ОРИГИНАЛНИ СТАТИИ
ORIGINAL ARTICLES

СРАВНИТЕЛНО КУЛТИВИРАНЕ НА ХОНДРОЦИТИ IN VITRO

В. Дончев[1], Е. Хайвазов[2], С. Васев[2], С. Константинов[3], Г. Момеков[3], Й. Илиева[3], Е. Стефанова[1] и Б. Ланджов[1]

[1]Катедра по анатомия и хистология, Медицински факултет, МУ – София
[2]Отделение по ортопедия и травматология, МБАЛ „Доверие“ – София
[3]Катедра по фармакология, фармакотерапия, токсикология, Фармацевтичен факултет, МУ – София

COMPARATIVELY CULTURING CHONDROCYTES IN VITRO

V. Dontchev[1], E. Hayvazov[2], S. Vasev[2], S. Konstantinov[3], G. Momekov[3], J. Ilieva[3], E. Stefanova[1] and B. Landzhov[1]

[1]Department of Anatomy and Histology, Faculty of Medicine, Medical University – Sofia
[2]Department of Orthopaedics and Traumatology, Hospital „Doverie“ – Sofia
[3]Department of Pharmacology, Pharmacotherapy, Toxicology, Faculty of Pharmacy, Medical University – Sofia

***Резюме**. Хондроцитите са високодиференцирани клетки, заобиколени от произведен от самите тях екстрацелуларен матрикс, секретиращи колаген 2 и протеогликани. Те осигуряват специфичните свойства на хрущяла. Извадени от тъканната им среда и култивирани in vitro, клетките намаляват своята диференциация, сменят секрецията на вида колаген с друг вид, приближавайки се фенотипно до клетки, наподобяващи фибробласти. Цел на изследването беше да култивираме клетки с характеристики на хондроцити, които да могат да бъдат инкорпорирани в триизмерна структура, в която да се развиват, за да станат основа на имплант за възстановяване на увреден ставен хрущял. Култивирахме и използвахме два биологични модела, а именно: 1) автоложни първични хондроцити; 2) хондросаркомни клетки от клетъчна линия SW 1353. Основната идея беше да се сравнят параметрите на двата клетъчни модела. Беше проверена и установена секрецията им на колаген 2 и протеогликани. Двата вида клетки имат потенциал за образуване на хрущялна тъкан. Те синтезират колаген 2, но секрецията на хондросаркомните клетки е сравнително постоянна във времето, докато при първичните хондроцити тя намалява няколко пъти с увеличаване броя на клетъчните пасирания и възрастта на културите. В културите с хондросаркомни клетки се доказаха повече протеогликани. За да се прецени кой от двата модела е по-перспективен, трябва да се направи опит в бъдеще за генериране на триизмерна структура с хондроцити и нейното вътреставно имплантиране.*

***Ключови думи**: хондроцити, клетъчни култури, колаген тип 1, колаген тип 2, агрекан*

***Адрес за кореспонденция**: Доц. Васил Дончев, дм, Катедра по анатомия и хистология, Медицински факултет, Медицински университет, ул. "Здраве" 2, 1431 София, e-mail: dvd03@mail.bg*

Summary. Chondrocytes are highly differentiated cells. They are surrounded by themselves produced extracellular matrix which secretes collagen type 2 and some proteoglycans (mainly aggrecan). They provide specific properties of cartilage. Removed from their environment and cultured in vitro, cells reducing their differentiation, change the secretion of collagen type to another, approaching phenotype to cells resembling fibroblasts. Aim of the study was to cultivate cells with characteristics of chondrocytes, which in a subsequent stage can be incorporated in the three-dimensional structure which can be developed to become the basis of implant for restoration of damaged articular cartilage. For this purpose, we are cultivating and using two biological models, namely: 1) culturing of autologous primary chondrocytes and 2) culturing chondrosarcoma cells of a cell line SW 1353. Basic idea was to compare the parameters of both cell models. Their secretion, in particular collagen type 2 and proteoglycans, was verified and established. Both types of cells have the potential

for formation of cartilage tissue. They synthesize collagen type 2, but the secretion of chondrosarcoma cells is relatively constant over time, whereas in primary chondrocytes, it reduces significantly in result of cell passage and age of the cultures. In cultures of chondrosarcoma cells prove more proteoglycans. Ultimately, in order to assess which of the two models is promising, experiments are needed to generate three-dimensional structure of chondrocytes and its implantation.

