

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



A. Executive summary

1. 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).

2. 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.

3. 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;*

- *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 della protesi, PJI).*

4. Sulla base di queste evidenze, nel 2023 abbiamo condotto ulteriori ricerche volte a:

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

- *sviluppare modelli 2D e 3D che ricapitolino*

struttura e microambiente della nicchia muscoloscheletrica allo scopo di valutare il ruolo di PTX3 nel turn-over fisiologico e patologico dell'osso;

- identificare "firme" genetiche e biochimiche di PJI che consentano di superare i limiti degli attuali protocolli diagnostici ed ottimizzare la gestione clinica dei pazienti a rischio di infezione.

B. Obiettivi del progetto

Stato dell'arte e razionale dello studio.

L'osteomielite è un'infezione ossea debilitante spesso sostenuta dal batterio *Staphylococcus aureus* (SA). Con l'espandersi dei fenomeni di antibiotico-resistenza e l'aumentare del numero delle procedure chirurgiche per impianto e sostituzione di protesi articolari, nonché in considerazione dell'invecchiamento della popolazione (principale fattore di rischio di fragilità osteoarticolare), la domanda di nuovi approcci diagnostici, prognostici e terapeutici al trattamento dell'osteomielite ha assunto carattere di urgenza. La pentrassina lunga PTX3 è una proteina dell'immunità innata che svolge ruoli importanti nella protezione da microrganismi patogeni ed è riconosciuta quale potenziale biomarcatore diagnostico e prognostico in molteplici infezioni, ivi comprese quelle sostenute da ceppi di SA meticillino-resistenti (MRSA).

Ipotesi. In studi precedenti abbiamo dimostrato che il deficit genetico di PTX3 in animali sperimentali è associato a ridotta formazione della matrice ossea durante il rimodellamento fisiologico dell'osso e la sua rigenerazione dopo frattura, il che suggerisce un ruolo importante per questa pentrassina nel turn-over del tessuto muscoloscheletrico. Sulla base di questo razionale e delle evidenze cliniche e precliniche prodotte nel triennio 2019-2021 (si veda la relazione scientifica dell'anno 2021), ipotizziamo che PTX3 sia coinvolta nella patogenesi dell'osteomielite batterica.

Obiettivi generali e risultati attesi. Il progetto di ricerca che insiste sul triennio 2022-2024 si propone di investigare i meccanismi molecolari di PTX3 nelle infezioni dell'osso quale base per lo sviluppo di nuove strategie di profilassi e terapia

dell'osteomielite batterica, nonché validare (ed ampliare) il potenziale di questa pentrassina lunga nella diagnosi di PJI. È atteso che questo studio generi nuove ipotesi meccanicistiche in osteoimmunologia e fornisca indicazioni originali su modalità innovative di gestione dei pazienti a rischio di osteomielite o con diagnosi di infezione.

Obiettivi specifici per l'anno 2023:

1. valutare la specificità del ruolo di PTX3 nella patogenesi dell'OM mediante l'impiego di animali privi di questa proteina e la ricostituzione della stessa con una sua forma ricombinante (prodotta in laboratorio), nonché l'identificazione delle popolazioni cellulari che la producono nell'infezione sperimentale;

2. investigare il ruolo di PTX3 nel rimodellamento fisiologico e patologico (in condizioni infiammatorie) del tessuto osseo avvalendosi di modelli 2D e 3D basati su co-culture di osteoblasti ed osteoclasti (isolati da topo e da uomo) in regime statico ovvero in perfusione;

3. finalizzare il reclutamento di pazienti nel nuovo protocollo di studio che ha, come obiettivo principale, l'identificazione di marcatori genetici della suscettibilità a PJI e della severità di patologia (si veda la relazione scientifica dell'anno 2022).

