



SAPIENZA

UNIVERSITA' DI ROMA

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA
SPERIMENTALE
XXXVI CICLO

“Studio dei meccanismi molecolari alla base della degenerazione del
disco intervertebrale: ruolo del canale TRPC6 e nuovi approcci
terapeutici”

DOTTORANDO

Andrea Sperati

DOCENTE GUIDA

Prof.ssa Antonella Calogero

COORDINATORE DEL DOTTORATO
Prof. Maurizio Sorice

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Indice

Introduzione	4
1. Anatomia del disco intervertebrale	4
2. Metabolismo del disco intervertebrale	6
3. Invecchiamento del disco intervertebrale.....	8
4. Degenerazione del disco intervertebrale	9
4.1 Ambiente patologico	10
4.2 Cambiamenti dello stato fisiologico delle cellule	10
4.3 Modifiche della matrice extracellulare	11
4.4 Alterazioni del carico sulla colonna	11
4.5 Ciclo degenerativo nel disco intervertebrale	12
5. Classificazione della degenerazione del disco intervertebrale.....	14
6. Degenerazione del disco intervertebrale e stress ossidativo	15
6.1 I geni ARE.....	17
7.1 Proteine di membrana coinvolte nell'osmoregolazione	19
7.2.2 TRPV	22
7.2.3 TRPC	23
Obiettivi della ricerca.....	24
Materiale e Metodi.....	25
1. Materiali.....	25
2. Colture cellulari	25
3. Campioni di disco intervertebrale.....	26
4. Saggio della vitalità cellulare.....	27
5. Western blot.....	27
5.1 Preparazione degli estratti totali	27
5.2 SDS-PAGE e immunoblotting	28
6. Immunofluorescenza.....	29
7. Analisi dell'espressione genica.....	29
7.1 Estrazione dell'RNA	29
7.2 Retrotrascrizione.....	30
7.3 Real-time qPCR.....	30
8. Analisi statistica.....	32

Risultati e discussione.....	33
1. Risultati sui dischi intervertebrali	33
2. Risultati delle cellule di Nucleo Polposi e di Annulus Fibroso	34
Conclusioni	51
Bibliografia	54

Introduzione

1. Anatomia del disco intervertebrale

Il disco intervertebrale (IVD) è una struttura fibrocartilaginea interposta tra due vertebre adiacenti capace di ammortizzare il carico che grava sulla colonna conferendo alla struttura stabilità e flessibilità, questa funzione si esercita sia in condizioni normali di carico sia quando la colonna è flessa o estesa (Adams MA et Roughley PJ 2006). Tali proprietà biomeccaniche sono dovute alla presenza di due differenti tessuti caratterizzati da due tipi cellulari: le cellule del *Nucleus Pulposus* (NP) localizzate nella regione centrale e che vengono circondate dalle cellule di *Annulus Fibrosus* (AF) (Huang YC *et al.* 2014); il limite del disco è delineato sia nella parte inferiore che in quella superiore dai piatti cartilaginei (CEP) (Zhu *et al.* 2020). I due tipi cellulari sono caratterizzati dalla produzione di una matrice extracellulare (ECM) specifica che ne determina struttura e funzione (Figura 1).

La regione del NP è composta di una ECM ricca in collagene di tipo II e proteoglicani, (principalmente aggregati) questo porta alla produzione di un gel altamente idratato capace di resistere alla compressione e di avere caratteristiche osmotiche importanti per la funzionalità del disco (Adams MA et Roughley PJ 2006). Per quanto riguarda la regione dell'AF, questa è composta da un fascio altamente organizzato di fibroblasti che producono una ECM ricca di collagene di tipo I, rendendo il tessuto più rigido e compatto in modo da poter resistere allo stress meccanico e riuscire a sostenere la pressione

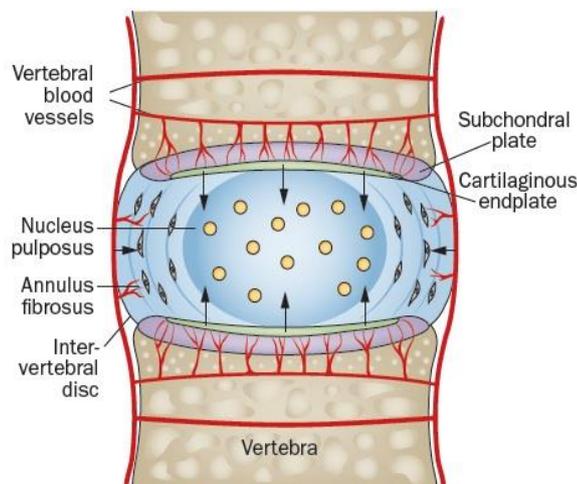


Figura 1 - Struttura del disco intervertebrale: nella zona centrale è possibile distinguere il NP caratterizzato dalle omonime cellule, a circondare questa struttura abbiamo le cellule di AF organizzate in lamelle, nella zona superiore e inferiore si trovano due piatti cartilaginei attraverso i quali si inseriscono i vasi. (Huang YC *et al.* 2014)

proveniente dal NP (Zhu *et al.* 2020). Le cellule del disco, sia nell'AF che nel NP, possiedono dei processi citoplasmatici molto evidenti, la cui funzione non è ancora chiara. Tuttavia, questi prolungamenti sembrerebbero coinvolti sia nella comunicazione intercellulare che nella percezione di stimoli meccanici sensore nel tessuto (Raj PP, 2007). Queste caratteristiche sono determinate dalla disposizione delle lamelle (variano tra le 15 e 25), le quali sono orientate a 60° variando, tra uno strato e l'altro, di circa 30° (Figura 2) (Zhu *et al.* 2020). All'interno dell' AF è possibile distinguere due aree: una esterna ed una interna, le quali differiscono tra loro per l'organizzazione e tipologia di collagene. La zona più interna è poco organizzata ed è nota come zona di transizione

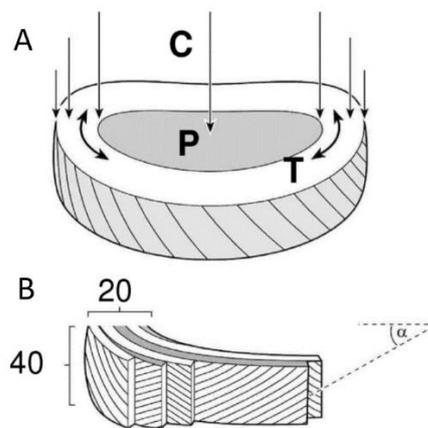


Figura 2 - Struttura dell'AF: A) la compressione spinale (C) genera una pressione idrostatica nel NP e uno stress di trazione (T) nell'AF. B) le lamelle nell'AF hanno le fibre di collagene alternate in differenti direzioni (circa 30° le une rispetto alle altre) (Adams MA et Roughley PJ 2006)

poiché sono ancora presenti molecole di collagene di tipo II e proteoglicani che portano ad una disposizione meno ordinata delle fibre; mentre l'area esterna dell'AF è maggiormente organizzata ed è ricca di collagene di tipo I, questo fa sì che tale zona sia più resistente alla tensione rispetto alla prima. (Zhu *et al.* 2020)

Come detto in precedenza, la funzionalità del disco intervertebrale è dovuta alle sue componenti biomeccaniche: nel NP, il collagene di tipo II e l'aggrecano hanno un ruolo fondamentale in questo contesto, mentre l'AF circonda la struttura tramite le fibre di collagene di tipo I. In particolare, gli aggregati di proteoglicani sono caratterizzati dalla presenza di glicosamminoglicani solfati, i quali conferiscono alle molecole la capacità di trattenere acqua permettendo al tessuto di idratarsi e gonfiarsi (Adams MA et Roughley PJ 2006). La forza che viene impressa sul tessuto porta quindi alla compressione del NP che viene sostenuto dalle fibre dell'AF, ciò porta ad una perdita di acqua nel NP che ha come conseguenza una maggiore concentrazione delle molecole di aggrecano. Quando il

carico viene rimosso l'acqua viene richiamata e l'altezza del disco si ripristina (Adams MA et Roughley PJ 2006).

2. Metabolismo del disco intervertebrale

È interessante notare che il disco intervertebrale è una struttura priva di vascolarizzazione e i capillari sono posizionati in corrispondenza dei piatti cartilaginei. Di conseguenza, solo le zone periferiche dell'AF sono in grado di scambiare materiale con i vasi sanguigni in modo diretto e questo rende il disco intervertebrale il più grande tessuto avascolare dell'organismo (Huang YC *et al.* 2014). Infatti, i nutrienti raggiungono le cellule per

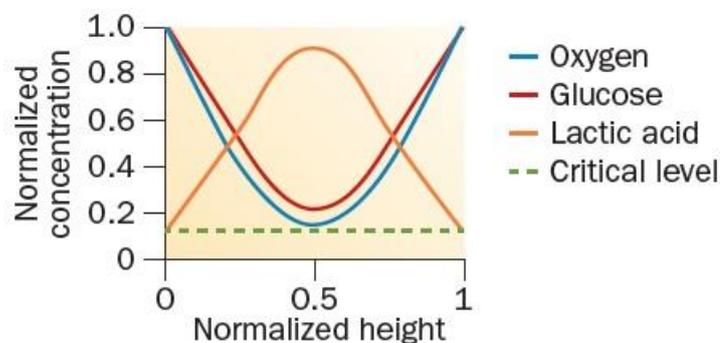


Figura 3 – Rappresentazione schematica della concentrazione di nutrienti e metaboliti da un CEP all'altro (Normalized height), il livello critico è la soglia superata la quale viene modificata attività e vitalità delle cellule (Huang YC *et al.* 2014)

diffusione dai capillari nei CEP fino alle zone più interne del NP; i metaboliti percorrono la stessa via nel senso inverso. Questo meccanismo di diffusione delle molecole nel tessuto rende alcune zone più rifornite rispetto alle altre. Infatti, al centro del disco, le concentrazioni di glucosio, ossigeno e nutrienti sono molto più basse rispetto ai distretti periferici. Questo fa sì che le cellule del disco possono essere esposte a carenza o eccesso di metaboliti. Il grafico in Figura 3 indica come sia presente una soglia che stabilisce i livelli entro i quali le cellule non vanno incontro a morte; infatti, in condizioni fisiologiche questi valori non vengono mai superati (Huang YC *et al.* 2014). Un trasporto poco efficace porta ad una limitazione dell'attività metabolica del disco che ha come conseguenza una limitata capacità del tessuto di reagire a eventuali squilibri metabolici o più in generale a un qualsiasi tipo di danno alla struttura (Adams MA et Roughley PJ 2006).

Come visto in precedenza, data la sua funzione, l'ECM è la componente fondamentale del disco intervertebrale e durante la vita dell'individuo, va incontro a diverse modificazioni in base alla crescita dell'organismo. Nelle fasi di crescita fetale e giovanile,

ad esempio, si ha un cambiamento della matrice che passa dallo stato di fluido traslucido ad uno amorfo e morbido, questo è dovuto principalmente all'aumento della produzione di collagene. Un altro possibile cambiamento è dato dalla variazione del contenuto di

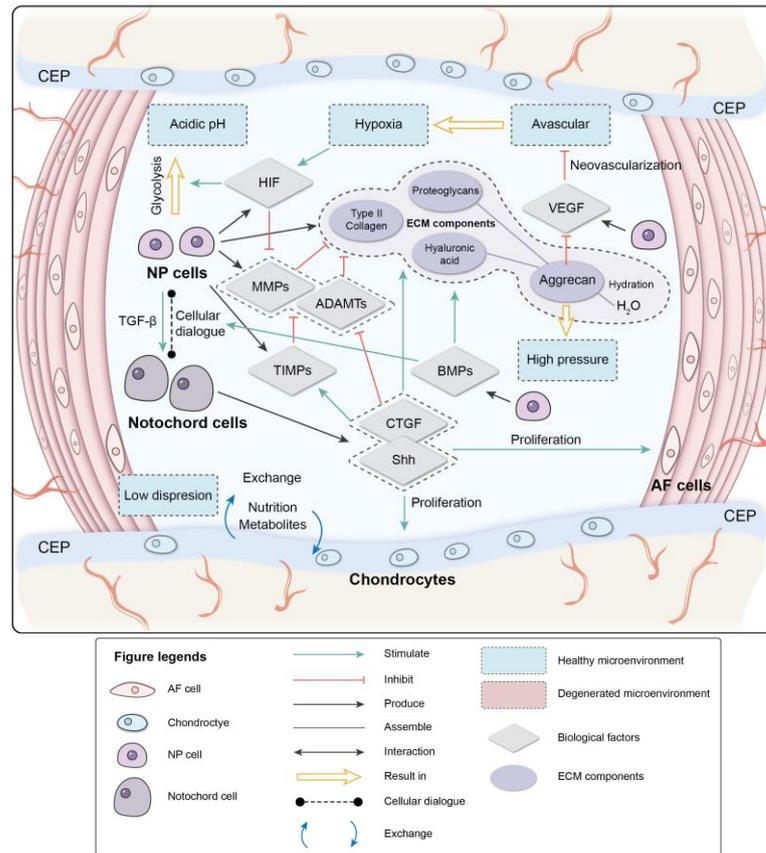


Figura 4 - Ambiente fisiologico del disco intervertebrale: un riassunto dettagliato dei fattori coinvolti nella degenerazione del disco intervertebrale e delle connessioni tra di loro (Dou Y et al. 2021)

proteoglicani, la cui concentrazione viene modificata presumibilmente attraverso proteolisi. Infatti, il giovane adulto possiede il numero massimo di queste molecole che poi diminuiscono progressivamente (Antoniou J et al. 1996) (Adams MA et Roughley PJ 2006). Queste modifiche avvengono fisiologicamente con lo sviluppo dell'individuo. Tuttavia, un'importante caratteristica strutturale del disco intervertebrale è quella di essere in grado di adattarsi alle pressioni meccaniche a cui è sottoposto. Infatti, sono proprio questi cambiamenti che rendono possibile un continuo rimodellamento del tessuto atto ad una fine regolazione della gestione del carico. Per poter attuare tali modifiche, le cellule del disco intervertebrale sono in grado di produrre degli enzimi capaci di degradare la stessa ECM, tra questi possiamo distinguere le metalloproteinasi (MMPs) e le disintegrine metalloproteinasi (ADAMTS) (Adams MA et Roughley PJ 2006). È importante sottolineare che il ciclo continuo di degradazione-rigenerazione della matrice

extracellulare e quindi i suoi cambiamenti nella composizione, sono fondamentali per mantenere e regolare le qualità biomeccaniche del disco intervertebrale (Figura 4) (Raj PP, 2007).

3. Invecchiamento del disco intervertebrale

Durante lo sviluppo e l'invecchiamento dell'individuo, le caratteristiche del disco intervertebrale subiscono dei cambiamenti che portano ad una lenta perdita di funzionalità della struttura. I due tipi cellulari perdono la loro organizzazione finemente regolata andando incontro ad importanti modifiche strutturali che ne determinano una minore efficienza (Raj PP, 2007).

Con l'invecchiamento, i confini tra AF e NP diventano meno netti e le due strutture cominciano ad invadersi reciprocamente determinando così la perdita dell'organizzazione dell'ECM. Tale fenomeno porta le lamelle a disporsi diversamente, provocando una riduzione nell'efficienza della struttura fibrosa di contenimento (Raj PP, 2007). Già a partire dall'infanzia, per poi peggiorare con l'invecchiamento, si assiste ad una degradazione dei proteoglicani con conseguente riduzione di acqua nel disco, causando così la perdita delle proprietà biomeccaniche del disco (Adams MA et Roughley PJ 2006). Inoltre, avviene uno *switch* nella produzione di collagene. Nell'AF infatti, si assiste ad un progressivo aumento della produzione di collagene di tipo II a svantaggio del tipo I. Un altro fattore importante nell'invecchiamento del disco intervertebrale coinvolge delle reazioni tra collagene e glucosio (glicazioni non enzimatiche). Un aumento di queste molecole comporta conseguenze dirette sull'ECM, poiché non rende possibile l'eliminazione di molecole danneggiate portando ad uno scorretto turnover della matrice, la quale risulterà essere meno efficiente e meno forte (Adams MA et Roughley PJ 2006).

Tutte queste modifiche che si verificano nel disco hanno una ripercussione diretta sulla funzionalità della struttura del NP con conseguente perdita di volume e spessore causando una maggiore pressione sull'AF, che a questo punto subisce uno stress meccanico dall'interno, divenendo sempre più rigido e debole. Tutto ciò favorisce la rottura dell'AF e quindi il collasso della struttura (Adams MA et Roughley PJ 2006).

4. Degenerazione del disco intervertebrale

La degenerazione del disco intervertebrale (DDI) è un processo che avviene precocemente. Infatti, può cominciare già nell'adolescenza per poi aggravarsi con l'invecchiamento. Tale disturbo è correlato molto spesso con stati dolorifici alla zona lombare, ovvero lombalgia, ma talvolta può essere presente senza una chiara manifestazione di sintomi. Infatti, in diversi individui, la lombalgia è presente solamente quando la degenerazione ha raggiunto uno stadio avanzato (Kos N *et al.* 2019).

Questo disturbo è una delle maggiori cause di disabilità in tutto il mondo con almeno l'80% degli adulti che affermano di aver sofferto di lombalgia almeno una volta in tutta la vita. Il dolore generato da questa condizione comporta un chiaro peggioramento dello stile di vita oltre ad un importante impatto anche a livello economico, non solo sui singoli individui ma sull'intera società (Ma K *et al.* 2019).

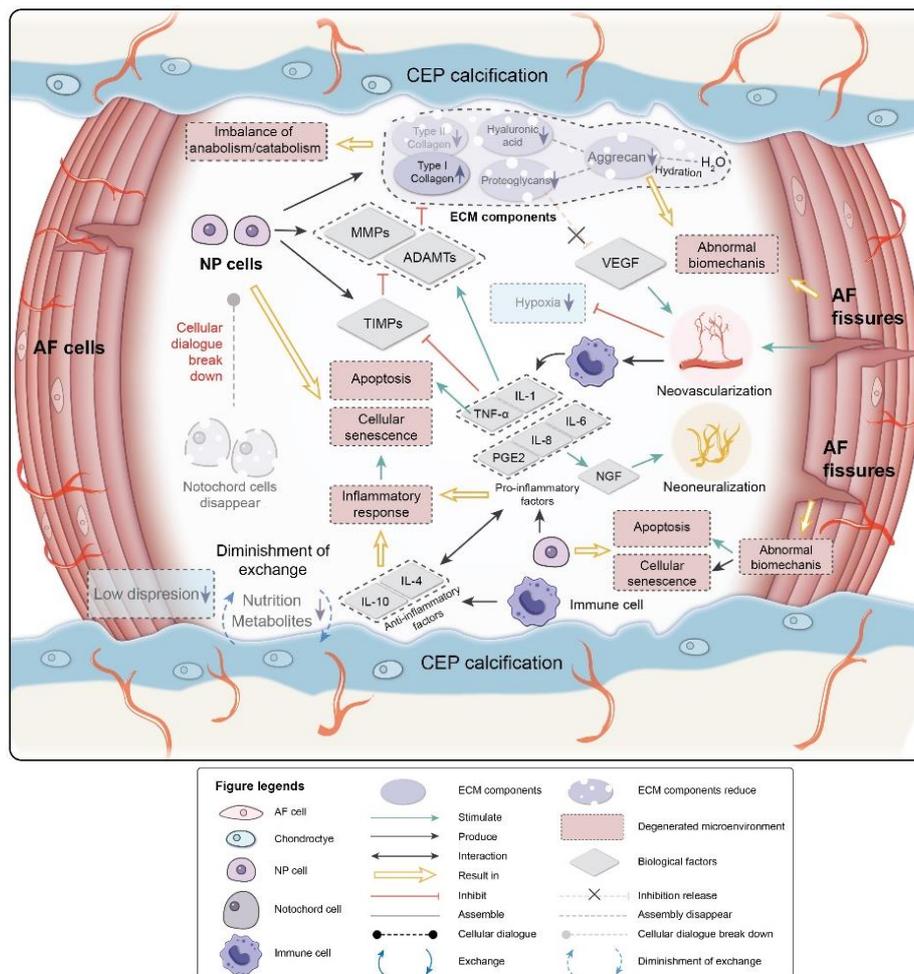


Figura 5 - Ambiente patologico del disco intervertebrale: un riassunto dettagliato dei fattori coinvolti nella DDI e delle connessioni tra loro (Dou Y *et al.* 2021)

4.1 Ambiente patologico

Nella DDI i meccanismi che possono essere alterati coinvolgono numerosi fattori e possono portare a differenti conseguenze: le cellule possono andare incontro a cambiamenti fenotipici che possono portare ad una mancata regolazione dell'ambiente circostante. Uno squilibrio dell'ECM può portare a cambiamenti strutturali che non permettono al disco di ammortizzare il peso in modo ottimale ed uniforme; inoltre, la presenza di stress ossidativo può compromettere il funzionamento biomeccanico della struttura e la vitalità cellulare. D'altra parte, un diverso carico sulla struttura può portare all'attivazione di vie di segnalazione che stimolino la degradazione dell'ECM (Dou Y *et al.* 2021). Infine, anche fattori genetici come mutazioni su geni coinvolti nella formazione e regolazione della matrice extracellulare (metallo-proteasi) possono chiaramente avere un impatto sulla stabilità del disco intervertebrale (Figura 4) (Kos N *et al.* 2019).

