



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

Dipartimento di ricerca traslazionale e delle nuove tecnologie in
Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea in *Medicina e Chirurgia*

Valutazione della Correlazione tra i livelli plasmatici della
Gamma Glutamil Transferasi e la qualità ossea

Relatore:
Chiar.mo Prof. Michele LISANTI

Candidato:
Agnese NESTI

Anno Accademico 2015/2016

INDICE

| | |
|---|----|
| 1. RIASSUNTO | 5 |
| 2. INTRODUZIONE..... | 6 |
| 2.1 INQUADRAMENTO GENERALE..... | 6 |
| 2.2 TESSUTO OSSEO | 8 |
| 2.2.1 Organizzazione..... | 8 |
| 2.2.2 Rimodellamento osseo | 8 |
| 2.3. OSTEOPOROSI | 11 |
| 2.3.1 Generalità | 11 |
| 2.3.2 Fattori di rischio | 12 |
| 2.3.3 Classificazione | 15 |
| 3. RAZIONALE DELLO STUDIO | 17 |
| 3.1 GAMMAGLUTAMILTRANSFERASI..... | 17 |
| 3.2 RIMODELLAMENTO OSSEO | 19 |
| 4. MATERIALI E METODI..... | 23 |
| 4.1 FASE DI RECLUTAMENTO..... | 23 |
| <u>Criteri di inclusione</u> | 23 |
| <u>Criteri di esclusione</u> | 23 |
| 4.2 FASE PREOPERATORIA..... | 26 |
| 4.3 FASE INTRAOPERATORIA | 28 |
| 5. RISULTATI..... | 34 |
| 5.1 RISULTATI PRELIEVO DI SANGUE..... | 34 |
| 5.2 RISULTATI ANALISI DEL COLLO DEL FEMORE CON MICRO CT | 37 |
| 5.3 RISULTATI ANALISI MORFOLOGICA DELLA TESTA DEL FEMORE | 44 |
| 6. DISCUSSIONE..... | 45 |

| | |
|--|----|
| 6.1 LETTERATURA..... | 45 |
| 6.2 STUDIO CLINICO | 49 |
| <u>6.2.1 Analisi prelievo sangue</u> | 49 |
| <u>6.2.2 Analisi collo del femore alla micro CT</u> | 49 |
| <u>6.2.3 Analisi morfologica della testa di femore</u> | 51 |
| 7. CONCLUSIONI..... | 53 |
| 8. BIBLIOGRAFIA..... | 55 |
| 9. RINGRAZIAMENTI..... | 59 |

1. RIASSUNTO

Lo studio clinico che andremo ad esporre è nato dalla volontà di andare a verificare l'eventuale correlazione tra i valori di GGT frazionate e la qualità ossea.

Abbiamo preso in esame 93 pazienti di etnia caucasica, di entrambi i sessi e di età compresa tra 60 e 85 anni che fossero stati ricoverati presso l'Unità Operativa diretta dal Professor Lisanti per artrosi dell'anca o per frattura del femore prossimale. I pazienti sono stati divisi in due gruppi: il gruppo A comprendeva pazienti sottoposti ad intervento di sostituzione totale dell'anca per artrosi, il gruppo B comprendeva pazienti sottoposti ad intervento di riduzione e sintesi di frattura del femore prossimale attraverso chiodo endomidollare, placca e viti o protesi d'anca. Preoperatoriamente, ai pazienti di entrambi i gruppi, è stato prelevato un campione di sangue e successivamente sono stati analizzati i valori di GGT totali e delle frazioni di GGT. Intraoperatoriamente, per quanto riguarda i pazienti del gruppo A e i pazienti sottoposti ad intervento di sostituzione protesica del gruppo B, sono stati prelevati testa e collo di femore; la testa di femore è stata sottoposta ad analisi morfologica mentre il collo di femore è stato sottoposto ad analisi con microCT.

Una volta ottenuti sia i risultati del campione di sangue che il risultato dei prelievi intraoperatori siamo andati a valutare la correlazione tra l'eventuale alterazione dei valori di GGT frazionate e la qualità dell'osso. I risultati di questo studio sono stati infine confrontati con la letteratura.

2. INTRODUZIONE

2.1 INQUADRAMENTO GENERALE

Lo scopo di questa tesi sperimentale è verificare, attraverso uno studio clinico, se esiste una correlazione tra i valori plasmatici delle frazioni delle gamma glutamil transferasi (GGT) e la qualità ossea. Se tale correlazione potrà essere determinata, le GGT potrebbero essere quindi utilizzate come marcatori di progressione dell'osteoporosi e di rischio di fratture ad essa correlate. Da tempo è nota l'importanza delle GGT come marcatori diagnostici di disfunzione epatica e abuso di alcool, ma solo recentemente è emersa un'associazione positiva tra GGT plasmatica ed il rischio di eventi di diversa natura, come ad esempio quelli cardiovascolari, d'insorgenza di diabete di tipo 2, di sindrome metabolica¹ e, importante al fine del nostro studio, di minor mineralizzazione ossea. Partendo dalle GGT totali possono essere ricavate le 4 frazioni di GGT: frazione b-GGT ("big"), m-GGT ("medium"), s-GGT ("small"), f-GGT ("free")². Da recenti studi, le varie frazioni risulterebbe maggiori in diversi stadi della vita e alterate in alcune patologie: la f-GGT sarebbe la frazione più rappresentata sia negli uomini che nelle donne³, un aumento della b-GGT sarebbe correlata a maggior rischio di formazione di placche aterosclerotiche⁴ e di patologie epatiche⁵ e un aumento delle s-GGT sarebbe stato riscontrato in pazienti con distrofia miotonica di tipo 1⁶. In base a questi risultati abbiamo preso spunto per il nostro studio e siamo andati a verificare se, anche per quanto riguarda la mineralizzazione ossea, le varie frazioni di GGT sono alterate e se si in quale modo.

Lo studio clinico si è svolto all'interno dell' Unità Operativa di Ortopedia e Traumatologia I dell'AOUP diretta dal Professor Lisanti in collaborazione con il Laboratorio di Patologia Clinica AOUP (in particolare con il Prof.

Paolicchi, con la Dott.ssa Fierabacci e con la Dott.ssa Franzini), l'Anatomia Patologica III dell'AOUP (in particolare con la Dott.ssa Pucci), L'istituto di Fisiologia Clinica (IFC-CNR) di Pisa (in particolare con il Prof. Salvadori ed il Dott. Panetta). Sono stati arruolati 93 pazienti, di entrambi i sessi e di etnia caucasica, con età compresa tra i 60 e gli 85 anni, affetti da artrosi dell'anca o da frattura del femore prossimale (causata da osteoporosi) che richiedessero un intervento chirurgico di riduzione e sintesi della frattura (attraverso placca e viti o con chiodo endomidollare) o di sostituzione protesica.

Tali soggetti sono stati suddivisi in due gruppi in base alla diagnosi iniziale ed al tipo di trattamento chirurgico necessario: nel gruppo A sono presenti soggetti che per artrosi o frattura sono stati sottoposti a sostituzione protesica dell'anca, nel gruppo B invece soggetti che a causa di frattura da fragilità sono stati sottoposti ad intervento chirurgico di riduzione e sintesi con chiodo endomidollare, con placca e viti o con sostituzione protesica.

Per prima cosa è stato effettuato a tutti i pazienti un prelievo di sangue nella fase preoperatoria per andare a valutare il livello dei valori di GGT frazionate; successivamente, nella fase intraoperatoria, nei pazienti sottoposti a intervento di posizionamento di protesi dell'anca totale o parziale, sono stati conservati collo e testa del femore e sono stati analizzati attraverso la microCT (collo del femore) e attraverso analisi istologica (testa del femore). Al termine dell'analisi sono stati esaminati i risultati attraverso analisi statistiche.

Per comprendere meglio l'argomento di questa tesi è utile prima fare un breve ripasso sul tessuto osseo e sul suo rimodellamento.

2.2 TESSUTO OSSEO

2.2.1 Organizzazione

L'osso è un particolare tipo di tessuto connettivo composto da una parte mineralizzata, che ne rappresenta il 60-70% (fosfato di calcio e conseguente idrossiapatite, carbonato di calcio, fosfato di magnesio, fluoruro di magnesio e ossido di ferro) e da una parte organica che rappresenta il restante 30-40% (collagene I, proteoglicani, osteocalcina, proteina GLA della matrice, osteonectina e proteine dell'attacco cellulare come la fibronectina, l'osteopontina, la trombospondina e le sialoproteine ossee); un importante ruolo nell'organizzazione ossea è rivestito inoltre dalla presenza in questo tessuto di fattori di crescita quali i fattori trasformanti $\beta 1, \beta 2, \beta 3$ e i fattori di crescita derivati dalle piastrine, il fattore di crescita insulino-simile, il fattore di crescita endoteliale e le proteine morfogenetiche ossee.

2.2.2 Rimodellamento osseo

Il tessuto osseo è in una fase di costante riassorbimento e formazione ossea che prende il nome di rimodellamento osseo e che è dovuta alla presenza di tre particolari tipi di cellule: **osteoblasti**, **osteociti** e **osteoclasti** (Figura 1).

Gli osteoblasti sono deputati alla sintesi e alla secrezione della componente organica dell'osso, la sostanza osteoide.

Gli osteociti sono cellule ovoidali derivate dagli osteoblasti che apparentemente risultano inattive ma che potrebbero contribuire al rilascio del calcio in circolo. Gli osteoclasti invece sono cellule giganti derivate da precursori emopoietici della linea dei monociti-macrofagi e sono deputati al riassorbimento osseo.

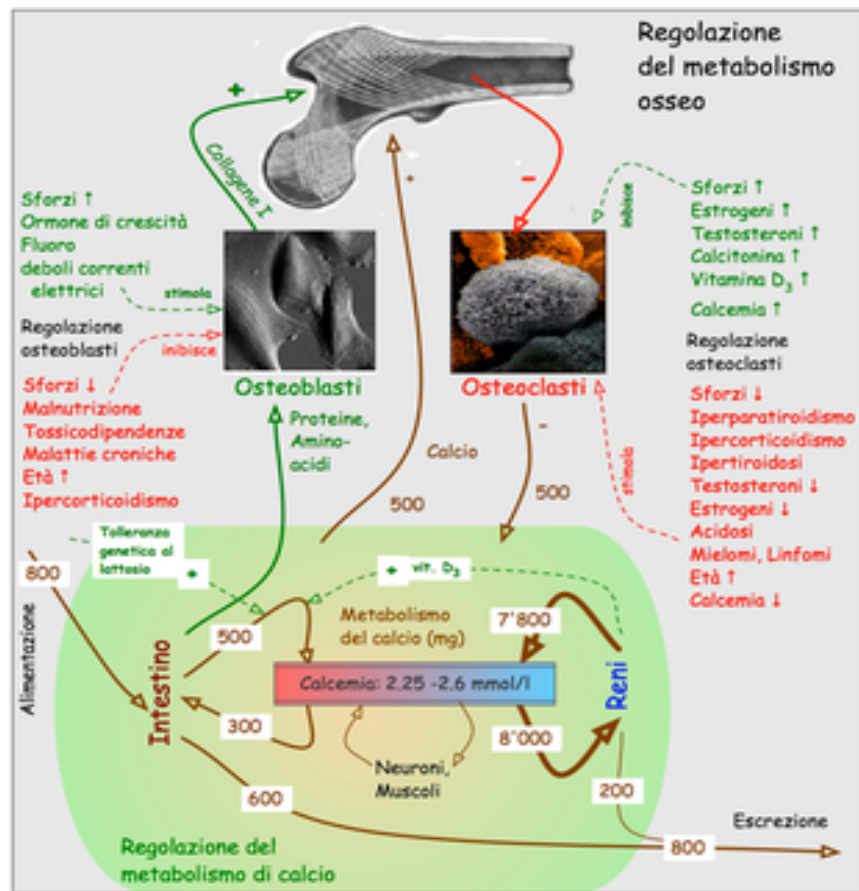


Figura 1: Cascata rimodellamento osseo

Il controllo del rimodellamento è influenzato da vari fattori quali sollecitazioni meccaniche, ormoni sistemici (ormone paratiroideo PTH, 1,25 diidrossicolecalciferolo, calcitonina, ormoni tiroidei, ormoni della crescita, glucocorticoidi e gli steroidi sessuali), citochine e fattori di crescita locali che fungono da mediatori agli stimoli meccanici ed ormonali.

L'attivazione degli osteoclasti, che rappresenta la prima fase del processo di rimodellamento osseo, avviene tramite il legame del recettore specifico RANK (presente sui monociti) a RANK ligando (prodotto dagli osteoblasti): questo passaggio verrà meglio analizzato nel capitolo riguardante il *Razionale dello studio* poiché è proprio attraverso il potenziamento di questo legame che le GGT andrebbero ad alterare la qualità ossea. Una volta attivati, gli osteoclasti si "attaccano" all'osso mineralizzato; questa fase è

regolamentata da specifiche proteine dette integrine (osteopontina, fibronectina e collagene di tipo I)⁷. Quindi, attraverso il rilascio di ioni idrogeno, queste cellule riescono a disciogliere il minerale osseo e successivamente a degradarlo per mezzo di enzimi lisosomiali.

Una volta riassorbito il tessuto osseo, fisiologicamente inizia la fase di apposizione di nuovo materiale osseo da parte degli osteoblasti; questo fenomeno avviene in nuclei focali che sono presenti lungo tutto lo scheletro.

I meccanismi fisiologici che regolano la sequenza temporale riassorbimento – apposizione non sono stati ancora completamente chiariti. Sicuramente svolgono un ruolo fondamentale sia il rilascio di fattori quali l'IGF-1 e 2 e il TGF- β durante la fase di riassorbimento ma con funzione di stimolazione per l'apposizione di nuovo osso⁸, sia la duplice azione dei fattori di riassorbimento su osteoclasti e osteoblasti che la posizione degli osteoblasti lungo la superficie dell'osso (essi infatti, in seguito al riassorbimento, tenderebbe a ristabilire l'integrità ossea).