Key words: chondrocytes, cell cultures, collagen type 1, collagen type 2, aggrecan

Address for correspondence: Assoc. Prof. Vasil Dontchev, Department of Histology, Faculty of Medicine, Medical University, 2 Zdrave st., Bg – 1431 Sofia, e-mail: dvd03@mail.bg

ВЪВЕДЕНИЕ

Зрелият ставен хрущял съдържа сравнително малко хондроцити. Тези клетки са лишени от способността да се делят. Вградени са в извънклетъчния матрикс (ECM). ECM се състои основно от два основни вида макромолекули – колаген (тип II, IX и XI) и протеогликани (aggrecan), които заедно съставляват 90% от сухото тегло на здравата тъкан. Хондроцитите регулират тъканната хомеостаза (синтез и разграждане на компонентите на ECM), докато матриксът осигурява функцията на тъканите и клетките в тях.

Хрущялът представлява аваскуларна и лишена от нерви тъкан. Изхранването става на принципа на обмен на хранителни вещества и газ чрез дифузия от ставното пространство. Метаболитите се движат заедно с водата в посока от хрущяла към ставната течност и обратно. В зряла възраст тази сравнително слабо активна тъкан търпи промени в резултат на въздействието на различни фактори. Тези промени се изразяват в различна по степен дегенерация на клетките и извънклетъчния матрикс. Обикновено те започват постепенно, задълбочават се и в крайна степен довеждат до пълно разрушаване на тъканта. Ниската пролиферативна способност на клетките обуславя слабите възможности за регенерация на хрущяла. Обикновено засегнатата тъкан остава трайно увредена. Това води до значително намаляване на функционалните способности на засегнатия ставен апарат. През последните години се отбелязва значителен интерес към структурната и функционалната реконструкция на тъканните дефекти на ставния хрущял, получени в резултат на травматични наранявания или дегенеративни заболявания. Такъв интерес се проявява не само от клиницисти, но също така и от биолози и специалисти от интердисциплинарни области (Tamai et al., 2005). За възстановяване на тъканната структура и/или функция до голяма степен се разчита на трансплантати или присадки (autografts или allografts). Сравнително отскоро като терапевтична алтернатива се използват и тъканни заместители (Dawson et al., 2011; Solchaga et al., 2011). Такива биха могли да бъдат клетки, фактори на растежа (GFS) и различни синтетични средства в комбинация или поотделно. Полагат се значителни усилия да се имитира естествената микросреда на всяка специфична тъкан, в която клетките могат да се размножават и диференцират.

Цел на нашата работа бе да получим зрели хондроцити, които след имплантация в става са способни да се развият като хрущялна тъкан. Успоредно с това сравняваме техните характеристики с хондросаркомни клетки от клетъчна лимния SW1353 (Human bone chondrosarcoma, fibroblast-like cell line). Ще преценим също евентуалната им способност да бъдат използвани като материал за субституция.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Биопсичен материал и получаване на клетъчни култури от първични хондроцити от хрущялна тъкан на колянна става

Използвахме хрущялна тъкан от коленни стави на 12 пациенти (7 мъже и 5 жени на възраст от 22 до 55 години – средна възраст 45 години). Материалът беше взет по време на артроскопска интервенция чрез кюртиране на интеркондилното пространство при условията на пълна стерилност и е с приблизителни размери 3-5 mm. Трима от болните бяха със скъсан заден рог – средна трета на външен менискус, а останалите – с увреден заден рог на вътрешния менискус, но без видима промяна на ставния хрущял. Всички пациенти се лекуваха в ортопедичната клиника на болница „Доверие“ – София, и са подписали информирано съгласие за оперативна интервенция и изследване на тъканна проба.

