

LAVORO ORIGINALE

Il fenotipo dei condrociti della cartilagine artrosica umana: l'espressione condrocitaria delle beta integrine e la sua correlazione con il danno anatomico

Phenotyping of chondrocytes from human osteoarthritic cartilage: chondrocyte expression of beta integrins and correlation with anatomic injury

F. Iannone, A. Corrado, V. Grattagliano, F.P. Cantatore, V. Patella¹, G. Lapadula

Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Pubblica, Sezione di Reumatologia, ¹Clinica Ortopedica II, Università degli Studi di Bari

SUMMARY

Chondrocyte-ECM (extracellular matrix) interactions are believed to play a pivotal role in the development and metabolic homeostasis of articular cartilage. Cell surface adhesion molecules have been reported to modulate chondrocyte binding to ECM (collagen, fibronectin, laminin) and they also act as transducers of critical signals in many biological processes such as growth, differentiation, migration and matrix synthesis. Recently, it has been shown that normal human articular chondrocytes strongly express $\beta 1$ integrins, which are constituted by a common chain (β_1) and a variable α chain, but the behaviour of these molecules in human osteoarthritic cartilage has not been extensively investigated.

We studied the expression of β integrins ($\beta_{1,5}$, $\alpha_{1,6}$, av chains), LFA-1, ICAM-1 and CD44, on freshly isolated chondrocytes obtained from 10 osteoarthritic patients undergoing surgical knee replacement. Chondrocytes were isolated by enzymatic digestion from three zones of each articular cartilage with a differing degree of macroscopic and microscopic damage. Integrin expression and cell cycle analysis were carried out by flowcytometry. Chondrocytes from costal cartilages of 5 human fetuses were also studied.

Chondrocytes from osteoarthritic cartilage expressed high levels of β_1 integrin and, at different percentages, all the α chains. The α chain most frequently expressed was α_1 , followed by α_3 , α_5 , α_2 , α_v . Integrin expression decreased from the least to the most damaged zone of articular cartilage and cell cycle analysis showed that proliferating chondrocytes (S phase) were prevalent on the latter zone. β_2 , β_3 , β_2 , β_5 , CD44, LFA-1/ICAM-1 complex were very low expressed. Fetal chondrocytes strongly expressed β_1 and β_5 chains.

These data provide evidence to show that integrin expression on human chondrocytes changes in osteoarthritis and suggest that perturbations of chondrocyte-ECM signalling occur in the development of the disease. The different pattern of expression of β_1 and β_5 chains on adult and fetal chondrocytes leads to speculate that integrins play a key role in control of cartilage morphogenesis and differentiation.

Reumatismo, 2001; 53(2):122-130

INTRODUZIONE

L'omeostasi tissutale dipende da una serie di complesse interazioni che si realizzano tra le cellule e tra queste e la matrice extracellulare (ECM). Un ruolo rilevante nel garantire e modulare questa sorta di "dialogo" è svolto dalle cosiddette molecole di adesione (1). Tali molecole sono gli-

coproteine di membrana con una porzione extracellulare, che interagisce con il microambiente circostante, ed una coda intracitoplasmatica, che modula l'assemblaggio e l'organizzazione funzionale del citoscheletro e trasduce segnali "da" e "verso" l'ambiente esterno (2). Queste molecole, pertanto, non sono semplicemente coinvolte nei processi di adesione cellulare, ma svolgono una funzione cruciale nel trasdurre e modulare una serie di segnali (chimici, meccanici, metabolici) diretti in modo bidirezionale dallo spazio intracellulare verso l'interstizio e vice versa (inside-out, outside-in signalling) (3, 4).

Indirizzo per la corrispondenza:

Giovanni Lapadula, DIMIMP-Sezione di Reumatologia, Policlinico Piazza G. Cesare 11, 70124 Bari, Tel. 080 5478 866, Fax 080 5478 802, E-mail pa1@reumbari.uniba.it.

La cartilagine articolare è un tessuto in cui i condrociti e la ECM interagiscono reciprocamente: i condrociti sintetizzano i componenti della matrice, che, a sua volta, modula il metabolismo dei condrociti (5). È verosimile che tale delicato equilibrio sia mantenuto da uno scambio di segnali tra condrocita e ECM e che le molecole di adesione siano responsabili della trasduzione e della modulazione di tali segnali.

Le molecole di adesione, che sembrano maggiormente coinvolte nelle interazioni condrocita-ECM, sono le integrine β (6-11), che sono delle proteine eterodimeriche caratterizzate da una catena comune β e differenti catene α con una elevata affinità di legame per le proteine della matrice. Le integrine β_1 sono le più diffusamente rappresentate e fungono da recettori per numerose proteine quali il collagene, la fibronectina, la vitronectina, la laminina (12). La catena integrinica β_2 (CD18), associandosi all'antigene CD11a, forma il complesso LFA-1, il cui ligando è ICAM-1 (CD54), appartenente alla famiglia delle immunoglobuline (13). Il complesso LFA-1/ICAM-1 è direttamente coinvolto nell'adesione cellulare omotipica ed eterotipica e potrebbe modulare l'adesione omotipica dei condrociti. ICAM-1 funge anche da recettore per l'acido ialuronico sulle cellule endoteliali epatiche di ratto (14). Le integrine β_3 mediano prevalentemente

