

# **EFFETTO DEL PENTOSAN POLISOLFATO (PPS) SU COLTURE PRIMARIE DI CONDROCITI ARTICOLARI DI CAVALLO (Effects of pentosan polysulphate on primary cultures of articular chondrocytes of horse)**

Borghetti P., De Angelis E., Martini F.M.(\*)

*Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria;*

*Istituto di Clinica Chirurgica Veterinaria(\*), Facoltà di Medicina Veterinaria - Parma*

## **Introduzione**

Argomento di grande attualità, sia in campo umano che animale, è lo studio sull'applicazione in corso di osteoartrite di farmaci cosiddetti "condroprotettivi". Diverse sostanze vengono incluse in tale definizione per il fatto che mostrano effetto diretto sul metabolismo cartilagineo in senso anabolico e/o anticatabolico o antidegradativo (6).

Il pentosan polisolfato (PPS), conosciuto da tempo per le sue proprietà antitrombotiche e antilipidemiche, negli ultimi anni ha dimostrato effetti anabolici ed anticatabolici sul tessuto cartilagineo in vivo ed in vitro oltre che effetti stimolatori sulla produzione di acido ialuronico ed inibitori sulla risposta leucocitaria infiammatoria. Nonostante tale potenzialità terapeutica nel trattamento dell'osteoartrite, valutata in diversi studi nell'uomo e in certe specie animali (coniglio, ratto, cane) (4,5,6,7,8), nella specie equina rimangono estremamente scarsi i lavori sperimentali relativi alla valutazione della molecola *in vivo* e soprattutto *in vitro*.

Si è voluto pertanto analizzare gli effetti del PPS in vitro utilizzando modelli di colture primarie di condrociti articolari di cavallo. I dati del presente lavoro riguardano preliminari studi in cui si sono analizzati alcuni parametri generali di biologia cellulare (sintesi proteica e attività proliferativa) nell'ottica di una iniziale valutazione tossico-metabolica della molecola in funzione di un ampio range di sue concentrazioni.

## **Materiali e metodi**

### *Colture primarie di condrociti articolari*

Il tessuto cartilagineo articolare è stato ottenuto da articolazioni metacarpo-falangee di cavalli di età compresa tra 4-6 anni regolarmente macellati; sono state utilizzate solo articolazioni senza alcun tipo di lesione macroscopicamente evidenziabile. La cartilagine articolare, prelevata in condizioni sterili, è stata finemente sminuzzata e

raccolta in medium (D-MEM) contenente penicillina (100 U/ml), streptomina (100 µg/ml) e anfotericina B (2.5 µg/ml) a 37°C. Dopo incubazione in 0,1 % di pronasi (Sigma) per 1 ora, il tessuto cartilagineo è stato digerito con collagenasi tipo IA allo 0.2% (Sigma) in D-MEM per 2 ore a 37°C. Il materiale digerito è stato filtrato attraverso due filtri successivi rispettivamente di 100 e 20 µm e la sospensione cellulare così ottenuta è stata centrifugata a 1500 rpm per 10 min. Il pellet cellulare è stato lavato diverse volte con D-MEM più 10% di FCS (fetal calf serum) (GIBCO) ed i condrociti ottenuti sono stati seminati in D-MEM più 10% FCS ad alta densità ( $15 \times 10^4 / \text{cm}^2$ ) per la valutazione della sintesi proteica ed a media densità ( $5 \times 10^4 / \text{cm}^2$ ) per la proliferazione cellulare in vassoi multipozzetto ( $4 \text{ cm}^2 / \text{pozzetto}$ ).

### ***Trattamento con pentosan polisolfato (PPS)***

Le colture di condrociti dopo la semina sono state coltivate in D-MEM più 10% di FCS per alcuni giorni. Successivamente le colture sono state trattate con medium completo senza (controlli) o contenente pentosan polisolfato alle concentrazioni di 1 • g/ml, 10 • g/ml, 100 • g/ml e 200 • g/ml per periodi di tempo indicati nei singoli esperimenti.

