norman et al., 1982; Manolagas et al., 1989; Reichel et al., 1990; Walters, 1992]. Sebbene il ruolo fisiologico dell'ormone sulle cellule di questi organi e tessuti non sia chiaro, appare probabile che sia legato sia al differenziamento cellulare che all'immunoregolazione. A prova di ciò, esistono dati sperimentali su colture cellulari che dimostrano la sua capacità sia di inibire la proliferazione di cheratinociti e fibroblasti umani, che di stimolare il differenziamento finale dei cheratinociti, che di indurre i monociti a produrre interleuchina-1 e a differenziarsi in macrofagi e cellule simil-osteoclastiche. Inoltre esso è in grado di inibire la produzione sia di interleuchina-2 da parte dei linfociti T, che di immunoglobuline da parte dei linfociti B [Manolagas, 1989]. È interessante, inoltre, l'osservazione che numerose linee cellulari tumorali, comprese cellule di carcinoma della mammella e di melanoma, posseggono il recettore per l' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . A queste osservazioni si pongono, di contro, quelle di pazienti con rachitismo vitamina  $\text{D}_3$  dipendente, che non presentano difetti nella risposta cellulare immune, così come quelle legate a patologie di tessuti ad elevato ricambio cellulare, come la cute, che non appaiono influenzati dalla carenza di questo ormone [Reichel et al., 1989].



## **Calcitonina**

La calcitonina è un polipeptide di 32 amminoacidi, prodotto dalle cellule c della tiroide, che agisce come antagonista fisiologico del PTH. Essa esercita un potente effetto ipocalcemizzante che si esplica sull'osso e sul rene, tramite l'inibizione del riassorbimento osseo e l'incremento della *clearance* renale del calcio (Figura 29). La maggior parte delle sue azioni si osservano ad alte dosi, perciò questo peptide può essere più importante dal punto di vista farmacologico che fisiologico. Sull'osso provoca, entro pochi minuti dalla sua somministrazione, una contrazione della membrana plasmatica dell'osteoclasta, che induce una cessazione dell'attività riassorbitiva [Deftos & Glowacki, 1984; Moonga et al., 1992]. Questo effetto, che si accompagna ad una elevazione del cAMP e del calcio citoplasmatico, è transitorio e cessa dopo circa 48-72 ore [Deftos, 1983; Deftos, 1987; Deftos, 1991; Moonga et al., 1992]. La secrezione della calcitonina è sotto il controllo del tasso ematico di calcio: quando questo si eleva o si riduce, il livello di calcitonina parallelamente si eleva o si riduce. Una volta secreta, rimane in circolo per pochi minuti e viene metabolizzata dal fegato e dal rene [Deftos, 1983].

La sua struttura primaria è stata determinata in diverse specie e presenta una notevole variabilità nella sequenza amminoacidica, che si collega a una diversa potenza nell'effetto ipocalcemizzante [Deftos, 1983]. La calcitonina di salmone, per esempio, è da 25 a 100 volte più potente di quella umana nel diminuire la calcemia e ciò sembra essere correlato al numero di residui di amminoacidi basici presenti nella molecola.

La calcitonina, che è codificata da due geni  $\alpha$  e  $\beta$ , localizzati sul cromosoma 11, viene sintetizzata come precursore, quattro volte più grande della molecola finale. La trascrizione del gene  $\beta$ , avviene solo nel cervello e porta alla sintesi di una molecola con effetti sull'apparato cardiovascolare e sul sistema nervoso centrale [Fisher & Born, 1987a].

## **Insulina**

L'insulina è un polipeptide di peso molecolare 6'000, sintetizzato dalle cellule  $\beta$  del pancreas. Essa regola il riassorbimento osseo, ma causa una marcata stimolazione della sintesi della matrice ossea e della formazione della cartilagine, essendo perciò tra gli ormoni più importanti nel modulare la normale crescita scheletrica. Inoltre, l'insulina è necessaria per la normale mineralizzazione ossea: individui ed animali con diabete mellito non trattato hanno una crescita scheletrica e una mineralizzazione inferiori al normale.

L'insulina ha effetti stimolatori diretti sul tessuto scheletrico, ma essa aumenta anche la produzione di IGF-I da parte del fegato; perciò alcuni dei suoi effetti *in vivo* potrebbero essere mediati dall'IGF-I. L'insulina stimola la sintesi della matrice ossea, ma a concentrazioni fisiologiche non altera la replicazione delle cellule ossee. Perciò, l'aumentata sintesi di matrice è dovuta alle azioni sul differenziamento dell'osteoblasta piuttosto che a un aumento nel numero di cellule produttrici di collagene. Le azioni dell'insulina e dell'IGF-I sono in qualche modo diverse poiché, oltre agli effetti sul differenziamento della funzione osteoblastica, l'IGF aumenta il numero delle cellule che sintetizzano matrice ossea [Canalis, 1980].

### **Ormone della crescita (GH)**

Il GH, un polipeptide ipofisario di peso molecolare 21'000, non possiede effetti diretti né sul riassorbimento né sulla formazione ossea. Comunque, il GH potrebbe stimolare la sintesi di IGF-I da parte delle cellule scheletriche e questo fattore locale è un importante regolatore della formazione ossea [Canalis, 1980].

### **Ormoni tiroidei**

Gli ormoni tiroidei sono necessari per una crescita e uno sviluppo regolare, visto che agiscono in parte sulla formazione della cartilagine, in congiunzione con l'IGF-I. In contrasto con questo importante ruolo sulla cartilagine e sulla crescita, gli ormoni tiroidei non stimolano la sintesi di matrice ossea o la replicazione delle cellule ossee. Essi, comunque, stimolano il riassorbimento osseo, e questo sembra responsabile dell'ipercalcemia che si osserva nell'iperparatiroidismo. Inoltre, dati clinico-epidemiologici dimostrano una maggiore incidenza di osteoporosi nell'ipertiroidismo [Mundy et al., 1976].

### **Glucocorticoidi**

I glucocorticoidi sono ormoni steroidei con marcati effetti sul metabolismo del tessuto osseo e del minerale. *In vivo*, ma non *in vitro*, i glucocorticoidi stimolano il riassorbimento osseo, indicando che il meccanismo è indiretto, e probabilmente dovuto a una diminuzione dell'assorbimento di calcio e ad un conseguente aumento di PTH [Hahn et al., 1981]. Le azioni dei glucocorticoidi sulla formazione ossea sono complesse. Dopo breve trattamento a concentrazioni fisiologiche, essi stimolano la sintesi di collagene osseo, possibilmente aumentando il legame dell'IGF al suo recettore. In contrasto, il

loro effetto a lungo termine sulla sintesi del collagene osseo è inibitorio in virtù di una notevole diminuzione della replicazione cellulare dei preosteoblasti. Questo risulta in una marcata diminuzione degli osteoblasti disponibili a sintetizzare matrice ossea, ed è la probabile causa dell'“osteoporosi da glucocorticoidi”, che rappresenta la forma più frequente di osteoporosi secondaria [Raisz et al., 1972; Canalis, 1983b; Raisz & Kream, 1983a; Raisz & Kream, 1983b].

## Estrogeni

Di particolare rilevanza per il tessuto osseo è il ruolo svolto dagli estrogeni. Già nel 1940, Albright evidenziò una relazione tra la diminuzione del tasso di estrogeni, come avviene nella menopausa fisiologica o chirurgica, e la diminuzione della massa scheletrica, accompagnata da segni di osteoporosi [Albright et al., 1941]. In diversi studi è infatti riportato che la carenza di estrogeni è seguita da un aumento della velocità di *turnover* osseo in cui risultano predominare i processi di riassorbimento su quelli di formazione, con conseguente perdita di tessuto osseo. Se, infatti, nell'uomo e nella donna a partire dalla quarta decade di vita, la perdita ossea che normalmente avviene è stimata nell'ordine dello 0.5-1% annuo, nei primi 5-10 anni dalla menopausa la perdita ossea, specialmente nell'osso trabecolare, è stimabile nel 3-6% annuo [Ott, 1991].

È stata postulata un'azione diretta degli estrogeni sul tessuto osseo in seguito al ritrovamento di recettori per questi ormoni in cellule osteoblasta-simili umane [Eriksen et al., 1988; Komm et al., 1988]. In seguito al legame con il loro recettore, gli estrogeni modulerebbero i processi di formazione e riassorbimento osseo, stimolando la prima ed inibendo il secondo. Ciò avverrebbe mediante l'induzione della sintesi e della liberazione di fattori locali che stimolano l'attività osteoblastica, come l'IGF [Caputo et al., 1976; Ernst et al., 1989], e l'inibizione della sintesi e della liberazione di fattori che promuovono il riassorbimento osseo [Feyen & Raisz, 1987; Girasole et al., 1992; Most et al., 1995]. Pacifici e coautori [Pacifici et al., 1991] hanno recentemente riportato che nella donna, dopo ovariectomia, si ha un'aumentata produzione di IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e *granulocyte/monocyte-colony-stimulating factor* (GM-CSF) (fattori che stimolano il riassorbimento osseo) da parte di colture *ex vivo* di monociti di sangue periferico, che viene prevenuta dalla somministrazione di estrogeni. Inoltre Tabibzadeh e coautori [Tabibzadeh et al., 1989] hanno riportato che il 17 $\beta$ -estradiolo inibisce la produzione di IL-6

da parte di cellule stromali murine, linee cellulari murine e di ratto, cellule ossee umane non trasformate e colture primarie di cellule ossee da calvaria di topo [Girasole et al., 1990]. È stato anche visto che quando colture cellulari primarie di calvaria murino sono prima trattate con estradiolo, e poi l'ormone viene tolto, si ha un significativo aumento nella produzione di IL-6 in risposta ad una successiva esposizione delle colture all'IL-1 e al PTH. Inoltre, in cellule di calvaria, l'estradiolo (così come un anticorpo neutralizzante anti-IL-6) sopprime lo sviluppo osteoclastico stimolato dal TNF, mentre l'IL-6 esogena promuove lo sviluppo osteoclastico in queste cellule [Passeri et al. 1991]. Infine, è stato dimostrato che, nel topo, la perdita ossea indotta dall'ovariectomia è associata con un aumentato sviluppo osteoclastico ed è prevenuta dalla terapia sostitutiva con estrogeni, esattamente come ci si aspetterebbe se gli estrogeni regolassero la formazione dei progenitori degli osteoclasti [Girasole et al., 1991]. Queste ultime scoperte confermano simili osservazioni fatte da Kalu [Kalu et al., 1990].

La caratteristica dei cambiamenti scheletrici che risultano dopo la menopausa è uno sbilanciamento del riassorbimento osseo rispetto alla formazione ossea, risultante in una riduzione della massa scheletrica [Riggs & Melton, 1986]. Considerando questo e il fatto che la terapia sostitutiva con estrogeni riduce l'attività osteoclastica, senza un effetto immediato sulla velocità di formazione ossea [Riggs et al., 1969], è ragionevole aspettarsi che gli effetti degli estrogeni sull'osso debbano essere esercitati essenzialmente sulla fase di riassorbimento.

La dimostrazione dell'inibizione di produzione di IL-6 da parte degli estrogeni in cellule della linea osteoblastica potrebbe spiegare il ruolo protettivo degli steroidi sessuali nell'osteoporosi. Cioè, le cellule del midollo osseo e le cellule della linea osteoblastica producono citochine che agiscono nel microambiente osseo in maniera paracrina, per regolare la formazione osteoclastica. La produzione e/o l'azione di queste citochine è sotto il controllo inibitorio degli estrogeni: perciò, la perdita ossea associata alla carenza di estrogeni è dovuta, almeno in parte, alla mancanza di questi effetti inibitori [Jilka et al., 1992; Manolagas & Jilka, 1992]. Questa ipotesi è in accordo con il fatto che i cambiamenti osteoporotici avvengono innanzitutto nei siti dove l'osso viene in contatto con il midollo osseo [Frost, 1973; Frost 1981, Michalsky et al., 1993; Moro et al., 1995]. Data l'evidenza che l'eterogeneità dei macrofagi è generata da un meccanismo di sviluppo controllato da fattori prodotti nel midollo [Witsell & Schook, 1991], questa

ipotesi può anche fornire una spiegazione meccanicistica dell'aumentata produzione di citochine da parte dei monociti nelle donne ovariectomizzate [Pacifici et al., 1991].

L'azione degli estrogeni sull'osso potrebbe anche essere indiretta, tramite la modulazione della sintesi e della liberazione degli ormoni calciotropi, specialmente calcitonina e 1,25-diidrossi-colecalciferolo.

## **Androgeni**

Recettori per gli androgeni sono presenti sugli osteoblasti [Colvard et al., 1989; Orwoll et al., 1991]. Le affinità di legame sono comparabili con quelle dei recettori per gli androgeni presenti nei tipici tessuti bersaglio come la prostata, ma le concentrazioni sono molto più basse.

Le cellule osteoblasta-simili sono in grado di aromatizzare gli androgeni in estrogeni [Purohit et al., 1992; Tanaka et al., 1993]. Gli osteoblasti umani esprimono anche un'attività 5 $\alpha$ -reduttasica [Bruch et al., 1992], che è stata ritrovata anche in ossa di ratto frantumate [Vittek et al., 1974]. Perciò, gli androgeni potrebbero influenzare l'omeostasi scheletrica sia direttamente (come testosterone o 5 $\alpha$ -diidrotosterone, tramite il recettore androgenico) che indirettamente (dopo aromatizzazione attraverso il recettore estrogenico).

Gli androgeni stimolano la proliferazione e il differenziamento degli osteoblasti e di cellule osteoblasta-simili [Kasper et al., 1989; Weisman et al., 1993]. Comunque, la biologia molecolare di questi effetti degli androgeni sugli osteoblasti rimane largamente sconosciuta. Gli effetti degli androgeni sulle cellule ossee potrebbe anche essere sesso-specifica: solo le cellule delle diafisi ottenute da ratti maschi in crescita, ma non da ratti femmine, rispondono agli androgeni, quando saggiate in coltura [Weisman et al., 1993]. Gli androgeni potrebbero perciò avere effetti diretti sulla proliferazione e sul differenziamento degli osteoblasti durante la crescita dei maschi. Gli effetti degli androgeni sul differenziamento osteoblastico potrebbero essere mediati dal TGF- $\beta$  [Kasperk et al., 1990; Benz et al., 1991], mentre i loro effetti sulla proliferazione osteoblastica potrebbero essere mediati da un aumento dei recettori per l'IGF-II [Kasperk et al., 1990].

Gli androgeni inibiscono il riassorbimento osseo direttamente, attraverso la diminuzione della produzione di interleuchina-6 da parte degli osteoblasti o delle cellule del midollo osseo [Girasole et al., 1992; Bellido et al., 1993; Ryaby et al., 1993], tramite l'inibizione della produzione di prostaglandina E<sub>2</sub> nelle colture tissutali [Pilbeam & Raisz, 1990], attraverso l'inibizione degli

effetti del PTH sugli osteoblasti [Fukayama & Tashjan, 1989], o tramite l'inibizione dell'osteoclastogenesi [Bellido et al., 1993; Ryaby et al., 1993]. La presenza di recettori per gli androgeni nelle cellule stromali di midollo osseo [Bellido et al., 1993] e nelle cellule multinucleate osteoclasta-simili [Mizuno et al., 1994], suggerisce che gli androgeni possono inibire il riassorbimento osseo in maniera diretta. L'evidenza di un effetto diretto degli androgeni sul riassorbimento osseo è, comunque, ancora preliminare *in vitro* [Tobias & Chambres, 1991], in contrasto con chiare evidenze di inibizione del riassorbimento osseo *in vivo*. Comunque, *in vitro* sono stati dimostrati effetti degli estrogeni sul riassorbimento osseo [Oursler et al., 1991; Jilka et al., 1992; Oursler et al., 1993]. Poiché gli androgeni possono essere trasformati in estrogeni da aromatasi scheletriche [Vittek et al., 1974; Purohit et al., 1992; Tanaka et al., 1993], i loro effetti *in vivo* potrebbero dipendere anche dalla loro conversione in estrogeni.

Sebbene gli effetti scheletrici della deficienza estrogenica abbiano ricevuto molta più attenzione [Kalu et al., 1984; Wronski et al., 1987], anche quelli dovuti alla carenza di androgeni sono stati studiati a fondo negli animali; a questo proposito il ratto maschio castrato è certamente il modello animale più utilizzato [Wink & Felts, 1980; Schoutens et al., 1984; Gürkan et al., 1986; Verhas et al., 1986; Wakley et al., 1991; Danielson et al., 1992; Vanderschueren et al., 1992; Vanderschueren et al., 1993].

La carenza di androgeni induce un temporaneo aumento di rimodellamento dell'osso trabecolare ed uno sbilanciamento fra riassorbimento e formazione ossea nei ratti maschi [Wakley et al., 1991; Vanderschueren et al., 1992], che risulta nella perdita di osso corticale e trabecolare [Schoutens et al., 1984; Verhas et al., 1986; Wakley et al., 1991; Danielson et al., 1992; Vanderschueren et al., 1992; Vanderschueren et al., 1993]. La somministrazione di androgeni previene sia l'aumento iniziale di *turnover* osseo che la diminuzione di massa ossea che si osservano durante la deficienza androgenica, senza concomitanti cambiamenti nella crescita ossea, nelle concentrazioni di ormoni calciotropi o di IGF-I serico [Wakley et al., 1991; Vanderschueren et al., 1992]. Nei ratti maschi orchiettomizzati, il 17 $\beta$ -estradiolo previene la perdita ossea, suggerendo che l'aromatizzazione degli androgeni in estrogeni potrebbe essere implicata nel mantenimento scheletrico [Vanderschueren et al., 1992]. Inoltre, i cambiamenti scheletrici che si osservano durante la carenza estrogenica nel modello del ratto ovariectomizzato e nella donna in postmenopausa, sono simili a quelli che si

hanno nei ratti androgeno-deficienti [Eriksen & Mosekilde, 1990]. Sebbene gli estrogeni giochino un ruolo significativo nell'omeostasi scheletrica, anche il 5 $\alpha$ -diidrotestosterone, un androgeno non aromatizzabile, può prevenire la perdita ossea nei ratti castrati [Wakley et al., 1991; Vanderschueren et al., 1992]. Anche l'assottigliamento corticale del femore, che si verifica durante il normale invecchiamento del ratto maschio [Danielson et al., 1992; Vanderschueren et al., 1993], è prevenuto dalla terapia androgenica [Vanderschueren et al., 1993], suggerendo che la diminuzione di testosterone serico correlata all'età, nei ratti maschi vecchi, può stimolare il riassorbimento osseo endostale. Oltre che effetti inibitori sul riassorbimento osseo, gli androgeni hanno anche effetti stimolatori sulla formazione di osso periostale nei ratti maschi in fase di crescita [Turner et al., 1990].

Nell'uomo, dati a sostegno di un possibile importante ruolo degli androgeni nel metabolismo del tessuto osseo, si possono ricavare indirettamente, soprattutto da studi epidemiologici, che evidenziano come situazioni di ipogonadismo sono invariabilmente accompagnate da una riduzione della massa ossea [Foresta et al., 1984; Stepan et al., 1989; Vermeulen, 1990; Vanderschueren & Bouillon, 1995]. Negli uomini con ipogonadismo, la somministrazione di androgeni può prevenire la perdita ossea, comunque sembra difficile correggere completamente la massa ossea in questi pazienti.

Durante la pubertà, gli androgeni stimolano lo sviluppo osseo sia direttamente che indirettamente [Attie et al., 1990; Kerrigan & Rogal, 1992; Keenan et al., 1993]. Gli effetti degli androgeni sullo sviluppo scheletrico hanno anche conseguenze cliniche sull'acquisizione del picco di massa ossea: una pubertà ritardata è stata associata con un diminuito picco di massa ossea negli uomini [Finkelstein et al., 1992], suggerendo che è necessaria una secrezione di androgeni temporalmente appropriata per raggiungere un picco di massa ossea ottimale. Gli effetti stimolatori degli androgeni sulla crescita scheletrica perciò sembrano associati con un aumento del picco di massa ossea, spiegando perché gli uomini non solo sono più alti delle donne, ma hanno anche un maggior picco di massa ossea che, in tarda età, li protegge contro l'osteoporosi. Inoltre, questi effetti degli androgeni sull'acquisizione del picco di massa ossea spiegano anche perché la terapia sostitutiva con androgeni, se iniziata dopo la chiusura del piatto di crescita, non corregge completamente la massa ossea nell'uomo con ipogonadismo [Finkelstein et al., 1989].

In conclusione, non è ancora stato chiarito in quale grado le concentrazioni fisiologiche di androgeni esprimono il loro effetto tramite il recettore androgenico (con o senza previa  $5\alpha$ -riduzione a  $5\alpha$ -dihidrotestosterone) o tramite quello estrogenico (dopo essere stati aromatizzati). Entrambi i meccanismi possono essere attivati dalla somministrazione di ormoni sessuali in modelli animali. Comunque, nei ratti sottoposti a trattamenti prolungati con un inibitore dell'aromatasi e negli uomini adulti con recettori estrogenici difettosi e conseguente resistenza agli estrogeni [Smith et al., 1994], è stata osservata una ridotta densità ossea, indicando che la maggior parte degli effetti degli androgeni sul *turnover* e sulla massa ossea avvengono attraverso il recettore per gli estrogeni.

Gli androgeni possono anche influenzare l'omeostasi scheletrica nelle donne, sebbene il loro meccanismo d'azione possa anche in questo caso essere relazionato alla loro conversione in estrogeni. Nelle donne in postmenopausa, le concentrazioni sieriche di androgeni potrebbero perciò avere significativi effetti protettivi sulla massa ossea.

### **Regolazione locale del rimodellamento osseo**

L'osso è una delle fonti più ricche di fattori di crescita che si sono dimostrati importanti per la regolazione della formazione e del riassorbimento ossei e possibilmente per l'accoppiamento di questi due processi [Manolagas & Jilka, 1995]. I fattori locali con azioni dirette sul rimodellamento osseo possono essere sintetizzati dalle cellule ossee o da cellule relazionate all'osso, come le cellule della cartilagine o del sangue, e possono modificare la replicazione o il differenziamento cellulare delle cellule della linea osteoblastica od osteoclastica (Figura 27).

### **Fattori di crescita sintetizzati dalle cellule ossee**

#### *Insulin-like growth factors (IGFs)*

Gli *insulin-like growth factors* (o somatomedine), polipeptidi di peso molecolare 7'600, sono secreti sotto il controllo dell'ormone della crescita. Sono stati caratterizzati due IGF: l'IGF-I e l'IGF-II. Essi sono sintetizzati da numerosi tessuti, compresi l'osso e la cartilagine, ed hanno proprietà biologiche simili, benché l'IGF-I sia da 4 a 7 volte più potente dell'IGF-II. In certe condizioni l'IGF può agire come agente sistemico; comunque, il suo effetto locale determina un'azione più diretta e probabilmente più significativa

sulla crescita tissutale. L'analisi biochimica ed istomorfometrica dell'IGF-I ha dimostrato che esso è in grado di indurre gli osteoblasti a sintetizzare collagene e matrice e di stimolare la replicazione delle cellule della linea osteoblastica. L'IGF-I, inoltre, diminuisce la degradazione del collagene osseo. L'effetto dell'IGF-I sulla sintesi della matrice non sembra, tuttavia, dipendere tanto dall'aumento del numero delle cellule, quanto dalla sua capacità di stimolare le funzioni sintetiche e secretorie degli osteoblasti. Appare dunque evidente che l'IGF-I gioca un ruolo fondamentale nel processo di formazione e di mantenimento della massa ossea.

La sintesi ed il legame dell'IGF ai suoi recettori cellulari è regolata da ormoni e da fattori locali, infatti il PTH ed altre molecole che stimolano la sintesi di cAMP nelle cellule ossee, sono i maggiori induttori della sintesi di IGF-I, mentre i glucocorticoidi la inibiscono. Ciò spiega l'effetto negativo di questi ultimi sulla formazione e sul mantenimento della massa ossea, pur non dimenticando che i glucocorticoidi hanno anche un'influenza negativa sull'assorbimento del calcio a livello intestinale. Alcuni fattori locali, come ad esempio la prostaglandina E<sub>2</sub>, sono in grado di aumentare la sintesi di IGF-I e il legame dell'IGF-I e II alle cellule ossee. Inoltre la  $\beta_2$  microglobulina, un polipeptide che si trova nel siero e sulla superficie di quasi tutte le cellule di mammifero, ha un effetto stimolatorio sulla formazione ossea, paragonabile a quello dell'IGF-I e II. Questo effetto sembra essere probabilmente riconducibile all'aumentata forza di legame tra l'IGF e il suo recettore presente sull'osteoblasta [Canalis et al., 1987].

Le cellule ossee, inoltre, secernono proteine che legano (*binding proteins*) l'IGF (IGFBPs). Fino ad oggi sono state identificate 6 IGFBPs chiamate IGFBPs 1-6, che vengono prodotte tutte, salvo l'IGFBP-1, dalle cellule ossee non stimulate. Il ruolo preciso delle IGFBPs non è chiaro; esse possono prolungare il tempo di dimezzamento degli IGF, neutralizzare o aumentare la loro attività biologica, o essere coinvolte nel trasporto dell'IGF alla cellula bersaglio [Binoux et al., 1986; Hock et al., 1988]. La regolazione della sintesi delle IGFBPs nella cellula ossea è complessa e i dati disponibili fino ad ora non sono sufficienti per comprendere l'intima funzione di queste proteine. Alcune IGFBPs vengono controllate dal cAMP, altre dall'IGF-I e II, suggerendo l'esistenza di un meccanismo locale di *feedback* atto a prevenire la sovraesposizione delle cellule ossee all'IGF.

### *Transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )*

I *transforming growth factors* sono polipeptidi in grado di indurre cellule non neoplastiche, come fibroblasti aderenti su superfici a crescita regolare, a formare colonie libere in agar molle. Questo processo si considera collegato alla trasformazione neoplastica, perché le cellule tumorali sono in grado di formare spontaneamente colonie.

Il TGF- $\beta$  ha molte funzioni nella regolazione del metabolismo della cellula normale. È un polipeptide di peso molecolare 25'000 che viene sintetizzato da molti tessuti, tra i quali anche l'osso. Nell'osso sono presenti 3 forme di TGF- $\beta$ , che sembrano avere attività biologiche simili (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3). Il TGF- $\beta$  modula la sintesi di matrice ossea sia aumentando il numero di cellule in grado di esprimere il fenotipo osteoblastico, che influenzando direttamente la sintesi di collagene osseo. Il TGF- $\beta$ , inoltre, diminuisce il riassorbimento osseo [Centrella et al., 1987].

Gli ormoni in grado di indurre riassorbimento osseo, come ad esempio il PTH, aumentano il rilascio dall'osso di TGF- $\beta$  attivo, quindi il TGF- $\beta$  disponibile potrebbe essere un mezzo per inibire l'ulteriore riassorbimento ed iniziare la fase di formazione ossea [Pfeilschifter et al., 1988].

Ci sono molti altri polipeptidi a sequenze amminoacidiche simili al TGF- $\beta$ . Questi includono varie *proteine morfogenetiche dell'osso* o *fattori osteoinduttivi* [Wozney et al., 1988]. Le proteine morfogenetiche dell'osso sono potenti induttori ossei, in grado di formare osso normale anche in sedi ectopiche. La loro scoperta è derivata dall'osservazione che polvere di osso impiantata sottocute (per esempio nel ventre di un animale), induce la formazione di un osso normale. Questa osservazione iniziale ha portato alla scoperta di questi fattori di natura proteica, di grande interesse sia teorico, perché contribuiscono a chiarire il fenomeno non chiaro dell'ossificazione, che pratico, in quanto trovano applicazione, seppure a livello sperimentale, nel trattamento delle fratture e dei tumori primitivi dell'osso, perché inducono la differenziazione dei preosteoblasti in cellule mature.

### *Fibroblast growth factor (FGF)*

I *fibroblast growth factors* (FGFs) acidi e basici, o fattori di crescita leganti l'eparina 1 e 2, sono polipeptidi con peso molecolare di circa 17'000 [Burgess et al., 1985]. Il fatto che furono purificati dal tessuto nervoso indusse inizialmente a pensare che fossero prodotti solo nel sistema nervoso centrale,

ma ben presto si poté dimostrare che i FGFs acidi e basici sono sintetizzati da molti altri tessuti, sia normali che neoplastici.

I FGFs sono fattori angiogenetici, considerati importanti per la neovascolarizzazione e per la rimarginazione delle ferite. L'osso contiene entrambi questi FGFs acidi e basici, che sono in grado di incrementare la sintesi di matrice stimolando la replicazione degli osteoblasti [Canalis et al., 1988c]. L'effetto stimolatorio dei FGFs sulla neovascolarizzazione, in associazione con l'effetto sulla replicazione degli osteoblasti, suggerisce che questi fattori sono importanti nel processo di guarigione e di riparazione delle fratture ossee. Questa considerazione deriva soprattutto dall'osservazione che essi non sono secreti dalla cellula, ma che il loro rilascio avviene dopo la lesione o la morte della cellula stessa. È interessante notare, inoltre, che i FGFs acidi e basici non hanno alcun effetto sul riassorbimento e sulla degradazione della matrice ossea.

#### *Platelet-derived growth factor (PDGF)*

Il PDGF è un polipeptide di peso molecolare 30'000, che si ritiene importante nelle prime fasi di riparazione delle ferite poiché è stato inizialmente isolato dalle piastrine [Heldin & Westermark, 1987]. Anche i tessuti normali e neoplastici sintetizzano PDGF, indicando che esso può agire come regolatore sistemico o locale della crescita tissutale. Il PDGF è un dimero prodotto da due geni che codificano per due subunità A e B. Il peptide attivo può essere in forma AA o BB (omodimero) o in forma AB (eterodimero). Le isoforme AB e BB predominano nella circolazione sistemica, mentre il PDGF AA viene secreto dall'osteoblasta normale. Al contrario, le cellule di osteosarcoma esprimono ambedue i geni e possono sintetizzare potenzialmente tutte le isoforme di PDGF. Il PDGF stimola il riassorbimento osseo e la replicazione delle cellule ossee [Canalis et al., 1989]. Ciò suggerisce la sua importanza, probabilmente in associazione ad altri fattori, nel processo di rimodellamento e nella riparazione delle fratture. Il PDGF non influisce sulla sintesi di collagene dell'osteoblasta.

#### **Fattori di crescita sintetizzati da tessuti correlati all'osso**

L'osso e la cartilagine sono tessuti strettamente correlati. La cartilagine, come l'osso, contiene IGF-I, TGF basico e TGF- $\beta$ . Probabilmente questi fattori sono importanti nei processi di crescita e di ossificazione endondrale. Anche fattori derivanti dalle cellule del sangue hanno un'importante funzione

sul rimodellamento osseo e, visto il contatto del midollo osseo all'osso, possono agire direttamente sull'osso. I due fattori ematici studiati in dettaglio per le loro azioni sul rimodellamento osseo sono l'interleuchina 1 (IL-1) e il *tumor necrosis factor*  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Essi sono importanti nei meccanismi di ipercalcemia dovuta a tumori, ma il loro ruolo fisiologico potrebbe essere messo in dubbio poiché essi sono innanzitutto prodotti di cellule mononucleari "attivate" o macrofagi.

L'IL-1 esiste in due forme: l'IL-1 $\alpha$  e l'IL-1 $\beta$ . Esse hanno una parziale omologia amminoacidica e simili attività biologiche. L'IL-1 ha effetti complessi sul rimodellamento osseo, e stimola il riassorbimento osseo e la replicazione delle cellule ossee. L'IL-1 sembra rilevante nel meccanismo dell'ipercalcemia di certi tumori ematici, inoltre sono stati riportati aumentati livelli di IL-1 in alcuni casi di osteoporosi [Dewhirst, 1985]. L'IL-1 aumenta la sintesi di IL-6, che aumenta il riassorbimento osseo probabilmente attraverso il reclutamento di cellule della linea osteoclastica. La sintesi di IL-6 viene diminuita dagli estrogeni, e il fenomeno potrebbe spiegare la diminuzione di riassorbimento osseo osservato dopo la terapia con estrogeni [Jilka et al., 1992].

Il *tumor necrosis factor*- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) o cachetina, è una citochina nota per le sue azioni citostatiche, citolitiche, e antivirali. Comunque, esso è importante anche in una varietà di risposte cellulari normali e, in contrasto con le sue proprietà inibitorie sulla crescita delle cellule tumorali, esso stimola la crescita di cellule non trasformate. Il TNF- $\alpha$  stimola il riassorbimento osseo e la replicazione delle cellule ossee, e le cellule che si replicano sotto la sua influenza si differenziano e sintetizzano collagene osseo [Bertolini et al., 1986].

### 1.3 Funzioni fisiologiche di calcio, fosforo e magnesio

È ormai accertato che la vita sia iniziata in un *medium* primordiale ricco di potassio e magnesio e povero di sodio e calcio; si suppone che l'attuale composizione del liquido intracellulare, anch'esso ricco di potassio e di magnesio, ma povero di sodio e di calcio, rifletta quella del *medium* iniziale. I cambiamenti intervenuti nelle diverse ere geologiche hanno modificato la composizione del *milieu* rendendolo ricco soprattutto di sodio e calcio, per cui nel corso dell'evoluzione, gli organismi hanno dovuto adattarsi alle mutate condizioni sviluppando dei sistemi di trasporto degli ioni atti a mantenere l'asimmetria delle concentrazioni dei cationi monovalenti e bivalenti ai due lati

delle membrane plasmatiche. Il mantenimento dei rapporti transmembrana potassio/sodio e magnesio/calcio è di importanza critica nel controllo dell'eccitazione cellulare e nella regolazione di molti aspetti del metabolismo intracellulare. In generale, i tessuti più attivi come i nervi, il fegato e i muscoli hanno un rapporto potassio/sodio e magnesio/calcio più alto dei tessuti inattivi, come la pelle e gli eritrociti. Inoltre, i tessuti più attivi hanno un contenuto di fosforo maggiore di quelli inattivi, in accordo con il ruolo svolto dagli esteri fosforici nel metabolismo energetico cellulare.

## **Calcio**

L'individuo adulto contiene circa 100 grammi di calcio, di cui il 99% si trova nello scheletro sotto forma di idrossiapatite e solo l'1% è presente nei liquidi extracellulari e nei tessuti molli. Circa l'1% del calcio scheletrico è scambiabile con i liquidi extracellulari. La concentrazione extracellulare di ioni calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) è dell'ordine mM, mentre quella citosolica è circa 1000 volte inferiore ( $\mu\text{M}$ ) [Krane, 1970].

Il calcio nell'organismo assolve a due importanti ruoli fisiologici. Nell'osso provvede all'integrità strutturale dello scheletro. Nei liquidi extracellulari e nel citoplasma la concentrazione di ioni calcio è criticamente importante per mantenere e controllare numerosi processi biochimici, e la concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  in entrambi i compartimenti viene mantenuta costante.

Nel siero esistono tre frazioni di calcio: il calcio ionizzato (circa 50%), quello legato a proteine (circa il 40%) e il calcio complessato soprattutto con citrato e fosfato (circa il 10%) [Marshall, 1976]. Sia la frazione complessata che quella ionizzata sono ultrafiltrabili, per cui circa il 60% del calcio serico totale è in grado di attraversare le membrane semipermeabili. Circa il 90% del calcio legato alle proteine è legato all'albumina, il resto alle globuline. Alterazioni della concentrazione dell'albumina serica, dunque, influenzano la misura della concentrazione del calcio serico totale. A pH 7.4, ogni g/dl di albumina lega 0.8 mg/dl di calcio. Tale semplice relazione può essere usata per correggere la concentrazione serica di calcio totale quando l'albumina è ridotta. Il calcio si lega soprattutto ai gruppi carbossilici dell'albumina e questo legame dipende dal pH del sangue. In condizioni di acidosi quindi, diminuisce il legame del calcio con le proteine e aumenta il calcio ionizzato, mentre in condizioni di alcalosi si nota la situazione opposta. Questi cambiamenti, non essendo il riflesso della variazione del calcio serico totale, possono venire apprezzati solo dalla misura del calcio ionizzato.

Solamente il calcio ionizzato è rilevante dal punto di vista fisiologico: esso infatti è coinvolto nella coagulazione del sangue (il calcio è un cofattore in questo processo), nel mantenimento del prodotto minerale ionico (necessario per la mineralizzazione scheletrica), nel contribuire sia alla stabilità delle plasmamembrane (legandosi ai fosfolipidi del doppio foglietto lipidico) che alla regolazione della permeabilità allo ione sodio attraverso le membrane plasmatiche stesse. Per quanto riguarda quest'ultima funzione, una riduzione del calcio ionizzato aumenta la permeabilità al sodio e induce un'ipereccitabilità di tutti i tessuti eccitabili, mentre un suo aumento induce l'effetto opposto.

Il controllo dell'omeostasi calcemica all'interno della cellula ( $\mu\text{M}$ ) è molto complesso e la regolazione della sua concentrazione è rigidamente mantenuta così come è mantenuta la concentrazione del calcio nei liquidi extracellulari ( $\text{mM}$ ) [Borle, 1981; Rasmussen & Rasmussen, 1990]. Il calcio presente nel citosol è legato ad alcune proteine e ad alcune strutture cellulari. È interessante notare che circa il 90-99% del calcio intracellulare è presente nei mitocondri e nei microsomi (soprattutto legato a fosfati organici ed inorganici), che fungono da depositi intracellulari dello stesso. Il calcio può essere rilasciato da questi depositi nel citoplasma, dove svolge funzioni di messaggero intracellulare.

La bassa concentrazione di calcio nel citosol è mantenuta da tre sistemi di trasporto ATP dipendenti: una pompa esterna, localizzata sulla membrana plasmatica e due pompe interne, localizzate una sulla membrana microsomiale e l'altra sulla membrana mitocondriale interna. Questi sistemi di trasporto mantengono la concentrazione intracellulare di calcio compiendo un lavoro con consumo di energia derivata dall'idrolisi di ATP, poiché pompano il calcio sia all'esterno della cellula che all'interno degli organelli intracellulari, deputati alla riserva dello ione, contro gradiente elettrico e di concentrazione.

Lo ione calcio citoplasmatico è il fattore che lega eccitazione e contrazione nei muscoli scheletrici e in quello cardiaco [Rasmussen & Rasmussen, 1990]. In numerose cellule, inoltre, il calcio funge da secondo messaggero che media gli effetti di segnali di membrana sul rilascio di prodotti di secrezione (ad es. neurotrasmettitori, secrezioni esocrine come l'amilasi, e secrezioni endocrine come l'insulina e l'aldosterone) [Rasmussen & Rasmussen, 1990]. Il sistema che coinvolge il calcio come messaggero, implica un flusso di informazioni attraverso i sistemi della calmodulina e della chinasi C. In molte cellule, parecchi punti del sistema del calcio-messaggero e del cAMP sono

profondamente integrati, per cui la risposta cellulare a un dato stimolo è determinata da un complesso gioco di interazione tra questi due sistemi.

## **Fosforo**

In un individuo adulto ci sono approssimativamente 600 grammi di fosforo di cui l'85% è contenuto nello scheletro e il rimanente 15% nei liquidi extracellulari, soprattutto sotto forma di ione fosfato e, nei tessuti molli, in forma esterificata. Gli esteri del fosfato e gli intermedi fosforilati intracellulari, sono coinvolti in numerosi ed importanti processi biochimici, come quelli legati alla generazione e al trasferimento di energia. Le concentrazioni intra ed extracellulari di fosfato (come anione divalente) sono dell'ordine di circa  $1 \times 10^{-4}$  e  $2 \times 10^{-4}$  M rispettivamente, e sono mantenute meno rigidamente di quelle del calcio e del magnesio.

Anche il fosfato inorganico presente nel siero esiste nelle tre frazioni ionizzata, legata alle proteine e sotto forma di complessi. La quota di fosfato legata alle proteine rappresenta circa il 10% del totale, mentre circa il 35% è complessata a sodio, calcio e magnesio. Circa il 90% del fosfato inorganico è quindi ultrafiltrabile. La maggior specie ionica nel siero, a pH 7.4, è presente come anione bivalente ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ).

All'opposto del calcio, la concentrazione di fosfato serico varia ampiamente ed è influenzata dall'età, dal sesso, dalla dieta, dal pH e da diversi ormoni. Una concentrazione di fosfato serico adeguata è importante per il mantenimento del prodotto ionico che consenta una normale mineralizzazione.

Il passaggio dello ione fosfato attraverso la membrana plasmatica e la membrana degli organelli intracellulari procede passivamente ed è influenzata principalmente dal movimento del calcio, oltre che dal movimento di altri cationi. Il contenuto di fosfato nei mitocondri, dove si trova soprattutto sotto forma di sali di calcio, è elevato. La concentrazione citoplasmatica di ioni fosfato in forma libera è abbastanza bassa, mentre la porzione maggiore del fosfato intracellulare è sotto forma di esteri fosforici. Questi esteri fosforici giocano un gran numero di ruoli criticamente importanti nel metabolismo cellulare: i nucleotidi purinici forniscono la cellula di depositi di energia; intermedi fosforilati sono implicati nella conservazione e nel trasferimento di energia; i fosfolipidi sono i maggiori costituenti delle membrane cellulari e la fosforilazione delle proteine è un importante mezzo di regolazione della loro attività biologica.

## **Magnesio**

La quantità di magnesio in un individuo adulto è di circa 25 grammi o 2'000 mEq, di cui i 2/3 si trovano nello scheletro ed 1/3 nei tessuti molli. Nell'osso il magnesio non è parte integrante del cristallo di idrossiapatite ma sembra essere localizzato sulla superficie del cristallo. Solo una minima parte del magnesio dell'osso è scambiabile con il magnesio extracellulare.

Il magnesio è il più abbondante catione divalente intracellulare. Approssimativamente circa il 60% del magnesio all'interno della cellula è presente nel mitocondrio mentre, della frazione contenuta nel citoplasma, solo circa il 5-10% è presente sotto forma di ione libero. Solo l'1% di tutto il magnesio presente nell'organismo si trova nel compartimento extracellulare, dove raggiunge una concentrazione di circa  $5 \times 10^{-4}$  M, al pari di quella intracellulare, che viene rigidamente mantenuta in entrambi i compartimenti. Il sistema di trasporto intracellulare, responsabile della distribuzione asimmetrica del magnesio nei compartimenti intracellulari, è meno studiato dei corrispondenti sistemi di trasporto del calcio; appare chiaro tuttavia che il metabolismo del calcio e del magnesio sono regolati in maniera indipendente.

Circa il 55% del magnesio nel siero è in forma ionizzata, mentre il 30% è legato a proteine e il rimanente 15% si trova sotto forma di complessi. La frazione legata alle proteine interagisce con i gruppi carbossilici dell'albumina in maniera analoga a quella del calcio. La frazione ionizzata è quella importante nei processi fisiologici, come per esempio nel processo di eccitabilità della membrana plasmatica. La concentrazione extracellulare dello ione magnesio è strettamente controllata dal rene [Rude & Singer, 1981].

Il magnesio è un cofattore essenziale di molti enzimi chiave: tra questi, gli enzimi legati al trasferimento dei gruppi fosfato in tutte le reazioni che richiedono ATP e gli enzimi coinvolti nella replicazione, trascrizione e traduzione dell'informazione genetica, esso inoltre è coinvolto nella regolazione dell'eccitabilità neuromuscolare.

### **1.4 Regolazione dell'omeostasi minerale ossea**

Schematizzando al massimo, la regolazione dell'omeostasi minerale può essere ricondotta al controllo dei livelli intra ed extracellulari degli ioni calcio, magnesio e fosfato, dovuta all'azione integrata di PTH, calcitonina e 1,25-diidrossi-vitamina D<sub>3</sub> su tre organi bersaglio: osso, intestino e rene. Tuttavia, questo semplice schematismo concettuale riflette solo parzialmente la realtà. In effetti, altri ioni sono implicati nel meccanismo omeostatico di calcio, fosfato

e magnesio. Sodio, potassio, cloruri, bicarbonati, solfati e pH, infatti, influenzano l'utilizzo cellulare di Ca,  $P_i$  e Mg. Similmente altri ormoni (prolattina, ormoni glucocorticoidi, ormone della crescita, insulina, *insulin-like growth factors* ed un gran numero di citochine) contribuiscono alla regolazione dell'omeostasi minerale. Infine, altri tessuti oltre a osso, rene e intestino, contribuiscono all'omeostasi minerale perché anch'essi sono bersaglio degli ormoni calciotropi.

Il Ca ed il  $P_i$  passano nel sangue dall'intestino, vengono eliminati dal rene e sono depositati soprattutto sull'osso. Allo scopo di mantenere l'equilibrio, l'assorbimento intestinale di Ca e  $P_i$  dev'essere controbilanciato dalla loro escrezione renale. L'assorbimento intestinale dipende dalla dieta e può avere un'efficienza diversa; la filtrazione glomerulare renale di questi ioni è invece relativamente costante, così che il rene modula l'escrezione di questi ioni regolando l'efficienza del riassorbimento tubulare di Ca e  $P_i$ . L'osso è il più importante sistema tampone nel mantenimento della costanza dei livelli ematici di questi ioni, in quanto da questo tessuto essi vengono rimossi e depositati. In conclusione, numerosi ormoni agiscono con effetti coordinati su tessuti diversi, con meccanismi diversi, che assicurano un supplemento di minerali, che è elevato durante la crescita, costante nella vita adulta e che diminuisce gradualmente durante il periodo dell'invecchiamento.

### **Assorbimento intestinale di calcio e fosfato**

L'1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamina D stimola l'assorbimento intestinale di Ca e  $P_i$ . I pazienti con deficienza di vitamina D o con resistenza alla vitamina D sono caratterizzati da ipocalcemia ed ipofosfatemia per inadeguato assorbimento intestinale di Ca e  $P_i$ . È interessante notare che i siti intestinali più sensibili alla 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> per l'assorbimento del Ca e del  $P_i$  sono diversi e sono, rispettivamente, il duodeno per il Ca ed il digiuno per il  $P_i$ . Similmente, appaiono diversi i sistemi di trasporto di Ca e  $P_i$ , benché si sappia ancora poco sui meccanismi molecolari coinvolti in questo processo. Il trasporto intestinale del Ca, così come quello del  $P_i$ , dipende molto dai livelli di vitamina D, sebbene per il  $P_i$  non in maniera così marcata come per il Ca. L'assorbimento del Mg, invece, è poco influenzato dal tasso serico di questo ormone. Il paratormone, viceversa, non influisce direttamente sul trasporto intestinale di Ca e  $P_i$ , bensì in via indiretta, in quanto aumenta la sintesi renale di 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

### **Autoregolazione dell'assorbimento di calcio e fosfato**

Il Ca ed il  $P_i$  si influenzano reciprocamente nell'assorbimento intestinale; infatti i sali di calcio (carbonato o citrato) sono usati in terapia per ridurre l'assorbimento di fosfati in pazienti con insufficienza renale. Tali pazienti, infatti, sviluppano una iperfosfatemia perché non sono in grado di eliminare il  $P_i$  attraverso il rene. Similmente i fosfati (di potassio o di sodio) sono usati per ridurre l'assorbimento intestinale di Ca in pazienti con ipercalcemia idiopatica. Ca e  $P_i$  agiscono indirettamente nel regolare il loro assorbimento intestinale controllando i livelli circolanti di  $1,25(OH)_2$ -vitamina  $D_3$ . Bassi livelli di Ca e/o  $P_i$  ematici stimolano la produzione renale di  $1,25(OH)_2$ -vitamina  $D_3$ , sia con azione diretta sulla  $25(OH)$ -vitamina  $D_3$ - $1\alpha$ -idrossilasi, che attraverso un altro ormone che controlla la sintesi di  $1,25(OH)_2$ -vitamina  $D$ . Per il Ca, questo ormone è il PTH: bassi livelli di Ca stimolano la produzione di PTH che a sua volta stimola la produzione di  $1,25(OH)_2D_3$ . Il Mg agisce in questo senso come il Ca. Bassi livelli di  $P_i$ , invece, non hanno effetto sul PTH ma sembrano stimolare la secrezione di un fattore ipofisario che a sua volta stimola la  $1\alpha$ -idrossilasi. L'identità di questo fattore non è ancora ben chiarita, anche se pare trattarsi dell'ormone della crescita che è in grado di stimolare la sintesi e la liberazione dell'*insulin-like growth factor* (IGF), il quale stimola la produzione di  $1,25(OH)_2D_3$ . Appare quindi possibile che pazienti affetti da tumori dell'ipofisi, o dopo resezione ipofisaria, possano avere sregolata la produzione di  $1,25(OH)_2D_3$  tramite il meccanismo  $P_i$ -dipendente.