Материалът бе поставян в стерилна културална среда с 10% FBS и бе транспортиран при температура между 25 и 30°C за не повече от 2 часа до лабораторията. Тук се нарязваше на малки частички (размер около 0.5 mm^3) с помощта на стерилен

скалпел. Полученият материал се поставяше в разтвор на 0.1 M колагеназа тип 2, разтворена в DMEM, 10% Fetal bovine serum (FBS) и $CaCl_2$ в инкубатор с температура 37°C за 24 часа.

След 24 часа разградената тъкан се центрофугираше и промиваше за кратко с фосфатен буфер pH 7.4, след което се центрофугираше отново. Пелетата се диспергираше във фласк в DMEM с добавка на FBS, Penicillin/Streptomycin (P/S) и L-Glutamin или Glutamax и се култивираше в CO_2 (5%) инкубатор на 37°C за различно време в зависимост от конкретния експеримент. Процентът на FBS варираще при отделните експрименти от 5 до 15.

С оглед на тестването на различни вещества и тяхното влияние върху растежа и развитието на клетките използвахме добавки, някои от тях в различни концентрации: глюкоза 1% и 4.5% натриев пируват, прогестерон, дексаметазон, B-27, трансферин, натриев селенит, инсулин.

Смяна на средата извършвахме на всеки четвърти ден. Когато клетките достигаха 70-90% плътност на монослоя, се трипсинизираха и пасираха.

За доказване наличието на протеогликани се прилагаше 0.1% воден разтвор на толуидиново синьо. За целта клетъчните култури, култивирани върху покривно стъкло, се фиксираха с 4% параформалдехид за около 15 минути. След три промивки в дестилирана вода покривните стъкла с клетъчните култури се поставяха за 30 секунди в разтвор на толуидиново синьо. Участъците, където има повишена концентрация на протеогликани, се оцветяваха в различни нюанси на червен цвят, чийто интензитет зависи от концентрацията.

Клетъчни култури от хондросаркомни клетки

Успоредно с първичните хондроцити култивирахме човешки хондросаркомни клетки от клетъчна линия SW 1353. Клетките бяха култивирани в DMEM с добавка на FBS, Penicillin/Streptomycin (P/S) и L-Glutamin или Glutamax в CO_2 (5%) инкубатор на 37°C. Всички експерименти, проведени с първичните хондроцити, при които включвахме различни видове добавки към средата, както и специфични оцветявания за доказване на вещества, характеризиращи хондроцитите, бяха проведени и с хондросаркомните клетки.

Имуноцитохимия

Първичните хондроцити или клетките на хондрогенната клетъчна линия се култивираха след трипсинизация за 4 дни върху покривни стъкла в DMEM с добавка на 5 до 15% FBS, P/S и L-Glutamin. След това фиксирахме клетките със затоплен 4% параформалдехид в PBS за около 15 минути. След промиване на фиксираните култури инактивирахме неспецифичната активност с 0.1 M глицин в PBS за 15 минути и след това с 1% fish gelatin за 30 минути. За пермеабилизиране на клетките към fish gelatin добавяхме 0.1% Triton X-100. След промивка с PBS клетките се третираха с поликлонално антитяло срещу колаген тип 1 (Santa Cruz Biotechnology) и моноклонално антитяло срещу колаген тип 2 (Pierce Biotechnology) за 24 часа на температура 4°C.

На другия ден след промивка с PBS културите се третираха за 1 час на стайна температура с donkey anti-goat вторично антитяло, конюгирано с Texas Red срещу колаген тип 1 (Santa Cruz Biotechnology), и anti-mouse вторично антитяло, конюгирано с FITC срещу колаген тип 2 (Pierce Biotechnology), разтворено в PBS с 1% fish gelatin в разреждане 1 : 100. Пет минути преди края на процедурата се добавяше Hoechst 33342 (Invitrogen) за визуализация на клетъчните ядра. Промивахме в PBS и дестилирана вода.