l'adesione delle cellule alla vitronectina ed alle sialoproteine (15, 16). Le integrine β_4 mediano essenzialmente il legame con la laminina (17), mentre le integrine β_5 modulano l'adesione alla fibronectina (18) e regolano l'endocitosi e la degradazione della vitronectina (19). L'acido ialuronico, interagendo con specifici recettori cellulari, le ialoaderine (20), forma uno strato di matrice pericellulare (la zona pericellulare) che sembra avere un ruolo rilevante nell'ancorare i condrociti ai proteoglicani e nell'attivazione dei processi metabolici intracellulari, della crescita e dello sviluppo cellulare (21, 22). Il principale recettore dell'acido ialuronico è l'antigene CD44, una glicoproteina che nei condrociti bovini regola la captazione e la degradazione dello ialuronato (23).

Nell'osteoartrosi (OA), sin dalle fasi più precoci, si verifica una profonda alterazione della cartilagine articolare con uno sconvolgimento strutturale della matrice; la denaturazione del collagene tipo II si rileva dapprima nella matrice territoriale pericondrocitaria (5), suggerendo una precoce alterazione delle interazioni condrocita-ECM. È pertanto ipotizzabile che turbe delle interazioni condrocita-ECM possano condizionare l'espressione delle integrine sui condrociti e che variazioni della loro espressione possano correlare con il grado di danno osteoartrosico. Per esplorare tale ipotesi, abbia-

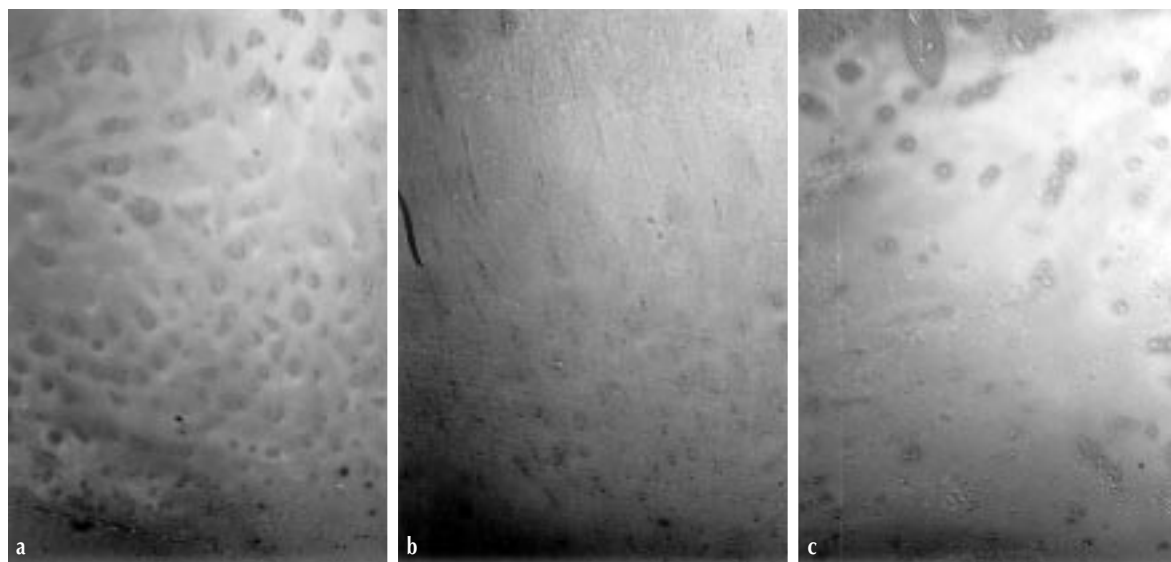


Figura 1 - Microfotografie di sezioni istologiche di cartilagine colorate con safranina-O di una paziente affetta da OA del ginocchio (ingrandimento x 60). Nella zona a minimo danno (a) la cartilagine appare diffusamente colorata; nella zona a danno intermedio (b) la fissazione del colorante appare ridotta, in particolare nella matrice territoriale che è indistinguibile dalla matrice interterritoriale, mentre la cellularità non appare modificata rispetto ad (a); nella zona a massimo danno (c) la cartilagine appare ipocellulare e la colorazione con safranina-O è notevolmente ridotta sino ad essere assente in alcune aree.

Tabella I - Grading istologico di danno cartilagineo (da Mankin modificato).

		Grading istologico-istochimico
Struttura	Normale	0
	Irregolarità di superficie	1
Cellule	Normale	0
	Ipercellularità diffusa	1
	Ipo-cellularità	2
Colorazione con Safranina-O	Normale	0
	Riduzione moderata	1
	Riduzione elevata	2

mo studiato la distribuzione delle molecole di adesione sui condrociti isolati da zone distinte della cartilagine articolare con danno osteoartrosico di differente gravità e con differente stato metabolico.

