

SISTEMA COLTURALE TRIDIMENSIONALE PER LO STUDIO DELLA PATOLOGIA CARTILAGINEA *IN VITRO*

BORGHETTI P., DELLA SALDA L. (*), DE ANGELIS E.

*Ist. Anatomia Patologica, Facoltà di Medicina Veterinaria-PARMA;
(*). Dip. Sanità Pubblica Veterinaria e Paologia. Animale - Facoltà di
Medicina Veterinaria- BOLOGNA.*

RIASSUNTO. Gli Autori hanno studiato un sistema colturale in cui i condrociti isolati dalla cartilagine articolare di suino sono coltivati all'interno di un gel di alginato di sodio. Indagini microscopiche e ultrastrutturali confermano che i condrociti in tale sistema mantengono caratteristiche morfologiche (aspetto rotondeggiante, aggregazione in pseudo-lacune a coppie o come condroni) e funzionali (produzione di proteoglicani in ambito pericellulare, territoriale ed interterritoriale) tipiche dell'organizzazione cellulare e strutturale del tessuto cartilagineo *in vivo*. Inoltre si è analizzato il trasporto di un osmolita compatibile, la betaina, fenomeno precedentemente studiato in condrociti coltivati in adesione come risposta adattativa specifica del condrocita al trattamento iperosmolare; mentre nelle colture in adesione tale risposta si manifesta entro la prima settimana di coltura ma tende a ridursi nel tempo, nei condrociti coltivati in alginato essa si mantiene inalterata anche prolungando i tempi colturali.

Parole chiave: Condrociti - Coltura tridimensionale - Alginato - Iperosmolarità - Suino.

INTRODUZIONE

Diversi tipi di sistemi colturali sono stati utilizzati per lo studio della fisiopatologia del condrocita. La conoscenza di diversi aspetti della fisiologia del condrocita è stata possibile grazie all'uso di sistemi colturali in cui le cellule cartilaginee isolate dal tessuto sono coltivate ad alta densità ed in adesione su plastica (Kuettner et al, 1982; Solurshet al., 1982; Thonar et al., 1983). Il maggiore svantaggio di questo tipo di modello è rappresentato dal fatto che le cellule cresciute in adesione si mantengono fenotipicamente stabili (secrezione di proteoglicani e di molecole collagene tipiche della cartilagine) solo per poche settimane di coltura (Thonar et al., 1986). Successivamente i condrociti coltivati in monostrato possono rapidamente perdere il loro differenziamento assumendo una morfologia fibroblastoide e secernendo collagene tipo I, III e V (von der Mark, 1986).

Attualmente si stanno studiando metodi di coltura in cui i condrociti sono coltivati in un ambiente semi-solido (agarosio, alginato) che ricrea un microambiente spaziale simile al tessuto. In tali condizioni il fenotipo è mantenuto stabilmente e viene prodotta matrice con caratteristiche strutturali tipiche della cartilagine (Hauselmann et al., 1994).

In nostri precedenti studi l'applicazione del modello in monostrato, caratterizzato morfologicamente e funzionalmente, ci ha permesso di analizzare il comportamento del condrocita sottoposto a stress osmotico, condizione che si realizza normalmente e patologicamente *in vivo* sotto l'azione di forze meccaniche (Borghetti et al., 1995).

Condrociti coltivati ad alta densità hanno mostrato una rapida ed efficace risposta adattativa al trattamento iperosmolare (500 mOsm), in presenza nel medium di un osmolita compatibile, la betaina, che sembra essere assunto dalla cellula grazie all'attivazione di sistemi di trasporto specifici (dati in corso di pubblicazione). Al tempo stesso si è sospettato che tale risposta adattativa specifica all'iperosmolarità possa essere condizionata dal sistema colturale stesso o dai tempi di coltura potenzialmente in grado di influenzare la morfologia e/o il differenziamento del condrocita.