Il processo fisiologico appena descritto può variare e perdere il suo equilibrio in varie patologie: nell'iperparatiroidismo primitivo, per esempio, l'ipersecrezione del paratormone da parte delle paratiroidi instaura una condizione di osteoporosi associata a ipercalcemia; nella malattia di Paget l'aumentato riassorbimento osseo sarebbe invece dovuto a vari fattori quali l'immunodeficienza ereditaria e/o un'infezione virale (da paramyxovirus) che attaccando gli osteoclasti li renderebbero più responsivi alla vitamina D. Anche per quanto riguarda il mieloma multiplo abbiamo una perdita dell'equilibrio che porterà alla formazione di lesioni osteolitiche a stampo⁹. Altra patologia di cui parleremo in maniera più estesa nel capitolo successivo e in cui si ha un alterazione del rimodellamento osseo è l'osteoporosi.

2.3. OSTEOPOROSI

2.3.1 Generalità

Con il termine “osteoporosi”, derivato dal greco *osteon* (osso) e *poros* (foro), si identifica una delle patologie ad eziopatogenesi multifattoriale più importanti e più frequenti dell’osso nonché la più importante dal punto di vista metabolico.

Questa patologia è definita come “malattia sistemica dello scheletro caratterizzata da una bassa massa ossea e da alterazioni della microarchitettura con un aumento della fragilità e del rischio di frattura”¹⁰. (Figura 2).

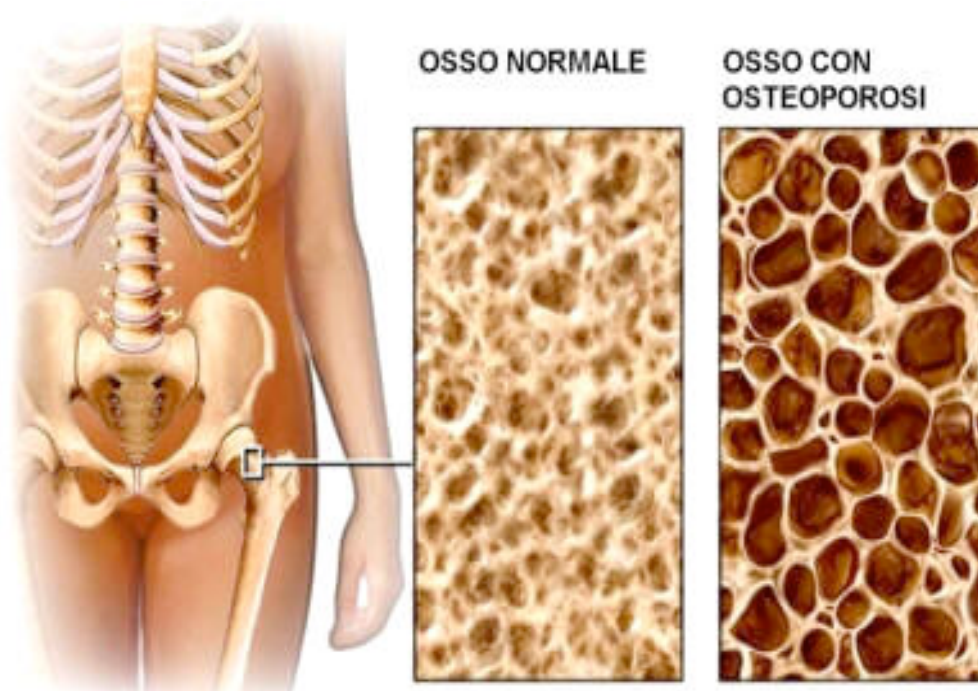


Figura 2: Differenza tra osso normale e osso osteoporotico

Fisiologicamente esiste nel nostro organismo un sistema di regolazione ormonale che evita lo sviluppo di squilibri del rimodellamento osseo; nel

caso dell'osteoporosi questo sistema di regolazione viene a perdere la sua efficacia andando così a creare uno stato di diminuita densità ossea, che colpisce sia la componente minerale sia la componente organica, con carattere di progressività e aumento della predisposizione del soggetto affetto da questa patologia a fratture ossee da fragilità.

E' importante comprendere che con frattura da fragilità si intende una frattura che si verifichi in seguito ad un trauma a bassa energia che non avrebbe fratturato un osso normale.

La perdita di tessuto osseo può essere dovuta sia a fattori estrinseci che a fattori intrinseci e si può verificare sia per un'incapacità degli osteoblasti a riparare gli effetti degli osteoclasti sia per un'alterazione degli osteoclasti stessi, sia per la carenza di substrati della matrice quali proteine e mucopolisaccaridi ¹¹.

2.3.2 Fattori di rischio

Prendendo in considerazione l'età possiamo vedere come essa sia strettamente correlata all'osteoporosi: la perdita di massa ossea inizia tra i 35 e i 45 anni in entrambi i sessi ma successivamente alla menopausa è maggiore nella donna. La menopausa infatti è la causa del 50% della perdita di osso trabecolare spugnoso (l'altra metà è dovuta al processo di invecchiamento) e ciò è dovuto alla diminuzione degli ormoni estrogeni (si ha infatti aumento di osteoporosi anche negli uomini sottoposti a castrazione). Ulteriore dato che conferma l'importanza della menopausa come fattore di rischio per l'osteoporosi è il fatto che circa il 50% della massa di osso spugnoso e il 35% della massa di osso corticale vengano persi nel corso della vita dalle donne, mentre nell'uomo la perdita è pari ai due terzi della quantità persa dalle donne ^{12, 13}. Altra considerazione da fare è la maggior predisposizione dell'osso trabecolare-spugnoso alla perdita di

massa ossea: esso è probabilmente dovuto al maggior rapporto tra superficie e volume, al microambiente cellulare e all'attività metabolica maggiore rispetto all'osso compatto; possiamo notare infatti come le fratture osteoporotiche si verificano soprattutto a livello della colonna vertebrale, luogo in cui l'osso trabecolare è maggiormente espresso. Ulteriori fattori di rischio oltre a menopausa ed età sono: il BMI (Body Mass Index; aumento del rischio di frattura di 2-3 volte per ogni riduzione della deviazione standard di BMI), il fumo di sigaretta, l'alcool, bassi livelli di calcio nella dieta, insufficiente attività fisica, alterazione nella produzione della vitamina D^{14, 15}. Inoltre anche la familiarità per osteoporosi, una prolungata terapia cortisonica, fratture precedenti, l'immobilità (per più di 6 mesi dopo la menopausa), il menarca tardivo, l'amenorrea prolungata, epatopatie, tireotossicosi e l'artrite reumatoide possono aumentare il rischio di osteoporosi (Figura 3 a,b,c,d: fattori di rischio osteoporotici da "Linee guida per la diagnosi, prevenzione e terapia dell'osteoporosi Sinossi; edizioni Internazionali srl, divisione EDIMES-edizioni Medico-Scientifiche-Pavia").

| FATTORI DI RISCHIO CLINICI PIÙ COMUNI CON LIVELLI DI EVIDENZA | | |
|--|---|--|
| <i>Fattori di rischio</i> | <i>Fattori di rischio per bassa massa ossea</i> | <i>Fattori di rischio per frattura</i> |
| Massa ossea | --- | 1a |
| Età | 1a | 1a |
| Fratture da fragilità dopo 40 anni | 2 | 1a |
| Familiarità per fratture | 2 | 2 |
| Terapia cronica steroidea | 1a | 1a |
| Menopausa precoce (< 45 anni) | 1a | 2 |
| Peso | 1a | 2 |
| Ridotto apporto di calcio | 1a | 1a |
| Ridotta attività fisica | 2 | 2 |
| Fumo | 2 | 1a |
| Abuso di alcolici | 2 | 3 |
| Fattori rischio cadute | --- | 1a |

Il valore diagnostico delle metodiche di misura della massa ossea è discusso in dettaglio separatamente.

Figura 3a: fattori di rischio osteoporosi

Altre condizioni

- Broncopneumopatia cronica ostruttiva
- Anoressia nervosa
- Emocromatosi
- Fibrosi cistica
- Malattie metaboliche del collagene (osteogenesi imperfecta, omocistinuria, Ehlers-Danlos, Marfan, ecc.)
- Trapianto d'organo
- Alcoolismo
- Fumo
- Tossicodipendenza
- Farmaci (oltre ai cortisonici): ciclosporina, diuretici dell'ansa, ormoni tiroidei a dosi soppressive in postmenopausa, anticoagulanti, chemioterapici, anticonvulsivanti, agonisti e/o antagonisti del GnRH
- Immobilizzazione prolungata
- Grave disabilità

**Queste caratteristiche aumentano il rischio di frattura anche indipendentemente dalla densità minerale ossea.*

Figura 3b: fattori di rischio di fratture osteoporotiche

ELENCO DELLE CONDIZIONI ASSOCIATE AD OSTEOPOROSI

Malattie endocrine

- Ipogonadismo
- Ipercortisolismo
- Iperparatiroidismo
- Ipertiroidismo
- Iperprolattinemia
- Diabete mellito tipo I
- Acromegalia
- Deficit GH

Malattie ematologiche

- Malattie mielo e linfoproliferative
- Mieloma multiplo
- Mastocitosi sistemica
- Talassemia

Malattie apparato gastro-enterico

- Malattie croniche epatiche
- Morbo celiaco

- Malattie infiammatorie croniche gastro-intestinali
- Gastrectomia
- Intolleranza al lattosio
- Malassorbimento intestinale
- Insufficienza pancreatica

Malattie reumatiche

- Artrite reumatoide
- LES
- Spondilite anchilosante
- Artrite psoriasica
- Sclerodermia

Malattie renali

- Ipercalciuria idiopatica renale
- Acidosi tubulare renale
- Insufficienza renale cronica

>>> segue

Figura 3c: fattori associati ad osteoporosi

Altre condizioni

- Broncopneumopatia cronica ostruttiva
- Anoressia nervosa
- Emocromatosi
- Fibrosi cistica
- Malattie metaboliche del collagene (osteogenesi imperfecta, omocistinuria, Ehlers-Danlos, Marfan, ecc.)
- Trapianto d'organo
- Alcoolismo
- Fumo
- Tossicodipendenza
- Farmaci (oltre ai cortisonici): ciclosporina, diuretici dell'ansa, ormoni tiroidei a dosi soppressive in postmenopausa, anticoagulanti, chemioterapici, anticonvulsivanti, agonisti e/o antagonisti del GnRH
- Immobilizzazione prolungata
- Grave disabilità

Figura 3d: continuo fattori associati ad osteoporosi

2.3.3 Classificazione

Per quanto riguarda la classificazione dell'osteoporosi essa può essere di vari tipi anche se la più rilevante è sicuramente quella che la distingue in primitiva e secondaria.

L'osteoporosi primitiva è da considerarsi, a differenza dell'osteoporosi secondaria, la “malattia” che va a causare la diminuzione della resistenza ossea e la conseguente maggior predisposizione alle fratture; essa può essere giovanile, idiopatica dell'età adulta, post-gravidica, post-menopausale (o di tipo I) e senile (o di tipo II).

L'osteoporosi secondaria è invece da considerarsi la conseguenza di una patologia di base o dell'uso di particolari farmaci. Le principali condizioni in grado di provocare la comparsa di osteoporosi sono:

- Malattie endocrino metaboliche (ipercortisolismo, iperparatiroidismi, ipertiroidismo, ipogonadismo, anoressia mentale).
- Condizioni associate a malassorbimento intestinale.
- Malattie mielo e linfoproliferative.
- Malattie metaboliche del collagene (osteogenesi imperfetta).
- Malattie reumatiche (artrite reumatoide e psoriasica, LES).
- Malattie renali (insufficienza renale cronica, ipercalciuria idiopatica).
- Trapianto d'organo.
- Uso di molti farmaci: corticosteroidi, immunosoppressori e terapia cronica con eparina.

3. RAZIONALE DELLO STUDIO

3.1 GAMMAGLUTAMILTRANSFERASI

Le gamma-glutamyltransferasi (GGT) sono enzimi presenti sulla membrana di tutte le cellule ed in misura maggiore nelle cellule dei tessuti epiteliali implicati in attività secretorie e di assorbimento ¹⁶ quali il fegato, le vie biliari e il rene. Le GGT sono implicate nel metabolismo degli aminoacidi e il loro ruolo fondamentale è quello di catalizzare la scissione del legame γ -glutamminico tra il gruppo carbossile in posizione gamma dell'acido glutammico e un'ammina e successivamente il trasferimento dello stesso acido glutammico su un accettore ² (figura 4).

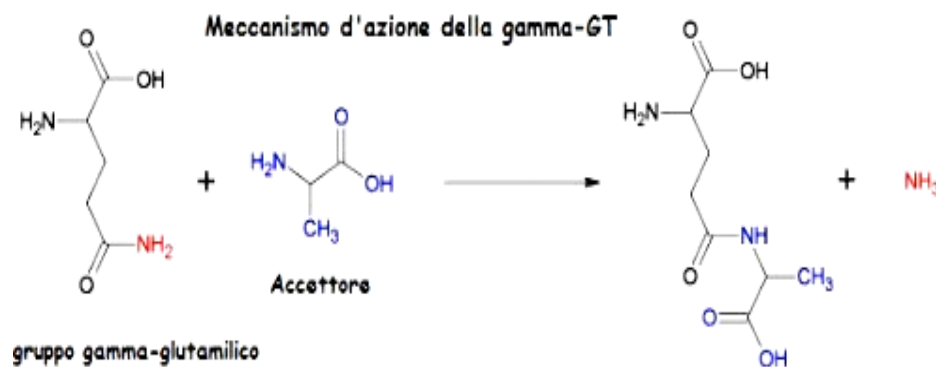


Figura 4: reazione catalizzata dalle GGT

I principali substrati fisiologici della GGT sono il glutatione o γ -glutammilcisteinglicina (GSH), il leucotriene C4 (coniugato del GSH), i coniugati del glutatione prodotti dalla GSH-transferasi, il nitrosoglutatione. Essendo il glutatione ad azione fundamentalmente antiossidante (mantiene il normale stato redox dentro la cellula con azione “scavenger” dei radicali

liberi ed è cofattore di enzimi con attività antiossidante) si è pensato per lungo tempo che le GGT fossero anch'esse implicate nella difesa antiossidante della cellula. E' emerso però come sia possibile anche un loro ruolo pro-ossidante: in presenza di metalli quali il rame [Cu(II)] e il ferro [Fe(III)] le GGT catalizzano infatti la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nell'ambiente extracellulare (figura 5). Il bilancio tra azione antiossidante e pro-ossidante dipenderà quindi dalla disponibilità di questi ioni metallici.