### **Regolazione del riassorbimento renale di calcio e fosfato tramite il PTH**

Come l' $1,25(OH)_2D_3$  è il principale regolatore dell'assorbimento intestinale di Ca e  $P_i$ , così il PTH è il principale regolatore del riassorbimento renale di questi ioni. Il PTH inibisce il riassorbimento renale del  $P_i$ , sia a livello del tubulo prossimale che distale, aumentando nel contempo il riassorbimento di Ca nel tubulo distale. L'effetto di inibizione del PTH sul riassorbimento renale del  $P_i$ , esprime la massima azione di controbilanciamento causata dall'aumento dei valori serici di  $P_i$ . Di contro, l'effetto ipercalcemizzante del PTH è dovuto all'effetto sul riassorbimento renale del Ca, all'aumento del riassorbimento osseo e all'aumentato assorbimento intestinale. Così l'iperparatiroidismo primitivo è caratterizzato da ipofosfatemia ed ipercalcemia. Questa riduzione nel  $P_i$  serico può contribuire alla capacità del PTH di stimolare la produzione di  $1,25(OH)_2D_3$  perché, come già detto, l'ipofosfatemia stimola la  $1\alpha$ -idrossilasi renale.

### **Autoregolazione dell'escrezione renale di calcio**

Benché il PTH aumenti il riassorbimento renale del calcio, l'ipercalciuria è frequente nei pazienti con iperparatiroidismo. La ragione di ciò è duplice. Con l'ipercalcemia è aumentato il carico di calcio filtrato e il suo riassorbimento a livello del tratto ascendente dell'ansa di Henle e nei dotti collettori è inibito. La capacità del PTH di stimolare il riassorbimento di Ca nel tubulo distale non riesce a compensare queste diverse azioni dell'ipercalcemia sull'escrezione del Ca.

## Capitolo 2

### IL RATTO COME MODELLO ANIMALE PER LO STUDIO DEL METABOLISMO DEL TESSUTO OSSEO

Un modello animale per essere accettabile deve rispondere alle seguenti caratteristiche:

- 1) convenienza, riferita alla semplicità di utilizzo;
- 2) rilevanza, riferita alla comparabilità tra il fenomeno studiato nell'animale e quello nell'uomo;
- 3) appropriatezza, riferita al complesso di altri fattori che rende una certa specie più idonea di altre per studiare un fenomeno particolare.

Considerando questi requisiti, da molti anni si è scelto come modello animale per lo studio del *turnover* osseo il ratto ovariectomizzato [Ballanti et al., 1993]. Infatti, un modello animale di perdita ossea postmenopausale deve essere un animale vivo, nel quale possano essere studiate perdite di massa ossea spontanee o indotte da una deficienza di ormone ovarico, e nel quale le caratteristiche della perdita ossea e le conseguenze riscontrate siano paragonabili a quelle delle donne in menopausa [Wessler, 1976]. La massa scheletrica dei ratti rimane quasi stabile per un lungo periodo di tempo della loro esistenza quindi, per paragonarlo con l'uomo, il ratto può essere ovariectomizzato per creare in esso una deficienza di ormone ovarico e per stimolare un'accelerata perdita ossea, come avviene nella donna in seguito alla menopausa. La perdita ossea indotta dall'ovariectomia nel ratto e la perdita ossea postmenopausale naturale mostrano caratteristiche molto simili [Kalu, 1991]. Queste includono:

- 1) una quota accresciuta di *turnover* osseo, con riassorbimento maggiore rispetto alla formazione;
- 2) una fase iniziale rapida di perdita ossea, seguita da una fase molto lenta di grossa perdita di osso trabecolare rispetto al corticale;
- 3) un ridotto assorbimento intestinale di calcio;
- 4) una certa protezione contro la perdita ossea mediante terapia con estrogeni, tamoxifene, bisfosfonati, ormone paratiroideo, calcitonina ed esercizio fisico.

Questo elevato numero di corrispondenze permette di considerare il modello del ratto ovariectomizzato adatto per lo studio dei problemi che

conseguono alla perdita ossea postmenopausale. È opportuno a questo punto distinguere l'osteoporosi dalla perdita ossea postmenopausale. Infatti, mentre un decremento della massa ossea è un fenomeno comune per una donna nel periodo postmenopausale, la sindrome osteoporotica, caratterizzata dal collasso dei corpi vertebrali e dalla facilità di fratture di certe ossa lunghe, non è sempre manifesta [Exton-Smith, 1985]. D'altronde nei ratti può essere descritta una perdita ossea dopo l'ovariectomia, ma non sembra che la deficienza di ormone ovarico possa essere causa di fratture tipiche dell'osteoporosi umana. Da ciò risulta più corretto considerare il ratto come un modello di osteopenia piuttosto che di osteoporosi.

Sebbene negli anni '60 Larsson utilizzò un modello animale di perdita ossea in cui dopo l'ovariectomia effettuava la terapia prednisolonica [Larsson, 1968; Larsson & Vejlens, 1968], quello di Saville viene usualmente riconosciuto come il primo tentativo di caratterizzare un modello animale di perdita ossea postmenopausale [Saville, 1969]. Saville castrò dei ratti femmina di 21 giorni di età, e li sacrificò in gruppi di 6, a intervalli di 2 settimane, per circa 100 giorni. Egli osservò che, rispetto agli animali di controllo, le ossa dei ratti ovariectomizzati avevano un minor contenuto di calcio per unità di volume. Questa scoperta è stata ripetutamente confermata [Aitken et al., 1972; Hodgkinson et al., 1978; Cruess & Hong, 1979; Kalu et al., 1984; Ibbotson et al., 1989; Kalu et al., 1989; Wronski et al., 1989; Yamazaki & Yamaguchi, 1989]. In una recente ricerca bibliografica, su 80 lavori pubblicati dopo Saville, solo in 4 non si osserva perdita ossea nel ratto ovariectomizzato. Le ragioni di questo non sono chiare, ma potrebbero essere relazionate ad un intervallo di tempo insufficiente dopo l'ovariectomia, alle tecniche usate per quantificare la perdita ossea, o ad alcune particolarità della dieta, come un alto contenuto di calcio che diminuisce la sensibilità dei ratti alla perdita ossea dovuta all'ovariectomia [Hodgkinson et al., 1978].

Per quanto riguarda il periodo di vita da usare nel modello, è noto che i ratti, a seconda del ceppo, possono vivere circa tre o quattro anni. In letteratura risulta che l'età dei ratti oggetto di studi per la perdita ossea dovuta ad ovariectomia varia da tre settimane [Saville, 1969] a due anni [Stepan & Tesarova, 1985; Ibbotson et al., 1989]. L'uso di animali di tre settimane è complicato dall'enorme crescita e rimodellamento scheletrico che avviene in questo periodo, mentre i ratti di due anni sono troppo vicini all'età in cui diventano anovulatori e hanno un'aumentata incidenza di malattie [Lu et al., 1979; Yu et al., 1982]. Allo scopo di standardizzare questo parametro, sono

stati proposti due tipi di modello animale compresi in questo intervallo di vita: il modello del ratto vecchio e il modello del ratto maturo [Kalu et al., 1989; Liu & Kalu, 1990].

La motivazione per scegliere un modello di ratto vecchio è duplice [Kalu et al., 1989]: primo, per essere sicuri che il modello sia basato su animali scheletricamente maturi, poiché la perdita ossea postmenopausale umana inizia dopo il raggiungimento della maturità scheletrica; secondo, per essere certi che la perdita ossea indotta dall'ovariectomia non sia complicata da malattie o perdite ossee dovute specificamente all'invecchiamento. Tenendo presenti queste considerazioni, è stato caratterizzato l'andamento della crescita ossea di ratti femmina di ceppo Wistar, come prerequisito per scegliere l'età appropriata per il modello del ratto vecchio [Kalu et al., 1989]. La lunghezza, il peso, la densità e il contenuto di calcio del femore aumentano con alta velocità da 1 a 3 mesi di età; in seguito, la velocità di crescita è più graduale. Da 6 mesi di età in poi, i cambiamenti nella densità e nel contenuto di calcio del femore sono minimi e, a 12 mesi, tutti i parametri ossei misurati hanno raggiunto livelli di *plateau*, senza ulteriori cambiamenti significativi fino a 24 mesi di età. Da queste considerazioni, 24 mesi sono stati scelti come l'età su cui basare il modello del ratto vecchio [Kalu et al., 1989], sebbene si possano utilizzare anche animali di 6 mesi [Kalu et al., 1984]. Perciò, il modello del ratto "vecchio" è chiamato così non perché i ratti utilizzati siano vecchi, ma piuttosto perché le loro caratteristiche scheletriche si sono stabilizzate ad un livello vicino a quello dei ratti vecchi. Poiché tutte le caratteristiche del femore del ratto sono praticamente stabili da 6 a 24 mesi di età, l'uso di animali di 12 mesi assicura che tutti i cambiamenti a livello scheletrico, osservati dopo l'ovariectomia, sono dovuti essenzialmente alla deficienza di ormone ovarico, quindi indipendenti da variazioni legate alla rapida crescita che si nota nei soggetti giovani, o da malattie che si manifestano nell'ultima parte della vita del ratto [Kalu et al., 1989]. Comunque, nelle metafisi delle ossa lunghe, si verifica un po' di perdita di osso trabecolare [Wronski et al., 1989], e ciò va tenuto in considerazione quando si utilizza il modello del ratto vecchio. Allo scopo di accertarsi dell'avvenuta perdita di una quantità significativa di osso, questi ratti vengono di norma sacrificati parecchi mesi dopo l'ovariectomia, anche se una significativa perdita di osso trabecolare è stata osservata nel femore prossimale già dopo due mesi [Yamazaki & Yamaguchi, 1989]. I cambiamenti nei parametri serici non sono significativi nei ratti ovariectomizzati [Kalu et al., 1989]. La perdita ossea nel modello del ratto

vecchio dipende da almeno due fattori: una diminuzione nell'assorbimento intestinale di calcio ed un aumentato *turnover* osseo, con il riassorbimento che eccede la formazione ossea.

Sebbene questo modello risponda a molte delle caratteristiche ricercate, i ratti di quest'età sono costosi e di scarsa reperibilità, inoltre deve trascorrere un lungo periodo prima che gli effetti della castrazione diventino manifesti. Al contrario, nel modello del ratto maturo, i giovani ratti di tre mesi sono facilmente reperibili, non sono molto costosi e gli effetti dell'ovariectomia si manifestano sul loro scheletro in un mese o meno con caratteristiche molto simili al modello precedente [Vogel, 1979; Liu & Kalu, 1990; Frost & Jee, 1992; Kalu et al., 1993b]. Questi attributi rendono conto del largo uso dei ratti più giovani per studiare la perdita ossea dovuta alla deficienza di ormone ovarico. Il termine "maturo" viene utilizzato per enfatizzare che questi ratti sono sessualmente maturi e capaci di rispondere in maniera appropriata alla deficienza di ormoni sessuali e alle conseguenze dell'ovariectomia.

Wronski e coautori hanno condotto un'accurata caratterizzazione dei cambiamenti ossei che si verificano nel modello del ratto maturo di perdita ossea postmenopausale o da deficienza di ormone ovarico [Wronski et al., 1989]. 12 ratti di controllo e 12 ratti ovariectomizzati di 90 giorni di età sono stati sacrificati a intervalli periodici lungo un periodo di 18 mesi; 8 ratti sono stati sacrificati al giorno 0 per fungere da controlli basali. È stata quindi analizzata la metafisi della tibia prossimale con tecniche istomorfometriche. Wronski et al. hanno osservato che, nei controlli, il volume trabecolare osseo rimaneva relativamente costante (circa 30%) per circa 6 mesi, e poi diminuiva. In contrasto, gli animali ovariectomizzati mostravano una drammatica perdita di osso trabecolare nella tibia prossimale. La perdita era progressiva: era evidente a 2 settimane e inequivocabile ad un mese; a 100 giorni il volume dell'osso trabecolare si era stabilizzato a circa 5-7%, e dopo 270 giorni il volume osseo diminuiva lentamente fino a 1-2%. Le superfici degli osteoblasti e degli osteoclasti e gli indici di formazione ossea (aree marcate con tetraciclina), erano maggiori nei ratti ovariectomizzati che nei controlli, specialmente durante i primi 100 giorni seguenti l'ovariectomia. Gli autori hanno concluso che la perdita di osso trabecolare nella tibia prossimale, nel modello del ratto maturo, è consistente con uno sbilanciamento dell'equilibrio riassorbimento-formazione ossea, con il primo che supera il secondo.

Tutto questo permette di considerare il ratto come un modello animale dotato di appropriatezza e rilevanza nello studio della perdita ossea da deficienza di ormone ovarico.

## Capitolo 3

### SCOPO DELLA RICERCA

Il complesso fenomeno della mineralizzazione dei tessuti, sia in condizioni fisiologiche (ossificazione membranosa ed encondrale) che in condizioni patologiche (calcificazioni metastatiche) è ancora un problema aperto. Anche se recentemente le conoscenze si sono ampliate, soprattutto per quanto riguarda il modello di calcificazione encondrale, il meccanismo completo e la sequenza degli eventi che portano alla formazione delle ossa lunghe non è perfettamente noto.

Come già riportato nel Capitolo 1.2.3, il processo di mineralizzazione è sotto il controllo degli osteoblasti, sia allo stadio iniziale di formazione del cristallo, che nel momento della sua crescita. La fosfatasi alcalina è, come già detto, un *marker* degli osteoblasti e il suo livello cellulare correla con il loro potenziale di mineralizzazione. Essa svolge un ruolo importante nel processo di mineralizzazione, la cui velocità appare dipendere dalla presenza di molecole di inibitori (come pirofosfato e proteine non collageniche acide), che in soluzione sembrano modulare la deposizione del minerale sulla matrice extracellulare. Anche se l'esatta funzione della fosfatasi alcalina non è stata ancora completamente chiarita, il fatto che a pH fisiologico essa sia in grado di catalizzare l'idrolisi del pirofosfato, porta a supporre che questo enzima possa regolare la mineralizzazione controllando la concentrazione degli inibitori. Anche il fosfocitrato, che è il più potente inibitore conosciuto della formazione dei cristalli di idrossiapatite [Williams & Sallis, 1979; Reddi et al., 1980; Tew et al., 1980; Tew et al., 1981], sembra essere un substrato naturale per la fosfatasi alcalina.

Scopo di questa tesi è stato lo studio della mineralizzazione del tessuto osseo nel modello di calcificazione encondrale. La ricerca pertanto è stata articolata in 3 progetti:

- 1) Considerato che il fosfocitrato è il più potente inibitore della mineralizzazione ed essendo già stata evidenziata negli epatociti di ratto la presenza di un'attività enzimatica in grado di sintetizzare il composto [Moro et al., 1990], è sembrato logico procedere con la caratterizzazione biochimica dell'attività *fosfocitrato sintetica*, determinandone anche la distribuzione cellulare e tissutale.

- 2) Poiché l'osso corticale svolge una funzione meccanica e l'osso trabecolare una funzione metabolica, e considerando che funzione e struttura sono l'una la conseguenza dell'altra, si è voluto caratterizzare il grado di alcune delle modificazioni post-traduzionali del collagene di tipo I che, come noto, costituisce più del 90% delle proteine della matrice dell'osso e che determina l'architettura della matrice stessa.
- 3) Poiché le dimensioni e la forza di tensione delle fibrille di collagene dipendono da alcune modificazioni post-traduzionali del collagene stesso, e considerando che ogni alterazione nelle dimensioni e nella forza di tensione delle fibrille di collagene potrebbe influenzare il sito di nucleazione per la formazione del minerale [Glimcher, 1976], si è voluto caratterizzare chimicamente e strutturalmente la fase minerale dei due compartimenti ossei.

## Capitolo 4

### TECNICHE IMPIEGATE

#### 4.1 Cromatografia

Una delle tecniche più efficaci e largamente usate con fini analitici e preparativi per la separazione di sostanze da miscele complesse è certamente la cromatografia. Questa tecnica, descritta per la prima volta nel 1903 da Twsett per la separazione di una miscela di pigmenti vegetali, per molti anni si è sviluppata essenzialmente su basi empiriche. È del 1938 l'introduzione della cromatografia su strato sottile (TLC) da parte di Izmailov. Fondamentali studi teorici sono stati condotti nei primi anni '40 da Martin e Synge. La cromatografia in fase liquida non ha presentato sostanziali innovazioni fino alla fine degli anni '60 quando diversi autori, rifacendosi agli studi classici di Martin, secondo i quali la riduzione della granulometria della fase stazionaria avrebbe aumentato l'efficienza della separazione, cercarono di ottimizzare le condizioni operative. La riduzione della granulometria della fase stazionaria e lo sforzo di ridurre il più possibile i volumi morti, hanno tuttavia comportato la necessità di aumentare la pressione esercitata a monte della colonna. Da qui le denominazioni "*High Pressure Liquid Chromatography*" e "*High Performance Liquid Chromatography*" (HPLC).

La cromatografia è un metodo chimico-fisico di separazione, basato sull'equilibrio di ripartizione dei componenti da separare, i quali sono distribuiti tra due fasi: una fissa e l'altra mobile. La prima è costituita da un solido o da un liquido opportunamente supportati (fase stazionaria), la seconda da un fluido che funge da veicolo di trasporto dei componenti da separare e che percola attraverso la prima (fase mobile). [Wilson & Goulding, 1986]. Le diverse sostanze contraggono interazioni deboli di diversa energia con l'una e l'altra fase; il rapporto di queste interazioni condiziona la velocità di migrazione nel sistema, realizzando così la separazione fisica dei componenti della miscela.

I metodi cromatografici possono essere classificati in relazione allo stato fisico della fase mobile. Secondo questo criterio i processi cromatografici vengono suddivisi in processi in fase liquida (ad esempio cromatografia di adsorbimento e di ripartizione) e processi in fase gassosa (gascromatografia).

### *Cromatografia di adsorbimento*

All'interfaccia di alcune coppie di fasi, quali ad esempio la solido-liquido, può stabilirsi un gradiente di concentrazione nella fase liquida, le cui molecole si addensano in prossimità della superficie del solido. Questo fenomeno, detto adsorbimento, è dovuto ad una particolare azione attrattiva che la fase solida esercita sulle molecole del liquido, trattenendole con legami chimici secondari. L'adsorbimento è influenzato da numerosi fattori come la concentrazione e la temperatura. La temperatura ad esempio, agisce negativamente sull'adsorbimento in quanto, aumentando l'agitazione, tende a rompere i legami adsorbente-adsorbito e diminuisce la probabilità che se ne formino di nuovi. Se l'energia cinetica molecolare non è inferiore ad un certo valore, l'urto delle molecole liquide con la superficie del solido adsorbente è quasi di tipo elastico, con relativo rimbalzo e impossibilità di formazione del legame.

Nella cromatografia di adsorbimento la separazione è basata sulla diversa affinità dei componenti del campione per i gruppi chimici attivi distribuiti sulla superficie della fase stazionaria. La cromatografia di adsorbimento viene condotta su una colonna contenente un adsorbente solido opportuno, attraverso il quale percola una soluzione contenente le sostanze da separare. Le fasi stazionarie più usate sono la silice e l'allumina, entrambe sostanze polari, la prima con caratteristiche moderatamente acide, la seconda con caratteristiche basiche. La selettività dell'adsorbimento è precipuamente legata alla natura dei gruppi polari presenti nelle molecole adsorbite: così i gruppi  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$  e  $-\text{NH}_2$ , sono notevolmente adsorbiti, mentre i chetoni, gli esteri e gli idrocarburi, sono progressivamente meno trattenuti; a parità di gruppi funzionali presenti, l'adsorbimento aumenta con il peso molecolare. La selettività dipende notevolmente anche dalla natura dell'adsorbente e dalla sua composizione granulometrica. Questo fatto conduce, nella tecnica analitica, ad un'accurata scelta del mezzo più idoneo da adoperarsi. A causa della polarità delle fasi stazionarie, le sostanze interagiscono con la fase stazionaria tanto di più quanto maggiore è la loro polarità, cioè le separazioni avvengono in fase diretta.

### *Cromatografia di ripartizione*

Molti processi cromatografici sono governati dalla legge di ripartizione di Nernst. Quando un soluto si trova a contatto con due solventi diversi, esso, all'equilibrio, si distribuisce tra i due secondo un rapporto costante (K) che dipende dalle solubilità nei due solventi:

$$K = \frac{C_x}{C_y}$$

dove  $C_x$  e  $C_y$  sono le rispettive concentrazioni del soluto nel solvente x e nel solvente y [Wilson & Goulding, 1986]. Questo fenomeno risulta selettivo, in quanto i valori di  $K$ , per una data coppia di solventi, variano da sostanza a sostanza.

La cromatografia di ripartizione può essere condotta su colonna contenente un supporto granulare, oppure su carta. Sia il supporto che la carta vengono impregnati di un liquido adsorbente e costituiscono la fase stazionaria. In questo metodo le sostanze da separare si distribuiscono, secondo la legge di ripartizione, tra il solvente della fase mobile ed un film di liquido che riveste la fase stazionaria, tra loro immiscibili. Questo film di liquido è legato chimicamente al supporto solido, generalmente di silice, sfruttando la reattività dei gruppi silanoli. Le più comuni fasi stazionarie sono rappresentate da catene alifatiche di 8-18 atomi di carbonio. Quando, come in questo caso, la fase stazionaria è apolare, o comunque meno polare della fase mobile, si parla di separazione in fase inversa; di conseguenza eluiscono prima le sostanze più polari, che interagiscono meno con la fase stazionaria. Quando invece alla fase stazionaria sono legati gruppi ammino-propilici o ciano-propilici, prevalgono le caratteristiche polari ed eluiscono prima le sostanze meno polari, quindi le separazioni avvengono in fase diretta.

### *Cromatografia a scambio ionico*

In questo tipo di cromatografia gli analiti sono separati in base alla loro capacità di spiazzare controioni da gruppi con carica elettrica sulla fase stazionaria. In pratica possono essere utilizzate come fasi stazionarie resine scambiatrici di anioni o di cationi e, nella fase mobile, soluzioni contenenti controioni che, al variare della forza ionica o del pH portano, per competizione verso le cariche della fase stazionaria, all'eluizione degli analiti.

Le fasi stazionarie scambiatrici di cationi più usate, sono costituite da resine con gruppi sulfonici o carbossilici, le scambiatrici di anioni contengono gruppi ammoniacali quaternari.

Oltre a cambiamenti nella forza ionica e nel pH, anche l'aggiunta di modificatori organici alla fase mobile è usata per controllare la ritenzione delle sostanze da analizzare.

### *Cromatografia di coppia ionica*

La separazione si basa su un principio non dissimile da quello utilizzato nella cromatografia a scambio ionico, salvo che la fase stazionaria non contiene gruppi elettricamente carichi, anzi è una fase apolare. Nell'eluente sono invece sciolti controioni con carica opposta all'analita (tetrabuttilammonio per analiti acidi; laurilsolfato per analiti basici) che presentano anche gruppi con notevole affinità per la fase stazionaria apolare. Gli analiti saranno quindi in equilibrio con il controione e, attraverso questo, anche con la fase stazionaria.

#### **4.1.1 Cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC)**

La cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) viene indicata anche come cromatografia ad alta pressione.

Dal punto di vista teorico, essa si basa sui principi fisici dell'adsorbimento, della ripartizione e dello scambio ionico ma, avvalendosi di tecnologie avanzate, consente di ottenere separazioni impossibili nella tradizionale cromatografia in fase liquida. Una delle caratteristiche più salienti a questo proposito è l'impiego di fasi stazionarie molto fini e quindi ad alta superficie, che richiedono, a loro volta, l'uso di alte pressioni al fine di ottenere l'eluizione della fase liquida in tempi accettabili. Ciò costituisce una netta differenza dalla gascromatografia in cui la pressione del gas di trasporto ha valori molto bassi.

L'impiego di fasi stazionarie molto fini ed omogenee permette di ottenere un perfetto impaccamento delle particelle che le costituiscono, il che fa sì che il cammino che il campione dovrà compiere, quindi la dispersione nell'eluente, sia limitato. In questo modo i picchi di uscita risultano molto stretti.

Poiché la resistenza che la colonna oppone al passaggio del fluido risulta essere molto bassa, si possono applicare pressioni notevoli per far passare più velocemente la fase mobile. Si riescono così ad avere equilibri veloci, che portano ad una diminuzione dell'altezza dei piatti teorici (lo spazio immaginario che è idealmente occupato dalla quantità di fase mobile e stazionaria interessate ad uno soltanto dei molteplici equilibri necessari alla separazione di più campioni). Con la diminuzione dell'altezza dei piatti teorici, si ha un aumento del loro numero a parità di altezza reale della colonna; ciò porta ad una migliore separazione dei campioni e ad una migliore risoluzione dei picchi.

Un altro importante vantaggio è costituito dal fatto che, grazie all'utilizzo di fasi mobili liquide, non è necessario vaporizzare il campione, il che consente di operare a temperature vicine a quella ambiente e quindi di poter procedere a separazioni di sostanze che verrebbero distrutte, o comunque alterate, con il riscaldamento.

Lo schema di funzionamento di una HPLC è riportato in Figura 30.

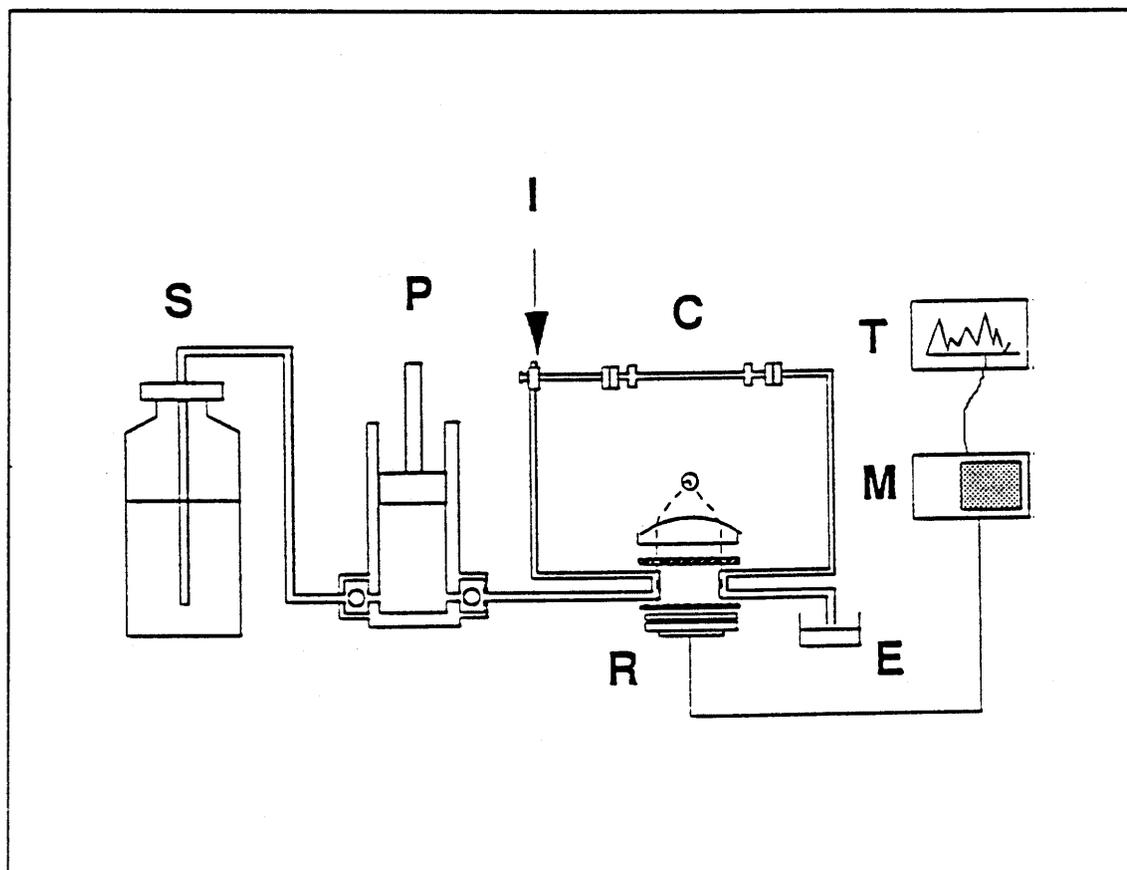


Figura 30: Schema di funzionamento di una HPLC.

La fase mobile, contenuta in S, viene spinta mediante la pompa P (destinata a produrre le alte pressioni di esercizio) nel ramo di riferimento del rivelatore R. A questo punto l'iniettore I provvede a inserire il campione nel flusso del solvente ed il tutto passa quindi alla colonna C. Infine l'eluito, dopo aver attraversato il ramo di misura del rivelatore, viene raccolto in E. Il segnale prodotto dal rivelatore viene inviato al registratore T, dopo essere stato elaborato in M.

## 4.2 Spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica molto potente che, utilizzando quantità molto piccole di materiale, viene utilizzata per identificare composti ignoti, determinare la quantità di molecole note in miscele e determinare la struttura ed alcune proprietà chimiche di molecole.

In generale, uno spettrometro di massa è costituito da diversi componenti che svolgono le varie funzioni richieste (Figura 31).

Il campione, che può essere sotto forma solida, liquida o gassosa, viene introdotto in una camera sotto vuoto e ionizzato nella camera di ionizzazione. Gli ioni, che sono in fase gassosa, sono smistati nell'analizzatore di massa secondo il valore del rapporto massa/carica ( $m/z$ ) e poi sono raccolti da un rivelatore dove generano un segnale elettrico proporzionale al numero degli ioni presenti. Il sistema di raccolta dei dati registra questi segnali elettrici e li converte in uno spettro di massa. Affinché tutto questo avvenga in modo efficiente, generalmente il campione deve essere in forma gassosa nelle condizioni di vuoto spinto. Il risultante spettro di massa è un grafico che rappresenta in ordinata l'abbondanza degli ioni e in ascissa i valori  $m/z$ . L'introduzione del campione nella camera di ionizzazione può avvenire con diverse modalità. Nel caso in cui il campione è costituito da un solo componente, viene introdotto direttamente nella camera sotto vuoto attraverso opportuni sistemi di entrata. Nel caso di miscele, la separazione dei singoli componenti avviene in apparati (di solito cromatografici) che sono collegati direttamente allo spettrometro di massa. Di conseguenza, una volta separati, i vari componenti entrano direttamente nella camera di ionizzazione. Il grosso vantaggio è che le miscele sono separate e analizzate sequenzialmente. Esistono diversi sistemi di ionizzazione, inoltre l'analizzatore di massa può essere predisposto allo smistamento degli ioni positivi o negativi.

Nella ionizzazione per impatto elettronico (EI), la molecola in esame viene fatta collidere con un fascio di elettroni ad alta energia che la frammentano. La ionizzazione chimica (CI) è un processo relativamente più delicato rispetto alla ionizzazione per impatto elettronico e consiste nel trasferire protoni da un gas reagente ionizzato alla molecola in esame. La sequenza di eventi che si verifica nella camera di ionizzazione è la seguente [Reynhold, 1987]:

- 1) ionizzazione EI delle molecole di gas, mantenuto vicino alla pressione atmosferica, che porta alla formazione di ioni primari;
- 2) reazioni ione-molecola degli ioni primari così formati con il gas di reazione per produrre "ioni reagenti";

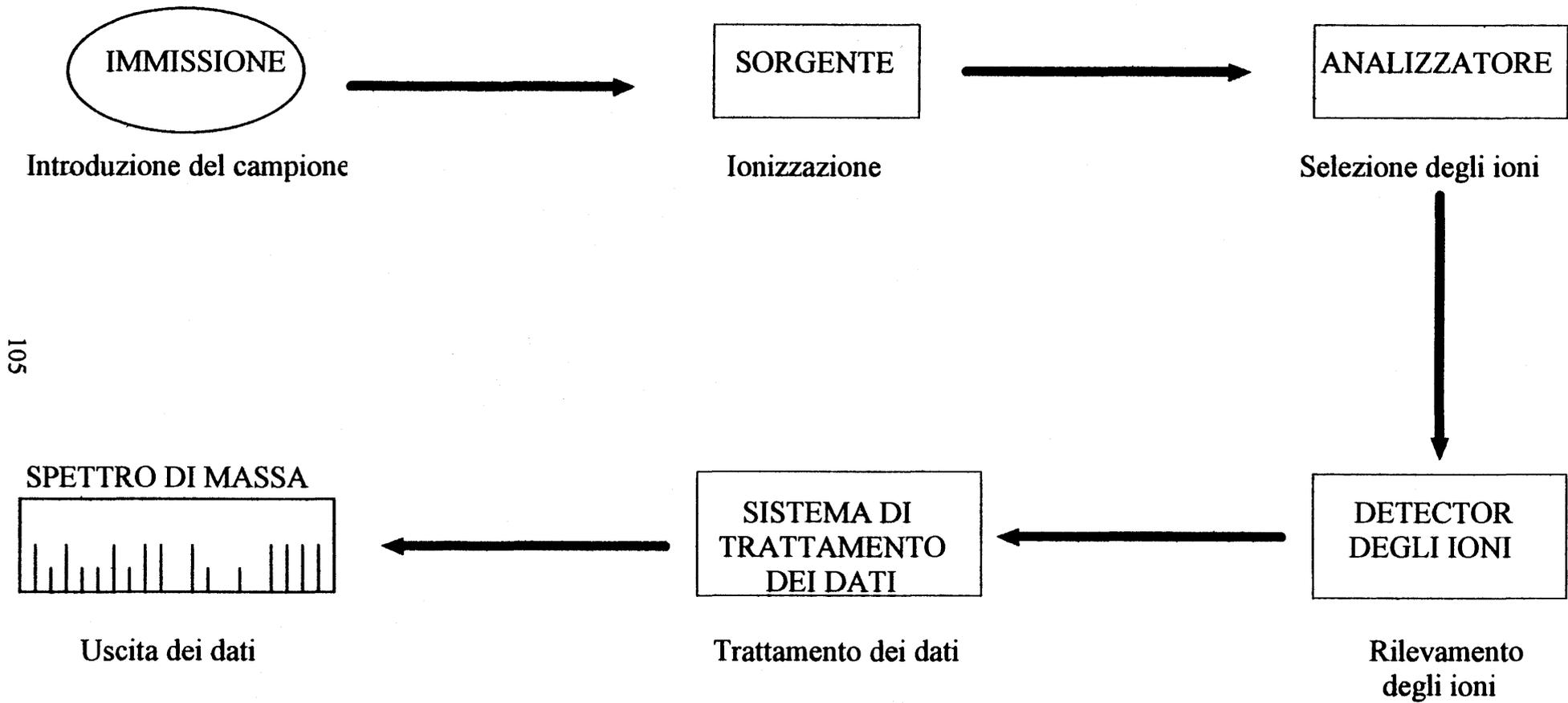


Figura 31: Schematizzazione delle parti costituenti uno spettrometro di massa

3) gli "ioni reagenti" reagiscono con la molecola in esame per dare lo spettro di massa del campione.

Questi eventi avvengono simultaneamente e continuamente nella camera di ionizzazione e il risultato è la formazione di molecole protonate. Un'importante modificazione della tecnica CI-MS è la possibilità di mettere il campione da analizzare su una sonda e di introdurlo direttamente nella camera di ionizzazione [Reynhold, 1987]. In pratica il campione viene posto su un filo metallico (emettitore) che viene inserito direttamente nella camera di ionizzazione. Il campione viene "distillato" riscaldando il filo metallico con una corrente programmata. Le caratteristiche e le limitazioni di questa tecnica sono collegate al processo di evaporazione del campione. Un altro sistema di ionizzazione, infine, è quello che si ottiene tramite bombardamento con atomi accelerati (FAB).

#### **4.2.1 Spettrometria di massa "Fast Atom Bombardment" (FAB-MS)**

FAB-MS è una tecnica molto utilizzata nell'analisi strutturale perché è in grado di determinare il peso molecolare della molecola in esame. Questa metodica è complementare ad altre tecniche (ad esempio alla gascromatografia), poiché da sola non consente la completa determinazione strutturale di una molecola.

FAB-MS differisce dalle tecniche più tradizionali di impatto elettronico e ionizzazione chimica, perché il campione viene ionizzato direttamente dalla matrice in cui è sciolto per bombardamento con ioni o atomi accelerati. Nella Figura 32 viene riportato uno schema della camera di ionizzazione FAB.

Nell'esperimento FAB-MS un fascio accelerato di atomi va a colpire il bersaglio metallico su cui è stato precedentemente caricato un liquido viscoso (matrice) contenente il campione. Quando il fascio di atomi colpisce la matrice, viene trasferita energia cinetica alla superficie molecolare e molte molecole sono "spruzzate" dalla matrice nella camera di ionizzazione sotto vuoto. Durante questo processo viene ionizzato un numero significativo di molecole, quindi sono generati ioni in fase gassosa senza volatilizzare previamente il campione.

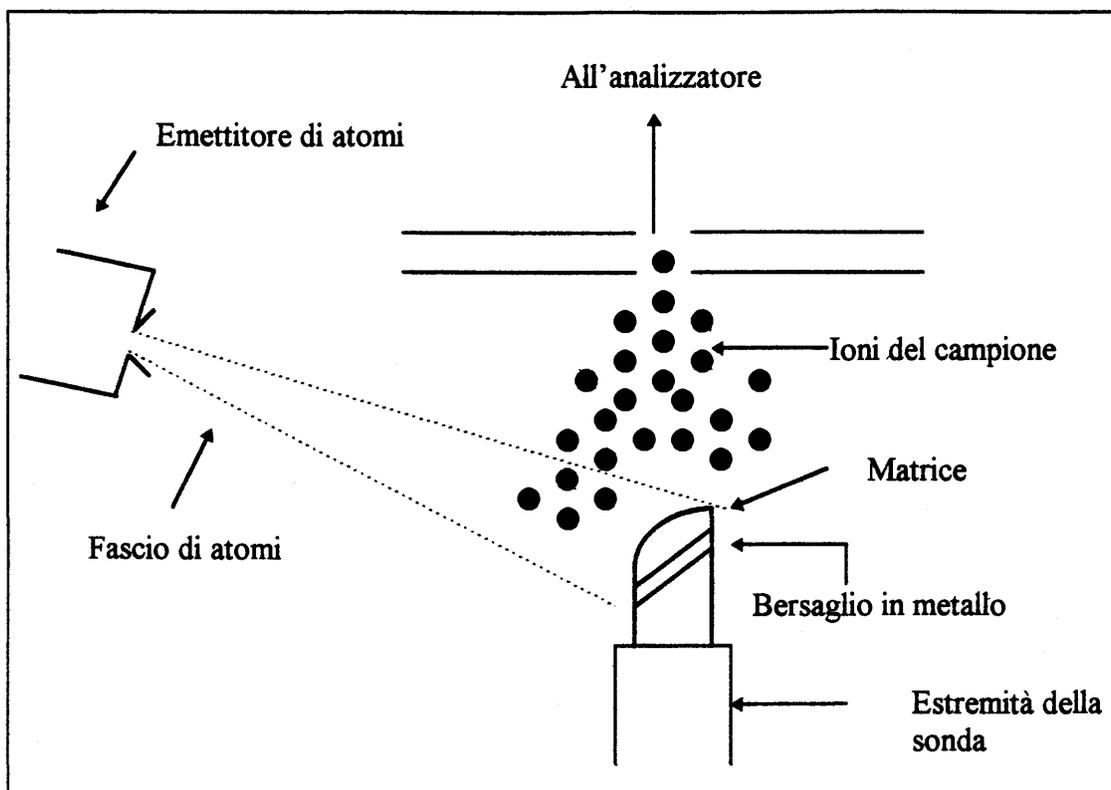


Figura 32: Rappresentazione schematica di una camera di ionizzazione FAB.

Gli spettri FAB sono caratterizzati da:

- a) ioni pseudomolecolari (ad esempio  $(M+H)^+$ ) abbondanti sia per il campione che per la matrice;
- b) un livello relativamente alto di rumore di fondo che fornisce segnali per ogni valore  $m/z$  fino allo ione pseudomolecolare. Questi ioni derivano sia dalla matrice che dal campione e permettono la conta manuale degli spettri fino a circa  $m/z = 4000$ ;
- c) gruppi di ioni ("cluster ions") che derivano di solito dalla matrice;
- d) frammenti ionici.

Gli ioni pseudomolecolari non si presentano come picchi singoli, ma piuttosto come gruppi di segnali. Ciò è dovuto in parte alla presenza dell'isotopo  $^{13}\text{C}$ , la cui abbondanza in natura è dell'1.1%, ed in parte a reazioni di ossidazione e riduzione che avvengono nella matrice durante l'esperimento FAB. Gli ioni pseudomolecolari più comunemente osservati sono:  $(M+H)^+$ ,  $(M+\text{NH}_4)^+$ ,  $(M+\text{Na})^+$  e  $(M+\text{K})^+$  con masse che corrispondono rispettivamente a  $M+1$ ,  $M+18$ ,  $M+23$  e  $M+39$  nel caso di ioni positivi e  $(M-H)^-$  e  $(M+\text{Cl})^-$  con masse  $M-1$  e  $M+35$  e  $M+37$  nel caso di ioni negativi. Il

dato peso molecolare che si ottiene fornisce informazioni sulla composizione delle molecole.

### 4.3 Analisi termogravimetrica

La termogravimetria è una tecnica usata per studiare le variazioni di peso di un materiale riscaldato con un incremento costante di temperatura. Durante il riscaldamento si può verificare una perdita di peso, se il campione si decompone in prodotti volatili, oppure un acquisto di peso, se il campione interagisce con il gas presente nella fornace.

Le curve termogravimetriche (curve TG) sono grafici che riportano la variazione di peso del campione in funzione della temperatura (o del tempo). Un'ipotetica curva TG presenta quattro stadi di perdita di peso, alcuni ben evidenti, altri meno, poiché le variazioni di peso si verificano in campi di temperature molto vicini: si distinguono la  $T_i$  (inizio decomposizione), la  $T_p$  (flesso verticale) e la  $T_f$  (fine perdita). La curva DTG riporta invece la derivata prima della perdita di peso in funzione della temperatura, che presenta un minimo per ogni  $T_p$ . Queste curve permettono un'immediata valutazione della cinetica del processo di perdita di peso.

Lo strumento utilizzato per eseguire la termogravimetria è indicato con il termine di "termobilancia". Una termobilancia è costituita da un forno, un programmatore di temperatura, una bilancia analitica e un registratore dei dati (*plotter*) [Wendlant & Gallagher, 1981; Dodd & Tonge, 1987]. Negli strumenti prodotti attualmente, la raccolta dei dati, la loro elaborazione e presentazione sono affidati ad un sistema di elaborazione elettronica, di solito dedicato, attraverso il quale in genere si controllano anche le condizioni operative della termobilancia. Il campione, introdotto nel forno, viene riscaldato con un programma termico impostato sul programmatore, mentre la bilancia analitica misura le variazioni di peso del campione. La temperatura, a sua volta, viene misurata con una termocoppia. Sia le variazioni di peso, sia i valori della temperatura infine, sono inviati ad un sistema elettronico collegato con il *plotter*, che registra il grafico termogravimetrico (T in funzione della % in peso).

Le misure TG possono essere influenzate da due tipi di fattori [Still, 1977]:

1. fattori connessi con lo strumento impiegato:

- a) atmosfera del forno;
- b) geometria e natura del portacampione;
- c) velocità di riscaldamento;

## 2. fattori connessi con le caratteristiche del campione:

- a) quantità di sostanza esaminata;
- b) stato di aggregazione e cristallinità della sostanza esaminata;
- c) capacità termica dei campioni esaminati.

L'atmosfera gassosa che circonda il campione può influire sulla temperatura di inizio decomposizione, la quale è tanto maggiore quanto maggiore è la pressione parziale del gas che si libera dal materiale riscaldato. La velocità di diffusione del gas eliminato dipende dalla geometria del portacampione; la forma di quest'ultimo infatti, può essere diversa a seconda della velocità che si vuole ottenere, e può determinare una perdita di peso più o meno lenta. Natura e forma del portacampione condizionano altresì il riscaldamento del sistema poiché, appena questo comincia, si genera un gradiente di temperatura tra le pareti del portacampione e il centro della massa del campione, che dipende dalla conducibilità termica della sostanza in esame e dalla distanza centro-pareti.

Il portacampione è costituito da materiali metallici inerti (Pt, Au, Ag, Ni) o da materiali refrattari ceramici ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , SiC) che, a causa della loro differente conducibilità termica, possono determinare uno spostamento delle  $T_i$  e  $T_f$ .

La temperatura di inizio decomposizione dipende dalla velocità di riscaldamento: minore è questa, minore è la  $T_i$  registrata, proprio in virtù del gradiente di temperatura che si crea tra le pareti e il centro del campione, il quale è tanto maggiore, quanto più alta è la velocità di riscaldamento: è consigliabile quindi usare una bassa velocità di riscaldamento ( $2-5^\circ\text{C}/\text{min}$ ).

Per quanto riguarda i fattori connessi con le caratteristiche del campione, maggiore è la quantità di sostanza esaminata, maggiore sarà la  $T_f$ , a causa del rallentamento dovuto alla diffusione termica all'interno del campione e alla diffusione della maggiore quantità di gas svolto dallo stesso. La fine suddivisione del campione permette una cinetica di distribuzione più rapida e completa, anche a causa del miglior contatto termico.

Alcune applicazioni della termogravimetria sono:

- a) decomposizione termica di sostanze inorganiche, organiche e polimeriche;
- b) determinazione del contenuto di umidità, gas e ceneri;
- c) studi di disidratazione e igroscopicità;
- d) degradazione termica ossidativa di sostanze polimeriche;
- e) studi sulle cinetiche di reazione;

f) curve di assorbimento e deassorbimento.

#### 4.4 Diffrazione di raggi-X

La diffrazione di raggi-X è la tecnica più potente, attualmente disponibile, per studiare la struttura di grandi molecole. In molti casi, gli studi di diffrazione di raggi-X sui cristalli di proteine o acidi nucleici hanno portato all'identificazione della struttura terziaria completa ad un livello di risoluzione di 3 Å o più, dando un contributo fondamentale alle correlazioni tra la struttura molecolare e le proprietà chimiche e fisiche delle sostanze.