Piano sperimentale dell'obiettivo 1:

infettare con SA (10^5 CFU/topo), per via intra-femorale, topi geneticamente modificati (PTX3 deficienti, o *Ptx3^{-/-}*) cui viene somministrata per via intraperitoneale una formulazione ricombinante della proteina (50 mg/topo ogni 2 giorni a partire dal giorno successivo all'infezione) e monitorare l'evoluzione della patologia scheletrica a 6 giorni dall'infezione in termini di carica microbica nell'osso e ricostituzione della proteina PTX3 nel circolo sanguigno e nel tessuto muscoloscheletrico. Isolare cellule del midollo e dell'osso dal femore di topi WT (che producono PTX3) e *Ptx3^{-/-}* (che ne sono privi) infettati con SA a 14 giorni dall'infezione e valutare la produzione di PTX3 nelle rispettive sottopopolazioni cellulari mediante tecniche di citofluorimetria a flusso (FACS).

Piano sperimentale dell'obiettivo 2:

allestire co-culture 2D di osteoblasti primari (OBs) isolati dalla calvaria (cranio) di topi WT e *Ptx3^{-/-}* ed osteoclasti (OCs) derivati dal midollo di topi WT, allo scopo di valutare l'effetto del deficit genetico di PTX3 sul metabolismo osseo (produzione di collagene, capacità di mineralizzazione, espressione di geni associati all'osteogenesi, rapporto RANKL/OPG, potenziale osteoclastogenico) in condizioni fisiologiche ed infiammatorie (riprodotte *in vitro* mediante

stimolazione delle cellule con TNF- α). Allestire co-culture 3D di osteoblasti ed osteoclasti umani su supporti bio-stampati che ricapitolano composizione ed architettura della matrice ossea (prodotti presso l'Istituto di Scienza, Tecnologia e Sostenibilità per lo Sviluppo dei Materiali Ceramici, ISSMC, del CNR di Faenza) in bioreattori a perfusione che riproducono le condizioni fluido-dinamiche del microcircolo del tessuto muscoloscheletrico (prodotti presso Celleg Biotek AG di Basilea).

Piano sperimentale dell'obiettivo 3:

finalizzare il reclutamento dei pazienti nel nuovo protocollo di studio clinico di tipo retrospettivo che, basandosi sulla coorte osservata nello studio precedente (coordinato dal dott. Mattia Loppini, Medico Assistente presso l'Unità di Ortopedia dell'Anca e Chirurgia Protetica di ICH, e dalla dott.ssa Bottazzi, Capo Unità presso il Laboratorio di Immunità Innata Umoreale e Cellulare di ICH), si propone di integrare i dati clinici e biochimici già disponibili con informazioni di natura genetica (da DNA genomico) allo scopo di identificare marcatori genetici della suscettibilità a PJI.

C. Metodologia applicata

Le attività proposte sono state svolte applicando una strategia sperimentale interdisciplinare che combina tecniche e metodologie della microchirurgia, della microbiologia, dell'immunologia molecolare e cellulare e della diagnostica clinica.

Obiettivo 1

Topi C57Bl/6 *Ptx3^{-/-}* maschi di circa 8 settimane sono stati infettati mediante iniezione di SA (10^5 CFU/topo) nella cavità midollare del femore destro, secondo la procedura operativa descritta nell'Allegato 1 alla relazione scientifica dell'anno 2019, adattata da studi precedenti. È stata, quindi, somministrata per via intraperitoneale una formulazione ricombinante di PTX3 murina prodotta e validata (per studi *in vitro* ed *in vivo*) nel nostro Laboratorio (50 mg/topo in 50 mL di PBS ogni 2 giorni a partire dal giorno successivo all'infezione. Alcuni topi (controllo) hanno ricevuto un pari volume di PBS (veicolo) secondo lo stesso schema di somministrazione. Gli animali sono stati assegnati ai gruppi di trattamento e di controllo in modo casuale e monitorati per rilevare l'insorgenza di eventuali segni di sofferenza, in particolare difficoltà nella deambulazione e zoppia. Sono stati effettuati prelievi di sangue dalla vena caudale al giorno dell'infezione e, successivamente, ogni 2 giorni per misurare i livelli di PTX3 nel siero (mediante tecnica ELISA). Al 6° giorno dall'infezione, gli animali sono stati sacrificati (tramite inalazione di CO₂) e ne sono

stati prelevati organi e sangue. In particolare, sono state esaminate le ossa degli arti inferiori al fine di misurare la carica batterica locale mediante conta delle CFU (Colony Forming Units, ovvero numero di batteri vivi) e determinare la concentrazione di PTX3 (con tecnica ELISA).