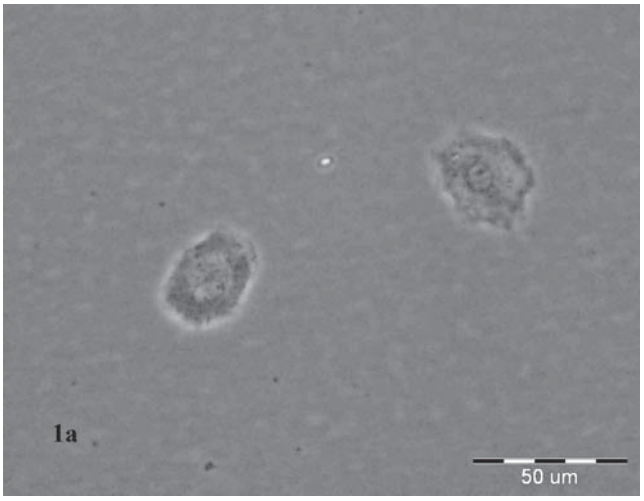
Всички имуноцитохимични оцветявания бяха придружени от контрола, при която липсваше някой от ключовите реактиви (първично или вторично антитяло). След включване в Ultra Cruze mounting medium наблюдавахме срезовете с помощта на Olympus TX51 инвертен флуоресцентен микроскоп, оборудван със софтуер от типа Soft Imiging System.

РЕЗУЛТАТИ

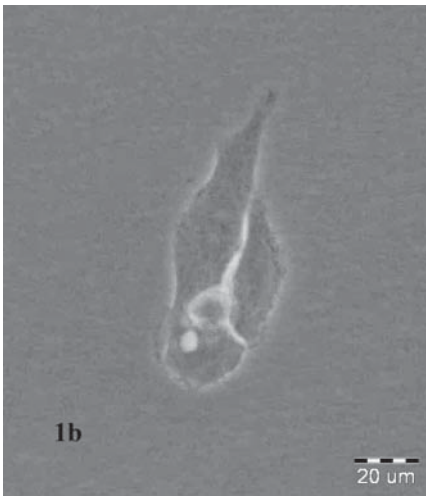
Морфология на първичните хондроцити in vitro

През първия ден след култивирането на клетките малка част от тях прилепваха за дъното на петрито (фиг. 1а). Прилепналите клетки имаха сферична или овална форма. Рядко намирахме клетки с удължена форма и начало на израстъци. Не много често се виждаха групи от клетки (фиг. 1б). Най-често те са плътно прилепнали по начин, подсказващ наскоро приключило клетъчно делене.

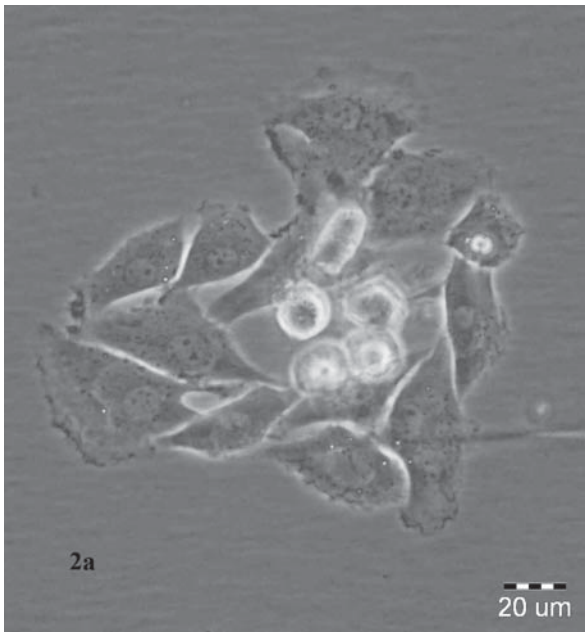
На петия ден след култивирането единичните сферични клетки се срещаха сравнително рядко. Клетъчните групи бяха по-многобройни (фиг. 2а). Основната част от клетките бяха с леко удължена или овална форма. Притежаваха подобни на ламелоподи разширения, разположени навсякъде около клетката. Понякога тези разширения се оформят като начало на израстъци (фиг. 2б).