Nel presente lavoro si è studiato un sistema colturale tridimensionale (condrociti all'interno di alginato) allo scopo non solo di assicurare una stabilità fenotipica alle cellule, ma anche per valutare se tale coltura consenta il mantenimento della risposta adattativa allo stress osmotico a tempi lunghi di coltura.

MATERIALI E METODI

COLTURE CELLULARI

I condrociti sono isolati da frammenti di cartilagine prelevata, in condizioni sterili, dall'articolazione omero-radio-ulnare di suini di 10 mesi di età. I pezzi di cartilagine ottenuti sono sminuzzati finemente e lavati numerose volte in tampone fosfato salino (PBS). Dopo una preincubazione in pronase 0.2% per 1 ora, il tessuto è trattato con 0.25% collagenasi tipo IA per 2ore; tutte le fasi della digestione sono fatte in Dulbecco's Modified Eagle's medium (D-MEM) contenente penicillina (100U/ml) e streptomina (100µg/ml).

Il tessuto digerito è filtrato attraverso due successivi filtri di nylon di cui il primo con pori di 100µm ed il secondo di 20µm; la sospensione cellulare così ottenuta è quindi centrifugata, il supernatante eliminato ed il pellet di cellule lavato numerose volte con D-MEM supplementato col 10% di siero di vitello fetale (FCS).

I condrociti isolati sono risospesi in alginato di sodio (1.2% in NaCl 0.9%) alla densità di 4×10^6 cellule/ml di alginato, la sospensione così ottenuta è fatta cadere goccia a goccia con l'aiuto di una siringa con ago di 22G in una soluzione di CaCl₂ 102mM; le sfere che si formano sono lasciate alcuni minuti in tale soluzione e successivamente lavate tre volte con NaCl 0.9% e una volta con D-MEM, dove vengono lasciate per 10'; a questo punto le sfere sono trasferite in piastre con D-MEM al 10% di FCS.

Dopo 6 e 15 giorni di coltura, sulle cellule coltivate in alginato sono effettuate indagini morfologiche ottiche e ultrastrutturali ed è analizzato il trasporto di betaina indotto da trattamento iperosmolare (500 mOsm); i successivi risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti da colture di condrociti seminati su plastica ad alta densità e sottoposti ad analoghe indagini agli stessi tempi sperimentali.

TRATTAMENTO IPEROSMOLARE e MISURA DEL TRASPORTO DI BETAINA.

A 6 e 15 giorni di coltura, è stato misurato il trasporto di betaina in cellule sottoposte a trattamento iperosmolare (500 mOsm) per 24 ore in confronto a cellule mantenute in medium isosmolare (D-MEM 300 mOsm). L'aumento di osmolarità del medium è ottenuta con l'aggiunta di NaCl al D-MEM e misurata con osmometro (Wescor).

Dopo il trattamento, si è aspirato il medium e le sfere sono lavate una volta con 2ml di EBSSG a 37°C. Le cellule sono state quindi incubate per 20 minuti a 37°C nella medesima soluzione salina per permettere la completa deplezione del pool aminoacidico intracellulare.

Al termine dei 20 minuti, le sfere di alginato sono lisate con soluzione tampone contenente 50 mM di Citrato di Na e 50 mM di EDTA e le cellule liberate dall'alginato sono incubate per 10 minuti in EBSSG a 37°C contenente 0.1mM di betaina e 1 μ Ci/ml di ³H-Betaina.

Il trasporto è stato quindi bloccato con aggiunta di 2ml di EBSSG a 4°C a cui sono seguiti tre lavaggi sempre con la medesima soluzione salina a 4°C. Dopo aggiunta di TCA al 10% a 4°C per 10 minuti, si è raccolta la frazione acidosolubile e dopo aggiunta di liquido di scintillazione, la misura della radioattività è effettuata in uno scintillatore in fase liquida.