4.2 Cambiamenti dello stato fisiologico delle cellule

Le cellule del disco intervertebrale possono andare incontro a modificazioni che ne alterano le caratteristiche con conseguenze sullo stato dell'intera struttura del disco (Dou Y *et al.* 2021). Infatti, sembrerebbe che influenze esterne possano spingere le cellule a differenziarsi in un tipo simil-condrocitico con una conseguente modifica del proprio fenotipo (Vergroesene PP *et al.* 2015).

Come verrà analizzato in seguito, un ambiente con queste caratteristiche può avere ripercussioni sullo stato della matrice extracellulare con conseguenze sulla funzionalità dell'intera struttura.

Le cellule di NP hanno una derivazione notocordale e durante la vita dell'individuo hanno la tendenza ad assumere sempre di più le caratteristiche tipiche delle cellule condrocitiche. Tra queste modifiche identifichiamo la secrezione di molecole utili per la funzione del disco che ha ripercussioni sulla composizione della matrice extracellulare (Vergroesene PP *et al.* 2015). Alcuni di questi cambiamenti riguardano uno switch della produzione di collagene con una marcata riduzione del tipo II in favore del tipo I e una ridotta espressione di proteoglicani nel NP che porta ad un'alterazione delle caratteristiche biomeccaniche della struttura (Vergroesene PP *et al.* 2015).

4.3 Modifiche della matrice extracellulare

Durante la DDI, la presenza di determinate molecole (ad esempio molecole pro-infiammatorie) portano ad una modifica delle caratteristiche dell'ambiente extracellulare. Le molecole maggiormente coinvolte nel rimodellamento dell'ECM sono le MMPs e le ADAMTs che hanno lo specifico ruolo di degradare il collagene e gli aggregati, rispettivamente (Vergroesene PP *et al.* 2015) (Dou Y *et al.* 2021). Un aumento dell'espressione di queste molecole porta ad una riduzione della ritenzione idrica conferendo caratteristiche differenti al tessuto (Vergroesene PP *et al.* 2015), e simultaneamente, viene stimolata la produzione di collagene di tipo I. Tutti questi fattori porteranno ad una struttura molto più rigida, fibrosa, meno morbida e poco idratata con ripercussioni sulla sua funzionalità (Vergroesene PP *et al.* 2015) (Dou Y *et al.* 2021). Tutte queste modifiche renderanno l'ambiente molto più tendente al catabolismo rispetto all'ambiente fisiologico che è tipicamente caratterizzato da anabolismo (Vergroesene PP *et al.* 2015) (Dou Y *et al.* 2021).

In condizioni fisiologiche, i proteoglicani hanno l'importante ruolo di impedire la vascolarizzazione e l'innervazione del tessuto (Dou Y *et al.* 2021), quando il loro livello diminuisce quest'inibizione viene meno e il NP viene invaso dai vasi e dai nervi. Questo comporta l'ingresso delle cellule del sistema immunitario nel tessuto con conseguente aumento dei livelli di infiammazione (Dou Y *et al.* 2021) (Fig. 5).

4.4 Alterazioni del carico sulla colonna

L'alta concentrazione di proteoglicani presente in condizioni fisiologiche fornisce al tessuto una forte pressione osmotica dovuta alla ritenzione di acqua nel NP, essa viene utilizzata per ammortizzare il peso che grava sulla colonna vertebrale e varia in base alla quantità di carico a cui viene sottoposta (Vergroesene PP *et al.* 2015). In queste condizioni, la struttura reagisce con un aumento dell'espressione di proteoglicani e un aumento degli inibitori delle metalloproteinasi (TIMP) che impediscono la degradazione della matrice da parte di MMPs e ADAMTs (Vergroesene PP *et al.* 2015).

In casi di grandi pressioni sulla struttura (come aumenti di peso o piccoli infortuni), è possibile che questa degeneri più rapidamente data la perdita delle componenti cellulari

ed extracellulari (Kos N *et al.* 2019). Recenti studi, hanno infatti dimostrato che i casi di insorgenza della DDI sono significativamente più elevati in lavoratori che trasportano carichi pesanti o che mantengono una postura scorretta per lunghi periodi di tempo come operai o autisti di mezzi pesanti. (Petitm A et Roquelaure Y 2015)

Durante la degenerazione, la frammentazione degli aggregati causa la perdita di acqua all'interno del disco, portando così ad una riduzione della pressione osmotica e quindi dello spessore della struttura (Vergroesene PP *et al.* 2015). Questo comporta uno sbilanciamento della pressione sul disco che, non essendo più uniforme, agisce solo su alcune zone dello stesso. Questo fenomeno viene definito stress laterale e porta alla produzione di collagene di tipo I, il quale permette al disco di proteggersi dalla fuoriuscita del materiale gelatinoso del nucleo polposo (Vergroesene PP *et al.* 2015). Lo stress laterale, inoltre, porta ad una produzione di ossido di azoto (NO), molecola segnale che inibisce la produzione di proteoglicani e aumenta i livelli di apoptosi, contribuendo ad un peggioramento della condizione patologica (Vergroesene PP *et al.* 2015) (Dou Y *et al.* 2021).

Questa protezione che il disco attua tramite modifica dell'ECM è resa possibile da una maggiore espressione di molecole di rimodellamento della matrice che, in condizioni di degenerazione, non vengono più inibite dalla TIMP (Dou Y *et al.* 2021). Ciò, contribuisce alla formazione di un ambiente maggiormente catabolico e meno anabolico.

4.5 Ciclo degenerativo nel disco intervertebrale

Il ciclo della DDI (Figura 6) descrive come tutti i fattori compresi nella patologia siano connessi tra di loro in un processo che, in condizioni fisiologiche, si autoregola per garantire l'omeostasi. Quando si ha un cambiamento dello stato di una delle condizioni coinvolte, tutti gli altri meccanismi implicati nella corretta funzione del disco subiscono modifiche che portano ad uno stato patologico progressivo (Vergroesene PP *et al.* 2015). Tutte le caratteristiche descritte in precedenza sono coinvolte nella patogenesi e sono in grado di indurre modifiche nelle tre componenti principali del processo: biomeccanica, fenotipo cellulare ed ECM (Vergroesene PP *et al.* 2015). Nella descrizione dei meccanismi che possono portare alla degenerazione del disco, è evidente come le modifiche che subisce ogni fattore non interessino solo questo, ma influenzino anche le altre componenti.

Analizzando il ciclo degenerativo si può affermare che uno squilibrio del carico sulla colonna sembrerebbe una delle principali cause di discopatia e che uno stress biomeccanico di questo tipo agisce sulla pressione idrostatica del disco che quindi potrebbe indurre delle lesioni laterali (*shear stress*). Ciò porterebbe a stress della matrice extracellulare, causando una risposta cellulare atta a preservare la struttura. Le cellule si differenzierebbero dunque in un tipo cellulare simil-condrocitico portando ad uno switch del metabolismo da anabolico a catabolico. Tale alterazione porta ad un'alterata produzione dei costituenti della matrice extracellulare, infatti, si ha una riduzione dell'espressione di collagene di tipo II e proteoglicani ed un aumento del collagene di tipo I, metalloproteasi e disintegrine, attuando così un rimodellamento della ECM. Il cambiamento delle componenti della ECM porta infine alla perdita di acqua nel tessuto con conseguente riduzione della pressione intradiscale. A questo punto, il disco non è più in grado di ammortizzare il carico efficacemente, causando così uno squilibrio della componente biomeccanica della struttura facendo ricominciare il ciclo degenerativo (Vergroesene PP *et al.* 2015).

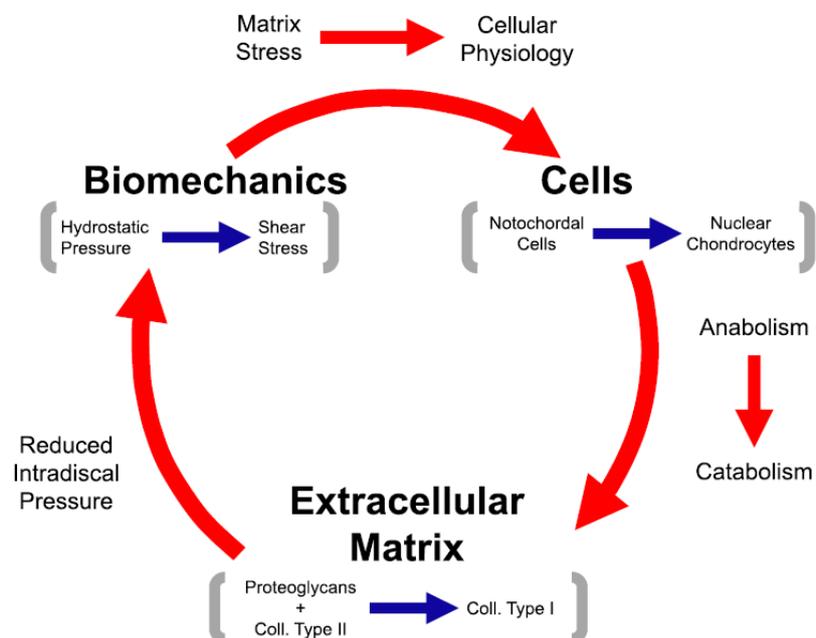


Figura 6 – Il ciclo degenerativo del disco intervertebrale: L'omeostasi del disco è garantita da una fine regolazione delle componenti biomeccaniche, cellulari, e della matrice; una modifica dello stato di una di esse comporta l'innescare di un ciclo che si autoalimenta e provoca un progressivo aumento della degenerazione (Vergroesene PP *et al.* 2015)

5. Classificazione della degenerazione del disco intervertebrale

Esistono diverse metodologie per classificare la degenerazione del disco intervertebrale, una delle più comuni, e clinicamente riconosciuta, è la scala Pfirrmann. Questo metodo di classificazione stima l'idratazione del disco attraverso parametri morfologici, su una scala da I a V, tramite l'utilizzo della risonanza magnetica (MRI) (Rim DC 2016). In

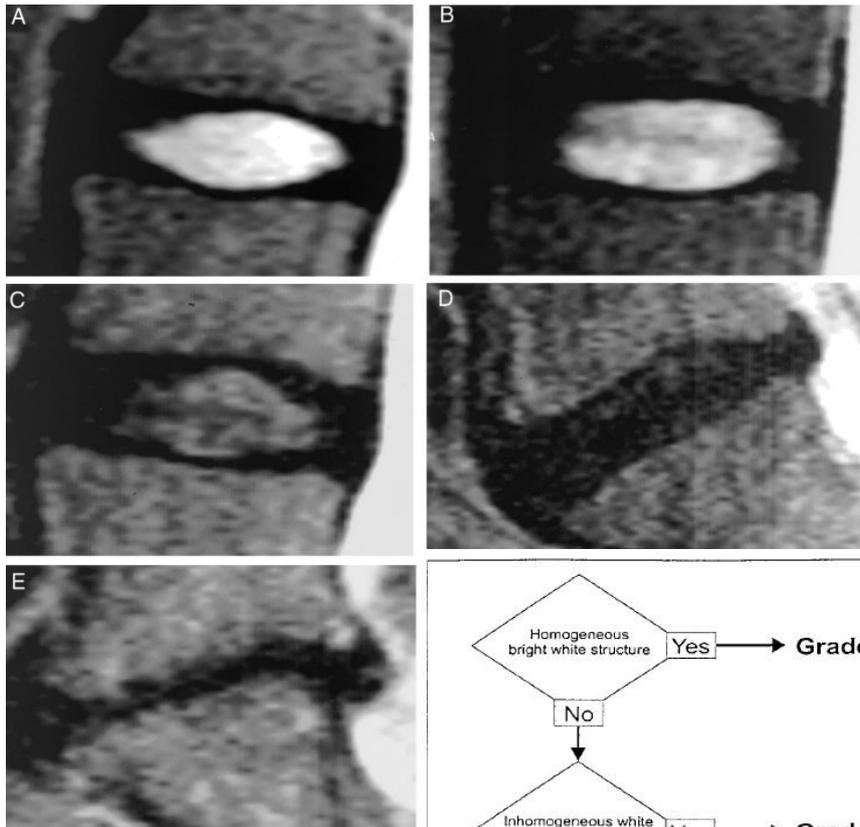


Figura 7 - Classificazione scala Pfirrmann:

A - Grado I: struttura omogenea di colore bianco brillante altezza normale
 B - Grado II: struttura non omogenea di colore bianco leggermente meno chiaro
 C - Grado III: struttura decisamente non omogenea di colore grigio, distinzione tra NP e AF meno chiara e altezza inalterata
 D - Grado IV: struttura non omogenea di colore grigio molto scuro, persa la distinzione tra AF e NP e altezza modificata leggermente
 E - Grado V: struttura non omogenea di colore nero, persa la distinzione tra NP e AF e spazio interdiscale collassato (Pfirrmann CW et al. 2001)

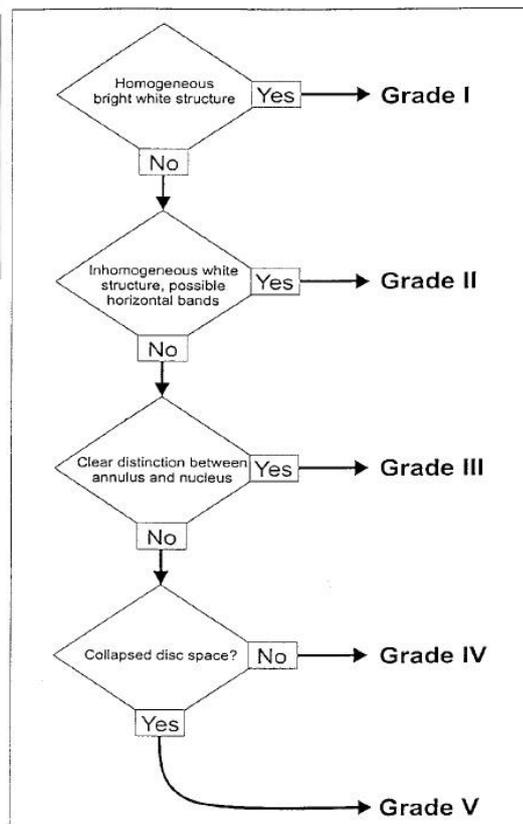


Figura 8 - Schematizzazione del sistema di gradazione Pfirrmann (Pfirrmann CW et al. 2001)

particolare, tramite questo metodo, possono essere valutati i cambiamenti strutturali quali: la perdita di spessore del disco, il colore della struttura e la quantità di proteoglicani presenti; mentre non indica in alcun modo la quantità di acqua e collagene (Pfirrmann CW *et al.* 2001). Questo metodo di classificazione ha una elevata concordanza di valutazione, garantendo così una alta riproducibilità che permette una valutazione univoca della degenerazione e degli studi ad essa correlati (Figura 7 e 8).

6. Degenerazione del disco intervertebrale e stress ossidativo

Il costante stress a cui è sottoposto normalmente il disco intervertebrale comporta la presenza di livelli basali di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nel microambiente che vengono tenuti sotto controllo da enzimi antiossidanti. Recenti studi hanno evidenziato un aumento dei marcatori di stress ossidativo

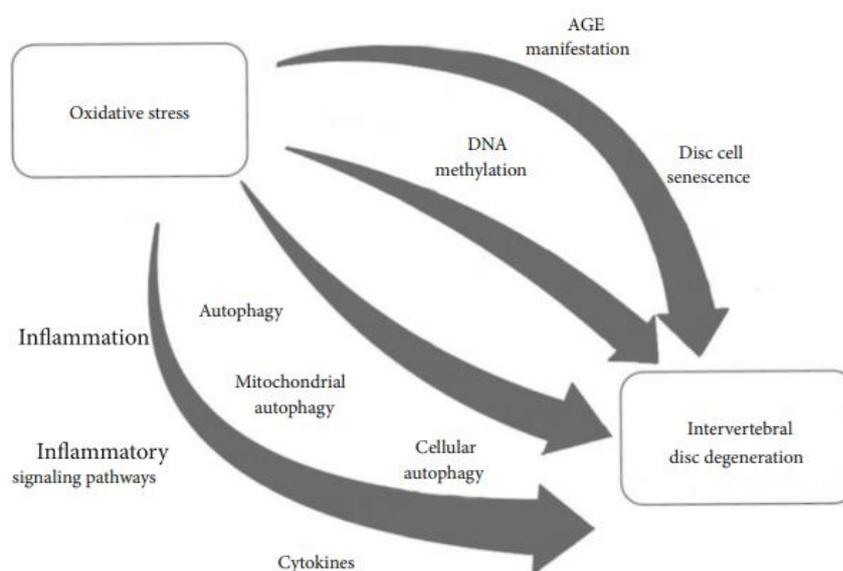


Figura 9 Lo stress ossidativo causa la degenerazione del disco intervertebrale attraverso diversi effetti

(fosfolipasi A, malondialdeide, fruttosamina) nei dischi intervertebrali con segni di degenerazione (Guoshuai *et al.*, 2022). Lo stress ossidativo è definito come uno squilibrio tra molecole pro-ossidanti e antiossidanti come il glutatione (GSH), a favore delle molecole pro-ossidanti. Le ROS più importanti nel processo di stress ossidativo sono il radicale ossidrilico ($\cdot\text{OH}$), lo ione superossido (O_2^-) e il perossido di idrogeno (H_2O_2). Lo stress ossidativo, se cronico, può indurre morte cellulare programmata ed è spesso correlato a diverse patologie. In particolare nel disco intervertebrale un eccesso di ROS sembrerebbe aumentare la degenerazione del disco attraverso diversi *pathways* come

l'attivazione del fattore di trascrizione NF.KB con seguente attivazione della risposta infiammatoria e i pathway legati a MAPK che possono portare ad apoptosi (Zhang GZ *et al.* 2021).

Le cellule hanno sviluppato un efficiente sistema che permette loro di contrastare lo stress ossidativo, controllando continuamente i livelli di ROS e, qualora questi siano troppo elevati, attuare una risposta antiossidante (Zhang GZ *et al.* 2020; Zhang GZ *et al.* 2021). La risposta antiossidante è mediata da fattori altamente sensibili a variazioni dello stato redox della cellula, come il fattore di trascrizione Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) (Zhang H *et al.* 2015).

Nrf2 è il principale attivatore delle difese antiossidanti, agisce legandosi all'elemento di risposta antiossidante (ARE, antioxidant response element) presente nel promotore dei geni antiossidanti e detossificanti di fase II che nel complesso sono denominati geni ARE. Nrf2 appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione con motivo a cerniera di leucina: è composto da sei domini funzionali conosciuti come Neh (Nrf2-ECH homologies) e designati rispettivamente Neh 1-6 (Zhang H *et al.* 2015).

In condizioni fisiologiche Nrf2 si trova nel citoplasma associato al suo inibitore Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) ed è continuamente ubiquitinato e destinato alla degradazione da parte del proteasoma. La proteina Keap1 contiene diversi residui di cisteina con gruppi sulfidrilici che possono reagire con le ROS, causando la rottura dei legami tra Nrf2 e Keap1.

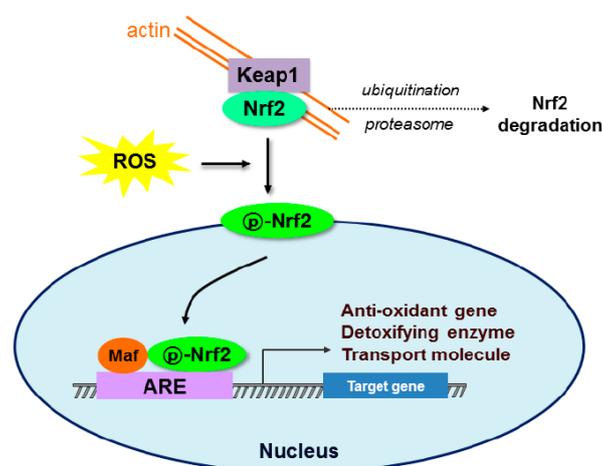


Figura 10 - Pathway di attivazione di Nrf2 (Oh *et al.* 2017).

Quindi, in risposta all'accumulo di ROS tali legami vengono meno e Nrf2 viene fosforilato e traslocato nel nucleo. Nel nucleo, Nrf2 forma eterodimeri con le piccole

proteine Maf (small musculoaponeurotic fibrosarcoma) e gli eterodimeri si legano alle regioni ARE dei promotori dei geni ARE (Figura 12) (Oh *et al.* 2017).