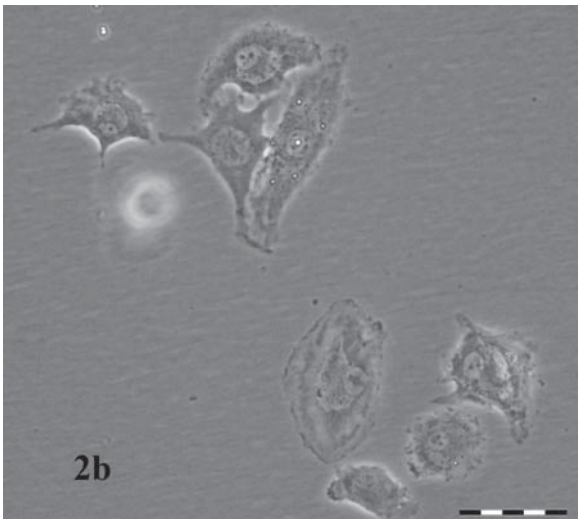
Фиг. 1а. Единични първични хондроцити през първия ден след култивиране



Фиг. 1б. Група първични хондроцити през първия ден след култивиране



Фиг. 2а. Група първични хондроцити през петия ден след култивиране

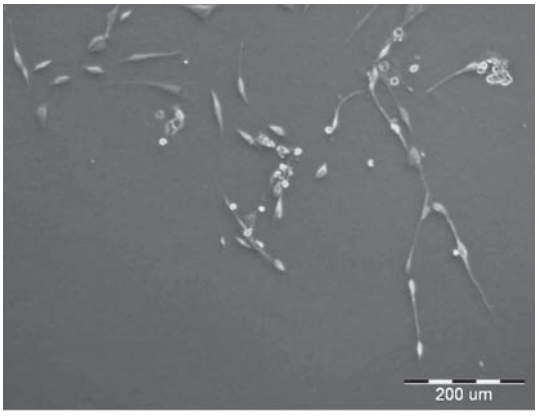


Фиг. 2б. Групи първични хондроцити през петия ден след култивиране. Може да се наблюдава начало на къси израстъци

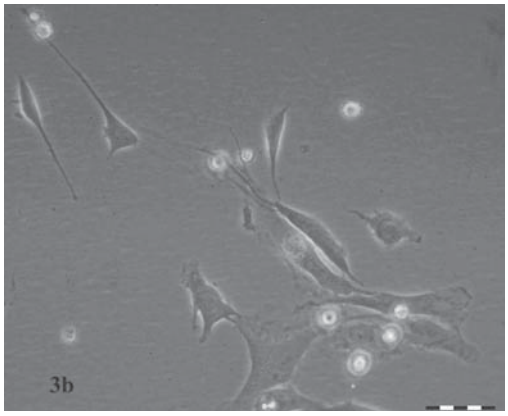
На 10-ия ден от култивирането на клетките преобладаваха тези с удължена биполярна форма (фиг. 3а). Рядко се срещат сферични и овални клетки. Намираха се такива със звездовидна форма и множество израстъци. Повечето клетки бяха единични, но имаше и такива на групи. Последните бяха с по-малко на брой израстъци, но имаха повече ламелоподобни периферни разширения (фиг. 3б).

На 15-ия ден от началото на експеримента наблюдавахме предимно клетки с удължена, вретеновидна форма, разклонени, с наличие на големи дълги израстъци със или без ламелоподобни разширения (фиг. 4а, б). Клетъчната мембрана бе гладка.

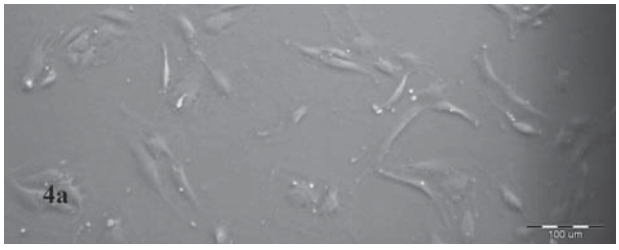
След 20-ия ден културите достигаха плътност около 50-60%, а към 25-ия-30-ия ден – 80-90%. Морфологията на клетките не се променяше съществено в сравнение с предходното наблюдение.