Le cellule sono poi solubilizzate con NaOH 0.2N per la determinazione del contenuto proteico tramite saggio Bio Rad di colorazione al Comassie blu R 250.

INDAGINI MORFOLOGICHE

Per l'analisi morfologica le colture sono lavate due volte con tampone cacodilato 0.1M pH 7.2, trattate con soluzione di CaCl₂ 55 mM per indurire l'alginato, e quindi fissate in 0.1M tampone cacodilato contenente 0,5% glutaraldeide-0.7% rutenio esamina tricloruro (RHT)-lisina 100mM per 30 minuti a 4 °C. Al termine della fissazione, le colture in alginato sono lavate alcune volte in tampone cacodilato e post-fissate con tetrossido di osmio diluito nel medesimo tampone a temperatura ambiente per circa 45 minuti, disidratate in serie di alcool crescenti ed incluse in resina Durcupan ACM. Sono approntate sezioni semifini colorate con il blu di toluidina e sezioni ultrafini, contrastate in acetato di uranile e tetrossido di piombo. L'osservazione di quest'ultime è stata effettuata con un microscopio elettronico a trasmissione Zeiss OM 109.

RISULTATI

INDAGINI AL MICROSCOPIO OTTICO

Al microscopio ottico i condrociti appaiono uniformemente inglobati all'interno delle sfere di alginato ad una concentrazione approssimativamente stimata intorno alle 6-7 x 10⁴ cellule (Fig. 1)

L'analisi delle sezioni semifini approntate per la microscopia elettronica evidenzia aspetti particolari del comportamento dei condrociti coltivati all'interno dell'alginato. I condrociti si presentano all'interno di pseudo-lacune, talora singolarmente, ma più frequentemente appaiati o in gruppi di tre o più cellule (Fig. 2).

Intorno alla lacuna che racchiude le cellule e tra le cellule stesse si evidenzia un alone metacromatico al blu di toluidina; la specificità della reazione istochimica e la fissazione applicata, che implica l'uso di rutenio esamina tricloruro allo scopo di preservare molecole polianioniche, testimonia della produzione di matrice da parte dei condrociti in ambito pericellulare e territoriale. Infatti questo alone presenta una zona più vicina alla cellula meno intensamente colorata e un bordo immediatamente più esterno decisamente metacromatico (freccia in Fig.2).

INDAGINI ULTRASTRUTTURALI

Le cellule poste in alginato da una settimana (Fig. 3) hanno una morfologia rotondeggiante od ovalare, la membrana citoplasmatica presenta alcune stroflessioni di lunghezza variabile, mentre nel citoplasma si rintracciano numerose gocce lipidiche di notevole dimensione, ed abbondante glicogeno. Ben evidenti appaiono l'apparato del Golgi, con numerose cisterne e vescicole, ed il reticolo endoplasmatico rugoso, le cui cisterne sono spesso dilatate per la presenza di materiale granuloso denso, di probabile natura proteica, al loro interno. I mitocondri appaiono ben strutturati. La cromatina nucleare si presenta normalmente addensata in piccoli aggregati, per lo più disposti attorno alla membrana nucleare.

Si nota la presenza di molecole proteoglicaniche nelle immediate vicinanze della membrana cellulare (Fig 4) e che tendono ad aumentare formando discreti aggregati procedendo verso il limite definito dal gel di alginato e tra le cellule appaiate (freccia in Fig. 3).

Si è notata la presenza, nelle zone in vicinanza di estroflessioni della membrana cellulare, di sottili fibrille disposte in piccoli fascetti e di orientamento casuale (Fig. 5). Di frequente riscontro è la presenza di condrociti disposti in gruppi di tre, quattro cellule (Fig. 6).