### ***Proliferazione cellulare***

La proliferazione cellulare è stata valutata in colture di condrociti seminati a media densità per un periodo di trattamento di 7 giorni iniziato 2 giorni dopo la semina (giorno 0 in Fig.1) della coltura primaria. Al 3° giorno di trattamento è stata somministrazione medium completo fresco (D-MEM + 10% di FCS) a tutte le colture. Le cellule sono state staccate enzimaticamente (0,1% pronasi e 0,1% collagenasi) e contate in camera di Burker dopo 1, 2, 4 e 7 giorni di trattamento.

### ***Velocità di sintesi proteica***

La velocità di sintesi proteica è stata valutata in colture di condrociti trattati meno con PPS dopo una settimana di coltura ed è stata come incorporazione di  $^3\text{H}$ -leucina (0.8mM; 2 µCi/ml) (Amersham,Bucks, U.K.) durante un incubazione di 30' delle cellule in medium completo. Al termine di tale incubazione, il tappeto cellulare è stato lavato per tre volte con una soluzione salina (EBSSG) a 4°C e le macromolecole sono precipitate con acido tricloroacetico (TCA) al 10% e a 4°C. Il precipitato è poi dissolto in NaOH 0,2N e la radioattività presente nella frazione acido-insolubile è determinata per mezzo di uno scintillatore in fase liquida. Il contenuto di proteine è determinato con il metodo Bio-Rad (1).

## Risultati

La Fig. 1 mostra i risultati relativi all'attività proliferativa di condrociti articolari coltivati per una settimana in presenza o assenza (controlli) di PPS nel medium di coltura: le colture trattate con 1 e 10  $\mu\text{g/ml}$  di PPS non mostrano differenze nel ritmo proliferativo, né come numero totale di cellule ai diversi punti sperimentali né come efficacia di adesione al substrato (valutabile nei primi 4 giorni di coltura), né come capacità di rispondere allo stimolo mitogeno dovuto alla somministrazione di medium completo fresco (giorno 0 e giorno 4 del periodo di trattamento). Le colture trattate con 100 e 200  $\mu\text{g/ml}$  di PPS raggiungono dopo 7 giorni di trattamento un numero cellulare inferiore ai controlli; questo fenomeno potrebbe dipendere più da un problema di interferenza del PPS sull'adesione alla plastica colturale (effetto già presente nelle prime 24 ore e persistente anche al 2° giorno di trattamento nelle colture esposte a 200  $\mu\text{g/ml}$  di PPS) e conseguente parziale distacco di cellule piuttosto che ad un effetto inibitorio diretto nelle successive fasi proliferative. Alla concentrazione più elevata (200  $\mu\text{g/ml}$  di PPS) appare evidente un certo effetto inibitorio anche sull'attività proliferativa soprattutto come risposta allo stimolo mitogeno del medium fresco.