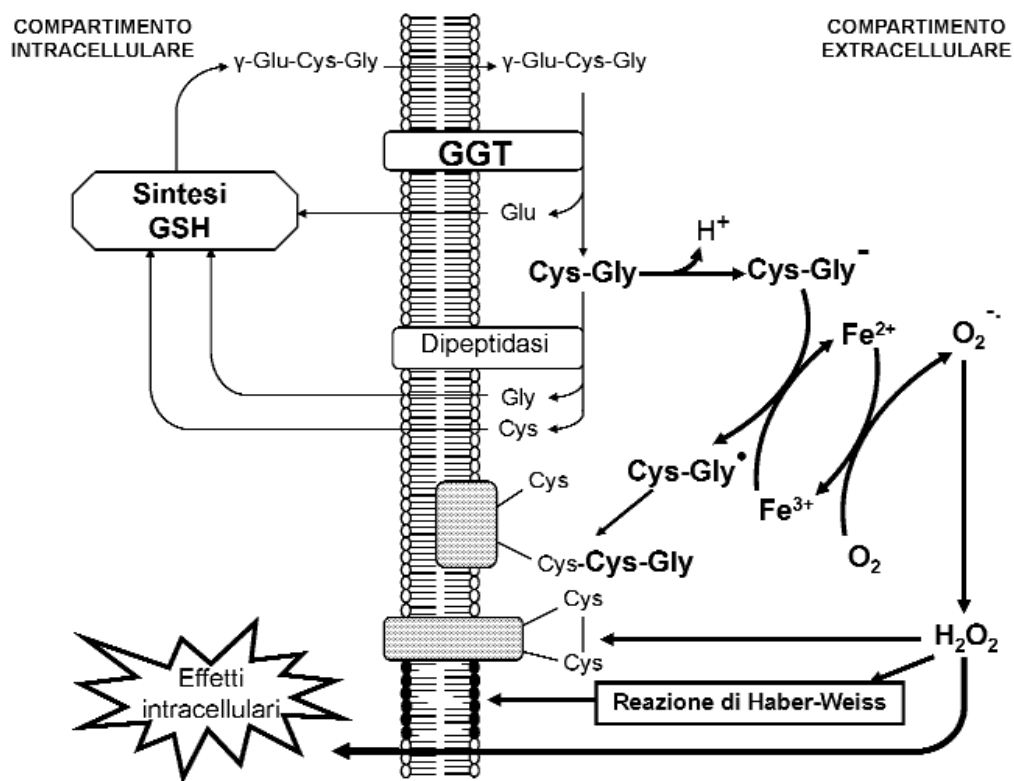


Figura 5: attività pro-ossidante delle GGT

Per quanto riguarda la loro correlazione con le patologie, è noto da tempo come l'innalzamento delle GGT sia correlato con un maggior rischio di malattie cardiovascolari, diabete e sindrome metaboliche; solo recentemente è stato scoperto come esse siano correlate anche alla mineralizzazione ossea.

Sempre di relativamente recente scoperta è la presenza di 4 differenti frazioni di tale enzima: frazione b-GGT ("big"), m-GGT ("medium"), s-GGT ("small"), f-GGT ("free"). Ognuna di queste frazioni avrebbe un diverso valore in varie patologie (per esempio nelle patologie epatiche e in quelle cardiovascolari). Il rationale di questo studio, prendendo spunto dalle recenti scoperte sulle frazioni delle GGT, è stato quello di andare a verificare se fosse presente una correlazione tra quest'ultime e il rimodellamento osseo. In base alla letteratura e ai nostri dati è emerso un rapporto tra le frazioni di GGT e il sistema RANK-RANKL che analizzeremo brevemente.

3.2 RIMODELLAMENTO OSSEO

Il sistema RANK e RANKL su cui interagiscono le GGT è alla base del rimodellamento osseo di cui stiamo parlando ed è quindi essenziale ripercorrere brevemente come avviene.

Fisiologicamente la differenziazione degli osteoclasti parte dalla secrezione da parte degli osteoblasti (sotto l'influenza del PTH, IL11 E $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3^{17, 18}) di M-CSF (Macrophage-colony stimulating factor) (Figura 6).

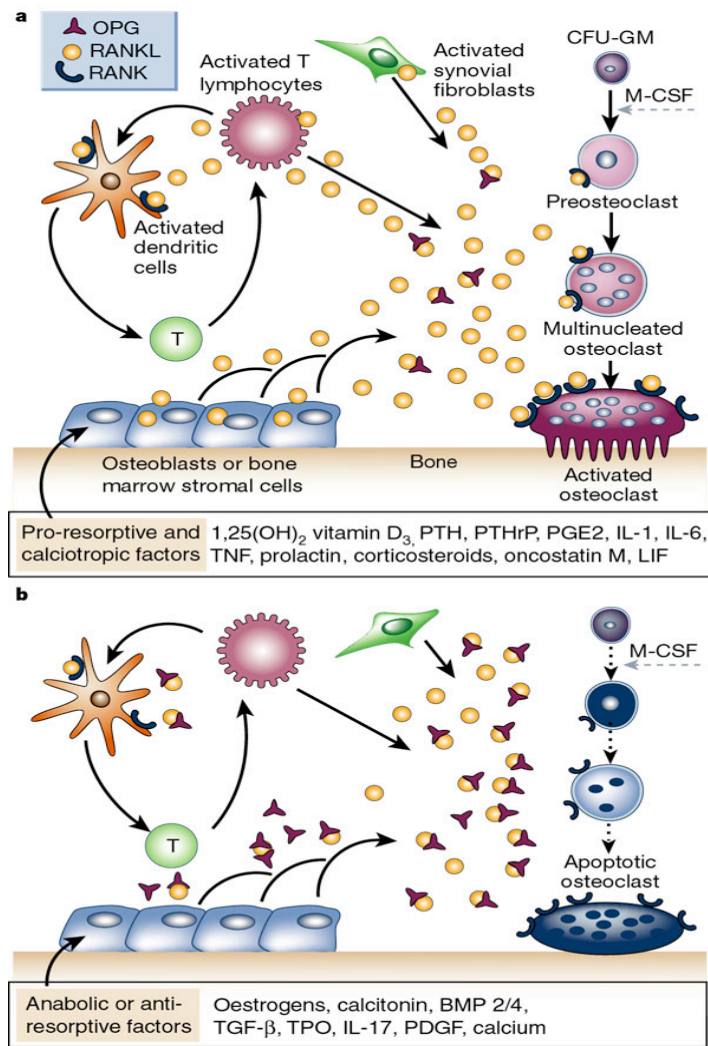


Figura 6: controllo ormonale del riassorbimento osseo da "Osteoclast differentiation and activation. William J. Boyle*, W. Scott Simonet & David L. Lacey "

RANKL, una proteina espressa sugli osteoblasti ed attivata dai linfociti T, si lega a RANK (recettore attivante dell'NF-kB, localizzato su gli osteoclasti e sulle cellule della linea monocitaria) inducendo così la differenziazione e l'attivazione degli osteoclasti che, unendosi tra loro, provocheranno l'assorbimento e la perdita ossea ¹⁹ (figura 7,8); per contro abbiamo l'osteoprotegerina (OPG), una proteina recettoriale, che inibisce, attraverso il legame con RANKL, RANK e il successivo riassorbimento.

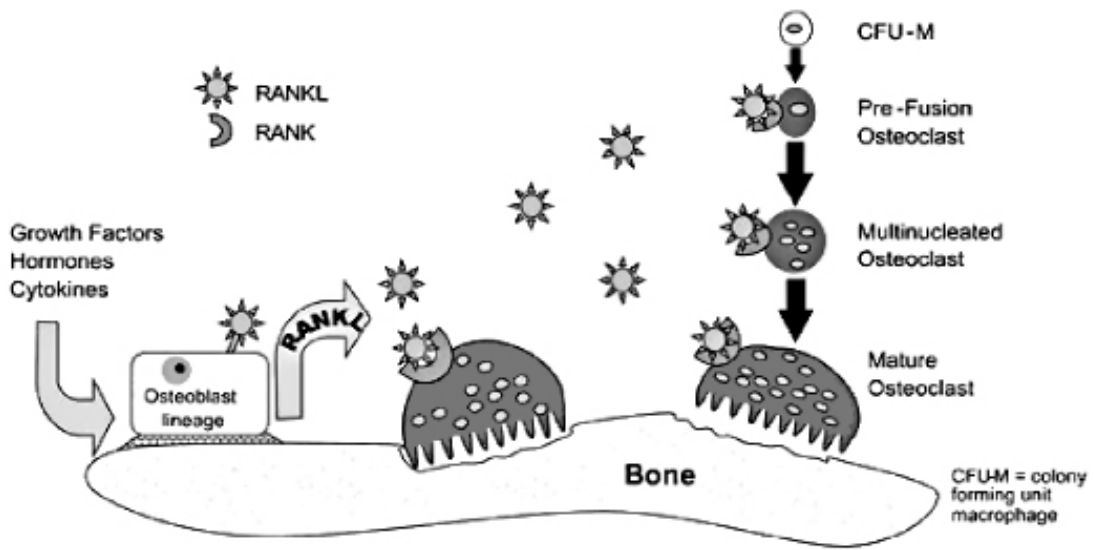


Figura 7: meccanismo RANK-RANKL

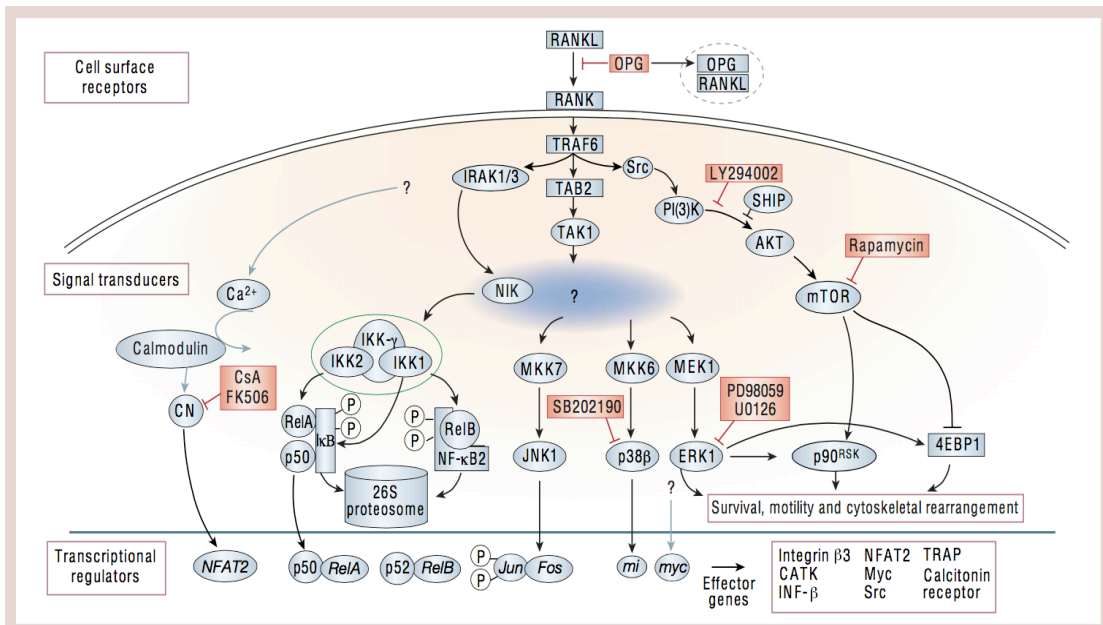


Figura 8: legame RANK-RANKL. Da "Osteoclast differentiation and activation. William J. Boyle*, W. Scott Simonet & David L. Lacey "

Studi in vivo su topi, hanno evidenziato che l'animale knockout per il gene che codifica per RANKL presentano una mancanza di osteoclasti. E' inoltre interessante vedere il caso opposto ovvero la mancanza di OPG: questi topi hanno una marcata osteoporosi¹⁹.

Altro dato rilevante è inoltre come questo complesso (complesso OPG/RANK/RANKL) sia soggetto alle influenze di eventi infiammatori e/o immunologici aumentando la perdita ossea e predisponendo il soggetto a rischio di frattura (è stato evidenziato infatti come il RANKL sia presente sulle cellule T attivate).

Quanto descritto sopra è servito per spiegare il razionale di questa tesi, in *Discussione* tratteremo in maniera più dettagliata la letteratura a riguardo ed i risultati ottenuti.

4. MATERIALI E METODI

Nella fase antecedente all'inizio del reclutamento dei pazienti abbiamo sottoposto lo studio clinico al Comitato Etico dell'Area Vasta Nord Ovest e siamo ancora in attesa dell'approvazione definitiva.

4.1 FASE DI RECLUTAMENTO

Da Febbraio 2014 ad Agosto 2015 abbiamo arruolato 2 tipologie di pazienti. Entrambe le tipologie di pazienti erano afferite all'Unità Operativa di Ortopedia e Traumatologia I Universitaria diretta dal Prof. Lisanti per problemi ortopedici o traumatologici tali da determinare la necessità di un intervento chirurgico.

Criteri di inclusione

- gruppo A: pazienti con artrosi primaria dell'anca tale da richiedere un intervento di sostituzione protesica; età compresa tra 60 e 85 anni.
- gruppo B: pazienti che a causa di una frattura da fragilità del femore prossimale, dovuta all'osteoporosi, richiedessero un intervento di riduzione e sintesi della frattura con chiodo endomidollare, placca e viti o protesi totale o parziale d'anca; età compresa tra 60 e 85 anni.

Criteri di esclusione

- gruppo A: presenza in anamnesi di malattie epatiche, abuso di alcool, osteoporosi nota (trattata o meno) e terapia con farmaci che possano inficiare la qualità ossea (es. terapia cortisonica cronica).

Successivamente alla firma del consenso informato è stata inoltre compilata una scheda di raccolta dati relativa all'anamnesi fisiologica e patologica del paziente (Figura 10).

