

## I nutraceutici per il benessere articolare

### Impatto socio-sanitario dell'OA

L'osteoartrosi costituisce un problema di sanità pubblica in drammatica espansione in tutte le società caratterizzate da progressivo invecchiamento della popolazione. I tassi di prevalenza registrati nei paesi occidentali sono sostanzialmente uniformi, in un range compreso fra il 15% ed il 20% della popolazione totale, con numeri che iniziano a diventare significativi dopo i 45 anni e con le donne maggiormente colpite rispetto agli uomini<sup>1</sup>. I valori aumentano sensibilmente con l'aumentare dell'età<sup>2</sup>.

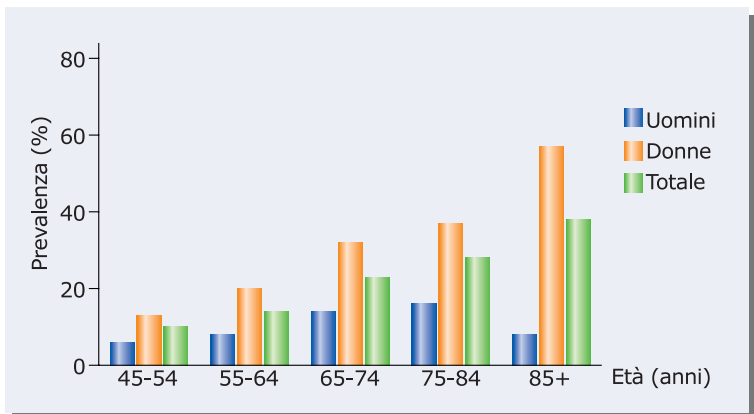
**L'osteoartrosi è una malattia ad elevata prevalenza nella popolazione generale, con impatto crescente a partire dalla quinta decade.**

In uno studio italiano condotto su una popolazione anziana, il 32.9% dei soggetti presentava OA a carico di almeno un distretto<sup>3</sup>. Le articolazioni più colpite risultarono il ginocchio (29.8%), seguita dalla mano (14.9%) e dall'anca (7.7%). Inoltre, il 28.2% dei soggetti presentava localizzazioni doppie o triple.

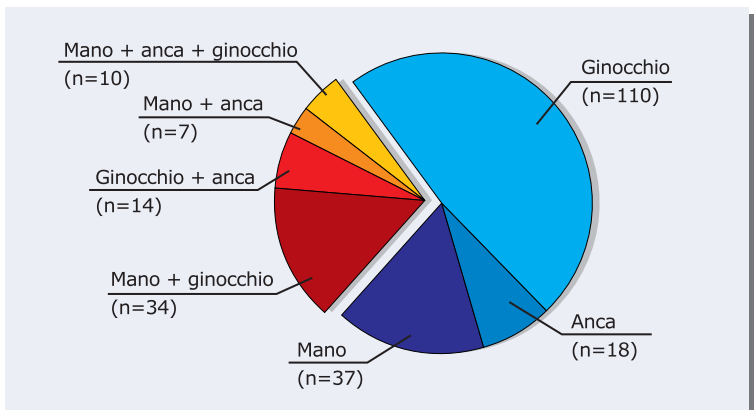
### I fattori di rischio

L'osteoartrosi è una malattia multifattoriale, cui concorrono cause genetiche, ambientali e comportamentali. Alcuni di questi fattori non sono modificabili, altri sono parzialmente o totalmente modificabili. Fra i fattori di rischio non modificabili un ruolo determinante è giocato dall'età e dal genere, con il

**Figura 1.** Prevalenza di osteoartrosi stratificata per età e sesso. (Dati da March 2004<sup>2</sup>).




**Figura 2.** Frequenza delle localizzazioni dell'OA. (Dati da Mannoni et al 2003<sup>3</sup>).



Zucchi S. Nutraceuticals for articular wellness. *Trends Med* 2013; 13(3):61-70.

©2013 Pharma Project Group srl.  
ISSN: 1594-2848

 **Sandro Zucchi**  
Specialista in Ortopedia e Traumatologia  
Direttore dell'AREA RIABILITAZIONE del C.O.B.  
di Viterbo, Montefiascone e Ronciglione  
e degli Ospedali di Acquapendente, Civita Castellana e Tarquinia

**Tabella 1.** I fattori di rischio nella patogenesi dell'osteoartrosi. (Dati da March et al 2004<sup>2</sup>).

Non modificabili	Modificabili
Età	Traumatismi
Sesso femminile	Obesità
Storia familiare	Overuse professionale
Razza	Altri

sesso femminile maggiormente esposto; fra i fattori di rischio modificabili, il sovrappeso, l'overuse professionale ed i traumi articolari sono quelli più frequenti e forti<sup>4,5</sup>.

### I costi

L'osteoartrosi ha costi sanitari ingenti, dovuti sia all'elevato numero di persone colpite sia alla disabilità ed alla necessità di sostituzione chirurgica nei casi più severi. Per tali motivi, in molti Paesi europei sono state allestite task force con l'intento di monitorare i costi della malattia.

In Italia il gruppo di studio che si occupa di questo aspetto è il GISCA (Gruppo Italiano di Studio dei Costi dell'OsteoArtrosi). In uno studio pubblicato nel

2004, il GISCA ha stimato i costi diretti della malattia in 934 s/paziente/anno ed i costi indiretti in 1.236 s/paziente/anno, con un costo totale di 2.170 s/paziente/anno<sup>6</sup>.

### L'articolazione vista "dall'interno"

L'osteoartrosi è una malattia degenerativa cronica che interessa l'intera struttura articolare:

- osso subcondrale;
- cartilagine ialina;
- sinovia.