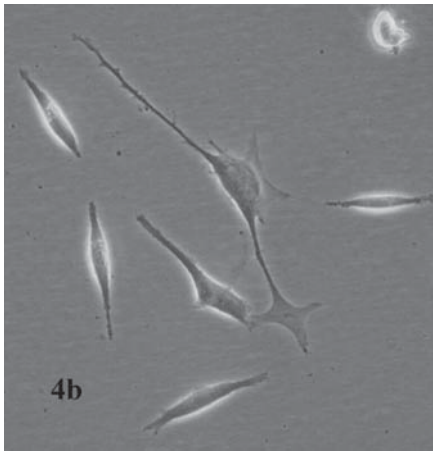
Фиг. 3а. Първични хондроцити с удължена форма от десетия ден след култивиране



Фиг. 3б. Първични хондроцити с удължена форма от десетия ден след култивиране. Ламелоподобни разширения (*)



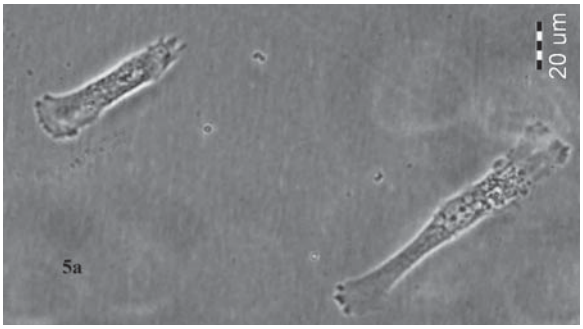
Фиг. 4а. Първични хондроцити с удължена, вретеновидна форма от петнадесетия ден след началото на култивацията



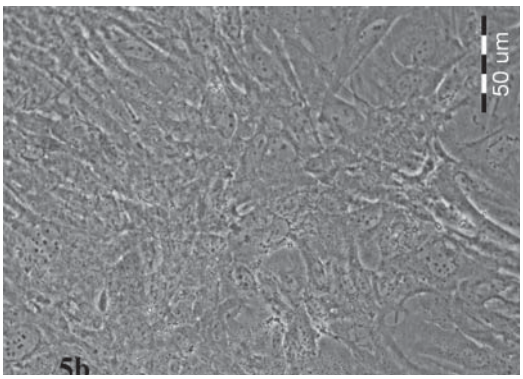
Фиг. 4б. Първични хондроцити с удължена, вретеновидна форма от петнадесетия ден след началото на култивацията

Клетъчни култури с клетки от хондросаркомна клетъчна линия SW 1353

Този тип клетки бяха удължени, с вретеновидна или цилиндрична форма. Формата не се променяше съществено с времето независимо от възрастта на културата. Броят на пасажите на клетките също не промени съществено тяхната форма. Израстъци почти не се наблюдаваха (фиг. 5а). За около седмица достигаха висока плътност на монослоя (фиг. 5б).



Фиг. 5а. Култури от хондросаркомни клетки SW 1353 с ниска плътност на монослоя



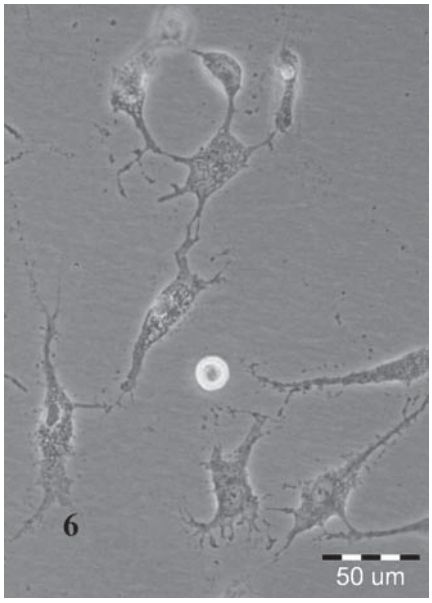
Фиг. 5б. Култури от хондросаркомни клетки SW 1353 с висока плътност на монослоя

***Добавянето на различни вещества към средата** води до промяна на растежа и развитието на клетките:*

Феталният серум беше основен стимулиращ фактор. Увеличаването на неговата концентрация подобряваше активността на клетките и тяхното размножение.