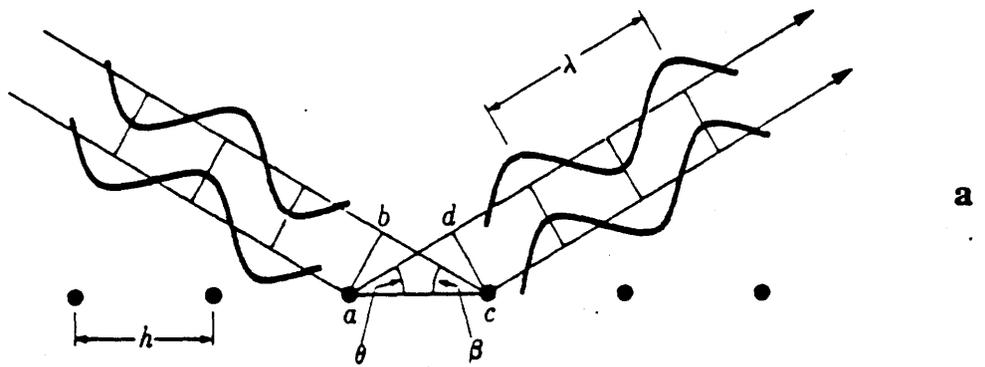
I raggi-X sono fotoni con lunghezze d'onda comprese nell'intervallo 0.1-100 Å. Essi generalmente vengono ottenuti bombardando un bersaglio con elettroni di energia pari a 10'000 eV o più. Dopo la collisione, questi elettroni ad alta energia possono allontanare gli elettroni dagli atomi bersaglio, lasciando vacanze negli strati elettronici. Se, per esempio, viene prodotta una vacanza nello strato più interno di un atomo (K), esso sarà rapidamente riempito da un elettrone discendente dallo strato successivo (L), o da quello successivo (M). I fotoni emessi come risultato di queste transizioni sono chiamati, rispettivamente, raggi-X  $K_{\alpha}$  e  $K_{\beta}$ . Le loro lunghezze d'onda sono:

$$\lambda_{K\alpha} = hc/(E_L - E_K) \quad \text{e} \quad \lambda_{K\beta} = hc/(E_M - E_K)$$

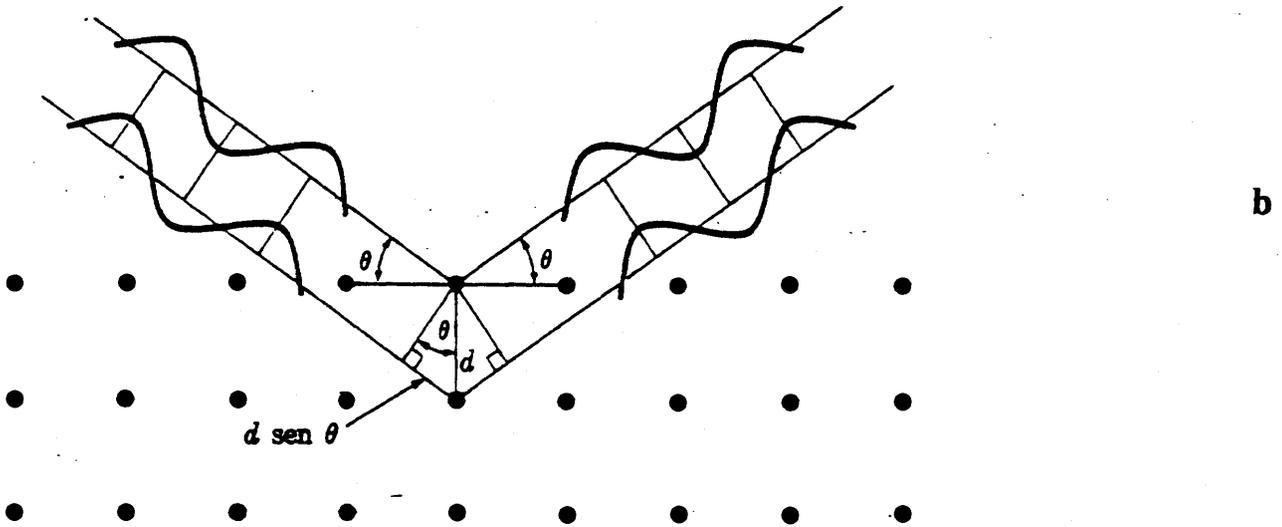
dove  $h$  è la costante di Planck,  $c$  è la velocità della luce ed  $E$  si riferisce all'energia di uno strato particolare (K, L o M). I tipici raggi-X usati nelle determinazioni strutturali sono le radiazioni  $K_{\alpha}$  del Cu ( $\lambda = 1.54$  Å) e le radiazioni  $K_{\alpha}$  del Mo ( $\lambda = 0.71$  Å) [Cantor & Schimmel, 1980].

Gli spettri di diffrazione sono prodotti ogni qualvolta la luce passa attraverso, o è riflessa da, una struttura periodica che ha un motivo ripetuto regolarmente. Un reticolo cristallino è una struttura periodica tridimensionale in cui la distanza ripetuta è all'incirca  $10^{-8}$  cm, la distanza tra gli atomi. Gli spettri di diffrazione sono prodotti quando raggi-X di lunghezza d'onda di circa  $10^{-8}$  cm passano attraverso i cristalli [Cantor & Schimmel, 1980].

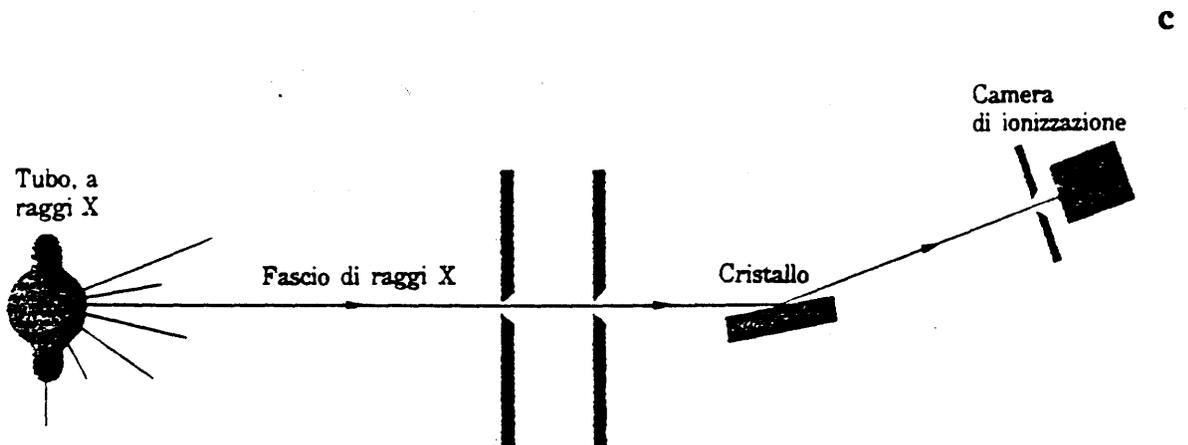
Quando i raggi-X di lunghezza d'onda  $\lambda$  incontrano un piano di atomi, come mostrato in Figura 33a, e sono diffratti di un angolo  $\beta$ , le onde diffratte produrranno un massimo di intensità sul *detector* se la differenza di cammino di raggi adiacenti è un numero intero di lunghezza d'onda. Se tale condizione è verificata, le onde giungeranno in fase sul *detector*. Dalla Figura 33a si vede



Diffrazione causata da una fila di atomi equidistanti.



Diffrazione da parte di piani successivi di atomi. Le onde diffratte sono in fase se  $n \lambda = 2 d \sin \theta$ .



Rappresentazione schematica dell'apparecchiatura usata da Bragg per la diffrazione dei raggi X.

Figura 33

che la differenza tra i cammini percorsi da raggi adiacenti è  $(ad-bc)$ , e tale differenza deve essere uguale a  $m\lambda$ , dove  $m$  è un numero intero. Si ha così:

$$ad - bc = m\lambda, \quad m = 0, 1, 2, \dots,$$

$$h(\cos\vartheta - \cos\beta) = m\lambda.$$

Quando  $m = 0$ , si ha  $\beta = \vartheta$ . Pertanto, quando l'angolo del raggio incidente è uguale all'angolo del raggio diffratto, si osserva un massimo d'intensità sul *detector*. A causa della ripetizione periodica regolare dei siti reticolari, un piano di "atomi" rifletterà, almeno in parte, un fascio di raggi-X così come uno specchio riflette la luce ordinaria.

Tuttavia, poiché un piano singolo di atomi riflette solo una frazione dell'intensità incidente dei raggi-X, deve essere verificata un'altra condizione perché possa essere osservato uno spettro di diffrazione di intensità apprezzabile. Le onde riflesse da piani di atomi paralleli successivi devono raggiungere il *detector* in fase così da produrre dei massimi di intensità. La Figura 33b illustra come può essere ottenuta la condizione di massima intensità per i raggi diffratti. Perché si verifichi quanto detto, le differenze tra le distanze percorse devono essere uguali a un numero intero di lunghezze d'onda,  $n\lambda$ , dove  $n$  è un intero. Dalla Figura 33b si trova che la differenza tra i cammini delle due onde è  $2d \sin\vartheta$ , ove  $d$  è la distanza tra i piani. Si ha dunque:

$$n\lambda = 2d \sin\vartheta, \quad n = 1, 2, 3, \dots,$$

come condizione che deve essere soddisfatta perché si abbia un massimo nelle intensità diffratte [Cantor & Schimmel, 1980].

L'equazione appena descritta è detta "equazione di diffrazione di Bragg", da W.L. Bragg, che per primo derivò l'equazione e la usò per analizzare la struttura dei cristalli. L'equazione di Bragg ha due importanti applicazioni. Se è nota la distanza ( $d$ ) tra i piani del reticolo cristallino si può calcolare la lunghezza d'onda dei raggi-X dalla misura dell'angolo di diffrazione  $\vartheta$ . Questa procedura fu usata da Moseley per determinare le lunghezze d'onda caratteristiche dei raggi-X emessi da ciascuno degli elementi nei suoi studi che portarono alla determinazione dei numeri atomici. Alternativamente, se la lunghezza d'onda dei raggi-X è nota, si può calcolare la distanza interplanare

dalla misura dell'angolo di diffrazione  $\vartheta$ . In questo modo può essere ottenuta una descrizione completa della struttura del reticolo di un cristallo.

È da notare che il fattore più importante che compare nell'equazione di Bragg è la spaziatura regolare dei piani reticolari. Si è visto che la ragione per cui un piano di atomi riflette i raggi-X più efficientemente quando l'angolo del raggio incidente è uguale a quello del raggio riflesso, è una conseguenza diretta della spaziatura regolare degli atomi nel piano. La derivazione dell'equazione di Bragg mostra che il fatto che le riflessioni da piani paralleli del reticolo cristallino si rinforzano a vicenda, è una conseguenza della spaziatura regolare interplanare. Se l'arrangiamento degli atomi nei piani o la spaziatura tra piani paralleli diventa irregolare, come nel caso di liquidi o solidi amorfi, non si osservano spettri di diffrazione dei raggi-X ben definiti [Cantor & Schimmel, 1980].

Il tipo più semplice di strumento per osservare la diffrazione dei raggi-X è mostrato in Figura 33c. I raggi-X di una lunghezza d'onda singola impattano su una piattaforma rotante. La radiazione diffratta è messa in evidenza attraverso la ionizzazione che essa produce nella camera di ionizzazione. Quando il cristallo è posto ad un angolo arbitrario rispetto alla radiazione incidente, solo una piccola frazione della radiazione incidente raggiunge il *detector*, poiché è probabile che secondo tale angolazione non esista un piano del reticolo cristallino che soddisfi l'equazione di Bragg dando un massimo di intensità diffratta. Tuttavia, man mano che il cristallo è ruotato, può avvenire che alcuni piani reticolari siano ad un angolo  $\vartheta$  che soddisfi l'equazione di Bragg e un segnale abbastanza forte appare sul *detector*. Man mano che il cristallo è ruotato, il segnale scompare, ma dopo una rotazione di un angolo  $\vartheta$  può apparire un nuovo segnale diffratto quando un nuovo insieme di piani reticolari soddisfa l'equazione di Bragg. Come è mostrato in Figura 33b per un reticolo bidimensionale, esistono molti insiemi di piani paralleli in un reticolo, e così la radiazione diffratta è osservata per molti angoli. Tuttavia, solo i piani reticolari che contengono un gran numero di atomi riflettono apprezzabilmente i raggi-X, così, in pratica, è osservata solo la diffrazione generata dai piani reticolari più importanti [Alexander, 1969; Cantor & Schimmel, 1980].

La misura degli angoli di diffrazione e l'uso dell'equazione di Bragg porta alla determinazione delle distanze interplanari di un reticolo cristallino. Si è appena assunto che i piani reticolari sono costituiti da punti identici privi di struttura, la cui unica caratteristica è l'abilità a diffrangere i raggi-X. In realtà, le unità poste nei siti reticolari possono essere atomi singoli o più

probabilmente molecole o gruppi di molecole di struttura piuttosto complessa. Sono gli elettroni di queste molecole che sono responsabili della diffrazione, quindi l'intensità dello spettro di diffrazione dipende dal numero e dalla distribuzione degli elettroni nei siti reticolari. La distribuzione elettronica è, naturalmente, determinata dalla struttura delle molecole che occupano i siti reticolari. Pertanto, studiando non solo gli angoli di diffrazione dei raggi-X, ma anche l'intensità della radiazione diffratta, è possibile determinare la struttura delle unità che sono nei siti reticolari. Nelle applicazioni più eleganti di tale tecnica è possibile ottenere mappe di contorno di densità elettronica di molecole molto complesse [Cantor & Schimmel, 1980].

Si è visto che le distanze interplanari dei reticoli cristallini determinano gli angoli di massima diffrazione dei raggi-X. Queste distanze interplanari sono una caratteristica intima dei cristalli, poiché esse sono definite dalla grandezza e dall'organizzazione degli atomi. Ciascun composto cristallino ha una caratteristica spaziatura interplanare e pertanto anche angoli caratteristici di diffrazione dei raggi X che, così come un'impronta digitale, possono essere usati per identificare una sostanza [Cantor & Schimmel, 1980].

Si è messo in evidenza che la proprietà microscopica che produce spettri di diffrazione ben netti è la struttura ordinata ripetuta regolarmente. I solidi cristallini che mostrano questi fenomeni di diffrazione ben netti sono descritti in termini di reticoli, o organizzazione tridimensionale di punti, che mostrano una ripetitività regolare. Il reticolo è caratterizzato dalla distanza tra punti successivi lungo ciascuno degli assi nelle tre dimensioni dello spazio ( $a, b, c$ ) e dagli angoli tra questi assi ( $\alpha, \beta, \gamma$ ). Il reticolo di punti può anche essere discusso in termini di una semplice organizzazione fondamentale di punti detta "cella unitaria". Questa cella è la più piccola unità che, quando ripetuta nelle tre dimensioni, genererà l'intero cristallo. Un cristallo può, quindi, essere immaginato come un insieme di celle unitarie, con le celle adiacenti che hanno in comune facce, spigoli e vertici. In un cristallo naturale i siti reticolari possono essere occupati da atomi o, come frequentemente accade, da raggruppamenti complessi di atomi, quindi la cella unitaria può avere una struttura interna anche molto complessa. Poiché anche nelle strutture molecolari più complesse la cella unitaria è l'unità base che si ripete nel cristallo, le dimensioni della cella unitaria possono essere ottenute dagli spettri di diffrazione dei raggi-X usando la relazione di Bragg. La struttura reale all'interno della cella unitaria è più difficile da ottenere ed è determinata

mediante misure di intensità delle macchie negli spettri di diffrazione [Cantor & Schimmel, 1980].

#### 4.5 Spettroscopia ad assorbimento infrarosso (IR)

La regione infrarossa dello spettro va da  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $625\text{ cm}^{-1}$ . Ai due lati vi sono le regioni note come infrarosso vicino (da  $12500$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$ ) e infrarosso lontano (da  $650$  a  $50\text{ cm}^{-1}$ ), riferendosi alla posizione occupata rispetto alla regione del visibile.

Tutti i vari processi di eccitazione delle molecole sono quantizzati; cioè, gli stati eccitati sono separati dagli stati fondamentali da quantità di energia specifiche e ben definite. Pertanto, una molecola non è libera di assorbire tutte le frequenze dello spettro della radiazione elettromagnetica. Essa può assorbire soltanto quelle frequenze che corrispondono all'energia richiesta per l'eccitazione da un livello energetico ad uno ad energia più elevata, tale energia è:

$$\Delta E = h\nu = hc/\lambda$$

dove  $h$  = costante di Planck;

$\nu$  = frequenza della radiazione assorbita (Hz);

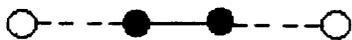
$c$  = velocità della luce ( $3.0 \times 10^{10}\text{ cm/sec}$ );

$\lambda$  = lunghezza d'onda della radiazione assorbita (cm).

A sua volta ciò consente di assegnare frequenze specifiche di assorbimento ad eccitazioni specifiche.

Ciascuna delle zone principali dello spettro elettromagnetico provoca almeno un tipo specifico di eccitazione di una molecola. Per esempio, l'assorbimento di radiazione ultravioletta provoca l'eccitazione degli elettroni dallo stato elettronico fondamentale ad uno stato elettronico eccitato. L'assorbimento di radiazione infrarossa produce uno "stiramento" (*stretching*) di legame o un "piegamento" (*bending*) dell'angolo di legame. Il legame specifico sottoposto a stiramento, o l'angolo specifico sottoposto a piegamento, dipendono dalla frequenza della radiazione che viene assorbita.

Un movimento vibrazionale di *stretching* corrisponde ad una variazione (positiva o negativa) nella distanza di legame fra atomi legati lungo l'asse internucleare. Un movimento vibrazionale di *bending* è caratterizzato dallo spostamento degli atomi dall'asse internucleare.



Stiramento di legame (stretching)



Piegamento o deformazione dell'angolo di legame (bending)

Stirando un legame, aumenta la distanza fra i due nuclei interessati al legame stesso. L'energia del sistema è funzione della distanza fra i nuclei ed aumenta quando quest'ultima si allontana dalla distanza di legame di equilibrio fra i nuclei. All'aumentare dell'energia del sistema il legame può esistere in vari stati vibrazionali eccitati ( $\nu_1, \nu_2, \nu_3$ ). Lo stato vibrazionale fondamentale è  $\nu_0$ : la maggior parte delle molecole a temperatura ambiente si trova nel livello  $\nu_0$ . Dato che l'assorbimento di energia dovrebbe eccitare un legame al livello energetico superiore più vicino, la maggior parte delle eccitazioni consiste nel passaggio da  $\nu_0$  a  $\nu_1$ . Affinché una molecola venga eccitata dal livello  $\nu_0$  al livello  $\nu_1$ , la differenza di energia fra  $\nu_0$  e  $\nu_1$  deve essere fornita dall'assorbimento di radiazione avente esattamente l'energia  $\Delta E = h\nu_1 - h\nu_0$ . Quindi, la frequenza della radiazione che deve essere assorbita, in modo che la molecola possa andare da  $\nu_0$  a  $\nu_1$ , è data da  $\nu = \Delta E/h$ . La vibrazione corrispondente alla transizione  $\nu_0 \rightarrow \nu_1$  è chiamata "vibrazione fondamentale" del legame. Gli assorbimenti corrispondenti alle eccitazioni di energia più elevata (ad esempio,  $\nu_0 \rightarrow \nu_2$ ) sono chiamati "armoniche superiori", e risultano sempre più deboli dei corrispondenti assorbimenti fondamentali. Una banda di armoniche superiori si verifica ad una frequenza che è multiplo di quella fondamentale. Per esempio, l'assorbimento fondamentale del gruppo carbonilico si verifica attorno a  $1715 \text{ cm}^{-1}$ . La sua prima armonica superiore, invece, si ha attorno a  $3430 \text{ cm}^{-1}$ .

L'intensità (cioè l'area dentro la "curva") di un particolare assorbimento fondamentale dipende dalla differenza fra i momenti di dipolo della molecola nello stato fondamentale e nello stato vibrazionale eccitato. Maggiore è la differenza fra questi momenti dipolari, più intenso è l'assorbimento. Se non è accompagnata da alcun cambiamento di momento di dipolo, la vibrazione è "inattiva all'infrarosso" e non genera una banda nello spettro IR.

Il movimento vibrazionale di stiramento del legame  $\text{C}=\text{C}$  dell'etilene è un esempio di vibrazione inattiva all'infrarosso. La variazione netta di momento di dipolo è zero perché la molecola, nel legame in questione, ha un centro di

simmetria. I legami con stati fondamentali ad elevata polarità (ad esempio C=O e S<sup>+</sup>-O<sup>-</sup>) mostrano degli assorbimenti infrarossi particolarmente forti.

La regione al di sotto di circa 1500 cm<sup>-1</sup> di solito è molto complessa, dato che gli assorbimenti dovuti ai movimenti vibrazionali di piegamento si hanno appunto al di sotto di tale valore. (Le vibrazioni di stiramento cadono a valori inferiori a 4000 cm<sup>-1</sup>). Mentre in questa regione le specifiche assegnazioni vibrazionali risultano difficili, l'andamento generale nella regione al di sotto di 1400 cm<sup>-1</sup> è tipico di un dato composto. Per questo motivo detta regione è chiamata regione delle "impronte digitali".

Nell'ambito di un gruppo funzionale i legami interagiscono l'un l'altro in modo particolarmente costante. Per questo motivo è possibile assegnare le frequenze di gruppo nei vari casi. Tali frequenze sono relativamente insensibili al tipo di scheletro di atomi di carbonio che porta il gruppo stesso. Di conseguenza, l'uso principale della spettroscopia infrarossa è quello di determinare la natura dei gruppi funzionali presenti nella molecola [Quinlan & De Sesa, 1955; Pasto & Johnson, 1969; Conley, 1972; Nakanishi & Solomon, 1977].

Per le analisi di spettroscopia nell'infrarosso in genere si utilizza uno spettrofotometro infrarosso a doppio raggio. In uno strumento di questo tipo, un raggio di luce passa attraverso il comparto contenente il campione, mentre un altro passa attraverso il comparto contenente un riferimento. Ciò consente la determinazione di spettri per differenza (cioè la differenza fra le proprietà caratteristiche dei due materiali). Se si determina lo spettro del campione puro, quest'ultimo viene confrontato con l'aria. Se il campione è in soluzione, il riferimento è costituito dal solvente puro.

I principali componenti di un tipico strumento IR sono: la sorgente della radiazione, i compartimenti del campione e del riferimento, il monocromatore (o un prisma, o una grata, o entrambi), l'attenuatore del raggio di riferimento, il rivelatore di radiazione, ed il registratore.

1. Una sorgente (molto spesso un semplice resistore, scaldato fino all'incandescenza) emette una radiazione che viene suddivisa in due raggi e fatta passare attraverso i compartimenti del campione e del riferimento. Ciò assicura che in questi settori entrino dei raggi identici.
2. La radiazione passa attraverso il campione ed il riferimento, ed alcune frequenze vengono assorbite più fortemente dal primo che dal secondo.
3. Il monocromatore riceve un raggio di luce che si alterna rapidamente, prima dalla cella del campione e quindi dal riferimento, e così via. Il

monocromatore passa in rassegna lentamente l'intervallo delle lunghezze d'onda.

4. A ciascuna lunghezza d'onda a cui il campione assorbe più del riferimento la differenza viene sentita dal rivelatore (ad esempio un termistore). Questo risponde generando una piccola corrente che, dopo essere stata amplificata, guida l'attenuatore dentro il raggio di riferimento per rendere identiche le intensità di entrambi i raggi ("metodo di zero ottico").

5. Il pennino del registratore si muove esattamente come l'attenuatore, attraverso delle connessioni meccaniche con il meccanismo di guida di quest'ultimo, o mediante collegamenti elettrici con lo stesso segnale amplificato che arriva dal rivelatore. La carta del registratore si sposta in sincronia con il monocromatore, ad angolo retto con il movimento del pennino in modo che una distanza standard lungo la lunghezza della carta stessa corrisponda ad un appropriato intervallo di frequenza.

#### 4.6 Spettroscopia ad assorbimento atomico

Gli spettri elettronici di assorbimento derivano dall'assorbimento di radiazioni ultraviolette (UV) e visibili (Vis), che è accompagnata dall'eccitazione di un elettrone di valenza da un dato livello ad uno di energia più elevata. Il tipo di spettroscopia che ne risulta è chiamato spettroscopia UV-Vis o semplicemente UV [Jaffé & Orchin, 1962; Pasto & Johnson, 1969; Silverstein et al., 1974; Pavia et al., 1979].

Del vasto panorama della radiazione elettromagnetica l'uomo può solo apprezzare la parte visibile, con lunghezze d'onda comprese fra 400 e 800 nm. La regione ultravioletta va da 1 nm a 400 nm, ma, poiché al di sotto di 200 nm assorbono i componenti dell'atmosfera, rendendo impossibili le misure, la regione da 200 a 400 nm è la parte dello spettro normalmente coperta dal termine ultravioletto (chiamato più correttamente "ultravioletto vicino"). La regione da 1 nm a 200 nm può essere studiata solo in sistemi in cui sia stato fatto il vuoto, ed è chiamata "ultravioletto nel vuoto".

L'eccitazione elettronica può promuovere elettroni di legami  $\sigma$ , legami  $\pi$ , o di non-legame (indicati con l'abbreviazione n) a vari orbitali antileganti. A tali transizioni appartengono quelle che, andando dallo stato fondamentale allo stato eccitato, possono essere indicate con:  $n \rightarrow \pi^*$ ,  $\pi \rightarrow \pi^*$ , e  $n \rightarrow \sigma^*$ . Una transizione  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  richiede più energia di tutte le altre, e si verifica nella regione a bassa lunghezza d'onda dell'ultravioletto nel vuoto.

Una volta eccitata elettronicamente, la molecola può perdere l'eccesso di energia attraverso uno dei cammini elencati sotto. Quello che viene seguito dipende (a) dalla molecola specifica che si sta studiando e (b) dal tipo di transizione provocato dall'assorbimento iniziale.

1. Rottura di legame: di solito porta ad una reazione chimica di tipo irreversibile.
2. Emissione: viene riemessa la stessa frequenza che era stata assorbita.
3. Fluorescenza: dopo l'eccitazione viene emessa una radiazione di lunghezza d'onda superiore a quella che ha provocato l'eccitazione stessa. La fluorescenza avviene rapidamente, spesso meno di  $10^{-6}$  secondi dopo l'assorbimento.
4. Fosforescenza: dopo l'eccitazione viene emessa una radiazione di lunghezza d'onda superiore a quella che ha provocato l'eccitazione stessa. L'emissione può continuare per varie ore.
5. Processi non-radiativi: alcune molecole perdono l'energia, che guadagnano quando assorbono la luce ultravioletta, mediante processi non-radiativi.

Gli spettri ultravioletti normalmente sono ottenuti usando una soluzione del campione (in un solvente che non assorbe) tenuta in cellette che possiedono delle pareti trasparenti all'UV (ad esempio quarzo). Gli spettri normalmente si ottengono mediante uno strumento a doppio raggio, usando il solvente puro come riferimento.

La quantità della radiazione assorbita è direttamente proporzionale al numero di molecole incontrate dalla luce lungo il cammino e, pertanto, aumenterà all'aumentare della concentrazione e/o dello spessore del campione (cioè della lunghezza della cella).

Ad una qualsiasi lunghezza d'onda, l'intensità della luce che entra nella soluzione ( $I_0$ ) può essere correlata con l'intensità della luce che lascia la soluzione ( $I$ ) per mezzo della Legge di Beer-Bouguer-Lambert (chiamata anche Legge di Lambert-Beer):

$$\log (I_0/I) = abc$$

dove  $a$  = assorbitività, una costante dipendente da  $\lambda$ , ma indipendente dalla concentrazione;

$b$  = lunghezza della cella;

$c$  = concentrazione.

Quando  $c$  è espressa in moli/litro di soluzione e  $b$  in cm,  $a$  diventa l'assorbitività molare,  $\varepsilon$ . Nella letteratura meno recente  $\varepsilon$  veniva chiamata coefficiente di estinzione molare. Anche se  $\varepsilon$  ha delle dimensioni, queste non vengono di solito indicate. La quantità di radiazione assorbita da un soluzione può essere riportata come assorbanza,  $A$  (nella letteratura più vecchia chiamata "densità ottica"), o come trasmittanza,  $T$ . Queste quantità sono definite nei modi che seguono:

$$A = \log(I_0 / I)$$

ovvero:

$$T = I / I_0$$

$$A = -\log T$$

Se il peso molecolare del campione non è noto o se questo è costituito da una miscela, al posto di  $\varepsilon$  viene usata  $E_{1cm}^{1\%}$ , l'assorbitività di 1 cm di una soluzione contenente 1 g di soluto per 100 ml di soluzione.

Uno spettrofotometro risulta essenzialmente composto dalle seguenti parti:

1. Sorgente di energia raggiante, la cui funzione è quella di fornire uno spettro continuo di radiazioni.
2. Monocromatore, che permette di selezionare la lunghezza d'onda più opportuna per l'analisi.
3. Celle contenenti le soluzioni in esame e quelle di riferimento.
4. Dispositivi fotosensibili, atti a fornire una misura oggettiva della luce ricevuta.

Poiché il campo abbracciato dalla maggior parte degli spettrofotometri per visibile ed ultravioletto è molto vasto (si estende come già detto da circa 200 nm a circa 800 nm) non è possibile abbracciarlo disponendo di una sola sorgente, senza compromettere la qualità dei risultati. Questi strumenti pertanto sono quasi sempre corredati da due sorgenti facilmente intercambiabili tra loro, ciascuna delle quali opera in un campo spettrale definito. In genere, si ha una lampada ad incandescenza che viene usata per determinazioni nel visibile, mentre nell'ultravioletto si usano soprattutto le lampade ad idrogeno. Queste lampade si basano sul principio della scarica in atmosfera di gas (in questo caso l'idrogeno), contenuto in un'ampolla di quarzo, in modo da permettere la fuoriuscita delle radiazioni. Si hanno parecchie versioni in relazione alla tensione di lavoro, alla temperatura del

catodo e alla pressione del gas contenuto. Per talune applicazioni possono essere usate vantaggiosamente le lampade a vapori di mercurio.

I monocromatori permettono di selezionare con continuità radiazioni di qualsiasi lunghezza d'onda e di elevata purezza spettrale. Essi si basano sul principio che la luce bianca proveniente da una sorgente quasi puntiforme (fenditura primaria o d'entrata), attraversa un mezzo ottico dispersivo (prisma o reticolo); dallo spettro così ottenuto viene prelevata una piccolissima porzione con l'ausilio di un'altra fenditura (fenditura secondaria o d'uscita).

Le celle hanno la funzione di contenere i liquidi in esame e quelli di riferimento. Tra i fattori che maggiormente influenzano e limitano l'uso di una cella di assorbimento è di fondamentale importanza la natura chimica del mezzo con cui la cella è costruita. Il vetro trasmette ottimamente nel campo del visibile, mentre è completamente opaco per le radiazioni ultraviolette ed infrarosse. Il suo campo d'impiego risulta pertanto limitato tra i 360 e i 1200 nm. Il quarzo fuso e, più ancora, i cristalli di quarzo naturali tagliati perpendicolarmente all'asse ottico, presentano una buona trasmittanza nell'ultravioletto anche sotto i 200 nm e pertanto costituiscono praticamente l'unico mezzo usato in questo campo. Le celle usate in spettrofotometria hanno di solito la forma di parallelepipedo, le due facce attraversate dalle radiazioni devono essere rigorosamente piane, parallele e lavorate otticamente; inoltre devono essere perfettamente omogenee ed uniformi in modo che la ~~trasmittanza~~ ~~risulti costante~~ in ogni punto della loro superficie. La maggior parte delle determinazioni spettrofotometriche viene eseguita con celle a spessore di 1 cm, provvedendo a opportune diluizioni nel caso che la soluzione in esame presenti un'assorbanza eccessivamente elevata.

## Capitolo 5

### PROGETTI SVILUPPATI

#### 5.1 CARATTERIZZAZIONE DELL'ATTIVITÀ FOSFOCITRATO SINTETASICA

##### 5.1.1 Introduzione

Il fosfocitrato (PC) è il più potente inibitore della formazione dei cristalli di idrossiapatite che si conosca [Williams & Sallis, 1979; Reddi et al., 1980; Tew et al., 1980; Tew et al., 1981]. Storicamente il primo a riconoscere la sua esistenza fu Albert Lehninger, il quale osservò che mitocondri isolati di cellule di fegato di ratto, sottoposti a carico di calcio, presentavano all'interno della loro matrice dei corpi elettron-opachi (*dense bodies*) osservabili al microscopio elettronico [Lehninger et al., 1982; Lehninger, 1983]. Poiché già si conosceva la capacità di questi organuli di accumulare ioni calcio, si concluse che tali corpi altro non erano che accumuli di calcio e fosfato in forma amorfa. L'analisi elementare confermava la presenza di grosse quantità di questi elementi all'interno del mitocondrio. L'esperimento contrario, cioè quando nel mezzo era presente una concentrazione non elevata di calcio, suggeriva che in queste condizioni il calcio, all'interno dell'organulo, fosse organizzato assieme al fosfato in forma cristallina simile a quella dell'idrossiapatite, anche questo venne confermato dall'analisi elementare [Tew et al., 1980; Lehninger, 1983]. L'accumulo di calcio all'interno del mitocondrio, dunque, faceva precipitare lo ione in forma amorfa. Era necessario perciò ipotizzare la presenza di un composto in grado di inibire la sua organizzazione in forma cristallina [Greenawalt et al., 1964; Sottocasa et al., 1967; Lehninger et al., 1982; Lehninger, 1983]. Studi successivi dimostrarono quali erano i requisiti minimi di questa ipotetica molecola: essa doveva possedere un gruppo fosfato ed almeno un residuo carbossilico. Ciò venne dimostrato sperimentalmente, impiegando composti con tali caratteristiche e studiando la loro capacità di indurre precipitazione in forma amorfa di soluzioni sature di fosfato tricalcico [Williams & Sallis, 1982].

La molecola del fosfocitrato (Figura 34) venne alla fine riconosciuta, all'interno dei mitocondri di epatociti di ratto, con tecniche cromatografiche, con l'uso della spettrometria di massa e della risonanza magnetica nucleare

[Lehninger et al., 1982; Lehninger, 1983]. Successivamente il fosfocitrato venne isolato anche in liquidi biologici: il sangue, l'urina, la bile ed il latte lo contengono in piccole quantità [Lehninger et al., 1982].

Il meccanismo d'azione del fosfocitrato non è interamente noto, ma è stato dimostrato che la molecola è un debole chelante dello ione calcio. Sembra che il fosfocitrato prevenga la crescita dei cristalli in virtù della sua configurazione stereochimica e delle cariche negative che presenta a pH fisiologico, poiché i suoi gruppi carbossilici hanno valori di  $pK_a$  da 3 a 5.5 circa. Queste caratteristiche gli conferiscono la capacità di interagire con i nuclei di idrossiapatite, stabilizzandoli ed inibendone la crescita [Williams & Sallis, 1979; Lehninger et al., 1982].

Visto che la molecola del fosfocitrato inibisce potentemente la formazione dei cristalli di idrossiapatite, numerosi lavori sono stati svolti per chiarire quale fosse la sua influenza sui meccanismi fisiologici e patologici di mineralizzazione. Perciò è stata studiata l'attività del fosfocitrato nelle calcificazioni metastatiche ed in quelle fisiologiche. Per quanto riguarda le calcificazioni metastatiche, si è visto che il fosfocitrato inibisce lo sviluppo di calcoli renali [Tew et al., 1981; Gimenez et al., 1982]; interferisce con le calcificazioni arteriosclerotiche [Shankar et al., 1984; Shankar & Sallis, 1985; Ward et al., 1987; Tsao et al., 1988]; impedisce l'artrite da cristalli di idrossiapatite e calcio pirofosfato in virtù del fatto che, inibendo la crescita di questi ultimi, ~~impedisce la lisi~~ della membrana dei leucociti polimorfo nucleati [Sallis et al., 1989]. ~~Riguardo~~ alle calcificazioni fisiologiche, si è dimostrato che il fosfocitrato non ha alcun effetto su di esse. In questo caso sembra che la mancanza di attività sia dovuta alla presenza di fosfatasi endogene che, idrolizzando il legame estereo, potrebbero regolare il livello di fosfocitrato nel sito di calcificazione [Reddi et al., 1980].

Malgrado tutta questa messe di dati non si conosceva ancora la via di sintesi cellulare del fosfocitrato. A questo proposito, recentemente, è stata evidenziata l'esistenza, negli epatociti di ratto, di un'attività *citrato chinasi* in grado di sintetizzare il composto [Moro et al., 1990]. *In vitro*, in opportune condizioni che prevedono la presenza di un donatore di fosfato ad alta energia (come l'ATP), è stato dimostrato da questi autori, per la prima volta, che il citrato può essere fosforilato da un omogenato di fegato di ratto per formare la corrispondente molecola del 3-fosfocitrato (Figura 34). Il prodotto della reazione enzimatica, il PC appunto, è stato identificato tramite digestione con

fosfatasi alcalina della miscela di saggio enzimatico, HPLC e spettroscopia di risonanza magnetica nucleare al protone ( $^1\text{H-NMR}$ ).

La presenza di un'attività enzimatica in grado di sintetizzare il fosfocitrato conferma i lavori precedenti che riportavano l'esistenza del composto nei mitocondri dei tessuti molli [Williams & Sallis, 1981; Lehninger, 1983].

In questo studio si sono volute ampliare le conoscenze di questa attività enzimatica, responsabile della sintesi fisiologica del PC e definita "*fosfocitrato sintetasi*", determinando:

- 1) i parametri cinetici e la termolabilità dell'enzima presente in un omogenato di fegato di ratto;
- 2) la sua distribuzione intracellulare;
- 3) la sua eventuale presenza in omogenati di altri organi di ratto (cuore, reni, intestino, polmoni);
- 4) avendo a disposizione frammenti di rene umano, ed essendo il fosfocitrato implicato nell'inibizione delle patologie renali da accumulo di calcio [Tew et al., 1981; Gimenez et al., 1982; Sallis et al., 1988], si è studiata la possibile presenza di questa attività enzimatica anche in omogenato di rene umano.

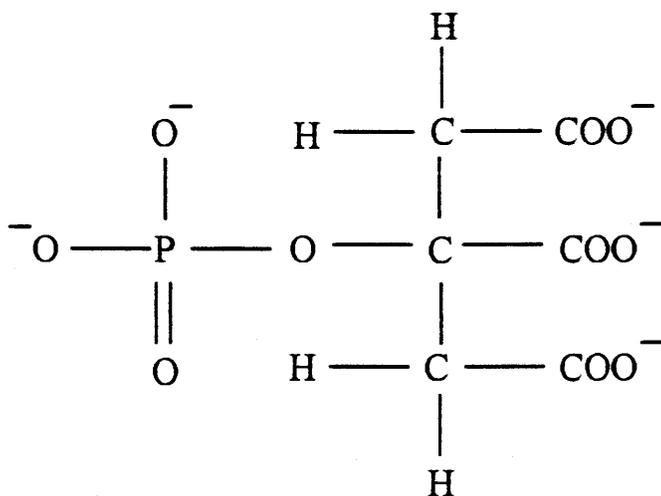


Figura 34: Formula di struttura del fosfocitrato.

## 5.1.2 Materiali e Metodi

### *Prodotti chimici impiegati*

I prodotti chimici utilizzati, ottenuti da ditte commerciali, sono tutti di grado analitico.

Il fosfocitrato standard è stato sintetizzato dal prof. J. D. Sallis, del Dipartimento di Biochimica dell'Università della Tasmania in Australia, seguendo la metodologia riportata in letteratura [Tew et al., 1980; Williams & Sallis, 1980].

### *Omogenato di tessuto*

Gli omogenati di tessuto al 10% sono stati preparati essenzialmente secondo Schnaitman e Greenawalt, in mannitolo 225 mM, saccarosio 75 mM e acido N-2-idrossietilpiperazino-N'-2-etansulfonico (HEPES) 1 mM, a pH 7.4 [Schnaitman & Greenawalt, 1968].

### *Determinazione delle proteine*

Per la determinazione della concentrazione proteica degli omogenati e delle frazioni cellulari (citoplasma, microsomi, mitocondri, mitocondri leggeri) dei diversi tessuti esaminati si è usata la reazione dell'acido bicinconinico (BCA) [Smith et al., 1985].

Le proteine reagiscono con lo ione rameico che viene ridotto a ione rameoso, il quale forma con il BCA un complesso color porpora che ha un massimo di assorbimento a 562 nm [Wiechelman et al., 1988].

Il reattivo dell'acido bicinconinico è costituito da:

*Reagente A:* sodio carbonato, sodio bicarbonato, BCA e sodio tartrato in NaOH 0.2 N;

*Reagente B:* soluzione di solfato di rame al 4%.

Al momento dell'uso si mescolano 1 parte di reagente A e 50 parti di reagente B, agitando fino ad ottenere una soluzione omogenea. Al materiale in esame (50  $\mu$ l), opportunamente diluito, vengono aggiunti 10  $\mu$ l di Triton 5% (v/v) e 1 ml di reattivo, quindi si incuba per 30 minuti a 37°C. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, si misura il valore di assorbimento a 562 nm. Contemporaneamente viene allestita una curva di taratura, usando come standard albumina di siero bovino in concentrazione nota.

### *Reazione enzimatica*

Un tipico saggio enzimatico ha un volume di 100  $\mu$ l e viene eseguito, se non diversamente indicato, incubando a 37°C per 60 minuti la miscela di reazione costituita da: circa 300  $\mu$ g di proteine, ATP 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM e citrato di sodio 20 mM in tampone Tris-HCl 40 mM, a pH 7.4. La reazione viene bloccata con l'aggiunta di 5  $\mu$ l di acido fosforico 16 M. Dopo centrifugazione a 6000 x g per 2 minuti, si analizza tramite HPLC un'aliquota da 20  $\mu$ l.

### *Identificazione dell'attività enzimatica*

Come già riportato [Moro et al., 1990], l'attività enzimatica è stata evidenziata separando, tramite HPLC su una colonna a fase inversa, il prodotto della reazione, il PC appunto, dalla miscela enzimatica contenente omogenato di tessuto.

### *Attività enzimatica in funzione del pH*

Per la determinazione dell'attività enzimatica in funzione del pH si sono utilizzati i seguenti tamponi: glicina-HCl, pH 2.5; sodio acetato-acido acetico, pH 5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH, pH 6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH, pH 7; trietanolammina-HCl, pH 7.6; trietanolammina-HCl, pH 8; glicina-NaOH, pH 9; glicina-NaOH, pH 10.

### *Frazionamento cellulare*

Le diverse frazioni cellulari (mitocondri, mitocondri leggeri, microsomi, citoplasma) sono state ottenute a partire da un omogenato di fegato di ratto al 10% (peso/volume), tramite centrifugazione differenziale a 4°C (Figura 35), essenzialmente secondo quanto riportato da Schnaitman [Schnaitman & Greenawalt, 1968].

### *Apparato HPLC*

Si è usato un sistema Beckman (modello *System Gold*), costituito da un sistema HPLC ed un *computer* (Figura 36), collegato con un rivelatore UV-visibile. Il monitoraggio a due lunghezze d'onda (220 e 260 nm) ha permesso di evidenziare tutti i composti rilevanti.

### *Separazione tramite HPLC*

Tutti i solventi utilizzati come eluenti cromatografici sono stati filtrati attraverso filtri da 0.22  $\mu\text{m}$  e degassati tramite sonicazione.

Si è utilizzata una colonna idrofobica,  $\text{C}_{18}$  (*Ultrasphere ODS*), lunga 25 cm, con un diametro interno di 4.6 mm, impaccata con particelle di diametro pari a 5  $\mu\text{m}$ , con pori di 80 Å. La colonna è stata equilibrata per 120 ore con una soluzione di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM, portata a pH 2 con  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , contenente tetrabuttilammonio idrogeno solfato ad una concentrazione 5 mM. L'eluente è costituito da una soluzione di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM portata a pH 2 con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  16 M, in condizioni isocratiche, impiegando una velocità di flusso pari a 1 ml al minuto.

### *Spettrometria di massa: apparato e condizioni*

Tutte le misure di spettrometria di massa sono state ottenute con uno strumento VG ZAB2F (VG Analytical, Manchester, UK), operante in condizioni FAB (*Fast Atom Bombardment*) (energia degli atomi di xenon pari a 8 keV). I *patterns* di frammentazione primaria sono stati determinati mediante CAD (*Collisionally Activated Decomposition*) e analizzati mediante spettrometria MIKE (*Mass-Analysed Ion Kinetic Energy*) [Cooks & Beynon, 1973].

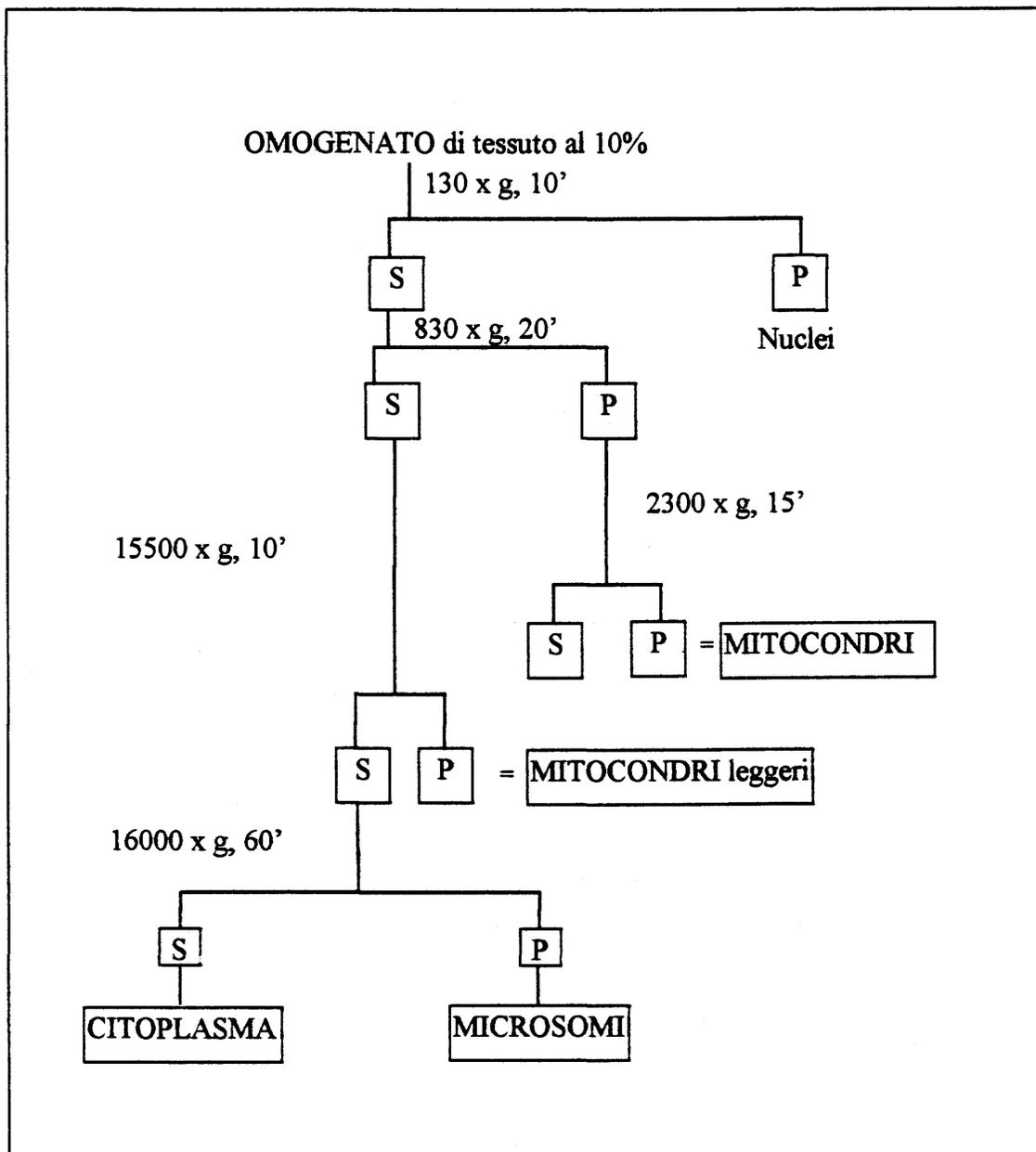


Figura 35: Schema di frazionamento cellulare di un omogenato di tessuto mediante centrifugazione differenziale (S = sovrantante; P = precipitato).

