

PROGETTO 3. Potenziale diagnostico e terapeutico della pentrassina lunga PTX3 nelle infezioni batteriche dell'osso, sviluppato presso la Fondazione Humanitas per la Ricerca (FHR), in collaborazione con l'Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRGB-CNR) presso l'Istituto Clinico Humanitas IRCCS (ICH).



Executive summary

L'osteomielite (OM) è una grave infezione del tessuto muscoloscheletrico spesso associata ad eventi traumatici e chirurgia artroplastica (con particolare riferimento all'impianto di protesi dell'anca e del ginocchio). Obiettivo generale delle ricerche in corso presso FHR è lo studio dei meccanismi patogenetici dell'OM, con un focus specifico sulla proteina PTX3 quale paradigma molecolare dell'interfaccia tra sistema immunitario e microambiente osseo. Le evidenze generate nel triennio 2019-2021 indicano che

PTX3 è coinvolta nella patogenesi delle infezioni batteriche dell'osso. In particolare:

- *in un modello murino di osteomielite da Staphylococcus aureus (SA, principale agente eziologico nella patologia umana), il deficit genetico (in animali geneticamente modificati) ed il blocco farmacologico (mediante un anticorpo monoclonale) di PTX3 sono associati ad una patologia meno grave;*

- *in un modello in vitro di SA-OM basato su scaffold ossei biomimetici tridimensionali, l'infezione di osteoblasti (cellule deputate alla formazione dell'osso) con SA induce sintesi e rilascio di PTX3 (ed altri fattori dell'infiammazione) in maniera matrice-dipendente;*

- *la concentrazione della proteina nel liquido sinoviale è un marcatore specifico di infezione nei pazienti sottoposti a revisione di protesi dell'anca o del ginocchio (di particolare rilevanza clinica per la gestione dei pazienti con sospetta infezione periprotetica, PJI).*

Sulla base di queste evidenze, nel 2022 abbiamo condotto ulteriori ricerche volte a:

- *caratterizzare i meccanismi molecolari di PTX3 nella patogenesi dell'OM;*

- *valutare il potenziale antibatterico di matrici ossee semisintetiche quale presupposto per lo sviluppo di strategie terapeutiche e/o profilattiche combinate (con anticorpi bloccanti PTX3);*

- *valutare e convalidare il potenziale diagnostico di PTX3 (e altri geni selezionati) quale marcatore genetico di PJI.*

Risultati

Nell'ambito delle attività sperimentali condotte nel 2022 e relative all'**Obiettivo 1**, particolare attenzione è stata dedicata alla valutazione dell'infezione sperimentale a tempi lunghi (fino a 30 giorni dall'iniezione di SA), con particolare riferimento al peso corporeo degli animali (indice generale dello stato di salute), alla carica batterica nell'osso inoculato con il microorganismo (infezione locale) ed a quella nel fegato, nella milza e nel rene (infezione sistemica). In riferimento all'effetto di PTX3 sulla patologia, i nuovi esperimenti indicano che i topi WT perdono peso fino a 14 giorni dall'inoculo di SA, per poi recuperare nelle 2 settimane successive. L'andamento del peso corporeo rispecchia quanto osservato per la carica batterica nell'osso infetto e nel fegato che, in entrambi i casi, è più alta nei topi WT a 6 e/o 14 giorni ed evolve verso valori comparabili tra i due genotipi a 30 giorni.

A tal riguardo, è opportuno notare che a 30 giorni non sono stati rilevati batteri vivi nel fegato degli animali WT e solo 3 (su 9) topi *Ptx3*^{-/-} presentavano livelli dosabili (ancorché molto bassi) di SA negli omogenati epatici, indicando che a tempi lunghi l'infezione è confinata all'arto trattato e non dissemina ad organi e tessuti distanti. A supporto di tale conclusione, non sono stati misurati batteri vivi nella milza e nei reni.

È interessante osservare come a 30 giorni dall'iniezione di SA la concentrazione di PTX3 nell'osso torni a livelli paragonabili a quelli dosati negli animali trattati con il solo veicolo (PBS). Allo stesso modo, i livelli ematici (nel siero) della proteina si riducono in maniera significativa dal 14° al 30° giorno (rispetto al valore massimo osservato a 9 giorni), pur rimanendo superiori a quelli indotti dal danno sterile derivante alla procedura di iniezione (PBS) ed a quelli fisiologici (baseline).