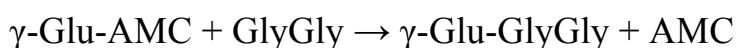
| Dati per l'analisi delle frazioni plasmatiche di g-glutamyltransferasi | | | | | |
|---|--|----|--|----|--------|
| Nome e Cognome (Codice) | | | (Telefono) | | |
| Data di nascita: | | | Sesso: M F | | |
| Diagnosi: | | | | | |
| DATA prelievo ematico: | | | Digiuno: Si No | | |
| Peso (kg) | Altezza (m) | | Circonferenza vita/fianchi (cm) | | |
| Pressione arteriosa e Frequenza cardiaca | | | | | |
| Donne (menopausa) | SI | NO | Fumo (n° sigarette/die) da quando | | |
| Consumo di caffè (n° al giorno) | | | | | |
| Attività fisica (tipo; ore/settimana) | | | | | |
| Consumo di alcool | SI | NO | Dipendenza da alcool | SI | NO |
| Consumo giornaliero (n bicchieri): Birra (33 cl) Vino (bicchiere 125 ml) Superalcolico (bicchiere 40 ml) | | | Consumo saltuario (1-3 giorni settimana): Birra (33 cl) Vino (bicchiere 125 ml) Superalcolico (bicchiere 40 ml) | | |
| Patologie in corso: | | | Dislipidemia | SI | NO |
| Ipertensione | SI | NO | Diabete | SI | NO |
| Insufficienza renale | | | SI | NO | |
| Patologie cardiovascolari: | | | | | |
| | aortopatia | SI | NO | | |
| | cardiopatia ischemica (angina-ima) | SI | NO | | |
| | carotidopatia (allegare ecodoppler vasi collo) | SI | NO | | |
| | arteriopatia obliterante arti inferiore | SI | NO | | |
| | aneurisma aorta toracica e/o addominale | SI | NO | | |
| | scompenso | SI | NO | | |
| Patologie epatiche e biliari (epatite B e C, litiasi biliare, cirrosi epatica, ...) | | | SI | NO | Quale: |
| Patologia neoplastica pregressa o attuale | | | SI | NO | Quale: |
| Patologia infiammatoria sistemica attiva | | | SI | NO | Quale: |
| Altro (Allergie, patologie croniche...) | | | | | |
| Farmaci in uso: | | | allegare/riportare lista farmaci | | |

Figura 10: scheda di raccolta dati

4.2 FASE PREOPERATORIA

Durante la fase preoperatoria è stata raccolta per ogni paziente un'aliquota di sangue (3 ml), aggiuntiva a quella di routine, in provetta contenente EDTA; la provetta è stata inviata presso il Laboratorio di Patologia Clinica dell'AOU Pisana ed è stata utilizzata per l'analisi delle frazioni di GGT. In laboratorio il campione è stato iniettato in una colonna cromatografica per esclusione molecolare (Superose 6 HR 10/300 GL, GE Healthcare) ed eluito alla velocità costante di 0,5 ml/min da una fase mobile costituita da tampone sodio fosfato 0,1mM a pH 7,4 contenente NaCl 0,2 M, EDTA 0,1 mM, glicilglicina (Gly-gly) 4,5 mM. La colonna cromatografica era calibrata con proteine a peso molecolare noto per stabilire la relazione tra peso molecolare e volume di eluizione. Per poter determinare in continuo l'attività di GGT, attraverso una connessione a T, all'eluato della cromatografia è stata aggiunta continuamente una soluzione contenente il substrato fluorescente per la GGT, γ -Glutammina-7-amido-4-metilcumarina (γ GluAMC), rilasciata al flusso di 0,1 mL/min. La reazione enzimatica che si è creata è avvenuta per circa 4,5 minuti a pH 8,2 in una spira di reazione del volume 2,6 mL mantenuta a temperatura costante di 37°C in un bagnetto termostatico (Figura 11).

Poiché l'accettore della reazione catalizzata dalla GGT era incluso nella fase mobile, la presenza dell'enzima è stata visualizzata attraverso la liberazione del composto fluorescente amminometilcumarina (AMC) secondo la reazione:



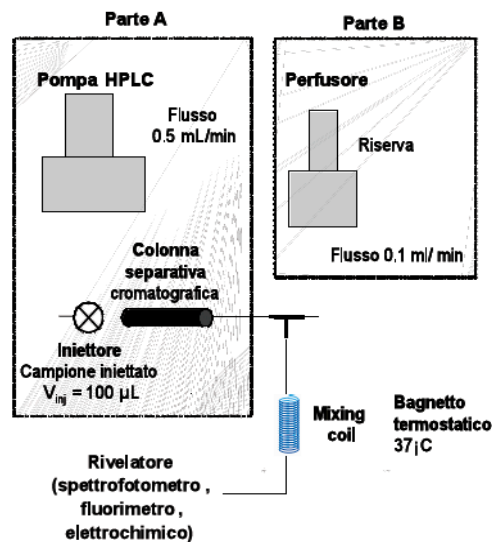


Figura 11: Apparato per separazione e quantificazione delle frazioni plasmatiche di GGT.

Il segnale derivante dalla reazione è stato rilevato tramite un fluorimetro operante a una lunghezza d'onda di eccitazione di 380 nm e di emissione di 440 nm. Con questo metodo, nel plasma umano, si sono distinte quattro frazioni con attività di GGT che eluiscono ai seguenti volumi: b-GGT 11,4 mL; m-GGT 15,0 mL; s-GGT 18,5 mL; f-GGT 21,2 mL.

Le condizioni di reazione sono state tali per cui l'area sottesa a tutto il cromatogramma, tra 10 e 25 mL di volume di eluizione, era proporzionale all'attività totale di GGT determinata dal laboratorio di analisi chimico-cliniche dell'Istituto di Fisiologia Clinica (CNR Pisa) e l'area sottesa ai picchi cromatografici era proporzionale all'attività di GGT associata ad ogni frazione.

La soluzione madre di γ GluAMC è stata preparata alla concentrazione di 4,5 mmol/L in etanolo 30% w/w contenente NaOH 0.005 N, tale soluzione è stata conservata a -20°C , protetta dalla luce. La soluzione di γ -Glu-AMC 4,5 mM è stata diluita al momento dell'uso in tampone TRIS 0,25M pH 8,5 per ottenere la concentrazione di γ -Glu-AMC 180 μM .

L'intensità di fluorescenza del segnale è stata espressa in unità arbitrarie di fluorescenza (f.u.)^{3, 20}.

Successivamente i dati raccolti sono stati analizzati con metodi statistici volti a determinare la correlazione dell'attività delle frazioni di GGT con i parametri anagrafici, anamnestici e ematochimici raccolti. I principali metodi statistici utilizzati sono stati l'analisi di regressione lineare univariata e multivariata oltre al calcolo dei parametri descrittivi la distribuzione dei valori delle frazioni di GGT.

4.3 FASE INTRAOPERATORIA

Nei pazienti affetti da artrosi localizzata primaria dell'anca (gruppo A) è stato effettuato un intervento di sostituzione protesica dell'anca e sono stati rimossi e conservati la testa e il collo del femore; la testa del femore è stata inviata presso l'Anatomia Patologica III, previa fissazione in formalina e successiva inclusione in paraffina, ed è stata sottoposta a valutazione morfologica (su sezioni colorate con Ematossilina-Eosina) (Figura 12). Il campione di collo femorale, anch' esso fissato in formalina, è stato analizzato presso i laboratori del CNR tramite Micro CT (Figura 13).

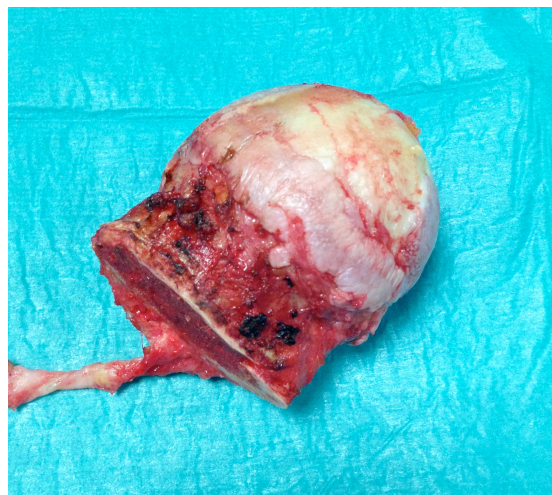


Figura 12: testa di femore

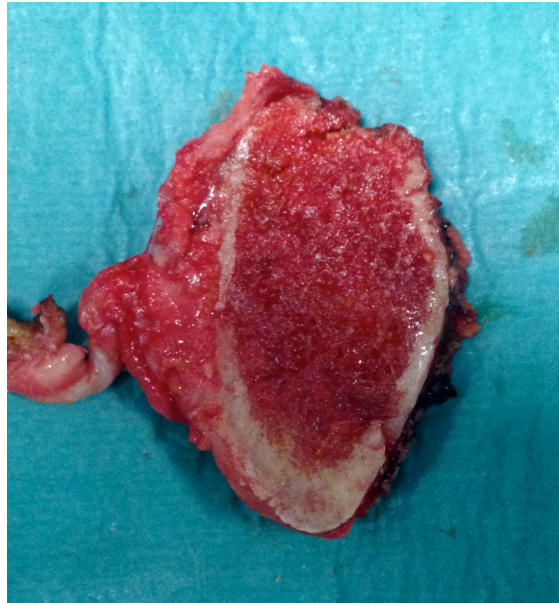


Figura 13: collo di femore

Per quanto riguarda i pazienti andati incontro a frattura da fragilità (gruppo B) essi sono stati trattati in base al tipo di frattura da fragilità del femore prossimale che avevano riportato con due tecniche chirurgiche differenti: coloro che riportavano una frattura mediale (detta anche intracapsulare) del collo del femore sono stati sottoposti ad intervento chirurgico di posizionamento di protesi d'anca parziale o totale (figura 14) con successivo invio della testa del femore all'Anatomia Patologica III e del collo al CNR; coloro che riportavano una frattura laterale (dette anche extracapsulare o inter/petrocanteriche) sono stati sottoposti ad intervento di riduzione e sintesi della frattura con posizionamento di un chiodo endomidollare o di una placca senza però effettuare nessun prelievo di tessuto osseo (Figura 15,16).



Frattura del collo femorale

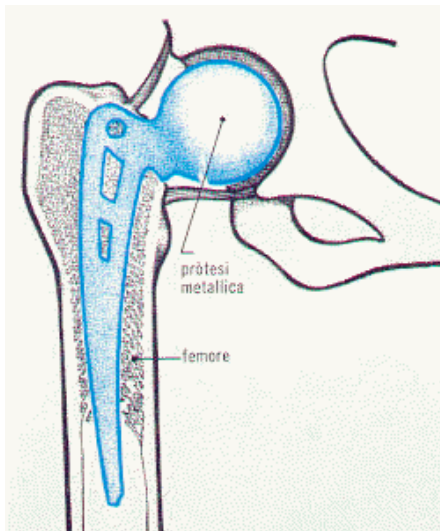


Figura 14: frattura del collo del femore e trattamento con endoprotesi

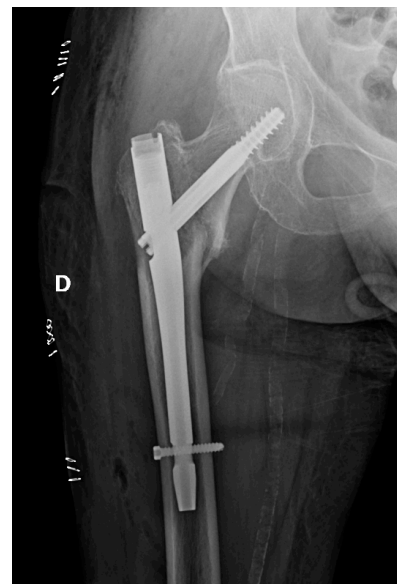
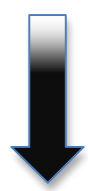


Figura 15: frattura pertrocanterica e trattamento con chiodo endomidollare

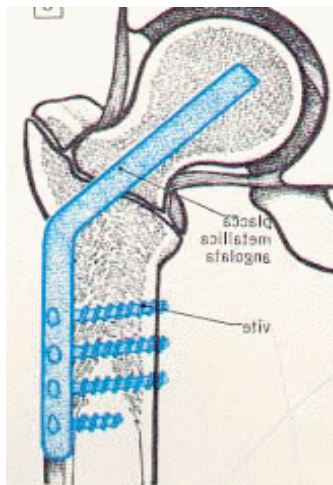


Figura 16: frattura pertrocanterica e trattamento con placca e viti

L'analisi con micro CT del collo del femore ha preso in esame due parametri caratteristici dell'osso: la frazione di volume osseo (Bone Volume/Total Volume o BV/TV) e lo structure model index (SMI) che descrive la forma delle trabecole (rod-like o plate-like). I valori emersi sono stati usati per

stratificare i pazienti in base al calcolo in quartili della distribuzione di BV/TV e SMI.

In conclusione, al fine di avere la certezza di aver effettuato per ogni paziente ogni passaggio, abbiamo compilato una check list (Figura 17).

| CHECK LIST "valutazione della correlazione tra le frazioni plasmatiche della gamma glutamil transferasi e la qualità ossea" | | |
|--|-------------------------------------|--------------------------|
| Nome | Cognome | |
| _____ | _____ | |
| Data di nascita | Data del prelievo di sangue | |
| ___/___/___ | ___/___/___ | |
| | SI | NO |
| Consenso informato | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Scheda di raccolta dati | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Prelievo di sangue | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Raccolta testa del femore | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Raccolta collo del femore | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Figura 17: check list

5. RISULTATI

Da Febbraio 2014 ad Agosto 2015 lo studio ha reclutato 93 pazienti di cui 61 donne e 32 uomini. Abbiamo un totale di 46 pazienti nel gruppo A (26 donne e 20 uomini) e 47 nel gruppo B (35 donne e 12 uomini). Per quanto riguarda l'età media essa è di 74 anni nel gruppo A (con un'età minima di 63 anni ed un'età massima di 83 anni) e di 83 anni nel gruppo B (con un'età minima di 61 anni ed un'età massima di 85 anni).