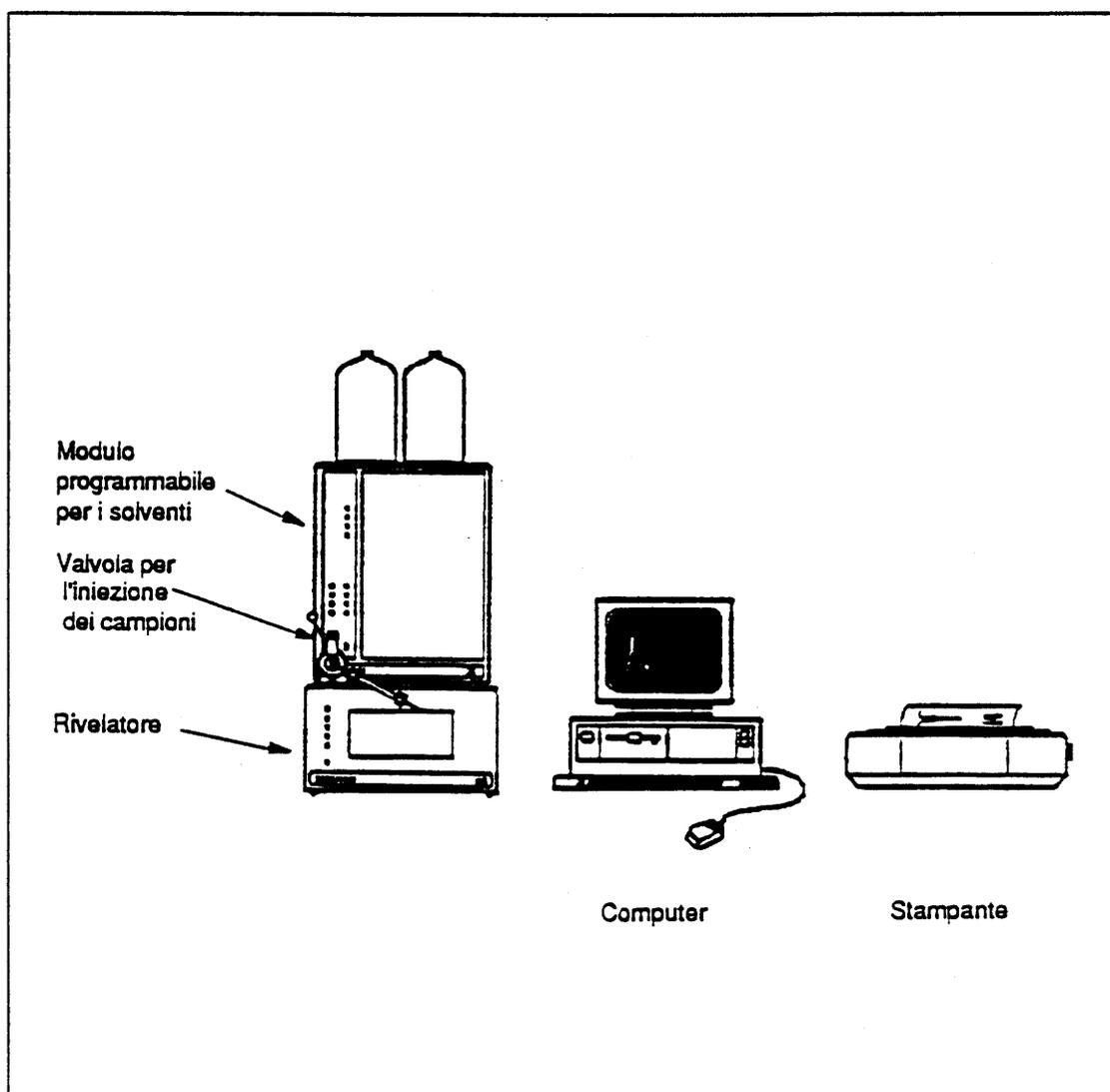


Figura 36: Schema di un sistema HPLC con personal computer.

### 5.1.3 Risultati

#### 1) Parametri cinetici

##### a) $pH$

La Figura 37 illustra l'attività *fosfocitrato sintetasica* in funzione del  $pH$ . Si può notare un classico andamento a campana fra  $pH$  6 e 10, con un massimo a un valore di 7.6.

#### *b) Tempo di incubazione e concentrazione proteica*

I risultati riportati nella Figura 38 (attività enzimatica in funzione del tempo di incubazione) e nella Figura 39 (attività enzimatica in funzione della concentrazione proteica), mostrano in entrambi i casi un andamento lineare dell'attività *fosfocitrato sintetasica*, rispettivamente fino a 6 ore di incubazione e fino ad un contenuto proteico nel saggio di 1 mg di proteine.

#### *c) $K_M$ della fosfocitrato sintetasi*

La  $K_M$  è stata calcolata secondo il classico sistema di Lineweaver-Burk (Figura 40). Il valore trovato è di 9.62 mM.

#### *d) Termolabilità*

La curva di attività enzimatica in funzione della temperatura di incubazione, riportata nella Figura 41, mostra un andamento a campana con un massimo a 50°C. Un ulteriore aumento della temperatura, come si può vedere, porta ad una rapida denaturazione dell'enzima.

### **2) Distribuzione intracellulare**

I risultati di questo studio sono riportati nella Figura 42 e mostrano che la frazione mitocondriale e quella citoplasmatica hanno la più elevata attività specifica, mentre la maggior quantità di enzima è presente nella frazione citoplasmatica.

### **3) Presenza della fosfocitrato sintetasi in organi diversi dal fegato**

Si è analizzato in quali organi di ratto, oltre al fegato, è presente l'attività enzimatica. La Tabella 6 mostra che, anche se la maggiore attività specifica si trova nel fegato, attività specifiche apprezzabili sono presenti anche in altri organi quali cuore, reni, intestino e polmoni.

### **4) Identificazione di un'attività fosfocitrato sintetasica in omogenato di rene umano**

Come mostrato nella Figura 43a, il PC standard eluisce allo stesso tempo di ritenzione del picco che si osserva nella miscela di reazione (Figura 43b). Questi risultati sono in accordo con quelli precedenti, che riportavano la sintesi biologica del PC usando come fonte di attività enzimatica omogenato di fegato di ratto [Moro et al., 1990].

Per ottenere ulteriori evidenze sulla natura del picco che eluisce allo stesso tempo di ritenzione dello standard, sono stati raccolti, in uscita dalla colonna, e sottoposti all'analisi di spettrometria di massa, sia il picco del PC standard che quello del composto prodotto dalla reazione enzimatica.

La Figura 44 mostra lo spettro di massa FAB del picco del PC standard (a) e del PC prodotto enzimaticamente (b) raccolti dalla colonna (rispettivamente come in Figura 43a e b). Entrambi gli spettri mostrano un'alta abbondanza relativa degli ioni a  $m/z$  311 e  $m/z$  349, con un rapporto segnale/rumore maggiore di 10.

La spettrometria di massa FAB è molto efficace per l'identificazione delle masse molecolari di sostanze polari, grazie alla formazione di speci molecolari protonate o cationizzate. Al contrario, essa è poco efficace per l'identificazione strutturale, vista la deposizione di una bassa quantità di energia e la conseguente scarsità di ioni frammento. Per avere tali informazioni strutturali, sono stati eseguiti alcuni esperimenti collisionali, tramite spettrometria MIKE [Cooks & Beynon, 1973], effettuata sui due ioni a  $m/z$  311 e 349 presenti negli spettri FAB della Figura 44 (Figura 45). I relativi *patterns* di frammentazione sono riportati in Figura 46. Come si può desumere dalla figura, entrambe le specie molecolari a  $m/z$  311 e 349 mostrano perdita d'acqua, responsabile della formazione degli ioni a  $m/z$  293 e 331 rispettivamente. Comunque, solo la specie ionica a  $m/z$  331 si decompone ulteriormente, tramite decarbossilazione, dando origine allo ione a  $m/z$  286. Una decomposizione interessante è quella che si origina dalla rottura 1 (Figura 46), comune a entrambi gli ioni parenti a  $m/z$  311 e 349, che porta al frammento comune a  $m/z$  213. Questi dati per le specie ioniche a  $m/z$  311 e 349 sono in accordo con le strutture dei sali mono e dipotassico; i *patterns* di frammentazione indicano che, per la specie a  $m/z$  349, uno degli atomi di potassio è contenuto nel gruppo fosfato.

Dapprima, la presenza degli atomi di potassio poteva essere attribuita all'aggiunta di  $K^+$  che avviene durante il FAB. Comunque, dalla variazione dell'acidità della matrice FAB si è desunto che, probabilmente, gli atomi di potassio provengono dalla molecola originale e derivano dalle condizioni cromatografiche a cui è sottoposta.

Tabella 6: Attività specifica della *fosfocitrato sintetasi* in diversi organi di ratto.

ORGANO	ATTIVITÀ SPECIFICA (mM/10'/mg proteine)
Fegato	120.5
Cuore	38.2
Reni	24.4
Intestino	10.4
Polmoni	4.5

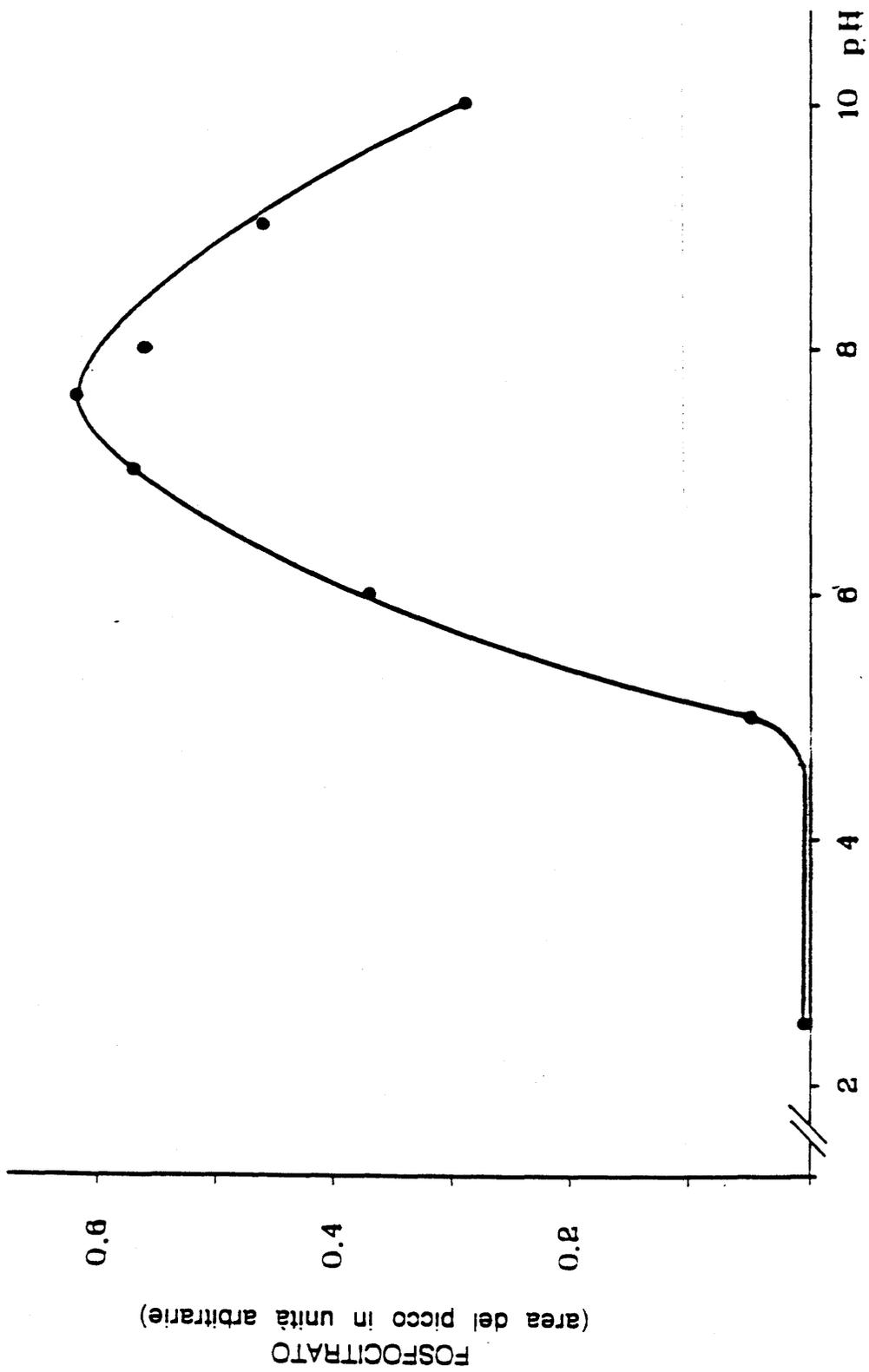


Figura 37: Curva di attività enzimatica in funzione del pH.

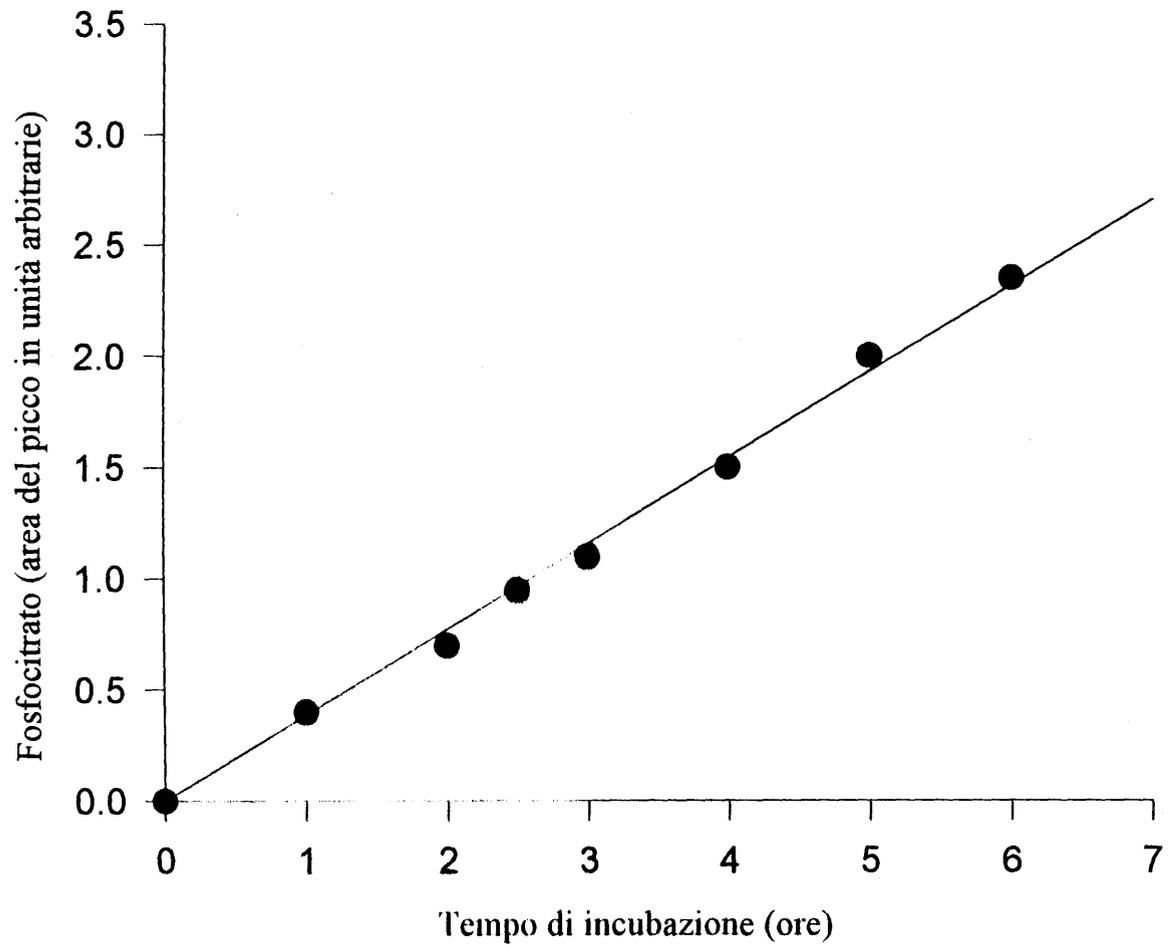


Figura 38: Relazione tra tempo di incubazione e quantità di fosfocitrato neosintetizzato.

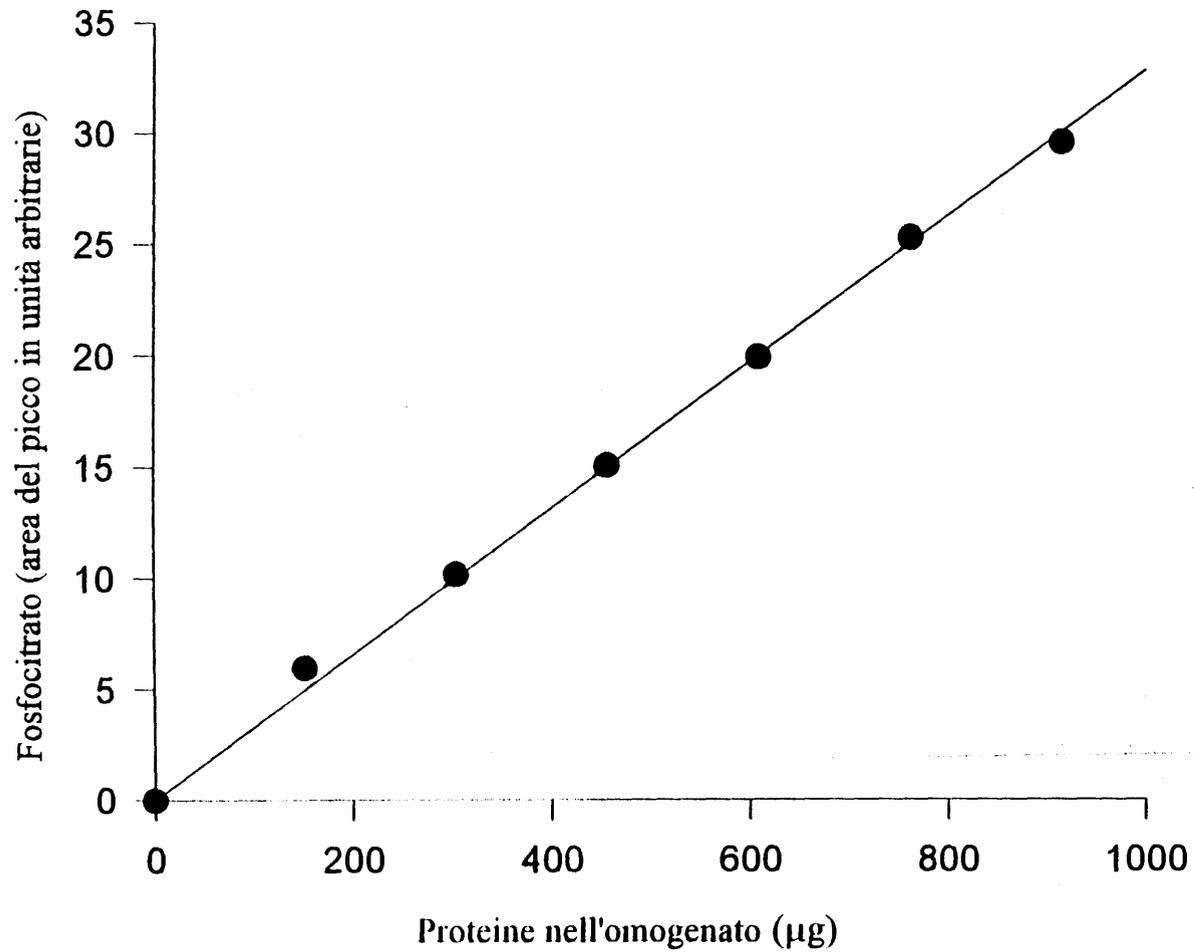


Figura 39: Relazione tra proteine nel saggio e quantità di fosfocitrato che si forma.

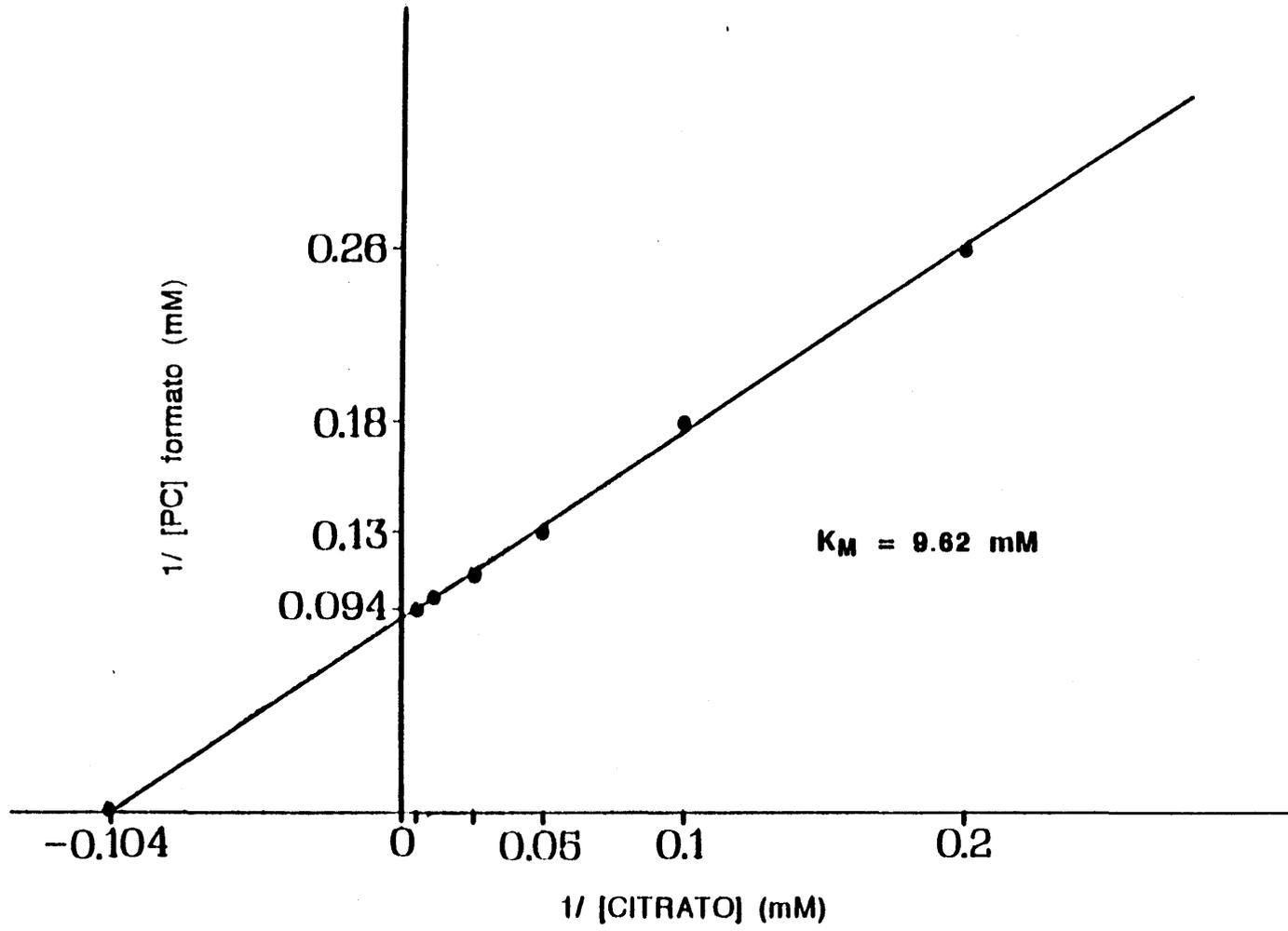


Figura 40: Grafico di Lineweaver-Burk e  $K_M$  della fosfo citrato sintetasi.

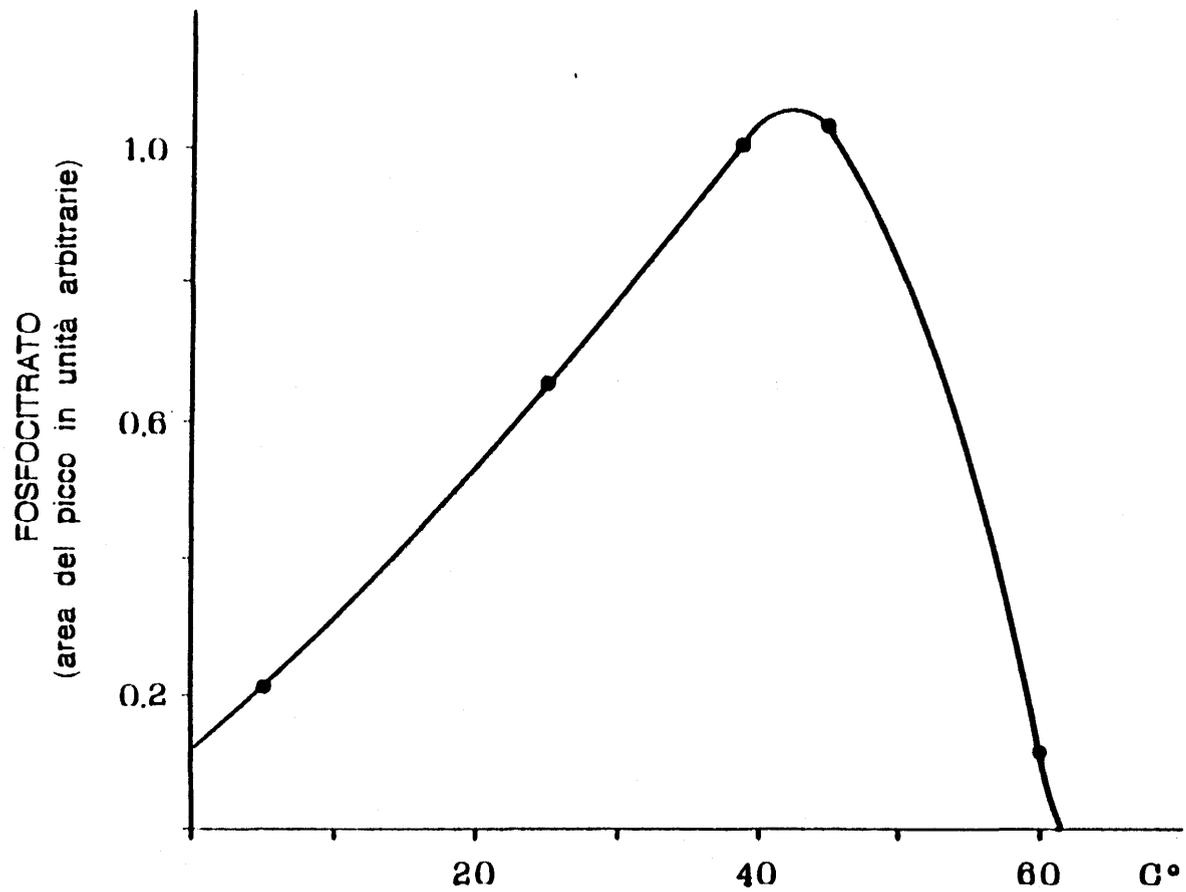


Figura 41: Curva di attività enzimatica in funzione della temperatura.

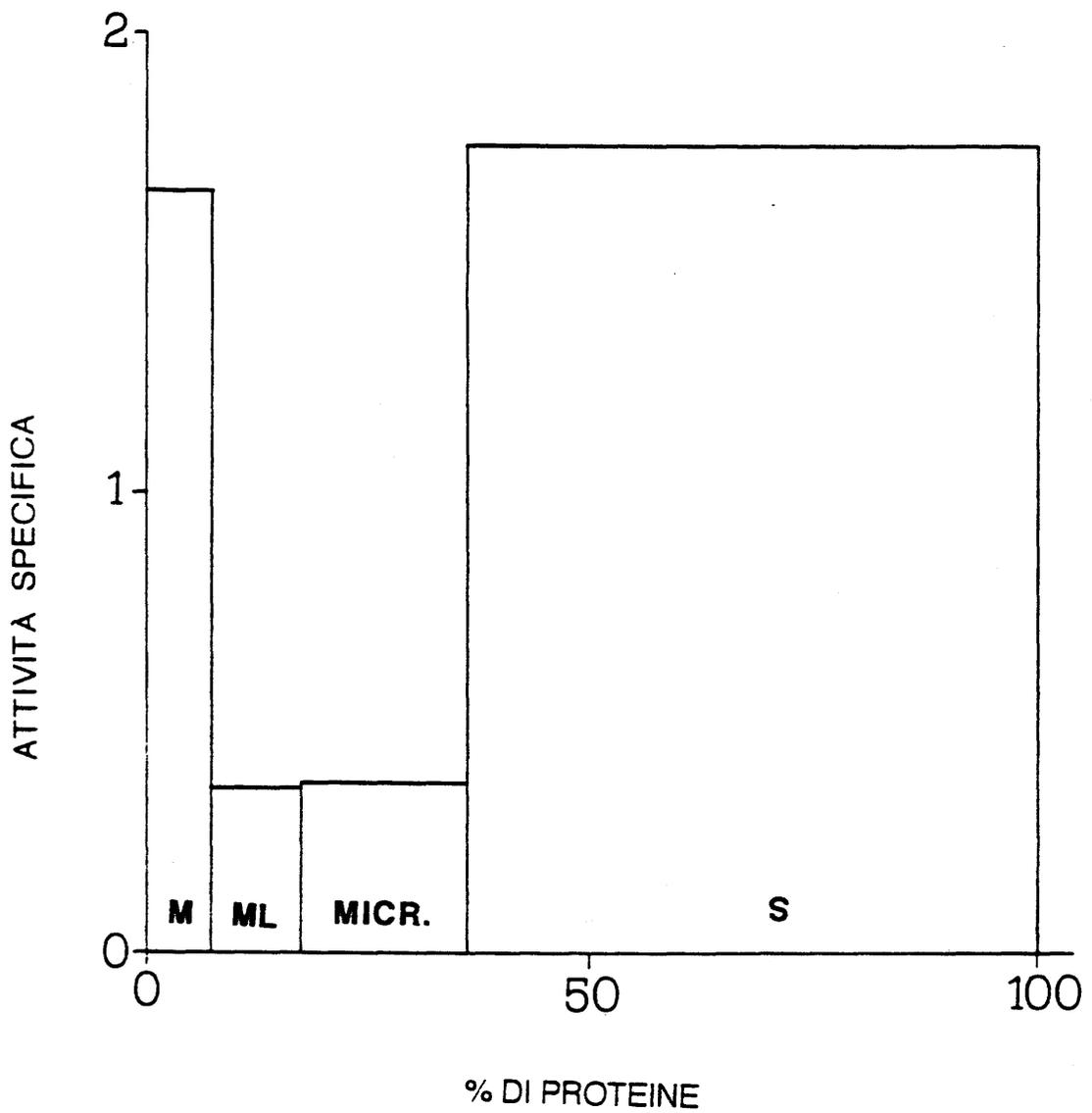


Figura 42: Localizzazioni subcellulari della *fosfocitrato sintetasi* (M = mitocondri, ML = mitocondri leggeri; MICR = microsomi; S = citoplasma).

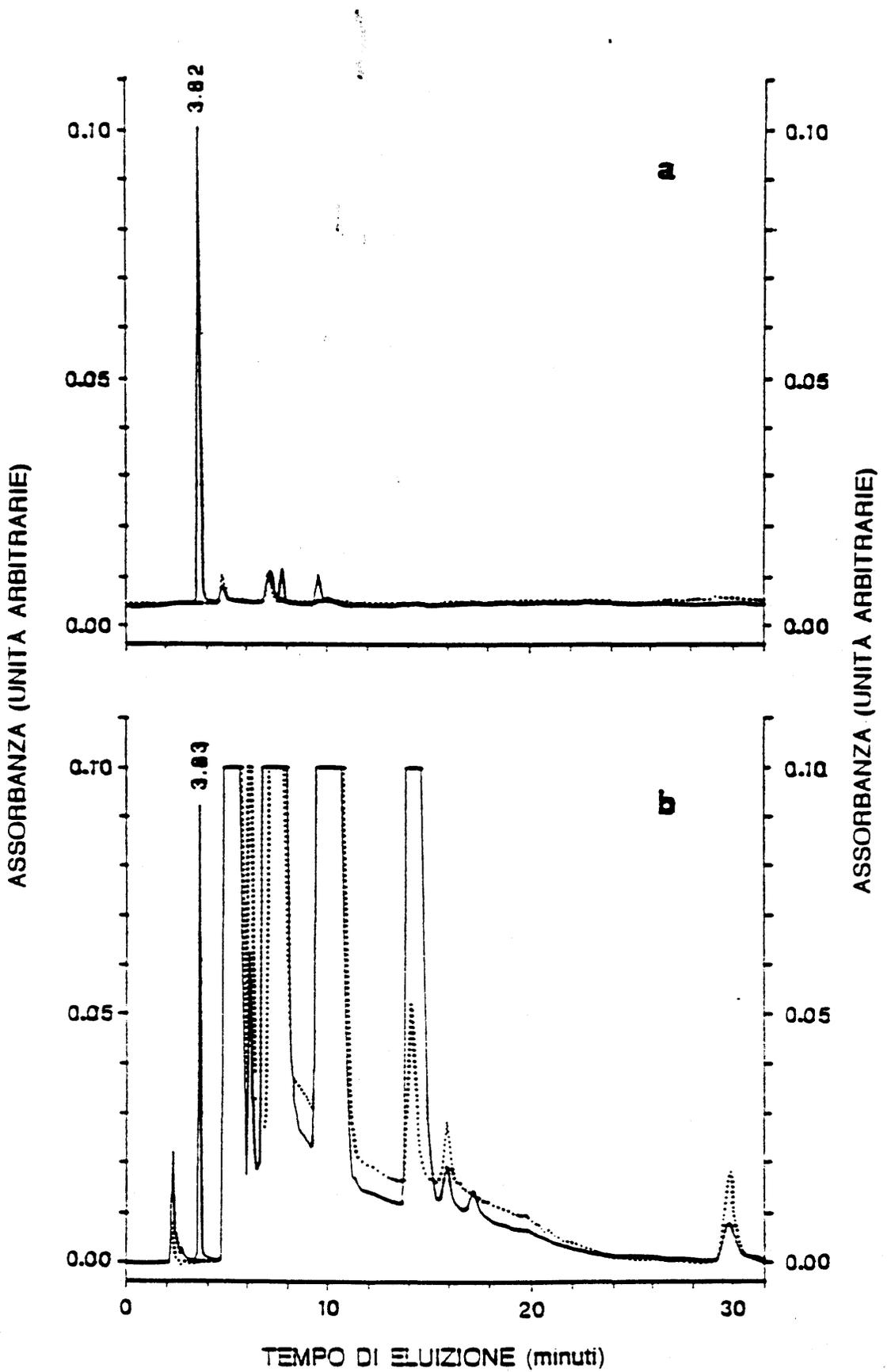


Figura 43: Profilo cromatografico del fosfocitrato standard (a) e della miscela di reazione enzimatica (b). (Lunghezze d'onda: (—) 220 nm; (- - - -) 260 nm).

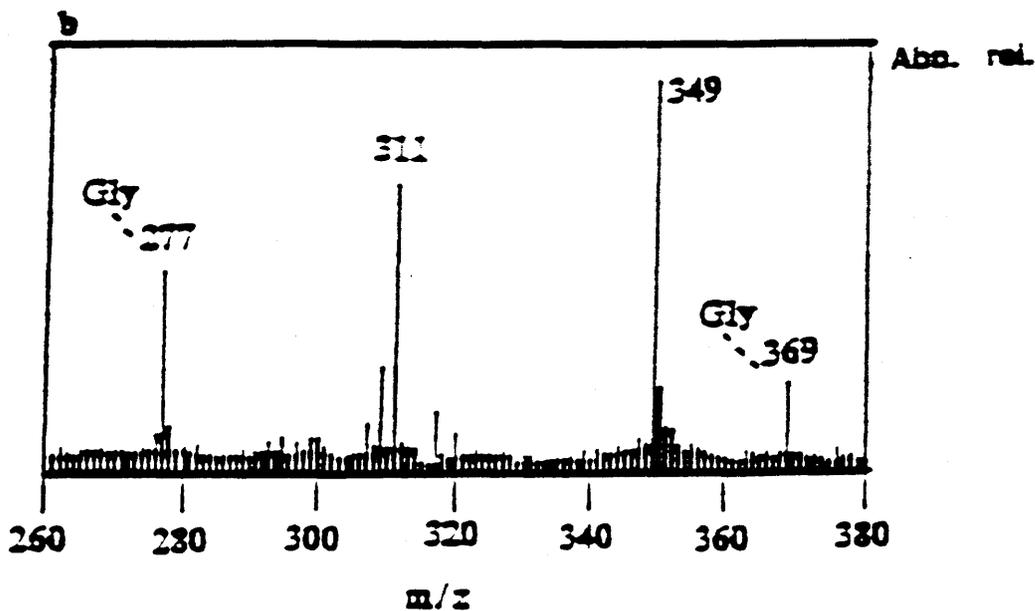
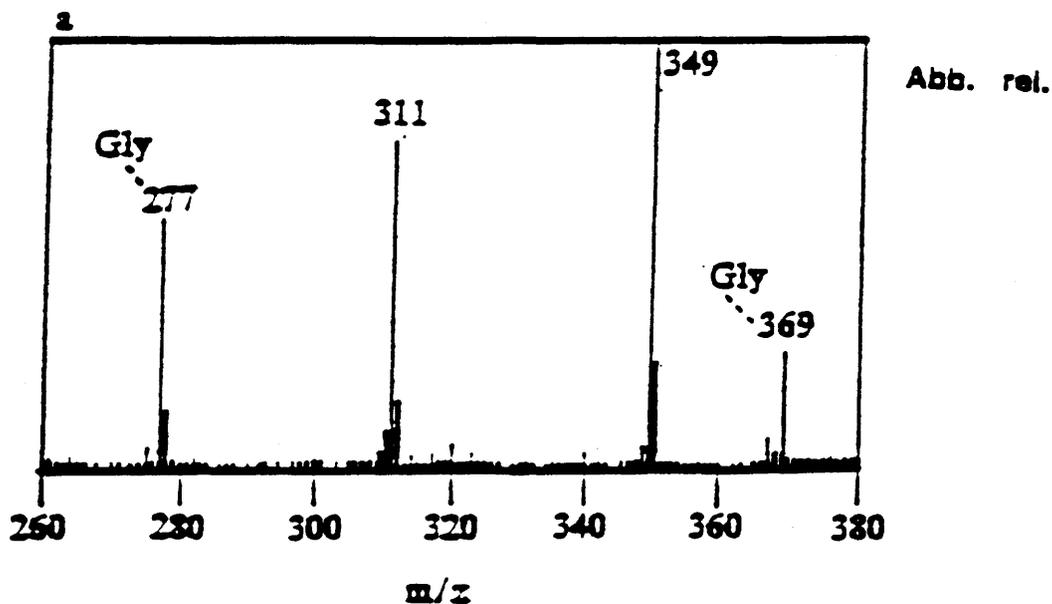


Figura 44: (a) Spettro di massa FAB del fosfocitrato standard dopo HPLC in fase inversa. (b) Spettro di massa FAB del fosfocitrato sintetizzato enzimaticamente, dopo HPLC a fase inversa. (Abb. rel.: abbondanza relativa; Gly: glicerolo).

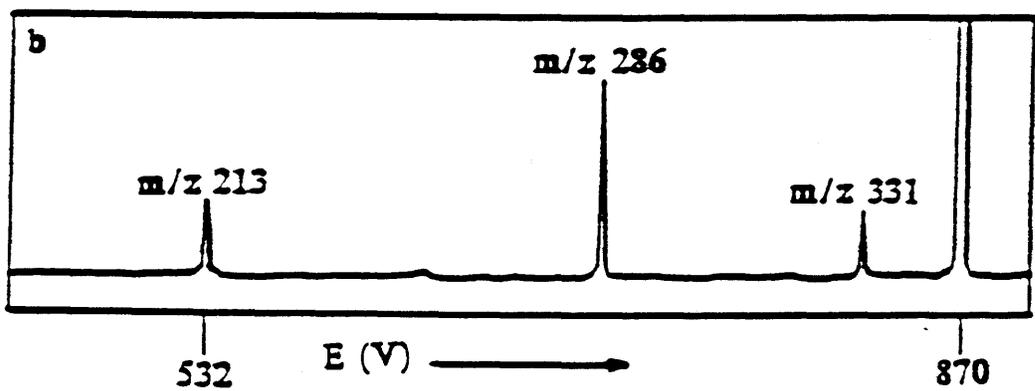
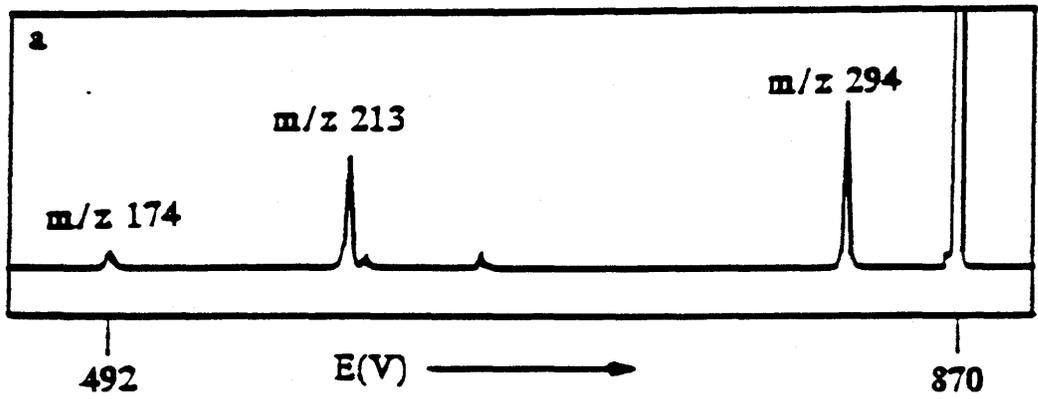


Figura 45: Spettri MIKE degli ioni a  $m/z$  311 (a) e 349 (b) presenti negli spettri FAB della Figura 44.

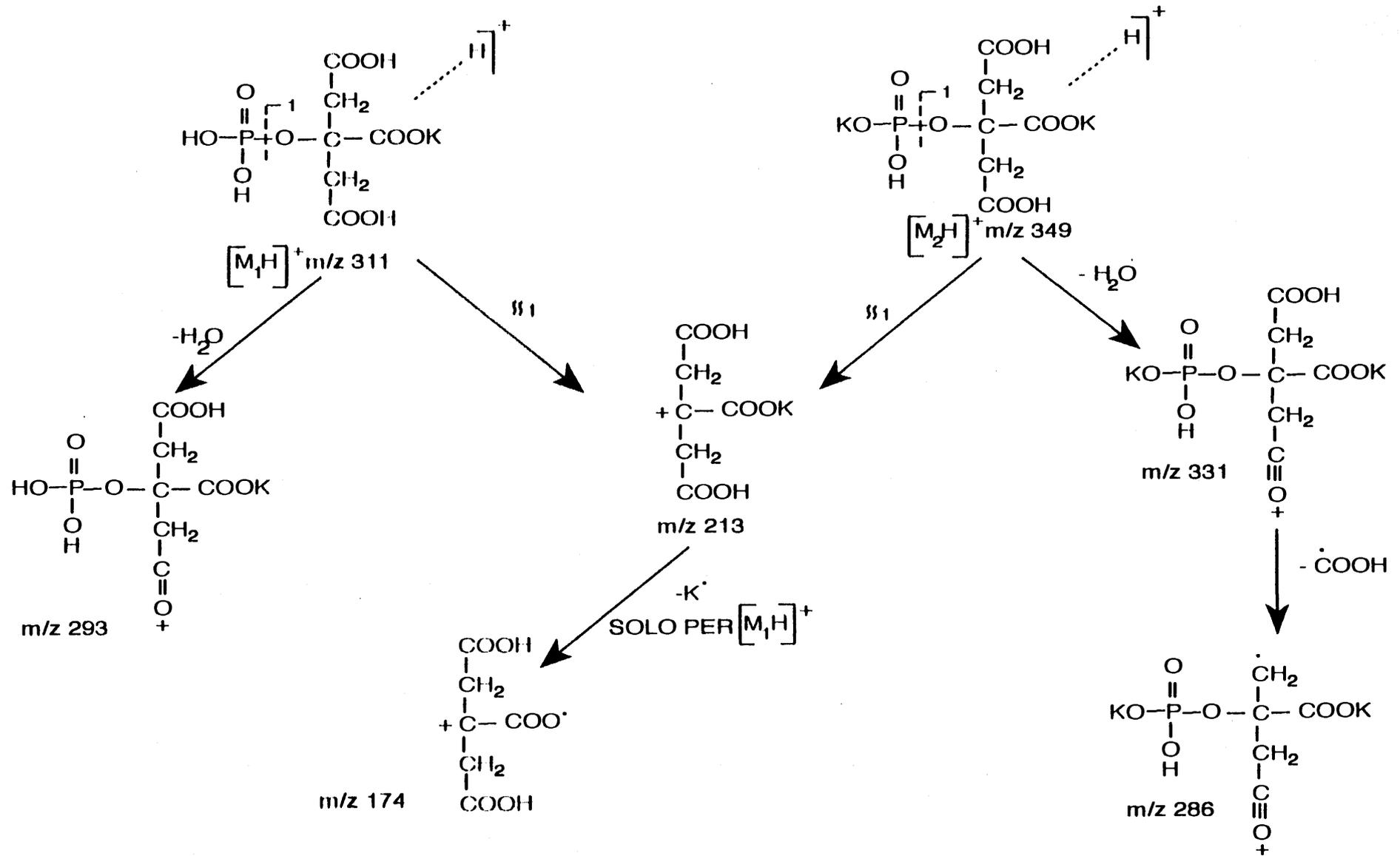


Figura 46: Diagrammi di frammentazione delle due specie molecolari del fosfocitrato a m/z 311 ( $[M_1H]^+$ ) e m/z 349 ( $[M_2H]^+$ ).