PAZIENTI E METODI

La cartilagine articolare è stata ottenuta da 10 pazienti (8 femmine, 2 maschi, età 56-78) affetti da OA e sottoposti ad intervento protesico per varismo del ginocchio. Nessuno dei pazienti assumeva terapia medica. Come precedentemente descritto (24), la cartilagine articolare è stata suddivisa in tre zone che mostravano un differente grado di lesioni macroscopiche: (1) una zona a minimo danno (MIN) comprendente la porzione più profonda della troclea femorale e le estremità anteriori e posteriori dei condili femorali; (2) una zona a danno intermedio (MED) corrispondente alla superficie tibiale ricoperta dai menischi; (3) una zona a massimo danno (MAX) comprendente la parte intermedia dei condili femorali e la superficie tibiale non protetta dai menischi.

La cartilagine articolare della zona MIN appariva normale con una superficie integra, liscia, traslucida; nella zona MAX, la cartilagine era giallastra e fibrillata; nella zona MED, la cartilagine aveva spesso un aspetto intermedio, potendo talvolta essere assimilabile a quella della zona MIN o MAX. I reperti macroscopici sono stati validati dallo studio istologico eseguito su biopsie a tutto spessore prelevate dalle differenti zone cartilaginee colorate con safranina-O (Fig. 1), blue di toluidina ed ematossilina-eosina. Il grado di danno cartilagineo microscopico è stato valutato utilizzando lo score di Mankin modificato (25) (Tab. I).

Sono stati, inoltre, studiati campioni di cartilagine costale di 5 feti umani di 12-13 settimane.

Isolamento dei condrociti

I condrociti sono stati isolati dalla matrice cartilaginea mediante digestione enzimatica sequenziale con ialuronidasi (0,2%, 30 min. 37°C, Sigma), pronasi (0,25%, 90 min. 37°C, Sigma) e collagenasi (0,2%, 3 h. 37°C, Sigma) (24). Dopo l'isolamento oltre il 95% dei condrociti erano vitali (test al tripan bleu).

Analisi del fenotipo condrocitario

I condrociti, appena isolati, venivano risospesi in PBS contenente sodio azide (0,1%) e BSA (0,2%) e quindi incubati con siero umano normale (2%). Dopo centrifugazione (5 min./1300 rpm), i condrociti erano dapprima incubati con anticorpi monoclonali murini anti α_{2-6} (CD49_{b-f}), av (CD5 1) (Immunotech, Francia), anti β_{1-5} (Serotec, UK), anti-CD11a (ATCC, Rockville, MD), anti-ICAM-1, anti-CD44 (Becton Dickinson, Mountain View, CA) per 20 min. a 4°C, e quindi lavati ed incubati con immunoglobuline (capra anti topo) coniugate con fluoresceina (GAM-FITIC, Becton Dickinson) per 20 min. a 4°C. Per la catena α_1 (CD49_a) è stato utilizzato un anticorpo monoclonale direttamente coniugato con fluoresceina (T-Cell Diagnostic, USA). I campioni di controllo venivano incubati con immunoglobuline di topo o di capra coniugate con fluoresceina (Becton Dickinson). I condrociti venivano infine analizzati mediante citofluorimetria.

Analisi del ciclo cellulare

Come precedentemente descritto (24), i condrociti erano fissati in paraformaldeide (0,01% in PBS) per 15 min. a 4°C e quindi permeabilizzati mediante incubazione per 5 min. a 4°C con n-octylglucoside allo 0,6% (Sigma); dopo lavaggio i condrociti venivano incubati per 20 min. a 4°C con 200 μ l di una soluzione contenente 25 μ g/ml di

propidio ioduro (Calbiochem) e 2 mg/ml di RNAse (Calbiochem). L'analisi del ciclo cellulare veniva eseguita mediante citofluorimetria (FACScan, Becton Dickinson).

Analisi statistica

I risultati sono espressi come media \pm 1 DS (deviazione standard). La differenza di espressione delle integrine tra le diverse zone di cartilagine è stata valutata applicando una analisi multifattoriale della varianza seguita dalla scomposizione della varianza mediante test LSD. Le fasi del ciclo cellulare sono state comparate mediante test del chi-quadrato. Il livello di significatività è stato considerato $p < 0,05$.

RISULTATI

In figura 2 sono rappresentati i valori medi \pm 1 SD della percentuale di condrociti che esprimono le catene comuni β delle integrine, l'antigene CD11a del complesso LFA1 ed il suo ligando ICAM-1 nelle diverse zone di cartilagine articolare. La catena β_1 era presente sul 55,5% \pm 27 dei condrociti della zona MIN ed era significativamente ridotta sui condrociti della zona MED (32,8% \pm 23) e della zona MAX (34,7% \pm 22) ($p < 0,01$). Le altre molecole rappresentate erano virtualmente assenti con percentuali variabili tra 1 e 4%.