Глюкозата присъства в основния разтвор на културалната среда. Използвахме концентрации от 1.0 g/l и 4.5 g/l. По-високите концентрации на глюкоза засилваха растежа и делението на клетките и съкращаваха срока на достигане на висока плътност на монослоя.

Добавянето на дексаметазон към културалната среда в концентрации 100 ng/ml (0.25 μM) бе последвано от намаляване степента на пролиферация на клетките. Те никога не достигаха статус, подходящ за пасиране. Клетките се свиваха, израстъците бяха малко и къси. Клетките губеха вид на активни (фиг. 6).



Фиг. 6. Първични хондроцити, третирани с дексаметазон, с признаци на дегенерация

Когато към средата се прибавяше прогестерон в концентрации 20 μM, клетките не променяха вида си, но забавяха рязко размножението и по-бавно достигаха висока плътност на монослоя, подходящ за пасаж на културата.

Добавянето на инсулин (4 μM), натриев пируват (40 μg/ml), натриев селенит (4 μg/ml), B27 (2%) поддържаше добър пролиферативен растеж, без това да повлияе на вида на клетките.

При прилагане на оцветяване за протеогликани на клетки от хондросаркомната клетъчна линия много от тях показват наличие на протеогликани. Те са нервномерно разпределени в рамките на клетката и дори извънклетъчно. При първичните хондроцити тези клетки са много по-малко.

И двата типа клетки отделяха колаген тип 2, но при първичните хондроцити той е по-малко и с пасажа на клетките изчезва по-бързо.

ОБСЪЖДАНЕ

Хондроцитите са клетки, приспособени да съществуват в ограниченото пространство на лакуните на хрущялната тъкан, в тясно взаимодействие със заобикалящия екстрацелуларен матрикс. Изваден от хрущяла и култивирани in vitro, те променят своето развитие и започват клетъчна дедиференциация (Chen et al., 2003; Ushida et al., 2004; Furukawa et al., 2010). В нашите изследвания също доказваме, че първичните хондроцити променят диференциацията си, а именно: променят външната си морфология – удължават се и започват да приличат на фибробласти, а в по-късен етап и на фиброцити. Намалява секрецията на колаген тип 2 и протеогликани. Последните, имайки предвид основния спектър от секретирани биомолекули от първичните хондроцити, са представени най-вече от агрекан (Chen et al., 2003).

Хондросаркомната клетъчна линия SW 1353 е съставена от клетки със стандартизирани параметри, близки до хондроцитите (Gebauer et al., 2005). Тези клетки притежават гена COL2A1, който кодира проколаген 2. След допълнителни модификации той узрява до зрял втори тип колаген – основен структурен протеин на хрущялната тъкан (Bleasel et al., 1995; Ito et al., 2005). Според нашите резултати тези клетки отделят колаген тип 2. Това не се променя във времето или след клетъчен пасаж за разлика от първичните хондроцити, където с увеличаване броя на клетъчните пасажи намалява секрецията на колаген тип 2. SW 1353 хондросаркомните клетки произвеждат също и агрекан по подобие на първичните хондроцити (Sieron et al., 1993). Наред с това установяваме, че продукцията на този вид протеогликани е стабилна и постоянна.