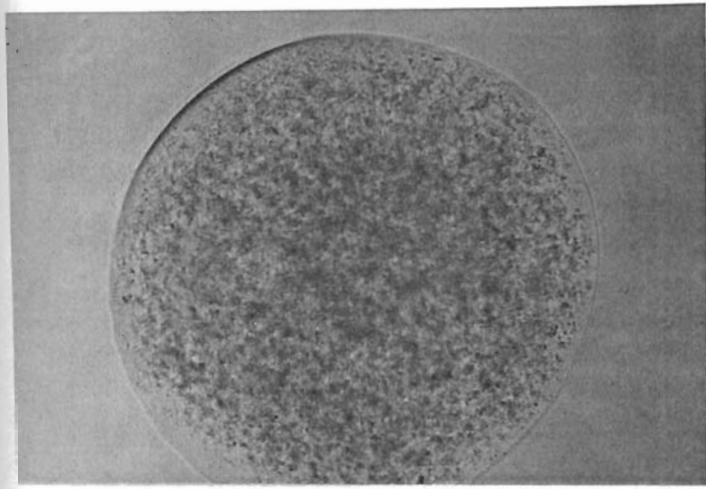


Fig. 1: Condrociti articolari di suino coltivati all'interno di sfere di alginato di sodio alla densità di $6-7 \times 10^4$ cellule per sfera.

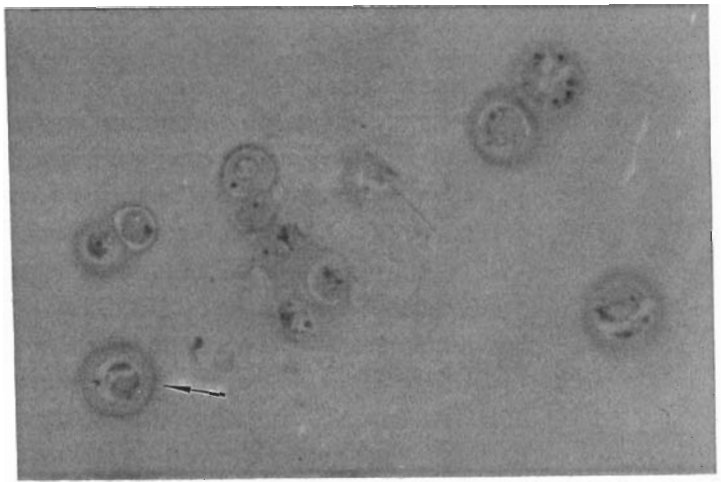


Fig. 2: Condrociti articolari di suino coltivati all'interno di sfere di alginato di sodio successivamente fissate ed incluse in resina epossidica. Sezioni semifini colorate con blu di toluidina. 600x.

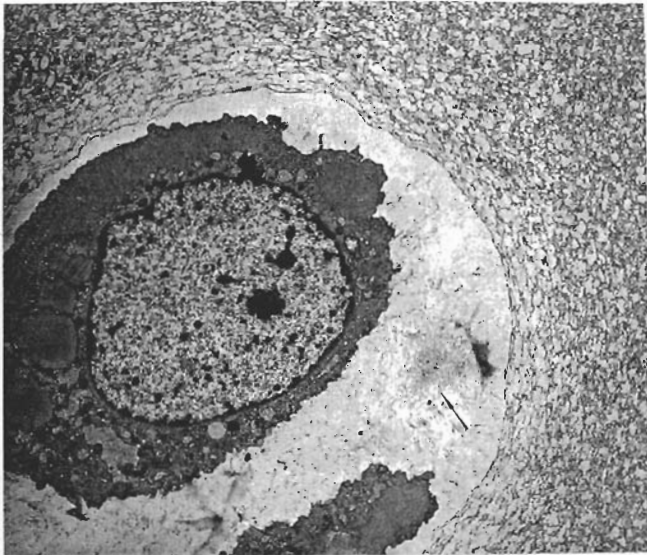


Fig. 3: Condrociti articolari all'interno di pseudo-lacune di alginato di sodio. Vedi testo. TEM 8.000x.