Il recettore dello ialuronato, CD44, era sorprendentemente assente sulla superficie dei condrociti. Tale anomalia era verosimilmente dovuta alla di-

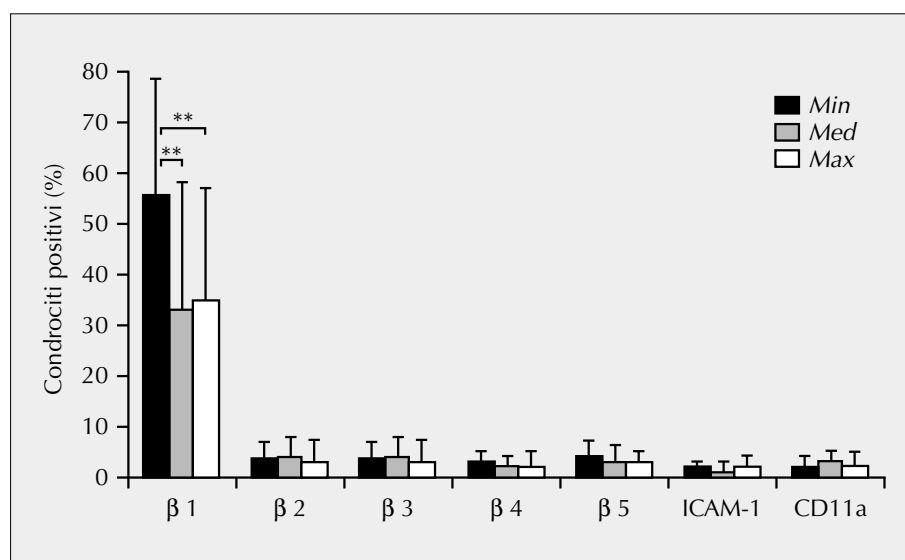
gestione enzimatica utilizzata per isolare i condrociti dalla matrice; infatti, i fibroblasti umani di cute normale, che esprimevano alti livelli di CD44 (67% \pm 9), perdevano completamente il recettore dell'acido ialuronico dopo incubazione con ialuronidasi, pronasi e collagenasi.

Globalmente l'espressione delle catene α (Fig. 3) si riduceva significativamente dalla zona MIN alla zona MAX; mentre i condrociti della zona MED mostravano un comportamento variabile. La più rappresentata era la catena α_1 essendo espressa sul 36,4% \pm 21 dei condrociti della zona MIN ed a livelli significativamente inferiori ($p < 0,05$) sui condrociti della zona MED (29% \pm 22) e MAX (26,5% \pm 21). Il pattern di espressione delle altre catene α appariva simile, con livelli di espressione significativamente maggiori nei condrociti della zona MIN che nei condrociti delle zone MED e MAX. Alcune differenze erano rilevabili per la zona MED; infatti, l'espressione delle catene α_2 , α_5 ed α_v era solo modestamente ridotta rispetto alla zona MAX, mentre le catene α_1 , α_3 , α_4 ed α_6 erano espresse a livelli simili alla zona MIN.

In figura 4 sono rappresentati i risultati medi \pm 1 DS dell'analisi del ciclo cellulare di tre cartilagini articolari. La percentuale dei condrociti in fase 5 era significativamente più alta nella zona MAX che nella zona MIN (79,2 \pm 15 vs 49,8 \pm 8, $p < 0,001$). Di contro, la percentuale di cellule in fase G0/G1 era significativamente maggiore nella zona MIN che nella zona MAX (28,7 \pm 1 vs 1,7 \pm 0,7, $p < 0,001$). I condrociti in fase G2/M non differivano nelle due zone.

Figura 2

Percentuale dei condrociti che esprimono le subunità β delle integrine e gli antigeni ICAM-1 e CD11a nelle differenti zone della cartilagine articolare con il minore (MIN), intermedio (MED) e maggiore grado di danno osteoartrosico. (media \pm 1 DS); ** $p < 0,01$.



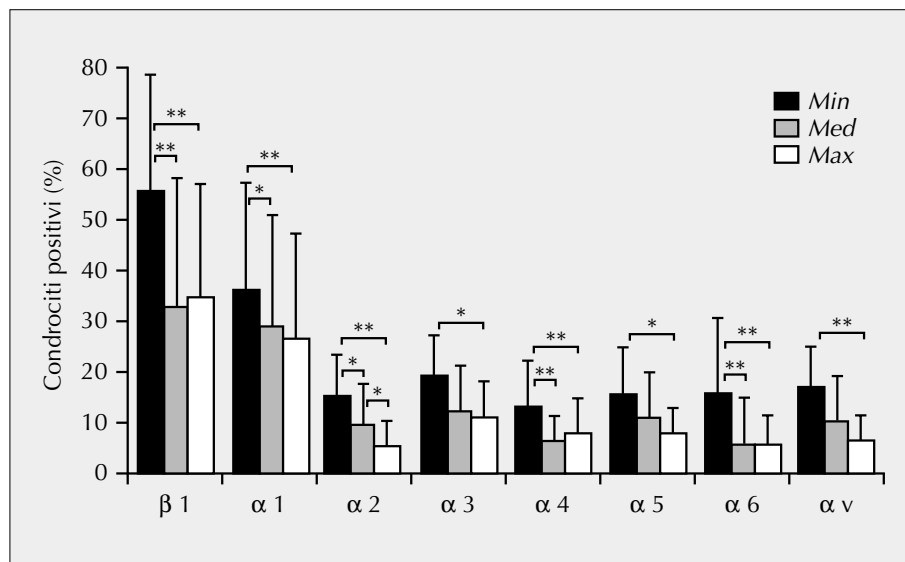


Figura 3

Percentuale dei condrociti che esprimono la catena β_1 e le varie catene α nelle differenti zone della cartilagine articolare con il minore (MIN), intermedio (MED) e maggiore grado di danno osteoartrosico. (media ± 1 DS); ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

In figura 5 sono riassunti i dati inerenti l'espressione delle catene integriniche β_{1-5} sui condrociti costali fetali. L'integrina maggiormente espressa era la β_1 ($75\% \pm 22$), seguita dall'integrina β_5 ($48\% \pm 24$), mentre i livelli delle rimanenti catene β non erano apprezzabili.