In altri esperimenti, Topi C57Bl/6 WT maschi di pari età sono stati infettati e monitorati come sopra descritto. Questi sono stati sacrificati al 14° giorno dall'infezione e ne sono state prelevate le cellule del midollo e dell'osso mediante una procedura che combina trattamenti meccanici (flushing) ed enzimatici (collagenasi). Le cellule così recuperate sono state analizzate mediante citofluorimetria a flusso (FACS) allo scopo di identificare le popolazioni cellulari che producono PTX3 nel corso dell'infezione sperimentale, mediante l'impiego di un anticorpo policlonale che riconosce selettivamente la proteina PTX3 del topo.

Obiettivo 2

Mono- e co-colture 2D di OBs ed OCs isolati da Topi C57Bl/6 *Ptx3*^{-/-} e WT sono state predisposte ed analizzate secondo i protocolli descritti in una nostra recente pubblicazione, cui si fa rimando per i dettagli sperimentali.

L'allestimento del modello 3D in perfusione ha richiesto una collaborazione specifica del nostro gruppo di ricerca con l'ISSMC del CNR di Faenza (che ha curato la stampa 3D e la caratterizzazione chimico-fisica di matrici biocompatibili ad elevata porosità e resistenza meccanica) e Celtec Biotek AG di Basilea (che ha condiviso la tecnologia U-CUP). A questo proposito, la dott.ssa Valentina Possetti ha trascorso un periodo di studio e ricerca di 7 mesi presso i laboratori della Celtec, quale attività di formazione del proprio programma di Dottorato (finanziato dal Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca nell'ambito del Programma Operativo Nazionale, PON, e del Piano Nazionale di Ripresa e Resilienza, PNRR). Nel dettaglio, matrici semisintetiche, prodotte mediante stampa 3D con l'impiego di bioinchiostri contenenti derivati del collagene ed idrossiapatite, sono state utilizzate per allestire co-culture di OBs ed OCs umani derivati, rispettivamente, da cellule mesenchimali del midollo osseo e da monociti del sangue periferico, in bio-reactori U-CUP progettati e realizzati per colture cellulari 3D in condizioni fluido-dinamiche. Il protocollo adottato per questi esperimenti ha previsto la semina delle cellule mesenchimali (2 milioni/bioreattore) ed una fase iniziale di proliferazione cellulare (6 giorni in presenza del fattore di crescita FGF2) cui ha fatto seguito un trattamento osteogenico di 20 giorni mediante aggiunta al terreno di coltura di fattori osteoinduttivi, quali desametasone, acido ascorbico e glicerolo-b-fosfato. Al 26° giorno di coltura, sono stati quindi seminati monociti (2 milioni/bioreattore di cellule CD14⁺ isolate da sangue umano periferico) quali precursori di OCs e si è passati a condizioni colturali osteoclastogeniche (vitamine D3 e prostaglandina E2 per 10 giorni). Differenziamento e maturazione di OBs ed OCs sono stati valutati mediante tecniche immunoenzimatiche ed immunocitochimiche nonché sulla base dei livelli di espressione di geni distintivi delle due popolazioni cellulari. È stato inoltre possibile apprezzare localizzazione (adesione allo scaffold) e funzione (deposizione di nuova matrice ossea) delle cellule combinando metodologie di microtomografia computerizzata (microCT) e microscopia elettronica a scansione (SEM). Le co-culture OBs/OCs così allestite sono state infine trattate con un anticorpo monoclonale che riconosce e blocca specificamente PTX3 (MNB1) ovvero con formulazioni ricombinanti della proteina murina in condizioni fisiologiche ed infiammatorie (in presenza di TNF- α) allo scopo di valutare il ruolo di questa molecola nel turn-over osseo in un modello che riproduce i processi di generazione e accrescimento del tessuto osseo operanti *in vivo*.