#### 5.1.4 Discussione

Lo studio dei parametri cinetici sopra riportati permette di ampliare le conoscenze sull'attività *fosfocitrato sintetasica*. I risultati ottenuti rientrano nella logica classica di un'attività enzimatica, a cominciare dal tipico andamento a campana della curva in funzione del pH, con un'attività a pH prevalentemente basico e un massimo a pH 7.6. L'attività enzimatica è particolarmente resistente alla denaturazione visto che un tempo di incubazione fino a 6 ore a 37°C non ne altera l'attività, e un tempo di 1 ora a 40°C addirittura incrementa la velocità di reazione. Appena oltre i 40°C l'enzima mostra una forte diminuzione di attività. Questa discreta termoresistenza è molto importante specialmente in previsione di un progetto futuro di purificazione dell'enzima. Inoltre, anche il fatto che ci sia una risposta lineare dell'attività enzimatica già a partire da basse concentrazioni proteiche (inferiori a 100 µg) fino a valori abbastanza elevati (oltre 1 mg), fa pensare che non ci siano fattori di inibizione rispettivamente né da eventuali forme proenzimatiche né da prodotti di reazione.

Lo studio sulla distribuzione intracellulare dell'attività enzimatica mostra che la sintesi del fosfocitrato avviene sia nei mitocondri che nel citoplasma. Il fatto che il citrato sia un intermedio del ciclo di Krebs (Figura 47) fa ritenere probabile l'esistenza di un sistema che regola l'utilizzazione di un substrato comune in due vie metaboliche distinte (Figura 47, punto (a) e punto (2)). Tenendo presente, a questo proposito, che sia l'*optimum* di pH dell'aconitasi (circa 7.9), che la sua  $K_M$  per il citrato (circa  $10^{-3}$  M) [Dickman, 1960], sono ambedue dello stesso ordine di grandezza di quelli della *fosfocitrato sintetasi*, significa che sicuramente devono esistere, per quest'ultimo enzima, dei fattori di regolazione, che sarà opportuno studiare: uno di questi potrebbe forse essere la stessa concentrazione di calcio mitocondriale. Bisognerà anche verificare se esiste e come viene regolata un'eventuale attività fosfatasi che trasformerebbe il fosfocitrato in citrato (Figura 47, punto (b)). Inoltre, visto che l'attività enzimatica è localizzata anche nel citoplasma, alla regolazione dell'utilizzazione del substrato da parte della *citrato liasi* e della *fosfocitrato sintetasi* (Figura 47 punto (10) e punto (a') rispettivamente), si aggiunge il problema del rientro del PC nel mitocondrio (Figura 47, punto (c)). È logico pensare, vista la grande selettività della membrana mitocondriale interna, che il rientro del fosfocitrato nel mitocondrio avvenga attraverso una *permeasi*, e viene quindi da chiedersi se essa sia specifica per il composto o se

quest'ultimo faccia parte di molecole traslocate da *carriers* in grado di legare molecole diverse.

La presenza di un'attività *fosfocitrato sintetasica* in diversi organi di ratto e anche nel rene umano potrebbe forse indurre a pensare a un ruolo del fosfocitrato più ampio di quanto le conoscenze attuali permettano di desumere. Il ruolo endogeno di questo composto, infatti, non è stato ancora interamente stabilito. A livello dei mitocondri una possibile funzione è quella di proteggere questi organelli dall'effetto dannoso provocato dalla precipitazione incontrollata di fosfato di calcio [Lehninger, 1983]. Nel prevenire la trasformazione del fosfato di calcio amorfo in idrossiapatite cristallina, il PC probabilmente agisce legando e impedendo la deposizione e la crescita dei cristalli sui siti di nucleazione [Tew et al., 1980; Williams & Sallis, 1982]. Quindi, la presenza di questa attività *fosfocitrato sintetasica* potrebbe essere un'espressione della cellula a sintetizzare in loco il PC al momento della sua richiesta. Questa ipotesi induce a ritenere che la presenza del PC nei diversi organi sia il risultato di un'attività *fosfocitrato sintetasica* praticamente ubiquitaria, il che evidenzia che il composto potrebbe svolgere anche ruoli diversi da quelli finora riportati in letteratura.

In conclusione, sembra chiara la necessità di isolare e purificare l'enzima, al fine di conoscere maggiori dettagli sulle caratteristiche della reazione. Quando sarà possibile disporre dell'enzima puro, non è escluso che si riuscirà a comprendere in maniera più chiara sia i fenomeni fisiologici di mineralizzazione, attribuendo funzioni più precise a molecole come la fosfatasi alcalina per la quale non si è ancora definito un ruolo chiaro in questo processo, che a fenomeni patologici come le calcificazioni metastatiche.

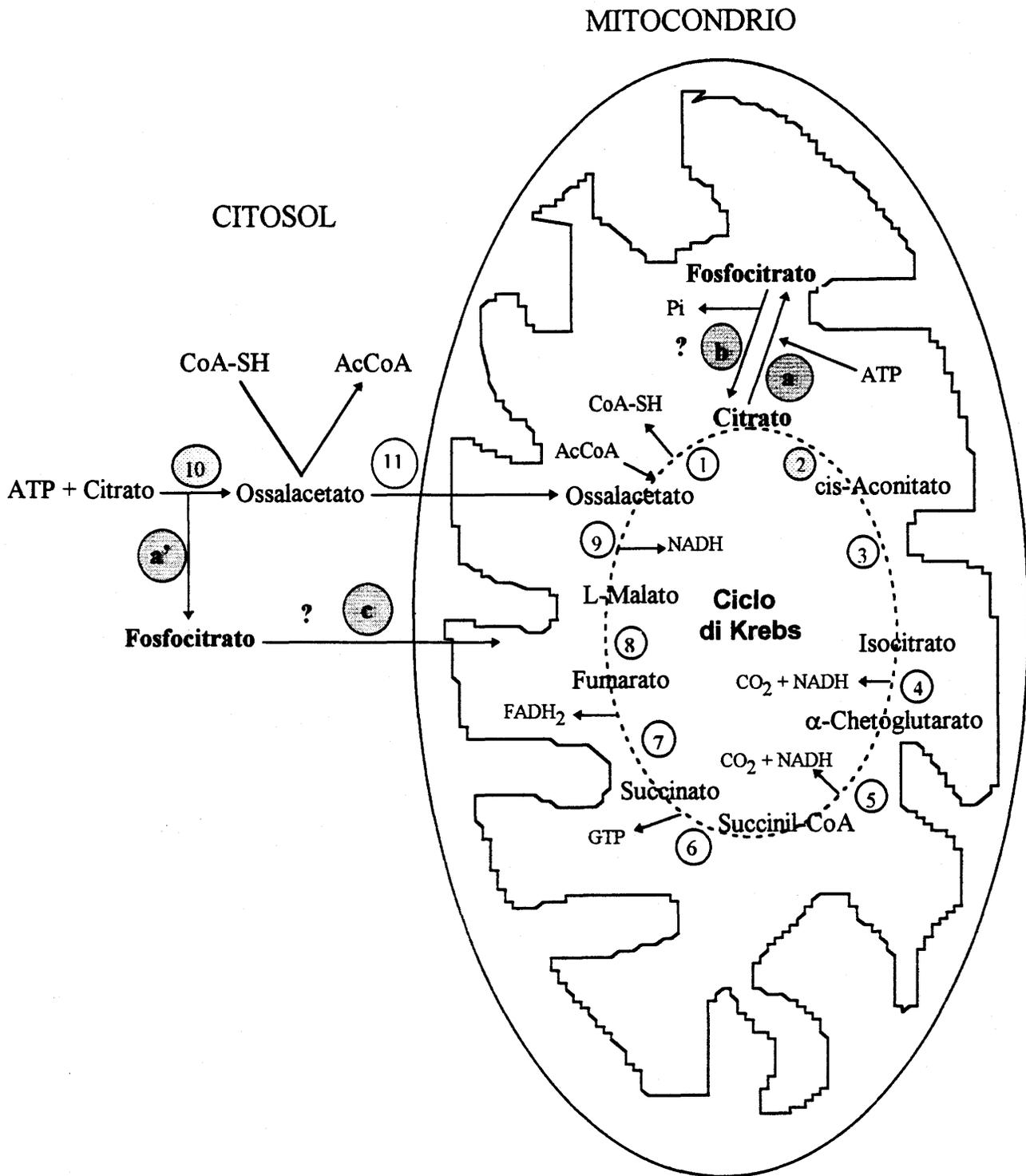


Figura 47: Possibili localizzazioni cellulari della *fosfocitrato sintetasi*.

(1) Citrato sintetasi; (2) e (3) Aconitasi; (4) Isocitrato deidrogenasi; (5) Complesso della  $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi; (6) Succinil-CoA sintetasi; (7) Succinato deidrogenasi; (8) Fumarasi; (9) Malato deidrogenasi; (10) Citrato liasi; (11) Permeasi; (a) e (a') *Fosfocitrato sintetasi*; (b) Fosfatasi (?); (c) Permeasi (?).

## 5.2 STUDIO DELLE MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI DEL COLLAGENE DI TIPO I DELL'OSSO CORTICALE E TRABECOLARE NEL RATTO

### 5.2.1 Introduzione

Il tipo e il grado di modificazioni post-traduzionali del collagene sia intra- che extracellulari (Tabella 2) non sono sempre le stesse [Kivirikko & Myllyla, 1982]. Così, nell'uomo, il *pattern* di glicosilazione dei tessuti molli è diverso da quello dell'osso [Pinnell et al. 1971]. Inoltre, nell'osso, il grado di idrossilazione della lisina [Bailey et al., 1993] e di glicosilazione dell'idrossilisina varia in diverse condizioni fisiologiche e patologiche [Kivirikko & Myllyla, 1982; Kuivaniemi et al., 1991]. Per spiegare tali differenze, studi recenti hanno mostrato come l'espressione fenotipica della cellula sia profondamente influenzata dall'ambiente [Wiley & Sons, 1988]. A questo proposito il microambiente corticale è certamente diverso da quello trabecolare. L'osso trabecolare, infatti, è più vascolarizzato ed è a contatto con il midollo osseo [Baron, 1993], risultando quindi più suscettibile all'azione dei fattori sistemici e locali che influenzano l'espressione e il metabolismo cellulari [Manolagas & Jilka, 1992; Bain et al., 1993; Horowitz, 1993; Kalu et al., 1993a; Kalu et al. 1993b; Turner et al. 1993; Wallach et al., 1993]. Inoltre i due compartimenti svolgono anche una funzione diversa: l'osso corticale ha soprattutto una funzione meccanica e protettiva, l'osso trabecolare svolge invece una funzione metabolica [Baron, 1993].

Poiché differenze funzionali sono il risultato di differenze strutturali, e poiché il collagene di tipo I rappresenta più del 90% della matrice ossea, lo scopo di questa ricerca è stato quello di verificare se il grado di modificazioni post-traduzionali nei due compartimenti ossei e nei due sessi siano uguali e se eventuali differenze riscontrate possano riflettere il loro diverso ruolo fisiologico.

Tenendo presenti queste considerazioni, è stata analizzata la matrice collagenica dell'osso corticale e trabecolare del ratto, che è il modello animale correntemente utilizzato negli studi sul metabolismo del tessuto osseo [Kalu, 1991; Frost & Jee, 1992]. Si sono pertanto studiati il grado di idrossilazione della lisina, di glicosilazione dell'idrossilisina e di formazione dei *cross-links* del piridinio, inoltre il diametro delle fibre di collagene nell'osso corticale e trabecolare di ratti femmine e maschi di 100 giorni di età.

## 5.2.2 Materiali e Metodi

### *Animali utilizzati*

Si sono utilizzati 10 ratti femmina e 10 ratti maschi di 100 giorni di età, di ceppo Sprague-Dawley. Gli animali sono stati sacrificati e si sono prelevati le tibie e i femori.

### *Preparazione del tessuto*

La procedura è stata condotta a 4°C. I femori e le tibie, ripuliti dai tessuti molli e dai muscoli e lavati con acqua distillata sono stati suddivisi in due aree anatomicamente distinte: le diafisi contenenti solo osso corticale e le metafisi, da cui è stato raschiato l'osso trabecolare. L'osso corticale è stato frammentato, dopo avere strappato il periostio dalle diafisi.

### *Trattamento dei campioni ossei prima dell'analisi*

I campioni sono stati sgrassati tramite trattamento sequenziale, a 4°C, con metanolo per 16 ore, seguito da cloroformio/metanolo (2:1, v/v) per 48 ore, quindi da metanolo per altre 16 ore.

Dopo lavaggio con acqua distillata, i campioni ossei sono stati decalcificati in tubi da dialisi (*cut-off* 3500) dializzandoli, a 4°C, con EDTA 0.5 M a pH 7.4 [Bailey et al., 1993].

I campioni ossei decalcificati sono stati quindi estratti per 24 ore, a temperatura ambiente, con una soluzione di cloruro di guanidinio 4 M sciolto in Tris-HCl 50 mM a pH 7.4, per rimuovere dalla matrice collagenica insolubile le macromolecole solubili quali i proteoglicani.

I campioni di matrice ossea corticale e trabecolare così ottenuti sono stati liofilizzati, divisi in due aliquote e idrolizzati. Un'aliquota è stata idrolizzata in NaOH 1.5 M (15 mg di peso secco d'osso/ml) per 18 ore a 108°C e, dopo aver corretto il pH a circa 7.0 con HCl 12 N, sono stati misurati l'idrossiprolina, l'idrossilisina e i glicosidi dell'idrossilisina. L'altra aliquota è stata idrolizzata per lo stesso tempo e alla stessa temperatura in HCl 6 N (20 mg di peso secco d'osso/ml) e si sono quindi misurati l'idrossiprolina e i *cross-links* del piridinio.

### *Preparazione dei campioni per l'esame al microscopio elettronico*

I femori e le tibie di 3 ratti femmine di 100 giorni di età, di ceppo Sprague-Dawley, ripuliti dai tessuti molli e dai muscoli e lavati con acqua distillata,

sono stati suddivisi in osso corticale e trabecolare, come sopra descritto. Sono stati mantenuti separati i campioni di tibia destra da quella sinistra e quelli del femore destro dal sinistro. Il tessuto è stato fissato in paraformaldeide al 4% in tampone fosfato. L'indagine è stata eseguita indipendentemente da due operatori mediante un oculare x25 graduato in mm che è stato posto a contatto della fotografia relativa al campo ultrastrutturale ingrandito x52.500. Il collagene è stato misurato su fibre singole tagliate longitudinalmente, escludendo sezioni oblique al taglio e posizionando l'oculare del microscopio parallelamente alla striatura.

### *Dosaggi*

#### **a) Dosaggio dell'idrossilisina e dei glicosidi dell'idrossilisina**

Il metodo utilizzato per il dosaggio dell'idrossilisina (OH-Lys), della galattosilidrossilisina (G-OH-Lys) e della glucosilgalattosilidrossilisina (GG-OH-Lys) prevede una fase preanalitica di derivatizzazione della molecola e una fase analitica di separazione da altre molecole derivatizzate presenti nella matrice [Moro et al., 1984; Moro et al., 1989].

Un'aliquota di campione d'osso idrolizzato viene derivatizzato, aggiungendovi una pari quantità di carbonato di sodio 0.3 M e una quantità doppia di cloruro di dansile sciolto in acetone (10 mg/ml). Il cloruro di dansile è una molecola fluorescente molto usata nella derivatizzazione di campioni che devono essere rilevati spettrofluorimetricamente: esso è in grado di legarsi con i residui amminici dell'idrossilisina e dei glicosidi dell'idrossilisina che non sono naturalmente fluorescenti [Gray, 1967]. Il campione viene quindi incubato a 60°C per 30 minuti, centrifugato e infine analizzato tramite HPLC (Figura 48).

Il sistema HPLC utilizzato (Beckman, modello System Gold) (Figura 36) è connesso ad un fluorimetro Shimadzu RF551, tramite un'interfaccia analogica (Beckman, modello 406). Le misure sono state effettuate utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 360 nm e una lunghezza d'onda di emissione di 490 nm. L'area dei picchi è stata calcolata da un *personal computer* IBM. Si è utilizzata una colonna a fase inversa (Beckman, C<sub>18</sub> Ultrasphere-ODS) lunga 25 cm, con diametro interno di 4.6 mm, impaccata con particelle di diametro di 3 µm, munita di precolonna. Si sono iniettati 20 µl di campione.

La fase mobile è costituita da due tamponi: A e B. Il tampone A è formato da 125 ml di acetonitrile, 50 ml di 2-propanolo, portato a volume di 1000 ml

con acetato di sodio 0.05 M. Il pH viene corretto a 6.3 con acido acetico. Il tampone B è formato da 500 ml di acetonitrile, 10 ml di 2-propanolo, portato a volume di 1000 ml con acetato di sodio 0.05M. Il pH viene corretto a 6.5 con acido acetico.

Il programma di separazione cromatografica richiede il seguente gradiente di eluizione:

TEMPO (minuti)	FLUSSO (ml/min)	%B	DURATA (min)
0	1	0	---
0.1	1	47.5	22
21.50	0.9	47.5	---
25	1	100	6
35	1	0	0.1

Poiché lo spazio nel cromatogramma è molto limitato, qualunque standard interno aggiunto al campione in modo da minimizzare gli errori analitici, coeluirebbe con picchi aspecifici e sarebbe mascherato da essi. Per superare questo problema, nella determinazione della concentrazione dell'idrossilisina e dei glicosidi dell'idrossilisina, si usa come standard esterno la L-lisina [de Bernard et al., 1989]. È stata fatta una curva di calibrazione utilizzando un bianco e tre diverse concentrazioni di L-lisina (7.5, 15 e 30  $\mu$ M) previamente derivatizzata con cloruro di dansile. Essendo lo standard esterno in forma L, esso si didansila dando un unico picco. Riportando i valori di concentrazione contro le aree dei picchi ottenuti, si ottiene una retta la cui pendenza rappresenta le unità di fluorescenza per micromole di lisina.

Dato che il contenuto dell'idrossiprolina dell'osso corticale e trabecolare non è significativamente diverso in entrambi i sessi (Tabella 7), la quantità di ciascun composto è espressa come rapporto molare con l'idrossiprolina.

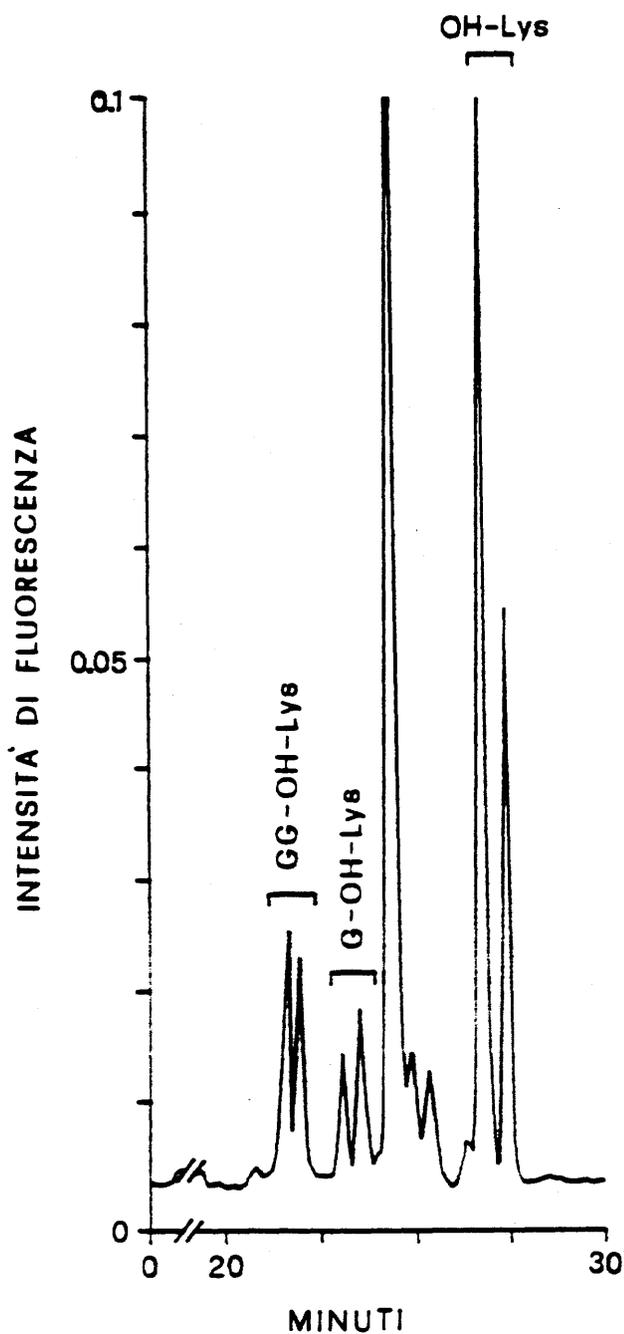


Figura 48: Profilo cromatografico dei glicosidi dell'idrossilisina (GG-OH-Lys, G-OH-Lys) e di idrossilisina (OH-Lys) in un tipico campione di idrolizzato d'osso derivatizzato con cloruro di dansile secondo la procedura descritta in Materiali e Metodi (GG-OH-Lys: I picco = monodansile; II picco = didansile; G-OH-Lys: I picco = monodansile; II picco = didansile; OH-Lys: I picco = monodansile; II picco = didansile).

### b) Dosaggio dei *cross-links* del piridinio

La determinazione dei *cross-links* del piridinio è stata effettuata tramite HPLC in fluorescenza.

Il sistema HPLC utilizzato (Beckman, System Gold) è lo stesso di quello descritto per la determinazione dei glicosidi dell'idrossilisina. Si sono usate una lunghezza d'onda di eccitazione di 297 nm e una lunghezza d'onda di emissione di 395 nm. Si è utilizzata una colonna a fase inversa (Beckman, C<sub>18</sub> XL-ODS) lunga 7 cm, con diametro interno di 4.6 mm, impaccata con particelle di diametro di 3 µm, fornita di precolonna. Si sono iniettati 100 µl di idrolizzato diluito 1:30 con una soluzione acquosa di acido n-eptafluorobutirrico (HFBA) all'1%.

La fase mobile è costituita da due solventi: A e B. Il solvente A è costituito da cloruro d'ammonio 20 mM, EDTA 0.6 mM e 0.13% HFBA, portato a pH 2 con HCl. Il solvente B è acetonitrile. La piridinolina (PID) e la deossipiridinolina (DPD) sono state separate in condizioni isocratiche usando il 9% di solvente B ad una velocità di flusso di 1 ml/min (Figura 49).

Le concentrazioni dei *cross-links* del piridinio sono state determinate utilizzando PID e DPD estratti da urine e calibrati in base ad uno standard gentilmente fornito dal Dr. D. Uebelhart (Università di Ginevra). Poiché il contenuto dell'idrossiprolina dell'osso corticale e trabecolare non è significativamente diverso in entrambi i sessi (Tabella 7), i risultati sono stati espressi come rapporto molare con l'idrossiprolina (somma delle moli dei *cross-links* del piridinio (PID + DPD) per mole di idrossiprolina).

### c) Dosaggio dell'idrossiprolina

Il metodo utilizzato per il dosaggio dell'idrossiprolina (Hyp) prevede una semplice e rapida fase preanalitica e una cromatografia isocratica [Teerlink et al., 1989].

La fase preanalitica comporta, dopo idrolisi acida, la derivatizzazione con orto-ftalaldeide (OPA) per bloccare i gruppi amminici primari e con fluorenilmetossicarbonilcloruro (FMOC-Cl) per derivatizzare, successivamente, gli amminoacidi con gruppi amminici secondari, tra cui appunto l'idrossiprolina.

Per la derivatizzazione dei campioni si è utilizzata la seguente procedura: a 50 µl di campione sono stati aggiunti 50 µl di standard interno (deidroprolina 300 µM) e 200 µl di borato di sodio 0.6 M; dopo agitazione sono stati aggiunti 50 µl di soluzione di 2-mercaptoetanolo 0.75 M in acetonitrile e 50 µl di

soluzione di OPA 0.37 M in acetonitrile. I campioni sono stati agitati per 10 secondi e poi lasciati riposare per 5 minuti; in seguito sono stati trattati con 100  $\mu$ l di una soluzione di iodoacetamide 0.75 M in acetonitrile. Dopo ulteriore agitazione sono stati aggiunti 75  $\mu$ l di una soluzione 5 mM di FMOC-Cl, si è agitato nuovamente, quindi si è lasciato a riposo per 10 minuti. Infine sono stati aggiunti 10 ml di acqua distillata. Si sono iniettati 20  $\mu$ l.

Il sistema HPLC è lo stesso utilizzato per la determinazione dei glicosidi dell'idrossilisina. Si sono impiegate una lunghezza d'onda di eccitazione di 260 nm e una lunghezza d'onda di emissione di 330 nm. Si è utilizzata una colonna a scambio anionico forte (Whatman, Partisphere SAX) lunga 11 cm, con diametro interno di 4.7 mm, impaccata con particelle di diametro di 5 $\mu$ m, fornita di precolonna.

La fase mobile è costituita da 7 ml di formiato d'ammonio 2 M a pH 3.7, 200 ml di acetonitrile, 100 ml di 2-propanolo, portata a volume di 1000 ml con acqua distillata. La separazione dei composti avviene in condizioni isocratiche, a flusso di 1 ml/min (Figura 50).

La concentrazione dell'idrossiprolina ( $\mu$ mol/L) è calcolata in base al rapporto tra l'altezza del picco della stessa e l'altezza del picco dello standard interno.

### *Statistica*

Le differenze statistiche tra i gruppi sono state valutate applicando il *test di Student* per coppie di dati non appaiati.

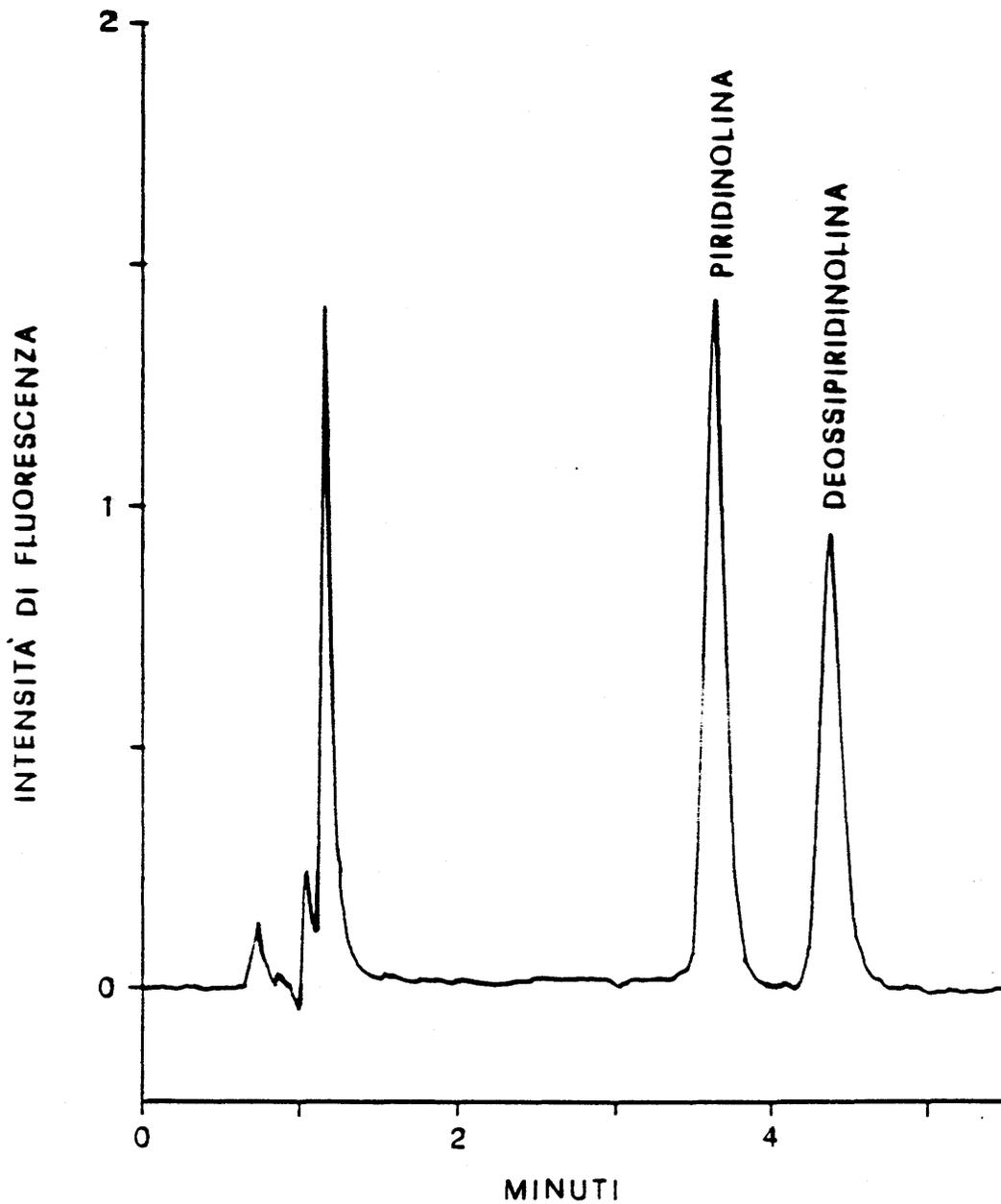


Figura 49: Profilo cromatografico dei *cross-links* del piridinio (piridinolina e deossipiridinolina) in un tipico campione di idrolizzato d'osso.

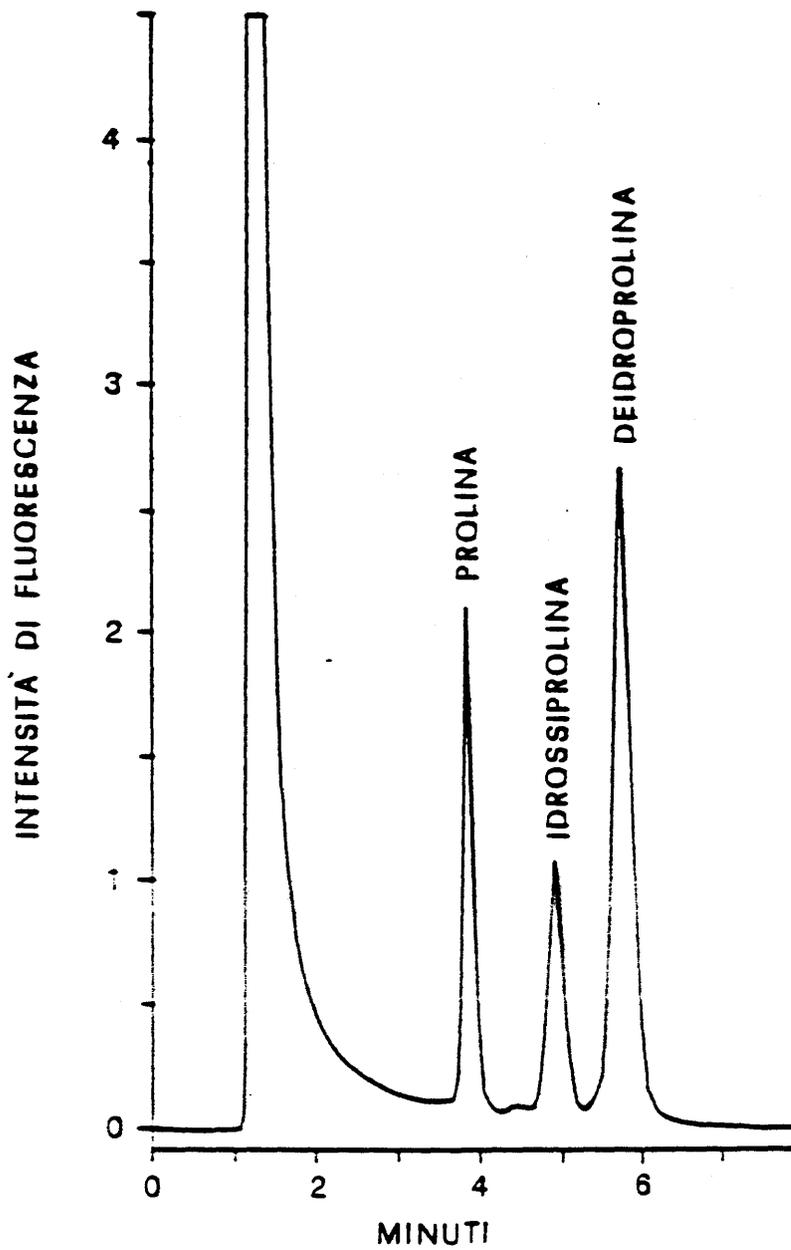


Figura 50: Profilo cromatografico dell'idrossiprolina in un tipico campione di idrolizzato d'osso derivatizzato secondo la procedura descritta in Materiali e Metodi.

### 5.2.3 Risultati

#### *Idrossilazione della prolina*

La Figura 50 mostra il profilo cromatografico dell'idrossiprolina in un tipico campione di idrolizzato d'osso derivatizzato seconda la procedura descritta in Materiali e Metodi. Il cromatogramma è completato in circa 6 minuti.

Il contenuto di idrossiprolina del collagene dell'osso corticale e trabecolare non è significativamente diverso in entrambi i sessi, come mostrato nella Tabella 7.

Tabella 7: Contenuto di idrossiprolina del collagene dell'osso corticale e trabecolare in ratti femmine e maschi.\*

	OSSO CORTICALE	OSSO TRABECOLARE
RATTI FEMMINE	0.50 ± 0.04	0.50 ± 0.06
RATTI MASCHI	0.51 ± 0.06	0.50 ± 0.04

\* I valori sono espressi come mmol/g di peso secco ± D.S.

#### *Idrossilazione della lisina e glicosilazione dell'idrossilisina*

La Figura 48 mostra il profilo cromatografico di un tipico campione di idrolizzato d'osso derivatizzato con cloruro di dansile. Il diglicoside dell'idrossilisina, essendo più polare, eluisce dalla colonna a fase inversa prima del monoglicoside. L'idrossilisina libera, composto ancora meno polare del monoglicoside, interagendo più saldamente con la fase stazionaria apolare, viene eluita per ultima. Tutti questi composti si presentano come un picco doppio poiché, in seguito all'idrolisi del campione, si ha la formazione dei loro racemi (D,L), quindi si formano i derivati mono e didansilati degli stessi. In base alle proprietà lipofile dei derivati, al confronto con standard di tipo racemico e a studi di spettrometria di massa, è stato stabilito che, nelle coppie di picchi, il primo picco rappresenta la forma monodansilata ed il secondo quella didansilata del composto in esame [Moro et al., 1984; Moro et al., 1989]. Come mostra il profilo di eluizione, l'area sottesa dal primo picco della coppia di picchi della GG-OH-Lys è maggiore di quella del secondo picco, mentre il contrario accade per la coppia di picchi della G-OH-Lys e dell'OH-

Lys. Ciò significa che, per quanto riguarda la GG-OH-Lys, la quantità di molecola didansilata risulta minore di quella della G-OH-Lys e dell'OH-Lys, a causa del maggiore ingombro sterico della porzione glucidica del diglicoside rispetto al monoglicoside e alla molecola non glicosilata. Essendo la curva di calibrazione basata sull'area dello standard esterno (lisina) che si presenta in forma didansilata, per calcolare la concentrazione dell'idrossilisina e dei glicosidi dell'idrossilisina si deve moltiplicare per 2 l'area del picco del monodansile e sommare a questa quella del picco del didansile. L'area totale così ottenuta viene utilizzata per estrapolare, sulla curva di taratura, la concentrazione dei tre composti.

Il contenuto di idrossilisina totale (idrossilisina + idrossilisina glicosilata) del collagene dell'osso corticale e trabecolare nei ratti femmina (Figura 51a) e nei ratti maschio (Figura 52a) non è significativamente diverso. Il contenuto di idrossilisina e di idrossilisina glicosilata è significativamente diverso nel collagene dell'osso corticale e trabecolare di entrambi i sessi. La molecola di collagene dell'osso corticale dimostra avere un più alto numero di residui di idrossilisina rispetto a quella dell'osso trabecolare (Figura 51b,  $p = 0.003$  per le femmine; Figura 52b,  $p = 0.02$  per i maschi). Al contrario, la glicosilazione dell'idrossilisina è più pronunciata nel collagene dell'osso trabecolare che in quello dell'osso corticale (Figura 51c,  $p = 0.001$  nelle femmine; e Figura 52c,  $p = 0.03$  nei maschi).

#### *Cross-links del piridinio*

La Figura 49 mostra il profilo cromatografico dei *cross-links* del piridinio di un tipico campione di idrolizzato d'osso. Come si può notare, i due composti risultano ben separati. La piridinolina, composto più polare, eluisce dalla colonna a fase inversa a un tempo inferiore rispetto a quello della deossipiridinolina. Il cromatogramma è completato in meno di 5 minuti.

Anche il contenuto di *cross-links* del piridinio del collagene dell'osso corticale e trabecolare risulta significativamente diverso in entrambi i sessi. Le Figure 51d e 52d mostrano che l'osso trabecolare contiene quantità di *cross-links* del piridinio più basse dell'osso corticale. La differenza statistica è altamente significativa per le femmine ( $p = 0.0001$ ) e raggiunge la significatività nei maschi ( $p = 0.04$ ).

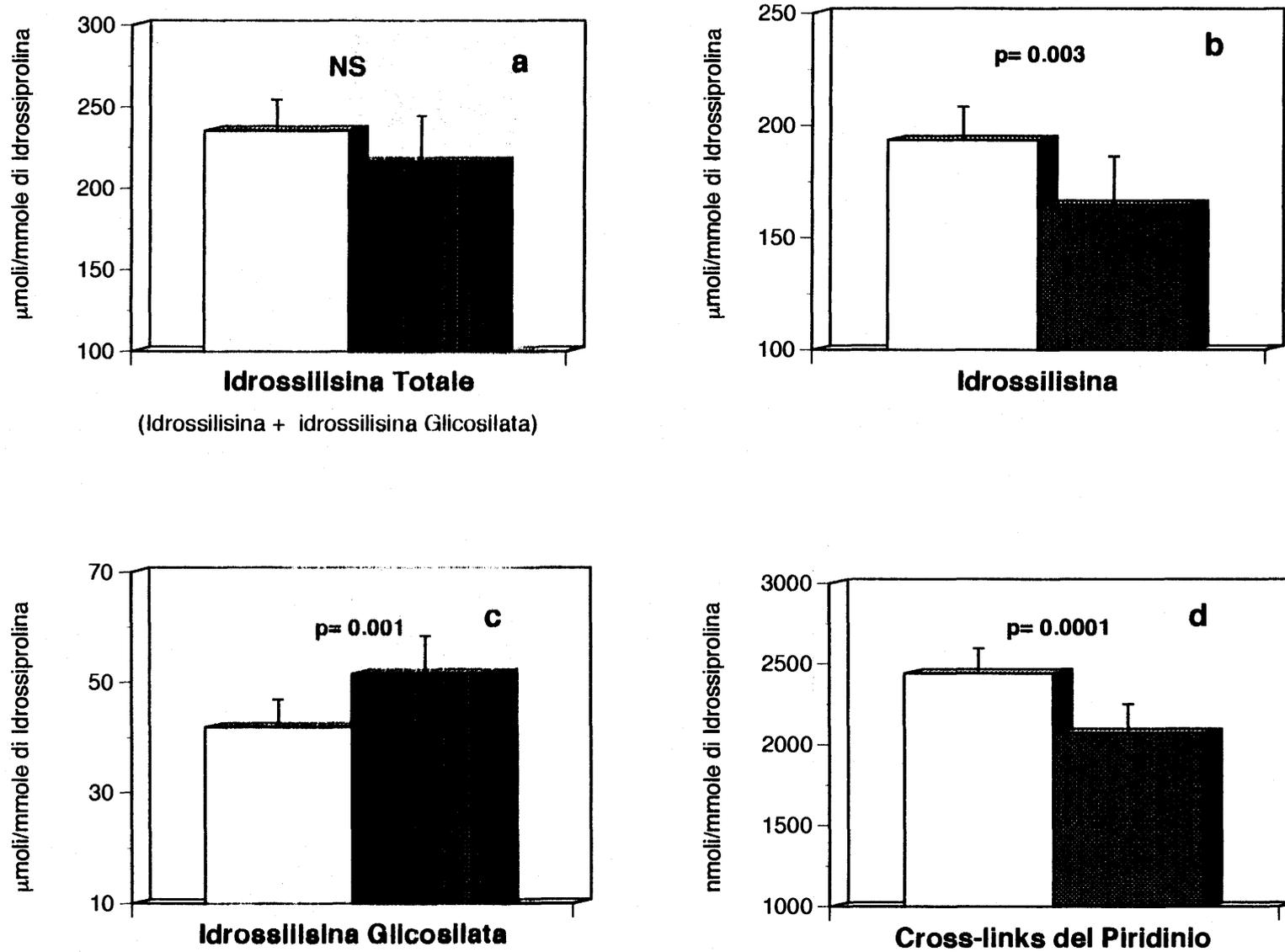


Figura 51: Modificazioni post-traduzionali del collagene dell'osso corticale (□) e trabecolare (■) nei ratti femmine.

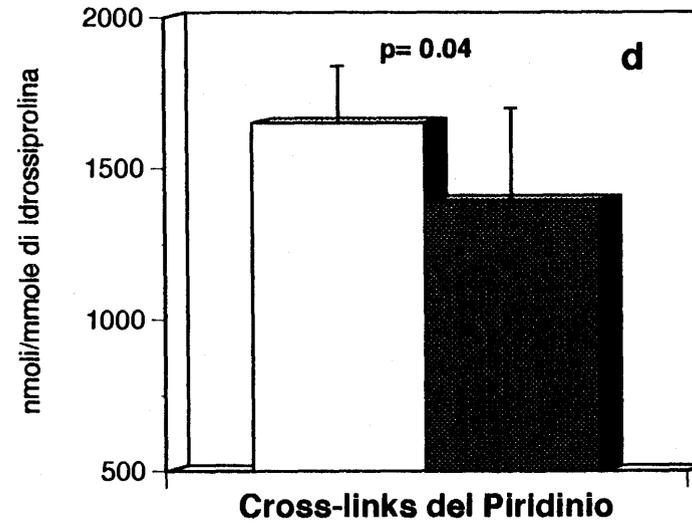
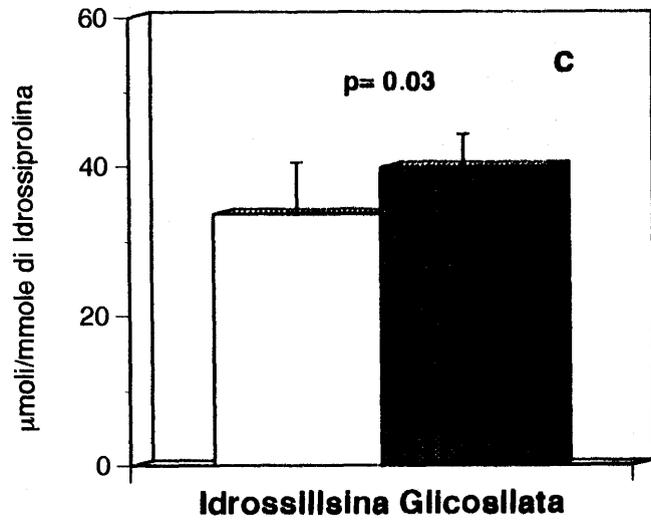
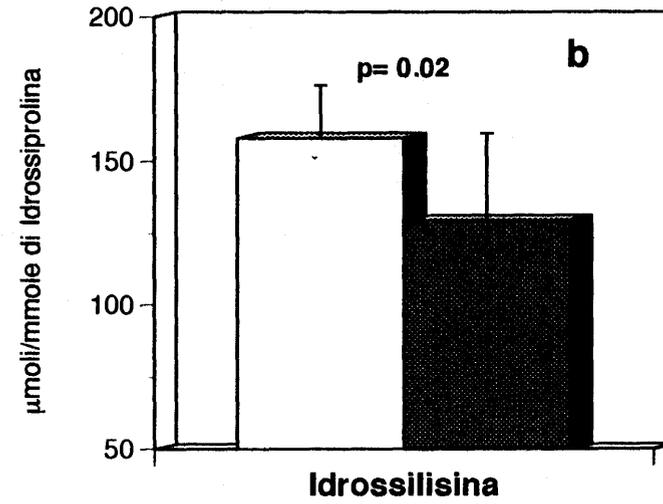
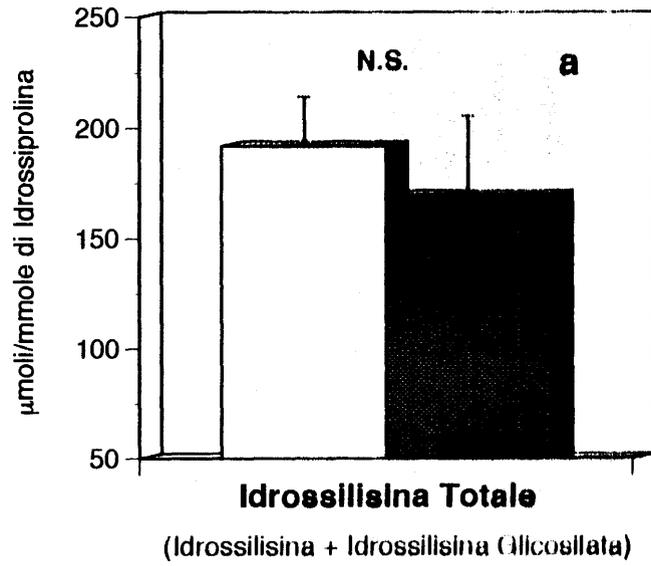


Figura 52: Modificazioni post-traduzionali del collagene dell'osso corticale (□) e trabecolare (■) nei ratti maschi.

### *Correlazione*

Esiste una correlazione, di tipo lineare inverso, tra idrossilisina glicosilata e *cross-links* del piridinio, come mostrato nella Figura 53a per i ratti femmina ( $r = -0.455$ ,  $p = 0.04$ ) e 53b per i ratti maschi ( $r = -0.426$ ,  $p = 0.06$ ).

### *Confronto del grado di modificazioni post-traduzionali tra i due sessi*

La Figura 54 mostra le differenze nel grado delle modificazioni post-traduzionali del collagene tra i due sessi (pannello superiore: osso trabecolare; pannello inferiore: osso corticale). Le femmine mostrano un grado di modificazioni post-traduzionali più alto dei maschi, come dimostrano le differenze statistiche che sono sempre significative fra i due gruppi.

### *Spessore delle fibre di collagene*

I dati ottenuti relativi ad un animale, sono riassunti nella Tabella 8. Essi dimostrano che non vi è una differenza statisticamente significativa tra lo spessore del collagene dei due compartimenti ossei in tutti i segmenti ossei esaminati. Si è dimostrata una differenza di valutazione nell'ambito degli operatori, probabilmente dovuta alla variabilità dello spessore del collagene in relazione alla striatura. I dati relativi agli altri 2 ratti sono analoghi (dati non mostrati).