DISCUSSIONE

L'espressione delle β integrine sui condrociti di cartilagine umana normale è stata descritta da altri autori (8-10); tuttavia, sono rari in letteratura dati sulla distribuzione delle integrine β_1 nella cartilagine osteoartrosica umana (11). Nel presente studio abbiamo comparato l'espressione delle β integrine e di altre molecole di adesione sui condrociti isolati da zone distinte della cartilagine articolare con danno osteoartrosico di differente entità. La digestione enzimatica della cartilagine, utilizzata per l'isolamento dei condrociti, potrebbe aver alterato l'espressione dei recettori cellulari; tuttavia, giacché la stessa procedura è stata applicata per le diverse zone della stessa cartilagine, le differenze rilevate possono essere considerate significative. Nel nostro studio si dimostra che i condrociti di OA esprimono le integrine β_1 , sia la catena comune CD29 sia le catene α_{1-6} ed α_v , e che la loro espressione si riduce con la progressione del danno cartilagineo. Risultano, invece, scarsamente rappresentate le integrine β_2 , β_3 , β_4 e β_5 . La riduzione delle integrine β_1 non è da ascrivere a fenomeni regressivi cellulari, avendo dimostrato che i condro-

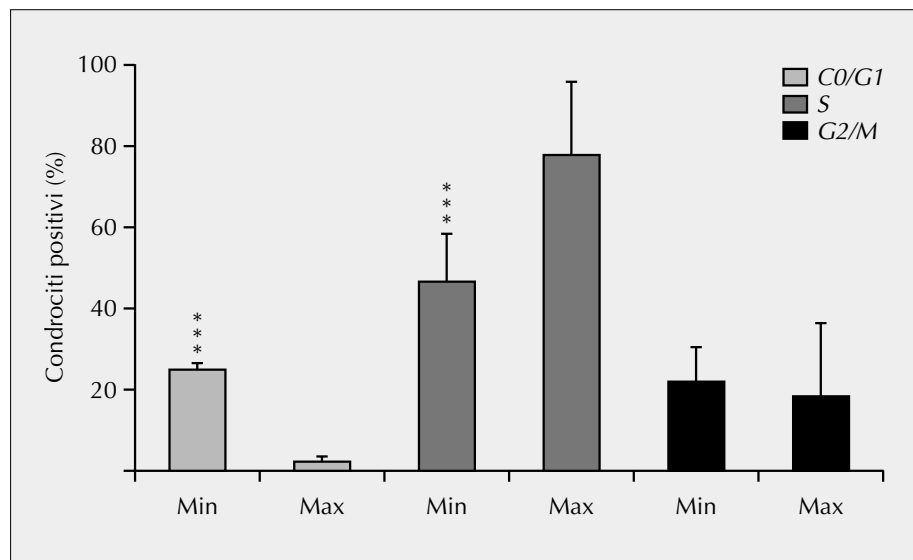
ci delle zone di cartilagine osteoartrosica maggiormente danneggiate sono prevalentemente nella fase S del ciclo cellulare e quindi in uno stato di attivazione metabolica.

Recentemente, Woods et al. (9) hanno dimostrato, con metodiche immunoistochimiche, che la subunità β_1 è similmente espressa negli strati superficiali e profondi della cartilagine normale, mentre la catena β_3 era presente prevalentemente negli strati superficiali. Tali reperti possono spiegare l'assenza delle integrine β_3 (e forse delle altre integrine) nella cartilagine osteoartrosica, la cui superficie è erosa dal processo patologico, ma non la riduzione delle integrine β_1 , nelle zone di cartilagine maggiormente danneggiate dall'OA. Pertanto, la riduzione dei livelli di molecole di adesione nella cartilagine di OA è da considerare un fenomeno strettamente connesso al processo osteoartrosico e nel cui determinismo svolge verosimilmente un ruolo rilevante.

Motivo di speculazione è certamente il differente comportamento delle catene α (Fig. 4); infatti, mentre le catene α_1 , α_5 e α_v decrescono gradualmente dalla zona MIN alla zona MAX, l'espressione delle catene α_1 , α_3 , α_4 ed α_6 è già molto bassa nella zona MED della cartilagine osteoartrosica. Tale profilo sembra suggerire che il "signalling" condrocita-matrice, modulato dalle catene α e dai rispettivi ligandi, sia alterato in fasi diverse e successive del processo osteoartrosico e che, pertanto, i differenti complessi integrina-ligando abbiano un ruolo (e forse un contributo) distinto nella patogenesi dell'OA.