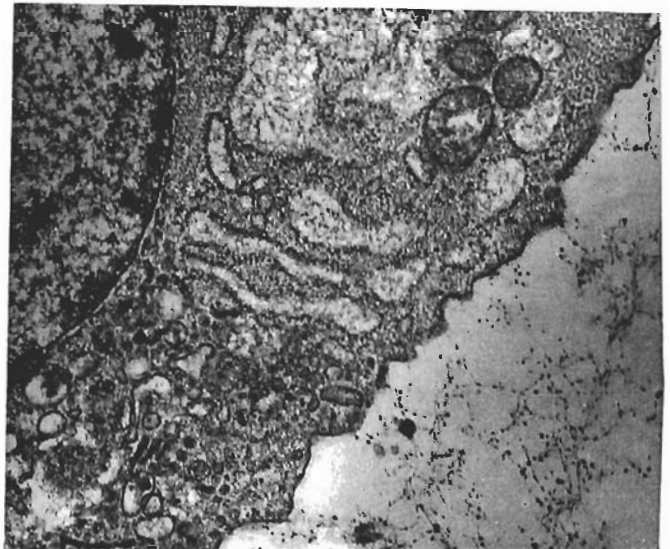


Fig. 4: Condrociti all'interno di sfere di alginato. Aggregati di proteoglicani in ambito pericellulare(vedi testo). TEM 54.000x.

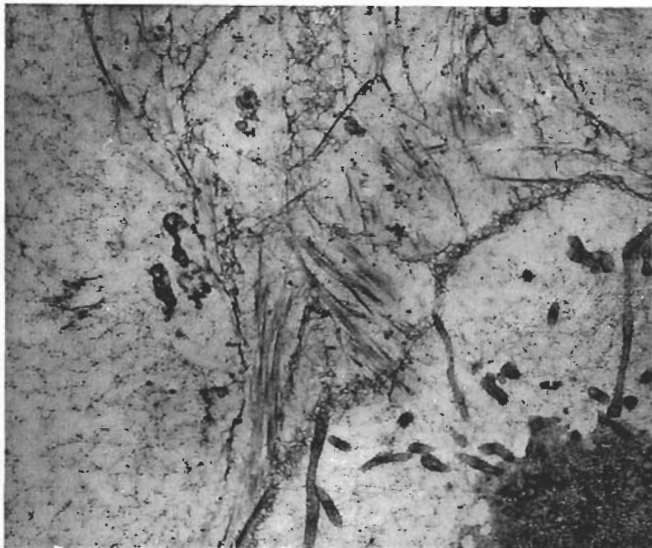


Fig. 5: Condrociti all'interno di sfere di alginato. Presenza di esili fibrille in vicinanza di estroflessioni cellulari. TEM 22.000x

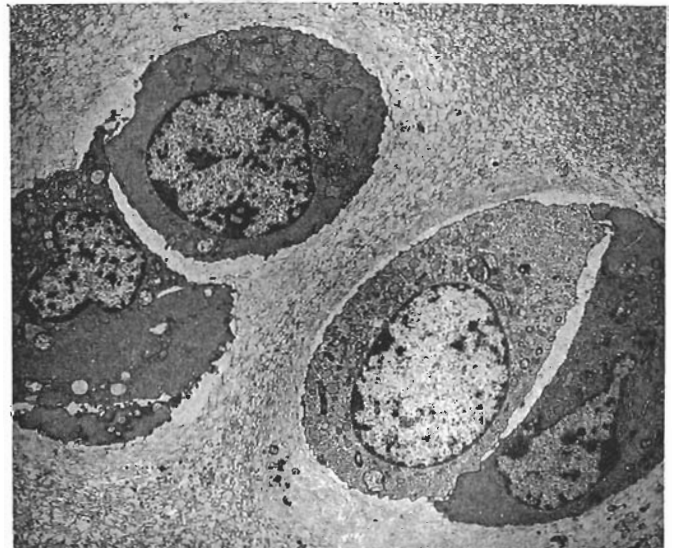


Fig. 6: Condrociti all'interno di sfere di alginato. Aggregazioni di condrociti con aspetto simile a condrone. TEM 5.400x