Obiettivo 3

In relazione alle attività cliniche svolte nell'ambito del progetto, 93 soggetti sono stati arruolati nello studio clinico retrospettivo dal titolo "Identificazione di biomarcatori genetici della suscettibilità all'infezione periprotetica di anca e ginocchio (PJI) e della severità di patologia". I soggetti che hanno aderito a questo protocollo (e che derivano da una coorte storica di uno studio precedente) hanno donato campioni di saliva da cui è stato estratto DNA genomico allo scopo di caratterizzare polimorfismi comuni (con una frequenza dell'allele minore, MAF, > 5%) nel gene *PTX3* ed in altri geni selezionati sulla base delle evidenze disponibili dalla letteratura scientifica (*IL-1b*, *IL-10*, *IL-6* ed *IL-17A*). I livelli di *IL-1b*, *IL-10*, *IL-6*, *CRP* ed *a-defensina-1* sono stati dosati nei campioni di liquido sinoviale e (nel caso di *IL-10*) plasma disponibili dallo studio precedenti (mediante kit ELISA commerciali) e sottoposti ad analisi iniziali di correlazione.

Considerazioni statistiche

I dati ottenuti sono stati analizzati usando test statistici non-parametrici (Mann-Whitney, One-way ANOVA, a seconda del numero di variabili e dei rispettivi livelli). Ove non espressamente indicato nelle figure e nelle corrispondenti didascalie, le differenze tra i gruppi sperimentali sono da intendersi non statisticamente significative.

D. Prodotti della ricerca

Risultati

Nell'ambito delle attività sperimentali condotte nel 2023 e relative all'**Obiettivo 1**, particolare attenzione è stata dedicata alla valutazione della specificità del ruolo di *PTX3* nella patogenesi dell'OM da SA. A tal riguardo, infatti, il nostro gruppo di ricerca ha in precedenza dimostrato che *PTX3* svolge un ruolo chiave nel turn-over fisiologico del tessuto osseo e che il suo deficit genetico si accompagna ad una ridotta formazione di osso trabecolare. Questo fenotipo è accentuato nei processi di rimodellamento acuto della matrice ossea (per esempio, in seguito a frattura) con particolare riferimento alla sua mineralizzazione. È quindi importante verificare che la riduzione della carica batterica osservata nell'arto infetto dei topi *Ptx3^{-/-}* (si veda la relazione scientifica dell'annualità 2022) sia dovuta all'assenza della proteina anziché al deficit di matrice ad essa associato. A tal proposito, topi

Ptx3^{-/-} infettati con SA hanno ricevuto per via intraperitoneale una formulazione ricombinante di PTX3 murina (ovvero, PBS come controllo). Sono stati, quindi, effettuati prelievi di sangue e si è proceduto a misurare la carica batterica nell'arto infetto e la concentrazione della proteina esogena nell'omogenato di osso e nel siero. Dal peritoneo la proteina ricombinante diffonde al circolo sanguigno e si accumula nel siero a concentrazioni paragonabili a quelle osservate in animali WT sottoposti allo stesso protocollo di infezione. Inoltre, parte della proteina permea il tessuto muscoloscheletrico e si ritrova nell'omogenato osseo ad una concentrazione media di circa 7,3 pg/mg di proteine totali. È interessante notare come la carica batterica nell'arto infetto dei topi *Ptx3^{-/-}* aumenti quando questi vengono trattati con la proteina ricombinante, ad indicare che PTX3 svolge un ruolo specifico ed indipendente nell'infezione sperimentale da SA.

La comprensione dei meccanismi molecolari di PTX3 nella patogenesi dell'OM batterica necessita della conoscenza delle sorgenti cellulari della proteina nel corso dell'infezione. A questo proposito, abbiamo condotto nuovi esperimenti in cui le cellule del midollo e dell'osso sono state isolate dall'arto inoculato con SA di topi WT al 6° giorno dall'infezione ed analizzate mediante FACS avvalendosi di un pannello di anticorpi diretti contro marcatori specifici di sottopopolazioni cellulari delle linee mieloide, linfoide, osteoblastica ed osteoclastica. Le cellule così isolate sono state, inoltre, incubate con un anticorpo specifico per PTX3 murina previa permeabilizzazione della membrana cellulare con un detergente allo scopo di rilevare la proteina che viene sintetizzata nella cellula ed ivi si accumula prima di essere secreta. Relativamente al comparto ematopoietico (cellule CD45⁺), l'infezione determina un'espansione (aumento percentuale) selettiva dei macrofagi che producono PTX3 (Ptx3⁺) senza alterare la percentuale di neutrofili e monociti Ptx3⁺. La percentuale di cellule linfoidi (linfociti B e T) Ptx3⁺ non cambia in questo modello sperimentale (dati non mostrati). Inoltre, con riferimento alle cellule non-ematopoietiche (CD45⁻) che esprimono PTX3, soltanto la componente Sca-1⁺ (corrispondente ad una sottopopolazione di cellule staminali pluripotenti dell'osso) va incontro ad espansione nel corso dell'infezione.