6.1 I geni ARE

La traslocazione di Nrf2 nel nucleo, attiva la trascrizione dei geni ARE, quali: GCL (γ -glutamato-cisteina ligasi), enzima limitante nella biosintesi del glutatione; GPX (glutatione perossidasi), enzima che agisce principalmente come perossidasi; HO-1 (eme-ossigenasi-1), enzima coinvolto nel catabolismo dell'eme; NQO1 (NADPH:quinone ossidoriduttasi-1), una flavoproteina citosolica in grado di catalizzare la riduzione di due elettroni di composti solitamente presenti nella cellula sotto forma di coenzima Q; xCT, subunità catalitica del trasportatore System Xc⁻ che scambia cistina con glutammato; CAT (catalasi) e SOD (superossido dismutasi).

La catalasi è un enzima con due attività enzimatiche differenti: se la concentrazione dell'H₂O₂ è alta, agisce cataliticamente trasformando l'H₂O₂ in H₂O e O₂; se la concentrazione di H₂O₂ è bassa e si è in presenza di un donatore di idrogeno agisce come una perossidasi, ossidando il substrato (Scibior *et al.*, 2006).

La superossido dismutasi è l'unico enzima antiossidante che elimina l'anione superossido convertendolo in O₂ e H₂O₂, evitando così la produzione di perossinitrito e ulteriori danni da radicali (Wang *et al.*, 2015). Le SOD possono essere divise, in base alla loro localizzazione: citoplasmatica (SOD1), mitocondriale (SOD2) ed extracellulare (SOD3). Tutte richiedono la presenza di un metallo catalitico (Cu, Mn, Zn) per svolgere la loro attività (Fukai *et al.*, 2011).

Nel disco intervertebrale la produzione di ROS avviene principalmente in seguito al metabolismo cellulare della fosforilazione ossidativa e al processo infiammatorio. Un processo di smaltimento delle ROS può avvenire, almeno in parte, attraverso l'aumentata trascrizione dei geni ARE dipendente da Nrf2. È stato osservato infatti che l'aumento del grado di degenerazione del disco è correlato con la riduzione significativa dei livelli di Nrf2. Inoltre, in esperimenti con topi Knock-out per questo gene, la riduzione di Nrf2 causa un peggioramento della condizione patologica (Tang Z *et al.* 2019).

L'accumulo cronico delle ROS è un processo tipico delle cellule che vanno incontro a senescenza, attivando il fenotipo catabolico e i meccanismi di rimodellamento dell'ECM

tramite degradazione di proteoglicani ad opera delle MMP e delle ADAMTs e questo porta alle modifiche tipiche della degenerazione (Dimozi A *et al.* 2015).

7. Osmoregolazione nel disco intervertebrale

Con l'invecchiamento e la degenerazione del disco intervertebrale, la concentrazione dei proteoglicani all'interno del disco diminuisce e nel tessuto aumentano le componenti fibrose con una conseguente perdita delle sue proprietà biomeccaniche (Sadowska A *et al.* 2018). In questo contesto, l'osmoregolazione gioca un ruolo fondamentale e deve

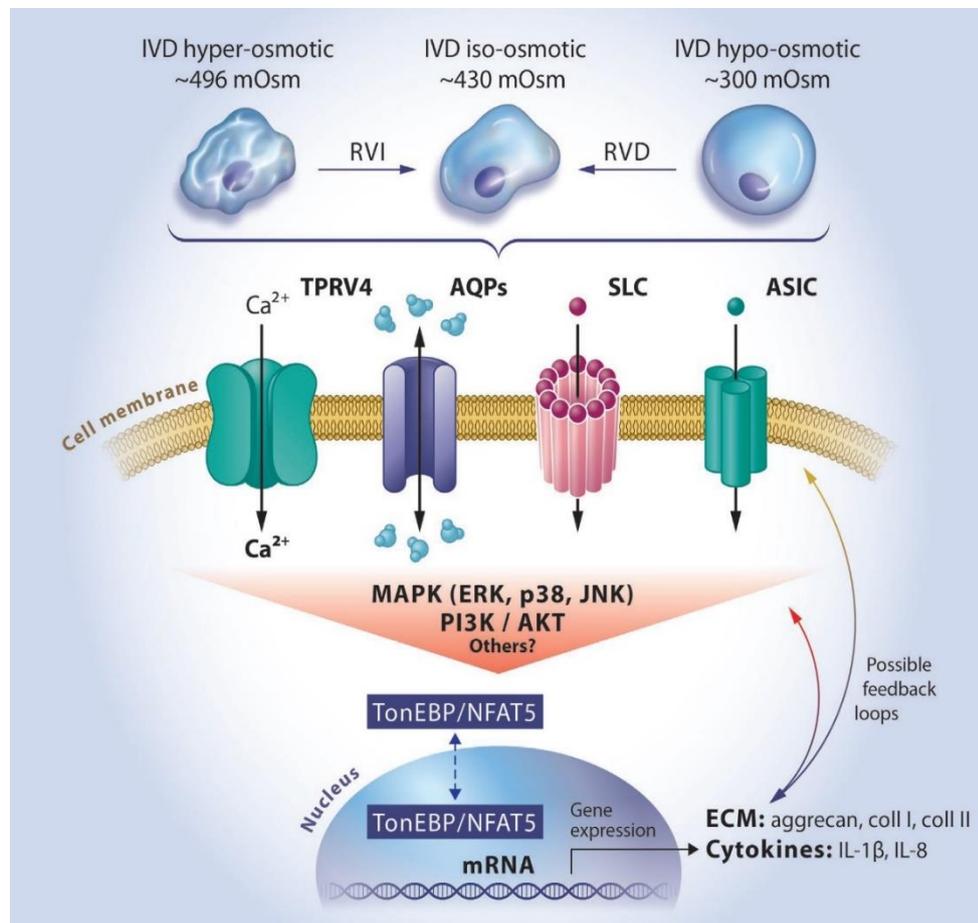


Figura 11 – Osmoregolazione nel disco intervertebrale: schematizzazione dei canali coinvolti nell'osmoregolazione del disco intervertebrale e delle possibili risposte effettuate (Sadowska A *et al.* 2018)

essere analizzata attentamente per capire a pieno come il disco intervertebrale percepisca gli squilibri biomeccanici e risponda ad essi.

L'osmoregolazione è la capacità delle cellule di regolare attivamente la pressione osmotica affinché non aumenti o diminuisca il volume cellulare mantenendo così uno

stato fisiologico. Questo dipende dal movimento dell'acqua attraverso la membrana guidato dal gradiente osmotico; la soluzione a maggiore concentrazione di soluti (iperosmotica), tenderà a richiamare acqua da quella a concentrazione minore (ipotonica) (Lodish H *et al.* 2000).

Durante l'arco della giornata, il disco intervertebrale è sottoposto a circa 16 ore di carico e 8 ore di recupero; in entrambe le fasi il nucleo polposo risente di un maggiore *shift* di pressione rispetto all'annulus. Questo accade perché l'acqua fuoriesce dal NP durante la fase di carico mentre torna nella struttura durante la fase di recupero portando così a delle variazioni importanti di osmolarità. La perdita della capacità di richiamare acqua nel NP sembrerebbe giocare un ruolo chiave nella patogenesi della discopatia degenerativa (Zhang T *et al.*, 2020).

Nel disco intervertebrale, un fattore essenziale per il mantenimento delle condizioni osmotiche è rappresentato dalla quantità e qualità dei proteoglicani. Questi possiedono numerosi gruppi solfati carichi negativamente in grado di attrarre ioni sodio, carichi positivamente, così da aumentare la forza ionica. In questo modo i proteoglicani riescono a richiamare e legare l'acqua nel NP (Urban and Roberts, 2003) (Sadowska A *et al.* 2018). Nello stato fisiologico, l'osmolarità assume un valore di circa 400 mOsm/L e la perdita di proteoglicani porta ad una riduzione fino a circa 300 mOsm/L. Dato che il disco è esposto a continue pressioni, un maggiore o minore carico comporta differenti risposte del tessuto. All'aumento del peso sulla colonna, l'acqua diffonde fuori dal disco (15% di diminuzione del contenuto di acqua) e la pressione osmotica aumenta. In mancanza di peso non c'è una riduzione della pressione grazie all'azione dell'AF (Sadowska A *et al.* 2018). Inoltre, recenti studi su cellule notocordali di ratto hanno evidenziato come lo stress iperosmotico possa indurre apoptosi causata da stress mitocondriale provocato dall'aumento del flusso di Ca^{2+} intracellulare (Jiang L. *et al.*, 2015).

7.1 Proteine di membrana coinvolte nell'osmoregolazione

La regolazione dell'osmolarità gioca quindi un ruolo chiave nella patogenesi e nella progressione della DDI. Infatti, cambiamenti nell'osmolarità possono regolare numerose

vie di segnalazione e modificare ad esempio la secrezione di molecole pro-infiammatorie, la produzione di ROS e la risposta catabolica.

Alcune proteine di membrana sono in grado di percepire variazioni di osmolarità e di pressione e di attuare una risposta adattiva: queste proteine sono i trasportatori di soluti di membrana (SLC), le acquaporine (AQP) e i Transient Receptors Potential channel (TRP).

Gli SLC hanno un coinvolgimento legato al trasporto di soluti attraverso la membrana cellulare, come ad esempio il glucosio; la loro espressione è correlata con l'aumento dell'osmolarità ma il loro ruolo preciso non è ancora stato chiarito (Sadowska A *et al.* 2018).

Le AQP sono dei canali transmembrana che trasportano in modo efficiente l'acqua attraverso la membrana cellulare, recenti studi hanno dimostrato che la condizione di DDI causa una riduzione dell'espressione di questo canale.

7.2. Canali TRP

I TRP sono una super famiglia di canali a 6 passaggi transmembrana, nei mammiferi ne sono stati identificati 28 e ne distinguiamo 6 famiglie. Questi canali sono permeabili a diversi ioni (in particolare Ca^{2+}) e sono in grado di percepire una pletera di stimoli come: stress meccanico, voltaggio, ligandi, pH, temperatura, stress ossidativo, ed altri ancora (figura 13) per il mantenimento dell'omeostasi della struttura in cui si trovano. Tali proteine non sono localizzate esclusivamente sulla membrana esterna ma anche sulle membrane degli organelli intracellulari (Krupkova O *et al.* 2017).

Questi canali sono coinvolti in diversi processi cellulari e hanno un ruolo nella patogenesi di molte malattie, sono considerati pertanto potenziali target per possibili trattamenti terapeutici. L'esatta funzione che essi hanno nel disco intervertebrale non è stata ancora del tutto chiarita (Krupkova O *et al.* 2017; Sadowska *et al.* 2019), ma alcuni di essi sembrerebbero associati alla discopatia degenerativa (Sadowska A *et al.* 2018).

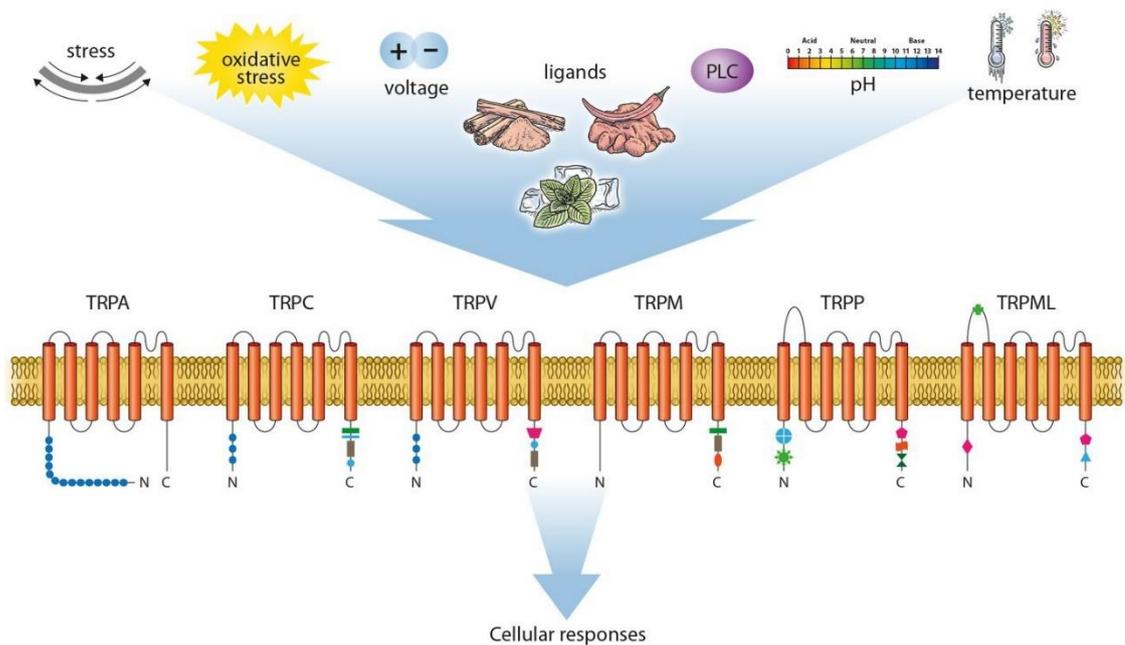


Figura 12 – Superfamiglia TRP: La superfamiglia dei canali TRP è composta da 6 famiglie differenti capaci di rispondere ad un numero molto alto di stimoli, sono permeabili a diversi ioni (in particolare Ca^{2+}) e tramite questo fenomeno sono in grado di innescare una risposta atta al ripristino dell'omeostasi (Krupkova O et al. 2017).

7.2.1 TRPA

Il TRP Anchirina (TRPA) è una delle famiglie dei canali TRP presenti nel disco intervertebrale e con un possibile coinvolgimento nella DDI. Questi canali sono coinvolti nei processi di percezione del dolore. Infatti, sono stati identificati principalmente nei neuroni sensitivi specializzati nella nocicezione, ma la loro espressione è confermata anche in altri tipi cellulari (Krupkova O et al. 2017). In presenza di molecole pro-infiammatorie, come ad esempio $IL-1\beta$, TRPA1 contribuisce alla regolazione del dolore in modelli cellulari di condrociti di topo e di ratto e anche alla propagazione dell'infiammazione (Krupkova O et al. 2017). Inoltre, l'espressione di questa proteina sembrerebbe correlata alla via di segnalazione di NF- κ B, alla presenza di neuropeptidi e ROS. Tutto questo suggerisce come una regolazione di TRPA1 possa avere effetti benefici sulla riduzione del dolore cronico e sull'infiammazione delle patologie del disco intervertebrale (Krupkova O et al. 2017).

7.2.2 TRPV

I TRP della famiglia Vanilloide (TRPV) sono conosciuti anche come i recettori della capsaicina (la sostanza responsabile della piccantezza) e sembrerebbero coinvolti nell'iperalgia delle articolazioni. TRPV1 è attivato da un pH particolarmente acido, infatti, la sua attivazione durante la DDI sembrerebbe dovuta alla presenza di acido lattico che oltre a rendere l'ambiente extracellulare acido, causa uno squilibrio del flusso di acqua nella struttura. Inoltre, l'espressione di TRPV4 può essere stimolata dalla presenza di citochine nell'ambiente ed è in grado anche di rispondere a segnali osmotici innescati

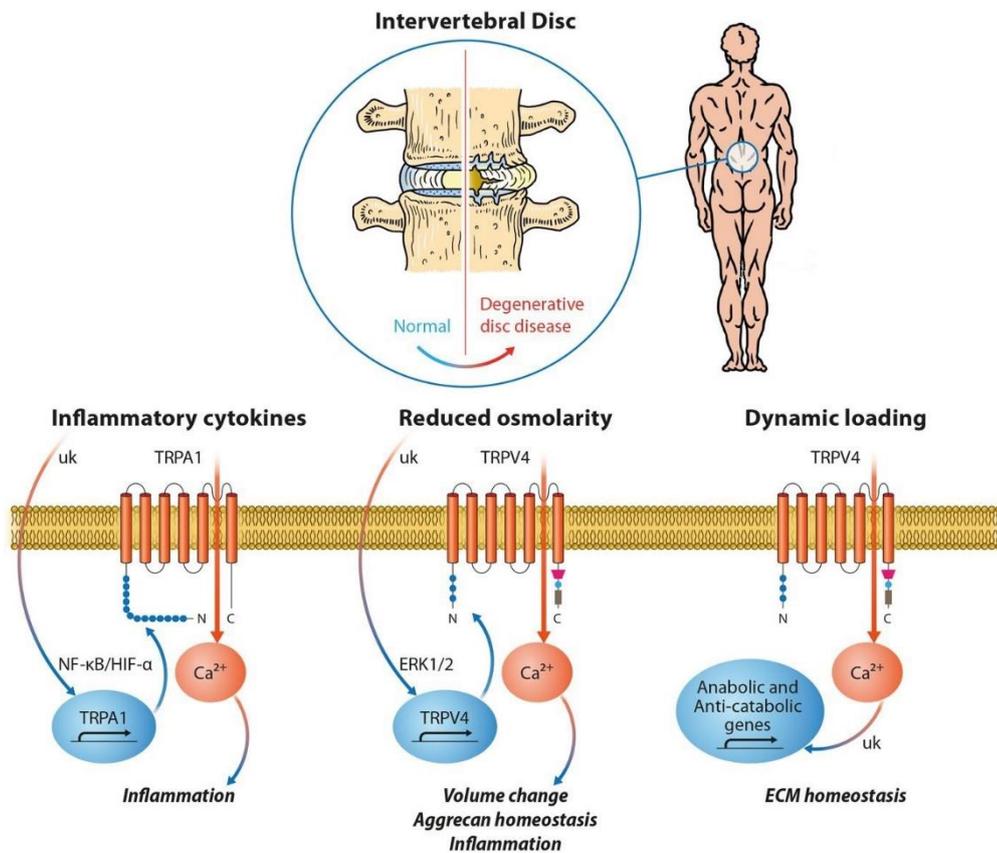


Figura 13 TRPA e TRPV: Queste due famiglie di canali hanno la capacità di rispondere a diversi stimoli, in particolare i canali rappresentati in figura sono presenti nel disco intervertebrale e sono coinvolti nel processo di DDI

dall'aumento di peso sulla colonna, la risposta che questo canale genera è principalmente coinvolta in meccanismi di infiammazione che potrebbero portare a fenomeni di rimodellamento dell'ECM (Krupkova O *et al.* 2017) (Figura 13).

TRPV2 è espresso in condrociti e nel disco intervertebrale ma non si sa molto del suo ruolo nella patogenesi della DDI. Questo canale è attivato in seguito a stimoli meccanici

e sembrerebbe che un aumento importante della sua espressione, e quindi della sua attivazione, può portare ad un influsso molto forte di Ca^{2+} con conseguente promozione di meccanismi di morte cellulare (Krupkova O *et al.* 2017).

7.2.3 TRPC

Un'altra famiglia di canali presente nel disco intervertebrale è quella dei TRP canonici (TRPC). Il loro coinvolgimento diretto nella progressione della DDI è stato documentato ma i meccanismi molecolari e cellulari non sono stati ancora del tutto chiariti. La loro funzione sembrerebbe essere correlata con una ridotta proliferazione, una modifica della progressione del ciclo cellulare e induzione della senescenza cellulare (Krupkova O *et al.* 2017). I TRPC sono coinvolti principalmente nella percezione di stimoli meccanici ed è stato dimostrato un loro coinvolgimento anche nei processi infiammatori (Krupkova O *et al.* 2017). In particolare, è stato dimostrato come un membro di questa famiglia, il TRPC6, sia correlato con i livelli di espressione di IL-6 (Sadowska A *et al.* 2018) (Krupkova O *et al.* 2017).

Uno studio recente ha evidenziato come il TRPC6 sia sensibile anche alla diminuzione del carico pressorio oltre che al suo aumento. Infatti, le cellule del disco intervertebrale sottoposte a microgravità (riduzione del peso) mostrano un livello di espressione di TRPC6 più basso rispetto alle cellule di controllo (Franco-Obregòn A *et al.* 2018), indicando un possibile coinvolgimento del TRPC6 in fenomeni di mecano-trasduzione e nella regolazione di vie metaboliche che possono portare ad un aumento dello stato degenerativo del disco intervertebrale. Queste caratteristiche rendono il TRPC6 un possibile ed interessante bersaglio terapeutico per la DDI.

Obiettivi della ricerca

La DDI consiste in un'alterazione della normale funzione della struttura del disco intervertebrale ed è fortemente correlata alla lombalgia, un disturbo che colpisce circa l'80% della popolazione adulta in tutto il mondo e può manifestarsi anche in ragazzi di età tra gli 11 e i 16 anni (Raj PP, 2007). Il tasso di incidenza si aggira tra il 12% e il 35% (Raj PP, 2007), con un 10% dei pazienti che acquisisce una disabilità cronica. Tra i fattori coinvolti troviamo la compressione permanente del disco e la deregolazione dei meccanismi biomeccanici che possono causare uno stato di iperalgesia nel soggetto affetto (Raj PP, 2007). La DDI si aggrava con l'invecchiamento. Infatti, è stato dimostrato che la percentuale di incidenza in pazienti di 50 anni sia del 10% circa ed arriva al 60% all'età di 60 anni (Raj PP, 2007).