Le alterazioni a carico dell'osso subcondrale e quelle a carico della sinovia sembrano secondarie all'insulto della cartilagine, che rimane la prima struttura ad essere coinvolta e l'unico marker obiettivo di progressione<sup>7</sup>.

**Tutte le articolazioni sono a rischio, con prevalenza di quelle sottoposte a carico.**

### La cartilagine: uno sguardo "molecolare"

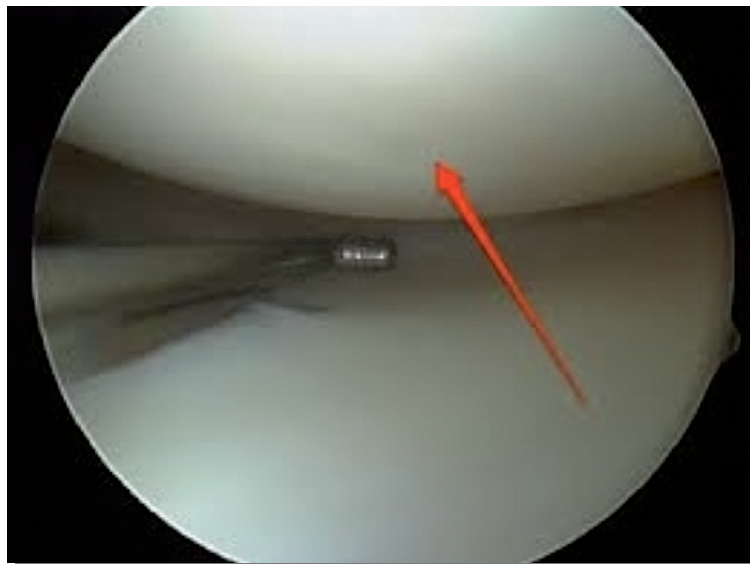
I capi articolari sono rivestiti da cartilagine ialina, una sottile pellicola di tessuto che all'osservazione endoscopica si presenta levigatissima, opalescente, dello spessore di 1.5-2.5 mm.

Si tratta di un tessuto avascolare e privo di terminazioni nervose, con proprietà meccaniche uniche che coniugano alla eccezionale durezza e levigatezza di superficie una elevata elasticità<sup>8</sup>. Il flusso di nutrienti ed O<sub>2</sub> avviene per diffusione, sia dal sottostante periostio sia dal sovrastante liquido sinoviale. La bassa densità dei condrociti e l'assenza di vascolarizzazione rendono il tessuto cartilagineo indolente ai processi riparativi.

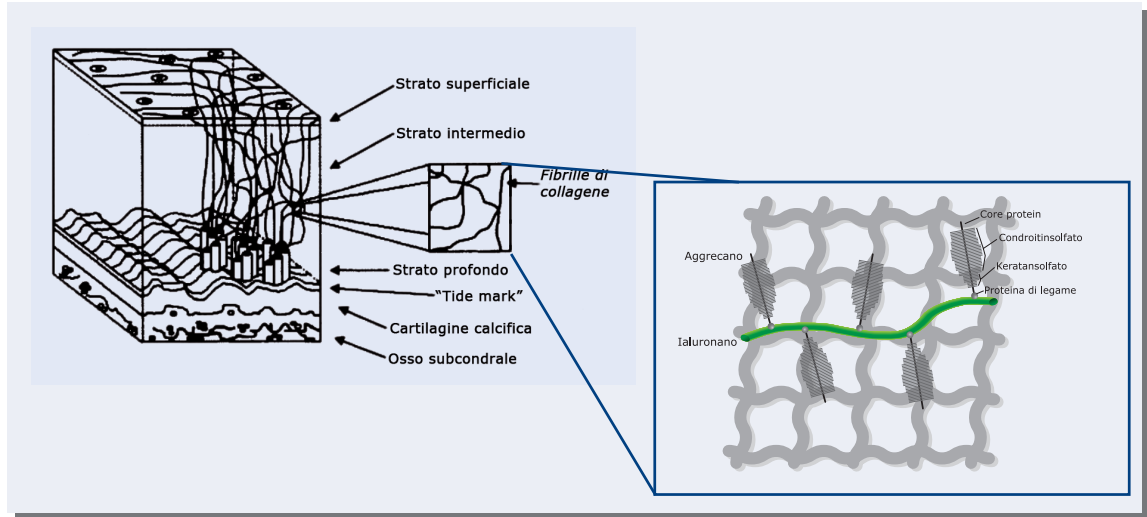
Osservati al microscopio ottico, i pochi condrociti presenti sono dispersi in una matrice composta da acqua, fibre di collagene e proteoglicani. L'analisi istochimica evidenzia le tre principali molecole della matrice che formano il reticolo molecolare della cartilagine:

- collagene
- proteoglicani
- acido ialuronico.

La sintesi di queste molecole da parte del condrocita è finemente regolata, ed il loro assemblaggio avviene seguendo una elaborata sequenza, durante la quale le singole molecole sono disposte in modo tale da formare un "contenitore" che trattiene acqua al suo interno (elasticità e assorbimento degli urti) e lascia le fibre di collagene ripiegate

**Figura 3.** Cartilagine ialina vista attraverso l'artroscopio.

**Figura 4.** La cartilagine vista dall'interno.



verso l'esterno (durezza e levigatezza). Ciò consente sia lo scorrimento dei capi articolari in assenza virtuale di attrito, sia l'assorbimento delle onde meccaniche che si scaricano sulla cartilagine durante il movimento<sup>9</sup>.

**L'articolazione artrosica**

La cartilagine è il primo tessuto ad essere coinvolto dall'OA, ma non l'unico. Il danno anatomico è preceduto da alterazioni biochimiche di lungo periodo, contrassegnate da riduzione del contenuto acquoso della matri-

ce, ridotta sintesi di collagene, di acido ialuronico e condroitin solfato (CS), con assemblaggio disfunzionale di proteoglicani e fibrille collageniche<sup>10</sup>.