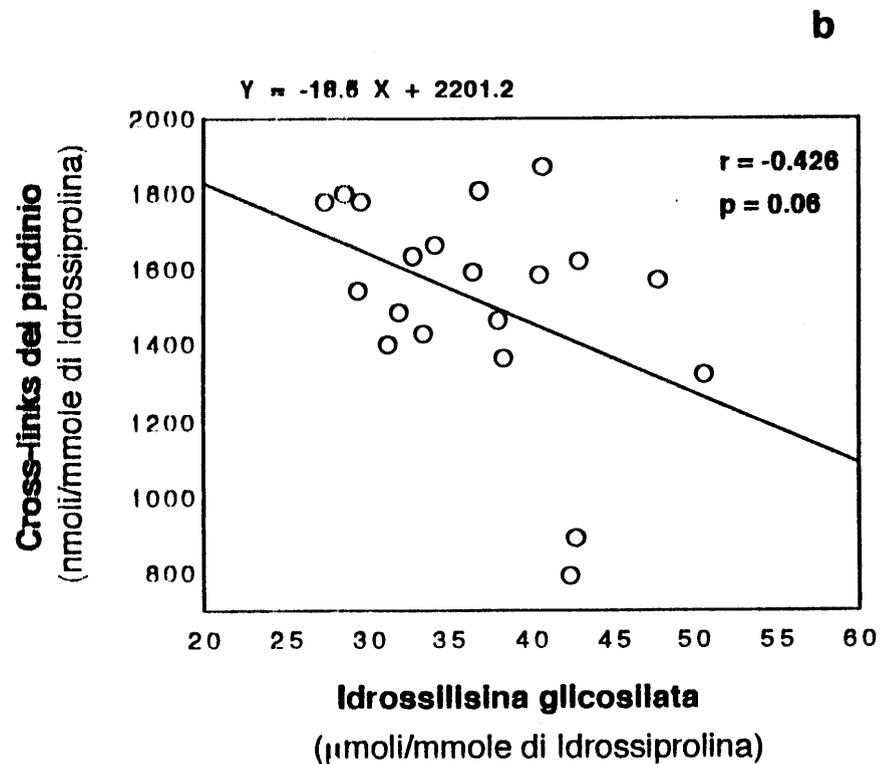
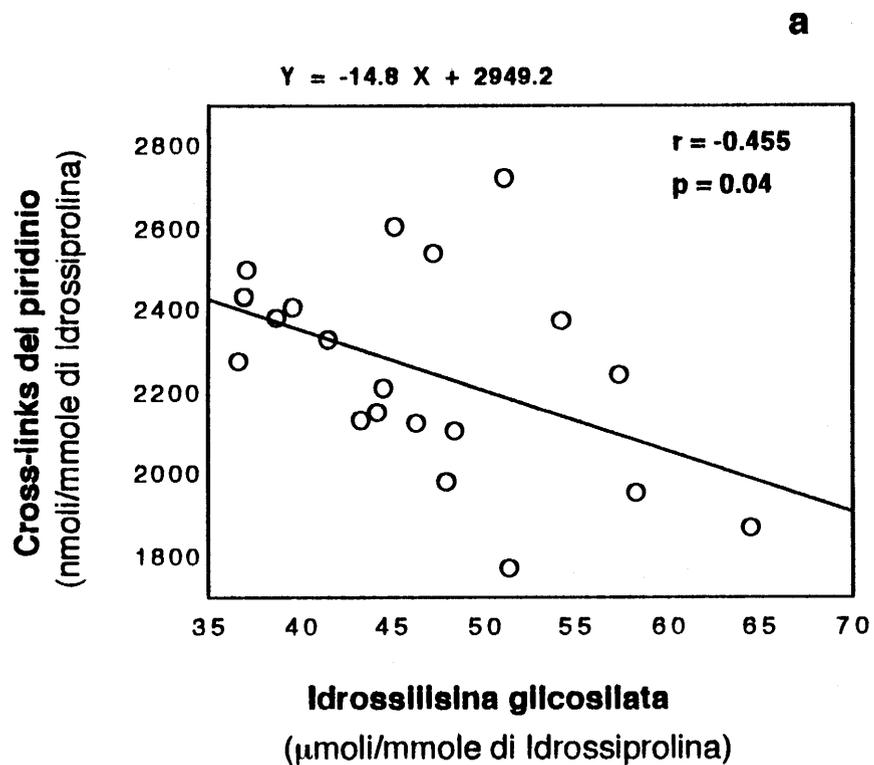


Figura 53: Correlazione tra glicosidi dell'idrossilisina e *cross-links* del piridinio nei ratti femmine (a) e nei ratti maschi (b).

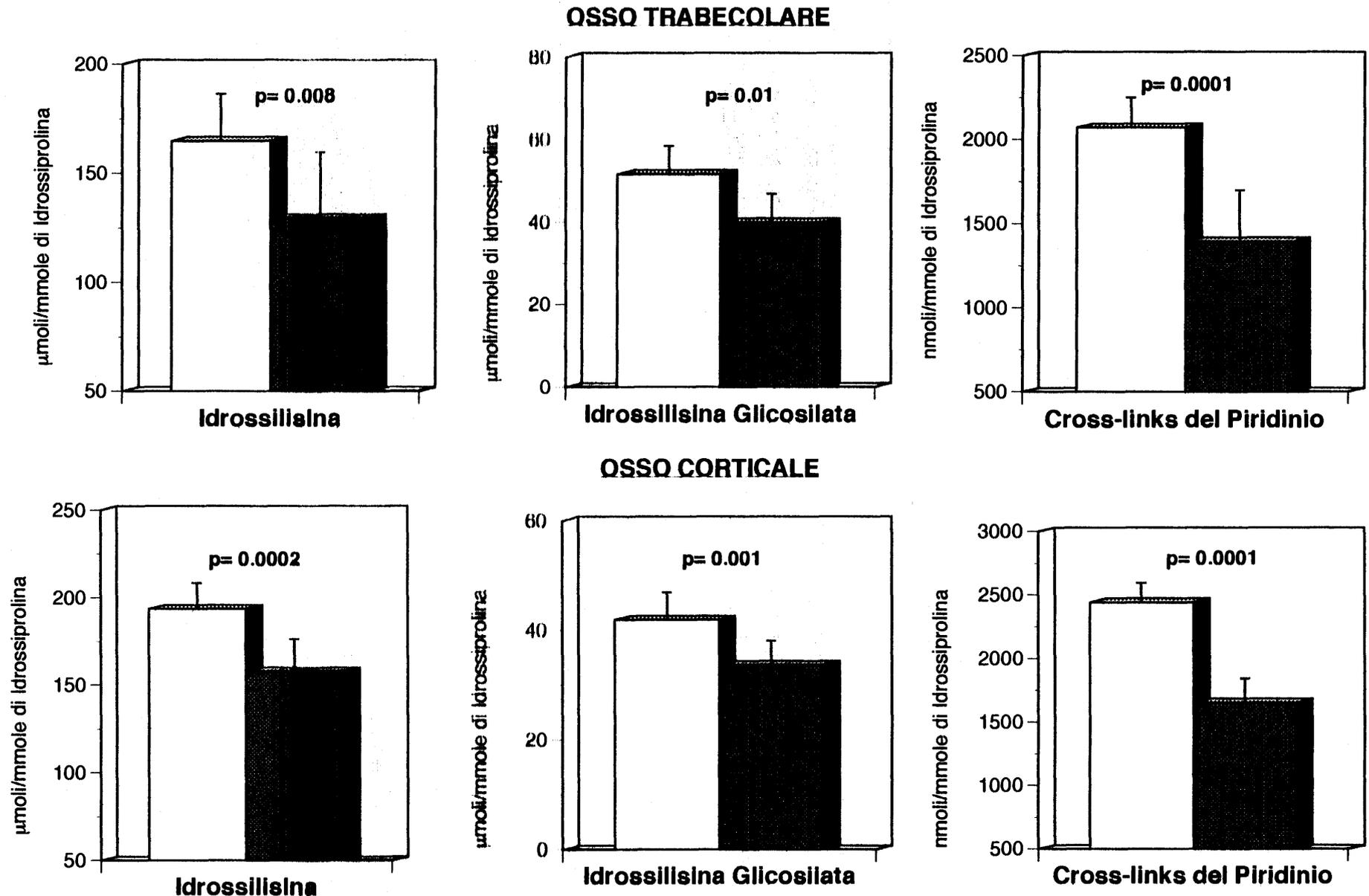


Figura 54: Modificazioni post-traduzionali del collagene dell'osso trabecolare (pannello superiore) e dell'osso corticale (pannello inferiore) nei ratti femmine (□) e nei ratti maschi (■).

Tabella 8: Diametro delle fibre di collagene dei due compartimenti ossei.

Campione	Media statistica (nm)	Deviazione standard
Tibia CORTICALE ds*	36.91	5.35
Tibia TRABECOLARE ds*	38.00	10.49
Tibia CORTICALE sn*	35.57	6.34
Tibia TRABECOLARE sn*	35.39	7.56
Femore CORTICALE ds*	34.60	6.86
Femore TRABECOLARE ds*	37.18	7.95
Femore CORTICALE sn*	36.62	7.30
Femore TRABECOLARE sn*	35.41	9.34
Tibia CORTICALE ds**	44.97	8.27
Tibia TRABECOLARE ds**	41.63	9.90
Tibia CORTICALE sn**	43.41	8.24
Tibia TRABECOLARE sn**	41.80	8.39
Femore CORTICALE ds**	42.96	13.91
Femore TRABECOLARE ds**	41.54	11.06
Femore CORTICALE sn**	43.53	10.03
Femore TRABECOLARE sn**	40.22	9.92

I campioni contrassegnati con (\*) sono stati esaminati da un operatore diverso da quello che ha esaminato i campioni contrassegnati con (\*\*). (ds = destro; sn = sinistro).

Le differenze fra i diametri delle fibre di collagene dei due compartimenti ossei nei corrispondenti frammenti non sono statisticamente significative.

#### 5.2.4 Discussione

In un lavoro precedente [Michalsky et al., 1993] in cui sono stati studiati gli effetti dell'ovariectomia sulla glicosilazione del collagene del tessuto osseo, non erano state evidenziate differenze statisticamente significative nel contenuto di galattosilidrossilisina e glucosilgalattosilidrossilisina tra collagene dell'osso trabecolare e corticale nei ratti sottoposti a falso intervento chirurgico. Nonostante la mancanza di significatività, comunque, si poteva notare una chiara tendenza verso una maggior glicosilazione del collagene dell'osso trabecolare rispetto a quello corticale.

In questa ricerca, aumentando il numero di animali e migliorando la procedura di purificazione dei campioni, si è potuto individuare un diverso grado di modificazioni post-traduzionali nell'osso corticale rispetto a quello trabecolare in entrambi i sessi, a 100 giorni di età. Inoltre, il grado di modificazioni post-traduzionali intracellulari sembra influenzare la quantità di *cross-links* non riducibili. Questo è suggerito dalla relazione lineare inversa tra i residui di idrossilisina glicosilata e le molecole di *cross-links* del piridinio che, comunque, raggiunge una differenza statisticamente significativa solo nelle femmine. Nei maschi, sebbene questa correlazione non raggiunga la significatività ( $p = 0.06$ ), poiché due valori stanno fuori dalla curva di correlazione (Figura 53b), si può osservare una certa tendenza verso la significatività.

Mentre il contenuto totale di idrossilisina (idrossilisina libera + idrossilisina glicosilata) non differisce fra i due compartimenti ossei, questi dati mostrano un aumento dell'idrossilisina glicosilata nell'osso trabecolare comparato a quello corticale (23% nelle femmine e 19% nei maschi). Al contrario, il contenuto di *cross-links* del piridinio nell'osso trabecolare è più basso di quello corticale (15% nelle femmine e 16% nei maschi). Questa osservazione è in accordo con recenti studi condotti su tessuto umano [Eyre et al., 1988] e nel ratto [Black et al., 1989], che mostrano che l'osso trabecolare contiene concentrazioni di *cross-links* più basse dell'osso corticale. Tuttavia, in questi lavori non era stata misurata l'idrossilisina glicosilata e quindi non si poteva stabilire una possibile relazione tra questi due composti. Per spiegare questa osservazione, i dati di letteratura sembrano essere contraddittori. Infatti, mentre è stato stabilito che la maggior parte dei *cross-links* nel collagene di diversi tessuti è glicosilata [Eyre & Glimcher, 1973; Robins and Bailey, 1973], l'idrossilisina glicosilata non sembra agire come substrato per la lisil ossidasi, quindi non può formare la corrispondente aldeide [Eyre et al., 1984] (Figura

10). Se così fosse, un più alto contenuto di idrossilisina glicosilata implicherebbe un più basso contenuto di idrossiallisina che è il composto di base per la formazione dei *cross-links* nel collagene (Figura 10). Comunque, questa osservazione può essere solo parzialmente spiegata sulla base di un'aumentata glicosilazione del collagene dell'osso trabecolare. Un'altra ragione potrebbe essere trovata considerando che l'osso trabecolare ha una velocità di *turnover* maggiore di quella dell'osso corticale [Eyre et al., 1988], perciò l'osso trabecolare non ha la stessa quantità di tempo per formare la stessa quantità di *cross-links* che si formano nell'osso corticale.

Da questo studio è emerso anche che il grado di modificazioni post-traduzionali intra ed extracellulari sono differenti tra i sessi, essendo maggiori tra le femmine rispetto ai maschi (Figura 54). Al momento non esistono evidenze dirette per spiegare questa osservazione, sebbene sia probabile che le differenze osservate possano essere il risultato della diversa influenza degli ormoni sessuali femminili e maschili sulla sintesi del collagene. Da questi dati, infatti, sembra che gli androgeni abbiano una maggiore capacità inibitoria sulle modificazioni post-traduzionali del collagene, quali la glicosilazione, rispetto agli estrogeni. Ancora non è possibile stabilire se questo effetto sia dovuto ad un'inibizione diretta degli ormoni sessuali sugli enzimi coinvolti nelle modificazioni post-traduzionali del collagene, o al fatto che gli ormoni sessuali promuovano l'accelerazione dell'avvolgimento delle catene  $\alpha$  nella tripla elica, che diminuirebbe il tempo d'azione degli stessi enzimi [Prockop & Kivirikko, 1979].

Importante sembra essere il fatto che questi risultati evidenziano significative differenze funzionali fra le fibre di collagene dell'osso corticale e trabecolare. Le analisi al microscopio elettronico hanno dimostrato che il diametro delle fibre del collagene dell'osso corticale è uguale a quello delle fibre dell'osso trabecolare. Sembra quindi che l'aumento del contenuto di idrossilisina osservato nell'osso corticale (15% nelle femmine e 18% nei maschi; Figura 51b e 52b) possa compensare la sovragelicosilazione dell'osso trabecolare (Figura 51c e 52c), portando così alla formazione di fibre dello stesso diametro. La maggior glicosilazione del collagene dell'osso trabecolare potrebbe però influenzare l'orientamento spaziale delle fibre. Al contrario, il più basso numero di *cross-links* del piridinio nel collagene dell'osso trabecolare (Figura 51d e 52d) suggerisce che le fibre hanno una minore stabilità [Bailey et al., 1974; Eyre et al., 1988; Bailey et al., 1993]. L'architettura della matrice nei due compartimenti ossei potrebbe quindi non

essere la stessa, poiché la matrice trabecolare risulterebbe meccanicamente sfavorita. La matrice dell'osso corticale invece, sembrerebbe essere più stabile, grazie al maggior numero di *cross-links* che le conferiscono una maggiore forza meccanica.

Queste considerazioni conducono alle relazioni tra matrice, minerale e proprietà meccaniche dell'osso. A questo proposito, i cambiamenti della matrice sono senza dubbio rilevanti per le proprietà meccaniche dell'osso [Landis, 1995a]. Per esempio Yang et al. [Yang et al., 1993b] hanno dimostrato che in topi alimentati con un'alta concentrazione di acido fulvico o con una dieta povera di selenio, si ha un aumentato grado di idrossilazione della lisina. Questa sovraindossilazione del collagene è associata ad una ridotta stabilità termica della proteina e ad una diminuita resistenza meccanica della tibia.

Dal modello animale sperimentale di Landis e McEven [Landis, 1995a] risulta ancora più chiara la relazione tra matrice, minerale e proprietà meccaniche dell'osso. Questo modello, in cui il principale componente organico della matrice è un collagene modificato, in quanto è un omotrimerico formato da tre catene  $\alpha_1$  di tipo I, mostra che le dimensioni, la forma e l'interazione dei cristalli con il collagene, sono diverse da quelle ritrovate nel tendine d'Achille del tacchino domestico usato come riferimento, la cui matrice contiene un collagene di tipo normale, determinando la formazione di un osso più fragile se confrontato con quello normale. Ciò dimostra che la natura molecolare della matrice organica influenza le caratteristiche della fase minerale, alterando in tal modo la resistenza meccanica e le caratteristiche biologiche dell'osso.

D'altra parte Batge e coautori [Batge et al., 1992] hanno dimostrato che il grado di idrossilazione della lisina della catena  $\alpha_2(I)$  del collagene, correla inversamente con il volume trabecolare osseo (TBV) e con la densità media del piatto trabecolare. Inoltre, gli stessi autori hanno dimostrato che il rapporto tra contenuto di idrossilisina e TBV è più alto in donne in postmenopausa che in donne in premenopausa ed è ancora più alto in donne con osteoporosi conclamata.

Infine, Bailey e coautori [Bailey et al., 1992] hanno dimostrato che il collagene della testa del femore di soggetti osteoporotici presenta un incremento del 39% nel grado di idrossilazione della lisina rispetto a quello di soggetti normali. Dunque, senza dubbio, l'architettura della matrice ha rilevanza nel determinare le proprietà biomeccaniche dell'osso.

Sulla base delle considerazioni sopra citate e dal momento che qualunque alterazione nelle dimensioni e nella forza di torsione della fibra di collagene può influenzare il sito di nucleazione per la formazione del minerale [Glimcher, 1976; Landis, 1995a; Landis et al., 1995b], sembra logico aspettarsi che anche la componente minerale dell'osso corticale e trabecolare sia diversa.

In conclusione, i risultati di questo studio mostrano che, nel ratto, il collagene dell'osso corticale presenta un grado di modificazioni post-traduzionali diverso da quello dell'osso trabecolare, portando alla formazione di una matrice organizzata in maniera diversa nei due compartimenti. Di conseguenza, anche il tipo di minerale che si associa a questa matrice potrebbe non essere lo stesso nei due compartimenti, determinando la formazione di un osso corticale funzionalmente diverso da quello trabecolare. Così, le differenze funzionali nei due compartimenti ossei potrebbero essere determinate da differenze strutturali sia nella matrice che nella fase minerale. Questo è stato lo spunto per lo studio successivo.

## 5.3 CARATTERIZZAZIONE CHIMICA E STRUTTURALE DELLA FASE MINERALE DELL'OSSO CORTICALE E TRABECOLARE NEL RATTO

### 5.3.1 Introduzione

La fase minerale dell'osso è costituita da idrossiapatite (HA) a basso grado di cristallinità, caratterizzata dalla presenza di numerosi ioni estranei (Capitolo 1.1.3) [Posner, 1969; Pugliarello et al., 1973; Baud & Very, 1982]. Tra gli ioni bivalenti che possono essere associati alle apatiti biologiche, il magnesio riveste un'importanza notevole, in virtù della sua quantità e del suo fondamentale ruolo strutturale sull'idrossiapatite [LeGeros & LeGeros, 1984; Bigi et al., 1993]. Infatti il magnesio, che può sostituire il calcio nella struttura dell'HA fino a circa 10 atomi % [Bigi et al., 1995] ed è noto inibire la cristallizzazione dell'idrossiapatite in soluzione [Posner et al., 1984], quando associato all'HA ne destabilizza la struttura e favorisce la sua conversione termica in  $\beta$ -tricalcio fosfato ( $\beta$ -TCP) [Bigi et al., 1988a; Bigi et al., 1992; Bigi et al., 1993]. Nei tessuti calcificati, la quantità di magnesio associata alla fase apatitica è più alta all'inizio del processo di calcificazione e diminuisce all'aumentare della calcificazione [Burnell et al., 1980; Bigi et al., 1988a; Bigi et al., 1992]. Inoltre, le apatiti biologiche di solito contengono quantità apprezzabili di carbonato. Come già detto (Capitolo 1.1.3), la struttura dell'HA può ospitare ioni carbonato in due diversi siti: il sito A, dove essi sostituiscono gli ioni  $\text{OH}^-$ , e il sito B, dove essi sostituiscono i gruppi  $\text{PO}_4^{3-}$  [LeGeros et al., 1967; Bonel, 1972; Elliott, 1980]. La presenza del carbonato, che nelle apatiti biologiche di solito occupa i siti B, può ridurre l'effetto destabilizzante che alcuni ioni, come il magnesio, hanno sulla struttura dell'HA [Baravelli et al., 1984; Apfelbaum et al., 1990]. Le apatiti biologiche di differenti tessuti calcificati normali e patologici, mostrano composizione chimica, cristallinità e stabilità diverse [Baud & Very, 1982; Rey et al., 1990]. Tra i fattori che influenzano il processo di mineralizzazione, la dimensione dei cristalli gioca un ruolo importante, poiché essa determina l'area superficiale e, di conseguenza, influenza la stechiometria e la solubilità delle apatiti biologiche [Arsenault & Grynepas, 1988]. Nei tendini calcificati e nelle ossa in condizioni fisiologiche, il contenuto di magnesio diminuisce, mentre il contenuto di carbonato, il rapporto molare Ca/P, le dimensioni dei cristalliti e la stabilità dell'HA aumentano all'aumentare della calcificazione [Burnell et

al., 1980; Grinpas et al., 1984; Bigi et al., 1992; Roberts et al., 1992]. Inoltre, l'analisi biochimica dell'osso in fase di maturazione rivela un progressivo aumento del contenuto di minerale e una relativa diminuzione di matrice ossea, sebbene la quantità di collagene nella matrice aumenti [Burnell et al., 1980; Landis et al., 1995b]. Poiché le fibrille di collagene rappresentano le macromolecole strutturali dei tessuti collagenici calcificati, le differenze osservate nella fase minerale potrebbero essere correlate alle modificazioni del collagene. Nell'*Osteogenesis imperfecta* di tipo II la diminuzione del contenuto di collagene, che porta a una struttura collagenica anormale, è associata ad un'anormale mineralizzazione ossea [Cohen-Solal et al., 1994]. Inoltre è stato trovato che, nell'*Osteogenesis imperfecta*, il rapporto molare Ca/P e le dimensioni dei cristalli di idrossiapatite associati al collagene sono minori che nel collagene normale [Vetter et al., 1991; Cassella & Yousuf Ali, 1992]. Infine, nell'osso osteoporotico di donne in postmenopausa con bassa densità minerale, trattate con sistemi sottocutanei a rilascio controllato di estrogeni, è stata trovata una relazione diretta tra la concentrazione di *cross-links* del piridinio e la densità minerale ossea [Holland et al., 1994].

Lo studio descritto precedentemente ha evidenziato, nel ratto, che il collagene del compartimento osseo corticale ha un grado di modificazioni post-traduzionali diverso da quello del collagene dell'osso trabecolare. L'osso corticale contiene una maggiore quantità di residui di idrossilisina e di *cross-links* del piridinio, mentre l'osso trabecolare mostra una maggiore quantità di idrossilisina glicosilata. Il minor contenuto di *cross-links* del piridinio nel collagene dell'osso trabecolare suggerisce che le fibrille hanno una ridotta stabilità, mentre la matrice del compartimento corticale sembrerebbe essere più stabile, visto il maggior numero di *cross-links* non riducibili che conferiscono forza meccanica alla struttura ossea. Queste scoperte, che come già detto non sono sorprendenti viste le differenti funzioni svolte dai due compartimenti ossei, e il fatto che qualunque alterazione nella dimensione e nella forza di tensione delle fibrille di collagene potrebbe influenzare il sito di nucleazione per la formazione del minerale [Glimcher, 1976], hanno portato ad ipotizzare l'esistenza di differenze nelle fasi minerali, determinate dalle diverse matrici collageniche.

Per verificare l'influenza del grado di modificazioni post-traduzionali del collagene sulle proprietà della fase inorganica, è stato condotto questo studio di caratterizzazione chimica e strutturale delle fasi minerali isolate dai compartimenti ossei corticale e trabecolare del ratto. I risultati ottenuti mettono

in evidenza parecchie differenze che possono essere interpretate come il risultato di differenti gradi di maturazione dei due compartimenti.

Questa ricerca, che analizza la fase minerale dei due compartimenti ossei, si può considerare la continuazione della precedente, giungendo così a una caratterizzazione biochimica completa del tessuto osseo nei due compartimenti in condizioni fisiologiche.

### 5.3.2 Materiali e Metodi

#### *Animali utilizzati*

Si sono utilizzati 10 ratti femmina di ceppo Sprague-Dawley di 100 giorni di età. Gli animali sono stati sacrificati e si sono prelevati le tibie e i femori che sono stati ripuliti dai tessuti molli e dai muscoli.

#### *Preparazione dei campioni*

I campioni ossei sono stati suddivisi in due aree anatomicamente distinte: le diafisi contenenti solo osso corticale e le metafisi, da cui è stato raschiato l'osso trabecolare. L'osso corticale è stato frammentato, dopo avere strappato il periostio dalle diafisi.

I campioni liofilizzati sono stati macinati in un mortaio di agata per alcuni minuti, per evitare il surriscaldamento. Le polveri sono state successivamente setacciate ad un diametro medio compreso tra 0.18 e 0.32 mm. Ciascuno dei due *pools* di osso corticale e trabecolare è stato diviso in sei differenti campioni che sono poi stati esaminati separatamente.

L'analisi della fase inorganica è stata condotta su campioni di osso corticale e trabecolare deproteinati con idrazina ( $N_2H_4$ ) [Bigi et al., 1992], che, in accordo con Termine J.D. et al. [Termine et al., 1973], non induce alterazioni nelle proprietà strutturali della fase minerale.

#### *Analisi di diffrazione di raggi-X*

I diagrammi di diffrazione su polveri dei campioni deproteinati, sono stati registrati con un diffrattometro automatico Philips PW 1050/81, dotato di un monocromatore di grafite sul raggio diffratto. Si è utilizzata la radiazione  $K\alpha$  del rame ( $\lambda = 0.154$  nm). Lo schema dello strumento è riportato in Figura 55.

È stato esplorato il campo di  $2\theta$  compreso tra  $10^\circ$  e  $65^\circ$  alla velocità di scansione di  $0.5^\circ/\text{min}$ . Le costanti reticolari sono state determinate dai dati di diffrazione con un programma di calcolo apposito basato sul raffinamento, con

il metodo dei minimi quadrati, dei valori angolari di un numero di riflessi variabile da 3 a 15, ottenuti nel campo di  $2\theta$  appena citato.

Il riconoscimento delle fasi cristalline è stato effettuato confrontando i diffrattogrammi con le schede della "Joint Committee on Powder Diffraction Standards" relative ai composti inorganici.

Al fine di calcolare le dimensioni e la cristallinità dei cristalliti, ulteriori dati di diffrazione di raggi-X sono stati ottenuti in due regioni: picco (002) compreso nel campo di  $2\theta$  fra  $24.4^\circ$  e  $27.4^\circ$  e picco (310) compreso nel campo di  $2\theta$  fra  $37.4^\circ$  e  $41.5^\circ$ , tramite scansione graduale usando un periodo di tempo di conteggio fisso di 30 secondi e una velocità di scansione di  $0.1^\circ/\text{intervallo}$ .

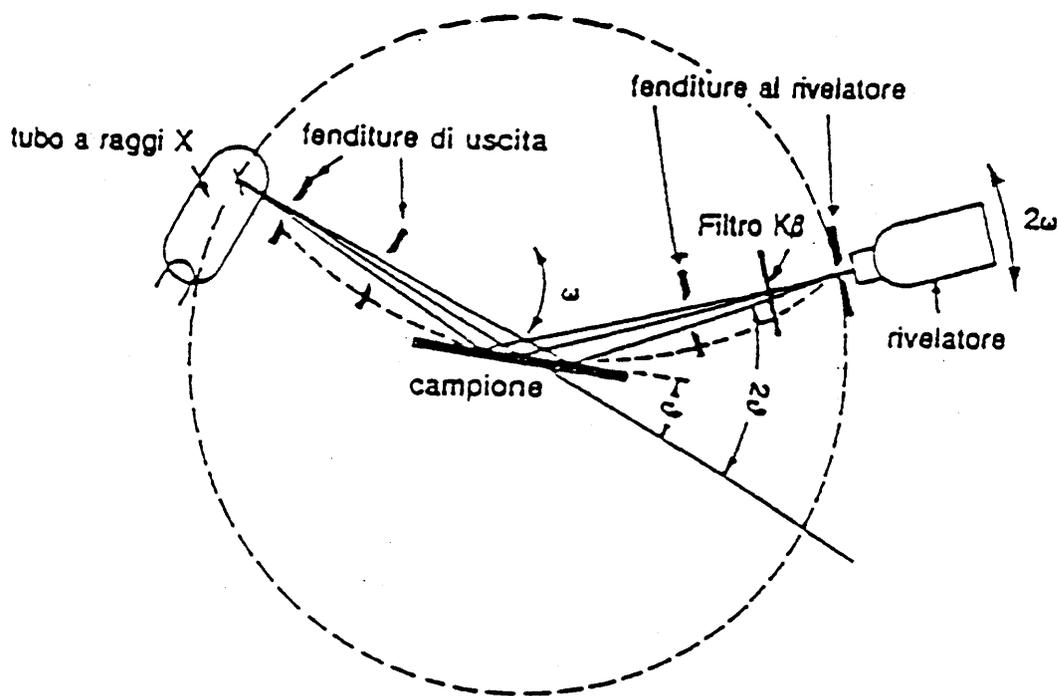


Figura 55: Schema di un diffrattometro di raggi-X.

### *Spettroscopia ad assorbimento infrarosso (IR)*

I campioni sono stati preparati mescolando 1 mg di sostanza a 300 mg di KBr (ad uso spettroscopico) e pressando la miscela ad 8 atm per 3 minuti.

Gli spettri di assorbimento infrarosso sono stati registrati impiegando uno spettrofotometro a reticolo Perkin-Elmer mod. 380. La registrazione è stata operata nel campo compreso fra  $4000\text{ cm}^{-1}$  e  $400\text{ cm}^{-1}$ , ad una velocità di scansione di  $72\text{ cm}^{-1}/\text{min}$ .

### *Analisi termogravimetrica*

L'analisi termogravimetrica è stata condotta sui campioni polverizzati usando una termobilancia Perkin Elmer mod. TG-7 fornita di un sistema di elaborazione elettronica dei dati P.E. 3700.

Il riscaldamento è stato condotto utilizzando un crogiolo di platino, con un flusso d'aria di  $20\text{ cm}^3/\text{min}$  ad una velocità di  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  fino a  $900^\circ\text{C}$ . I pesi dei campioni erano compresi nell'intervallo 5-10 mg.

### *Spettroscopia ad assorbimento atomico*

Il contenuto di calcio e magnesio nei campioni è stato determinato tramite spettrofotometria ad assorbimento atomico, utilizzando uno spettrofotometro Perkin Elmer 373 e una coppia di lampade a catodo cavo Cathodeon alimentate con una corrente di  $4\text{ mA}$  nel caso del calcio e  $2.7\text{ mA}$  nel caso del magnesio. L'assorbanza delle soluzioni è stata misurata aspirandole alla velocità costante di  $5\text{ ml}/\text{min}$  e nebulizzandole su una fiamma aria-acetilene (rapporto di flusso 55/32), ad una  $\lambda$  che assume il valore di  $422.7\text{ nm}$  e  $285.2\text{ nm}$  per il calcio e il magnesio rispettivamente; il raggio incidente è stato collimato attraverso una fenditura di  $0.7\text{ mm}$ .

Si è integrato il segnale elettronicamente in un tempo di 5 sec; per ogni campione sono state effettuate 6 letture ad intervalli successivi di 5 sec, facendo la media dei valori ottenuti. La preparazione delle soluzioni è stata condotta nel modo seguente:

- circa 0.01 g di tessuto, ridotto a cenere, sono stati solubilizzati in 12 ml di HCl 2 N e diluiti a 100 ml con acqua bidistillata;
- 1 ml di questa soluzione è stato mescolato con 2 ml di una soluzione di  $\text{La}^{3+}$  al 10%, in HCl 6 N e diluito a 25 ml con acqua bidistillata.

Il lantanio è stato aggiunto allo scopo di minimizzare le interferenze dovute alla formazione di fosfati poco volatili dei due metalli in esame.

La determinazione della concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  è infine stata effettuata utilizzando rette di taratura, costruite misurando l'assorbanza di soluzioni ottenute da diluizioni successive di soluzioni standard dei due ioni nell'intervallo di concentrazioni:  $1.0 \cdot 10^{-6}$  g/ml -  $4.0 \cdot 10^{-6}$  g/ml per il  $\text{Ca}^{2+}$ ;  $0.1 \cdot 10^{-6}$  g/ml -  $1.0 \cdot 10^{-6}$  g/ml per il  $\text{Mg}^{2+}$ .

Dall'assorbanza di ogni campione è stata sottratta quella di una soluzione contenente le stesse concentrazioni finali di tutti i reagenti utilizzati per la preparazione dei campioni stessi.

### *Spettroscopia ultravioletta*

Lo ione fosfato è stato determinato per via spettrofotometrica come acido molibdo-vanado-fosforico [Quinlan & De Sesa, 1955].

Si sono effettuate le misure di assorbanza utilizzando uno spettrofotometro Varian Techtron mod. 635 e una coppia di celle al quarzo di 1 cm di lato, operando a  $\lambda = 400$  nm e con una fenditura di 0.2 mm.

Le soluzioni sono state preparate nel modo seguente:

- circa 0.037 g di campione sono stati sciolti in 5 ml di  $\text{HClO}_4$  8 M e portati a 100 ml con acqua bidistillata;
- 10 ml di questa soluzione sono stati addizionati di 10 ml di ammonio metavanadato [ $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ] 0.020 M, 20 ml di ammonio molibdato tetraidrato [ $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ] 0.20 M, 4.5 ml di  $\text{HClO}_4$  8 N.

Le concentrazioni dei campioni sono state determinate utilizzando una retta di taratura ottenuta misurando l'assorbanza di soluzioni diversamente diluite partendo da una soluzione di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.014 M. Come riferimento si è utilizzata una soluzione contenente le stesse concentrazioni finali di tutti i reagenti utilizzati per la preparazione dei campioni stessi.

### **5.3.3 Risultati**

Il contenuto di fase inorganica dei campioni è stato determinato dai risultati dell'analisi termogravimetrica. I diagrammi di termogravimetria-termogravimetria differenziale (TG-DTG) registrati dai campioni polverizzati mostrano tre processi termici che sono stati identificati [Bigi et al., 1991] come segue: perdita di  $\text{H}_2\text{O}$  tra 25 e 250°C; decomposizione del collagene e combustione dei componenti organici residui tra 250 e 450°C; rimozione degli ioni carbonato dalla fase inorganica tra 700 e 800°C (Figura 56). Mentre i picchi di temperatura mostrati dai campioni di osso corticale e trabecolare non

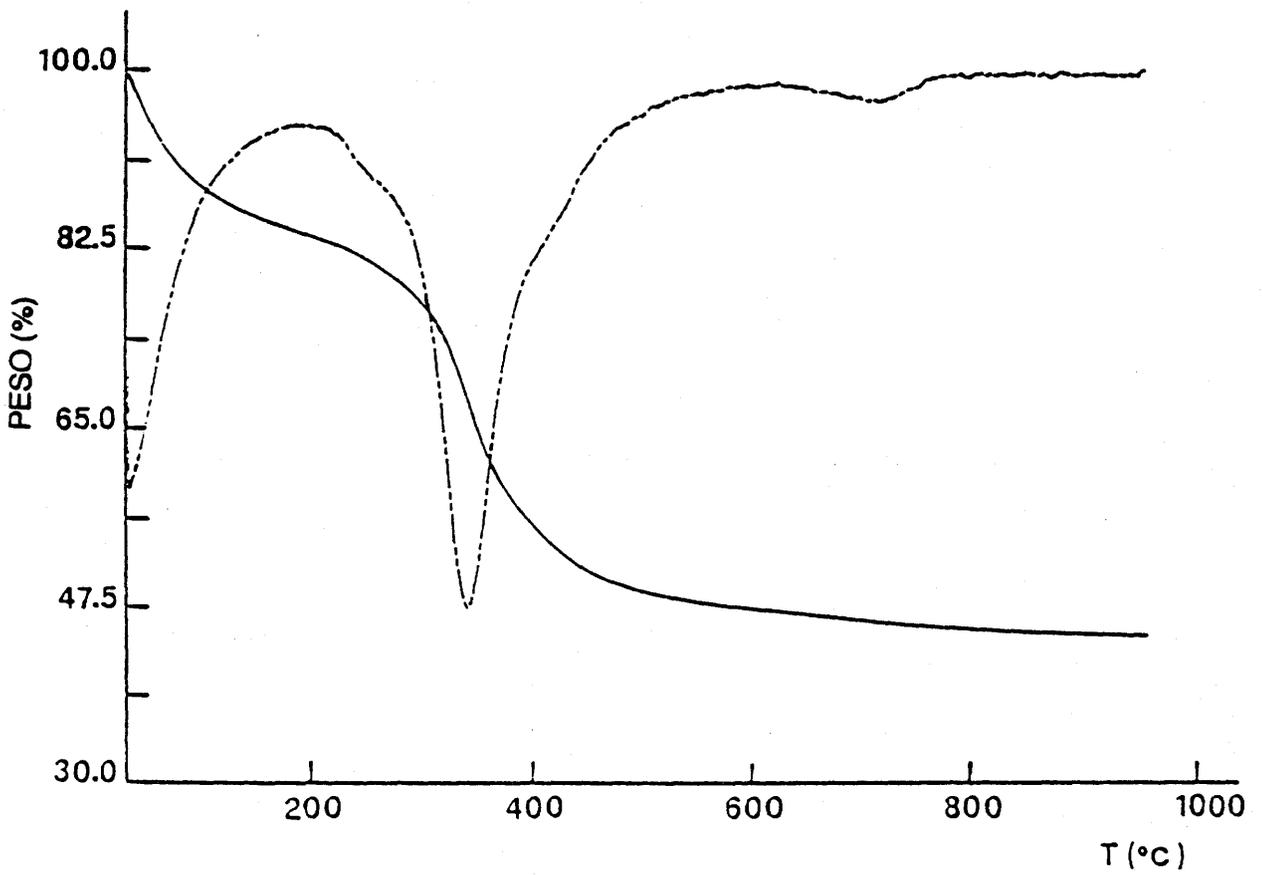


Figura 56: Diagramma di termogravimetria-termogravimetria differenziale (TG-DTG) di un campione di osso trabecolare.

differiscono in maniera apprezzabile, le perdite di peso associate con i diversi picchi permettono di determinare un contenuto di fase inorganica di  $62.0 \pm 0.3\%$  per il compartimento trabecolare e di  $66.4 \pm 0.3\%$  per il compartimento corticale, come riportato nella Tabella 9. Inoltre, il contenuto di carbonato rende conto del  $2.3 \pm 0.2\%$  della fase inorganica presente nell'osso corticale e del  $3.8 \pm 0.2\%$  della fase inorganica presente nell'osso trabecolare (Tabella 9).

Tabella 9: Contenuto di fase inorganica, carbonato, magnesio e rapporto molare Ca/P dell'osso corticale e trabecolare. Ciascun valore rappresenta la media  $\pm$  DS di 6 campioni.

	Contenuto di fase inorganica (% in peso)	Contenuto di $CO_3^{2-}$ (% in peso)	Contenuto di $Mg^{2+}$ (% in atomi)	Ca/P (rapporto molare)
Trabecolare	$62.0 \pm 0.3$	$2.3 \pm 0.2$	$3.6 \pm 0.2$	$1.50 \pm 0.2$
Corticale	$66.4 \pm 0.3$	$3.8 \pm 0.2$	$3.7 \pm 0.2$	$1.63 \pm 0.2$
	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p > 0.2$	$p < 0.001$

Le fasi inorganiche isolate sia dai campioni di osso corticale che da quelli di osso trabecolare mostrano diagrammi di diffrazione di raggi-X su polveri caratteristici dell'idrossiapatite a basso grado di cristallinità (Figura 57).

I diagrammi di diffrazione di raggi-X a scansione registrati nell'intorno dei riflessi (002) e (310) sono stati utilizzati per valutare la dimensione media dei cristalliti. I valori di D, che sono relazionati alla grandezza dei cristalli di HA sia nella dimensione più lunga (002) che in sezione trasversale (310), sono stati calcolati dall'ampiezza a metà altezza del riflesso preso in considerazione ( $\beta_{1/2}$ ) usando l'equazione di Sherrer [Alexander et al., 1969]:

$$D = \frac{K \lambda}{\beta_{1/2} \cos \vartheta}$$

dove  $\lambda$  è la lunghezza d'onda dei raggi-X e  $\vartheta$  l'angolo di diffrazione. K è una costante correlata con la forma del cristallo e scelta uguale a 0.9.

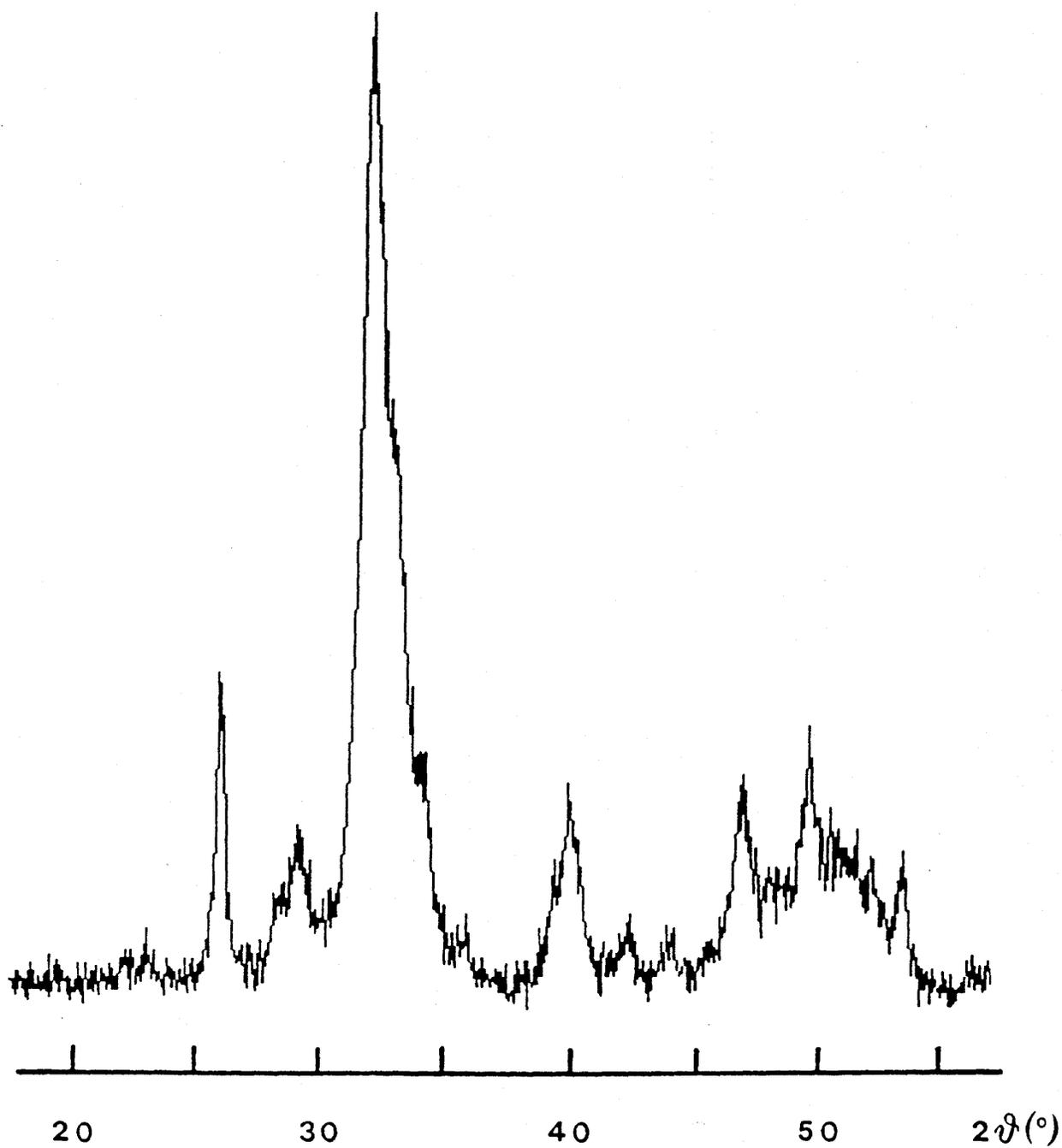


Figura 57: Diagramma di diffrazione di raggi-X di polveri relativo ad un campione deproteinato di osso corticale.

I valori medi di D valutati dall'allargamento relativo dei picchi (002) e (310) sono riportati nella Tabella 10.

Tabella 10: Dimensioni ( $D_{hkl}$ ) dei cristalliti di idrossiapatite dell'osso corticale e trabecolare valutate dall'ampiezza a metà altezza ( $\beta_{1/2}$ ) dei picchi (002) e (310). Ciascun valore rappresenta la media  $\pm$  DS di 6 campioni.

	$\beta_{1/2}(002)$ (°)	$D_{002}$ (nm)	$\beta_{1/2}(310)$ (°)	$D_{310}$ (nm)
Trabecolare	$0.481 \pm 0.006$	$16.9 \pm 0.2$	$1.26 \pm 0.02$	$6.7 \pm 0.1$
Corticale	$0.394 \pm 0.006$	$20.7 \pm 0.3$	$1.16 \pm 0.02$	$7.33 \pm 0.1$
		$p < 0.001$		$p < 0.001$

Gli spettri di assorbimento infrarosso dei campioni deproteinati mostrano le bande di assorbimento caratteristiche dell'idrossiapatite a basso grado di cristallinità, insieme alle bande a  $1455\text{-}1430\text{ cm}^{-1}$  e  $870\text{ cm}^{-1}$  associate con lo *stretching*, simmetrico e fuori dal piano rispettivamente, del carbonato (Figura 58a). Gli spettri di assorbimento infrarosso dei campioni riscaldati fino a  $1000^\circ\text{C}$  (Figura 58b) mostrano un globale aumento nell'asprezza delle bande di assorbimento. In particolare, diventano evidenti le bande di assorbimento a  $630$  e  $3572\text{ cm}^{-1}$  dovute rispettivamente ai moti librazionali e allo *stretching* dell'OH, mentre le bande di assorbimento caratteristiche del carbonato non sono più visibili. Inoltre, dalle bande di assorbimento a  $1120$ ,  $970$  e  $940\text{ cm}^{-1}$  si può determinare la presenza di  $\beta$ -tricalcio fosfato. In accordo, i *patterns* di diffrazione ai raggi-X di questi campioni indicano che il riscaldamento a  $1000^\circ\text{C}$  induce non solo un completo aumento nel grado di cristallinità della fase apatitica, ma anche una parziale conversione dell'idrossiapatite in  $\beta$ -TCP (Figura 59). La percentuale di quantità relativa di  $\beta$ -TCP valutata dal rapporto delle aree dei massimi di diffrazione più intensi delle due fasi è del 15% per i campioni deproteinati di trabecolare e del 10% per quelli di corticale. Le costanti reticolari delle fasi apatitiche valutate dai *patterns* registrati dai campioni riscaldati a  $1000^\circ\text{C}$  e riportate nella Tabella 11 non differiscono apprezzabilmente. Le fasi inorganiche dei due compartimenti ossei mostrano

singolari differenze nei rapporti molari Ca/P e contenuti molto simili di magnesio (Tabella 9).