Questi risultati suggeriscono che nel modello sperimentale adoperato l'effetto di PTX3 sull'infezione è confinato alla finestra temporale (da 3-6 a 14-30 giorni) in cui la proteina è espressa a livelli sovralfisiologici nel tessuto osseo e nel sangue, corroborando l'ipotesi che questa molecola sia coinvolta direttamente nei meccanismi patogenetici delle infezioni muscoloscheletriche sostenute da SA.

La risposta del sistema immunitario a microorganismi patogeni nonché il decorso clinico delle infezioni che ne derivano variano in dipendenza, tra le altre cose, dalla carica microbica al contagio, per cui è importante valutarne l'effetto in modelli sperimentali di patologia. Alla luce di tali considerazioni, topi WT e *Ptx3*^{-/-} sono stati infettati con dosi di SA 10 volte superiori (10^6 CFU/topo) o inferiori (10^4 CFU/topo) a quelle impiegate negli esperimenti precedenti (10^5 CFU/topo).

Alle dosi più alte (10^6 CFU/topo) l'integrità strutturale e funzionale del tessuto muscoloscheletrico è irrimediabilmente compromessa (di fatto precludendo il raggiungimento dell'endpoint primario dello studio, ovvero la valutazione dell'infezione ossea) e la sofferenza inflitta agli animali (zoppia, formazione e dimensione di ascessi) è tale da non essere giustificata alla luce dei principi umanitari che informano la moderna sperimentazione animale. Pertanto, questi esperimenti sono stati immediatamente cessati. Alla dose più bassa (10^4 CFU/topo), invece, i segni di sofferenza riscontrati (ad esempio, grado e difficoltà di deambulazione) sono inferiori in termini di frequenza ed intensità a quelli registrati alla dose di 10^5 CFU/topo. In coerenza con queste osservazioni, gli animali WT non hanno perso peso nel corso degli esperimenti condotti con 10^4 CFU/topo a differenza di quelli in cui sono stati impiegati 10^5 CFU/topo. Inoltre, nel fegato di questi animali è stata riscontrata una carica batterica più bassa rispetto a quella misurata nei topi infettati con 10^5 CFU/topo. È importante osservare che, anche in queste condizioni, il deficit genetico di PTX3 si associa ad una ridotta colonizzazione del tessuto muscoloscheletrico da parte di SA ed i livelli locali ed ematici della proteina siano paragonabili tra le due dosi di batterio (10^4 vs. 10^5 CFU/topo). Questi risultati suggeriscono che il ruolo svolto da PTX3 nella patogenesi dell'osteomielite batterica sia indipendente dalla carica microbica al contagio (perlomeno nell'intervallo di concentrazione adoperato nello studio), ad ulteriore conferma del coinvolgimento di questa pentrassina nei meccanismi molecolari di questa patologia.

In riferimento alle attività sperimentali *in vitro* relative all'**Obiettivo 2**, sono state allestite mono-colture di SA su scaffold biomimetici di idrossiapatite e collagene I (HA/Col) contenenti ioni divalenti di elementi metallici selezionati sulla base di proprietà antibatteriche e/o batteriostatiche.

Sono stati, quindi, quantificati i batteri adesi allo scaffold immediatamente dopo la semina (tempo 0) e nei 3 giorni successivi, adattando protocolli sviluppati in un nostro studio precedente. Le matrici HA/Col contenenti Mg^{2+} , Fe^{2+} o Zn^{2+} non presentano evidenti proprietà antibatteriche/batteriostatiche in quanto l'ammontare di batteri vivi (CFU) adesi a questi supporti è paragonabile a quello osservato con scaffold privi di ioni metallici (Ctr) ad ogni tempo di osservazione. Di contro, in questi esperimenti preliminari il materiale contenente Cu^{2+} manifesta una spiccata attività antibatterica già ad 1 giorno dalla semina di SA.

