

STUDIU EXPERIMENTAL PRIVIND CREȘTEREA CONDROCITARĂ IN VITRO SI POSIBILITATILE DE UTILIZARE A CONDROCITELOR IN PATOLOGIA ORTOPEDICA

A IVANESCU¹, R MELINTE², A SOLYOM², L MORARU³, DANA GHIGA⁴, KLARA BRANZANIUC¹

1 – Disciplina de Anatomie si Embriologie, Universitatea de Medicina si Farmacie Targu Mures

2 – Clinica Ortopedie I, Spitalul Clinic Judetean de Urgenta Tg-Mures

3 –Clinica de Chirurgie Cardiovasculara ,Spitalul Clinic Judetean de Urgenta Tg-Mures

4 – Disciplina Metodologiei Cercetarii Stiintifice Medicale ,Universitatea de Medicina si Farmacie Targu Mures

Rezumat

Introducere. Cartilajului articular are o capacitate intrinsecă slabă de auto-reparare, datorită lipsei unor mecanisme inerente de reparație la nivelul cartilajului matur. Scopul studiului este de a izola și crește pe medii de cultură a condrocitelor umane, necesare transplantului autolog de condrocite, și de a observa creșterea condrocitară. Material și metodă. S-a efectuat un studiu experimental in vitro pentru a observa creșterea celulară pe medii de cultură a condrocitelor. Condrocitele s-au obținut de la nivelul articulației genunchiului din biopsia meniscului. Probele obținute au fost disociate în tripsină 0,25% pentru o oră, urmată de o disociere celulară în collagenază 0,1% la 37°C pentru 12 ore. La celulele izolate s-a adăugat mediul DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Sedimentul a fost resuspendat în mediu DMEM suplimentat cu albumină umană 10% și antibiotice (penicilină 0,1 mg/ml, gentamicină 0,05 mg/ml). Celulele au fost însămânțate la o densitate de 2x10⁵ celule/ml pe plăci Petri de 100 mm, iar apoi incubate în atmosferă umidificată de CO₂ 5% la 37°C. Rezultate. Atunci când s-a folosit mediu DMEM suplimentat cu albumină umană 10%, rata proliferării celulară a fost bună. Cea mai mare rată de proliferare celulară s-a observat în mediu DMEM suplimentat cu IGF-I. Discuții. În ceea ce privește creșterea experimentală in vitro a condrocitelor, experimentul nostru a arătat o arhitectură tridimensională a structurii celulelor. Studiul densității celulare finale a arătat că suplimentarea mediului de cultură cu IGF-I a indus cea mai mare rată de proliferare celulară, urmată îndeaproape de suplimentarea cu albumină umană. Concluzii. Datele noastre arată că obținerea unui număr suficient de condrocite necesită o perioadă lungă de timp, procesul fiind stimulat prin suplimentarea cu proteine și mai ales de IGF-I.

Cuvinte cheie: transplant autolog, cultură celulară in vitro, DMEM, IGF-1.

Experimental study on the in vitro condorcitary growth and the possible use of condrocites in orthopaedical pathology

Abstract

Introduction. Articular cartilage has a poor intrinsic capacity for self-repair, due to the lack of inherent mechanisms of repair in mature articular cartilage. The aim of the study was to isolate and culture human chondrocytes for autologous transplantation and to observe the chondrocytes growth. Material and method. We conducted an in vitro experimental study to observe the chondrocytes growth. Chondrocytes were obtained from meniscal biopsy of the knee joint. The obtained specimens were digested with 0.25% trypsin for one hour, followed by digestion with 0.1% collagenase for 12 h at 37 °C. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) was added to the released cells. The pellet was resuspended in DMEM supplemented with 10% human albumin, and antibiotics (penicillin 0.1 mg/ ml, gentamycin 0.05 mg/ml). The cells were seeded at a density of 2×10^5 cells/ml in 100 mm Petri dishes and were incubated in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. Results. In case of DMEM supplemented with 10% human albumin, the cell proliferation rate was good. In DMEM also supplemented with IGF-1, chondrocytes presented the highest proliferation rate. Discussions. Regarding the chondrocytes experimental growth in vitro our experiment showed a tridimensional architecture of the cells structure. The study of the final cell densities revealed that IGF-1 supplement induced the highest proliferation rate, closely followed by human albumin. Conclusions. Our data reveal that obtaining a sufficient number of chondrocytes requires a long period of time, the process being stimulated by protein supplementation and especially by IGF-1 addition.

Keywords: autologous transplantation, in vitro culture cell, DMEM, IGF-1.