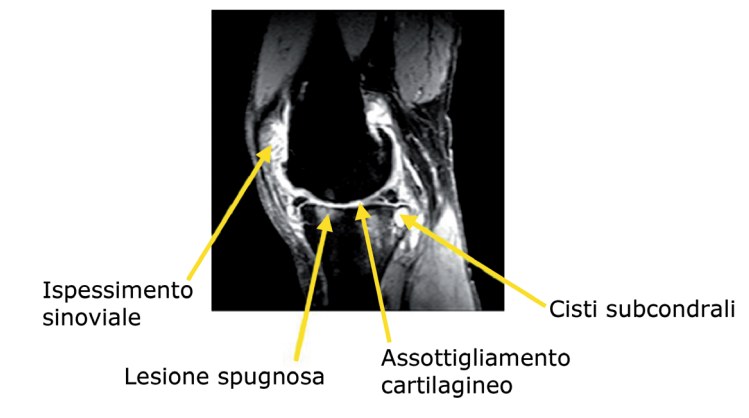
La cartilagine perde le sue proprietà elastiche ed espone l'osso subcondrale a sollecitazioni anormali, che reagisce con formazione di cisti intraossee ed osteofiti, cui segue sintomatologia algica e funzionale. In questa fase sono interessati oltre all'osso ed alla cartilagine anche la sinovia ed il liquido sinoviale.

Il ruolo della sinovia nella patogenesi dell'OA è determinante

***Nell'osteoartrosi la cartilagine è il primo tessuto ad essere coinvolto, seguito dalla sinovia e dall'osso subcondrale. L'infiammazione locale è condizione necessaria per la progressione della malattia.***

perché è da queste cellule, e dai monociti che ad esse si intercalano, che inizia il rilascio di quei mediatori infiammatori e citolitici che porteranno al progressivo sfibramento della cartilagine<sup>11</sup>.

**Figura 5.** La triade osso-cartilagine-sinovia nella patogenesi dell'OA.



**La strategia multitarget**

Benché non classificata fra le malattie reumatiche infiammatorie, non vi sono oggi dubbi che il danno cartilagineo nell'OA sia mediato da: 1) un eccesso di sostanze infiammatorie e citolitiche rilasciate localmente in conseguenza di un'esaltata produzione di radicali liberi; 2) una forma di "pigrezza metabolica" del condrocita nel rimpiazzare le macromolecole della cartilagine danneggiate<sup>12,13</sup>.

**Tabella 2.** Sostanze con attività biologica nella OA: effetti sinergici.

Agente	Effetti				
	Stress ossidativo	Infiammazione	Strutturale	Anabolico	Anticatabolico
Glucosamina	+	+	+++	++	+++
Condroitin solfato	+	+	+++	++	++++
Acidi boswellici	++	+++			+
Vitamina C	+++		+	++	+
Vitamina D	+		+	++	+
Manganese	+++			+++	+

Partendo da questi presupposti, il supplemento ideale dovrebbe intercettare le principali vie metaboliche che guidano il danno cartilagineo. I nutraceutici di nuova generazione si basano sull'impiego di più sostanze sinergiche con provata attività sia sulla componente infiammatoria sia su quella strutturale. In questo contesto le sostanze più studiate sono:

1. condroitin solfato
2. glucosamina cloridrato
3. acidi boswellici
4. vitamina C
5. vitamina D
6. manganese.

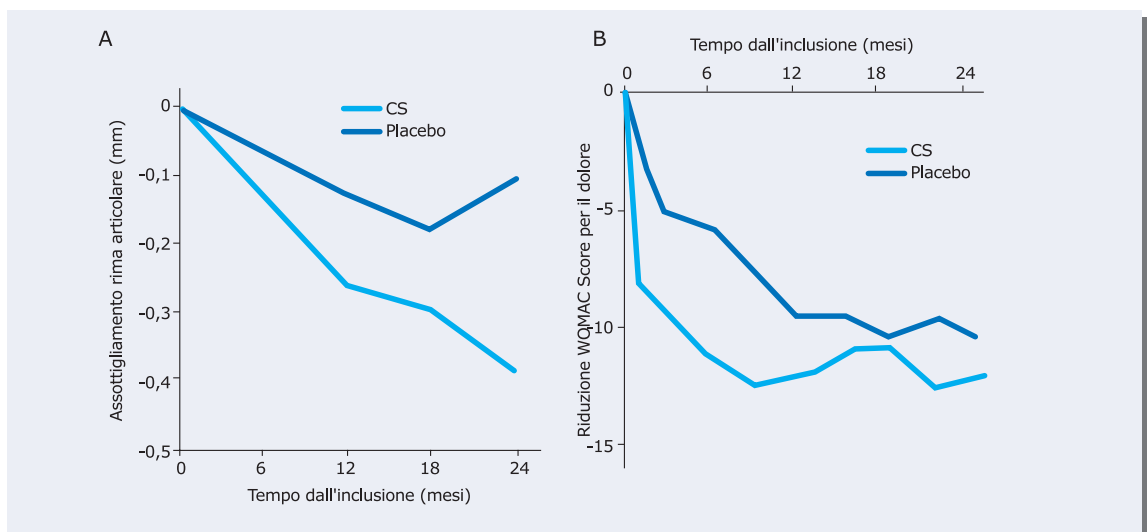
### La combinazione condroitin solfato/ glucosamina