In relazione alle attività cliniche svolte nell'ambito dell'**Obiettivo 3** del progetto, lo studio clinico condotto dal dott. Loppini e dalla dott.sa Bottazzi (Studio osservazionale monocentrico di accuratezza diagnostica della proteina pentrassina 3 ematica e sinoviale per la diagnosi di infezione periprotetica di anca e ginocchio) ha evidenziato che la concentrazione della proteina PTX3 nel liquido sinoviale dei pazienti con infezione periprotetica (PJI) è significativamente maggiore di quella misurata nei soggetti senza infezione (Figura 1A). È importante notare come la concentrazione di questa molecola nel liquido sinoviale sia associata all'infezione della protesi con elevata specificità (93%; Figura 1B). Ciò suggerisce che PTX3 possa trovare

applicazione nella pratica clinica principalmente in casi con diagnosi incerta per i quali contribuirebbe ad ottimizzare la gestione dei pazienti, ad esempio, informando il medico sull'opportunità o meno di prescrivere terapie antibiotiche (il cui uso improprio è spesso associato all'insorgenza di fenomeni di farmaco-resistenza).

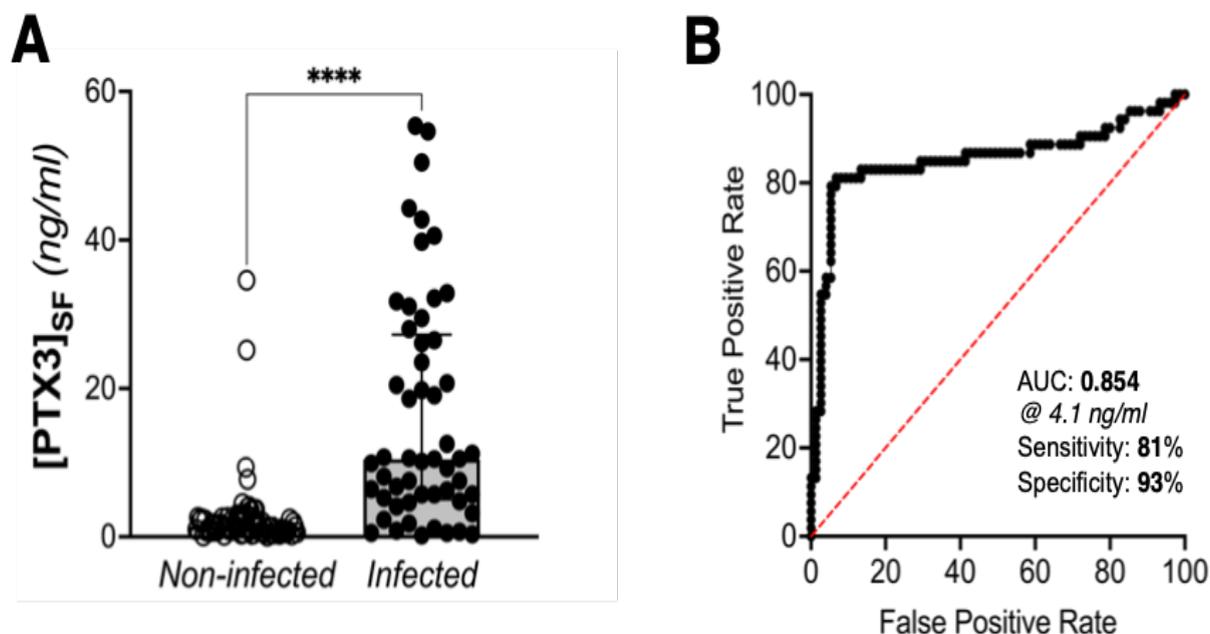


Figura 1. A) Concentrazione della proteina PTX3 nel liquido sinoviale di pazienti sottoposti a revisione totale di protesi d'anca (THA) e ginocchio (TKA) con e senza infezione periprotetica (PJI) secondo i criteri EBJIS. **B)** Curva ROC (Receiver Operating Characteristic) relativa all'impiego della concentrazione sinoviale di PTX3 nella diagnosi di PJI. Sono indicati l'area sotto la curva (AUC, una stima dell'accuratezza del test diagnostico) ed i valori di sensibilità e specificità alla concentrazione soglia di 4.1 ng/ml.