Figura 4

Analisi del ciclo cellulare dei condrociti isolati dalla cartilagine di osteoartrosi con il minore (MIN) ed il maggiore (MAX) danno anatomico. Percentuale di condrociti positivi (media \pm 1 DS); *** $p < 0,001$.



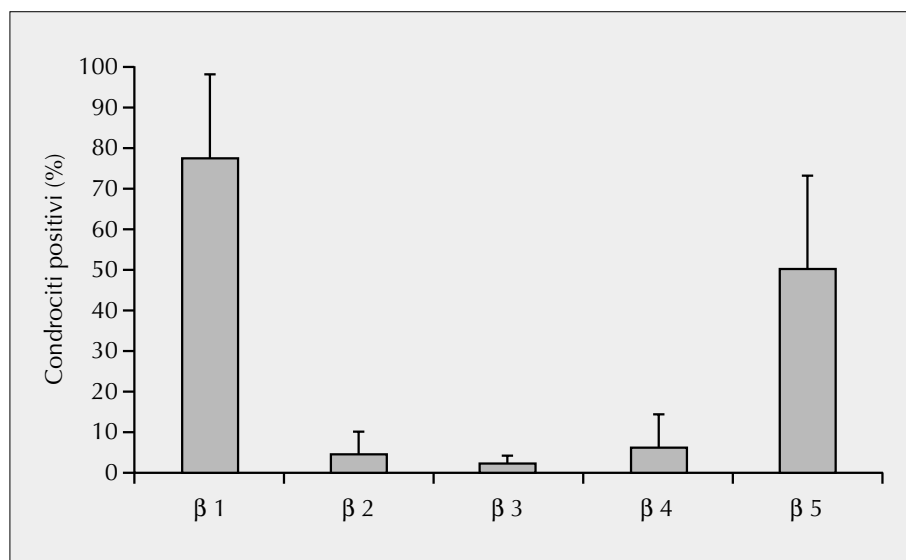
L'importanza delle integrine nella trasduzione di segnali intracellulari è stata ulteriormente dimostrata da Schlaepfer et al. (4), che, utilizzando fibroblasti murini, hanno rilevato che il legame delle integrine con la fibronectina induce l'associazione del c-Src e del FAK con conseguente attivazione del MAPK. Inoltre, in condizioni fisiologiche, l'espressione delle integrine sembra dipendere dalla disponibilità del ligando. È stata, infatti, dimostrata una regolazione post-trascrizionale dei livelli di fibronectina e del suo recettore $\beta_1\alpha_5$ sui fibroblasti dipendente dall'adesione delle cellule alla fibronectina "in vitro" (26): la rimozione del substrato, e quindi la mancata adesione dei fibroblasti alla fibronectina, comporta la riduzione della sintesi di fibronectina e dell'espressione del recettore $\beta_1\alpha_5$. Si dimostra così che le interazioni cellula-matrice sono fondamentali per il mantenimento del fenotipo e dell'omeostasi tissutale e che alterazioni del "signalling", mediato dalle integrine, comportano profonde alterazioni del fenotipo e dell'attività metabolica cellulare.

Si potrebbe pertanto ipotizzare che la riduzione dei livelli di integrine sui condrociti di OA rifletta la minor disponibilità dei differenti ligandi della matrice extracellulare; in realtà, come spesso accade nel tentativo di assimilare dati ottenuti "in vivo" ad evidenze sperimentali di laboratorio "in vitro", gli eventi patologici che caratterizzano l'OA sono ben più complessi. Infatti, oltre alle alterazioni quantitative, bisogna considerare l'esistenza di anomalie qualitative che caratterizzano i componenti della matrice nell'OA.

Giacché la sintesi di fibronectina nella matrice cartilaginea artrosica aumenta (27), sarebbe atteso un incremento dei relativi recettori sui condrociti. Pertanto, i nostri dati, che dimostrano una riduzione dell'espressione dei recettori della fibronectina, sembrerebbero in evidente contrasto; tuttavia, tale fibronectina è essenzialmente costituita da una isoforma embrionale assente nella cartilagine normale (28), ed è ipotizzabile che tali alterazioni qualitative possano modificare le proprietà di legame dei componenti della matrice (29), con conseguente down-regulation dell'espressione delle integrine sui condrociti.

Il profilo di espressione delle β integrine sui condrociti fetali appariva differente essendo presente, oltre alla subunità β_1 , anche la catena β_5 . Si desume che l'espressione delle β integrine, e presumibilmente dei ligandi della ECM, sia regolata dai condrociti a secondo dello stadio funzionale e differenziativo della cartilagine.