Questi dati suggeriscono che la proteina PTX3 sia prodotta da almeno due distinte sottopopolazioni di cellule (macrofagi e cellule staminali dell'osso) quando i topi WT sono infettati con SA, e sono coerenti con quanto da noi stessi osservato in studi precedenti in cui abbiamo documentato

l'espressione di PTX3 in cellule progenitrici di osteoblasti in condizioni di infiammazione sterile (frattura sperimentale e l'accumulo di cellule mieloidi nel midollo di topi (sia WT che *Ptx3*^{-/-}) nel corso dell'infezione sperimentale da SA (si veda la relazione scientifica dell'annualità 2021).

In riferimento alle attività sperimentali *in vitro* relative all'**Obiettivo 2**, sono state allestite mono- e co-culture 2D di OBs primari isolati dalla calvaria di topi WT e *Ptx3*^{-/-} ed osteoclasti (OCs) derivati dal midollo di topi WT, allo scopo di valutare l'effetto del deficit genetico di PTX3 sul metabolismo osseo in condizioni fisiologiche ed infiammatorie (riprodotte *in vitro* mediante stimolazione delle cellule con TNF- α). In sintesi (si veda la Figura 1), in condizioni omeostatiche, PTX3, sintetizzata da OBs maturi e loro precursori (1), inibisce la produzione di RANKL (2) e stimola il rilascio di OPG (3). La conseguente riduzione del rapporto RANKL/OPG (4) nonché l'aumento dell'espressione di CD44 da parte degli OBs (5) determinano l'inibizione dell'osteoclastogenesi. Condizioni infiammatorie (trattamento con TNF- α) stimolano l'ulteriore produzione di PTX3 da parte degli OBs (6) e la proteina da questi secreta favorisce, attraverso la matrice extracellulare (7), la sintesi e la deposizione di collagene (8). In questo modo, PTX3 controbilancia gli effetti osteoclastogenici del TNF- α sugli OCs (9). Inoltre, questa proteina è coinvolta nella risposta infiammatoria degli OBs, modulandone l'espressione di chemochine, quali CCL2 e CCL3, coinvolte nella comunicazione con il sistema immunitario (10). Sulla base di queste evidenze (per i cui dettagli si rimanda alla nostra recente pubblicazione [12]), ipotizziamo che PTX3 eserciti un effetto osteogenico netto sul sistema OB/OC attraverso il contenimento dell'osteoclastogenesi in condizioni omeostatiche e la promozione della deposizione di matrice ossea in contesti infiammatori.

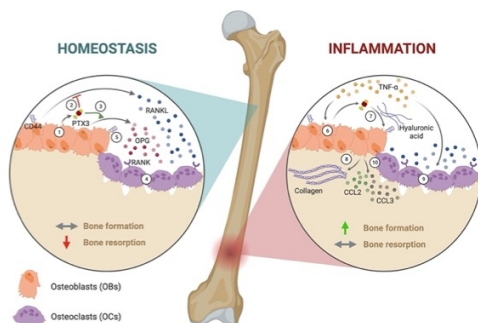


Figura 1. Rappresentazione schematica dei meccanismi attraverso i quali PTX3 partecipa al rimodellamento del tessuto osseo in condizioni omeostatiche ed infiammatorie

sulla base di esperimenti 2D con mono- e co-culture di OBs ed OCs murini.

Con l'obiettivo di estendere queste indagini alla nicchia osteoblastica/osteoclastica umana, in collaborazione con l'ISSMC del CNR di Faenza e la Cellec Biotek AG di Basilea, abbiamo sviluppato co-culture 3D di osteoblasti ed osteoclasti umani basate su matrici bio-stampate e bioreattori in perfusione, secondo lo schema mostrato in Fig. 2.