5.1 RISULTATI PRELIEVO DI SANGUE

Per quanto riguarda i risultati delle analisi eseguite sul prelievo di sangue esse hanno dimostrato una differente distribuzione delle frazioni delle GGT nei due gruppi di pazienti presi in esame (vedi grafici sottostanti dove “frattura” corrisponde al gruppo B e “artrosi” al gruppo A).

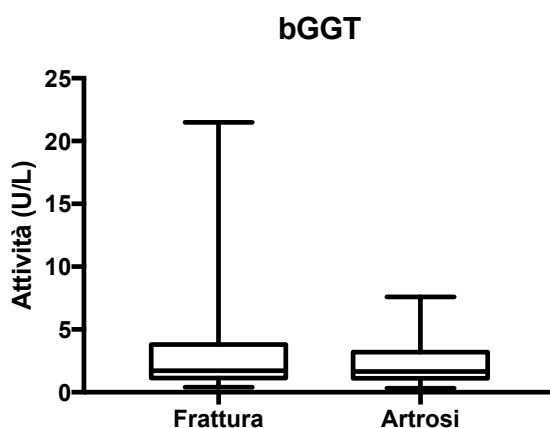


Grafico 1

Per quanto riguarda le b-GGT (grafico 1) esse, in media, sono appena superiori nei pazienti del gruppo B (1,72 U/L come valore medio) rispetto ai pazienti del gruppo A (1,65 U/L come valore medio).

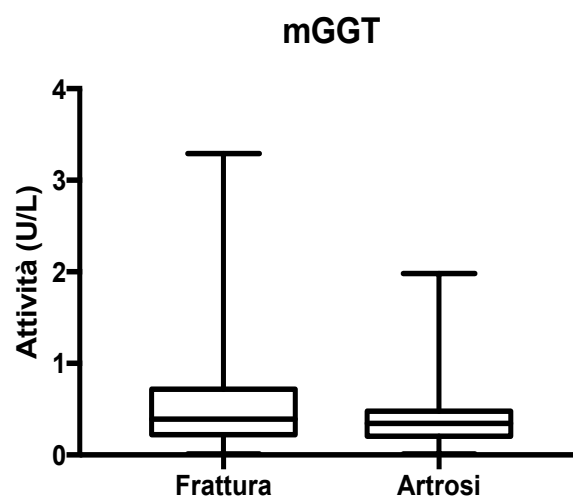


Grafico 2

Se andiamo a prendere in esame la frazione m-GGT (grafico 2) i suoi valori sono di poco discrepanti nei due gruppi, con un minimo incremento nei pazienti del gruppo B (0,39 U/L v.m.) rispetto al gruppo A (0,345 U/L v.m.).

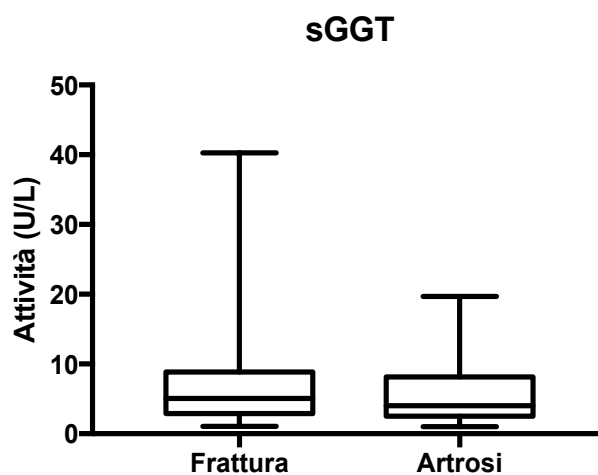


Grafico 3

I valori della frazione s-GGT (grafico 3) sono superiori nel gruppo B (5,07 U/L v.m.) e minori nel gruppo A (4,01 U/L v.m.).

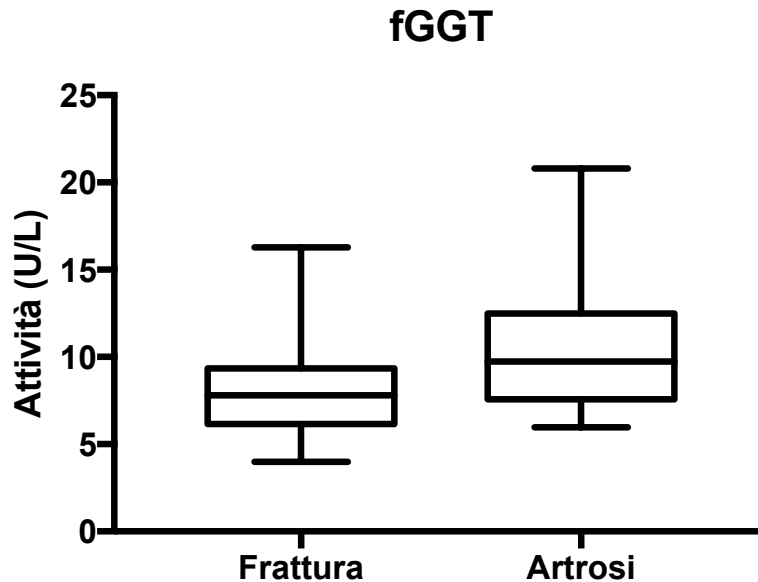


Grafico 4

A differenza delle altre frazioni, le f-GGT (grafico 4) sono maggiore nel gruppo A (9,73 U/L v.m.) rispetto al gruppo B (7,8 U/L v.m.).

Per quanto riguarda i valori delle GGT totali esse sono superiore nel gruppo A (16,44 U/L v.m.) rispetto al gruppo B (15,56 U/L v.m.).

Possiamo notare che l'unico dato che abbia avuto significatività statistica, con $p=0,0005$, è la frazione f-GGT (Figura 18).

| | Frattura (1) | | | | | Artrosi (2) | | | | | T test |
|---------|--------------|--------|---------|---------|------------------|-------------|--------|---------|---------|------------------|--------|
| | N | Median | Minimum | Maximum | 25 - 75 P | N | Median | Minimum | Maximum | 25 - 75 P | |
| bGGT | 47 | 1,72 | 0,4 | 21,49 | 1.148 to 3.682 | 46 | 1,65 | 0,33 | 7,6 | 1.130 to 3.170 | 0,8386 |
| mGGT | 47 | 0,39 | 0,01 | 3,29 | 0.220 to 0.712 | 46 | 0,345 | 0,01 | 1,98 | 0.210 to 0.470 | 0,3234 |
| sGGT | 47 | 5,07 | 1,05 | 40,29 | 2.918 to 8.788 | 46 | 4,01 | 1,04 | 19,68 | 2.620 to 8.110 | 0,3585 |
| fgGT | 47 | 7,8 | 3,99 | 16,29 | 6.167 to 9.328 | 46 | 9,73 | 5,97 | 20,81 | 7.590 to 12.330 | 0,0005 |
| GGT_TOT | 47 | 15,56 | 6,68 | 55,87 | 11.483 to 21.490 | 46 | 16,44 | 7,17 | 44,1 | 12.990 to 24.130 | 0,4491 |

Figura 18: risultati e significatività frazioni GGT

5.2 RISULTATI ANALISI DEL COLLO DEL FEMORE CON MICRO CT

Con la micro CT siamo andati ad analizzare la frazione di volume osseo (BV/TV) e lo structure model index (SMI). Dai dati sono stati calcolati i quartili di distribuzione per entrambi i valori e per le varie frazioni di GGT così da poter stratificare i pazienti.

Per quanto riguarda il BV/TV i pazienti sotto il 1° quartile sono considerati certamente osteoporotici, mentre i pazienti sotto il 4° sono considerati “normali” (appartenenti quindi al gruppo A); per i pazienti sotto il 2° e 3° quartile si è potuto fare una classificazione certa solo sulla base del BV/TV (vedi grafico 5).

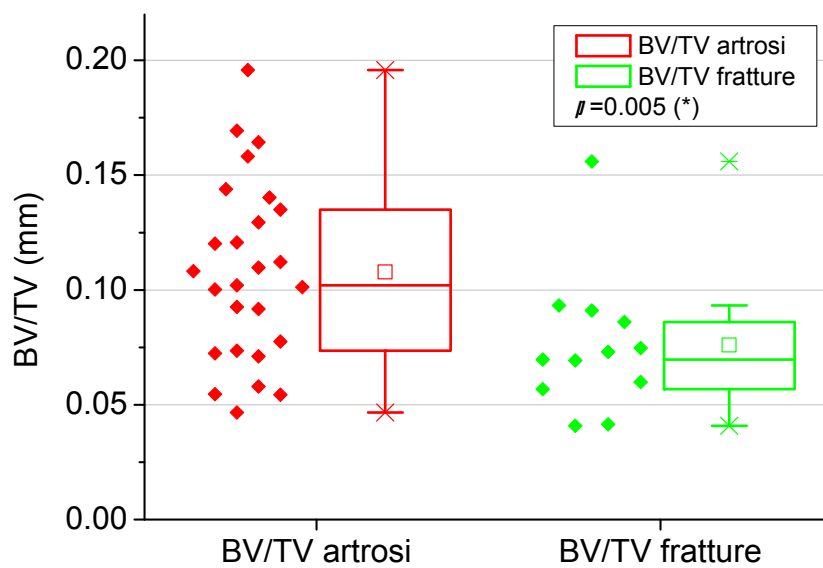


Grafico 5

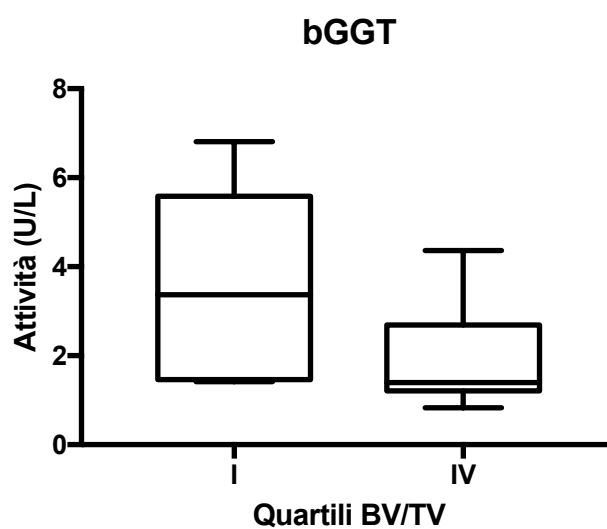


Grafico 6

Per quanto riguarda la frazione b-GGT essa è più alta nei pazienti in cui la BV/TV è minore (grafico 6) con una significatività di $p=0,0393$.

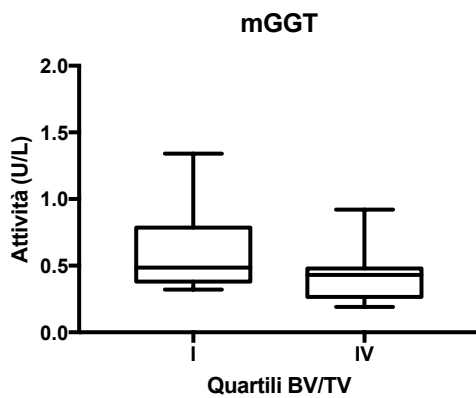


Grafico 7

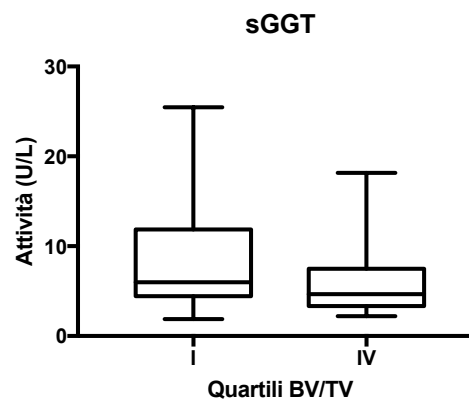


Grafico 8

Anche per quanto riguarda le m-GGT (grafico 7) e le s-GGT (grafico 8) esse sono maggiori nei pazienti con basso BV/TV.

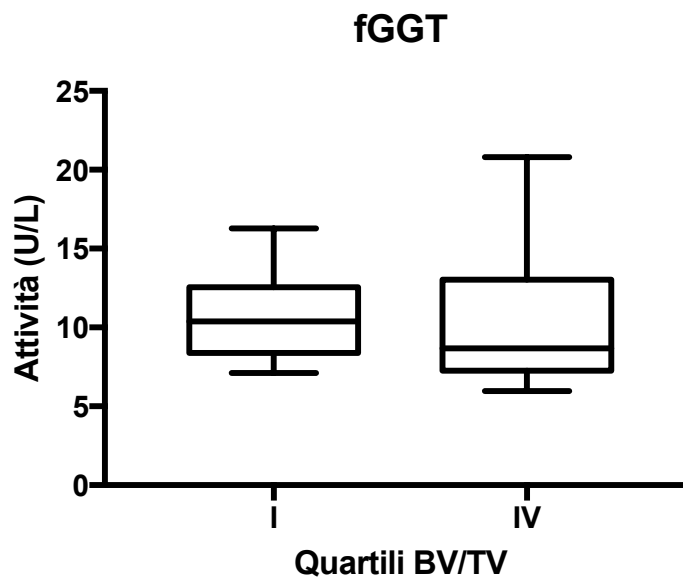


Grafico 9

Prendendo in considerazione le f-GGT (grafico 9) vediamo come il risultato cambi: le f-GGT sono minori nei pazienti con BV/TV basso.

Le GGT totali sono maggiori nei pazienti con bassa BV/TV.

Passando al parametro structure model index (SMI), che descrive la forma delle trabecole (rod-like o plate-like), vediamo come i pazienti del 1° quartile (gruppo A) sono più spostati verso il "plate" (maggiore resistenza), mentre i pazienti del 4° quartile (gruppo B) tendono più alla forma "rod".