Uno degli aspetti insoliti della fisiopatologia della cartilagine articolare è se i condrociti interagiscono reciprocamente (adesione cellulare omotipica) o se la presenza di un sottile strato di matrice pericellulare ne impedisca il contatto. Donahue et al. (30), partendo dall'osservazione che la connexina 43, una specifica proteina delle "gap junction", è presente nei condrociti di cartilagine articolare adulta bovina, hanno ipotizzato che interazioni intercellulari possano verificarsi tra i condrociti dei "clusters" che si formano durante l'OA. Il complesso LFA1(CD18/CD11a)/ICAM-1 media l'adesione tra diversi tipi cellulari (13) e potrebbe

**Figura 5**

Percentuale dei condrociti costali fetali che esprimono le differenti catene β delle integrine. (media \pm 1 DS).

essere coinvolto nell'adesione omotipica dei condrociti. Tuttavia, come precedentemente dimostrato (8, 11), l'espressione sui condrociti della catena integrinica β_2 (CD18), dell'antigene CD11a ed ICAM-1 appare irrilevante. L'antigene ICAM-1 è inducibile sui condrociti umani "in vitro" mediante stimolazione con citochine (31, 32), mentre la sua espressione costitutiva sui condrociti è stata riportata da alcuni autori (32) e non confermata da altri (31). Il motivo di tali risultati contrastanti rimane da chiarire.

Il presente studio sembra dimostrare che l'espressione delle integrine sui condrociti di OA è inversamente correlata al grado di danno cartilagineo ed allo stato metabolico cellulare, suggerendo che:

1) il profilo di espressione delle integrine riflette di-

rettamente lo stadio morfologico-funzionale dei condrociti;

2) in corso di OA le interazioni condrocita-ECM sono alterate;

3) le alterazioni del "signalling" mediato dalle integrine possono avere un ruolo rilevante nella patogenesi dell'OA.

Sebbene tale ruolo sia allo stato attuale meramente speculativo, è possibile ipotizzare un siffatto scenario. Durante lo sviluppo morfogenetico della cartilagine, i condrociti, in virtù di un preciso programma genetico, interagiscono con la ECM esprimendo un peculiare pattern di molecole di adesione (prevalentemente integrine β_1 e β_5). Con il raggiungimento della maturità morfologica e strutturale della cartilagine, l'omeostasi metabolica è mantenuta da un delicato equilibrio condrocita-

RIASSUNTO

Le interazioni condrocita-ECM (matrice extracellulare) svolgono un ruolo fondamentale nello sviluppo e nell'omeostasi metabolica della cartilagine articolare. Le integrine β modulano l'adesione dei condrociti ai componenti della ECM (collagene, fibronectina, laminina) e fungono da trasduttori di segnali chimici e meccanici provenienti da e diretti verso le cellule (inside-out, outside-in signalling).

Noi abbiamo studiato l'espressione delle integrine β_1 (catena comune e catene α), β_2 , β_3 , β_4 , β_5 , sui condrociti isolati dalla cartilagine articolare di pazienti affetti da gonartrosi e su condrociti fetali. I risultati dimostrano che i condrociti osteoartrosici esprimono le integrine β_1 e che i livelli di espressione correlano inversamente con il grado di danno cartilagineo. I condrociti fetali, invece, esprimono prevalentemente le integrine β_1 e β_5 . Si ipotizza, pertanto, che in corso di osteoartrosi si verificano alterazioni del signalling condrocita-ECM e che tali alterazioni possano avere un ruolo rilevante nella patogenesi della malattia.

Parole chiave. Matrice extracellulare, "signalling", ciclo cellulare.

Key words: Extracellular matrix, signalling, cell cycle.

ECM, le cui interazioni sono adesso modulate quasi esclusivamente dalle integrine β_1 . L'azione di una *noxa patogena* determinerebbe l'alterazione della sintesi e dell'espressione delle integrine; il condrocita perde la capacità di "comunicare" con l'ambiente extracellulare e, non ricevendo il corretto "signalling" dalla ECM, attiva il proprio metabolismo con sintesi afinalistica e non coordinata di costituenti della matrice non presenti nella cartilagine adulta normale, quali collagene X, fibronectina embrionale, condroitin-4-solfato (33). Alle turbe funzionali seguitano le alterazioni strutturali con sovvertimento dell'architettura tridimensionale della matrice, comparsa progressiva di lesioni anatomiche (fibrillazioni, erosioni) ed infine perdita di elementi cellulari.