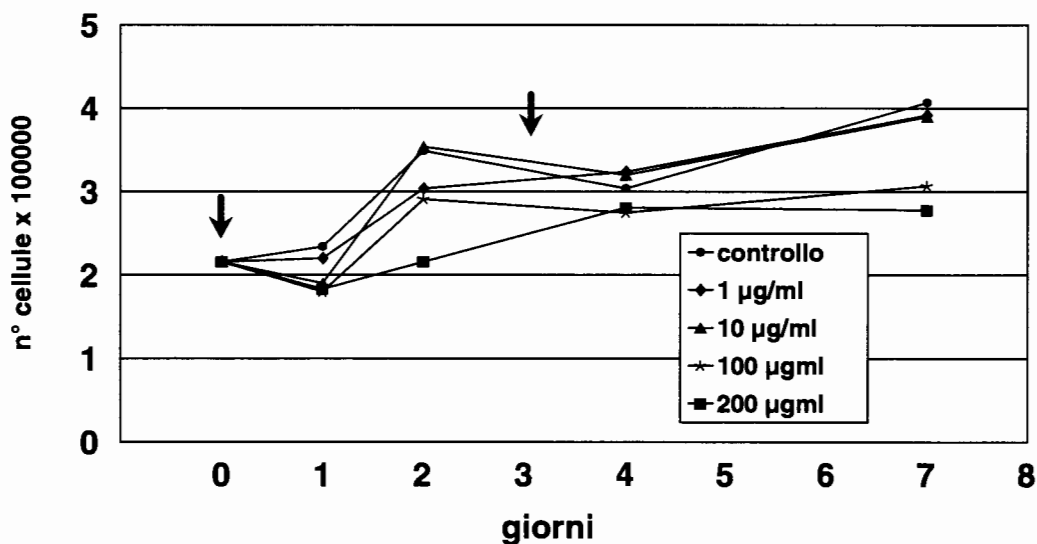


Fig. 1: Curve di proliferazione di condrociti articolari di cavallo coltivati per 7 giorni in assenza (controllo) o presenza di 1, 10, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$  di PPS. La freccia indica il giorno di somministrazione di medium completo.

I dati relativi alla velocità di sintesi proteica delle colture di condrociti articolari mostrano un comportamento metabolico del condrocita in risposta alla presenza di PPS abbastanza simile nelle diverse concentrazioni di PPS utilizzate almeno per

quanto riguarda le concentrazioni più elevate. Si assiste ad un incremento della velocità di sintesi proteica a tempi brevi di trattamento (24 ore) mentre tale fenomeno tende successivamente a stabilizzarsi su valori decisamente più bassi ma sempre leggermente superiori alle colture di controllo.

L'incremento della sintesi proteica alle 24 ore di trattamento appare del tutto simile nelle colture trattate con 10, 100 e 200  $\mu\text{g/ml}$  di PPS (Fig. 2 e 3) mentre appare più limitato in quelle trattate con 1  $\mu\text{g/ml}$  di PPS (Fig. 1).

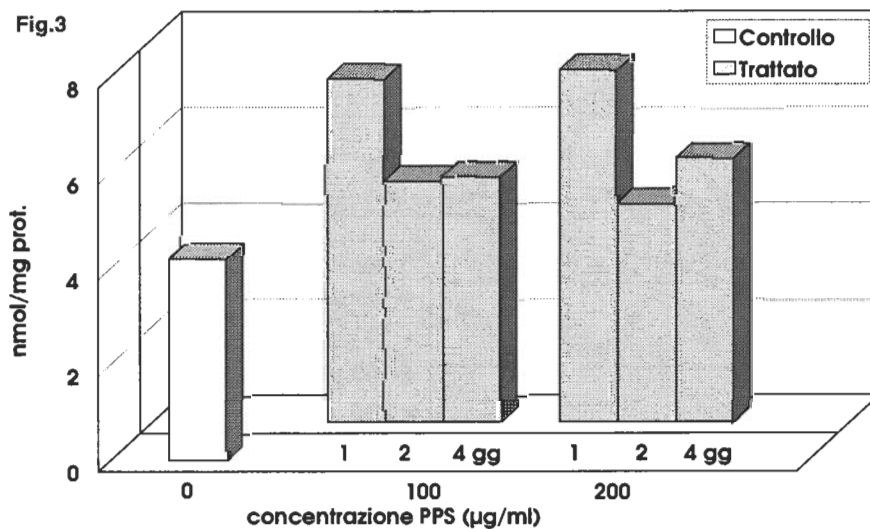
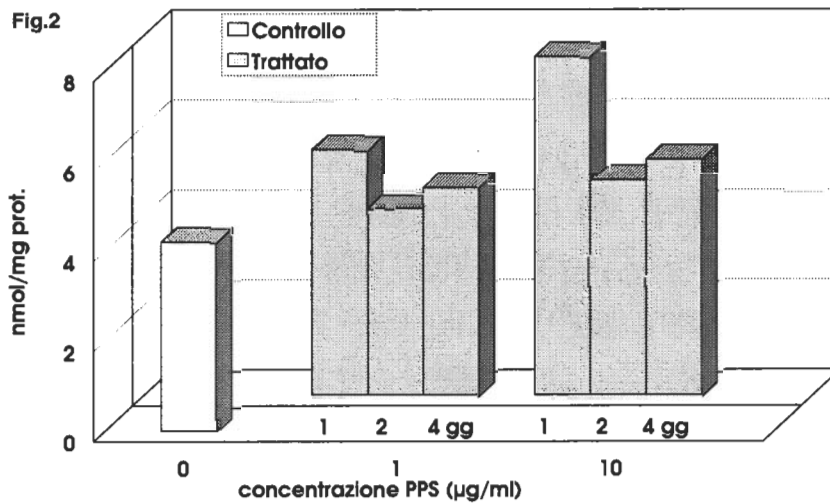