L'obiettivo principale di questo lavoro è stato quello di indagare i meccanismi molecolari e cellulari alla base della degenerazione del disco intervertebrale. Sono stati condotti studi *ex vivo* su campioni di disco intervertebrale prelevati dai pazienti e studi *in vitro* su cellule primarie umane di disco intervertebrale. In particolare, il ruolo del recettore TRPC6 è stato analizzato nelle cellule discali del *Nucleus Pulposus* (NP) e dell'*Annulus Fibrosus* (AF).

Inizialmente è stata verificata l'espressione di TRPC6 nei dischi intervertebrali di pazienti affetti da DDI. Successivamente è stata modulata l'attività e l'espressione del recettore nelle cellule di NP e di AF utilizzando specifici agonisti e inibitori al fine di analizzare il suo coinvolgimento nella regolazione della composizione della matrice extracellulare e nella risposta allo stress ossidativo.

In particolare, in queste condizioni sperimentali è stata valutata l'espressione di costituenti della matrice extracellulare quali: collagene di tipo I, collagene di tipo II e la metallo-proteasi II, data la loro importanza nei processi di degenerazione discale. Inoltre, visto il ruolo dello stress ossidativo nella patogenesi della DDI, si è valutato se le cellule di NP e AF fossero in grado di rispondere all'accumulo di ROS e se l'agonista di TRPC6 potesse attivare alcuni geni della risposta antiossidante come Catalasi, SOD1 e SOD2.

Infine, dato che specifiche condizioni di osmolarità sono essenziali per il mantenimento delle proprietà biomeccaniche e che le alterazioni di queste condizioni sono riconducibili a stati patologici, è stata analizzata la vitalità delle cellule coltivate in terreni a diverse osmolarità.

Materiale e Metodi

1. Materiali

Per gli esperimenti di vitalità cellulare è stato utilizzato Thiazolyl blue tetrazolium bromide (Sigma).

Per gli esperimenti di western blot sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: anti-actina policlonale (Sigma), anti-Tubulina (Abcam), anti-TRPC6 (Proteintech), anti-Catalasi policlonale (Rockland), anti-Col2A1(Cell Signaling), anti-Col1A1(Cell Signaling) e anti-MMP-2 (Cell Signaling) sviluppati in rabbit. È stato utilizzato l'anticorpo secondario anti-rabbit policlonale (Biorad).

Per l'analisi dell'espressione genica sono stati utilizzati il Kit Go Taq 2-Step RT- qPCR System (Promega).

Per i trattamenti sono stati utilizzati GSK1702934 (5 μ M) (Sigma SML2323), Rotenone (10 μ M) (Sigma, R8875) e Rosiglitazone (30 μ M) (Sigma R2408). Per riprodurre le diverse condizioni osmotiche, sono state prodotte delle soluzioni acquose in cui sono stati disciolti: KCl 4.7 mM; KH_2PO_4 1.2 mM; NaCHO_3 25 mM; CaCl_2 2.5 mM; MgCl_2 1 mM; glucosio 5.5 mM. Le variazioni di osmolarità sono dovute alle diverse concentrazioni di NaCl: 19 mM a 100 mOSM; 69 mM a 200 mOSM; 119mM a 300 mOSM; 169 mM a 400 mOSM e 219 mM a 500 mOSM.

2. Colture cellulari

Come modello cellulare sono state utilizzate linee primarie di Annulus Fibrosus e Nucleus Pulposus, acquistate da Innoprot.

Le cellule sono state mantenute in coltura a 37°C, in atmosfera al 5% di CO₂, utilizzando il terreno Nucleus Pulposus Cell Medium kit (NPCM) Ref. P60135.

Le cellule sono state seminate in fiasche da 75 cm² e lasciate crescere fino al raggiungimento dell'80% di confluenza. Per espandere la coltura, le cellule sono state staccate dal substrato mediante trattamento con tripsina (EuroClone) e seminate in altre fiasche da 75 cm². Ogni procedura è stata effettuata sotto cappa a flusso laminare (Biohazard), per garantire le condizioni di sterilità.

2.1 Condizioni di trattamento

Le cellule sono state seminate alla densità di:

- 3x10⁴ Cells/piastra da 1.5 cm di diametro (Sarstedt) per saggio di vitalità;
- 6x10⁴ Cells/piastra da 3.5 cm di diametro (Sarstedt) per immunofluorescenza;
- 1.5x10⁵ Cells/piastra da 3.5 cm di diametro (Sarstedt) per l'estrazione dell'RNA.
- 4x10⁵ Cells/piastra da 6 cm di diametro (Sarstedt) per gli estratti proteici totali.

Le cellule sono state mantenute in coltura per 24 h in NPCM completo. Al termine delle 24 h è stato rimosso da ogni piastra il NPCM completo, ed è stato aggiunto NPCM per eseguire i trattamenti.

I trattamenti sono stati effettuati in:

- 1 ml in caso di utilizzo delle piastre da 3.5 cm di diametro.
- 3 ml in caso di utilizzo delle piastre da 6 cm di diametro.
- 7 ml in caso di utilizzo delle piastre da 10 cm di diametro.

Le cellule sono state trattate con Rotenone (10 µM), Rosiglitazone (30 µM) e GSK (5 µM) per diversi periodi di tempo, come indicato nei risultati. Al termine del trattamento le cellule sono state staccate meccanicamente mediante l'utilizzo di scrapers per poi procedere con gli estratti proteici.

3. Campioni di disco intervertebrale

I campioni sono stati ottenuti tramite discectomia da pazienti affetti da DDI di età compresa tra i 20 e i 65 anni, grazie ad una collaborazione con il dipartimento NESMOS dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Sant'Andrea dell'università di Roma "La Sapienza". Appena estratti i campioni sono stati conservati a -80°C.

Successivamente, i campioni prelevati dai pazienti sono stati suddivisi in base al grado di degenerazione secondo la scala Pfirmann.

Per quanto riguarda la condizione di controllo, i dischi sono stati prelevati da cadavere e sottoposti a RX per valutarne l'integrità.

CONTROLLI DA CADAVERE			PFIRMMANN 3			PFIRMMANN 4			PFIRMMANN 5		
N°	SESSO	VERTEBRA	Paziente	SESSO	VERTEBRA	Paziente	SESSO	VERTEBRA	Paziente	SESSO	VERTEBRA
1	M	L4-L5	1	M	L4-L5	1	F	L2-L3	1	M	L3-L4
2	M	L4-L5	2	F	L5-S1	2	F	S1	2	M	L5-S1
3	M	L4-L5	3	F	L4-L5	3	F	L2-L3	3	F	L3-L4
4	M	L5-S1	4	F	L4-L5	4	M	L4-L5	4	M	L4-L5
5	M	L5-S1	5	F	L3-L4	5	M	L4-L5	5	M	L2-L3
			6	M	L3-L4	6	M	L4-L5	6	F	L3-L4
			7	F	L5-S1	7	F	L5-S1	7	F	L3-L4
			8	F	L4-L5	8	F	L4-L5	8	F	C6-C7
			9	M	L5-S1	9	F	L5-S1	9	F	C5-C6
			10	M	L5-S1	10	F	L3-L4			
			11	M	L5-S1	11	M	L4-L5			
			12	F	L2-L3						
			13	F	L2-L3						
			14	F	L4-L5						
			15	F	L4-L5						

PFIRMMANN 2		
Paziente	SESSO	VERTEBRA
1	M	L4-L5
2	M	L3-L4
3	M	L3-L4

Tabella 1 Classificazione dei campioni prelevati dai pazienti secondo grado di degenerazione da I a V (Scala Pfirrmann)

4. Saggio della vitalità cellulare

La vitalità delle cellule di NPC e Afc è stata valutata mediante il saggio MTT. Alla scadenza del tempo di trattamento è stata aggiunta al terreno di coltura una soluzione di MTT al 10% (5 mg/ml di MTT sciolto in PBS) e le cellule sono state lasciate in incubatore a 37°C per 4 ore. Al termine del periodo di incubazione, è stato aggiunto a ciascun pozzetto un uguale volume di solvente per MTT (4 mM HCl, 0.1% NP40 in isopropanolo), l'incubazione è proseguita a 37°C per 30 minuti. Al termine dell'incubazione è stata misurata la densità ottica (OD) di ciascun campione alla lunghezza d'onda di 570 nm mediante il lettore Tecan Spark10M.

5. Western blot

5.1 Preparazione degli estratti totali

La preparazione degli estratti totali è stata effettuata utilizzando il buffer TEEN 1% triton (10 mM tris HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 1% triton, cocktail

di inibitori di proteasi diluito 1:100; Sigma). Al termine del periodo di trattamento, le cellule sono state lavate in PBS, staccate meccanicamente mediante l'utilizzo di uno scraper e trasferite in eppendorf da 1.5 ml. In seguito, le cellule sono state centrifugate a 5000 rpm, 4°C per 5 minuti. Ciascun pellet è stato risospeso in 30 µl di buffer TEEN con 1% triton. I campioni sono stati mantenuti a 4°C per 20 minuti, agitando ogni minuto. In seguito, i campioni sono stati centrifugati a 14000 rpm, 4°C per 20 minuti. Al termine della centrifugazione il soprannatante contenente le proteine cellulari è stato prelevato e conservato in aliquote a -80°C.

5.2 SDS-PAGE e immunoblotting

La presenza di proteine negli estratti totali e nucleari è stata analizzata mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti e successiva ibridazione con anticorpi specifici. Su gel al 6 e 8% di poliacrilammide, sono state caricate quantità equivalenti di proteine totali di ciascun campione. La corsa elettroforetica è stata effettuata in un Running Buffer composto da Tris/Glicina/SDS (Biorad). Al termine della corsa elettroforetica, le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa. Il trasferimento è stato eseguito utilizzando lo strumento "Trans Blot" (Biorad).

In seguito al trasferimento, la membrana è stata incubata in TBS-T (Tris Buffer Saline: 20 mM Tris- HCl pH 7.4; 137 mM NaCl; 0.1% di Tween 20) contenente 5% di latte in polvere senza grassi (Blotting-Grade Blocker, Biorad) per un'ora a temperatura ambiente, per bloccare i siti di legame aspecifici con le proteine del latte. In seguito, la membrana è stata incubata per tutta la notte a 4°C con TBS-T contenente 5% di latte in cui è stato aggiunto l'anticorpo primario. La mattina seguente la membrana è stata lasciata qualche minuto a temperatura ambiente ed è poi stata lavata tre volte con TBS-T per 6 minuti, ciascun lavaggio è stato effettuato in agitazione orbitale veloce.

La membrana è stata quindi incubata con l'anticorpo secondario in TBS-T contenente 2.5% di latte per un'ora a temperatura ambiente in agitazione orbitale lenta. La membrana, quindi, è stata nuovamente lavata tre volte con TBS-T per 6 minuti, in agitazione orbitale veloce. Il reagente impiegato per la rilevazione è stato il Clarity Western ECL substrate (Biorad), che permette la rilevazione di anticorpi coniugati con la perossidasi. Il complesso enzimatico della perossidasi catalizza l'ossidazione del

substrato luminolo ad acido 3-aminofalico per aggiunta di H₂O₂, emettendo chemiluminescenza.

Le differenze tra i vari campioni, rispetto la presenza della proteina sotto studio, sono state normalizzate utilizzando come riferimento la proteina actina o tubulina per gli estratti totali.

6. Immunofluorescenza

1.5x10⁴ U373 sono state seminate in piastre da 3.5 cm di diametro contenenti vetrini coprioggetto 20x20 mm, trattati con poli-lisina. Dopo i trattamenti, le cellule sono state lavate in PBS e fissate in PFA 4%. Le cellule sono state permeabilizzate mediante l'aggiunta di Triton nella blocking solution (5% BSA, 0,1% Triton in PBS) per un'ora a temperatura ambiente. Al termine dell'ora di blocco le cellule sono state incubate tutta la notte a 4°C con anti-TRPC6 1:100 in una soluzione composta da 1% BSA e 5% FBS in PBS. Dopo essere state lavate, le cellule sono state incubate per un'ora a 37°C con anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 coniugato diluito 1:500 in una soluzione composta da 0.5% BSA e 2.5% FBS in PBS. Al termine dell'ora di secondario le cellule sono state lavate e chiuse con un montante che preserva la fluorescenza (Vectashield), sono state quindi osservate al microscopio a fluorescenza.

7. Analisi dell'espressione genica

7.1 Estrazione dell'RNA

L' RNA è stato estratto secondo il metodo single step di Chomczynsky e Sacchi, utilizzando il reagente Trizol (Invitrogen), una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato. In particolare, è stato aggiunto 1 ml di Trizol in ogni piastra (3.5 cm, Sarstedt), precedentemente portata a secco, e il contenuto è stato spostato in eppendorf da 1.5 ml. Ad ogni campione vengono aggiunti 200 µl di cloroformio, e dopo 15 secondi di agitazione al vortex, i campioni vengono lasciati 2/3 minuti a temperatura ambiente e, quindi, centrifugati a 12000 rpm, 4°C, 15 minuti. Alla fase acquosa, contenente l'RNA, vengono aggiunti 500 µl di isopropanolo, che permette all'RNA di

precipitare. In seguito ad un periodo di incubazione, i campioni vengono centrifugati a 12000 rpm, 4 °C, 10 minuti. Il pellet così ottenuto viene pulito da un eccesso di sali mediante un lavaggio con 1 ml di soluzione acquosa al 75% di etanolo e, infine, risospeso in 20 µl di H₂O milliQ.

L'estrazione di RNA da disco intervertebrale è stata effettuata polverizzando il campione (circa 80mg) con pestello e mortaio in azoto liquido. I successivi passaggi dell'estrazione sono gli stessi utilizzati per le colture cellulari.

7.2 Retrotrascrizione

È stato retrotrascritto 1 µg di RNA totale in cDNA in 20µl di reazione, utilizzando il Kit Go Taq 2-Step RT-qPCR System (Promega). La prima mix di reazione è composta da 1 µl di oligo(dT) (utilizzato come innesco per la retrotrascrizione), 1 µg di RNA, e acqua nuclease-free per portare a volume di 10 µl. La seconda mix di reazione è composta da 1.5 µl di acqua nuclease-free, 4 µl di GoScript 5X Reaction Buffer, 2 µl di MgCl₂ 25 mM, 1 µl di PCR nucleotide mix 10 mM, 0.5 µl di recombinant RNAsin (inibitore delle ribonucleasi) e 1 µl di GoScript Reverse transcriptase, per un volume totale di 10 µl. La prima mix è stata messa in un termociclatore per 5 minuti a 70°C, al termine dei quali è stata aggiunta ai campioni la seconda mix. I campioni con prima e seconda mix vengono messi nuovamente nel termociclatore a 25°C per la fase di annealing; l'estensione del trascritto è stata condotta a 42°C per un'ora e infine la reazione è stata terminata con incubazione a 70°C per 15min. I cDNA sono stati conservati a -20°C ed utilizzati per le analisi successive.

7.3 Real-time qPCR

Il cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione di 1 µg di RNA totale è stato diluito 1:10 in acqua milliQ. 3 µl di ciascun cDNA diluito sono stati utilizzati per fare dei triplicati. Per l'amplificazione è stato utilizzato il Kit GO Taq2-Step RT-qPCR System (Promega), che contiene la GO Taq qPCR Master Mix. Per la qPCR l'amplificazione è stata eseguita in 15 µl di miscela di reazione composta da: GO Taq qPCR Master Mix (2X) 7.5 µl, 0.3 µl

di primer “forward” e 0.3 µl di primer “reverse” del gene di interesse (25 pmol/µl), 3 µl di cDNA e acqua milliQ per portare a volume.

Le sequenze dei primers utilizzati per l'amplificazione sono le seguenti:

- GAPDH

FWD: 5'-TTG TTG CCA TCA ATG ACCC-3'

REV: 5'-CTT CCC GTT CTC AGC CTTG-3'

- TRPC6

FWD:5'-GTT ATG TTC GGA TTG TGG AAG CA -3'

REV: 5'-ACA TCA TGG GAG AAC CGT GTC -3'

- COLLAGENE DI TIPO I

FWD:5'- GAG ATG ATG GGG AAG CTG G-3'

REV:5' – ACC ACT GAA AAG TCT GTG TC-3'

- COLLAGENE DI TIPO II

FWD: 5'- CTT GGT GGA AAC TTT GCT GC-3'

REV: 5' – CTT GAG GCC GAG CAG GAG CAC-3'

- SOD1

FWD: 5' - AGT AAT GGA CCA GTG AAG G-3'

REV: 5'-GGA TAG AGG ATT AAA GTG AGG A-3'

- SOD2

FWD: 5'-TCA GTT TGG GGA TTA TTC AGG TG-3'

REV: 5'-CAA AAC CAC CGG AAA TGC TGG A-3'

- CATALASI

FWD: 5'-TCA GGT TTC TTT CTT GTT CAG-3'

REV: 5'-CTG GTC AGT CTT ATA ATG GAA TT-3'

8. Analisi statistica

I dati riportati nelle figure sono espressi come media \pm errore standard di triplicati sperimentali. L'analisi statistica dei dati è stata eseguita utilizzando il software Graph Pad PRISM. La significatività statistica è stata valutata tramite il test One-way ANOVA, seguito dal test Bonferroni. Le differenze delle medie sono considerate statisticamente significative con valori di $p \leq 0,05$.

Risultati e discussione

1. Risultati sui dischi intervertebrali

Per investigare sul coinvolgimento di TRPC6 nella patogenesi e progressione della discopatia degenerativa, i campioni di disco prelevati dai pazienti affetti da diversi gradi di degenerazione discale sono stati processati per valutare se questi esprimessero o meno questo canale.

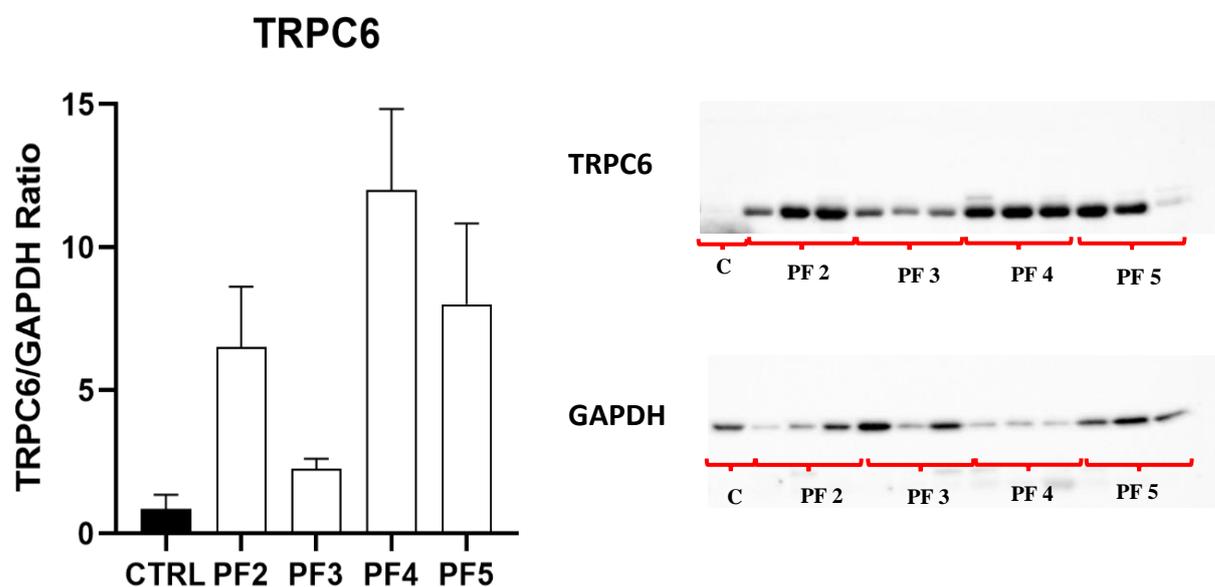


Figura 14 Analisi dell'espressione proteica di TRPC6 tramite Western Blot su campioni di disco intervertebrale prelevati da pazienti affetti da degenerazione discale

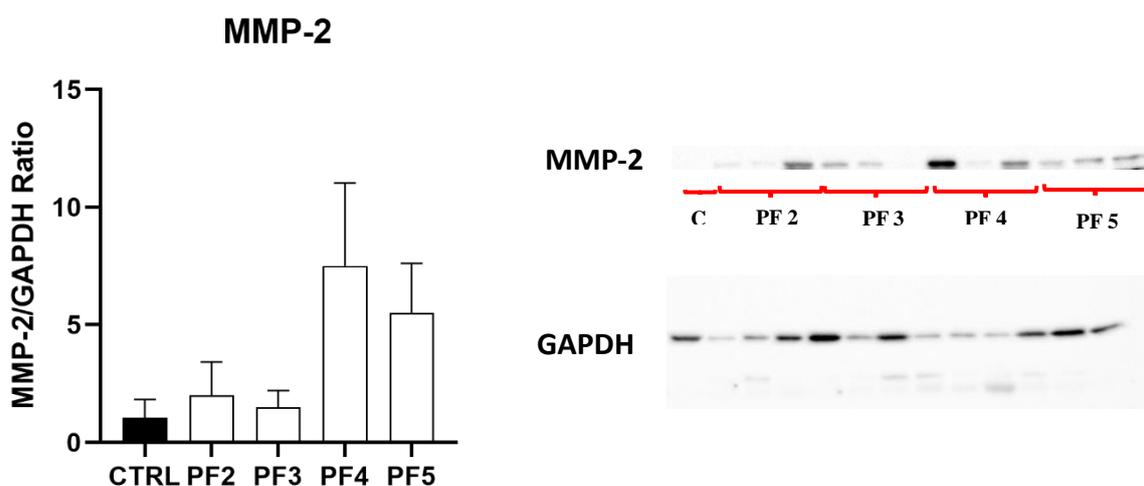


Figura 15 Analisi dell'espressione proteica di MMP-2 tramite Western Blot su campioni di disco intervertebrale prelevati da pazienti affetti da degenerazione discale

Il grafico (Fig. 14) indica un aumento dei livelli di espressione proteica di TRPC6 soprattutto nei gradi più gravi di degenerazione. Ciò suggerisce un ruolo di questo recettore per quanto riguarda la progressione della DDI.