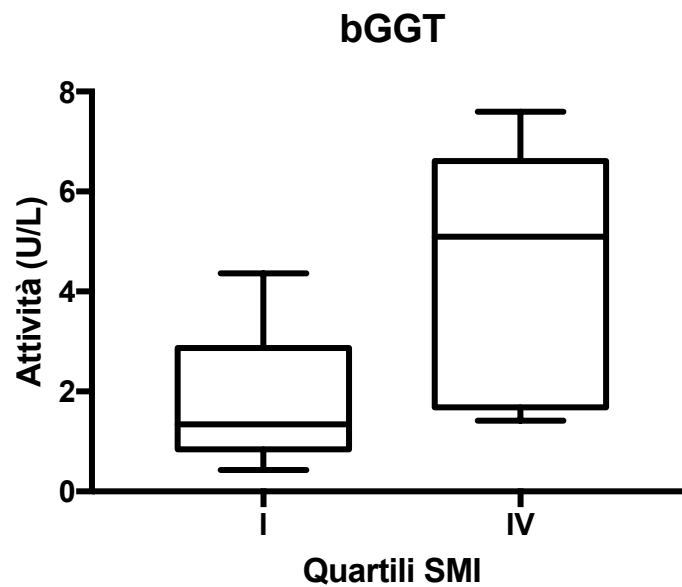


Grafico 10

Le b-GGT (grafico 10) sono nettamente maggiori nei pazienti con SMI rod, con una significatività di $p=0,0117$.

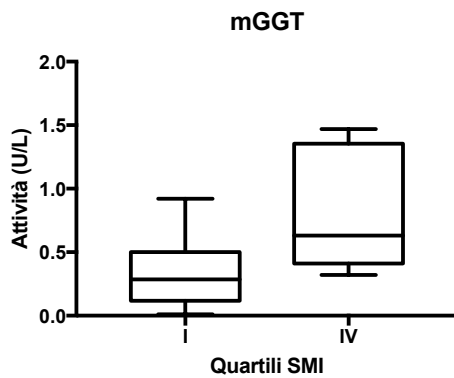


Grafico 11

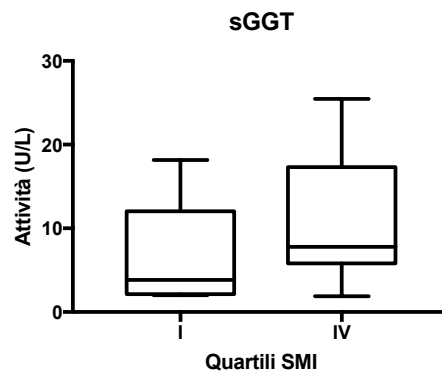


Grafico 12

Le frazioni m-GGT (grafico 11) e le s-GGT (grafico 12) sono maggiori nei pazienti con SMI rod. Per la frazione m-GGT abbiamo una significatività di $p=0,0357$.

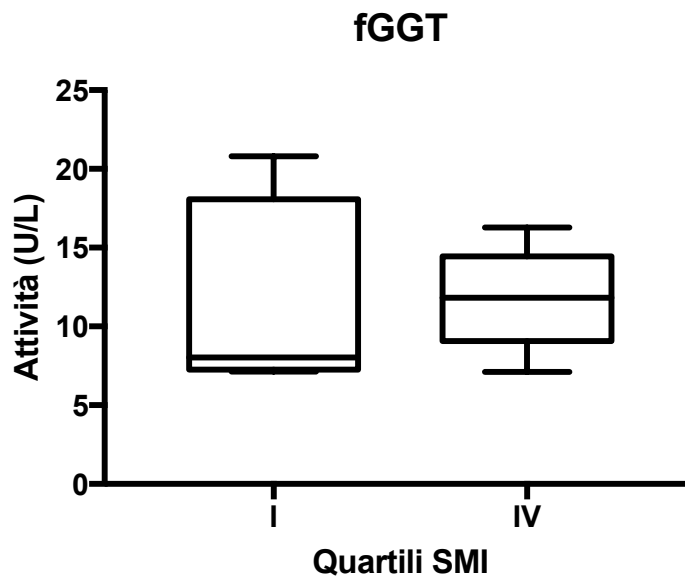


Grafico 12

Come abbiamo visto per l'altro parametro, anche qui il risultato della frazione f-GGT va contro tendenza rispetto alle altre frazioni (grafico 12): questa frazione aumenta nei pazienti con SMI plate.

Per quanto riguarda le GGT totali esse risultano aumentate nei pazienti con SMI rod.

Abbiamo quindi significatività statistica solo per la frazione b-GGT per il BV/TV e per b-GGT e m-GGT per quanto riguarda il SMI. (Figure 19,20).

| | Q_BV_TV | | | | | | | | | | Mann-Whitney Q1 vs. Q4 |
|-----------|---------|--------|---------|---------|------------------|----|--------|---------|---------|------------------|---------------------------|
| | 1 | | | | | 4 | | | | | |
| | N | Median | Minimum | Maximum | 25 - 75 P | N | Median | Minimum | Maximum | 25 - 75 P | |
| ETA' | 6 | 79,5 | 63 | 89 | 70.000 to 87.000 | 8 | 70 | 63 | 83 | 65.500 to 76.000 | 0,175 |
| GGT_TOT | 6 | 19,67 | 13,46 | 48,6 | 18.090 to 22.320 | 10 | 14,465 | 10,45 | 41,9 | 13.980 to 16.670 | 0,129 |
| bGGT | 6 | 3,37 | 1,42 | 6,81 | 1.480 to 5.170 | 10 | 1,4 | 0,83 | 4,36 | 1.320 to 2.540 | 0,039 |
| mGGT | 6 | 0,485 | 0,32 | 1,34 | 0.400 to 0.600 | 10 | 0,43 | 0,19 | 0,92 | 0.280 to 0.470 | 0,255 |
| sGGT | 6 | 5,985 | 1,9 | 25,47 | 5.300 to 7.330 | 10 | 4,67 | 2,2 | 18,16 | 3.360 to 5.210 | 0,193 |
| fGGT | 6 | 10,38 | 7,11 | 16,29 | 8.800 to 11.300 | 10 | 8,685 | 5,97 | 20,81 | 7.290 to 10.520 | 0,448 |
| BV/TV | 6 | 0,051 | 0,0409 | 0,0567 | 0.0415 to 0.0547 | 10 | 0,15 | 0,121 | 0,196 | 0.135 to 0.164 | 3E-04 |
| Tb.Sp | 6 | 2,702 | 1,636 | 4,424 | 2.572 to 3.146 | 10 | 1 | 0,882 | 1,333 | 0.926 to 1.075 | 0,001 |
| SMI | 6 | 3,271 | 2,939 | 3,59 | 3.135 to 3.530 | 10 | 2,506 | 1,827 | 3,002 | 2.106 to 2.650 | 0,002 |
| Male, N | 2 | | | | | 5 | | | | | |
| Female, N | 4 | | | | | 5 | | | | | |

Figura 19: risultati e significatività frazioni GGT e BV/TV tra 1° quartile (pazienti osteoporotici) e 4° quartile (pazienti artrosici)

| | Q_SMI | | | | | | | | | | Mann-Whitney Q1 vs. Q2 |
|-----------|-------|--------|---------|---------|------------------|---|--------|---------|---------|------------------|---------------------------|
| | 1 | | | | | 4 | | | | | |
| | N | Median | Minimum | Maximum | 25 - 75 P | N | Median | Minimum | Maximum | 25 - 75 P | |
| GGT_TOT | 8 | 14,17 | 10,29 | 41,9 | 10.635 to 27.495 | 8 | 23,915 | 13,46 | 48,6 | 19.550 to 36.765 | 0,074 |
| bGGT | 8 | 1,345 | 0,43 | 4,36 | 0.860 to 2.590 | 8 | 5,095 | 1,42 | 7,6 | 1.885 to 6.405 | 0,012 |
| mGGT | 8 | 0,285 | 0,01 | 0,92 | 0.135 to 0.490 | 8 | 0,63 | 0,32 | 1,47 | 0.420 to 1.350 | 0,036 |
| sGGT | 8 | 3,825 | 2,02 | 18,16 | 2.155 to 9.765 | 8 | 7,79 | 1,9 | 25,47 | 5.985 to 14.950 | 0,142 |
| fGGT | 8 | 8,035 | 7,13 | 20,81 | 7.270 to 15.565 | 8 | 11,815 | 7,11 | 16,29 | 9.365 to 14.395 | 0,401 |
| BV/TV | 8 | 0,13 | 0,0776 | 0,196 | 0.106 to 0.167 | 8 | 0,0555 | 0,0409 | 0,12 | 0.0441 to 0.0718 | 0,002 |
| Tb.Sp | 8 | 1,275 | 0,926 | 1,782 | 1.004 to 1.376 | 8 | 2,12 | 1,279 | 4,424 | 1.574 to 2.937 | 0,009 |
| SMI | 8 | 2,193 | 1,827 | 2,451 | 1.938 to 2.364 | 8 | 3,271 | 3,076 | 3,59 | 3.111 to 3.484 | 8E-04 |
| Male, N | 5 | | | | | 3 | | | | | |
| Female, N | 3 | | | | | 5 | | | | | |

Figura 20: risultati e significatività frazioni GGT e SMI tra 1° quartile (pazienti artrosici) e 4° quartile (pazienti osteoporotici)

A livello microstrutturale possiamo vedere come la trama trabecolare ossea sia differente tra tessuto osseo di un paziente artrosico (gruppo A) e tessuto osseo di un paziente osteoporotico (gruppo B) (Figure 21 e 22).

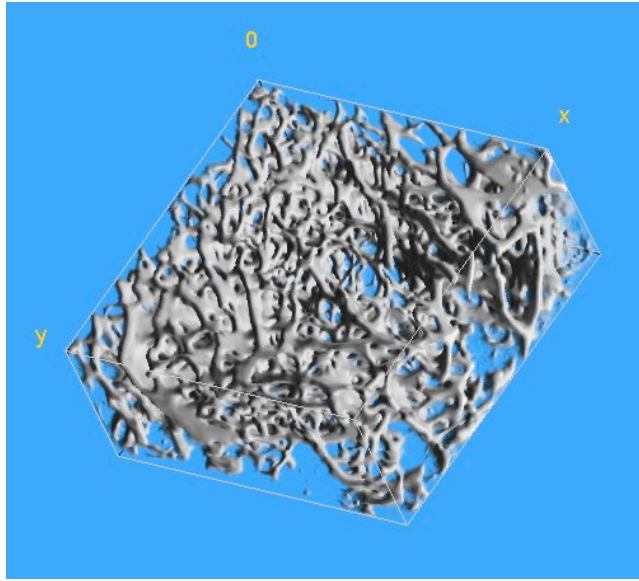


Figura 21: trabecole ossee in paziente artrosico (gruppo A)

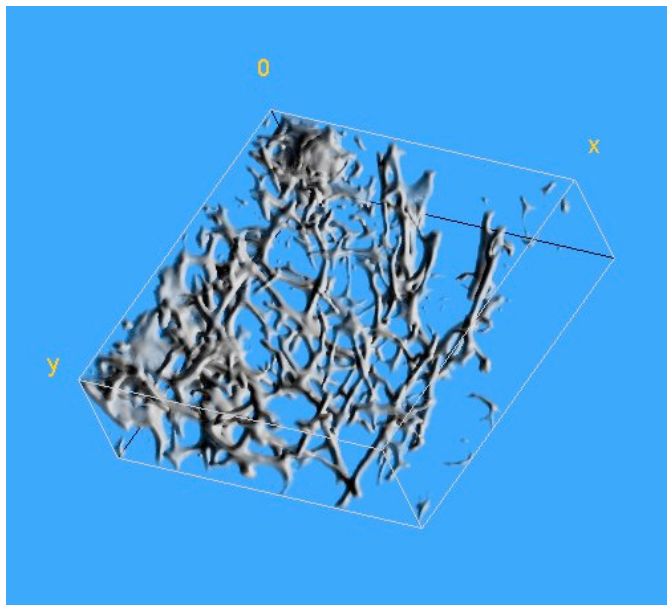


Figura 22: trabecole ossee in paziente osteoporotico (gruppo B)

5.3 RISULTATI ANALISI MORFOLOGICA DELLA TESTA DEL FEMORE

Su un totale di 93 pazienti sono state raccolte ed analizzate 32 teste di femore. Dall'analisi morfologica effettuata presso l'Anatomia Patologica III dell'AOUP sono stati confermati i quadri clinici. Il gruppo A infatti risulta avere un tessuto osseo rimaneggiato, con irregolarità della corticale e alterazioni della cartilagine articolare. Il gruppo B presenta un tessuto osseo francamente osteoporotico con aree emorragiche e sovrapposto rimaneggiamento osseo.

6. DISCUSSIONE

Prima di iniziare la discussione vera e propria ritengo opportuno fare delle precisazioni. La letteratura riguardante le GGT e il rimodellamento osseo è limitata e per quanto riguarda più nello specifico le frazioni delle GGT e la qualità ossea è pressoché inesistente. Tutto ciò è stato sia un fattore negativo per quanto concerne la mancanza di riferimenti che un fattore stimolante che ci ha spinto ad approfondire ancora di più l'argomento al fine di dimostrare una correlazione fino ad ora mai verificata da nessuno studio.

6.1 LETTERATURA

Uno dei primi studi riguardanti la correlazione tra GGT e qualità ossea fu quello di Shumpei Niida et al.²¹ nel 2003 in cui si andava ad analizzare l'effetto delle GGT su culture di cellule midollari murine. Il risultato fu un effettivo aumento degli osteoclasti e una successiva perdita ossea dovute però non all'attività enzimatiche delle GGT ma al loro legame recettoriale con RANKL (come avviene per le citochine quali l'IL1) che promuoveva la trasduzione del segnale. Quest'ultimo dato emerse dal fatto che anche GGT inattivate con acivicina andavano a stimolare gli osteoclasti, cosa impossibile se il passaggio fosse stato catalizzato dalla loro attività enzimatica.

Successivamente Yutaro Asaba et al.²², nel 2006, dimostrarono la correlazione tra aumento di GGT urinarie e aumentata attività osteoclastica; essi dosando le GGT urinarie in topi deficitari di osteoprotegerina notarono un incremento di GGT urinarie. Fu inoltre notato come questo aumento delle GGT fosse simile al valore delle pazienti che soffrivano di osteoporosi in età postmenopausale, parallelamente ad un incremento della desossipiridolina, e

come questo valore diminuisse dopo trattamento con alendronato (bifosfonato che aumenta il riassorbimento osseo attraverso l'inibizione degli osteoclasti). Ulteriore dato interessante che fu scoperto è come in topi che soffrivano di osteopetrosi (op-op) le GGT aumentassero dopo stimolazione osteoclastica attraverso iniezione di M-CSF o dopo somministrazione di paratormone (Figura 23).