La glucosamina (GS) e il condroitin solfato (CS) sono registrate in quasi tutte le farmacie dei Paesi occidentali, sia come farmaci che come integratori alimentari. L'utilizzo come farmaco piuttosto che come integratore dipende dal dosaggio giornaliero ammesso dalle singole autorità regolatorie. Le due molecole sono state sottoposte, singolarmente o in associazione, a numerosi indagini sperimentali e studi clinici<sup>14-16</sup>. Que-

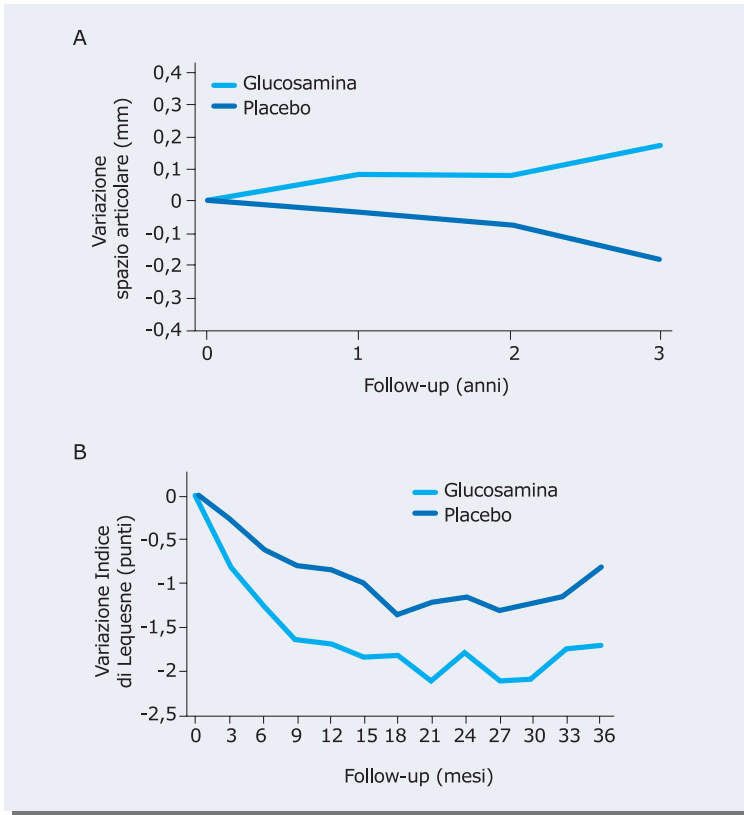
sti studi hanno dimostrato che la supplementazione con la combinazione GS/CS agisce sul condrocita sia iperstimolando il metabolismo sia comportandosi da substrato metabolico per la costruzione dei glicosaminoglicani (GAG). Questi due meccanismi si traducono in due effetti clinicamente misurabili:

- il miglioramento della sintomatologia algica e funzionale (effetto SYSDOA -Symptomatic Slow-Acting Drugs for Osteoarthritis-);
- un effetto protettivo della cartilagine (effetto DMOAD -

**Figura 6.** Riduzione dell'assottigliamento cartilagineo (A) e del punteggio WOMAC per il dolore (B) dopo due anni di trattamento. (Da Kahan A et al. 2009<sup>17</sup>).



**Figura 7.** Variazione dello spazio articolare e dell'Indice di Lequesne dopo tre anni di supplementazione con GS. (Dati da Pavelka et al 2002<sup>15</sup>).



Disease Modifying Osteoarthritis Drugs-).

Negli studi che hanno utilizzato le molecole singole o la combinazione GS/CS a dosaggio farmacologico il rallentamento della progressione è apparso ben evidente: nello studio STOPP la somministrazione di CS (800 mg/die) a pazienti con gonar-

troso ha sensibilmente ridotto l'assottigliamento della cartilagine rispetto al gruppo di controllo al termine dei 24 mesi di somministrazione<sup>17</sup>.

Risultati analoghi sono stati ottenuti da Pavelka e associati su 202 pazienti con gonartrosi randomizzati a ricevere GS (1.500 mg/die) o placebo per la durata di tre anni<sup>15</sup>. Al termine dello

studio non si osservò alcuna progressione di malattia, mentre nei controlli la riduzione dello spazio articolare seguì l'andamento previsto. A questo effetto strutturale si accompagnò il miglioramento degli indici algofunzionali misurati con la scala di Lequesne.

**Acidi boswelllici**

La Boswellia Serrata è una pianta nativa del Libano e di alcuni paesi asiatici dalle cui bacche si estrae una resina ricca di sostanze antiinfiammatorie, gli acidi boswelllici (AB). Dei vari AB, sei sono stati identificati e caratterizzati chimicamente; di questi, tre sono quelli maggiormente utilizzati come supplementi.

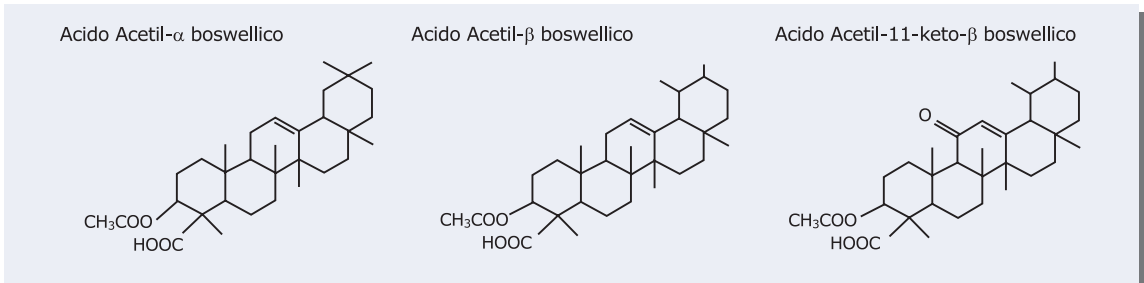
Queste tre sostanze sono dotate di due attività potenzialmente utili nell'OA:

- azione antiinfiammatoria, mediata dall'inibizione della via dei leukotrieni e delle liposine<sup>18,19</sup>;
- inibizione della sintesi di MMP-3 e forse di altre metalloproteinasi<sup>20</sup>.