INDAGINI BIOCHIMICHE -

La Fig. 7 mostra il trasporto di betaina in condrociti seminati in adesione ed ad alta densità cellulare (A) ed in condrociti coltivati all'interno delle sfere di alginato (B) sottoposti a trattamento iperosmolare a 500 mOsm (T) per 24 ore rispetto alle stesse colture mantenute in medium isosmolare (C). Tale analisi è effettuata a 6 giorni e 15 giorni di coltura per entrambi i sistemi colturali.

A 6 giorni di coltura, in entrambi i sistemi colturali, il trattamento iperosmolare induce una risposta adattativa che si esprime con elevato incremento del trasporto di betaina nelle cellule trattate rispetto ai controlli.

A tempi colturali più lunghi tale comportamento appare differente tra i due sistemi colturali. Mentre nei condrociti cresciuti su plastica l'incorporazione di betaina indotta dall'iperosmolarità è fortemente ridotta, nei condrociti cresciuti in sfere di alginato tale risposta si mantiene costante ed invariata anche a 15 giorni di coltura.

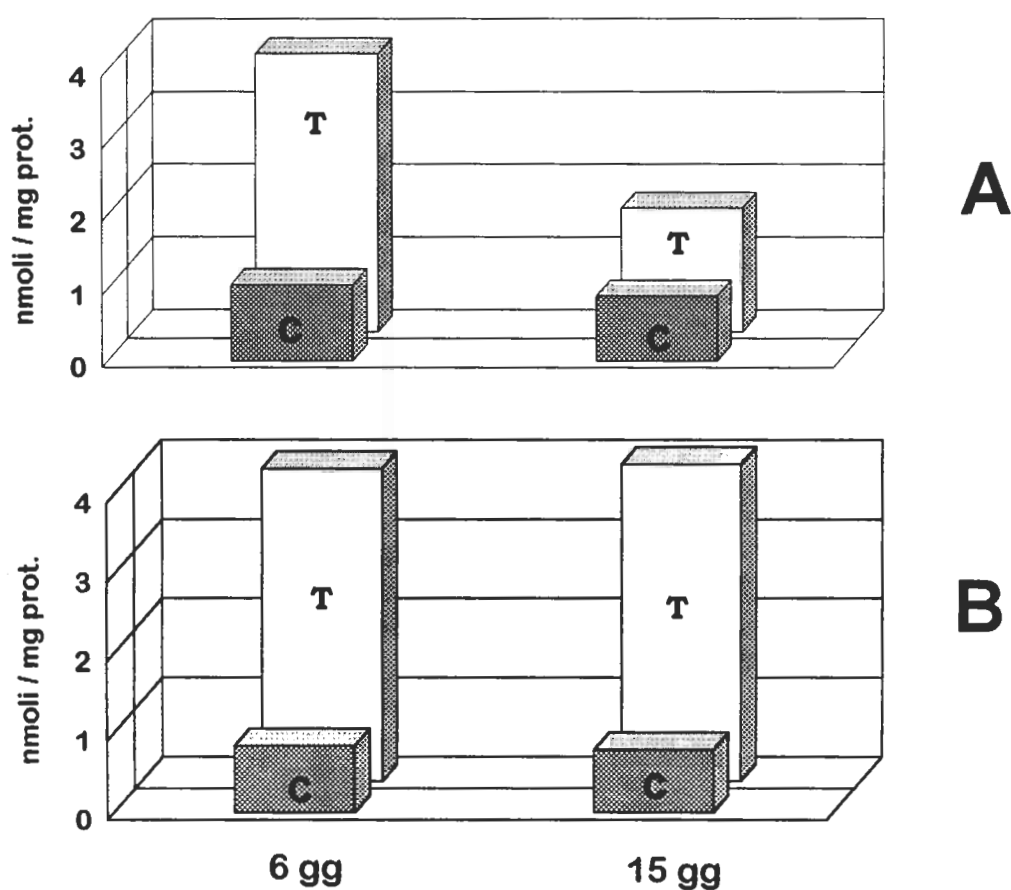


Fig. 7: Trasporto di betaina in condrociti cresciuti in adesione ed ad alta densità di semina (A) e in condrociti coltivati in alginato (B): entrambe le colture sono sottoposte a trattamento iperosmolare (500 mOsm) per 24 ore dopo 6 e 15 giorni di coltura.

DISCUSSIONE

La caratterizzazione fenotipica del condrocita in coltura si basa sul mantenimento di aspetti morfologici e funzionali ben definiti da diversi autori (von der Mark, 1986, Benya et al., 1982). Un aspetto fondamentale è l'associazione di una morfologia rotondeggiante con la produzione di macromolecole tipiche della matrice cartilaginea.

Confrontando i risultati di nostri precedenti lavori (Borghetti et al., 1995) effettuati su condrociti coltivati ad alta densità, sono emersi i seguenti risultati. Le cellule coltivate in adesione mantengono caratteristiche fenotipiche morfofunzionali stabili almeno nella prima settimana di coltura: tali aspetti sono caratterizzati da coltura a pluristrato, con aspetti