Introducere

Cartilajul articular este un țesut conjunctiv specializat care permite mișcarea lină fără fricțiune a articulațiilor diartrodiale și este compus dintr-un număr relativ mic de celule (condrocite) încorporate într-o abundență de matrice extracelulară. Matricea extracelulară este compusă în principal din collagen tip II, proteoglicani, apă și în cantitate mai mică din alte tipuri de collagen și proteine noncolagenice [1].

Cartilajului articular are o capacitate intrinsecă slabă de auto-reparare [2], datorită lipsei unor mecanisme inerente de reparație la nivelul cartilajului matur [3].

Defectele cartilaginoase duc la creșterea nivelului durerii și la pierderea mobilității datorită limitării mișcărilor ducând astfel la diminuarea calității vieții [4].

Etiologia exactă și incidența defectelor condrale nu sunt nici astăzi pe deplin stabilite. Evenimentele traumatice și entitățile de dezvoltare, cum ar fi osteocondrita disecantă (OCD) predomină la grupele de vârstă mai tânără: hemartrozele traumatice la atleții

cu leziuni la nivelul genunchiului sunt asociate cu defecte condrale într-o proporție până la 10 cazuri, incidența leziunilor de tip osteocondrită disecantă a fost estimată la 30-60 de cazuri la 100.000 persoane [6]. Mai multe studii au arătat un grad ridicat de leziuni condrale (gradul Outerbridge III și IV) la 5-11% din pacienții tineri (mai tineri de 40 de ani) și până la 60 % la grupurile cu vârste mai înaintate [7-9].

Studiile clinice arată o superioritate semnificativă a microfracturării, transplantului osteocondral ca și a implantării autologe de condrocite ca metodă de tratament în cazul defectelor condrale cu grosime totală [10-12].

Scopul studiului este de a izola și crește pe medii de cultură a condrocitelor umane, necesare transplantului autolog de condrocite, și de a observa creșterea condrocitară.

Material și metodă

Conceptul transplantului autolog de condrocite se bazează pe o procedură în trei pași: dintr-o biopsie de cartilaj hialin condrocitele sunt izolate și înmulțite în

vitro. Scopul principal al culturii celulare in vitro inițiale de condrocite este de a crește numărul de celule cu scopul de a oferi un număr suficient pentru a umple un defect focal al cartilajului articular. Pentru a îndeplini acest scop, condrocitele sunt izolate din felii mici de cartilaj recoltat artroscopic de la nivelul genunchiului lezat dintr-o zonă sănătoasă care suportă o greutate minimă. Matricea extracelulară este eliminată prin digestie enzimatică, iar celule sunt apoi cultivate în cultură monostrat. După ce s-a obținut un număr suficient de celule, condrocitele sunt apoi implantate în defectul cartilagin (figura 1) [1].

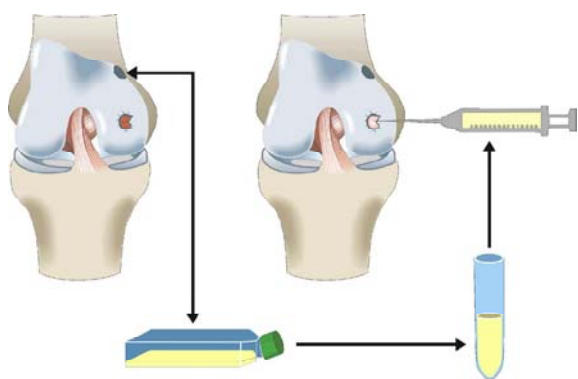


Figura 1: Conceptul transplantului autolog de condrocite

S-a efectuat un studiu experimental in vitro pentru a observa creșterea celulară pe medii de cultură a condrocitelor.

S-a recoltat cartilaj articular, în urma consimțământului informat, de la un pacient în vârstă de 35 de ani, internat cu diagnosticul de leziune traumatică la nivelul genunchiului, în Clinica de Ortopedie și Traumatologie a spitalului Clinic de Urgență Tîrgu Mureș.

Condrocitele s-au obținut de la nivelul articulației genunchiului din biopsia meniscului.

Fragmentul de țesut cartilagin (a avut o dimensiune de 10 mm și a fost transportat imediat după recoltare într-o eprubetă sterilă. Cartilajul a fost spălat în soluție salină tamponată cu fosfat și dezagregat mecanic cu ajutorul unui scalpel steril. Probele obținute au fost disociate în tripsină 0,25% pentru o oră, urmată de o disociere celulară în collagenază 0,1% la 37°C pentru 12 ore. La celulele izolate s-a adăugat mediul DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), după care acestea au fost centrifugate la 1200 rpm pentru 10 minute. După 24 ore, celulele neaderente au fost îndepărtate prin schimbarea mediului de cultură.

Sedimentul a fost resuspendat în mediu DMEM suplimentat cu albumină umană 10% și antibiotice (penicilină 0,1 mg/ml, gentamicină 0,05 mg/ml). Celulele au fost înșămânțate la o densitate de 2×10^5 celule/ml pe plăci Petri de 100 mm, iar apoi incubate în atmosferă umidificată de CO₂ 5% la 37°C.