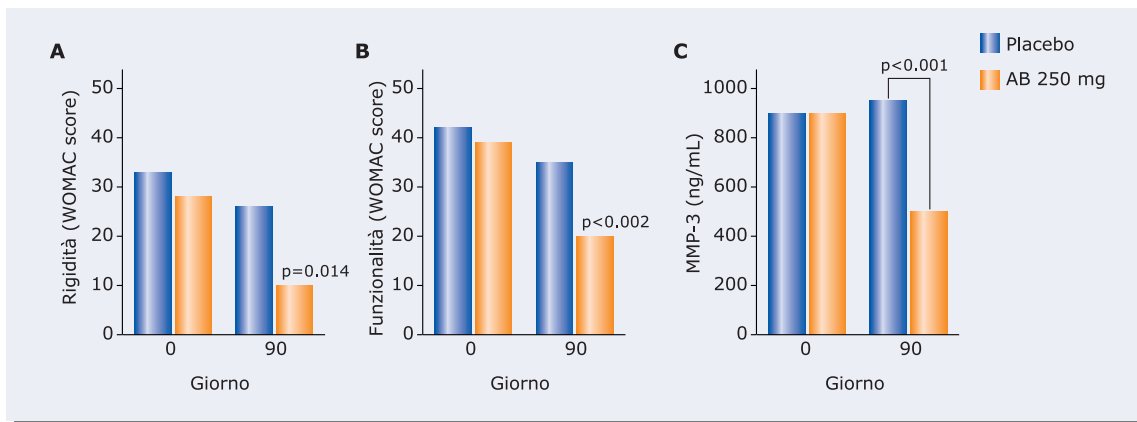
Queste azioni si sono dimostrate clinicamente rilevanti in soggetti con diagnosi di OA. In uno

**Gli AB sono molecole in grado di modulare la cascata infiammatoria, con benefici sulla funzionalità articolare.**

**Figura 8.** Gli acidi boswelllici meglio studiati nell'OA.



**Figura 9.** Effetti degli AB sulla rigidità articolare (A), la funzionalità (B) ed il rilascio di MMP-3 nel liquido sinoviale. (Da Sengupta K 2008<sup>21</sup>).



studio su 75 soggetti con OA diagnosticata secondo i criteri ACR e randomizzati a ricevere placebo o AB per tre mesi, si osservò una riduzione ampia e statisticamente significativa sia della rigidità che della funzionalità articolare misurate alla scala WOMAC<sup>21</sup>. In un sottogruppo sottoposto ad artrocentesi, si osservò anche una riduzione delle concentrazioni di MMP-3 nel liquido sinoviale.

Risultati analoghi sono stati ottenuti in sperimentazioni successive. Uno studio recente su 60 soggetti con gonartrosi ha valutato l'attività degli AB assunti per 30 giorni sia sul dolore, misurato con scala VAS, sia sull'articolazione, misurata con l'Indice Funzionale di Lequesne (LFI)<sup>22</sup>.

Benchè l'effetto non sia rapido come quello dei FANS, i risultati sono apparsi significativi a partire dal 15° giorno di somministrazione.

### Vitamina C

L'acido L-ascorbico è una vitamina idrosolubile ben nota per le sue proprietà antiossidanti e per la sua capacità di guarire i pazienti affetti dallo scorbuto, una malattia del connettivo. Sin dai primi studi condotti sulla cinetica della vitamina C, è apparso evidente che essa si concentra in misura circa 50 volte maggiore nei linfociti e nei macrofagi che nel plasma.

Per aumentare la permeabilità nei linfociti ed in altre cellule dell'immunità sono state brevettate formulazioni nelle quali

l'acido ascorbico è disperso in un veicolo lipidico (es. Pureway C<sup>®</sup>)<sup>23</sup>.

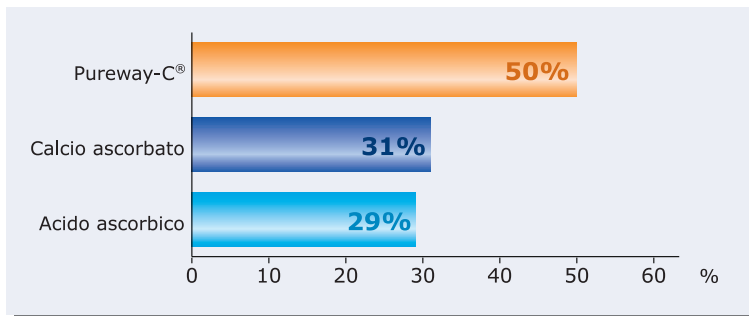
La vitamina C interviene nella funzionalità articolare attraverso due meccanismi distinti:

1. effetto antiossidante;
2. effetto sulla collagenosintesi.

### Effetto antiossidante

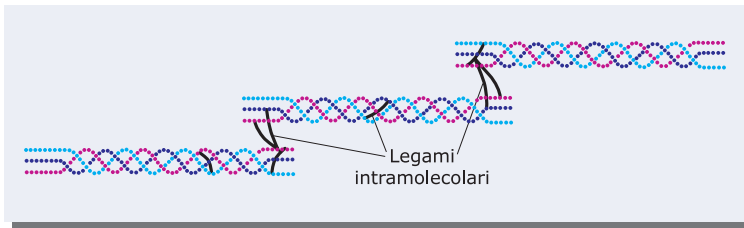
Studi sperimentali hanno individuato nell'esaltato rilascio di ROS (Reactive Oxygen Species - Radicali Liberi dell'Ossigeno) da parte del condrocita uno dei driver precoci di danno cartilagineo<sup>24</sup>. Successivamente, i ROS diffondono dalla matrice ai tessuti adiacenti fino ad arrivare alla sinovia, dove attivano i linfociti ed i macrofagi residenti. Questi, sotto lo stimolo ossidativo, iniziano a rilasciare sostanze collagenolitiche (elastasi, MMPs, etc), con conseguente danno al collagene ed ai polisaccaridi della cartilagine<sup>25,26</sup>. Un elevato ap-

**Figura 10.** Assorbimento di diverse formulazioni di vitamina C nei linfociti T a due ore dalla somministrazione. (Da Weeks B 2007<sup>23</sup>).