eterogenei delle cellule che si presentano sia di aspetto rotondeggiante che di aspetto allungato e con intensa produzione di matrice. La stabilità di tali caratteristiche fenotipiche è però fortemente influenzata dal prolungamento dei tempi di coltura per cui dopo due o più settimane o, a maggior ragione, in coltura secondaria si assiste ad un dedifferenziamento del condrocita contraddistinto dall'acquisizione di una morfologia fibroblastoide e dalla drastica riduzione della produzione di matrice extracellulare specifica (Borghetti et al., 1995).

Al contrario la coltura in alginato ha permesso, almeno nel periodo di tempo osservato nel presente lavoro (tre settimane), il mantenimento delle caratteristiche fenotipiche condrocitarie sopra descritte: morfologia rotondeggiante, produzione di matrice proteoglicanica e di collagene. Inoltre si è evidenziato che l'applicazione di tale sistema colturale permette il mantenimento o il realizzarsi di aspetti di organizzazione cellulare e di interazioni matrice-cellula simili a quelli descritti istologicamente o ultrasrtutturalmente per la cartilagine articolare:

- 1) le singole cellule od i gruppi di cellule producono matrice proteoglicanica che caratteristicamente si dispone spazialmente in zone sovrapponibili a quelle descritte nel tessuto, nelle immediate vicinanze della cellula (zona pericellulare) e progressivamente più distanti e tra le cellule appaiate (zona territoriale);
- 2) con l'aumentare del tempo di coltura si è osservato un aumento di dimensioni delle molecole proteoglicaniche, che tendono ad essere presenti anche in zone più distanti dalla pseudolacuna, all'interno dell'alginato;
- 3) il riscontro di fibrille verosimilmente di collagene in vicinanza di estroflessioni plasmacellulari è un aspetto morfologico descritto nel tessuto (Hunziker, 1992) e caratteristico della zona territoriale;
- 4) analogamente al tessuto si rinvengono gruppi di cellule circondate da matrice con caratteristiche morfologiche simili ai condroni.