Successivamente, nei campioni di disco, è stata valutata l'espressione proteica della MMP-2, enzima che si occupa del rimodellamento e della degradazione della matrice extracellulare.

Come si evince dal grafico (Fig.15), si ha un aumento dei livelli proteici di MMP-2 nei gradi più alti di degenerazione. Questo dato, indica come all'interno dei dischi intervertebrali ci sia una degradazione della matrice extracellulare che può condurre alla perdita delle funzioni biomeccaniche del disco.

2. Risultati delle cellule di Nucleo Polposi e di Annulus Fibroso

Per quanto riguarda il modello *in vitro*, come prima cosa si è voluto dimostrare l'espressione di TRPC6 nelle cellule di Nucleo Polposi e di Annulus Fibroso.

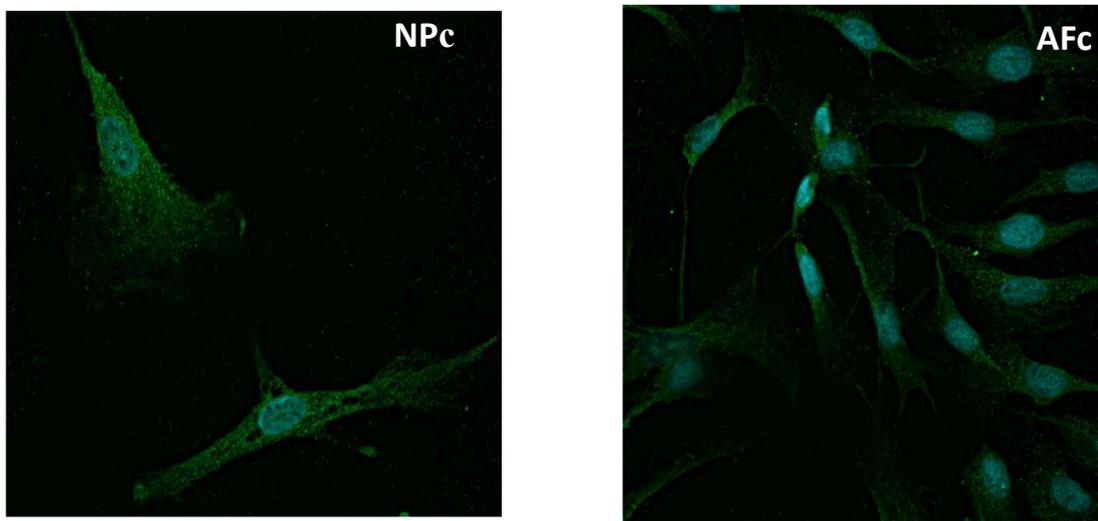


Figura16 – Cellule di NP e AF marcate per il canale TRPC6 osservate al microscopio confocale (80x).

Tramite microscopia confocale, si è osservata un'espressione basale di TRPC6 in entrambi i tipi cellulari

Per verificare il coinvolgimento di TRPC6 nella degenerazione del disco intervertebrale, è stata analizzata la vitalità cellulare delle cellule di NP e AF e l'espressione di proteine fondamentali per il corretto funzionamento della struttura del disco a seguito

dell'esposizione all'agonista per questo canale: il GSK1702934A (GSK), alla concentrazione 5 μ M.

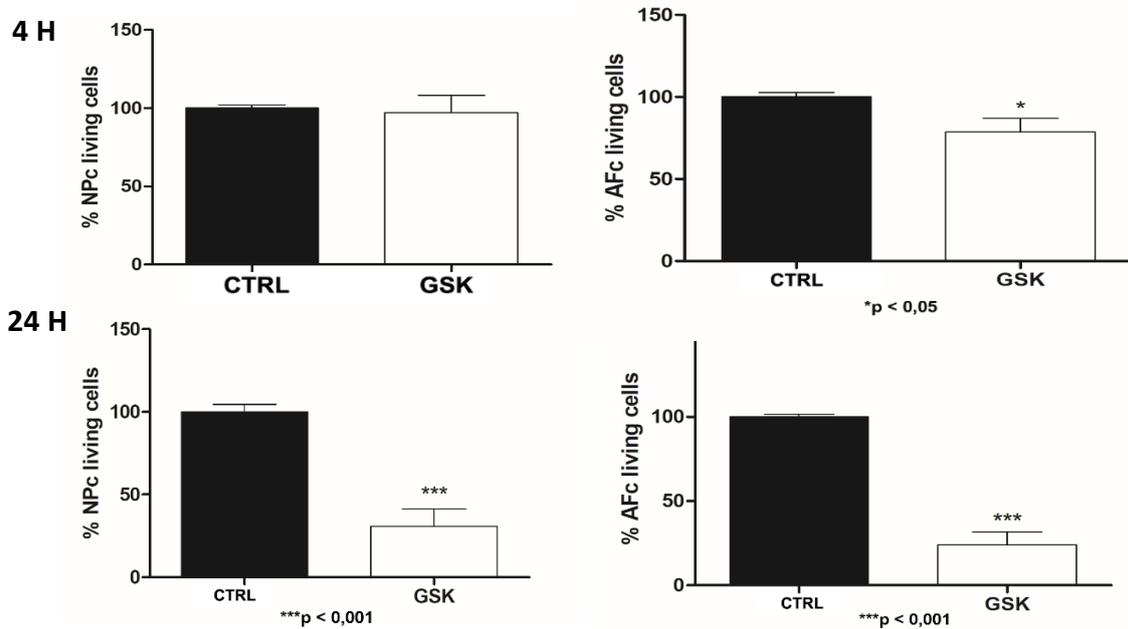


Figura 17 Analisi della vitalità cellulare delle cellule di NP e AF tramite MTT test dopo trattamento con l'agonista di TRPC6, GSK, per 4H e 24H

I risultati indicano che l'attivazione prolungata di TRPC6 tramite il suo agonista causa una riduzione della vitalità di circa il 20% nelle cellule di AF dopo 4 H di trattamento. Nel tempo più lungo (24H) si ha invece una riduzione del 70% e di circa il 75%, rispettivamente nelle cellule di NP e AF. Ciò, potrebbe essere riconducibile all'aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} che potrebbe causare stress mitocondriale e produzione di ROS.

Per quanto riguarda l'analisi dell'espressione genica e proteica a seguito del trattamento con l'agonista del recettore, sono stati valutati i livelli di TRPC6, Collagene di tipo I, Collagene di tipo II e MMP-2.

Come si può osservare nella figura 18, i livelli trascrizionali di TRPC6 aumentano significativamente solo nelle cellule di NP a 6 H dal trattamento con GSK, mentre nelle cellule di AF si ha un leggero aumento indicativo. Invece, per quanto riguarda i livelli proteici del canale, si ha un aumento significativo sia nelle cellule di NP che in quelle di

AF. Questi dati suggeriscono che l'attivazione di TRPC6 porta ad un aumento della sua produzione attraverso un meccanismo di feedback positivo.

Dato che i cambiamenti della matrice extracellulare sono determinanti per la progressione

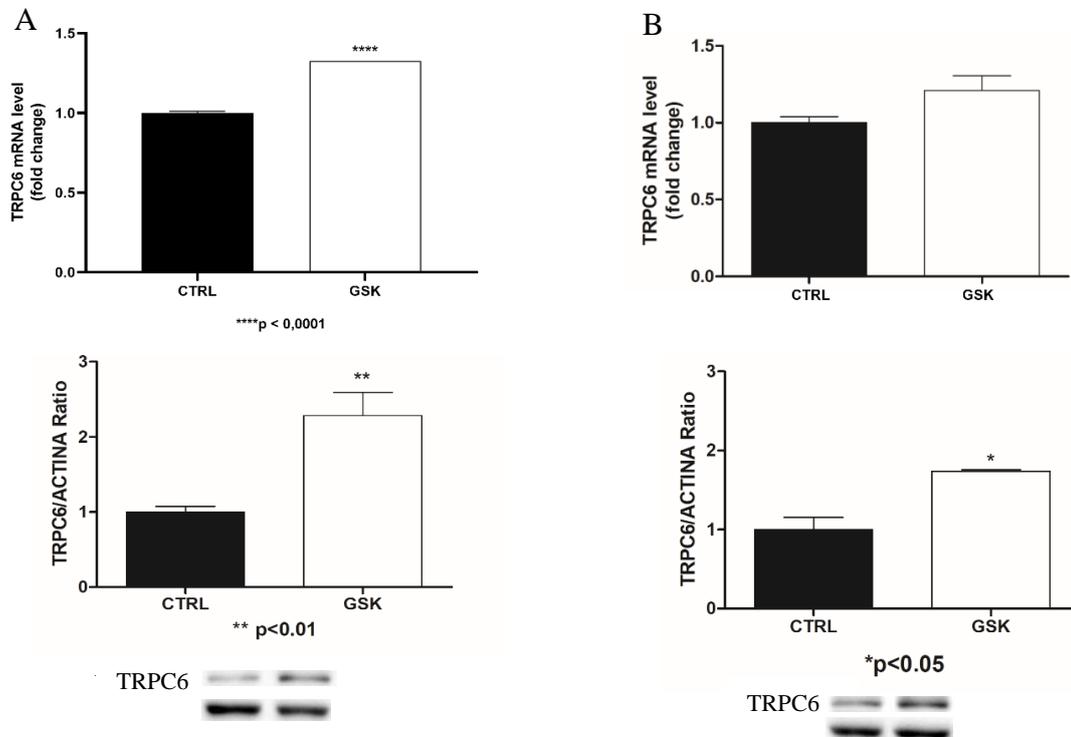


Figura18 Espressione genica e proteica di TRPC6 rispettivamente a 6 H e 8H dopo trattamento con GSK nelle cellule di NP(A) e AF (B)

della degenerazione del disco intervertebrale, si è valutato se l'attivazione di TRPC6 potesse modulare la produzione di componenti di matrice come Collagene di tipo I e Collagene di tipo II.

Come si evince dal grafico (fig. 19) si ha un aumento della trascrizione del gene di COL I solo nelle cellule di NP; mentre per quanto riguarda le cellule di AF, si ha una riduzione non significativa sia dell'espressione genica che si quella proteica.

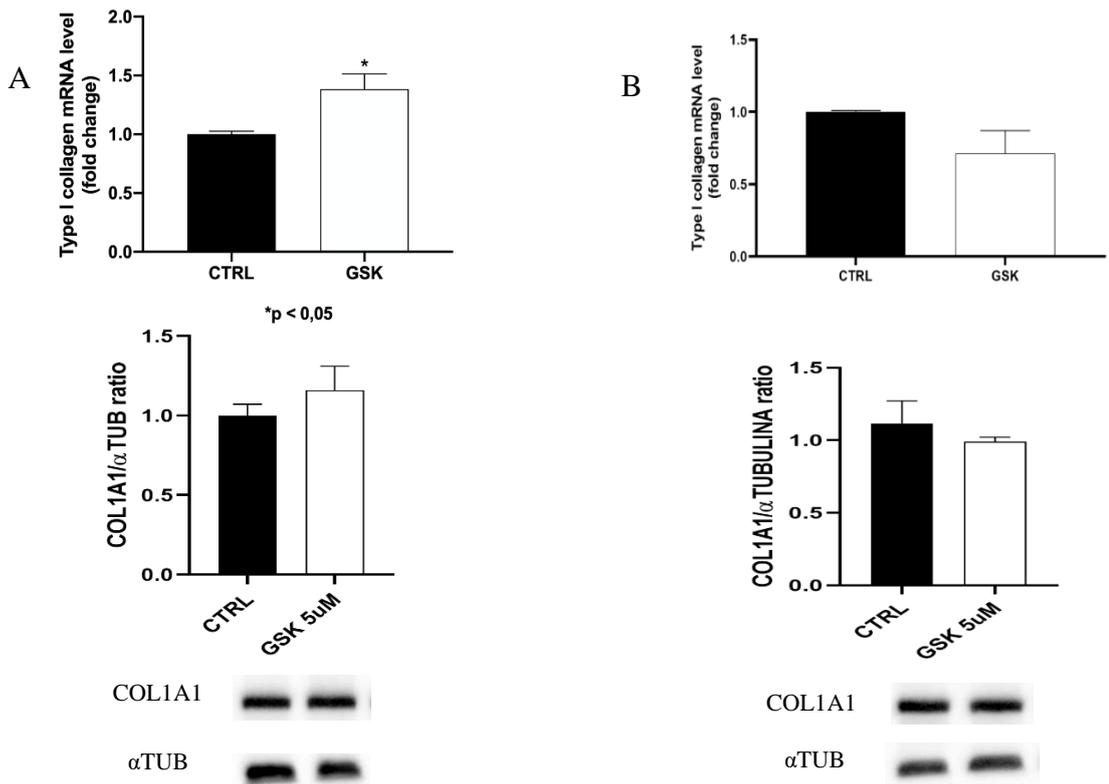


Figura 19 Espressione genica e proteica di COL I rispettivamente a 6 H e 8H dopo trattamento con GSK nelle cellule di NP(A) e AF (B)

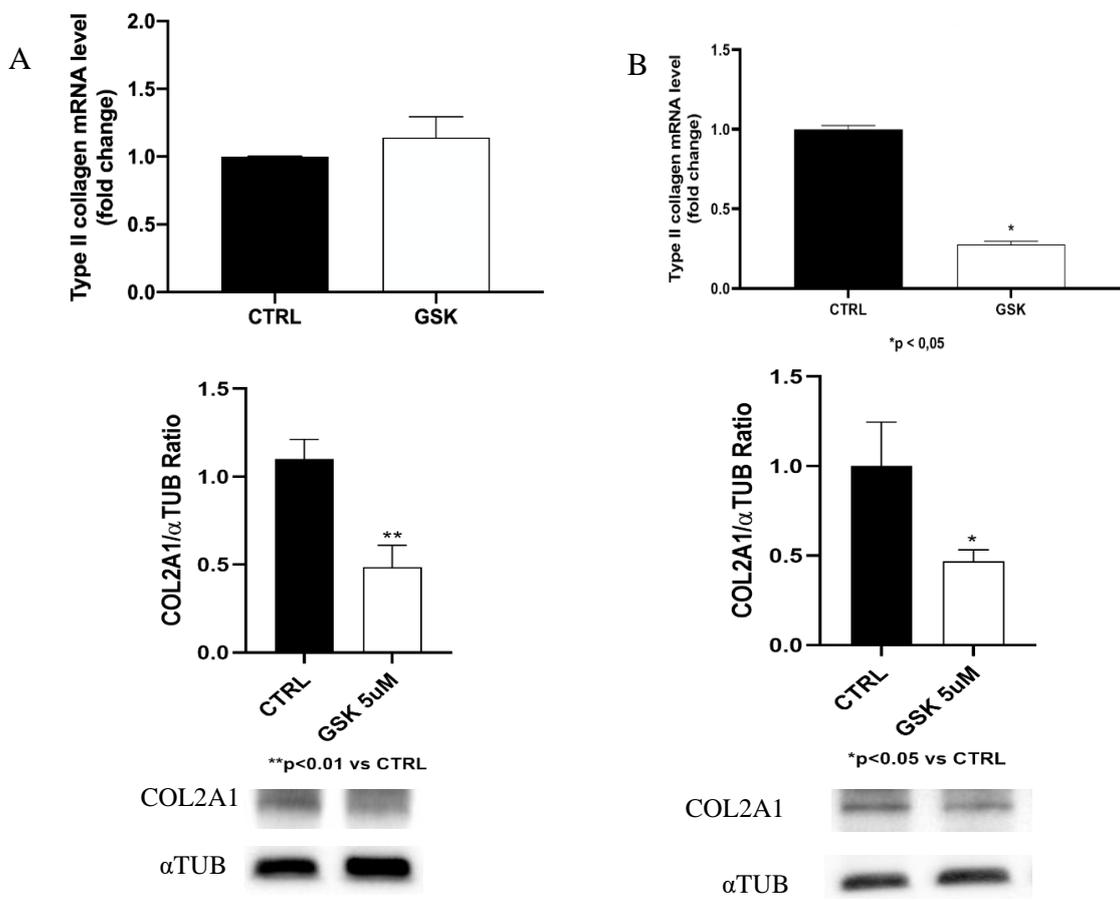


Figura 20 Espressione genica e proteica di COL II rispettivamente a 6 H e 8H dopo trattamento con GSK nelle cellule di NP(A) e AF (B)

Nella figura 20, è stato dimostrato come la stimolazione del recettore, tramite l'agonista GSK, porti ad una riduzione dei livelli di proteina di COL II sia nelle cellule di NP che in quelle di AF. Dato che il ciclo degenerativo prevede uno switch della produzione di collagene, tale modulazione induce a pensare che TRPC6 possa effettivamente partecipare al rimodellamento della matrice extracellulare. Inoltre, questa ipotesi è sostenuta anche dall'aumento significativo, nelle cellule di NP, dei livelli di mRNA del gene per il collagene di tipo I (Vergroesene PP et al. 2015); andando così a suggerire come TRPC6 possa essere coinvolto in tale processo.

Anche per quanto riguarda l'espressione di MMP-2, si ha una modulazione della sua espressione nelle cellule di NP. Come si può osservare infatti, vi è un aumento dell'espressione di questa proteina solamente nelle cellule del nucleo polposo, mentre non sembra ci sia una modulazione per quanto riguarda le cellule di AF. Recenti studi hanno dimostrato come una mancata regolazione nella produzione di questa proteina possa essere uno dei principali fattori di rischio nella patogenesi della degenerazione del disco intervertebrale. Infatti, data l'azione di degradazione di collagene ed aggreganti, MMP-2, partecipa attivamente al rimodellamento della matrice cellulare (Song et al., 2021). Tutte queste modulazioni, suggeriscono come TRPC6 possa giocare un ruolo chiave nei processi di modificazioni della matrice extracellulare. Proprio questi cambiamenti sono alla base della perdita della pressione idrostatica del disco e delle sue funzioni biomeccaniche, compromettendo così la sua struttura.