**La vitamina C è coinvolta nella funzionalità articolare sia garantendo il corretto assemblaggio del collagene sia riducendo i danni provocati dallo stress ossidativo.**

**Figura 11.** Ponti idrogeno fra idrossilisina ed idrossiprolina all'interno delle singole catene e fra differenti catene di collagene.



porto esogeno di vitamina C nell'OA è quindi necessario per riequilibrare le scorte di acido ascorbico depauperate dai ROS.

### **Effetto sulla collagenosintesi**

La vitamina C è cofattore obbligato di due idrossilasi preposte alla sintesi del collagene<sup>27</sup>. Il collagene è una proteina filamentosa costituita da tre catene amminoacidiche avvolte ad elica. Ai fini della stabilità, l'assemblaggio a tripla elica richiede l'idrossilazione di due amminoacidi, la lisina e la prolina, tramite i quali si formano numerosi ponti idrogeno sia all'interno di ciascuna catena che tra le singole catene.

Le due idrossilasi che convertono la lisina e la prolina in idrossilisina ed idrossiprolina necessitano della vitamina C come cofattore. In presenza di deficit del cofattore, si ha un assemblaggio alterato delle tre catene. Ne deriva una molecola di collagene "cedevole", che a sua volta rende la cartilagine anelastica e morbida, incapace di resistere alle sollecitazioni meccaniche ed incline allo sfibramento.

**Nelle popolazioni con carenze dietetiche di vitamina D si registra una maggiore propensione all'OA.**

### **Vitamina D**

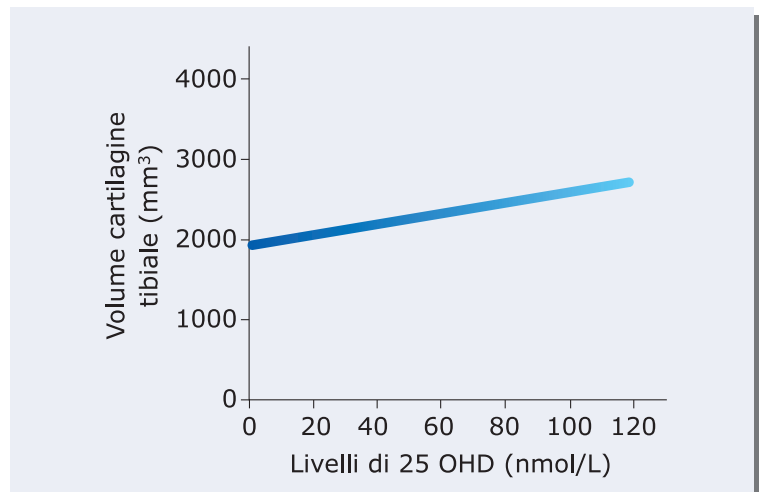
La vitamina D<sub>3</sub> è l'ormone coinvolto nell'omeostasi fosfo-calcica e la sua attività nel metabolismo minerale osseo è ben nota. Più recente è la scoperta che recettori per la vitamina D (VDR) sono presenti anche in altri tessuti, incluso il condrocita<sup>28</sup>. Questo dato getta luce su un'altra patologia correlata al deficit di vitamina D, oggi fortunatamente debellata nell'infanzia e molto rara nell'adulto: l'osteomalacia. Si tratta di un difetto della mineralizzazione che, se presente durante la fase di accrescimento, come nel rachitismo infantile, coinvolge sia l'osso che le cartilagini epifisarie, nelle quali l'ossificazione è precocemente interrotta per ridotta stimolazione del VDR.

Il primo riscontro circa il possibile coinvolgimento dell'ipovitaminosi D nell'OA proviene da uno studio osservazionale, nel quale i soggetti con bassi livelli circolanti della molecola presentavano un rischio 2.89 volte maggiore di evoluzione della gonartrosi rispetto alla controparte con normali livelli circolanti della vitamina<sup>29</sup>. Queste osservazioni preliminari sono state confermate da studi successivi di natura prospettica. Nel Tasmanian Older Adult Cohort Study, il volume della cartilagine tibiale fu misurato con RMN al basale e dopo 2.9 anni di follow-up<sup>30</sup>. Il volume della cartilagine risultò correlare in modo continuo e lineare con i livelli circolanti di 25 OHD.