Il dato biochimico relativo al trasporto di betaina in seguito a trattamento iprosmolare permette di fare alcune considerazioni. Nelle cellule coltivate in adesione, la riduzione della risposta adattativa specifica del condrocita all'iperosmolarità con l'aumentare del tempo colturale può essere soltanto legata a modificazioni morfologiche (acquisizione di morfologia fibroblastoide) intrinseche a tale sistema colturale ma potrebbe anche essere espressione della perdita del differenziamento fenotipico. Viceversa le cellule coltivate in sfere di alginato mantengono tale capacità di risposta. Ciò potrebbe rappresentare un ulteriore conferma e aspetto caratteristico della stabilità fenotipica in tale sistema

colturale. Inoltre l'utilizzazione del sistema tridimensionale offre la possibilità di studiare gli effetti dello stress osmotico sull'attività metabolica del condrocita anche per trattamenti prolungati o ciclici nel tempo simulando gli effetti delle situazioni meccaniche che si verificano *in vivo*.

TRIDIMENSIONAL CULTURAL SYSTEM TO STUDY THE DEGENERATIVE PATHOLOGY OF CARTILAGE *IN VITRO*

SUMMARY. A cultural system based on the entrapment of chondrocytes within alginate was studied. Microscopic and ultrastructural investigations confirmed that the chondrocytes maintained morphological (round shape, paired aggregation and/or chondrons-like structures) and functional (proteoglycan production in pericellular, territorial and interterritorial compartments) typical aspects of the cartilaginous tissue *in vivo*. Furthermore, the transport of a compatible osmolyte, the betaine, a process previously characterized in chondrocytes grown on plastic as a typical adaptive response of chondrocyte to the hyperosmolar treatment, was studied. In chondrocytes cultured on plastic, the uptake of betaine, induced by the hyperosmolar treatment, was evident within the first week of culture, then it tended to reduce; on the contrary in chondrocytes grown within alginate this response was still maintained after two week of culture.

Key words: Chondrocytes - Tridimensional culture - Alginate - Hyperosmolarity - Swine.

BIBLIOGRAFIA

1. Benya P.D., Shaffer J.D. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. (1982) *Cell*, **30**, 215-224.
2. Borghetti P., Della Salda L., De Angelis E., Maltarello M.C., Petronini P.G., Maraldi N.M., Cabassi E., Marcato P.S., Borghetti A.F.. Adaptive response to osmotic stress in pig articular chondrocytes. (1995) *Tissue & Cell*, **27**(2), 173-183.
3. Hauselman H.J., Russel J.F., Mok S.S., Schmid T.M., Block J.A., Aydelotte M.B., Kuettner K.E., Thonar E. J-M.A. (1994). Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J. Cell. Sci.*, **107**, 17-27.
4. Hunziker E.B.. Articular cartilage structure in human and experimental animals (1992). In Kuettner K.K., Schleyerbach R., Peyron J.G., *Articular cartilage and osteoarthritis.*, 1992, Raven Press, New York; 183-199.
5. Kuettner K.E., Pauli B.U., Gall G., Memoli V.A., Schenk R.K. (1982). Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. I. Isolation, culture characteristics and morphology. *J.Biol. Cell.* , **93**, 743-750.
6. Solursh M, Linsenmayer T.F., Jensen, K.L.(1982) Chondrogenesis from single limb mesenchyme cells. *Dev.Biol.*, **94**, 259-264.
7. Thonar E. J-M. A., Buckwalter J.A., Kuettner K.E. (1986). Maturation-related differences in the structure and composition of proteoglycans

synthesized by chondrocytes from bovine articular cartilage. *J. Biol. Chem.*, **261**, 2467-2474.

8. Thonar E. J-M. A., Lohmander L.S., Kimura J.H., Fellini S.A., Yanagishita, Hascall V.C. (1983). Biosynthesis of O-linked oligosaccharides on proteoglycans by chondrocytes from the Swarm rat chondrosarcoma. *J. Biol. Chem.*, **258**, 11564-11570.
9. von der Mark K. (1986). Differentiation, modulation and dedifferentiation of chondrocytes. In: Kuhn K., Krieg T eds., *Rheumatology*, vol. 10, Basel:Karger, 1986; 272-315.