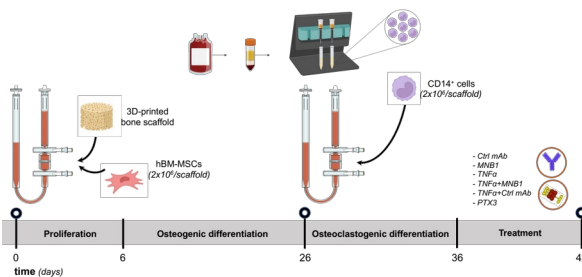


Figura 2. Disegno sperimentale dello studio di ricostituzione della nicchia osteoblastica/osteoclastica umana in matrici 3D bio-stampate e condizioni di perfusione.

Il protocollo sperimentale messo a punto nello studio prevede la semina di 2 milioni di cellule mesenchimali da midollo osseo umano. A 6 giorni di coltura in un terreno contenente un fattore di crescita che stimola la proliferazione cellulare (FGF2) hanno fatto seguito 3 settimane di differenziamento osteogenico in presenza di un terreno osteoinduttivo che induce, appunto, il differenziamento delle cellule mesenchimali ad osteoblasti, ovvero le cellule specializzate nella sintesi delle componenti organiche ed inorganiche della matrice ossea. Successivamente, sono stati seminati monociti CD14⁺ purificati da sangue periferico umano i quali sono stati mantenuti in coltura per 10 giorni in presenza di stimoli specifici per il differenziamento ad osteoclasti, le cellule deputate al riassorbimento della matrice ossea. Al termine degli esperimenti, è stata effettuata una caratterizzazione morfologica e funzionale del modello mediante microtomografia computerizzata (microCT), microscopia elettronica a scansione (SEM), tecniche di immunofluorescenza ed istochimica ed analisi di espressione genica. Le co-culture OBs/OCs così ottenute sono state infine trattate con un anticorpo monoclonale che riconosce e blocca PTX3 (MNB1) ovvero con formulazioni ricombinanti della proteina murina in condizioni fisiologiche ed infiammatorie (in presenza di TNF- α) allo scopo di valutare il ruolo di questa pentrassina nel turn-over osseo.

Le analisi istologiche (colorazione con

ematossilina ed eosina) e morfometriche (microCT) dimostrano che le matrici bio-printate (composte da derivati del collagene e microcristalli di idrossiapatite) sono state efficacemente colonizzate dalle cellule seminate e che queste hanno depositato nuova matrice extracellulare parzialmente mineralizzata. Inoltre, la microscopia SEM ha consentito di apprezzare la formazione di fibre di collagene e la caratteristica morfologia con filopodi e lamellipodi di OBs maturi. Mediante tecniche immunoenzimatiche (che consentono di rilevare l'attività dell'enzima TRAP, espresso da OCs), è stato infine possibile identificare OCs funzionalmente competenti.

Questi dati dimostrano che nelle condizioni sperimentali adoperate (co-culture 3D in bioreattori a perfusione), le cellule mesenchimali ed i monociti differenziano rispettivamente ad OBs e OCs, di fatto indicando la ricostituzione *in vitro* di aspetti salienti del microambiente osseo umano. Sono in corso analisi volte all'ulteriore caratterizzazione del modello ed alla comprensione del ruolo di PTX3 nel turnover fisiologico ed infiammatorio della matrice ossea.

In relazione alle attività cliniche svolte nell'ambito dell'**Obiettivo 3** del progetto, nel Dicembre 2023 è terminata la campagna di arruolamento nello studio clinico finalizzato a definire il potenziale genetico (oltre che biochimico) di PTX3 nella diagnosi di PJI (dal titolo "Identificazione di biomarcatori genetici della suscettibilità all'infezione periprotetica di anca e ginocchio e della severità di patologia").