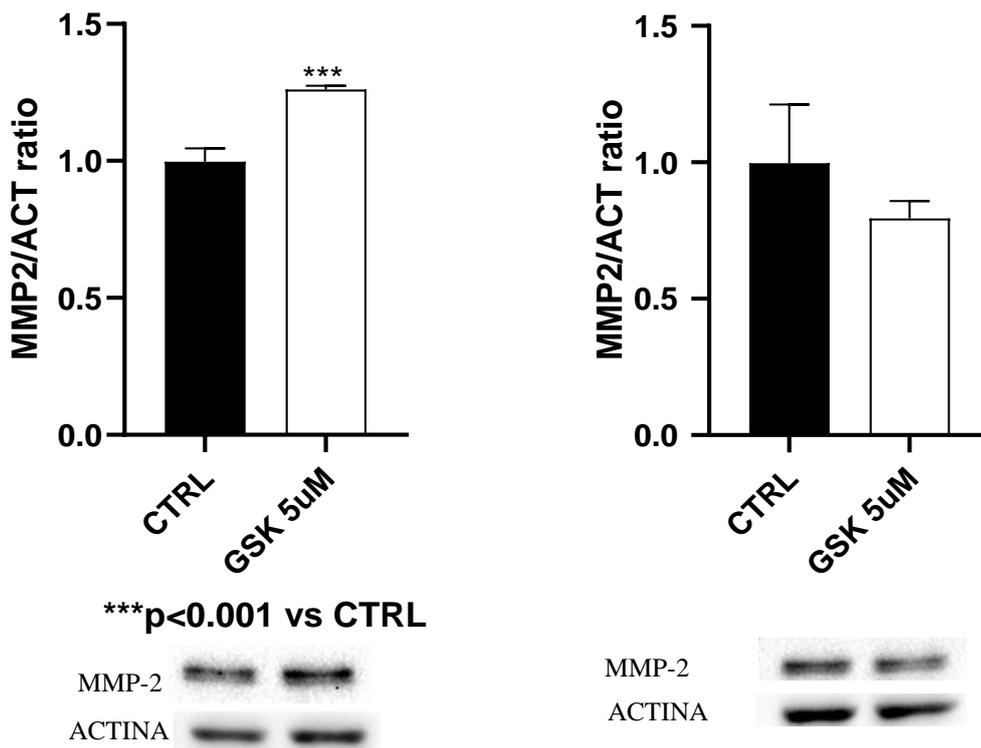


Figura 2 Analisi dell'espressione proteica di MMP-2 nelle cellule di NP (A) e di AF (B) a seguito del trattamento con l'agonista GSK per 8H

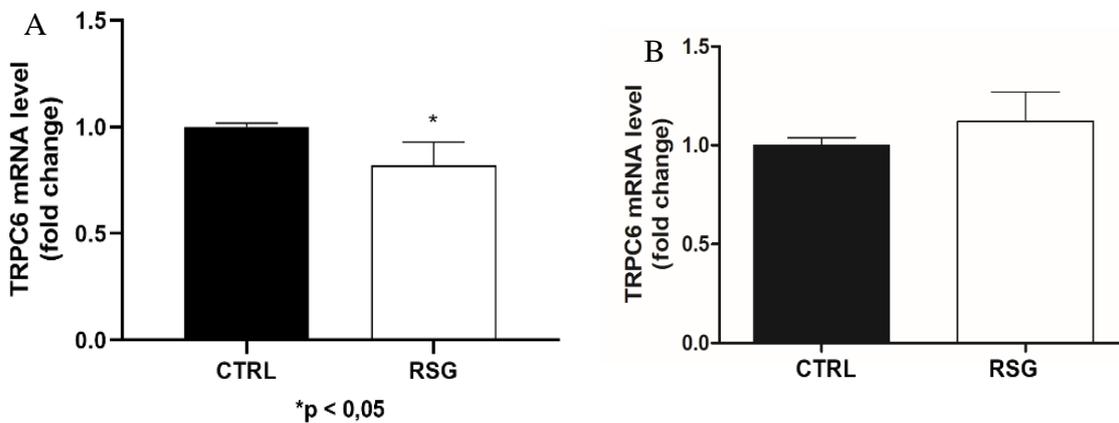


Figura 22 - Valutazione dei livelli di espressione di mRNA di TRPC6 in cellule di NP (A) e AF (B) dopo 6 h di trattamento con Rosiglitazone.

Al fine di verificare il coinvolgimento di questo recettore, sono stati eseguiti esperimenti utilizzando il Rosiglitazone (RSG), che agisce come inibitore della trascrizione di TRPC6 ed è anche utilizzato come farmaco per la cura del diabete di tipo II. Le cellule di NP e AF sono state quindi trattate con RSG 30 µM per 6 ore ed è stata analizzata anzitutto l'espressione genica di TRPC6 e, successivamente, quella dei geni del collagene di tipo I e di tipo II

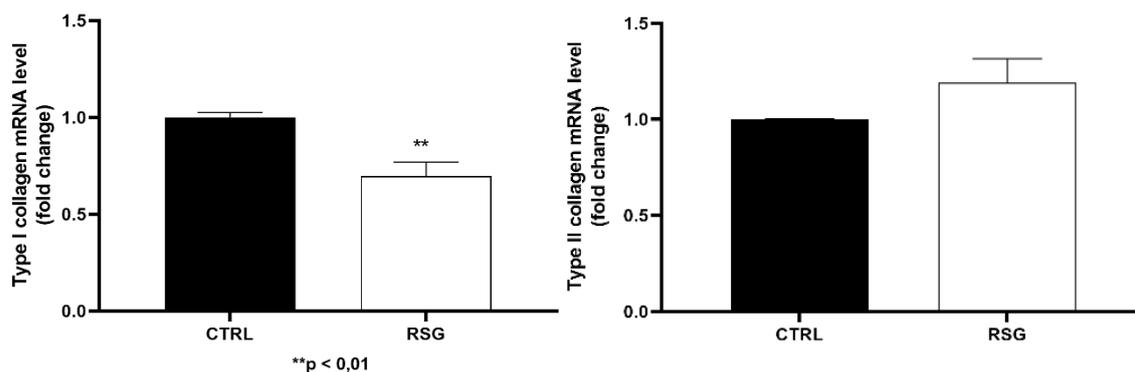


Figura 23 - Valutazione dei livelli di espressione di mRNA di Collagene di tipo I e II in cellule di NP dopo 6 h di trattamento con Rosiglitazone.

È interessante notare come, nelle cellule di NP, la ridotta espressione di TRPC6 corrisponda ad una significativa riduzione dell'espressione di collagene di tipo I (Figura 28). Questi risultati suggeriscono come un'alterata espressione di TRPC6 possa influenzare la composizione della matrice extracellulare.

Per quanto riguarda i livelli di espressione nelle cellule di AF, i risultati indicano che non sono modificati i livelli di mRNA di nessuno dei geni analizzati. Questo, suggerisce che TRPC6 potrebbe giocare un ruolo chiave nella riorganizzazione della matrice extracellulare soprattutto all'interno del NP.

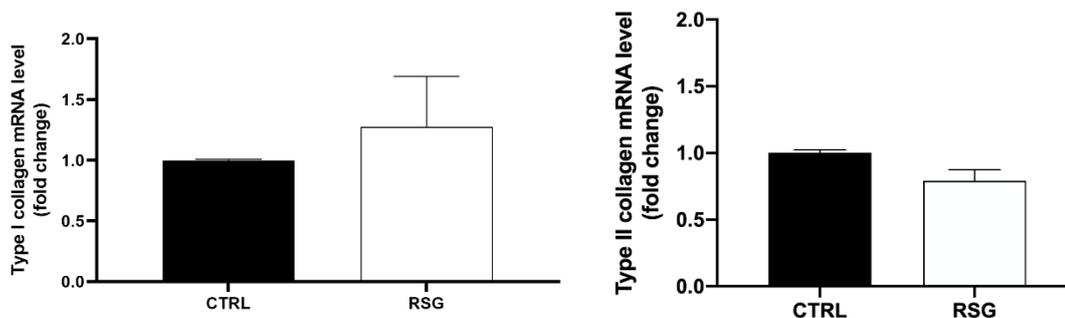


Figura 24 - Valutazione dei livelli di espressione di mRNA di Collagene di tipo I e II in cellule di AF dopo 6 h di trattamento con Rosiglitazone.

Dati gli effetti del RSG sull'espressione genica delle cellule di NP e di AF, si è voluto analizzare l'effetto di tale farmaco sulla vitalità cellulare di questi due tipi cellulari.

È interessante notare che la somministrazione di Rosiglitazone per 24 H ripristina completamente la vitalità cellulare compromessa dall'agonista (GSK) di TRPC6. Ciò,

indica come tale farmaco possa essere utilizzato nel contrastare gli effetti negativi di questo recettore sulla vitalità delle cellule del disco intervertebrale.

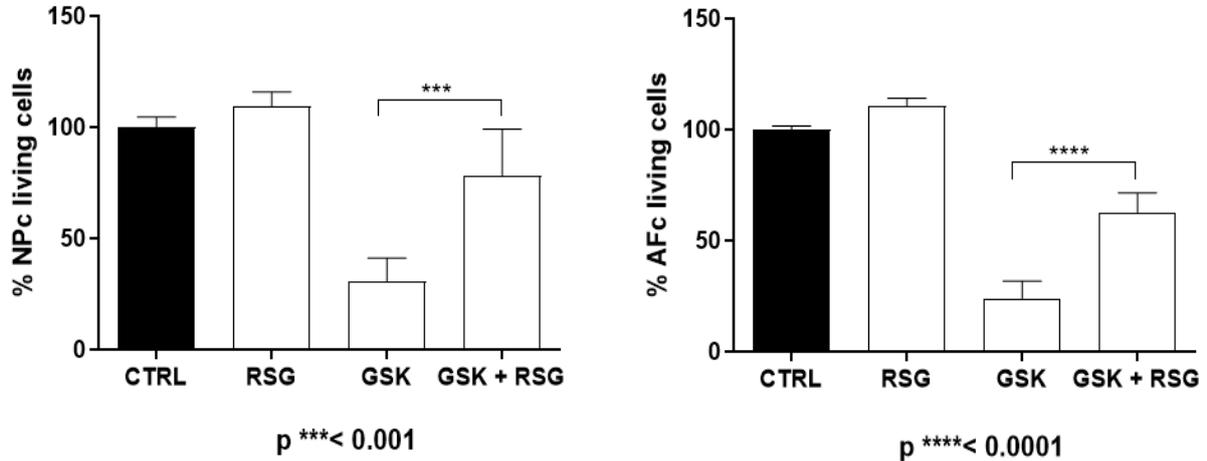


Figura 25 Vitalità cellulare delle cellule di NP e AF dopo trattamento a 24 H con GSK, RSG e in co-trattamento GSK+RSG

Lo stress ossidativo sembra uno dei principali fattori in grado di indurre e far progredire la discopatia degenerativa. Per questo, si è analizzata la risposta delle cellule di NP e AF verso uno stimolo pro-ossidante. In particolare è stato utilizzato il rotenone (ROT), molecola in grado di bloccare il complesso I della catena respiratoria degli elettroni. Per prima cosa, si è verificato se lo stress ossidativo potesse alterare l'espressione di TRPC6.

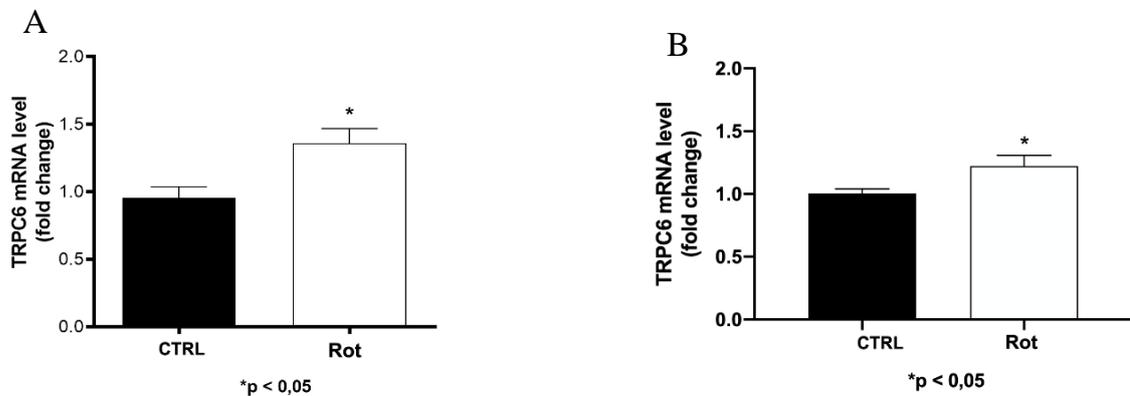


Figura 26 Analisi dell'espressione genica di TRPC6 dopo trattamento a 6 H con rotenone (ROT)

Come si può vedere dalla figura 26, sia nelle cellule di NP che di AF si ha un aumento significativo dei livelli trascrizionali di TRPC6. Questo, suggerisce che TRPC6 potrebbe essere coinvolto nei processi di stress ossidativo. Per valutare se queste cellule siano responsive a stimoli pro-ossidanti, sono stati valutati i livelli trascrizionali e proteici dell'enzima Catalasi e i livelli di mRNA di SOD1 e SOD2 dopo il trattamento col rotenone.

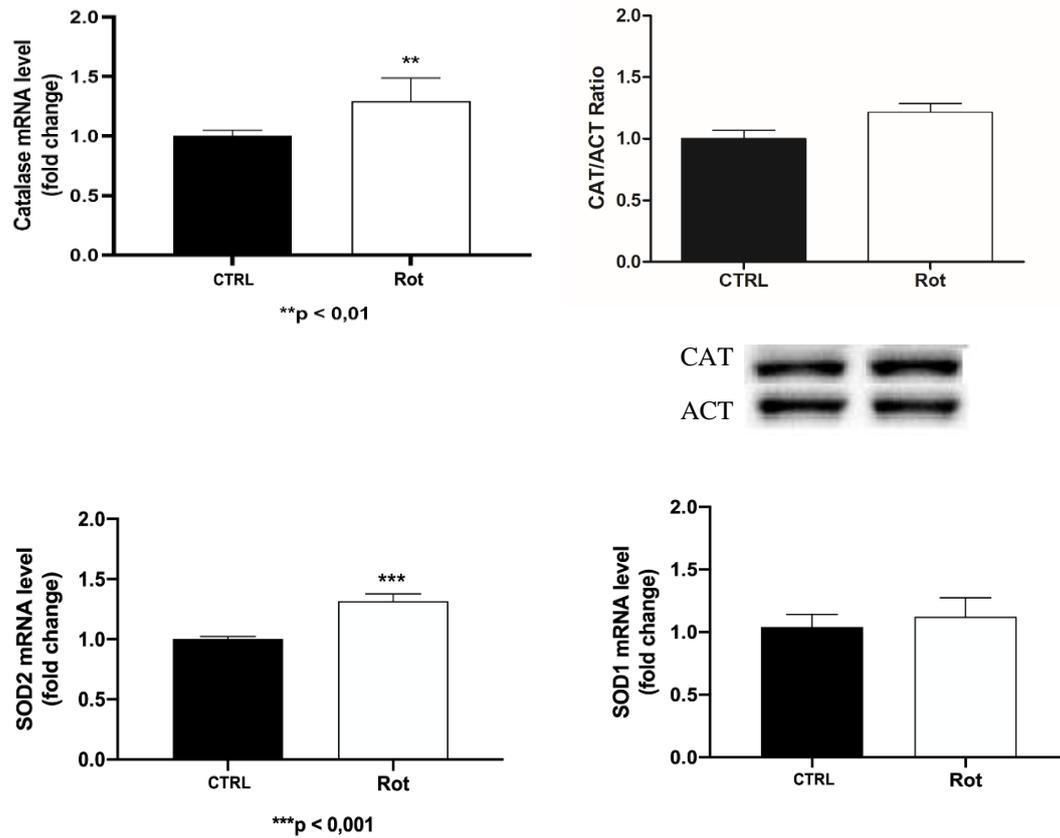


Figura 27 Analisi genica e proteica dei geni per la risposta antiossidante nelle cellule di NP, dopo trattamento con rotenone a 6 H per mRNA e 8 H per le proteine

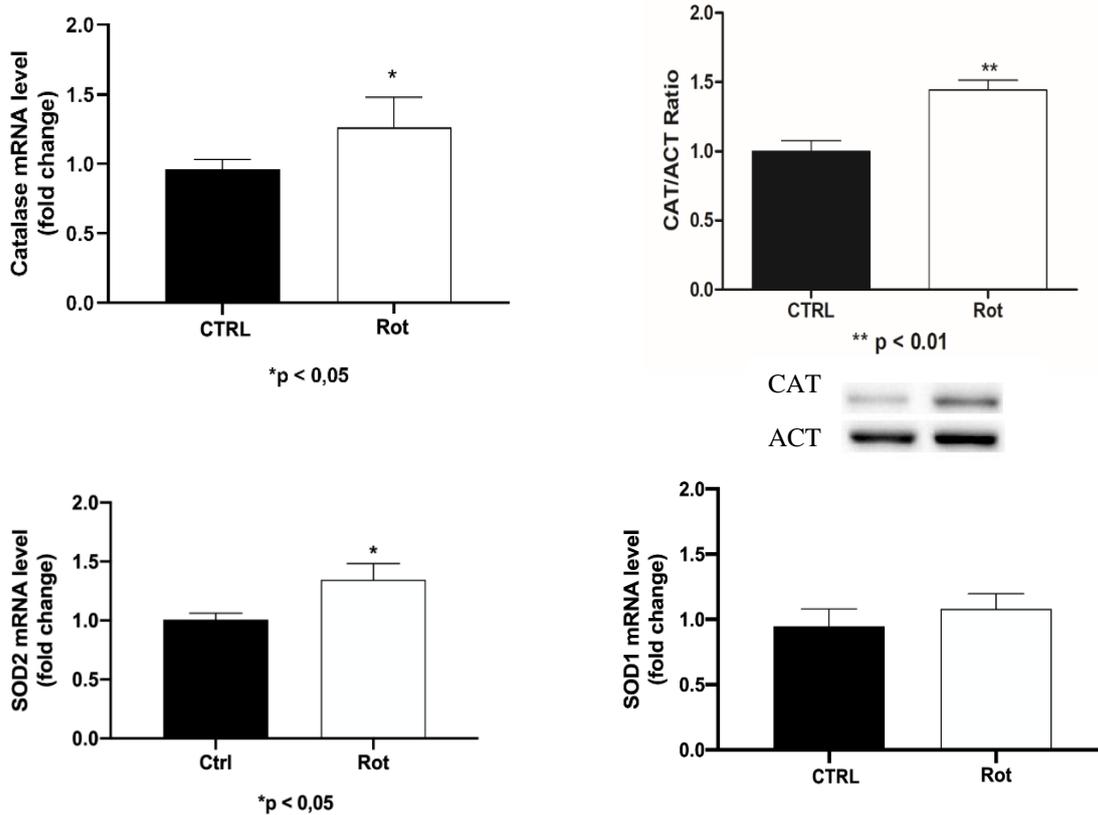


Figura 28 Analisi genica e proteica dei geni per la risposta antiossidante nelle cellule di AF, dopo trattamento con ROT a 6 H per mRNA e 8 H per le proteine

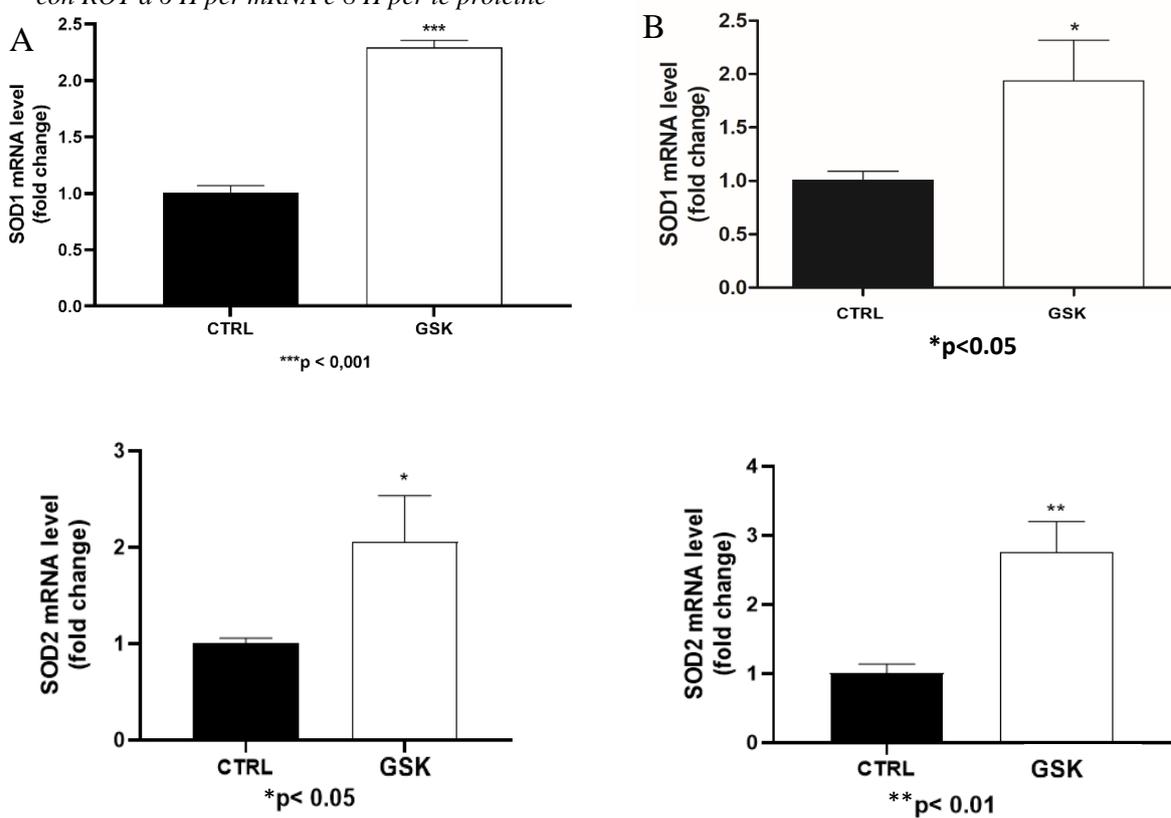


Figura 29 Analisi dell'espressione genica di SOD1 e SOD2 nelle cellule di NP (A) e AF (B) dopo trattamento a 6 H con ROT

La figura 27 illustra come, nelle cellule di NP, il trattamento con rotenone porta ad un

aumento dei livelli trascrizionali dei geni catalasi e SOD2; mentre non si ha un aumento significativo dei livelli proteici della catalasi né in quelli di mRNA della SOD1.