Tabella 11: Costanti reticolari delle fasi apatitiche valutate dai diagrammi di diffrazione di raggi-X di polveri delle fasi inorganiche ottenute riscaldando i campioni di osso trabecolare e corticale a 1000°C. (Tra parentesi sono riportate le deviazioni standard dell'ultima cifra significativa).

	a(Å)	c(Å)	V(Å <sup>3</sup> )
Trabecolare	9.415(2)	6.884(2)	528.4(2)
Corticale	9.418(4)	6.891(4)	529.3(4)

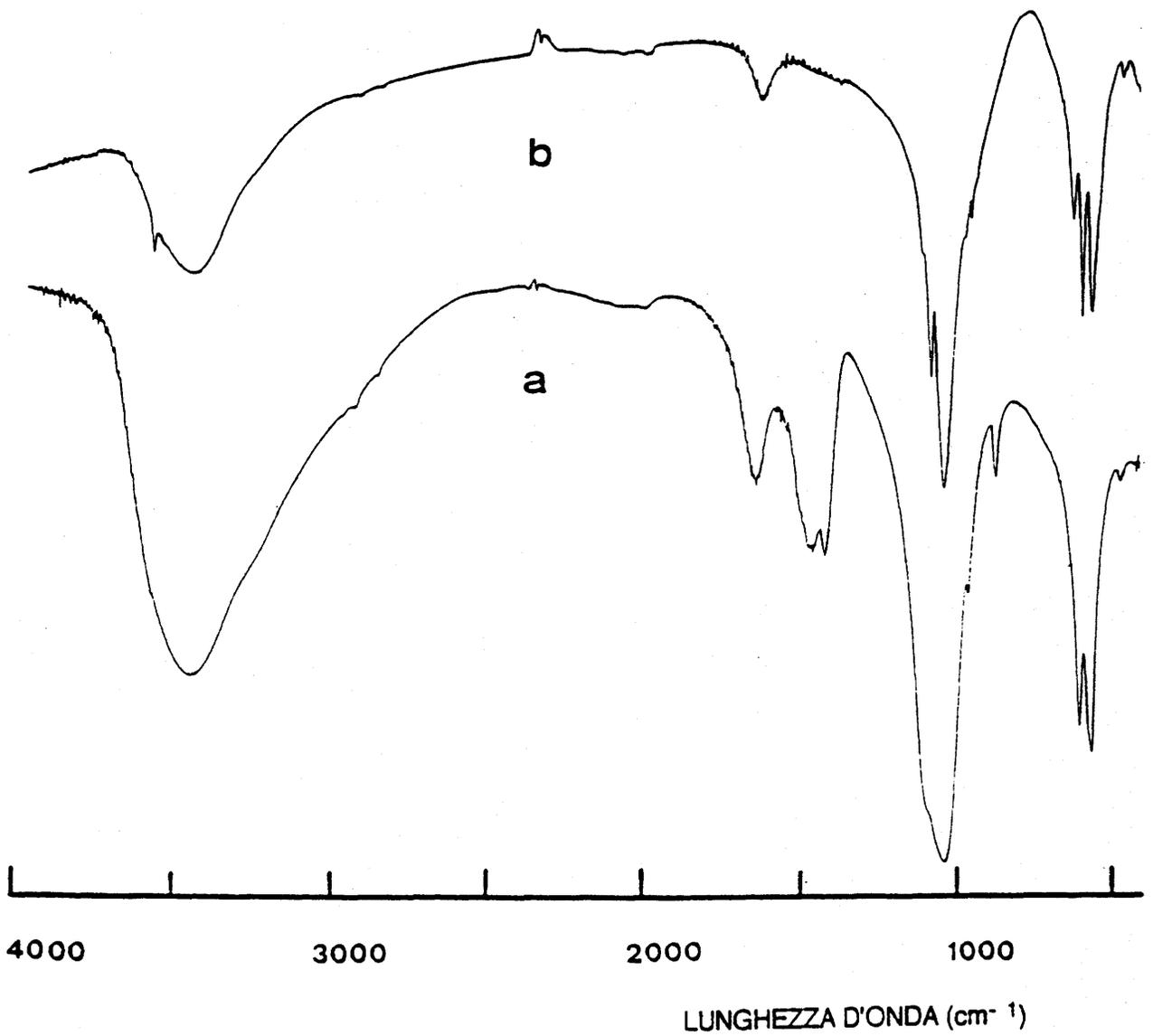


Figura 58: Spettro di assorbimento IR di un campione deproteinato di osso trabecolare prima (a) e dopo (b) trattamento termico a 1000°C.

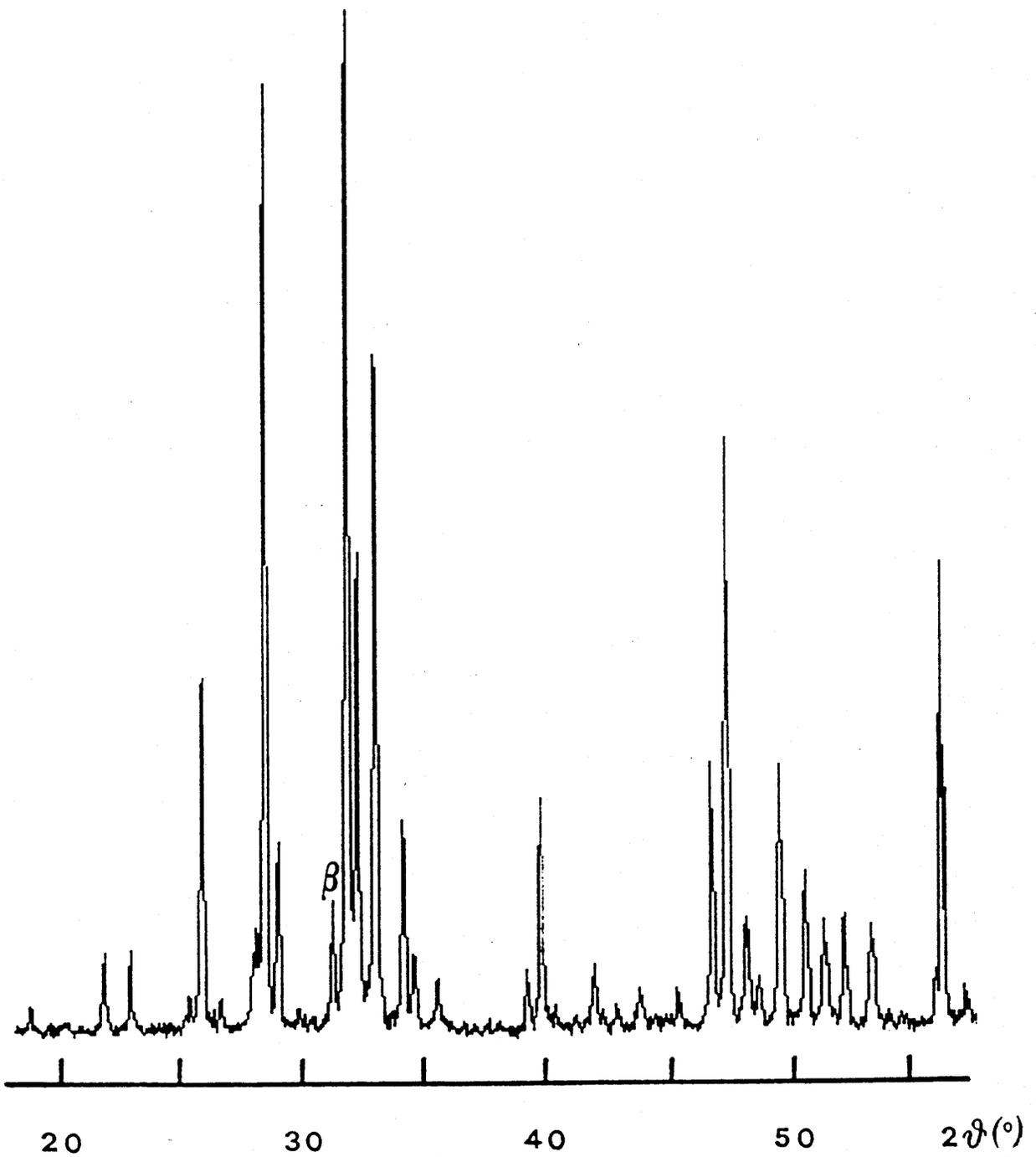


Figura 59: Diagramma di diffrazione di raggi-X di polveri relativo ad un campione deproteinato di osso corticale trattato termicamente a  $1000^{\circ}\text{C}$ . Viene indicato il più intenso picco di diffrazione relativo al  $\beta$ -tricalciofosfato.

### 5.3.4 Discussione

I risultati di questo studio mettono in evidenza parecchie differenze chimiche e strutturali fra le fasi inorganiche dei due compartimenti ossei. La quantità relativa di fase inorganica, costituita da idrossiapatite a basso grado di cristallinità, contenente ioni carbonato e magnesio, è leggermente, ma significativamente inferiore nell'osso trabecolare rispetto a quello corticale. Inoltre, l'osso trabecolare mostra dimensioni medie dei cristalli di idrossiapatite ridotte rispetto all'osso corticale, con una riduzione più evidente lungo la direzione 002 piuttosto che lungo la direzione 310. Nei tessuti calcificati, in condizioni fisiologiche, le dimensioni del cristallo di HA aumentano con la maturazione del tessuto [Burnell et al., 1980; Bonar et al., 1983; Bigi et al., 1992; Handschin & Stern, 1992; Ziv & Weiner, 1993], mentre esse mostrano, rispetto ai controlli della stessa età, valori maggiori in metafisi osteopetrotiche [Boskey & Marks, 1985] e valori ridotti nell'osso fragile caratteristico dell'*Osteogenesis imperfecta* [Vetter et al., 1991; Landis, 1995a]. La cristallinità del minerale osseo aumenta rapidamente con l'età dell'animale, mentre non varia di molto nelle frazioni a diversa densità nell'ambito di una stessa età [Bonar et al., 1983; Rey et al., 1991]. L'aumento della dimensione media dei cristalli nell'osso normale in crescita è stato relazionato alla composizione ionica e ai cambiamenti di densità minerale [Burnell et al., 1980; Arsenault & Grynpas, 1988]. In accordo con questo, l'apatite dell'osso trabecolare contiene una quantità di ioni carbonato e mostra un rapporto molare Ca/P inferiori rispetto all'apatite dell'osso corticale. Le apatiti carbonatate di tipo A e B possono essere distinte sulla base dei loro parametri di reticolo  $a$  e dei loro spettri IR [LeGeros et al., 1967; Bonel, 1972; Elliott, 1980]. Sfortunatamente, la bassa cristallinità delle apatiti di entrambi i compartimenti ossei non permette un'accurata valutazione delle loro costanti di reticolo. D'altro canto, il riscaldamento a 1000°C provoca non solo un aumento di cristallinità delle apatiti di entrambi i compartimenti, ma anche la rimozione degli ioni carbonato dalle fasi apatitiche, che perciò mostrano costanti reticolari molto simili. Comunque, le posizioni delle bande di assorbimento negli spettri IR dei campioni non trattati indicano che, come nella maggior parte delle apatiti biologiche, il carbonato sostituisce il fosfato, dando origine alla cosiddetta apatite carbonatata di tipo B. La sostituzione dei gruppi fosfato da parte degli ioni carbonato nelle apatiti biologiche è stata associata ad un aumento di stabilità dell'apatite stessa [Nancollas, 1982]. Inoltre, la presenza degli ioni carbonato nelle apatiti sintetiche ritarda o

previene la loro decomposizione termica in  $\beta$ -TCP [Bigi et al., 1986a; Apfelbaum et al., 1990]. Un altro parametro che influenza il comportamento termico dell'apatite è il valore del suo rapporto molare Ca/P [Bigi et al., 1995b]. Infatti, mentre le apatiti stechiometriche non si convertono in nessun'altra fase con il riscaldamento termico fino a 1000°C, le apatiti non stechiometriche si convertono in  $\beta$ -TCP in un grado che aumenta al diminuire del rapporto molare Ca/P. Il valore del rapporto molare Ca/P nell'osso corticale è vicino a quello caratteristico dell'apatite stechiometrica, mentre esso è apprezzabilmente ridotto nell'osso trabecolare. Perciò, l'apatite del compartimento trabecolare, sebbene contenga quasi la stessa quantità di magnesio dell'apatite dell'osso corticale, mostra dimensioni dei cristalliti, rapporto molare Ca/P e contenuto di carbonato inferiori, e mostra una maggiore entità di conversione termica in  $\beta$ -TCP. Va messo in rilievo che il suo valore molto basso di rapporto molare Ca/P potrebbe giustificare un'entità di conversione termica maggiore del 15%. Si deve concludere che la presenza di più del 2% di carbonato nei siti B giochi un ruolo importante sulla stabilità dell'apatite, riducendo l'effetto destabilizzante di un rapporto molare Ca/P non stechiometrico.

Comparando questi dati con i cambiamenti caratteristici della fase inorganica durante la maturazione dei tessuti calcificati in condizioni fisiologiche [Burnell et al., 1980; Rey et al., 1991] si può dedurre che l'osso trabecolare ha un grado di maturazione inferiore rispetto all'osso corticale. Si può concludere che i diversi gradi di modificazioni post-traduzionali osservati nei due compartimenti ossei (come riportato nello studio precedente), che suggeriscono una ridotta stabilità delle fibrille di collagene dell'osso trabecolare, portano, come sopra ipotizzato, a differenze chimiche e strutturali nelle loro fasi minerali. Perciò, le differenze funzionali dei due compartimenti ossei possono essere attribuite a differenze sia nella matrice che nella fase minerale.

## Capitolo 6

### CONCLUSIONI GENERALI

L'inizio e il progredire della mineralizzazione dei tessuti in condizioni sia fisiologiche che patologiche non è stato ancora totalmente chiarito nel suo intimo meccanismo, anche se sono stati finora proposti numerosi fattori biologici, chimici e fisici che lo influenzano. Tra questi merita menzione il fatto che l'induzione della mineralizzazione in sistemi diversi *in vitro* ed *in vivo*, fra cui anche in tessuti quali l'osso [Ascenzi et al., 1990; Burger et al., 1991; Wagner & Weiner, 1992] e la cartilagine [Sah et al., 1989], possa essere considerata, almeno in parte, il risultato di forze meccaniche.

Il processo biologico della mineralizzazione nei vertebrati, in tutti i tessuti eccettuati lo smalto, gli otoliti e qualche altra eccezione, implica una serie complessa di eventi che culmina nella deposizione dell'idrossiapatite su di una matrice organica, essenzialmente proteica, composta principalmente da collagene. Insieme, l'idrossiapatite e il collagene, interagiscono per formare un materiale composito le cui caratteristiche meccaniche, fisico-chimiche e biologiche differiscono considerevolmente da quelle dei due costituenti considerati separatamente. Quindi, la natura e le caratteristiche della matrice collagenica e del minerale, così come l'associazione matrice-minerale, sono critiche per la solidità di un tessuto calcificato come l'osso. Da un punto di vista meccanico, la resistenza di qualunque tessuto deriva principalmente da due fattori, la componente elastica (o durezza) e la componente plastica. Per quanto riguarda un tessuto calcificato, l'elasticità è correlata alla fase minerale, mentre la plasticità alla matrice [Burstein et al., 1977; Curry 1989; Jepsen et al., 1992]. Non è stato ancora chiarito in quale modo queste due proprietà siano influenzate dalla matrice e dal minerale o dalla loro interazione. Studi di interazione ultrastrutturale tra matrice e fase organica, condotti su una grande quantità di tessuti calcificati, inclusi casi di *Osteogenesis imperfecta*, calcifilassi e dermatomiositi, hanno dimostrato che i cristalli hanno differenti caratteristiche di struttura e di organizzazione, in associazione con le loro corrispondenti matrici organiche [Landis, 1995a]. Ciò indica che la resistenza, la solidità e altre proprietà meccaniche dei tessuti calcificati dipendono in parte dalla struttura molecolare e dall'arrangiamento dei cristalli di minerale all'interno della loro matrice organica. È dunque

logico, nel cercare di approfondire questa interazione, studiare sia la matrice che il minerale dei due compartimenti ossei, così come approfondire le conoscenze biochimiche dell'enzima che catalizza la sintesi del fosfocitrato, ciò anche in una prospettiva terapeutica riguardante quest'ultimo composto.

Considerato che il fosfocitrato è uno dei composti in grado di influenzare il complesso fenomeno della mineralizzazione, il primo progetto sviluppato in questo studio è stato volto a caratterizzare l'attività enzimatica responsabile della sua sintesi. I risultati ottenuti dimostrano che l'attività *fosfocitrato sintetasica* è presente sia nei mitocondri che nel citoplasma degli epatociti di ratto; ha un'attività a pH prevalentemente basico, con un massimo a pH 7.6, ed è particolarmente resistente alle alte temperature. Inoltre, la presenza dell'attività *fosfocitrato sintetasica* in diversi organi di ratto e anche nel rene umano, induce a ritenere che il fosfocitrato, oltre a prevenire la trasformazione del fosfato di calcio amorfo in cristalli di idrossiapatite, potrebbe svolgere anche altri ruoli, venendo sintetizzato dalla cellula al momento della sua richiesta. La ricerca è proseguita con lo studio delle caratteristiche biochimiche del collagene dei due compartimenti ossei, il corticale e il trabecolare che, come è noto, svolgono una differente funzione. Poiché la funzione biologica è il risultato di una struttura biochimica, e visto che la struttura biochimica del collagene è determinata dalle modificazioni post-traduzionali intra ed extracellulari che influenzano il diametro e l'arrangiamento spaziale delle fibrille, cioè l'architettura della matrice, si sono analizzate le modificazioni post-traduzionali nei due compartimenti ossei. I risultati mostrano che, nel ratto di entrambi i sessi, l'osso corticale contiene una maggiore quantità di residui di idrossilisina e di *cross-links* del piridinio, mentre l'osso trabecolare mostra una maggior quantità di idrossilisina glicosilata. La matrice corticale risulterebbe quindi più stabile, visto il maggior numero di *cross-links* non riducibili che conferiscono forza meccanica alla struttura ossea, anche se il diametro delle fibrille non risulta diverso da quello dell'osso trabecolare, poiché il maggior numero di residui di idrossilisina compenserebbe la maggior glicosilazione dell'osso trabecolare. Per altro, l'osso trabecolare, che è più glicosilato, non solo risulterebbe meno stabile ma, poiché le fibrille potrebbero avere un diverso orientamento spaziale rispetto all'osso corticale, anche meno "fisiologico", quindi a più rapida rimozione. In altri termini, l'aumento dei residui zuccherini potrebbe essere la causa del fatto che l'osso trabecolare ha un *turnover* otto volte maggiore rispetto all'osso corticale [Eyre et al., 1988]. Poiché in letteratura viene riportato che la natura

molecolare della matrice organica dei tessuti che calcificano potrebbe criticamente influenzare la formazione, la struttura e la localizzazione del minerale [Landis, 1995a; Landis et al., 1995b], si è ipotizzato che anche la matrice possa influenzare la mineralizzazione. Nell'ultimo progetto sviluppato i risultati danno ragione a questa ipotesi. Le differenze riscontrate nella componente minerale dell'osso corticale e trabecolare sono in accordo con le diverse funzioni dei due compartimenti già precedentemente menzionate. L'osso corticale infatti presenta un maggior contenuto di minerale, il cui rapporto molare calcio/fosfato di 1.63 si avvicina a quello teorico dell'idrossiapatite che è di 1.67. Inoltre le dimensioni dei cristalliti sono maggiori di quelle dell'osso trabecolare. In questo senso l'osso trabecolare, che presenta una minor quantità di minerale, con un rapporto calcio/fosfato di 1.50 che si allontana rispetto a quello dell'idrossiapatite e con un diametro dei cristalliti significativamente inferiore all'osso corticale, ha le caratteristiche di un osso immaturo e pertanto di un osso che viene rapidamente rimosso e sostituito.

In conclusione, i dati presentati in questa tesi non solo portano ulteriore sostegno all'ipotesi dell'esistenza di una relazione tra le componenti organica e minerale dell'osso, contribuendo a far luce sul complesso fenomeno della biomineralizzazione, ma anche dimostrano che le differenze funzionali tra i due compartimenti ossei risultano dovute a reali differenze molecolari, sia della fase organica che di quella minerale.

## BIBLIOGRAFIA

Aitken JM, Armstrong E, and Anderson JB. Osteoporosis after oophorectomy in the mature female rat and the effect of estrogen and or progesterone replacement therapy in its prevention. *J. Endocrinol.* (1972); 55: 79-87.

Albright F, Smith PH, and Richardson AM. Postmenopausal osteoporosis. *J. Am. Med. Assoc.* (1941); 116: 2465-2474.

Alexander LE. X-ray diffraction methods in polymer science. Wiley-Interscience, New York, 1969.

Amano S, Hanazawa S, Kawata Y, Ohta K, Kitami H, and Kitano S. An assay system utilizing devitalized bone for assessment of differentiation of osteoclast progenitors. *J. Bone Miner. Res.* (1992); 7: 321-328.

Apfelbaum F, Mayer I, and Featherstone JDB. The role of  $\text{HPO}_4^{2-}$  and  $\text{CO}_3^{2-}$  on the transformation of synthetic apatites to  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . *J. Inorg. Biochem.* (1990); 38: 1-8.

Apfelbaum F, Diab H, Mayer I, Featherstone and JDB. An FTIR study of carbonate in synthetic apatites. *J. Inorg. Biochem.* (1992); 45: 277-282.

Arsenault AL, and Grynblas MD. Crystals in calcified epiphyseal cartilage and cortical bone of the rat. *Calcif. Tissue Int.* (1988); 43: 219-225.

Ascenzi A, Boyde A, Carando S, and Potigliatti Barbos M. The biomechanical basis of bone structure and remodelling. *Ital. J. Miner. Electrolyte Metabol.* (1990); 4: 65-74.

Attie KM, Ramirez NR, Conte FA, Kaplan SL, and Grumbach MM. The pubertal growth spurt in eight patients with true precocious puberty and growth hormone deficiency: evidence for a direct role of sex steroids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1990); 71: 975-983.

Bailey AJ, Robins SP, and Balian GA. Biological significance of the cross-links of collagen. *Nature* (1974); 251: 105-109.

Bailey AJ, Wotton SF, Sims TJ, and Thompson PW. Post-translational modifications in the collagen of human osteoporotic femoral head. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1992); 185: 801-805.

Bailey AJ, Wotton SF, Sims TJ, and Thompson PW. Biochemical changes in the collagen of human osteoporotic bone matrix. *Conn. Tissue Res.* (1993); 29: 119-132.

Bain SD, Bailey MS, Celino DL, Lantry MM, and Edwards MW. High-dose estrogen inhibits bone resorption and stimulates bone formation in the ovariectomized mouse. *J. Bone Miner. Res.* (1993); 8: 435-442.

Ballanti P, Martelli A, Mereto E, and Bonucci E. Ovariectomized rats as experimental model of postmenopausal osteoporosis: critical considerations. *Ital. J. Mineral Electrolyte Metab.* (1993); 7: 243-248.

Baravelli S, Bigi A, Ripamonti A, Roveri N and Foresti E. Thermal behaviour of bone and synthetic hydroxyapatites submitted to magnesium interaction in aqueous medium. *J. Inorg. Biochem.* (1984); 20: 1-12.

Baron R, Vignery A, and Horowitz M. Lymphocytes, macrophages and the regulation of bone remodeling. In: *Bone and Mineral Research, II*; Peck WA (ed.). Elsevier, pp. 175-242, 1983.

Baron R. Anatomy and ultrastructure of bone. In: *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, 2nd edition; Murray J (ed.). Raven Press, New York, pp. 3-9, 1993.

Batge B, Diebold J, Stein H, Bodo M, and Muller PK. Compositional analysis of the collagenous bone matrix. A study on adult normal and osteopenic bone tissue. *Eur. J. Clin. Invest.* (1992); 22: 805-812.

Baud CA and Very JM. Morphological and crystallographic analysis of bone mineral. In: *Role Calcium Biol. Syst.* 1; Anghileri LJ, Tuffet-Anghileri A (eds.). CRC, Boca Raton, Fla., pp. 95-105.

Bellido T, Girasole G, Jilka RL, Crabb D, and Manolagas SC. Demonstration of androgen receptors in bone marrow stromal cells and their role in the regulation of transcription from the human interleukin-6 (IL-6) gene promoter. *J. Bone Miner. Res.* (1993); 8: S131, abstract 57.

Benz DJ, Haussler MR, Thomas MA, Speelman B, and Komm BS. High-affinity androgen binding and androgenic regulation of alpha 1(I)-procollagen and transforming growth factor- $\beta$  steady state messenger ribonucleic acid levels in human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Endocrinol.* (1991); 128: 2723-2730.

Beresford JN, Fedarko NS, Fisher LW, Midura RJ, Yanagishita M, Termine JD, and Gehron Robey P. Analysis of the proteoglycans synthesized by human bone cells in vitro. *J. Biol. Chem.* (1987); 262: 17164-17172.

Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, and Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors. *Nature* (1986), 319: 516-518.

Bigi A, Foresti E, Incerti A, Ripamonti A, and Roveri N. Structural and chemical characterization of the inorganic deposits in calcified human aortic wall. *Inorg. Chim. Acta* (1980); 55:81-85.

Bigi A, Foresti E, Marchetti F, Ripamonti A, and Roveri N. Barium calcium hydroxyapatite solid solutions. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1984) 1091-1093.

Bigi A, Foresti E, Ripamonti A, and Roveri N. Fluoride and carbonate incorporation in hydroxyapatite under conditions of cyclic pH variation. *J. Inorg. Biochem.* (1986a); 15: 317-327.

Bigi A, Gazzano M, Ripamonti A, Foresti E, and Roveri N. Thermal stability of cadmium-calcium hydroxyapatite solid solutions. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1986b) 241-244.

Bigi A, Compostella L, Fichera AM, Foresti E, Gazzano M, Ripamonti A, and Roveri N. Structural and chemical characterization of inorganic deposits in calcified human mitral valve. *J. Inorg. Biochem.* (1988a), 34: 75-82.

Bigi A, Ripamonti A, Koch MHJ, and Roveri N. Calcified turkey leg tendon as structural model for bone mineralization. *Int. J. Biol. Macromol.* (1988b); 10: 282-286.

Bigi A, Ripamonti A, Bruckner S, Gazzano M, Roveri N, and Tomas AS. Structure refinements of lead-substituted calcium hydroxyapatite by X-ray powder fitting. *Acta Cryst.* (1989) 45, Sect. B: 247-251.

Bigi A, Ripamonti A, Cojazzi G, Pizzuto G, Roveri N, and Koch MHJ. Structural analysis of turkey tendon collagen upon removal of the inorganic phase. *Int. J. Biol. Macromol.* (1991); 13: 110-114.

Bigi A, Foresti E, Gregorini R, Ripamonti A, Roveri N, and Shah JS. The role of magnesium on the structure of biological apatites. *Calcif. Tissue Int.* (1992); 50: 439-444.

Bigi A, Falini G, Foresti E, Gazzano M, Ripamonti A, and Roveri N. Magnesium influence on hydroxylapatite crystallization. *J. Inorg. Biochem.* (1993); 49: 69-78.

Bigi A, Foresti E, Gandolfi M, Gazzano M, and Roveri N. Inhibiting effect of zinc on hydroxylapatite crystallization. *J. Inorg. Biochem.* (1995); 58: 49-58.

Bigi A, Falini G, Foresti E, Gazzano M, Ripamonti A, and Roveri N. Rietveld structure refinements of calcium hydroxylapatite containing magnesium. *Acta Cryst. B* (1996); in press.

Binoux M, Hossenlopp P, Hardouin S, Seurin D, Lassarre C, and Gourmelen M. Somatomedin (insulin-like growth factors)-binding proteins molecular form and regulation. (1986); 24: 141-151.

Black D, Farquharson C, and Robins SP. Excretion of pyridinium cross-links of collagen in ovariectomized rats as urinary markers for increased bone resorption. *Calcif. Tissue Int.* (1989); 44: 343-347.

Bonar LC, Roufusse AH, Sabine WK, Grynepas MD, and Glimcher MJ. X-ray diffraction studies of the crystallinity of bone mineral in newly synthesized and density fractionated bone. *Calcif. Tissue Int.* (1983); 35: 202-209.

Bonel G. Apatite carbonation. Synthesis and physicochemical properties of type A carbonated apatites. *Ann. Chim.* (1972); 7: 65-68.

Bonucci E. The locus of initial calcification in cartilage and bone. *Clin. Orthop. Rel. Res.* (1971); 78: 108-139.

Borle AB. Control, modulation and regulation of cell calcium. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* (1981); 90: 13-153.

Bornestein P, and Traub W. The chemistry and biology of collagen. In: *The proteins*, Vol. 4; Neurath H. and Hill (eds.). Academic Press, pp. 412-632, 1979.

Boskey AL and Marks SC. Mineral and matrix alterations in the bones of incisors-absent (*ia/ia*) osteopetrotic rats. *Calcif. Tissue Int.* (1985); 37: 287-292.

Boyce BF, Aufdemorte TB, Garrett IR, Yates AJP, and Mundy GR. Effects of interleukin-1 on bone turnover in normal mice. *Endocrinol.* (1989); 123: 1142-1150.

Bringham FR, Zajac JD, Daggett AS, Skurat RN, and Kronenberg HM. Inhibition of parathyroid hormone responsiveness in clonal osteoblastic cells expressing a mutant form of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Mol. Endocrinol.* (1989); 3:60-67.

Brock DL, Madri J, Eikenberry EF, and Brodsky B. Characterization of type V collagen from chick bone. *J. Biol. Chem.* (1985); 260: 555-560.

Bruch HB, Wolf L, Budde R, Romalo G, and Schweikert HU. Androstenedione metabolism in cultured human osteoblast-like cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1992); 75: 101-105.

Burger EH, Klein-Nulend J, and Veldhuijzen JP. Modulation of osteogenesis in fetal bone rudiments by mechanical stress in vitro. *J. Biomech.* (1991); 24: 101-109.

Burgess WH, Wehlman T, Firesel R, Johnson WV, and Maciag T. Multiple forms of endothelial cell growth factor. *J. Biol. Chem.* (1985); 260: 11389-11392.

Burnell JM, Teubner EJ, and Miller AG. The maturational changes in bone matrix, mineral and crystal size in the rat. *Calcif. Tissue Int.* (1980); 31: 13-19.

Burstein AH, Zika JC, Heiple KG, and Klein L. Contribution of collagen and mineral to the elastic-plastic properties of bone. *J. Bone Joint Surg.* (1977); 57A: 956-961.

Canalis E. Effect of insulin-like growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *J. Clin. Invest.* (1980); 66: 709-719.

Canalis E. The hormonal and local regulation of bone formation. *Endocrinol. Rev.* (1983a); 4: 62-77.

Canalis E. Effects of glucocorticoids on type I collagen synthesis, alkaline phosphatase activity, and deoxyribonucleic acid content in cultured rat calvariae. *Endocrinol.* (1983b); 112: 931-939.

Canalis E, McCarthy T, and Centrella M. A bone-derived growth factor isolated from rat calvariae is Beta<sub>2</sub> microglobulin. *Endocrinol.* (1987); 21: 1198-1200.

Canalis E, McCarthy T, and Centrella M. Isolation and characterization of insulin-like growth factor I (somatomedin C) from cultures of fetal rat calvariae. *Endocrinol.* (1988a); 122: 22-27.

Canalis E, McCarthy T, and Centrella M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J. Clin. Invest.* (1988b); 81: 277-281.

Canalis E, Centrella M, and McCarthy T. Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. *J. Clin. Invest.* (1988c); 81: 1572-1577.

Canalis E, McCarthy T, and Centrella M. Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in vitro. *J. Cell Physiol.* (1989); 140: 530-537.

Cantor CR, and Schimmel PR. X-Ray crystallography. In: *Biophysical chemistry*, Vol. II; Bartlett AC, Vapnek PC, McCombs LW (eds.). WH Freeman and Company, San Francisco, pp. 687-738, 1980.

Caputo C, Meadows D, and Raisz LG. Failure of estrogens and androgens to inhibit bone resorption in tissue cultures. *Endocrinol.* (1976); 98: 1065-1068.

Cassella JP, and Yousuf Ali S. Abnormal collagen and mineral formation in osteogenesis imperfecta. *Bone Miner.* (1992); 17: 123-128.

Centrella M, McCarthy T, and Canalis E. Transforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J. Biol. Chem.* (1987); 262: 2869-2874.

Chambers TJ, and Magnus CJ. Calcitonin alters the behaviour of isolated osteoclasts. *J. Pathol.* (1982); 136: 27-40.

Chambers RJ, McSheehy PMJ, Thomson BM, and Fuller K. The effect of calcium regulating hormones and prostaglandins on bone resorption by osteoclasts disaggregated from neonatal rabbit bones. *Endocrinol.* (1985); 116: 234-239.

Chenu C, Pfeilschifter J, Mundy GR, and Roodman GD. Transforming growth factor  $\beta$  inhibits formation of osteoclast-like cells in long-term human marrow cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988); 85: 5683-5687.

Christoffersen J, and Landis WJ. A contribution with review to the description of mineralization of bone and other calcified tissues in vivo. *Anat. Rec.* (1991); 230: 435-450.

Clezardin P, Malaval L, Ehrensperger AS, Delmas P, Dechavanne M, and McGregor JL. Complex formation of human thrombospondin with osteonectin. *Eur. J. Biochem.* (1988); 175: 275-284.

Cohen-Solal L, Zylberberg L, Sangalli A, Gomez Lira M., and Mottes M. Substitution of an aspartic acid for glycine 700 in the  $\alpha 2(I)$  chain of type I collagen in a recurrent lethal type II Osteogenesis Imperfecta dramatically affects the mineralization of bone. *J. Biol. Chem.* (1994); 269: 14751-14758.

Colvard DS, Eriksen EF, Keeting PE, Wilson EM, Lubahn DB, French FS, Riggs BL, and Spelsberg TC. Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1989); 86: 854-857.

Conley RT. In: *Infrared spectroscopy*; Allyn and Bacon (eds.). Boston, 1972.

Cooks RG, and Beynon JH. In: *Metastable ions*; Caprioli RM, Lester GR (eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 42-44, 1973.

Cruess RL, and Hong KC. Effect of long-term estrogen administration on bone metabolism in the female rat. *Endocrinol.* (1979); 104: 1188-1193.

Curry JD. Strain dependence of the mechanical properties of reindeer antler and the cumulative damage model of bone fracture. *J. Biomech.* (1989); 22: 469-476.

Danielson CC, Mosekilde L, and Andreassen TT. Long-term effect of orchidectomy on cortical bone from rat femur: bone mass and mechanical properties. *Calcif. Tissue Int.* (1992); 50: 169-174.

de Bernard B, Moro L, Gazzarrini C, and Battista C. Galactosylhydroxylysine as biochemical marker of bone collagen degradation. In: *Le osteoporosi e il loro trattamento*; De Bastiani G, Pecile A, Pietrogrande V, Torri G (eds.). Monduzzi, Bologna, pp. 9-15, 1989.

Deftos LJ. In: *Medullary thyroid carcinoma*. S. Karger Publishing Co. New York, pp. 1-114, 1983.

Deftos LJ, and Glowacki J. Mechanisms of bone metabolism. In: *Pathophysiology*; Kem DC, Frohlich E (eds.). JB Lipincott Co., Philadelphia, pp. 445-468, 1984.

Deftos LJ. Calcitonin secretion in humans. In: *Current research on calcium regulating hormones*; Cooper CW (ed.). University of Texas Press, Austin, pp. 79-100, 1987.

Deftos LJ. Calcitonin and medullary thyroid carcinoma. In: *Cecil textbook of medicine*; Wyngaarden, Smith, Bennet (eds.). WB Sanders, Philadelphia, pp. 1420-1423, 1991.

De Luca HF. Vitamin D revisited. *Clin. Endocrinol. Metab.* (1980); 9: 1-26.

Dewhirst FE, Stashenko PP, Mole JE, and Tsurumachi T. Purification and partial sequence of human osteoclast activating factor, identity with interleukin-1. *J. Immunol.* (1985); 135: 2562-2568.

Dickman SR. Aconitase. In: *The enzymes*, Vol. 5; Boyer PD, Lardy H, Myrback K, (eds.). Academic Press, New York and London, pp. 495-510, 1960.

Dixit R, Harrison MW, and Dixit SN. Characterization of a 26K globular domain of a new basement membrane collagen. *Conn. Tiss. Res.* (1988); 17: 71-82.

Dodd JW, and Tonge KH. In: *Thermal Methods*; Wiley (ed.). Chichester, 1987.

Donahue HJ, Fryer MJ, Eriksen EF, and Heath H. Differential effects of parathyroid hormone and its analogues on cytosolic calcium ion and cAMP levels in cultured rat osteoblastlike cells. *J. Biol. Chem.* (1988); 263: 13522-13527.

Elliott JC. Space group and lattice constants of  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$ . *J. Appl. Cryst.* (1980); 13: 618-621.

Epstein EH.  $[\alpha 1(\text{III})]_3$  human skin collagen. *J. Biol. Chem.* (1974) 249: 3225-3228.

Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, and Riggs BL. Evidence of estrogens receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* (1988); 241: 84-86.

Eriksen EF, and Mosekilde L. Estrogens and bone. In: *Bone and mineral research*, Vol. 7; Heersche JNM, Kanis JA (eds.). Elsevier Science Publishers BV, (Biomedical Division) New York, pp. 273-311, 1990.

Ernst M, Heath JK, and Rodan GA. Estradiol effects on proliferation, messenger ribonucleic acid for collagen and insulin-growth factor-I, and parathyroid hormone-stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cells from calvariae and long bones. *Endocrinol.* (1989); 125: 825-833.

Exton-Smith AN. Mineral metabolism. In: *Handbook of the biology of aging*; Finch CE and Schneider EL (eds.). Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 511-539, 1985.

Eyre DR, and Glimcher MJ. Analysis of a crosslinked peptide from calf bone collagen: evidence that hydroxylysyl glycoside participates in the crosslink. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1973); 52: 663-671.

Eyre DR, Paz MA, and Gallop PM. Crosslinking in collagen and elastin. *Ann. Rev. Biochem.* (1984); 53: 717-748.

Eyre D. Collagen cross-linking aminoacids. *Methods Enzymol.* (1987); 144: 115-139.

Eyre DR, Dickson IR, and von Ness K. Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. *Biochem. J.* (1988); 252: 495-500.

Fell HB, and Mellanby E. The effect of hypervitaminosis A on embryonic limb bones cultured in vitro. *J. Physiol* (1952); 116: 320-249.

Fessler JH, and Fessler LI. Biosynthesis of procollagen. *Ann. Rev. Biochem.* (1978); 47: 129-162.

Fessler LI, Morris MP, and Fessler JH. Procollagen: biological scission of amino and carboxyterminal extension peptides. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1985) 72: 4905-4909.

Feyen JHM, and Raisz LG. Prostaglandin production by calvariae from sham operated and oophorectomized rats: effect of 17- $\beta$ -estradiol in vivo. *Endocrinol.* (1987); 121: 819-821.

Finkelstein JS, Klibanski A, Neer RM, Doppelt SH, Rosenthal DI, Segre GV, and Crowley WF Jr. Increases in bone density during treatment of men with hypogonadotropic hypogonadism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1989); 69: 776-783.

Finkelstein JS, Neer RM, Biller BMK, Crawford JD, and Klibanski A. Osteopenia in men with a history of delayed puberty. *N. Engl. J. Med.* (1992); 326: 600-604.

Fisher JA, and Born W. Calcitonin gene products: evolution, expression and biological targets. *Bone Miner.* (1987a); 2: 347-353.

Fisher LW, Hawkins GR, Tuross N, and Termine JD. Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I

and II and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J. Biol. Chem.* (1987b); 262: 9702-9708.

Foresta C, Ruzza G, Mioni R, Guarnieri G, Gribaldo R, Meneghello A, and Mastrogiacomo I. Osteoporosis and decline of gonadal function in the elderly male. *Horm Res.* (1984); 19: 18-22

Fritsch J, Grosse B, Liberherr M, and Balsan S. 1,25-dihydroxyvitamin D is required for growth-independent expression of alkaline phosphatase in cultured rat osteoblasts. *Calcif. Tissue Int.* (1985); 37: 639-645.

Frost HM. In: *Bone remodeling and its relation to metabolic bone disease.* Springfield, Springfield IL, pp. 1-210, 1973.

Frost HM. Osteoporosis: quo vadis? *Orthop. Clin. North Am.* (1981); 12: 683-691.

Frost HM, and Jee WSS. On the rat model of human osteopenias and osteoporosis. *Bone Miner.* (1992); 18: 227-236.

Fukayama S, and Tashjan AH. Direct modulation by androgens of the response of human bone cells (SaOS-2) to human parathyroid hormone (PTH) and PTRrp. *Endocrinol.* (1989); 125: 1789-1794.

Garrett IR, Durie BGM, Nedwin GE, Gillespie A, Bringman T, Sabatini M, Bertolini DR, and Mundy GR. Production of the bone resorbing cytokine lymphotoxin by cultured human myeloma cells. *N. Engl. J. Med.* (1987); 317: 526-532.

Garrett IR, Boyce BF, Oreffo ROC, Bonewald L, Poser P, and Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* (1990); 85: 632-639.

Gehron Robey P, Young MF, Flanders KC, Roche NS, Kondaiah P, Reddi AH, Termine JD, Sporn MB, and Roberts AB. Osteoblasts synthesize and respond to TGF-beta in vitro. *J. Cell Bio.* (1987); 105: 457-463.

Gehron Robey P, Young MF, Fisher LW, and McClain TD. Thrombospondin is an osteoblast-derived component of mineralized extracellular matrix. *J. Cell Biol.* (1988); 108: 719-727.

Gimenez L, Walker WG, Tew WP, and Hermann JA. Prevention of phosphate-induced progression of uremia in rats by 3-phosphocitric acid. *Kidney International* (1982); 22: 36-41.

Girasole G, Sakagami Y, Hustmyer FG, Yu X, Derrigs HG, Boswell S, Peacock M, Boder G, and Manolagas SC.  $17\beta$ -estradiol inhibits cytokine-induced IL-6 production by bone marrow stromal cells and osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* (1990); 5 (suppl 2), abstract 795.

Girasole G, Paul D, Passeri G, Herring J, Jilka RL, Manolagas SC, and Williams DC. Increased osteoclast-like cell formation from bone marrow aspirates and trabecular bone loss are induced by ovariectomy and reversed by estrogen replacement in the mouse. *J. Bone Miner. Res.* (1991); 6: S299, abstract 859.

Girasole G, Jilka RL, Passeri G, Boswell S, Boder G, Williams DC, and Manolagas SC.  $17\beta$ -estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro. A potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J. Clin. Invest.* (1992); 89: 883-891.

Glimcher MJ. The composition, structure and organization of bone and other mineralized tissues and the mechanism of calcification. In: *Handbook of physiology: endocrinology*, Vol. 7; Greep RO, Astwood, EB (eds.). American Physiological Society, Washington, pp. 25-113, 1976.

Glowacki J, and Lian JB. Impaired recruitment of osteoclast progenitors by osteocalcium-deficient bone implants. In: *The chemistry and biology of mineralized tissues*; Butler WT (ed.). Ebsco Media, Birmingham, pp.164-169, 1985.

Gowen M, Nedwin G, and Mundy GR. Preferential inhibition of cytokine stimulated bone resorption by recombinant interferon gamma. *J. Bone Min. Res.* (1986); 1: 469-474.

Gray WR. Dansyl chloride procedure. *Methods Enzymol.* (1967); 11: 139-151.

Greenawalt JW, Rossi CS, and Lehninger AL. Effect of active accumulation of calcium and phosphate ions on the structure of rat liver mitochondria. *J. Cell Bio.* (1964); 23: 21-38.

Grinpas MD, Bonar LC, and Glimcher MJ. Failure to detect an amorphous calcium-phosphate solid phase in bone mineral: a radial distribution function study. *Calcif. Tissue Int.* (1984); 36: 291-301.

Gürkan L, Ekeland A, Gautvik KM, Langeland N, Ronningen H, and Solheim LF. Bone changes after castration in rats. *Acta Orthop. Scand.* (1986); 57: 67-70.

Hahn TJ, Halstead LB, and Baran DT. Effects of short-term glucocorticoid administration on intestinal calcium absorption and circulating Vitamin D metabolites in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1981); 52: 111-115.

Handschin RG, and Stern WB. Crystallographic lattice refinement of human bone. *Calcif. Tissue Int.* (1992); 51: 111-120.

Harrison JR, and Clark NB. Avian medullary bone in organ culture: effects of vitamin D metabolites on collagen synthesis. *Calcif. Tissue Int.* (1986); 39: 35-43.

Heijligers HM, Driessens FCM, and Verbeeck RMH. Lattice parameters and cation distribution of solid solutions of calcium and strontium hydroxyapatite. *Calcif. Tissue Int.* (1979); 29: 127-131.

Heldin CH, and Westermark B. PDGF-like growth factors in autocrine stimulation of growth. *J. Cell. Physiol.* (1987); 5: 31-34.

Henry HL, and Norman AW. Vitamin D: metabolism and biological action. *Ann. Rev. Nutr.* (1984); 4: 493-520.

Hock JM, Centrella M, and Canalis E. Insulin-like growth factor I (IGF-I) has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinol.* (1988); 122 254-260.

Hodgkins A, Aaron JE, Horsman A, McLachlan MSF, and Nordin BEC. Effect of oophorectomy and calcium deprivation on bone mass in the rat. *Clin. Sci. Molec. Med.* (1978); 54: 439-446.

Holland PWH, Harper SJ, McVey JH, and Hogan BLM. In vivo expression of mRNA for the Ca<sup>2+</sup>-binding protein SPARC (osteonectin) revealed by in situ hybridization. *J. Cell Biol.* (1987); 105: 473-482.

Holland EFN, Studd JWW, Mansell JP, Leather AT, and Bailey AJ. Changes in collagen composition and cross-links in bone and skin of osteoporotic postmenopausal women treated with percutaneous estradiol implants. *Obstet. Gynecol.* (1994); 83: 180-183.

Hook M, Woods A, Johansson S, Kjellen J, and Couchman Jr. Functions of proteoglycans at the cell surface. In: *Functions of the proteoglycans*; Evered E and Whelan J (eds.), Ciba Foundation Symposium 124: John Wiley and Sons, Chichester, pp. 143-156, 1986.

Horowitz MC. Cytokines and estrogens in bone: anti-osteoporotic effects. *Science* (1993); 260: 626-627.

Ibbotson KJ, D'Souza SM, Smith DD, Carpenter G, and Mundy GR. EGF receptor antiserum inhibits bone resorbing activity produced by a rat Leydig cell tumor associated with the humoral hypercalcemia of malignancy. *Endocrinol.* (1985); 116: 469-471.