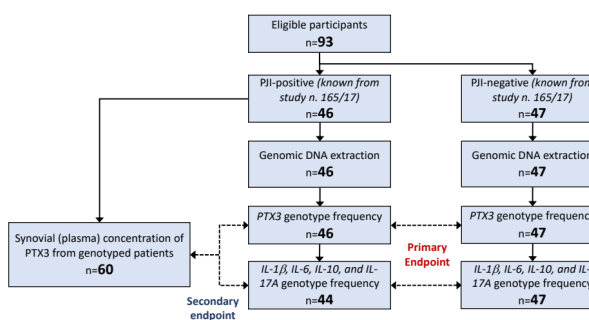


Figura 3. Disegno sperimentale dello studio clinico "Identificazione di biomarcatori genetici della suscettibilità all'infezione periprotetica di anca e ginocchio e della severità di patologia". È indicato il numero dei pazienti arruolati e di quelli da cui sono stati ottenuti dati genetici o per cui è disponibile la concentrazione della proteina PTX3 nel liquido sinoviale.

In tale studio sono stati arruolati 93 soggetti (derivanti dalla coorte storica del nostro precedente studio 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* [2], tra cui le interleuchine IL-1 α , IL-6, IL-10 e IL-17A. Di questi 93 soggetti, 46 hanno ricevuto diagnosi di PJI e 47 sono stati classificati come asettici. I dati genetici ottenuti da questi pazienti saranno analizzati per studiare la relazione tra i polimorfismi selezionati ed il rischio di infezione (*primary endpoint*). Inoltre, per 60 soggetti è disponibile la concentrazione della proteina *PTX3* nel liquido sinoviale, la cui relazione con i dati genetici prodotti nello studio sarà oggetto di ulteriori analisi (*secondary endpoint in figura 3*).

Nell'ambito di queste indagini, abbiamo avuto la possibilità di dosare marcatori dell'infiammazione (IL-1 α , IL-6, IL-10, CRP ed α -defensina-1, in aggiunta a *PTX3*) in campioni di liquido sinoviale disponibili dallo studio precedente. In tutti i casi, come atteso, l'infezione causa un aumento significativo dei livelli delle proteine, con l'eccezione di IL-6 ed α -defensina-1, per cui si osserva in ogni caso una tendenza all'aumento (ancorché non significativa).

Conclusioni all'anno 2023

Obiettivo 1. I risultati ottenuti in questa fase dello studio, in combinazione e ad integrazione di quelli generati nei precedenti quattro anni, indicano che, nel modello animale di OM da SA, *la proteina PTX3 viene principalmente prodotta da macrofagi e cellule staminali pluripotenti dell'osso e svolge un ruolo patogenetico indipendente dal suo coinvolgimento nel turn-over della matrice ossea.* Queste evidenze corroborano ulteriormente l'ipotesi (maturata sulla base degli studi pregressi) che la pentrossina lunga *PTX3* sia coinvolta direttamente nei meccanismi patogenetici delle infezioni muscoloscheletriche sostenute da SA e suggeriscono che cellule ematopoietiche e non-ematopoietiche contribuiscono (attraverso la sintesi ed il rilascio di *PTX3*) a questi meccanismi.

Obiettivo 2. Sulla base di studi condotti su mono- e co-culture 2D di cellule dell'osso murino, proponiamo che *PTX3 eserciti un effetto osteogenico netto sul sistema OB/OC attraverso il contenimento dell'osteoclastogenesi in condizioni omeostatiche e la promozione della deposizione di matrice ossea in contesti infiammatori.* Con l'obiettivo di estendere queste indagini alla fisiopatologia umana, *abbiamo sviluppato un modello 3D basato su matrici ossee bio-stampate e bioreattori in perfusione che riproduce struttura, composizione e fluido-dinamica della nicchia osteoblastica/osteoclastica dell'uomo.*

Obiettivo 3. Abbiamo terminato la campagna di arruolamento nello studio clinico finalizzato a definire il potenziale genetico (oltre che biochimico) di PTX3 nella diagnosi di PJI (dal titolo "Identificazione di biomarcatori genetici della suscettibilità all'infezione periprotetica di anca e ginocchio e della severità di patologia"). È in corso l'analisi dei dati generati nello studio allo scopo di investigare le relazioni tra variabilità genetica, livelli di mediatori dell'infiammazione e rischio di patologia.