Nel corso del 2022 è inoltre proseguita la campagna di arruolamento relativa ad un secondo studio clinico volto a definire il potenziale genetico (oltre che biochimico) di PTX3 nella diagnosi di PJI (Identificazione di biomarcatori genetici della suscettibilità all'infezione periprotetica di anca e ginocchio e della severità di patologia). Al 31 Dicembre 2022 sono stati arruolati 70 soggetti (derivanti dalla coorte storica dello studio precedente) dai cui campioni di saliva è stato estratto DNA genomico successivamente impiegato per la genotipizzazione di polimorfismi nel gene *PTX3* ed in altri geni noti dalla letteratura essere coinvolti nella patogenesi dell'osteomielite batterica e nell'espressione di PTX3, tra cui le interleuchine IL-1b, IL-6, IL-10, and IL-17A.

Conclusioni all'anno 2022

Obiettivo 1. I risultati ottenuti in questa fase dello studio, in combinazione e ad integrazione di quelli generati nei precedenti tre anni, indicano che, quando SA è iniettato direttamente nella cavità midollare del femore di animali sperimentali (condizione che mima l'osteomielite da chirurgia e/o trauma nell'uomo), *la proteina PTX3 è sovra-espressa nell'osso (e nel sangue) in una finestra temporale definita (da 3-6 a 14-30 giorni dall'iniezione del microorganismo) che coincide con l'intervallo in cui si osserva la massima carica batterica nel tessuto muscoloscheletrico.* Inoltre, *il deficit genetico di PTX3 protegge dall'infezione da SA anche quando quest'ultimo è inoculato a basse dosi (10^4 vs. 10^5 CFU/topo).* Queste evidenze corroborano l'ipotesi (maturata sulla base degli studi pregressi) che la pentrassina lunga PTX3 sia coinvolta direttamente nei meccanismi patogenetici delle infezioni muscoloscheletriche sostenute da SA.

Obiettivo 2. I risultati di studi iniziali condotti con mono-culture di SA in matrici ossee biometriche (HA/Col) contenenti ioni di elementi metallici (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+}) suggeriscono che *gli ioni Cu^{2+} , quando incorporati nella componente minerale di scaffold HA/Col, svolgono una potente azione antibatterica.* In futuri esperimenti, valuteremo se questo materiale manifesta tossicità nei confronti di cellule dell'osso.

Obiettivo 3. La concentrazione della proteina PTX3 nel liquido sinoviale è un marcatore specifico di infezione periprotetica in pazienti sottoposti a revisione della protesi d'anca e di ginocchio. Queste evidenze hanno informato un nuovo protocollo di studio che prevede di integrare i dati clinici e biochimici disponibili dalla stessa coorte di pazienti con informazioni di natura genetica. Al 31 Dicembre 2022 sono 70 i soggetti arruolati nel nuovo studio dai cui è stato ottenuto DNA genomico successivamente genotipizzato.

Publicazioni scientifiche

Granata V, Possetti V, Parente R, Bottazzi B, Inforzato A, Sobacchi C, (2022) The osteoblast secretome in Staphylococcus aureus osteomyelitis. Front Immunol: 1048505. [doi: 10.3389/fimmu.2022.1048505]

Stravalaci M, Ferrara M, Pathak V, Davi F, Bottazzi B, Mantovani A, Medina RJ, Romano MR, Inforzato A (2022) The Long Pentraxin PTX3 as a New Biomarker and Pharmacological Target in Age-Related Macular Degeneration and Diabetic Retinopathy. Front Pharmacol: 3975 [doi: 10.3389/fphar.2021.811344]

Granata V, Crisafulli L, Nastasi C, Ficara F, Sobacchi C (2022) Bone Marrow Niches and Tumour Cells: Lights and Shadows of a Mutual Relationship. Front Immunol: 884024 [doi: 10.3389/fimmu.2022.884024]

Partecipazione a congressi

European Calcified Tissue Society (ECTS) 2022 Conference – May 6-10, Helsinki, Finland [Selected Abstract for Oral Communication]

13th National Congress of the Italian Society of Immunology, Clinical Immunology and Allergology (SIICA) – May 23-26, Naples, Italy [Poster Communication]

11th edition of Milan Meets Immunology (MMI) meeting – June 8, Milan, Italy [Poster Communication]

PhD Students Meeting 2022 – June 9-10, Milan, Italy [Poster Communication]