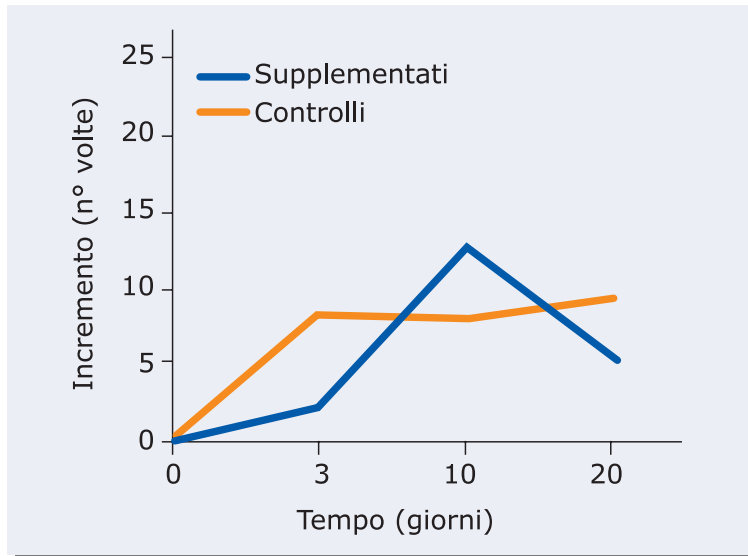
Poiché lo studio pose in relazione il volume della cartilagine articolare con l'intero spettro di valori ematici di 25 OHD registrati nel campione, gli Autori suggerirono l'esistenza di un valore soglia, pari a circa 50 nmol/L, al di sotto del quale si inizia a perdere cartilagine.

In aggiunta ad un effetto "trofico", studi sperimentali sembrano indicare che la vitamina D potrebbe agire anche riducendo

**Figura 12.** Cartilagine tibiale e livelli di vitamina D. (Da Ding 2009<sup>30</sup>).



**Figura 13.** Effetti della supplementazione con vitamina D sulla espressione di IL-1 $\beta$  nella cartilagine di ratto. (Da Castillo 2012<sup>32</sup>).



la flogosi articolare: è stato infatti dimostrato che la vitamina D, aggiunta al mezzo di coltura, riduce l'espressione di TNF- $\alpha$  e MMPs da parte di monociti attivati<sup>31</sup>. Più recentemente è stato anche dimostrato che la supplementazione con vitamina D riduce l'espressione di citochine infiammatorie e di MMP-3 in ratti con OA indotta chirurgicamente<sup>32</sup>.

### Manganese

Il manganese (Mn) è presente nell'organismo umano prevalentemente sotto forma di ione Mn<sup>++</sup>, prevalentemente nell'apparato mitocondriale, dove attiva numerosi enzimi (idrolasi, transferasi, chinasi e decarbossilasi). A livello citoplasmatico il manganese è sia un cofattore essenziale della superossidodismutasi Mn-dipendente (SOD-Mn) sia un attivatore di alcuni enzimi coinvolti nella sintesi dei proteoglicani. In modo particolare:

**Il manganese è indispensabile alla funzionalità cartilaginea sia come cofattore di complessi enzimatici ad attività antiossidante (SOD), sia come cofattore degli enzimi coinvolti nella sintesi dei proteoglicani.**

- polisaccaride polimerasi;
- galattotransferasi;
- xilosiltransferasi.

Il primo catalizza la sintesi dei polisaccaridi della cartilagine a partire dalla UDP-N-acetil-galattosamina e dall'UDP-glicuronato. Il secondo stacca una molecola di galattosio dal complesso UDP-galattosio e la incorpora nel trisaccaride galattosio-galattosio-xilosio, indispensabile per coniugare le catene polisaccaridiche all'asse proteico all'interno dei glicosaminoglicani<sup>33,34</sup>. E' probabile che

anche altri enzimi Mn-dipendenti siano coinvolti nella sintesi dei glicosaminoglicani.

### Manganese e sintesi dei mucopolisaccaridi della cartilagine

Nelle cavie giovani alimentate con diete povere di Mn si osserva ridotto accrescimento del radio, dell'ulna, della tibia e della fibula<sup>34</sup>. Inoltre, il piatto tibiale risulta di maggiori dimensioni, con deformazione dell'articolazione del ginocchio proprio a causa della elevata deformabilità cartilaginea.

Questi effetti sono stati estesamente studiati in vari modelli, e dimostrano che l'origine di tali alterazioni è da imputarsi ad una distrofia della cartilagine delle epifisi ossee<sup>35,36</sup>. La condrodistrofia che si sviluppa in questi modelli si presenta con un quadro clinico del tutto simile alla condrodistrofia umana.

L'esame istologico rivela una scarsa maturazione cartilaginea, con una matrice extracellulare rarefatta e povera di mucopolisaccaridi<sup>37</sup>. Anche il condrocita è affetto da estese vacuolazioni ed il contenuto di mucopolisaccaridi nelle sue immediate vicinanze è molto ridotto.

La causa di tali alterazioni risiede nel blocco delle due tappe enzimatiche prima citate, entrambe mediate da enzimi Mn-dipendenti.

Questi dati, presi complessivamente suggeriscono che il manganese è un elemento essenziale per la corretta sintesi dei mucopolisaccaridi della matrice e che carenze del metallo inducono alterazioni istologiche della cartilagine. **TiM**