BIBLIOGRAFIA

1. Ingber D. Integrins as mechanochemical transducers. *Curr Opin Cell Biol* 1991; 3: 841-8.
2. Damsky CH, Werb Z. Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information. *Curr Opin Cell Biol* 1992; 4: 772-81.
3. Ginsberg MH, Du X, Plow EF. Inside-out integrin signalling. *Curr Opin Cell Biol* 1992; 4: 766-71.
4. Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 1994; 372: 786-91.
5. Poole AR, Billingham C, Nelson F. New perspectives in cartilage degeneration in osteoarthritis. *Rheumatology in Europe* 1995; 24 (52): 57-65.
6. Enomoto M, Leboy PS, Menko AS, Boettiger D. Beta 1 integrins mediate chondrocyte interaction with type I collagen, type II collagen, and fibronectin. *Exp Cell Res* 1993; 205: 276-85.
7. Durr J, Goodman S, Potocnik A, von der Mark H, von der Mark K. Localization of beta 1-integrins in human cartilage and their role in chondrocyte adhesion to collagen and fibronectin. *Exp Cell Res* 1993; 207: 235-44.
8. Salter DM, Hughes DE, Simpson R, Gardner DL. Integrin expression by human articular chondrocytes. *Br J Rheumatol* 1992; 31: 231-4.
9. Woods VLJ, Schreck PJ, Gesink DS, Pacheco HO, Amiel D, Akeson WH, et al. Integrin expression by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 537-44.
10. Loeser RF, Carlson CS, McGee MP. Expression of beta 1 integrins by cultured articular chondrocytes and in osteoarthritic cartilage. *Exp Cell Res* 1995; 217: 248-57.
11. Ostergaard K, Salter DM, Petersen J, Bendtzen K, Hvolris J, Andersen CB. Expression of alpha and beta subunits of the integrin superfamily in articular cartilage from macroscopically normal and osteoarthritic human femoral heads. *Ann Rheum Dis* 1998; 57: 303-8.
12. Springer TA. Adhesion receptor of the immune system. *Nature* 1990; 346: 425-34.
13. Marlin SD, Springer TA. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* 1987; 51: 813-9.
14. McCourt PA, Ek B, Forsberg N, Gustafson S. Intercellular adhesion molecule-1 is a cell surface receptor for hyaluronan. *J Biol Chem* 1994; 269: 30081-4.
15. Miyauchi A, Alvarez J, Greenfield EM, Teti A, Grano M, Colucci S, et al. Recognition of osteopontin and related peptides by an alpha v beta 3 integrin stimulates immediate celi signals in osteoclasts. *J Biol Chem* 1991; 266: 20369-74.
16. Helfrich MH, Nesbitt SA, Dorey EL, Horton MA. Rat osteoclasts adhere to a wide range of RGD (Arg-Gly-Asp) peptide-containing proteins, including the bone sialoproteins and fibronectin, via a beta 3 integrin. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 335-43.
17. Tozeren A, Kleinman HK, Wu S, Mercurio AM, Byers SW. Integrin alpha 6 beta 4 mediates dynamic interactions with laminin. *J Cell Sci* 1994; 107: 3153-63.
18. Chen J, Maeda T, Sekiguchi K, Sheppard D. Distinct structural requirements for interaction of the integrins alpha 5 beta 1, alpha v beta 5, and alpha v beta 6 with the central cell binding domain in fibronectin. *Cell Adhes Commun* 1996; 4: 237-50.
19. Panetti TS, McKeown-Longo PJ. The alpha v beta 5 integrin receptor regulates receptor-mediated endocytosis of vitronectin. *J Biol Chem* 1993; 268:11492-5.
20. Toole BP. Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins. *Curr Opin Cell Biol* 1990; 2: 839-44.
21. Laurent TC, Laurent UB, Fraser JR. Functions of hyaluronan. *Ann Rheum Dis* 1995; 54: 429-32.
22. Knudson CB. Hyaluronan receptor-directed assembly of chondrocyte pericellular matrix. *J Cell Biol* 1993; 120: 825-34.
23. Hua Q, Knudson CB, Knudson W. Internalization of hyaluronan by chondrocytes occurs via receptor-mediated endocytosis. *J Cell Sci* 1993; 106: 365-75.
24. Lapadula G, Iannone F, Zuccaro C, Covelli M, Patella V, Lobianco G, et al. Expression of membrane-bound peptidases (CD10 and CD26) on human articular chondrocytes. Possible role of neuropeptidases in the pathogenesis of osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1995; 13: 143-8.
25. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* 1971; 53: 523-37.
26. Dalton SL, Marcantonio EE, Assoian RK. Cell attachment controls fibronectin and alpha 5 beta 1 integrin levels in fibroblasts. Implications for anchorage-dependent and -independent growth. *J Biol Chem* 1992; 267: 8186-91.
27. Chevalier X, Groult N, Labat Robert J. Biosynthesis and distribution of fibronectin in normal and osteoarthritic human cartilage. *Clin Physiol Biochem* 1992; 9: 1-6.

28. Chevalier X, Groult N, Hornebeck W. Increased expression of the Ed-Bcontaining fibronectin (an embryonic isoform of fibronectin) in human osteoarthritic cartilage. *Br J Rheumatol* 1996; 35: 407-15.
29. Carnemolla B, Leprini A, Allemani G, Saginati M, Zardi L. The inclusion of type III repeat in the fibronectin molecule generates conformational modifications that unmasks a cryptic sequence. *J Biol Chem* 1992; 267: 24689-92.
30. Donahue HJ, Guilak F, Vander Molen MA, McLeod KJ, Rubin CT, Grande DA, et al. Chondrocytes isolated from mature articular cartilage retain the capacity to form functional gapjunctions. *J Bone Miner Res* 1995; 10: 1359-64.
31. Davies ME, Dingle JT, Pigott R, Power C, Sharma H. Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on human articular cartilage chondrocytes. *Connect Tissue Res* 1991; 26: 207-16.
32. Jobanputra P, Corrigan V, Kingsley G, Panayi G. Cellular responses to human chondrocytes: absence of allogeneic responses in the presence of HLA-DR and ICAM-1. *Clin Exp Immunol* 1992; 90: 336-44.
33. Hamerman D. The biology of osteoarthritis. *N Engl J Med* 1989; 320: 1322-30.