Ibbotson KJ, Harrod J, Gowen M, D'Souza S, Smith DD, Winkler ME, Derynck R, and Mundy GR. Human recombinant transforming growth factor alpha stimulates bone resorption and inhibits formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986); 83: 2228-2232.

Ibbotson KJ, Orcutt CM, D'Souza SM, Miller BE, Stokes CL, Janowsky ML, and Boyce RW. Contrasting effects of parathyroid hormone (PTH) and human recombinant insulin-like growth factor 1 (IGF-1) on bone in an aged ovariectomized (OVX) rat model of postmenopausal osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* (1989); 4 (Suppl. 1): Abstract S377.

Jaffé HH, and Orchin M. In: *Theory and applications of ultraviolet spectroscopy*; John Wiley (ed). New York, 1962.

Jepsen KJ, Mansoura MK, Kuhn JL, Wu H, Jaenisch R, Bonadio JF, and Goldstein SA. An in vivo assessment of the contribution of type I collagen to the mechanical properties of cortical bone. *Trans. Orthop. Res. Soc.* (1992); 17: 93.

Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxeyer H, and Manolagas SC. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* (1992); 257: 88-91.

Johnson RA, Boyce BF, and Mundy GR. Tumors producing human TNF induce hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice. *Endocrinol.* (1989); 124: 1424-1427.

Jones SJ, Boyde A, Ali NN, and Maconnachie E. A review of bone cell substratum interactions. *Scanning* (1985); 7: 5-24.

Kalu DN, Hardin RR, and Cockerham R. Evaluation of the pathogenesis of skeletal changes in ovariectomized rats. *Endocrinol.* (1984); 115: 507-512.

Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, and Hollis BW. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinol.* (1989); 124: 7-16.

Kalu DN. Proliferation of tartrate-resistant acid phosphatase-positive multinucleate cells in ovariectomized animals. *Soc. Exp. Biol. Med.* (1990); 195: 70-74.

Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* (1991); 15: 175-192.

Kalu DN, Salerno E, Higami Y, Liu CC, Ferraro F, Salih MA, and Arjmandi BN. In vivo effects of transforming growth factor- $\beta$  in ovariectomized rats. *Bone Miner.* (1993a); 22: 209-220.

Kalu DN, Salerno E, Liu CC, Ferraro F, Arjmandi BN, and Salih MA.. Ovariectomy-induced bone loss and the hematopoietic system. *Bone Miner.* (1993b); 23: 145-161.

Kasperk C, Wergedal JE, Farley JR, Linkhart TA, Turner RT, and Baylink D. Androgens directly stimulate proliferation of bone cells in vitro. *Endocrinol.* (1989); 124: 1576-1579.

Kasperk C, Fitzsimmons R, Strong D, Mohan S, Jennings J, Wergedal J, and Baylink D. Studies on the mechanism by which androgens enhance mitogenesis and differentiation in bone cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1990); 71: 1322-1329.

Kay MI, Young RA, and Posner AS. Crystal structure of hydroxyapatite. *Nature* (1964); 204: 1050-1052.

Keenan BS, Richards GE, Ponder SW, Dallas JS, Nagamani M, and Smith ER. Androgen-stimulated pubertal growth: the effect of testosterone and dihydrotestosterone on growth hormone and insuline-like growth factor-I in the treatment of short stature and delayed puberty. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1990); 75: 996-1001.

Keene DR, Sakai LY, and Burgenson RE. Human bone contains type III collagen, type IV collagen and fibrillin: type III collagen is present on specific fibres that may mediate attachment of tendons, ligaments, and periostium to calcified bone cortex. *J. Histochem. Cytochem.* (1991); 39: 59-69.

Kerrigan JR, and Rogal AD. The impact of gonadal steroid secretion during childhood and adolescence. *Endocrinol. Rev.* (1992); 13: 281-298.

Kivirikko KI, and Myllyla R. Collagen glycosyltransferase. *Int. Rev. Connect. Tissue Res.* (1979); 8: 23-30.

Kivirikko KI, and Myllyla R. Post-translational enzymes in the biosynthesis of collagen: intracellular enzymes. *Methods Enzymol.* (1982); 82: 284-304.

Komm BS, Terpening CM, Benz DJ, Graeme KA, Gallegos A, Korc M, Greene GL, O'Malley BW, and Haussler MR. Estrogen binding, receptor mRNA and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science* (1988); 241: 81-844.

Krane SM. Calcium, phosphate and magnesium. In: *International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*, Vol 1; Rasmussen H (ed.). Pergamon Press, London, pp. 19-59, 1970.

Krusius T, Gehlsen KR, and Ruoslahti E. A fibroblast chondroitin sulfate proteoglycan core proteins contains lectin-like and growth factor-like sequences. *J. Biol. Chem.* (1987); 262: 13120-13125.

Kuhn K. The classical collagen types. In: *Structure and function of collagen types*; Mayne R, Burgenson RE (eds.). Academic Press, New York, pp. 1-103, 1987.

Kuivaniemi H, Tromp G, and Prockop DJ. Mutations in collagen genes: causes of rare and some common disease in humans. *FASEB J.* (1991); 5: 2052-2060.

Landis WJ. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. *Bone.* (1995a); 16:533-544.

Landis WJ, Librizzi JJ, Dunn MG, and Silver FH. A study of the relationship between mineral content and mechanical properties of turkey gastrocnemius tendon. *J. Bone Miner. Res.* (1995b); 10: 859-867.

Larsson SE. The effect of combined oophorectomy and prednisolone administration on the skeletal tissue and calcium retention in one year old rats. *Calcif. Tissue Res.* (1968); 2(Suppl.): 84-84a.

Larsson SE, and Vejlens L. The glycosaminoglycans of compact bone tissue in experimental osteoporosis. Induced by combine oophorectomy and prednisolone treatment or prolonged calcium restriction in one year old rats. *Calcif. Tiss. Res.* (1968); 2(Suppl.): 32-32a.

Leathers VL, Linse S, Forsen S, and Norman AW. Calbindin-D28K, a  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$ -induced calcium-binding protein, binds five or six  $Ca^{2+}$  ions with high affinity. *J. Biol. Chem.* (1990); 265: 9838-9841.

LeGeros RZ, Trautz OR, LeGeros JP, and Klei E. Apatite crystallites: effects of carbonate on morphology. *Science* (1967); 155: 1409-1411.

LeGeros RZ, Taheri MM, Quirolgico GB, and LeGeros JP. Proc. 2nd Int., Boston, IMPMOS (Paris), (1980), 89-92.

LeGeros RZ, and LeGeros JP. Phosphate minerals in human tissues. In: *Phosphate minerals*; Nriagu JO and Moore PB (eds.). Springer, New York, pp. 351-385, 1984.

Lehninger AL, Tew WP, Howard JE, and Rathinasamy H. Phosphocitrate inhibits deposition and crystallization of calcium phosphate in mitochondria in vivo. Second European Bioenergetics Conference; LBTM-CNRS (ed.). Villeurbanne, 1982.

Lehninger AL. The possible role of mitochondria and phosphocitrate in biological calcification. In: *Biom mineralization and biological metal accumulation*; Westbroek P, De Jong EW (eds.). Reidel Publishing Company, Boston, pp. 107-122, 1983.

Lian JB, Coutts M, and Canalis E. Studies of hormonal regulation of osteocalcin synthesis in cultured fetal rat calvariae (1985); 260: 8706-8710.

Light ND, and Bailey AJ. Covalent cross-links in collagen. *Methods Enzymol.* (1982); 82:360-372.

Lindsay R, Hart DM, and Forrest C. Prevention of spinal osteoporosis in oophorectomised women. *Lancet* (1980); 2: 1151-1153.

Liu CC, and Kalu DN. Human parathyroid hormone prevents bone loss and augments bone formation in sexually mature ovariectomized rats. *J. Bone Miner. Res.* (1990); 5: 973-982.

Lomri A, and Marie PJ. Effect of parathyroid hormone and forskolin on cytoskeletal protein synthesis in cultured mouse osteoblastic cells. *Biochem. Biophys. acta* (1988); 970: 333-342.

Lu KH, Hopper BR, Vargo TM, and Yen SSC. Chronologic changes in sex steroid, gonadotropin and prolactin secretion in aging female rats displaying different reproductive states. *Biol. Reprod.* (1979); 21: 193-203.

Manolagas SC, Hustmyer FG, and Yu XP. 1,25-Dihydroxyvitamin D-3 and the immune system. *Exp. Biol. Med.* (1989); 52: 238-245.

Manolagas SC, and Jilka RL. Cytokines, hematopoiesis, osteoclastogenesis, and estrogens. *Calcif. Tissu Int.* (1992); 50: 199-202.

Manolagas SC, and Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *The New Engl. J. Med.* (1995); 332: 305-311.

Marshall RW. Plasma fractions. In: *Calcium, Phosphate, and Magnesium Metabolism*; Nordin BEC (ed.). Churchill Livingstone, London, pp: 162-185, 1976.

Mark MP, Prince CW, Gay S, Austin RL, and Butler WT. 44kDal bone phosphoprotein (osteopontin) antigenicity at extopic sites in newborn rats: kidney and nervous tissues. *Cell Tiss. Res.* (1988); 251: 23-30.

Mayne R, and Burgeson RE (eds.). Structure and function of collagen types. Academic Press, New York, 1987.

McSheehy PMJ, and Chambers TJ. Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinol.* (1986); 118: 824-828.

Meltzer V, Weinreb S, Bellorin-Font E, and Hruska KA. Parathyroid hormone stimulation of renal phosphoinositide metabolism is a cyclic nucleotide-dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Acta* (1982); 712: 258-267.

Michalsky M, Noris Suarez K, Bettica P, Pecile A, and Moro L. Rat cortical and trabecular bone collagen glycosylation are differently influenced by ovariectomy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1993); 192: 1281-1288.

Miller EJ, and Gay S. Collagen: an overview. *Methods Enzimol.* (1982); 82: 3-32.

Miller EJ. Chemistry of the collagens and their distribution. In: *Extracellular matrix biochemistry*; Piez KA, Reddi AD (eds.). Elsevier Science Publishing Co. Inc, New York, pp. 41-48, 1984.

Mizuno Y, Hosoi T, Inoue S, Ikegami A, Kaneki M, Akedo Y, Nakamura T, Ouchi Y, Chang C, and Orimo H. Immunocytochemical identification of androgen receptor in mouse osteoclast-like multinucleated cells. *Calcif. Tissue Int.* (1994); 54: 325-326.

Moonga BS, Alam AS, Bevis PJ, Avaldi F, Soncini R, Huang CL, and Zaidi M. Regulation of cytosolic free calcium in isolated osteoclasts by calcitonin. *J. Endocrinol.* (1992); 132: 241-249.

Moro L, Modricky C, Stagni N, Vittur F, and de Bernard B. High-performance liquid chromatographic analysis of urinary hydroxylsyl

glycosides as indicators of collagen turnover. *Analyst* (1984); 109: 1621-1622.

Moro L, Battista C, Modricky C, Rovis L, and de Bernard B. High-performance liquid chromatographic preparation of galactosylhydroxylysine, a specific bone collagen marker. *J. Chromatogr.* (1989); 490: 285-292.

Moro L, Stagni N, Luxich E, Sallis JD, and de Bernard B. Evidence in vitro for an enzymatic synthesis of phosphocitrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1990); 170: 251-258.

Moro L, Bettica P, Noris Suarez K, and Romanello M. Influence of estrogens and tamoxifen on rat trabecular bone collagen glycosylation. Second International Symposium on Osteoporosis, Beijing, Cina, Abstract 34, p. 43.

Most W, Schot L, Enderveen A, van der Wee-Pals L, Papapoulos S, and Löwik C. In vitro and ex vivo evidence that estrogens suppress increased bone resorption induced by ovariectomy or PTH stimulation through an effect on osteoclastogenesis. *J. Bone Miner. Res.* (1995); 100: 1523-1530.

Mundy GR, Shapiro JL, Bandelin JG, Canalis EM, and Raisz LG. Direct stimulation of bone resorption by thyroid hormones. *J. Clin. Invest.* (1976); 58: 529-534.

Mundy GR, Rick ME, Turcotte R, and Kowalski MA.. Pathogenesis of hypercalcemia in lymphosarcoma cell leukemia. Role of an osteoclast activating factor-like substance and mechanism of action for glucocorticoid therapy. *Am. J. Med.* (1978); 65: 600-606.

Mundy GR, and Roodman GD. Osteoclast ontogeny and function. In: *Bone and Mineral Research*, V; Peck W (ed). Elsevier, pp. 209-280, 1987.

Nakanishi K, and Solomon PH. In: *Infrared absorption spectroscopy*; Holden-Day (ed.). San Francisco, 1977.

Nancollas GH. Biological mineralization and demineralization. Dahlem Konferenzen, Springer-Verlag, Berlin, 1982.

Noda M, and Camilliere JJ. In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta. *Endocrinol.* (1989); 124: 2991-2994.

Norman AW, Roth J, and Orci L. The vitamin D endocrine system: steroid metabolism, hormone receptors and biological response (calcium binding proteins). *Endocrinol. Rev.* (1982); 3: 331-366.

Orwoll ES, Stribrska L, Ramsey EB, and Keenan EJ. Androgen receptors in osteoblast-like cells. *Calcif. Tissue Int.* (1991); 49: 183-187.

Ott SM. Bone density in adolescent. *N. Eng. J. Med.* (1991); 325: 1646-1647.

Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen J, Riggs BL, and Spelsberg TC. Avian osteoclast cells as estrogen target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991); 88: 6613-6617.

Oursler MJ, Pederson L, Pyfferoen J, Osdoby P, Fitzpatrick L, and Spelsberg TC. Estrogen modulation of avian osteoclast lysosomal gene expression. *Endocrinol.* (1993); 132: 1313-1380.

Pacifici R, Rifas L, McCracken R, and Vered I. Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin-1 release. *Proc. Natl. Acad. USA* (1989); 86: 2398-2402.

Pacifici R, Brown C, Puscheck E, Friedrich E, Slatopolsky E, Maggio D, McCracken R, and Avioli LV. Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1991); 88: 5134-5138.

Parfitt AM. The actions of parathyroid hormone on bone, relation to bone remodeling and turnover calcium homeostasis and metabolic bone disease. *Metabolism* (1978); 25: 1033-1069.

Parfitt AM. Bone remodeling: relationship to the amount and structure of bone and the pathogenesis and prevention of fractures. In: *Osteoporosis: etiology, diagnosis and management*; Riggs BL and Melton LJ (eds.). Raven Press, New York, pp. 45-93, 1988.

Passeri G, Girasole G, Markus T, Abrams JS, Manolagas SC, and Jilka RL.  $17\beta$ -estradiol regulates IL-6 production and osteoclast development in murine calvaria cell cultures. *J. Bone Miner. Res.* (1991); 6: S263, abstract 716.

Pasto DJ, and Johnson CR. In: *Organic structure determination*; Prentice-Hall (ed.). Englewood Cliffs, 1969.

Pavia DL, Lampman GM, and Kriz GS Jr. In: *Introduction to spectroscopy*. Saunder, Philadelphia, 1979.

Pfeilschifter JP, Seydin S, and Mundy GR. Transformed growth factor  $\beta$  inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures. *J. Clin. Invest.* (1988); 82: 680-685.

Pilbeam CC, and Raisz LG. Effects of androgens on parathyroid and interleukin 1-stimulated prostaglandin production in cultured neonatal mouse calvariae. *J. Bone Miner. Res.* (1990); 5: 1183-1188.

Pinnell SR, Fox R, and Krane SM. Human collagens: differences in glycosylated hydroxylysines in skin and bone. *Biochim. Biophys. Acta* (1971) 239: 119-122.

Porter RR, and Reid KBM. The biochemistry of complement. *Nature* (1978) 275: 699-704.

Posner AS. The crystal chemistry of bone mineral. *Physiol. Rev.* (1969): 49: 760-792.

Posner AS, Blumental NC, and Betts F. Chemistry and structure of precipitated hydroxyapatites. In: *Phosphate Minerals*; Nriagu JO and Moore PB (eds.). Springer, New York, pp. 330-350, 1984.

Price PA, Parthermore JG, and Deftos LJ. New biochemical marker for bone metabolism. *J. Clin. Invest.* (1980); 66: 878-883.

Price PA. Vitamin K-dependent bone proteins. In: *Calcium regulation and bone metabolism: basic and clinical aspects*, Vol 9; Cohn DV, Martin TJ and Meunier PJ (eds.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 419-425, 1987.

Prockop DJ, Berg RA, and Kivirikko KI. Intracellular steps in the biosynthesis of collagen. In: *Biochemistry of collagen*; Ramachandran GN, Reddi AH (eds.). Plenum Press, New York, pp. 163-273, 1976.

Prockop DJ, and Kivirikko KI. The biosynthesis of collagen and its disorders. *N. Eng. J. Med.* (1979); 310: 13-23.

Prockop DJ, and Tuderman L. Post-translational enzymes in the biosynthesis of collagen: extracellular enzymes. *Methods Enzymol.* (1982); 82: 305-319.

Prockop DJ, and Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* (1995); 64: 403-434.

Pugliarello MC, Vittur F, de Bernard B, Bonucci E, and Ascenzi A. Analysis of bone composition at the microscopic level. *Calcif. Tissue Res.* (1973); 12: 209-216.

Purohit A, Flanagan AM, and Reed MJ. Estrogen synthesis by osteoblast cell lines. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1992); 61: 152-157.

Puzas JE. Phosphotyrosine phosphatase activity in bone cells: an old enzyme with a new function. *Adv. Prot. Phosphatases* (1986); 3: 237-256.

Quinlan KP, and De Sesa MA. Spectrophotometric determination of phosphorus as molybdovanadophosphoric acid. *Anal. Chem.* (1955); 27: 1626-1629.

Raisz LG, and Niemann I. Effect of phosphate, calcium and magnesium on bone resorption and hormonal responses in tissue culture. *Endocrinol.* (1969); 85: 446-452.

Raisz LG, Trummel CL, Wener JA, and Simmons H. Effect of glucocorticoids on bone resorption in tissue cultures. *Endocrinol.* (1972); 90: 961-967.

Raisz LG, and Kream BE. Regulation of bone formation. *N. Engl. J. Med.* (1983a); 309: 29-36.

Raisz LG, and Kream BE. Regulation of bone formation. *N. Engl. J. Med.* (1983b); 309: 83-89.

Rasmussen H, and Rasmussen J. Calcium as intracellular messenger: from simplicity to complexity. *Curr. Top Cell Regul.* (1990); 31: 1-109.

Reddi AH, Meyer JL, Tew WP, Howard JE, and Lehninger AL. Influence of phosphocitrate, a potent inhibitor of hydroxyapatite crystal growth, on mineralization of cartilage and bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1980); 97:154-159.

Reichel H, Koeffler HP, and Norman AW. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N. Engl. J. Med.* (1989); 320: 980-991.

Reichel H, Koeffler HP, and Norman AW. Production of  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$  by hematopoietic cells. *Prog. Clin. Biol. Res.* (1990); 332: 81-97.

Reid KBM. A collagen-like aminoacid sequence in a polypeptide chain of C1q (a sub-component of the first component of complement). *J. Biochem.* (1974); 14: 189-208.

Rey C, Shimizu M, Collins B, and Glimcher MJ. Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ions in the early deposits of a solid phase of calcium-phosphate in bone and enamel, and their evolution with age. I: investigations in the  $\nu_4$   $PO_4$  domain. *Calcif. Tissue Int.* (1990); 46: 384-394.

Rey C, Renugopalakrishnan V, Collins B, and Glimcher MJ. Fourier transform infrared spectroscopic study of the carbonate ions in bone mineral during aging. *Calcif. Tissue Int.* (1991); 49: 251-258.

Reynhold VN. Direct chemical ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Methods in enzymology* (1987); 138:59-84.

Riggs BL, Jowsey J, Kelly PJ, Jones JD, and Maher FT. Effect of sex hormones on bone in primary osteoporosis. *J. Clin. Invest.* (1969); 48: 1065-1072.

Riggs BL, and Melton LJ. Involutional osteoporosis. *N. Eng. J. Med.* (1986); 314: 1676.

Roberts JE, Bonar LC, Griffin RG, and Glimcher MJ. Characterization of very young mineral phases of bone by solid state  $^{31}$ Phosphorus magic angle spinning nuclear magnetic resonance and X-ray diffraction. *Calcif. Tissue Int.* (1992); 50: 42-48.

Robins SP, and Bailey AJ. Isolation and characterization of glycosyl derivatives of the reducible cross-links in collagens. *FEBS Lett.* (1973); 38: 334-336.

Robins SP. Turnover and cross-linking of collagen. In: *Collagen in health disease*; Weiss JB, Jayson MIV (eds.). Churchill Livingstone, 1982.

Robinson R. The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. *Biochem. J.* (1923); 17: 286-293.

Roodman GD, Ibbotson KJ, MacDonald BR, Kuehl TJ, and Mundy GR.  $1,25(OH)_2$  vitamin  $D_3$  causes formation of multinucleated cells with

osteoclast characteristics in cultures of primate marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985); 82: 8213-8217.

Rosenberry TL, and Richardson JM. Structure of 18S and 14S acetylcholinesterase: identification of collagen-like subunits that are linked by disulfuride bonds to catalytic subunits. *Biochem.* (1977); 16: 3550-3558.

Rowles SL. Precipitation of whitlockite from aqueous solutions. *Bull. Soc. Chim. Fr.* (1968); (Spec. No.) 1797-1802.

Rude RK, and Singer FR. Magnesium deficiency and excess. *Ann. Rev. Med.* (1981); 32: 245-253.

Ruoslahti E, and Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* (1987); 238: 491-497.

Ruoslahti E. Structure and biology of proteoglycans. *Ann Rev. Cell Biol.* (1988); 4: 229-255.

Ryaby JT, Magee FP, Khin NA, Fitzsimmons RJ, and Baylink DJ. Downregulation of osteoclastogenic potential in vivo by combined ac/dc magnetic fields. *J. Bone Miner. Res.* (1993); 8: S273: Abstract 626.

Sabatini M, Boyce B, Aufdemorte T, Bonewald L, and Mundy GR. Infusions of recombinant human interleukin-1 $\alpha$  and  $\beta$  cause hypercalcemia in normal mice. *Proc. Natl. Acad. USA* (1988); 85: 5235-5239.

Sah RLY, Kim YJ, Doong JYH, Grodzinsky AJ, Plaas AHK, and Sandy JD. Biosynthetic response of cartilage explants to dynamic compression. *J. Orthopaed. Res.* (1989); 7: 619-636.

Sallis JD, Thomson R, Rees B, and Shankar R. Reduction of infection stones in rats by combined antibiotic and phosphocitrate therapy. *J. Urol.* (1988); 140: 1063-1066.

Sallis JD, Shankar R, Rees B, and Thomson R. Protection of crystal-induced polymorphonuclear leukocyte membranolysis by phosphocitrate. *Biochemical Medicine and Meabolic Biology* (1989); 41: 56-63.

Saville PD. Changes in skeletal mass and fragility with castration in the rat; a model of osteoporosis. *J. Am. Geriatr. Soc.* (1969); 17: 155-166.

Schnaitman C, and Greenawalt JW. Enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. *J. Cell Biol.* (1968); 38: 158-175.

Schoutens A, Verhas M, L'Hermite-Baleriaux, L'Hermite M, Verschaeren A, Dourov N, Mone M, Heilporn A, and Tricot A. Growth and bone haemodynamic responses to castration in male rats. Reversibility by testosterone. *Acta Endocrinol.* (1984); 107: 428-432.

Shankar R, Crowden S, and Sallis JD. Phosphocitrate and its analogue N-sulpho-2-amino-tricarballoylate inhibit aortic calcification. *Atherosclerosis* (1984); 52: 191-198.

Shankar R, and Sallis JD. Phosphocitrate inhibition of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1985); 131: 793-799.

Sigel H, and Sigel A. In: *Metal ions in biological systems*, vol. 26, 1990, Marcel Dekker Inc., New York.

Silverstein RM, Bassler GC, and Morrill TC. In: *Spectrometric identification of organic compounds*; John Wiley (ed.). New York, 1974.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GI, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, and Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* (1985); 150: 76-85.

Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, and Korach KS. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N. Engl. J. Med.* (1994); 331: 1056-1061.

Somerman MJ, Fisher LW, Foster RA, and Sauk JJ. Human bone sialoprotein I and II enhance fibroblast attachment in vitro. *Calcif. Tissue Int.* (1988); 43:50-53.

Sottocasa GL, Kuylenstierna B, Ernster L, and Bergstrand A. An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A biochemical and morphological study. *J. Cell Biol.* (1967); 32: 415-438.

Stepan JJ, and Tesarova A. Age and sex dependency of the biochemical indices of bone remodelling. *Clin. Chem. Acta* (1985); 151: 273-283.

Stepan JJ, Lachman M, Zverina J, Pacovsky V, and Baylink DJ. Castrated men exhibit bone loss: effect of calcitonin treatment on biochemical indices of bone remodelling. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1989); 69: 523-527.

Stern PH, Krieger NS, and Nissenson RA.. Human transforming growth factor alpha stimulates bone resorption in vitro. *J. Clin. Invest.* (1985); 76: 2016-2020.

Still RH. The use and abuse of thermal methods of stability assessment. In: *Developments in polymer degradation-1*; Grassie N (ed.). Applied Science Publishers, London, 1977.

Tabibzadeh SS, Santhanam U, Sehgal PB, and May LT. Cytokine-induced production of IFN- $\beta_2$ /IL-6 by freshly explanted human endometrial stromal cells. Modulation by estradiol-17 $\beta$ . *J. Immunol.* (1989); 142: 3134-3139.

Takahashi N, MacDonald BR, Hon J, Winkler ME, Derynck R, Mundy GR, and Rodman GD. Recombinant human transforming growth factor alpha stimulates the formation of osteoclast-like cells in long term human marrow cultures. *J. Clin. Invest.* (1986); 78: 894-898.

Takahashi N, Mundy GR, Kuehl TJ, and Roodman GD. Osteoclast like formation in fetal and newborn long term baboon marrow cultures is more sensitive to 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> than adult long term marrow cultures. *J. Bone Min. Res.* (1987); 2: 311-317.

Talmage RV, and Elliott JR. Removal of calcium from bone as influenced by the parathyroids. *Endocrinol.* (1958); 62: 717-722.

Tanaka S, Haji M, Nishi Y, Yanase T, Takayanagi R, and Nawata H. Aromatase activity in human osteoblast-like cells. *Calcif. Tissue Int.* (1993); 52: 107-109.

Tashjian AH, Voelkel EF, and Levine L. Evidence that the bone resorption-stimulating factor produced by mouse fibrosarcoma cells is prostaglandin E<sub>2</sub>: a new model for the hypercalcemia of cancer. *J. Exp. Med.* (1972); 136: 1329-1343.

Tashjian AH Jr, Voelkel EF, Lloyd W, and Derynck R. Actions fo growth factors on plasma calcium. Epidermal growth factor and human transformmming growth factor- alpha cause elevation of plasma calcium in mice. *J. Clin. Invest.* (1986); 78: 1405-1409.

Tashjian AH Jr, Voelkel EF, Lazzaro M, and Goad D. Tumor necrosis factor-alpha (cachectin) stimulates bone resorption in mouse calvaria via a prostaglandin-mediated mechanism. *Endocrinol.* (1987); 120: 2029-2036.

Teerlink T, Tavenier P, and Netelenbos C. Selective determination of hydroxyproline in urine by high-performance liquid chromatography using precolumn derivatization. *Clin. Chim. Acta* (1989); 183: 309-316.

Termine JD, Eanes ED, Greenfield DJ, Nylén MU, and Harper RA. Hydrazine-deproteinated bone mineral. Physical and chemical properties. *Calcif. Tissue Int.* (1973); 12: 73-90.

Termine JD, Eanes ED, and Conn KM. Phosphoprotein modulation of apatite crystallization. *Calcif. Tissue Int.* (1980); 31: 247-251.

Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, and Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* (1981); 26: 99-105.

Termine JD. Non-collagen proteins in bone. In: *Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissue*; Evered D and Harnett S (eds.); Ciba Foundation Symposium 136. John Wiley and Sons, Chichester, pp.178-190, 1988.

Terpstra RA, and Driessens FCM. Magnesium in tooth enamel and synthetic apatites. *Calcif. Tissue Int.* (1986); 39: 348-354.

Tew WP, Mahle C, Benavides J, Howard JE, and Lehninger AL. Synthesis and characterization of phosphocitric acid, a potent inhibitor of hydroxylyapatite crystal growth. *Biochem* (1980); 19: 1983-1988.

Tew WP, Malis CD, Howard JE, and Lehninger AL. Phosphocitrate inhibits mitochondrial and cytosolic accumulation of calcium in kidney cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1981); 78: 5528-5532.

Thomson BM, Saklatvala J, and Chambers TJ. Osteoblasts mediate interleukin-1 stimulation of bone resorption by rat osteoclasts. *J. Exp. Med.* (1986); 164: 104-112.

Thomson BM, Mundy GR, and Chambers TJ. Tumor necrosis factor alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J. Immunol.* (1987); 138: 775-779.

Tobias JH, and Chambers TJ. The effect of sex hormone on bone resorption by rat osteoclasts. *Acta Endocrinol.* (1991); 124: 121-127.

Treslad RL. Multistep assembly of type I collagen fibrils. *Cell* (1982); 28: 197-198.

Tsao JW, Schoen FJ, Shankar R, Sallis JD, and Levy RJ. Retardation of calcification of bovine pericardium used in bioprosthetic heart valves by phosphocitrate and a synthetic analogue. *Biomaterials* (1988); 9: 393-397.

Tsoukas CD, Provvedini DM, and Manolagas SC. 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: a novel immunoregulatory hormone. *Science* (1984); 224: 1438-1440.

Turner RT, Wakley GK, and Hannon KS. Differential effects of androgens on cortical bone histomorphometry in gonadectomized male and female rats. *J. Orthop. Res.* (1990); 8: 612-617.

Turner RT, Evans GL, and Wakley GK. Mechanism of action of estrogen on cancellous bone balance in tibiae of ovariectomized growing rats: inhibition on indices of formation and resorption (1993); 8: 359-366.

Vanderschueren D, Van Herck E, Suiker AMH, Visser WJ, Schot LPC, and Bouillon R. Bone and mineral metabolism in aged male rats: short- and long-term effects of androgen deficiency. *Endocrinol.* (1992); 130: 2906-2916.

Vanderschueren D, Van Herck E, Shot L, Rush E, Einhorn T, Geusens P, and Bouillon R. The aged male rat as a model for human osteoporosis: evaluation by nondestructive measurements and biomechanical testing. *Calcif. Tissue Int.* (1993); 53: 342-347.

Vanderschueren D, and Bouillon R. Androgens and bone. *Calcif. Tissue Int.* (1995); 56: 341-36.

Verhas M, Schoutens A, L'Hermite-Baleriaux, Dourov N, Verschaeren A, Mone M, and Heilporn A. The effect of orchidectomy on bone metabolism in aging rats. *Calcif. Tissue Int.* (1986); 39: 74-77.

Vermeulen A. Androgens and male senescence. In: *Testosterone: action, deficiency, substitution*; Nieschlag E, Behre NM (eds). Springer Verlag; Heidelberg, pp. 261-276, 1990.

Vetter U, Eanes ED, Kopp JB, Termine JD, and Gehron Robey P. Changes in apatite crystal size in bones of patients with osteogenesis imperfecta. *Calcif. Tissue Int.* (1991); 49: 248-250.

Vitteck J, Altman K, Gordon GG, and Southren AL. The metabolism of testosterone by rat mandibular bone. *Endocrinol.* (1974); 94: 325-329.

Vogel HG. Influence of maturation and aging on mechanical and biochemical parameters of rat bone. *Geront.* (1979); 25:16-23.

Wagner HD, and Weiner S. On the relation between the microstructure of bone and its mechanical stiffness. *J. Biomech.* (1992); 25: 1311-1320.

Wakley GK, Schitte HD, Kathleen SH, and Turner RT. Androgen treatment prevents loss of cancellous bone in the orchidectomized rat. *J. Bone Miner. Res.* (1991); 6: 325-330.

Wallach S, Avioli LV, Feinblatt JD, and Cartstens JH. Cytokines and bone metabolism. *Calcif. Tissue Int.* (1993); 53: 293-296.

Walters MR. Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocrinol. Rev.* (1992); 13:719-764.

Ward LC, Shankar R, and Sallis JD. A possible antiatherogenic role for phosphocitrate through modulation of low density lipoprotein uptake and degradation in aortic muscle cells. *Atherosclerosis* (1987); 65: 117-124.

Weiner S, and Traub W. Organization of hydroxyapatite crystals within collagen fibrils. *FEBS Letters* (1986); 206: 262-266.

Weisman Y, Cassorla F, Malozowski S, Krieg RJ, Goldray D, Kae AM, and Sojien D. Sex-specific response of bone cells to gonadal steroids: modulation in perinatally androgenized females and in testicular feminized male rats. *Steroids* (1993); 58: 126-133.

Wendlant WW, and Gallagher PK. Instrumentation. In: *Thermal characterization of polymeric materials*; Turi EA (ed.). Academic Press, New York, 1981.

Wener JA, Gorton SJ, and Raisz LG. Escape from inhibition of resorption in cultures of fetal bone treated with calcitonin and parathyroid hormone. *Endocrinol.* (1972); 90: 752-759.

Wessler S. Introduction: What is a model. In: *Animal models of thrombosis and hemorrhagic diseases*. Report of a workshop organized by The Institute of Laboratory Animal Resources (ILAR) Committee on Animal Models for Thrombosis and Hemorrhagic Diseases, held March 12-13, 1975 at The National Academy of Sciences, Washington, D.C. DHEW Pub. No. (NIH) 76-82. Washington DC: US Department of Health, Education and Welfare, xi-xvi, 1976.

Wewer UM, Albrechtsen R, Fisher LW, Young MF, and Termine JD. Osteonectin/SPARC/BM-40 in human decidua and carcinoma, tissues characterized by de novo formation of basement membrane. *Amer. J. Path.* (1988); 132: 345-355.

Wiechelmann K, Braun R, and Fitzpatrick J. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* (1988); 175: 231-237.

Wiley J. & Sons, Chichester, UK. Cell and molecular biology of vertebrate hard tissues (1988) Ciba Found. Symp. 136.

Williams G, and Sallis JD. Structure-activity relationship of inhibitors of hydroxyapatite formation. *Biochem. J.* (1979); 184: 181-184.

Williams G, and Sallis JD. The synthesis of unlabeled and <sup>32</sup>P-labeled phosphocitrate and analytical systems for its identification. *Anal. Biochem.* (1980); 102: 365-373.

Williams G, and Sallis JD. The source of phosphocitrate and its role as an inhibitor of calcium phosphate and calcium oxalate crystallization. In: *Urolithiasis, clinical and basic research*; Smith LH, Robertson WG, Finlayson B (eds.). Plenum Press, New York, pp. 569-577, 1981.

Williams G, and Sallis JD. Structural factors influencing the ability of compounds to inhibit hydroxyapatite formation. *Calcif. Tissue Int.* (1982); 34: 169-177.

Wilson K, and Goulding KH. In: *A biologist's guide to principles and techniques of practical biochemistry*; Arnold E (ed.). Ltd, London, 1986.

Wink CS, and Felts WJL. Effects of castration on the bone structure of male rats: a model for osteoporosis. *Calcif. Tissue Int.* (1980); 32: 77-82.

Witsell AL, and Schook LB. Macrophage heterogeneity occurs through a developmental mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1991); 88: 1963-1967.

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mittleman LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, and Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* (1988); 242: 1528-1534.

Wronski TJ, Schenck PA, Cintron M, and Walsh CC. Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif. Tissue Res.* (1987); 40: 155-159.

Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, and Cintron M. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif. Tissue Int.* (1989); 45: 360-366.

Yamauchi M, Katz EP, Ostubo K, Teraoka K, and Mechanic GL. Cross-linking and stereospecific structure of collagen in mineralized and nonmineralized skeletal tissues. *Connect. Tissue Res.* (1989); 21: 159-169.

Yamazaki I, and Yamaguchi H. Characteristics of an ovariectomized osteopenic rat. *J. Bone Miner. Res.* (1989); 4: 13-22.

Yang CL, Rui H, Mosler S, Sawaryn A, and Muller PK. Collagen II from articular cartilage and annulus fibrosus. Structural and functional implications of tissue specific post-translational modifications of collagen molecules. *Eur. Biochem.* (1993a); 213: 1297-1302.

Yang C, Niu C, Bodo M, Gabriel E, Notbohm H, Wolf E, and Muller PK. Fulvic acid supplementation and selenium deficiency disturb the structural integrity of mouse skeletal tissue. An animal model to study the molecular defects of Kashin-Beck disease. *Biochem. J.* (1993b); 289: 829-835.

Yu BP, Masoro EJ, Murata I, Bertrand HA, and Lynd FT. Life span study for SPF Fisher 344 male rats fed ad libitum or restricted diets: longevity, growth, lean body mass and disease. *J. Gerontol.* (1982); 37: 130-141.

Ziv V, and Weiner S. Bone crystal sizes: a comparison of transmission electron microscopic and X-ray diffraction line width broadening techniques. *Connect. Tissue Res.* (1993); 29: 1-11.

## ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI

- 1 Romanello M., Michalsky M., Stagni N., and Moro L. High performance liquid chromatographic and mass spectrometric identification of phosphocitrate synthesized by human kidney homogenate. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* (1993); 616: 167-173.
- 2 Moro L., Noris Suarez K., Michalsky M., Romanello M., and de Bernard B. The glycosides of hydroxylysine are final products of collagen degradation in humans. *Biochim. Biophys. Acta* (1993); 1156: 288-290.
- 3 Romanello M., Noris Suarez K., Bettica P., and Moro L. Detection of pyridinium cross-links in human bile. *Calcif. Tissue Int.* (1995); 57: 415-418.
- 4 Noris Suarez K., Romanello M., Bettica P., and Moro L. Collagen type I of rat cortical and trabecular bone differs in the extent of posttranslational modifications. *Calcif. Tissue Int.* (1996); 58: 65-69.
- 5 Bigi A., Cojazzi G., Ripamonti A., Roveri N., Romanello M., Noris Suarez K., and Moro L. Chemical and structural characterization of the mineral phase from cortical and trabecular bone. (Inviato a *Calcif. Tissue Int.*).
- 6 Moro L., Bettica P., Noris Suarez K., and Romanello M. 17- $\beta$ -estradiol and tamoxifen reverse the over-glycosylation of rat trabecular bone collagen induced by ovariectomy. (Inviato a *Endocrinol.*).
- 7 Moro L., Noris Suarez K., and Romanello M. The influence of orchidectomy on collagen glycosylation of trabecular bone in rat. (Inviato a *Calcif. Tissue Int.*).

## **ELENCO DELLE COMUNICAZIONI A CONGRESSI RELATIVE AL DOTTORATO DI RICERCA**

- 1 Noris Suarez K., Michalsky M., Romanello M., e Moro L.  
Attività  $\alpha$ -glicosidasica e  $\beta$ -galattosidasica renali ed escrezione urinaria della galattosil idrossilisina.  
"53° incontro semestrale del Gruppo Nazionale Tessuti Calcificati"  
Montegrotto Terme, Italia, Giugno 1992.
  
- 2 Romanello M., Stagni N., Favretto D., Traldi P., and Moro L.  
Detection of phosphocitrate synthetase activity in human kidney.  
"Società Italiana di Biochimica (SIB)-Gruppo Struttura e Funzione delle Proteine-VIII Convegno Nazionale-Proteine '93"  
Parma, Italia, Maggio 1993.
  
- 3 Romanello M., Noris Suarez K., Stagni N., and Moro L.  
Identification of a phosphocitrate synthetase activity in human kidney homogenate.  
"38° Congresso Nazionale della Società Italiana di Biochimica (SIB)"  
Trieste, Italia, Settembre 1993.
  
- 4 Noris Suarez K., Romanello M., Bettica P., and Moro L.  
Differential influence of estrogens on rat cortical and trabecular bone collagen glycosylation.  
"38° Congresso Nazionale della Società Italiana di Biochimica (SIB)".  
Trieste, Italia, Settembre 1993.
  
- 5 Bettica P., Noris Suarez K., Romanello M., Baylink D.J., Modricky C., e Moro L.  
Riproducibilità e performances cliniche della galattosil idrossilisina e della deossipiridinolina urinarie, due marcatori specifici del riassorbimento osseo.  
"25° Congresso Nazionale della Società Italiana di Biochimica Clinica-SIBioC '93"  
Torino, Italia, Settembre 1993.

- 6 Moro L., Simoni E., Bettica P., Modricky C., Noris Suarez K., Romanello M., and Baylink D.J.  
Galactosyl hydroxylysine and pyridinium crosslinks compared in different bone turnover rate physiopathological conditions.  
"XV International Congress of Clinical Chemistry-31st Annual Conferene Australian Association of Clinical Biochemists-6th Asian-Pacific Congress of Clinical Chemistry"  
Melbourne, Australia, Novembre 1993
  
- 7 Moro L., Noris Suarez K., Romanello M., e Bettica P.  
Può una over-glicosilazione del collagene dell'osso trabecolare spiegare l'aumento del turnover osseo nel ratto ovariectomizzato?  
"5° Congresso Nazionale della Società Italiana dell'Osteoporosi (S.I.O.P.)"  
Padova, Italia, Dicembre 1993.
  
- 8 Romanello M., Noris Suarez K., Bettica P., e Moro L.  
Modificazioni della glicosilazione del collagene e funzionalità del tessuto osseo.  
"Riunione Gruppo Glicoconiugati della Società Italiana di Biochimica (SIB)"  
Baia Sardinia, Italia, Maggio 1994.
  
- 9 Romanello M., Noris Suarez K., Bettica P., e Moro L.  
I crosslinks del piridinio non sono metabolizzati e sono parzialmente escreti dal fegato.  
"26° Congresso Nazionale della Società Italiana di Biochimica Clinica-SIBioC '94"  
Montecatini, Italia, Ottobre 1994.
  
- 10 Noris Suarez K., Romanello M., Bettica P., Moro L., Specchia N., and Sanguinetti C.  
Physical and biochemical changes in cortical and trabecular bone in oophorectomized rats.  
"3<sup>th</sup> inter-meeting-SIROT"  
Boston, USA, Ottobre 1994.

- 11 **Noris Suarez K., Romanello M., Bettica P., and Moro L.**  
**Evidence that the architecture of bone matrix in rat is different in cortical and trabecular compartment.**  
**“The XXIVth European Symposium on Calcified Tissues”**  
**Aarhus, Danimarca, Maggio 1995.**
  
- 12 **Moro L., Romanello M., Noris Suarez K., and Bettica P.**  
**Osteoblasts of trabecular bone from orchidectomysed rats secrete an overglycosylated collagen type I which could be a signal for osteoclast-matrix interaction.**  
**“III Workshop on Osteobiology”**  
**Foggia, Italia, Luglio 1995.**
  
- 13 **Romanello M., Noris Suarez K., e Moro L.**  
**Confronto di praticità e precisione tra due metodi HPLC per la determinazione dei crosslinks del piridinio.**  
**“27° Congresso Nazionale della Società Italiana di Biochimica Clinica-SIBioC '95”**  
**Riva del Garda, Italia, Ottobre 1995.**
  
- 14 **Moro L., BetticaP., Noris Suarez K., and Romanello M.**  
**Influence of estrogens and tamoxifen on rat trabecular bone collagen glycosylation.**  
**“The Second International Symposium on Osteoporosis”**  
**Beijing, Cina, Ottobre 1995.**

## **ELENCO DELLE COMUNICAZIONI A CONGRESSI CONCERNENTI ALTRE RICERCHE SVOLTE**

- 1 Modricky C., Noris Suarez K., Bettica P., Gazzarrini C., Romanello M., e Moro L.  
Metastasi ossee da carcinoma della mammella: come escluderle usando markers biochimici.  
"25° Congresso Nazionale della Società Italiana di Biochimica Clinica-SIBioC '93"  
Torino, Italia, Settembre 1993.
- 2 Simoni E., Tomasi G., Bettica P., Parma A., Romanello M., Noris Suarez K., Modricky C., e Moro L.  
Correlazione tra markers di formazione ossea: osteocalcina (molecola intera e frammenti), fosfatasi alcalina ossea (isoelettrofocusing e metodo immunometrico), peptide carbossiterminale del collagene di tipo I (PICP).  
"26° Congresso Nazionale della Società Italiana di Biochimica Clinica-SIBioC '94"  
Montecatini, Italia, Ottobre 1994.
- 3 Simoni E., Tomasi G., Bettica P., Parma A., Romanello M., Noris Suarez K., Modricky C., e Moro L.  
Confronto tra l'isoelettrofocusing e un metodo immunoradiometrico di determinazione dell'isoenzima osseo della fosfatasi alcalina.  
"26° Congresso Nazionale della Società Italiana di Biochimica Clinica-SIBioC '94"  
Montecatini, Italia, Ottobre 1994.
- 4 Bettica P., Vago T., Norbiato G., Moro L., Noris Suarez K., Romanello M., and Bevilacqua M.  
Pyridinium crosslinks and type I collagen telopeptides show similar clinical performances but may have different ways of elimination.  
"The XXIVth European Symposium on Calcified Tissues"  
Aarhus, Danimarca, Maggio 1995.

- 5 Uebelhart D., Demiaux Domenech B., Roth M., Moro L., Noris Suarez, M. Romanello, Vuagnat H., and Slosman DO.  
Prospective evolution of biochemical markers of bone metabolism and whole-body composition in spinal cord injury patients.  
J. Bone Miner. Res. 10, Suppl. 1: S181, Abstract P209, 1995.
  
- 6 Uebelhart D., Bernard J., Demiaux-Domenech B., Roth M., Moro L., Noris Suarez K., Romanello M., Vico L., Lafage M.H., and Alexandre C.  
Effects of long-term bed rest on biochemical markers of bone metabolism and whole-body composition.  
J. Bone Miner. Res. 10, Suppl. 1: S346, Abstract M375, 1995.

## RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare:

il Dr. P. Traldi e la Dott.ssa D. Favretto per l'aiuto nella registrazione degli spettri FAB-MS del fosfocitrato;

la Prof.ssa A. Bigi, il Prof. N. Roveri e il Prof. A. Ripamonti, per l'importante collaborazione nella caratterizzazione chimica e strutturale della fase minerale dell'osso;

il Prof. E. Bonucci e la Dott.ssa P. Mocetti, per le misure di microscopia elettronica sulle fibre di collagene osseo;

i miei *referees* Prof. E. Panfili e G.L. Sottocasa per gli utili suggerimenti;

i miei carissimi amici e colleghi Dr. K. Noris Suarez, Dr. A. Vetere e Dr. P. Cescutti per la collaborazione e per l'amichevole incoraggiamento;

il Prof. N. Stagni per gli utili suggerimenti e la Dott.ssa C. Modricky per la cortesia dimostrata.

Un ringraziamento particolare va al mio tutore, Prof. Luigi Moro, per la fiducia dimostratami e per avermi incoraggiato durante questi quattro anni, spesso non privi di difficoltà, di Dottorato di ricerca. In tutto questo tempo egli mi ha guidato come maestro ed amico, tramandandomi la sua passione per la ricerca scientifica e dandomi l'opportunità di approfondire le mie conoscenze in Biochimica. Gli sono grata per tutto ciò che mi ha insegnato.