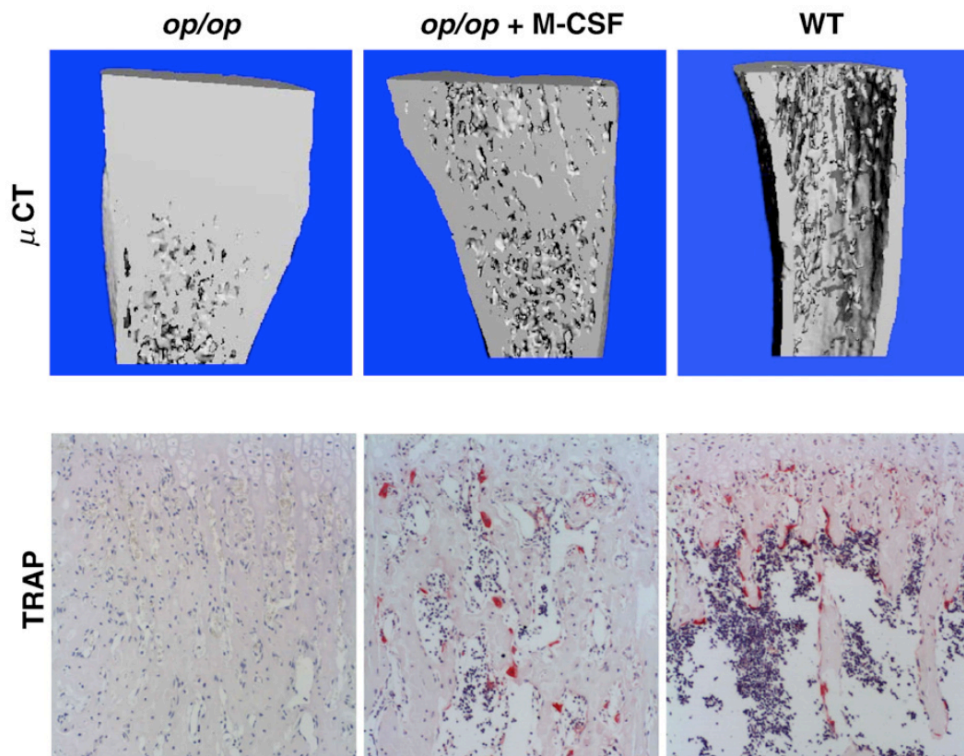


Figura 23: sezione di tibia alla micro TC. Confronto tra topi con osteopetrosi (op/op), topi op/op dove infuzione di M-CSF, topi wild type. Da “Urinary gamma-glutamyltransferase (GGT) as a potential marker of bone resorption.” Di Asaba Y et al.

Nel 2007 Kyoshi Hiramatsu et al.²³, prendendo sempre in analisi l'effetto sui topi di inoculazione di GGT purificate, presero in considerazione anche l'aspetto del tessuto osseo alla microCT. Essi andarono ad analizzare la metafisi della tibia e videro come la sovra espressione delle GGT fosse correlata ad una marcata osteoporosi con riduzione della frazione del volume osseo (BV/TV), aumento dello spazio trabecolare e modificazione dello structure model index (SMI) (Figure 24,25).

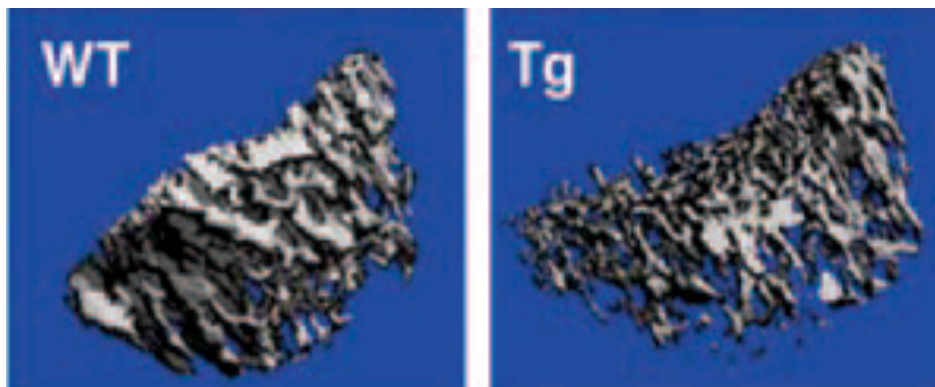


Figura 24: immagini tridimensionali di microTC della tibia di topi wild type (WT) e topi transgenici (Tg) da " Hiramatsu K, Asaba Y, Takeshita S, Nimura Y, Tatsumi S, Katagiri N, et al. Overexpression of gamma-glutamyltransferase in transgenic mice accelerates bone resorption and causes osteoporosis. *Endocrinology*. 2007; 148(6): 2708-15."

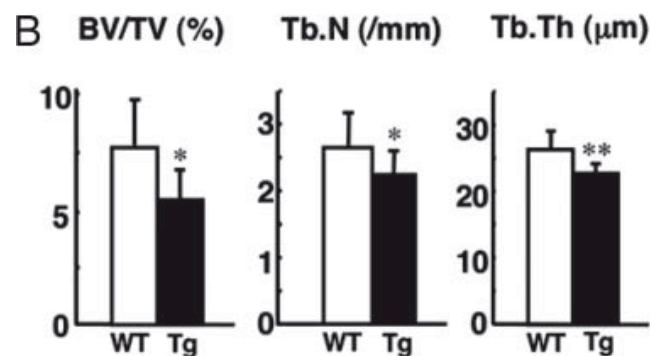


Figura 25: BV/TV, SMI e Tb.Th in topi wild type (WT) e in topi transgenici (Tg) da " Hiramatsu K, Asaba Y, Takeshita S, Nimura Y, Tatsumi S, Katagiri N, et al. Overexpression of gamma-glutamyltransferase in transgenic mice accelerates bone resorption and causes osteoporosis. *Endocrinology*. 2007; 148(6): 2708-15."

In disaccordo con i precedenti studi, nel 2011 Canan tikiz et al.²⁴ smentirono un effettiva correlazione tra valori delle GGT urinarie e osteoporosi.

Essi presero in esame un gruppo di donne in menopausa e le divisero in 3 gruppi in base al loro T score della colonna vertebrale lombare: osteoporotiche, osteopeniche e normali. Successivamente furono dosate in queste pazienti desossipiridolina, gamma-glutamilttransferasi, osteocalcina e fosfatasi alcaline ossee. Mentre per osteocalcina, desossipiridinolina e fosfatasi alcaline si notò un incremento nelle pazienti osteoporotiche, per quanto riguarda le GGT esse non erano significativamente aumentate nelle pazienti osteoporotiche, smentendo l'ipotesi che esse potessero diventare il nuovo marcatore di riassorbimento osseo.

Da un recente studio del 2014 di Beom-Jun Kim et al.²⁵ effettuato su 16,036 uomini di età >50 anni che presentavano un livello di GGT elevato è stato osservato come sia possibile una correlazione tra i livelli più elevati di GGT e la qualità del tessuto osseo. Essi hanno dosato le GGT sieriche in un gruppo di pazienti e successivamente hanno analizzato quale fosse la percentuale di presentazione di frattura osteoporotica negli anni successivi in questi pazienti. Il risultato è stato una maggior percentuale di fratture in quei pazienti in cui erano state rilevate GGT alte. Questo dato, discordando con quello dello studio precedente, riconfermerebbe il legame tra GGT e qualità ossea e il loro possibile utilizzo come marcatori di riassorbimento.

Il motivo per cui le GGT potenziano il rimodellamento osseo sarebbe, secondo alcuni studi^{2,26}, la presenza sulla cellula da esse stimolata, ovvero l'osteoblasto (attraverso il legame con RANKL), di specifici recettori per le GGT in grado di trasdurre il segnale. La conferma della funzione citochinomimica delle GGT starebbe nella struttura stessa della proteina: nelle GGT esisterebbe due ponti disolfuro, uno tra Cys 49 e 73 e uno tra Cys 191 e 195

(disposte secondo il motivo CX3C), elementi strutturali che designano una classe di chemochine di cui fa parte la neuroactina. Inoltre il motivo CX3C è un sito di coordinazione per il Cu(I) e nelle GGT sembrerebbe esposto sulla proteina²⁶.

6.2 STUDIO CLINICO

Arrivando a parlare del nostro studio, esso avrebbe parzialmente confermato una possibile correlazione tra le GGT e la qualità ossea.

6.2.1 Analisi prelievo sangue

Andando ad analizzare i risultati possiamo infatti vedere come i valori delle varie frazioni delle GGT cambino nei due gruppi di pazienti presi in esame. Per quanto riguarda i risultati del prelievo di sangue l'unico dato che abbia significatività è quello della frazione f-GGT ($p=0,0005$): esse sono minori nel gruppo B rispetto al gruppo A; abbiamo inoltre che i valori di GGT totali sono più bassi nel gruppo B rispetto al gruppo A andando così contro ai dati in letteratura che vogliono un aumento delle GGT nei pazienti osteoporotici. Per quanto riguarda i valori delle frazioni b-GGT, m-GGT e s-GGT esse non variano, se non di poco, tra i due gruppi.

6.2.2 Analisi collo del femore alla micro CT

Prendendo in considerazione i risultati della microCT, sia per quanto riguarda la frazione di volume osseo (BV/TV), nettamente diminuita nei pazienti del

gruppo B rispetto a quelli del gruppo A (Figura 26,27), sia per quanto riguarda il SMI (structure model index), vediamo come le frazioni di b-GGT, m-GGT e s-GGT e le GGT totali siano maggiori nei pazienti osteoporotici rispetto agli altri. E' da notare però che l'unico dato che abbia significatività è quello per il BV/TV delle b-GGT ($p=0,0393$) e per il SMI delle b-GGT ($p=0,0117$) e delle m-GGT ($p=0,0357$); si andrebbe così a confermare una possibile correlazione tra le GGT e la qualità ossea. Unico dato che discorda è quello delle f-GGT poiché esse sono aumentate nei pazienti non osteoporotici.

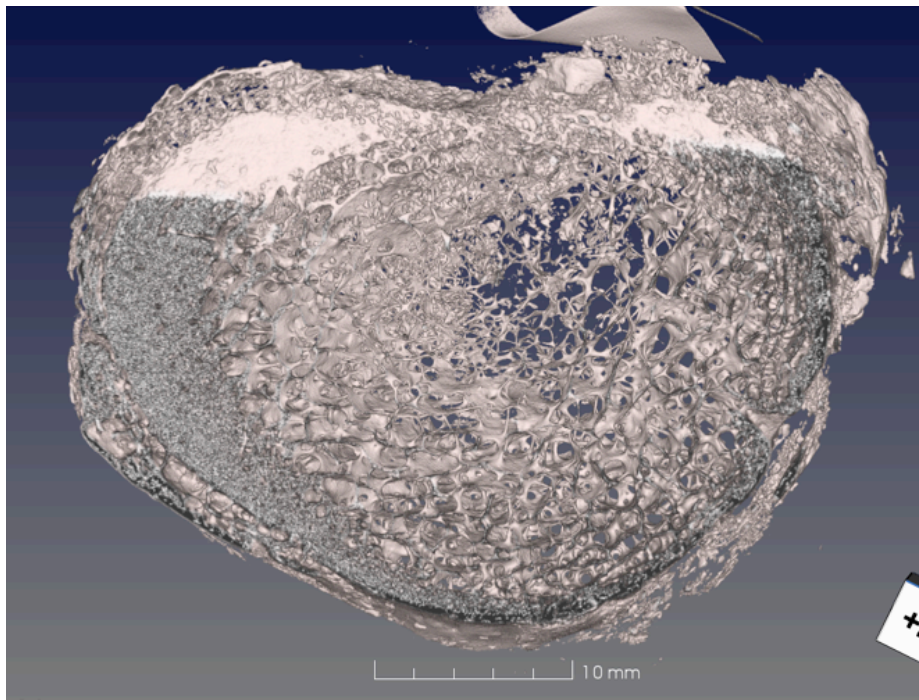


Figura 26: microTC paziente gruppo A

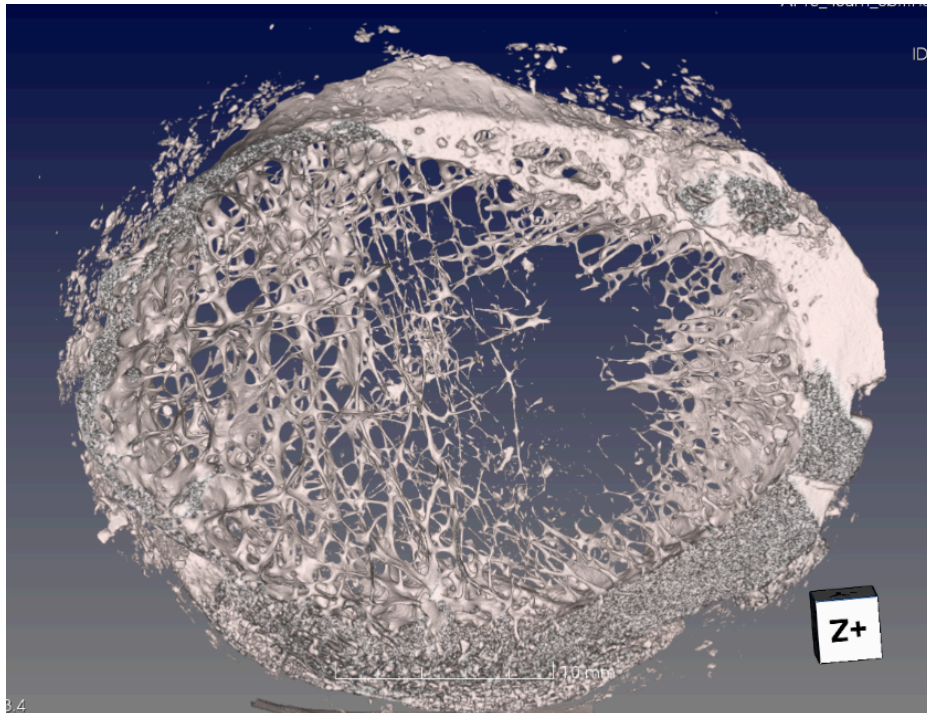


Figura 27: microTC paziente gruppo B

Possiamo quindi vedere come i risultati non confermino una chiara correlazione tra le frazioni delle GGT e il riassorbimento osseo per quanto riguarda le analisi del prelievo di sangue mentre siano più significativi per la frazione b-GGT e parzialmente per la frazione m-GGT per quanto riguarda la struttura ossea analizzata alla microTC.