В съвременните терапевтични концепции за дегенеративните и травматичните увреди на ставния хрущял през последните години се дискутира и имплантацията в ставата на получена in vitro триизмерна структура, съставена от изкуствен матрикс и вторично поселени в него хондроцити. Тези хондроцити могат да бъдат получени чрез диференциация и пролифереция от различен първоначален материал (Cole и D'Amato, 2001; Ilie et al., 2012). Основната цел на нашата работа беше получаването на хондроцити, които след включване в подходяща триизмерна структура да могат да изпълнят адекватно ролята на хрущялна тъкан, която

да бъде имплантирана на място в става. И двата използвани модела имат някои предимства, които ще трябва да се уточнят при бъдещи изследвания с подходящ триизмерен носител. Така например автоложните, първичните хондроцити са собствени клетки за организма, носещи същия генотип на клетките, и при евентуален контакт с имунната система не биха довели до отхвърляне на импланта. От друга страна обаче, те имат по-слаба секреция на колаген 2 и донякъде на протеогликани. При хондросаркомната клетъчна линия SW 1353 има клетки с различен генотип от организма приемник и затова по принцип биха били отхвърлени от имунната му система, ако има директен контакт с кръвта. Все пак хрущялната тъкан на ставата няма директен контакт с кръвоносните съдове и поради това считаме, че реакция на отхвърляне не следва да се очаква. За да се прецени кой от двата модела е по-перспективен, трябва да се направи опит в бъдеще за генериране на триизмерна структура с хондроцити и нейното вътреставно имплантиране.

Статията е написана като резултат от изследователски грант към Съвета по медицинска наука, при Медицински университет – София, по Договор № 30/2012 година, Проект № 41.

The article was written as a result of a research grant to the Council for Medical Science, Medical University – Sofia, under Contract № 30/2012 year Project № 41.

Библиография

1. Bleasel, J. F. et al. Type II procollagen gene (COL2A1) mutation in exon 11 associated with spondyloepiphyseal dysplasia, tall stature and pre-cocious osteoarthritis. – J. Rheumatol., **22**, 1995, 255-261.
2. Chen, G. et al. Redifferentiation of dedifferentiated bovine chondrocytes when cultured in vitro in a PLGA-collagen hybrid mesh. – FEBS Lett., **542**, 2003, № 1-3, 95-99.
3. Cole, B. J. et M. D'Amato. Autologous chondrocyte implantation. – Op. Tech. Orthop., **11**, 2001, № 2, 115-131.
4. Dawson, M. R. et al. Direct evidence for lineage-dependent effects of bone marrow stromal cells on tumor progression. – Am. J. Cancer Res., **1**, 2011, № 2, 144-154.
5. Furukawa, K. S. et al. Scaffold-free Cartilage. Tissue by Mechanical Stress Loading for Tissue Engineering. – In: Tissue Engineering, D. Eberli (Ed.).
6. Gebauer, M. et al. Comparison of the chondrosarcoma cell line SW1353 with primary human adult articular chondrocytes with regard to their gene expression profile and reactivity to IL-1β1. – OsteoArthritis Cartilage, **13**, 2005, 697-708.
7. Ilie, I. et al. Influence of nanomaterials on stem cell differentiation: designing an appropriate nanobiointerface. – Int. J. Nanomedicine, **7**, 2012, 221-2225.
8. Ito, H. et al. Guilty by association: some collagen ii mutants alter the formation of ECM as a result of atypical interaction with fibronectin. – J. Mol. Biol., **352**, 2005, 382-395.
9. Sieron, A. L. et al. Deletion of a large domain in recombinant human procollagen II does not alter the thermal stability of the triple helix. – J. Biol. Chem., **268**, 1993, 21232-21237.
10. Solchaga, L. A., K. J. Penick et J. F. Welterm. Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: tips and tricks. – Methods Mol. Biol., **698**, 2011, 253-278.
11. Tamai, N. et al. A new biotechnology for articular cartilage repair: subchondral implantation of a composite of interconnected porous hydroxyapatite, synthetic polymer (PLA-PEG), and bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). – OsteoArthritis Cartilage, **13**, 2005, № 5, 405-417.
12. Ushida, T. et al. Engineering approaches to regulate cell differentiation and tissue regeneration. – In: Biomechanics at Micro-and Nanoscale Levels Wada, H. (Ed.). World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., vol. 1, 2004, 91-99.