Nelle cellule di AF, il rotenone induce un aumento significativo sia dei livelli di mRNA che di proteina di catalasi e dei livelli di mRNA di SOD2. Per quanto riguarda il gene SOD1, non si ha un aumento significativo della sua espressione. Questi risultati indicano che le

cellule del disco intervertebrale sono in grado di rispondere a stimoli pro-ossidanti andando ad aumentare la trascrizione dei geni antiossidanti.

Per verificare un coinvolgimento effettivo di TRPC6 nello stress ossidativo, si è analizzata l'espressione di geni antiossidanti a seguito del trattamento con l'agonista GSK.

Come si può osservare dalla figura 29, l'attivazione di TRPC6 causa l'aumento della trascrizione dei geni anti-ossidanti SOD1 e SOD2 nelle cellule di AF e NP.

Questi risultati suggeriscono che TRPC6 potrebbe causare stress ossidativo tramite un importante influsso di Ca^{2+} , portando così alla trascrizione di geni come SOD1. Inoltre, l'aumento dei livelli trascrizionali di SOD2 suggerisce che l'importante ingresso di questo ione a livello intracellulare, tramite l'attivazione di TRPC6, potrebbe causare stress mitocondriale con produzione di superossido nei mitocondri.

Nelle condizioni di stress ossidativo indotto dal rotenone, è stata analizzata la vitalità delle cellule di NP e AF dopo 4 H e 24 H dal trattamento. Per valutare il ruolo di TRPC6 in queste condizioni, la vitalità è stata analizzata in presenza e in assenza di rosigitazione.

La figura 30 mostra come il rotenone causi una riduzione della vitalità di circa il 50% sia nelle cellule di NP che di AF, che non viene ripristinata inibendo TRPC6 con il rosigitazione. Il mancato ripristino della vitalità potrebbe essere dovuto al fatto che il rotenone può attivare diverse vie di segnalazione che quindi potrebbero portare a morte cellulare.

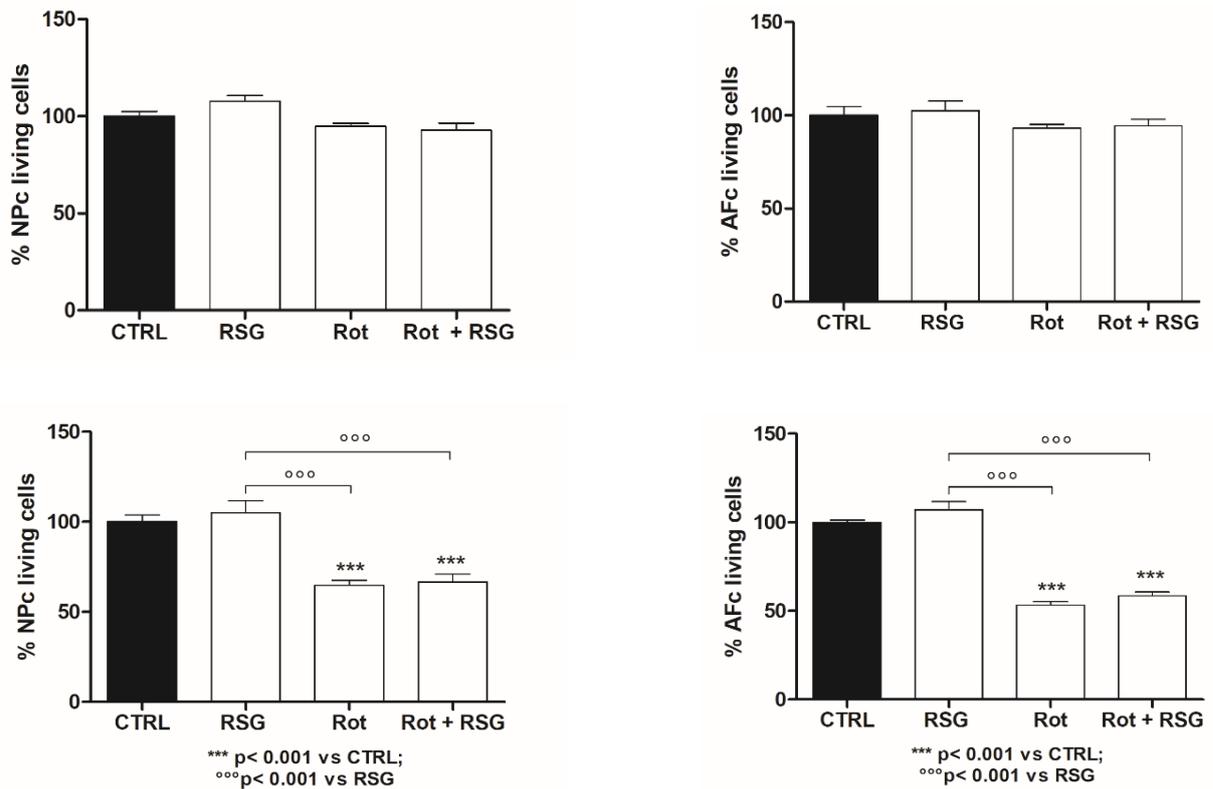


Figura 30 Analisi della vitalità cellulare delle cellule di NP e AF trattate con Rot e RSG a 4 H e 24 H

Pertanto, la sola inibizione di TRPC6 da parte del rosigitazone non sarebbe sufficiente a compensare la morte cellulare indotta dal rotenone.

Come detto in precedenza, il disco intervertebrale è quotidianamente sottoposto a variazioni di pressione osmotica. Per questo, si è voluto analizzare la risposta allo stress osmotico delle cellule di NP e AF. A questo scopo sono state utilizzate soluzioni a diverse osmolarità, in un intervallo da un'osmolarità minima di 100 mOSM (iposmotica), fino ad un'osmolarità di 500 mOSM (iperosmotica).

Innanzitutto, è stata analizzata l'espressione di TRPC6 dopo aver sottoposto le cellule di NP e AF a diverse condizioni di osmolarità.

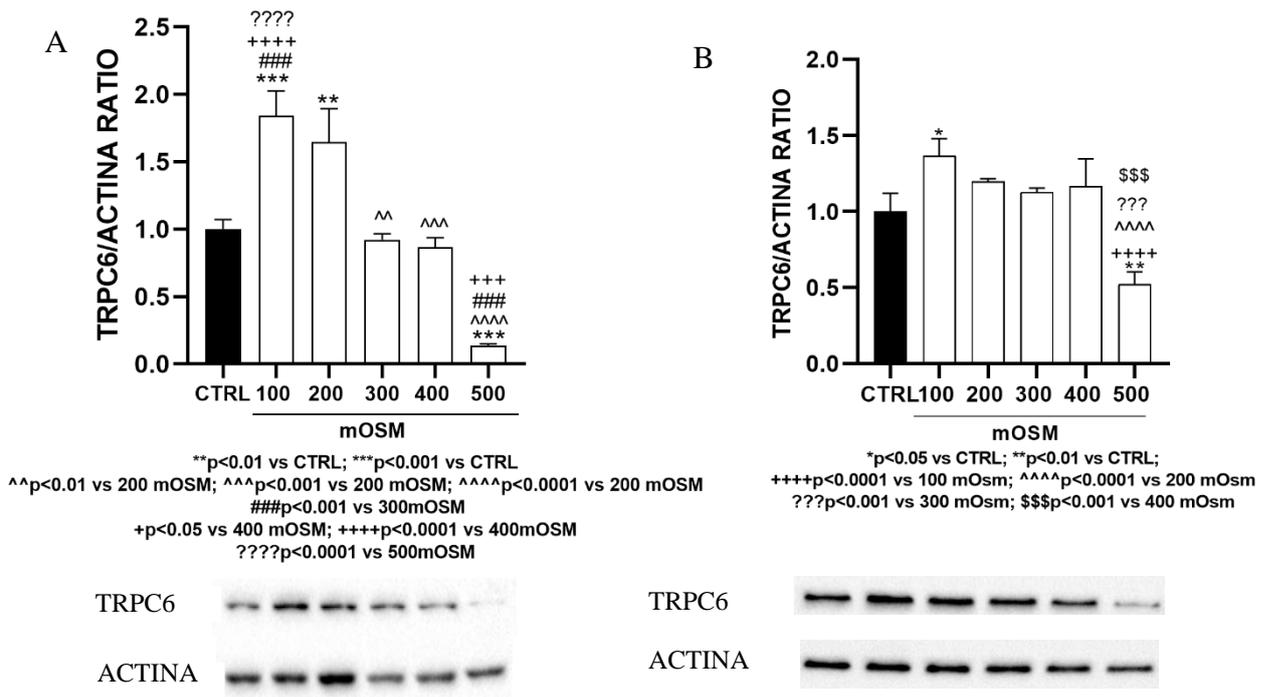
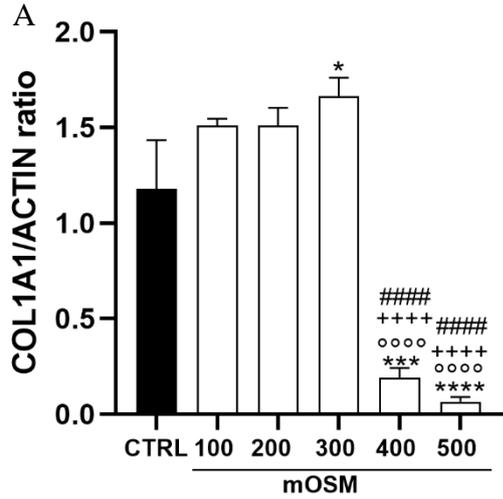


Figura 31 Analisi dell'espressione proteica di TRPC6 nelle cellule di NP (A) e AF (B), dopo trattamento con le soluzioni a diversa osmolarità a 16 H

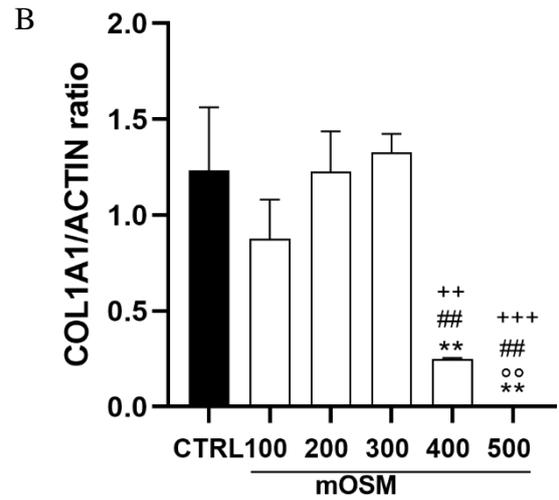
I dati ottenuti dimostrano che nelle cellule di NP, l'espressione di TRPC6 viene modulata dalle condizioni osmotiche dell'ambiente esterno. Infatti, in condizione di iposmolarità si ha un aumento dei livelli di proteina di circa l'80% rispetto al controllo; mentre in condizioni iperosmotiche si ha una notevole riduzione dell'espressione. Anche nelle cellule di AF, si ha un aumento dei livelli proteici di circa il 40%; mentre a 500 mOSM si ha una riduzione di circa il 50%.

Sono state prese in esame anche proteine di matrice extracellulare quali COL I, COL II e MMP-2.

Per quanto riguarda l'espressione proteica del Collagene di tipo I, si è osservata un'importante riduzione dei livelli di proteina nelle condizioni osmotiche di 400 mOSM e 500 mOSM sia nelle cellule di NP che di AF; mentre si ha un aumento significativo solamente nelle cellule di NP all'osmolarità di 300 mOSM.



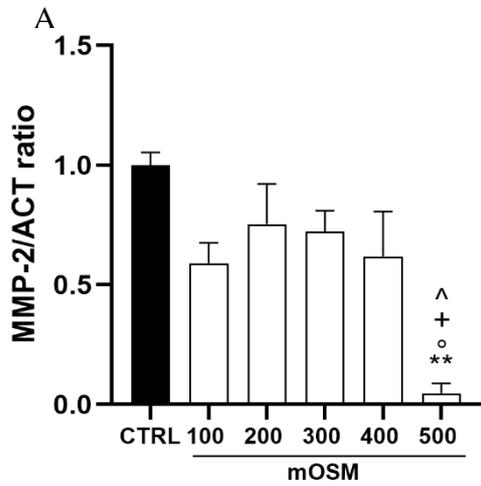
*p<0.05 vs CTRL; ***p<0.001 vs CTRL; ****P<0.0001 vs CTRL
 °°°p<0.001 vs 100 mOSM; °°°°p<0.0001 vs 100 mOSM
 ++++p<0.0001 vs 200 mOSM; #####p<0.0001 vs 300 mOSM



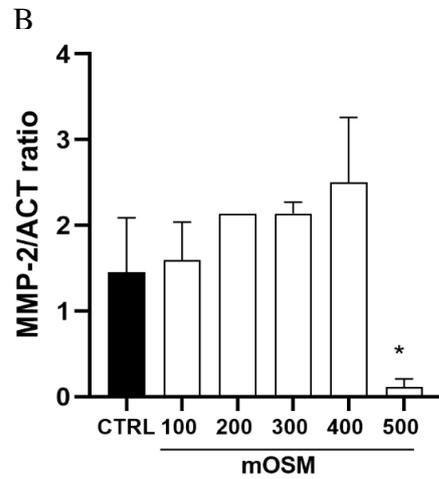
*p<0.05 vs CTRL; **p<0.01 vs CTRL
 °°p<0.01 vs 100 mOSM
 ##p<0.01 vs 200 mOSM
 ++p<0.01 vs 300 mOSM; +++p<0.001 vs 300 mOSM



Figura 32 Analisi dell'espressione proteica di COL1A1 nelle cellule di NP (A) e AF (B), dopo trattamento con le soluzioni a diversa osmolarità a 16 H



**p<0.01 vs CTRL
 °p<0.05 vs 200 mOSM
 +p<0.05 vs 300 mOSM
 ^p<0.05 vs 400 mOSM



*p<0.05 vs 400 mOSM

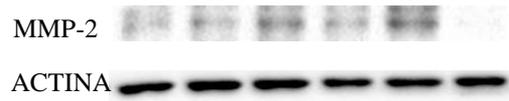
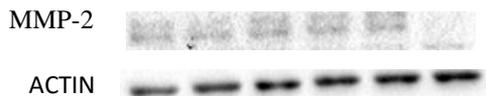


Figura 33 Analisi dell'espressione proteica di MMP-2 nelle cellule di NP (A) e AF (B), dopo trattamento con le soluzioni a diversa osmolarità a 16 H

Anche l'espressione di MMP-2 viene modulata dalla condizione di iperosmolarità. Infatti, come mostrato nella figura 32, trattando le cellule con una soluzione di osmolarità a 500 mOSM, si ha una notevole riduzione dei livelli di espressione della proteina MMP-2 in entrambi i tipi cellulari.

Questi dati suggeriscono che nella condizione di iper-osmolarità le cellule arrestino l'espressione di determinate proteine. Infatti, alcuni studi (Pritchard et al., 2002) suggeriscono come un aumento di carico sulla struttura del disco possa portare ad una riduzione significativa della produzione di proteine della matrice extracellulare come

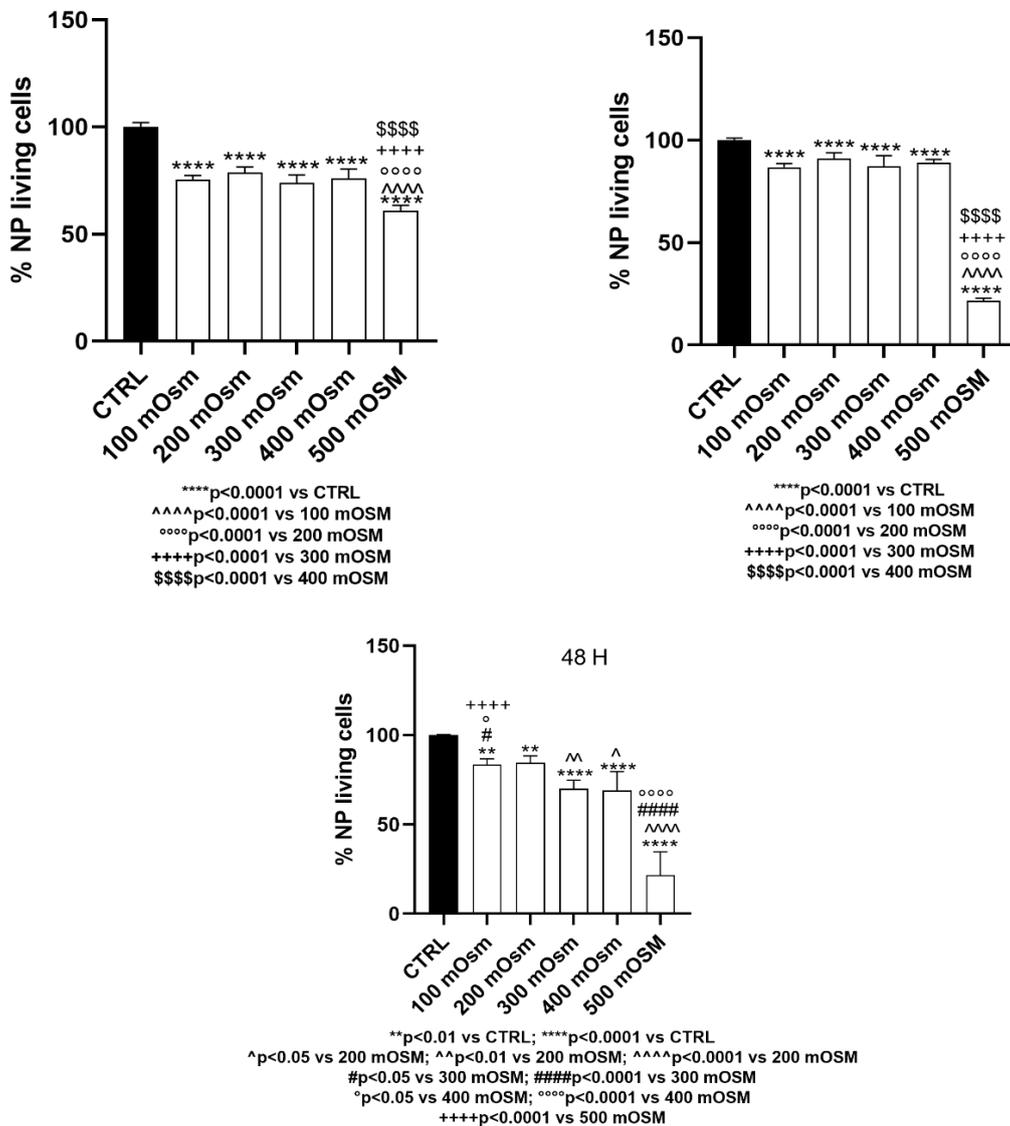


Figura 34 Analisi della vitalità cellulare delle cellule di NP a 8H, 24H e 48H dopo il trattamento con soluzioni a diversa osmolarità

proteoglicani e collagene. Inoltre, tale riduzione, potrebbe essere dovuta anche ad uno

stato di senescenza causato da questo tipo di stress che quindi potrebbe compromettere le funzionalità della cellula.

Data la modulazione dell'espressione di TRPC6 e dei costituenti della matrice extracellulare vista precedentemente, si è voluto analizzare la vitalità cellulare delle cellule di NP e AF a diversi tempi (8 H, 24 H e 48H) per comprendere maggiormente gli effetti dello stress osmotico su questi tipi cellulari.