## Bibliografia

1. **Felson DT, Nevitt MC, Zhang Y, et al.** High prevalence of lateral knee osteoarthritis in Beijing Chinese compared with Framingham Caucasian subjects. *Arthritis Rheum* 2002; 46:1217-1222.
2. **March LM, Bagga H.** Epidemiology of osteoarthritis in Australia. *Med J Austral* 2004; 180:S6-S10.
3. **Mannoni A, Riganti MP, Di Bari M, et al.** Epidemiological profile of symptomatic osteoarthritis in older adults: a population based study in Dicomano, Italy. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:576-578.
4. **Reijman M, Pols HA, Bergink AP, et al.** Body mass index associated with onset and progression of osteoarthritis of the knee but not of the hip. The Rotterdam Study. *Ann Rheum Dis* 2007; 66:158-162.
5. **Shepard GJ, Banks AJ, Ryan WG.** Ex-professional association footballers have an increased prevalence of osteoarthritis of the hip compared with age matched controls despite not having sustained notable hip injuries. *Br J Sports Med* 2003; 37: 80-1.
6. **Leardini G, Salaffi F, Caporali R;** Italian Group for Study of the Costs of Arthritis. Direct and indirect costs of osteoarthritis of the knee. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22:699-706.
7. **Hunter DJ, Le Graverand MP, Eckstein F.** Radiologic markers of osteoarthritis progression. *Curr Opin Rheumatol* 2009; 21:110-117.
8. **Kladny B, Bail H, Swododa B, et al.** Cartilage thickness measurement in magnetic resonance imaging. *Osteoarthritis Cartilage* 1996; 4:181-186.
9. **Heinegård D, Saxne T.** The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011; 7:50-56.
10. **Hashimoto M, Nakasa T, Hikota T.** Molecular network of cartilage homeostasis and steoarthritis. *Med Res Rev* 2008; 28:464-481.
11. **Scanzello CR, Goldring SR.** The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone* 2012; 51:249-257.
12. **Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE.** Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage-associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum* 2001; 44:585-594.
13. **Lorenz H, Richter W.** Osteoarthritis: cellular and molecular changes in degenerating cartilage. *Prog Histochem Cytochem* 2006; 40:135-163.
14. **Ronca F, Palmieri L, Panicucci P, et al.** Anti-inflammatory activity of chondroitinsulfate. *Osteoarthritis Cartilage* 1998; 6 (Suppl A):14-21.
15. **Pavelka K, Gatterova J, Olejarova M, et al.** Glucosamine sulfate use and delay of progression of knee osteoarthritis. *Arch Int Med* 2002; 162:2113-2123.
16. **Kanzaki N, Saito K, Maeda A, et al.** Effect of a dietary supplement containing glucosamine hydrochloride, chondroitin sulfate and quercetin glycosides on symptomatic knee osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Sci Food Agric* 2012; 92:862-869.
17. **Kahan A, Uebelhart D, De Vathaire F, et al.** Long-term effects of chondroitins 4 and 6 sulfate on knee osteoarthritis: the study on osteoarthritis progression prevention, a two-year, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2009; 60:524-533.
18. **Poeckel D, Werz O.** Boswellic acids: biological actions and molecular targets. *Curr Med Chem* 2006; 13:3359-3369.
19. **Kimmatkar N, Thawani V, Hingorani L, et al.** Efficacy and tolerability of *Boswellia serrata* extract in treatment of osteoarthritis of knee - a randomized double blind placebo controlled trial. *Phytomedicine* 2003; 10:3-11.
20. **Ammon HP.** Modulation of the immune system by *Boswellia serrata* extracts and boswellic acids. *Phytomedicine*. 2010;17:862-7.
21. **Sengupta K, Alluri KV, Satish AR, et al.** A double blind, randomized, placebo controlled study of the efficacy and safety of 5-Loxin for treatment of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Res Ther* 2008; 10:R85.
22. **Vishal AA, Mishra A, Raychaudhuri SP.** A double blind, randomized, placebo controlled clinical study evaluates the early efficacy of aflapin in subjects with osteoarthritis of knee. *Int J Med Sci* 2011; 8:615-622.
23. **Weeks B, Perez P.** A novel vitamin C preparation enhances neurite formation and fibroblast adhesion and reduces xenobiotic-induced T cell hyperactivation. *Med Sci Monit* 2007; 13:BR51-BR58.
24. **Price JS, Waters JG, Darrah C, et al.** The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell* 2002;1:57-65.
25. **Ronchetti IP, Quagliano D Jr, Bergamini G.** Ascorbic acid and connective tissue. *Subcell Biochem* 1996; 25:249-264.
26. **Biniecka M, Kennedy A, Fearon U, et al.** Oxidative damage in synovial tissue is associated with in vivo hypoxicstatus in the arthritic joint. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1172-1178.
27. **Murad S, Grove D, Lindberg KA, et al.** Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proc Natl Acad Sci* 1982; 78:2879-2882.
28. **Masuyama R, Stockmans I, Torrekens S, et al.** Vitamin D receptor in chondrocytes promotes osteoclastogenesis and regulates FGF23 production in osteoblasts. *J Clin Invest* 2006; 116:3150-3159.
29. **McAlindon TE, Felson DT, Zhang Y, et al.** Relation of dietary intake and serum levels of vitamin D to progression of osteoarthritis of the knee among participants in the Framingham Study. *Ann Intern Med* 1996; 125:353-359.
30. **Ding C, Cicuttini F, Parameswaran V, et al.** Serum levels of vitamin D, sunlight exposure, and knee cartilage loss in older adults: the Tasmanian older adult cohort study. *Arthritis Rheum* 2009; 60:1381-1389.
31. **Sadeghi K, Wessner B, Laggner U, et al.** Vitamin D3 downregulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular

- patterns. *Eur J Immunol* 2006; 36:361-370.
32. **Castillo EC, Hernandez-Cueto MA, Vega-Lopez MA, et al.** Effects of Vitamin D Supplementation during the Induction and Progression of Osteoarthritis in a Rat Model. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; Epub 2012 Oct 14.
33. **Leach RM Jr.** Role of manganese in the synthesis of mucopolysaccharides. *Fed Proc* 1967; 26:118-120.
34. **Burch RE, Hahn HK, Sullivan JF.** Newer aspects of the roles of zinc, manganese, and copper in human nutrition. *Clin Chem* 1975; 21:501-520.
35. **Asling CW, and Hurley LS.** The influence of trace elements on the skeleton. *Clin Ort* 1963; 27:214.
36. **Leach RM Jr, Gay CV.** Role of epiphyseal cartilage in endochondral bone formation. *J Nutr* 1987; 117:784-790.
37. **Valero G, Alley MR, Badcoe LM, et al.** Chondrodystrophy in calves associated with manganese deficiency. *N Z Vet J* 1990; 38:161-167.