6.2.3 Analisi morfologica della testa di femore

L'analisi morfologica ha evidenziato infine come i pazienti del gruppo A (artrosici) abbiano una particolare struttura ossea caratterizzata da tessuto

osseo rimaneggiato, alterazioni cartilaginee e irregolarità corticali. Per quanto riguarda i pazienti appartenenti al gruppo B (osteoporotici) essi presentano un tessuto osteoporotico con aree emorragiche e annesso rimaneggiamento osseo; questo dato conferma come i pazienti con frazioni plasmatiche delle GGT alterate (in questo caso la diminuzione della frazione f-GGT rispetto ai pazienti del gruppo A) abbiano un rimodellamento osseo alterato.

Facendo un ultimo confronto con la letteratura possiamo quindi dire che anche nel nostro studio, come nella maggior parte degli articoli precedentemente analizzati, esiste una correlazione tra valori alterati di GGT e qualità ossea anche se nel nostro caso, per quanto riguarda il prelievo del sangue, si vede una diminuzione delle f-GGT nei pazienti osteoporotici invece che un aumento come in letteratura.

Viene quindi nella nostra casistica evidenziato un ulteriore dato interessante: la possibile correlazione tra innalzamento della frazione f-GGT e l'artrosi e quindi una stimolante base per un successivo studio che vada a verificare l'attendibilità delle f-GGT come markers di questa patologia.

7. CONCLUSIONI

L'assenza di letteratura riguardante il rapporto tra frazioni delle GGT e osteoporosi ha rappresentato sia un limite che un punto di forza di questo lavoro.

E' a nostro giudizio importante sottolineare come questo studio clinico sia stato il primo effettuato su questo argomento poiché finora gli studi clinici presenti in letteratura hanno analizzato la sola correlazione tra le GGT totali e qualità ossea e non la sua correlazione con le singole frazioni di GGT; la peculiarità di questo studio clinico prospettico è stata inoltre l'aver effettuato lo studio in vivo su esseri umani invece che in vitro o in modelli animali come successo negli altri studi svolti finora sulle GGT totali.

Dopo un'attenta analisi dei dati ottenuti da questo studio sperimentale e dopo un confronto di essi con la letteratura riguardante l'argomento siamo arrivati a più conclusioni.

Come prima cosa possiamo vedere come una correlazione tra i valori di GGT frazionate (in particolare la frazione b-GGT e la frazione f-GGT) e la qualità ossea esista. Se andiamo infatti a valutare le frazioni b-GGT (e in maniera minore la frazione m-GGT) vediamo come esse aumentino nei pazienti osteoporotici (più nello specifico nei pazienti con BV/TV minore e SMI "rod"), confermando la nostra ipotesi di partenza.

I risultati di questo studio supporterebbero quindi la tesi che vuole le GGT come possibili nuovi indici sierologici di rimodellamento osseo. Se questi risultati fossero confermati da ulteriori approfondimenti ed un ampliamento dei pazienti presi in esami le GGT potrebbero in futuro affiancare le attuali metodiche diagnostiche di osteoporosi velocizzando così la diagnosi e diminuendo i costi sia per la Sanità sia per il paziente stesso (per esempio

riducendo gli esami radiografici a cui vengono sottoposti i pazienti); le GGT potrebbero essere inoltre considerate un fattore di rischio osteoporotico e diventare quindi un valido strumento per la diagnosi precoce, lo screening e il follow up della patologia.

Altra conclusione che è emersa inaspettatamente da questo studio è una significativa diminuzione del valore della frazione f-GGT nei pazienti osteoporotici rispetto ai pazienti artrosici, andando così ad evidenziare una correlazione tra f-GGT e rimodellamento osseo discordante rispetto alla nostra ipotesi di partenza e andando a sottolineare invece un possibile rapporto tra f-GGT e artrosi. Questo dato potrebbe quindi non solo essere interessante per quanto riguarda il rimodellamento osseo ma anche per quanto riguarda la possibile correlazione tra innalzamento delle f-GGT e la patologia artrosica.

Con questo studio abbiamo quindi sia confermato l'ipotesi iniziale riguardante il rimodellamento osseo e le frazioni di GGT sia gettato le basi per successivi studi riguardanti la correlazione tra frazioni di GGT e artrosi.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Lee DH, Jacobs DR, Jr., Gross M, Kiefe CI, Roseman J, Lewis CE, et al. Gamma-glutamyltransferase is a predictor of incident diabetes and hypertension: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Clinical chemistry*. 2003; **49**(8): 1358-66.
2. Franzini M CA, Mammini C. γ -Glutamyltransferasi: biochimica clinica e fisiopatologia umana. *Biochimica clinica*. **33**(1): 9-38.
3. Franzini M, Ottaviano V, Fierabracci V, Bramanti E, Zyw L, Barsacchi R, et al. Fractions of plasma gamma-glutamyltransferase in healthy individuals: reference values. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2008; **395**(1-2): 188-9.
4. Belcastro E FM, Cianchetti S, Lorenzini E, Masotti S, Fierabacci V, PUcci A, Pompella A, Corti A. Monocytes/macrophages activation contributes to b-gamma-glutamyltransferase accumulation inside atherosclerotic plaques. *Journal of Translational Medicine*. 2015.
5. Franzini M CA, Fornaciari I, Balderi M, Torracca F, Lorenzini E, Baggiani A, Pompella A, Emdin M, Paolicchi A. Cultured human cells release soluble gamma-glutamyltransferase complexes corresponding to the plasma b-GGT. *Biomarkers* 2009.
6. Franzini M FI, Siciliano G, Voldi L, Ricci G, Marchi S, Gagliardi G, Baggiani A, Torracca F, Fierabacci V, Miccoli M, Pompella A, Emdin M, Paolicchi A. Serum gamma-glutamyltransferase fractions in myotonic dystrophy type 1: differences with healthy subjects and patients with liver disease. *Clinical biochemistry*. 2010.
7. Horton MA, Davies J. Perspectives: adhesion receptors in bone. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1989; **4**(6): 803-8.

8. Howard GA, Bottemiller BL, Turner RT, Rader JJ, Baylink DJ. Parathyroid hormone stimulates bone formation and resorption in organ culture: evidence for a coupling mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981; **78**(5): 3204-8.
9. Snapper I KA. Myelomatosis; 1971.
10. G C. Le proiezioni future delle principali patologie cronico degenerative dell'anziano. 2002 [cited; Available from: http://www.sigg.it/attivita_cnr.html
11. Monticone M. Atti del Congresso Regionale S.I.M.F.E.R."La Malattia Osteoporotica: dall'individuazione del paziente al suo corretto trattamento"
12. Jones G, Nguyen T, Sambrook P, Kelly PJ, Eisman JA. Progressive loss of bone in the femoral neck in elderly people: longitudinal findings from the Dubbo osteoporosis epidemiology study. *BMJ (Clinical research ed)*. 1994; **309**(6956): 691-5.
13. Mazess RB. On aging bone loss. *Clinical orthopaedics and related research*. 1982; (165): 239-52.
14. Scane AC, Francis RM. Risk factors for osteoporosis in men. *Clinical endocrinology*. 1993; **38**(1): 15-6.
15. Compston JE. Risk factors for osteoporosis. *Clinical endocrinology*. 1992; **36**(3): 223-4.
16. Hanigan MH, Frierson HF. Immunohistochemical detection of gamma-glutamyl transpeptidase in normal human tissue. *J Histochem Cytochem*. 1996; **44**(10): 1101-8.
17. Takahashi N, Akatsu T, Sasaki T, Nicholson GC, Moseley JM, Martin TJ, et al. Induction of calcitonin receptors by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in osteoclast-like multinucleated cells formed from mouse bone marrow cells. *Endocrinology*. 1988; **123**(3): 1504-10.
18. Akatsu T, Takahashi N, Udagawa N, Sato K, Nagata N, Moseley JM, et al. Parathyroid hormone (PTH)-related protein is a potent stimulator of

osteoclast-like multinucleated cell formation to the same extent as PTH in mouse marrow cultures. *Endocrinology*. 1989; **125**(1): 20-7.

19. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003; **423**(6937): 337-42.

20. Franzini M, Bramanti E, Ottaviano V, Ghiri E, Scatena F, Barsacchi R, et al. A high performance gel filtration chromatography method for gamma-glutamyltransferase fraction analysis. *Anal Biochem*. 2008; **374**(1): 1-6.

21. Niida S, Kawahara M, Ishizuka Y, Ikeda Y, Kondo T, Hibi T, et al. Gamma-glutamyltranspeptidase stimulates receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression independent of its enzymatic activity and serves as a pathological bone-resorbing factor. *The Journal of biological chemistry*. 2004; **279**(7): 5752-6.

22. Asaba Y, Hiramatsu K, Matsui Y, Harada A, Nimura Y, Katagiri N, et al. Urinary gamma-glutamyltransferase (GGT) as a potential marker of bone resorption. *Bone*. 2006; **39**(6): 1276-82.

23. Hiramatsu K, Asaba Y, Takeshita S, Nimura Y, Tatsumi S, Katagiri N, et al. Overexpression of gamma-glutamyltransferase in transgenic mice accelerates bone resorption and causes osteoporosis. *Endocrinology*. 2007; **148**(6): 2708-15.

24. Canan Tıkız CU, Fatma Taneli, Ebru Yiğit Acar, Gül Gümüser, Gönül Dinç Horasan. Can Urinary Gamma Glutamyl Transferase be Used as a Bone Resorption Marker in Postmenopausal Osteoporosis? *Turkish Journal of Biochemistry*. 2011; **36**(2): 154-9.

25. Kim BJ, Baek S, Ahn SH, Kim SH, Jo MW, Bae SJ, et al. A higher serum gamma-glutamyl transferase level could be associated with an increased risk of incident osteoporotic fractures in Korean men aged 50 years or older. *Endocrine journal*. 2014; **61**(3): 257-63.

26. Kinlough CL PP, Bruns JB, et al. . Gamma- glutamyltranspeptidase: disulfide bridges, propeptide cleavage, and activation in the endoplasmic reticulum. *Methods in enzymology*. 2005.

9. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Michele Lisanti per avermi dato l'opportunità di frequentare e di apprendere nel suo reparto.

Ringrazio il dott. Nicola Piolanti per non essere stato solamente un tutor, che mi ha supportato in questo percorso e che mi ha trasmesso l'amore per l'ortopedia, ma anche un amico.

Grazie alla mia famiglia perché senza di loro non sarei arrivata dove sono e soprattutto non sarei, nel bene e nel male, la persona che sono.

Grazie a mia madre Doriana perché ogni confronto e ogni conflitto con lei mi hanno reso un persona più forte; ogni gesto di affetto e di amore da parte sua mi hanno reso una persona più amorevole e positiva; spero un giorno di essere il punto di riferimento per qualcuno come lei lo è per me.

Grazie a mio padre Roberto perché ci sono poche persone al mondo che riescono a farmi ridere come lui. E' l'esempio di come con il sorriso e la spensieratezza la vita assuma un altro sapore; lo ringrazio perché se sono la persona solare che sono oggi è grazie a lui.

Ringrazio mio fratello Simone, perché nonostante la lontananza è al mio fianco sempre e comunque.

Grazie a Maddalena e Beatrice, perché non sono state semplicemente colleghe per me ma le sorelle che non ho mai avuto, le persone che, nel bene e nel male, ci sono sempre state. Sono state ancora di salvezza quando non pensavo di farcela e sono state capaci di farmi sorridere di nuovo. Loro che non mi hanno mai giudicato ma che sono state al mio fianco sempre e comunque con tutto l'amore e l'affetto che solo due persone dal cuore grande come loro possono fare.

Grazie a Marina, Giulia, Carlotta, Giulia e Alice perché l'amicizia è sapere che, lontane o vicine, nel momento del bisogno le tue amiche ci sono. Le mie

amiche sono il mio passato, il mio presente e il mio futuro e per questo le ringrazio.

Grazie a Claudio per il supporto che mi ha dato, l'amicizia che condividiamo e le risate fatte insieme; la sua generosità e la sua bontà l'hanno reso per me un vero amico.

Grazie a Marco per essere stato presente sia nei momenti migliori che nei momenti peggiori; l'esempio di come non importi la quantità ma la qualità del tempo che passi con una persona a fare la differenza.

Un ringraziamento va a Nicola, Gaspare, Anna Chiara, Paola, Elena e Erika perché grazie a loro l'università non è stata soltanto un sacrificio ma anche un modo per conoscere persone splendide.

Grazie a Lorenzo per essermi stato vicino con affetto, pazienza e sempre con il sorriso.

Grazie a Claudia e Valentina (e il piccolo Leonardo) per il supporto e l'amore che mi hanno sempre dato. In punta di piedi sono entrate nella mia vita e piano piano sono arrivate ad essere per me persone indispensabili, amiche fidate e punti di riferimento.

Un ringraziamento speciale va a Veronica e Betta (per l'amicizia che ci lega), Luca, Michele, Sara, Anna, Lorenzo, Gianluca, Carmine, Michele, Francesco, Gisberto, Antonella; loro che sono stati per me come una famiglia e che in questi anni mi hanno supportato, incoraggiato e fatto divertire. Ognuno di loro ha contribuito ad accrescere la mia passione per l'ortopedia e mi ha fatto comprendere come si possa lavorare con il sorriso.

“Ogni persona che passa nella nostra vita è unica. Sempre lascia un po' di sé e si porta via un po' di noi. Ci sarà chi si è portato via molto, ma non ci sarà mai chi non avrà lasciato nulla. Questa è la più grande responsabilità della nostra vita e la prova evidente che due anime non si incontrano per caso.”

(Jorge Luis Borges).