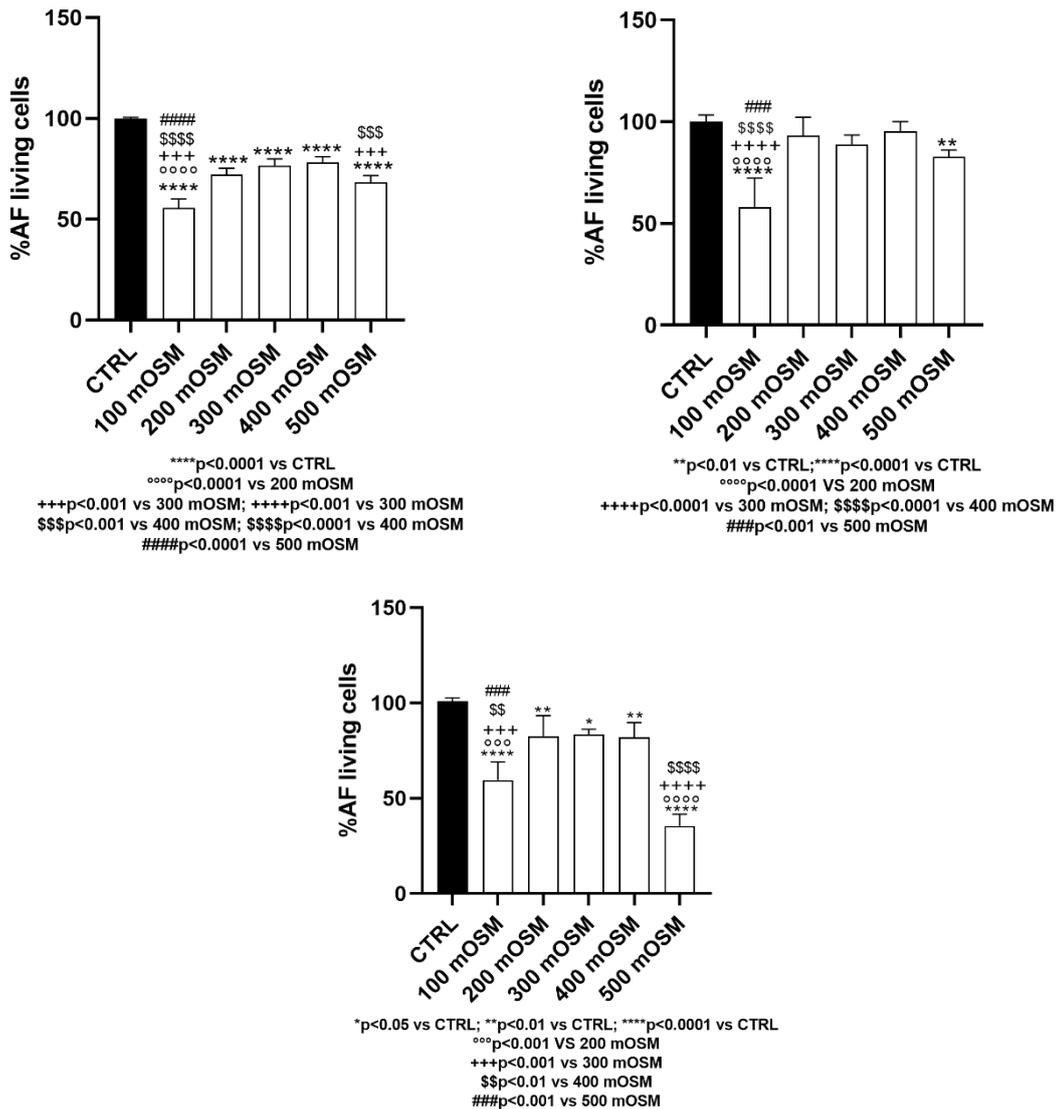


Figura 35 Analisi della vitalità cellulare delle cellule di AF a 8H, 24H e 48H dopo il trattamento con soluzioni a diversa osmolarità

Nelle cellule di NP, si ha una notevole riduzione significativa della vitalità nella condizione di iperosmolarità a 500mOSM, che aumenta maggiormente con l'aumentare del tempo di esposizione. Questo indica che le cellule del Nucleo Polposso presentano una maggiore sensibilità ad una condizione di stress iperosmotico rispetto a quella iposmotica.

Per quanto riguarda le cellule di AF invece, è interessante notare come si abbia una maggiore riduzione della vitalità nella condizione di iposmolarità a 100 mOSM già al tempo più breve che però resta costante anche al tempo più prolungato. Questo suggerisce che le cellule di AF siano molto più sensibili allo stress iposmotico rispetto alle cellule di NP. Invece, in presenza di stress iperosmotico, si ha una riduzione della vitalità che aumenta in modo direttamente proporzionale al tempo di trattamento.

Questi risultati indicano che lo stress osmotico potrebbe giocare un ruolo chiave per quanto riguarda la degenerazione del disco intervertebrale. Infatti, alterazioni di osmolarità causano una riduzione della vitalità cellulare delle cellule di NP e AF. Inoltre, questo fenomeno potrebbe causare la riduzione dell'espressione di proteine importanti per il mantenimento delle funzioni biomeccaniche dell'intera struttura portando al suo collasso. In queste condizioni di stress osmotico, è doveroso investigare su quale sia l'effettivo ruolo di TRPC6. Ciò, può essere esaminato trattando le cellule con l'agonista GSK così da valutare se vi siano cambiamenti nelle modulazioni viste fin ora. Inoltre, per comprendere a pieno la partecipazione di questo canale nei pathway attivati dallo stress osmotico, è utile anche osservare la risposta cellulare somministrando l'inibitore rosigitazione alle cellule di NP e AF.

Conclusioni

I dati ottenuti in questo lavoro suggeriscono come il canale TRPC6 possa portare a delle modificazioni della matrice extracellulare, compromettendo così le funzionalità biomeccaniche del disco intervertebrale, fattore importante nella patogenesi della discopatia degenerativa.

Nei dischi dei pazienti affetti da degenerazione discale si è osservato un aumento indicativo dei livelli di TRPC6 soprattutto negli stadi degenerativi più gravi. Inoltre, anche per l'espressione di MMP-2 si ha un aumento che segue quasi lo stesso andamento dei livelli di TRPC6. Tali risultati propongono la presenza di una correlazione tra questo canale e le modificazioni della matrice extracellulare che possono presentarsi durante lo sviluppo della DDI.

Al fine di studiare più nel dettaglio il ruolo di TRPC6 nella DDI, sono stati condotti esperimenti su colture primarie di NP e AF. È stato osservato come l'agonista di TRPC6 (GSK) possa indurre sia l'aumento della trascrizione che dei livelli proteici del canale stesso. Un ulteriore effetto riguarda il cambiamento nell'espressione di costituenti fondamentali della matrice extracellulare come Collagene di tipo I e II e MMP-2. Infatti, dai risultati ottenuti, si evince come l'attivazione di TRPC6 nelle cellule di NP causi un aumento di trascrizione di Collagene di tipo I e dei livelli proteici di MMP2 ed una riduzione dell'espressione di Collagene di tipo II. Questo indica che TRPC6 potrebbe innescare lo *switch* delle componenti della matrice extracellulare, fenomeno che causerebbe un ispessimento della struttura e la perdita delle sue proprietà biomeccaniche. In aggiunta, come riportato in letteratura, tale processo tende a verificarsi durante quello che viene definito ciclo degenerativo. Inoltre, anche nelle cellule di AF vi è una riduzione nell'espressione di COL II, suggerendo quindi una correlazione tra TRPC6 e le modificazioni dell'ECM in entrambi i distretti del disco intervertebrale.

A supporto di queste ipotesi, le cellule sono state sottoposte ad un inibitore della trascrizione di TRPC6, il farmaco Rosiglitazone. In particolare, è stato dimostrato che nelle cellule di NP si ha una riduzione dei livelli di trascrizione sia di TRPC6 che di Collagene di tipo I. Ciò, quindi, sembrerebbe dimostrare una correlazione tra l'espressione di TRPC6 e la modulazione della composizione della matrice extracellulare.

Inoltre, è stato dimostrato che l'attivazione di TRPC6 mediante GSK, induce una riduzione notevole della vitalità dopo 24 H dal trattamento in entrambi i tipi cellulari. Questo dato è in accordo con il ridotto numero di cellule presenti nel tessuto degenerato prelevato dai campioni di dischi intervertebrali.

La riduzione della vitalità causata dall'attività del recettore viene però ripristinata dal Rosiglitazone. Questo farmaco, utilizzato solitamente per il diabete, potrebbe quindi dimostrarsi efficace nel bloccare l'azione del canale TRPC6.

I trattamenti con il GSK hanno dimostrato di stimolare la produzione di SOD1 e SOD2 in entrambi i tipi cellulari, indicando un possibile coinvolgimento dello stress ossidativo e della risposta antiossidante. Come atteso, il trattamento delle cellule con Rotenone, uno stimolo pro-ossidante, ha incrementato significativamente i livelli di TRPC6, di SOD2 e di catalasi, sia nelle cellule del NP sia in quelle dell'AF. Tale risultato sottolinea come possa esserci un collegamento tra l'attività di TRPC6 e quella dei geni ARE e, in particolare, l'aumento di SOD2 suggerisce un possibile stress mitocondriale che si esplica con un aumento della produzione di ROS.

L'attivazione di TRPC6 può portare ad un aumento delle concentrazioni di Ca^{2+} intracellulare che potrebbe causare stress mitocondriale. Ciò porterebbe alla produzione di ROS che potrebbe spiegare la riduzione della vitalità cellulare.

Vista l'importanza dello stress osmotico a cui è sottoposto il disco intervertebrale, è stato osservato come variazioni di osmolarità causino nelle cellule un'alterata espressione di TRPC6. Infatti, in condizioni di iposmolarità, si ha un aumento dell'espressione del canale in entrambi i tipi cellulari. Questo potrebbe essere dovuto al rigonfiamento delle cellule che, causando uno *stretch* di membrana, porta all'attivazione di TRPC6 e quindi ad un aumento della sua espressione. Inoltre, si può osservare come un aumento dell'osmolarità, situazione che tende a instaurarsi negli stati più gravi di degenerazione, porti ad una diminuzione dell'espressione di TRPC6 e di proteine della matrice come COL-I e MMP-2. Come già noto in letteratura, la ridotta espressione di TRPC6 è associata alla senescenza cellulare, che quindi comprometterebbe non solo la vitalità delle cellule di NP e AF, ma anche la corretta capacità di espressione di determinate proteine. Ciò, spiegherebbe infatti, la riduzione dell'espressione sia di COL-I che di MMP-2.

I dati raccolti in questo lavoro suggeriscono quindi come l'attività di TRPC6 sia fondamentale nel rimodellamento della matrice extracellulare, fenomeno importante per

il mantenimento della struttura negli stati più precoci di degenerazione. Infatti, si suppone che in primo luogo il disco vada incontro ad una condizione di iposmolarità, la quale comporta un aumento dell'attività e dell'espressione di TRPC6. Questo indurrebbe stress ossidativo oltre ad un continuo cambiamento delle componenti della matrice che causerebbero la perdita delle funzioni biomeccaniche del disco. La presenza di tali condizioni, porta al collasso della struttura con un progressivo aumento dell'osmolarità sottoponendo così le cellule ad un ambiente iperosmotico. In questo sistema, la riduzione dell'espressione di TRPC6 causerebbe l'entrata delle cellule in uno stato di senescenza con conseguente perdita di espressione di proteine per il mantenimento della matrice che condurrebbe infine alla degradazione totale del disco, situazione presente nei gradi più elevati di degenerazione.

Ulteriori studi sono necessari per approfondire la comprensione dei meccanismi alla base di questa malattia e degli specifici pathway associati a questo recettore al fine di poter individuare possibili nuovi target terapeutici per un trattamento più efficace.

Bibliografia

Adams MA, Roughley PJ. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? *Spine (Phila Pa 1976)*. 2006 Aug 15;31(18):2151-61. doi: 10.1097/01.brs.0000231761.73859.2c. PMID: 16915105.

Antoniou J, Steffen T, Nelson F, Winterbottom N, Hollander AP, Poole RA, Aebi M, Alini M. The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration. *J Clin Invest*. 1996 Aug 15;98(4):996-1003. doi: 10.1172/JCI118884. PMID: 8770872; PMCID: PMC507515.

Aripaka S.S., Bech-Azeddine R., Jørgensen L.M., Mikkelsen J.D. Transient receptor potential (TRP) channels mRNA transcripts in the lumbar intervertebral discs: biomarkers for inflammation, pain, disability, and clinical outcome. *Mol Cell Biochem* 2023 Jan;478(1):121-130. doi: 10.1007/s11010-022-04501-5.

Dimozi A, Mavrogonatou E, Sklirou A, Kletsas D. Oxidative stress inhibits the proliferation, induces premature senescence and promotes a catabolic phenotype in human nucleus pulposus intervertebral disc cells. *Eur Cell Mater*. 2015 Sep 4; 30:89-102; discussion 103. doi: 10.22203/ecm.v030a07. PMID: 26337541.

Dou Y, Sun X, Ma X, Zhao X, Yang Q. Intervertebral Disk Degeneration: The Microenvironment and Tissue Engineering Strategies. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021 Jul 20; 9:592118. doi: 10.3389/fbioe.2021.592118. PMID: 34354983; PMCID: PMC8329559.

Franco-Obregón A, Cambria E, Greutert H, Wernas T, Hitzl W, Egli M, Sekiguchi M, Boos N, Hausmann O, Ferguson SJ, Kobayashi H, Wuertz-Kozak K. TRPC6 in simulated microgravity of intervertebral disc cells. *Eur Spine J*. 2018 Oct;27(10):2621-2630. doi: 10.1007/s00586-018-5688-8. Epub 2018 Jul 2. PMID: 29968164.

Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*. (2011); 15(6):1583-606. doi: 10.1089/ars.2011.3999.

Cao G, Yang S, Cao J, Tan Z, Wu L, Dong F, Ding W, Zhang F. The Role of Oxidative Stress in Intervertebral Disc Degeneration. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2022, Article ID 2166817, 16 pages

<https://doi.org/10.1155/2022/2166817>

Huang YC, Urban JP, Luk KD. Intervertebral disc regeneration: do nutrients lead the way? *Nat Rev Rheumatol.* 2014 Sep;10(9):561-6. doi: 10.1038/nrrheum.2014.91. Epub 2014 Jun 10. PMID: 24914695.

Jiang L, Cao L, Yin X, Yasen M, Yishake M, Dong J, Li X. Activation of autophagy via Ca²⁺-dependent AMPK/mTOR pathway in rat notochordal cells is a cellular adaptation under hyperosmotic stress. *Cell Cycle* 14:6, 867--879; March 15, 2015; 2015 Taylor & Francis Group, LLC <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1004946>

Kos N, Gradisnik L, Velnar T. A Brief Review of the Degenerative Intervertebral Disc Disease. *Med Arch.* 2019 Dec;73(6):421-424. doi: 10.5455/medarh.2019.73.421-424. PMID: 32082013; PMCID: PMC7007629.

Krupkova O, Zvick J, Wuertz-Kozak K. The role of transient receptor potential channels in joint diseases. *Eur Cell Mater.* 2017 Oct 10;34:180-201. doi: 10.22203/eCM.v034a12. PMID: 28994450.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000) Osmosis, water channels, and the regulation of cell volume. In: *Molecular Cell Biology*, 4th edition, WH Freeman and Company, New York, USA.

Ma K, Chen S, Li Z, Deng X, Huang D, Xiong L, Shao Z. Mechanisms of endogenous repair failure during intervertebral disc degeneration. *Osteoarthritis Cartilage.* 2019 Jan;27(1):41-48. doi: 10.1016/j.joca.2018.08.021. Epub 2018 Sep 19. PMID: 30243946.

Oh YS, Jun HS. Effects of Glucagon-Like Peptide-1 on Oxidative Stress and Nrf2 Signaling. *Int J Mol Sci.* (2017); 19(1):26. doi: 10.3390/ijms19010026.

Petit A, Roquelaure Y. Low back pain, intervertebral disc and occupational diseases. *Int J Occup Saf Ergon.* 2015;21(1):15-9. doi: 10.1080/10803548.2015.1017940. PMID: 26327258.

Pfirrmann CW, Metzdorf A, Zanetti M, Hodler J, Boos N. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001 Sep 1;26(17):1873-8. doi: 10.1097/00007632-200109010-00011. PMID: 11568697.

Pritchard S., Erickson G.R., Guilak F. Hyperosmotically Induced Volume Change and Calcium Signaling in Intervertebral Disk Cells: The Role of the Actin Cytoskeleton. *Biophysical Journal* Volume 83 November 2002 2502–2510 doi: 10.1016/S0006-3495(02)75261-2

Raj PP. Intervertebral disc: anatomy-physiology-pathophysiology-treatment. *Pain Pract.* 2008 Jan-Feb;8(1):18-44. doi: 10.1111/j.1533-2500.2007.00171.x. PMID: 18211591.

Rim DC. Quantitative Pfirrmann Disc Degeneration Grading System to Overcome the Limitation of Pfirrmann Disc Degeneration Grade. *Korean J Spine.* 2016 Mar;13(1):1-8. doi: 10.14245/kjs.2016.13.1.1. Epub 2016 Mar 31. PMID: 27123023; PMCID: PMC4844654.

Risbud, M., Shapiro, I. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content. *Nat Rev Rheumatol* 10, 44-56 (2014). <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2013.160>

Sadowska A, Kameda T, Krupkova O, Wuertz-Kozak K. Osmosensing, osmosignalling and inflammation: how intervertebral disc cells respond to altered osmolarity. *Eur Cell Mater.* 2018 Nov 19;36:231-250. doi: 10.22203/eCM.v036a17. PMID: 30452080.

Sadowska A, Touli E, Hitzl W, Greutert H, Ferguson SJ, Wuertz-Kozak K, Hausmann ON. Inflammaging in cervical and lumbar degenerated intervertebral discs: analysis of proinflammatory cytokine and TRP channel expression. *Eur Spine J.* 2018 Mar;27(3):564-577. doi: 10.1007/s00586-017-5360-8. Epub 2017 Dec 4. PMID: 29204735.

Sadowska, A., Hitzl, W., Karol, A. *et al.* Differential regulation of TRP channel gene and protein expression by intervertebral disc degeneration and back pain. *Sci Rep* 9, 18889 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55212-9>

Samanta A., Lufkin T., Kraus P. Intervertebral disc degeneration-Current therapeutic options and challenges. *Front Public Health.* 2023 Jul 6;11:1156749. doi: 10.3389/fpubh.2023.1156749.

Scibior D, Czczot H. Katalaza--budowa, Waciwoci, Funkcje. Catalase: structure, properties, functions. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* (2006); 60:170-80

Song Q., Zhang F., Wang K., Chen Z., Li Q., Liu Z., Shen H. MiR-874-3p plays a protective role in intervertebral disc degeneration by suppressing MMP2 and MMP3. *European Journal of Pharmacology* journal 895 (2021) 173891 <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.173891>

Tang Z, Hu B, Zang F, Wang J, Zhang X, Chen H. Nrf2 drives oxidative stress-induced autophagy in nucleus pulposus cells via a Keap1/Nrf2/p62 feedback loop to protect intervertebral disc from degeneration. *Cell Death Dis.* 2019 Jul 1;10(7):510. doi: 10.1038/s41419-019-1701-3. PMID: 31263165; PMCID: PMC6602960.

Vergroesen PP, Kingma I, Emanuel KS, Hoogendoorn RJ, Welting TJ, van Royen BJ, van Dieën JH, Smit TH. Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration: a vicious circle. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015 Jul;23(7):1057-70. doi: 10.1016/j.joca.2015.03.028. Epub 2015 Mar 27. PMID: 25827971.

Yidian Wang Y., Huiguang Cheng H., Wang T., Zhang K., Zhang Y., Kang X. Oxidative stress in intervertebral disc degeneration: Molecular mechanisms, pathogenesis and treatment. *Cell Prolif.* 2023 Sep; 56(9): e13448. Published online 2023 Mar 13. doi: 10.1111/cpr.13448

Zhang GZ, Deng YJ, Xie QQ, Ren EH, Ma ZJ, He XG, Gao YC, Kang XW. Sirtuins and intervertebral disc degeneration: Roles in inflammation, oxidative stress, and mitochondrial function. *Clin Chim Acta.* 2020 Sep;508:33-42. doi: 10.1016/j.cca.2020.04.016. Epub 2020 Apr 26. PMID: 32348785.

Zhang GZ, Liu MQ, Chen HW, Wu ZL, Gao YC, Ma ZJ, He XG, Kang XW. NF-KB signalling pathways in nucleus pulposus cell function and intervertebral disc degeneration. *Cell Prolif.* 2021 Jul;54(7):e13057. doi: 10.1111/cpr.13057. Epub 2021 May 24. PMID: 34028920; PMCID: PMC8249791.

Zhang H, Davies KJA, Forman HJ. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radic Biol Med.* 2015 Nov;88(Pt B):314-336. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.036. Epub 2015 Jun 9. PMID: 26066302; PMCID: PMC4628850.

Zhang T, Li Z, Dong J, Jiang L. The circadian rhythm in intervertebral disc degeneration: an autophagy connection. *Experimental & Molecular Medicine* (2020) 52:31–40 <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0372-6>

Zhu L, Yu C, Zhang X, Yu Z, Zhan F, Yu X, Wang S, He F, Han Y, Zhao H. The treatment of intervertebral disc degeneration using Traditional Chinese Medicine. *J Ethnopharmacol.* 2020 Dec 5;263:113117. doi: 10.1016/j.jep.2020.113117. Epub 2020 Jul 29. PMID: 32738389.