Fig. 2 e 3: Velocità di sintesi proteica in condrociti articolari di cavallo dopo 1, 2, 4 giorni in di trattamento a 1 e 10  $\mu\text{g/ml}$  (Fig.2) e 100 e 200  $\mu\text{g/ml}$  (Fig.3)

## Discussione

Dai risultati ottenuti seppur preliminari e limitati ad una valutazione di parametri generali di fisiologia cellulare, si possono desumere alcune importanti considerazioni sull'influenza che il pentosan polisolfato (PPS) può avere sul metabolismo del condrocita articolare di cavallo *in vitro*.

Innanzitutto non si sono rilevati effetti dannosi sull'attività proliferativa e di sintesi proteica utilizzando tempi di trattamento di una certa durata e un ampio range di concentrazioni di PPS. Solo a concentrazioni molto elevate (200 µg/ml) si può assistere ad un certo effetto negativo sull'adesione cellulare *in vitro* e ad un rallentamento del ritmo proliferativo con il perdurare del trattamento. Inoltre l'effetto anabolico sulla velocità di sintesi proteica appare indipendente dalle concentrazioni della molecola oltre i 10 µg/ml.

Su tale base si può affermare che dosaggi intorno ai 10 µg/ml possono già risultare particolarmente efficaci e privi di effetti potenzialmente dannosi; tale riscontro trova analogie nei dati di altri autori, seppur in altri sistemi cellulari (2,3).

Altra considerazione riguarda l'efficacia del trattamento nel tempo con mantenimento di un effetto anabolico almeno fino al 4° giorno di trattamento.

Entrambi i dati, se confermati da analoghi riscontri nelle sintesi macromolecolari più specifiche (es. collagene e proteoglicani) e per tempi più lunghi, potranno fornire una importante base di valutazione per la somministrazione del PPS *in vivo*.

## Bibliografia

- 1) Borghetti P., Della Salda L., De Angelis E., Maltarello M.C., Petronini P.G., Cabassi E., Marcato P.S., Maraldi N.M., Borghetti A. F.. Adaptive cellular response to osmotic stress in pig articular chondrocytes. *Tissue & Cell* (1995), 27, 173-183.
- 2) Collier S., Ghosh P. Evaluation of the effects of antiarthritic drugs on the secretion of proteoglycans by lapine chondrocytes using a novel assay procedure. *Ann Rheum Dis*, 1989, 48, 372-381.
- 3) Costeseque R., Emonds-Alt X., Breliere J.C.: Polysulphated polysaccharides: an *in vitro* study of their effects on proteoglycan biosynthesis by articular chondrocytes. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1986, 282, 196-208.
- 4) Francis DJ, Forrest MJ, Brooks PM: Retardation of articular cartilage degradation by glycosaminoglycan polysulfate (Arteparon), pentosan polysulfate (SP54), and DH4OJ in the rat air pouch model. *Arthritis Rheum.*, 1989, 32, 608-616.

- 5) Francis DJ, Hutadilok N, Kongtawelert P: Pentosan polysulphate and glycosaminoglycan polysulphate stimulate the synthesis of hyaluronan in vivo. *Rheumatol. Int.*, 1993, 13, 61-64.
- 6) Little C, Ghosh P: Potential use of pentosan polysulphate for treatment of equine joint disease. In "McIlwraith and Trotter: Joint disease in the horse. WB Saunders Company, 1996, 281-292.
- 7) Rogachefsky R.A., Dean D.D., Howell D.S., Altman R.D. Treatment of canine osteoarthritis with insulin-like growth factor (IGF-1) and sodium pentosan polysulfate. *Osteoarthritis-Cartilage*, 1993, 1, 105-114.
- 8) Smith MM, Ghosh P, Numata Y: The effects of orally administered calcium pentosan polysulphate on inflammation and cartilage degradation produced in rabbit joints by intra-articular injection of a hyaluronate-polylysine complex. *Arth. Rheum.*, 1993, 37,125-136.