A fost folosită albumină umană în loc de ser fetal de vițel deoarece scopul nostru este de a obține proliferare condrocitară pe medii de cultură, pentru a putea fi folosite pentru transplant autolog. Începând cu ziua 7 de cultură celulară mediul DMEM a fost suplimentat cu 50-100 ng/ml factor de creștere insuline-like (IGF-I) sau cu dexametazonă 4 ng/ml. Mediile de cultură au fost examinate pentru a urmări creșterea celulară de două ori pe săptămână, timp de 8 săptămâni, iar mediul de cultură a fost schimbat de două ori pe parcursul acestui experiment.

La finalul experimentului celulele au fost separate de mediul de cultură prin folosirea de tripsină 0,25%.

Rezultate

Izolarea celulară a fost considerată completă numai după obținerea de celule individuale.

Concentrația celulară inițială a fost scăzută (2×10^3 celule/ml), permițând perioade lungi de timp între completările mediului de cultură (figura 2).

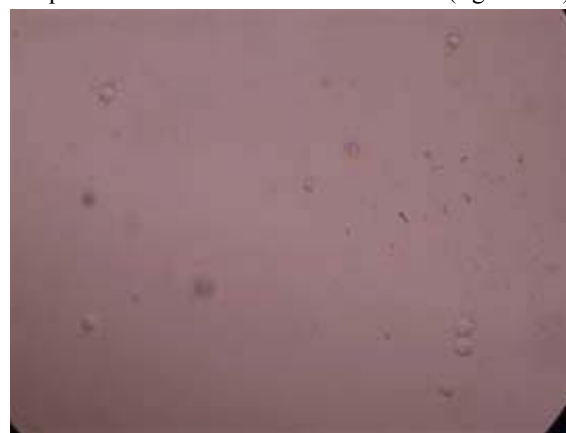


Figura 2: Condrocite pe mediu de cultură imediat după înșămânțare

Când s-a folosit mediu DMEM fără supliment de proteină, s-a văzut că celulele nu prezentau modificări morfologice semnificative, dar rata lor de proliferare a fost de aproape 0 (figura 3).

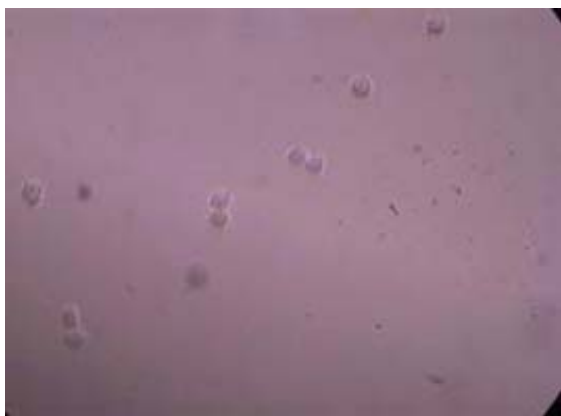


Figura 3: Condrocite în mediu DMEM fără supliment de proteină

Atunci când s-a folosit mediu DMEM suplimentat cu albumină umană 10%, rata proliferării celulare a fost bună, numărul celulelor crescând semnificativ după 4 săptămâni de la începerea experimentului continuând până la final (8 săptămâni) (figura 4). Grupurile de celule au apărut compacte, destul de mari, rotunde, cu arhitectură tridimensională compusă din condrocite mari, rotunde, cu nucleu distinct, prezentând câteodată și nucleoli, și cu citoplasmă abundentă. Concentrația celulară a fost de 45×10^3 celule/ml după 4 săptămâni, iar la finalul experimentului de 120×10^3 celule/ml.

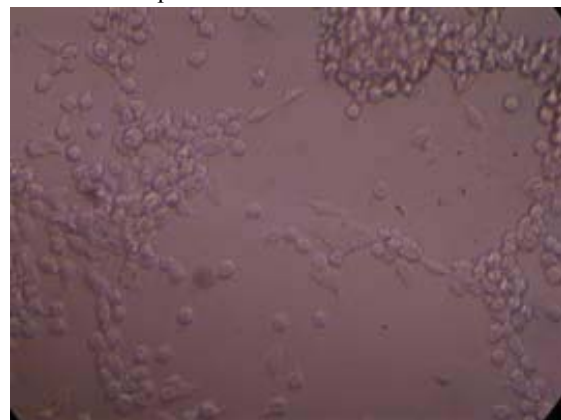


Figura 4: Condrocite în mediu DMEM cu supliment de albumină umană 10%, săptămâna 8

Cea mai mare rată de proliferare celulară s-a observat în mediu DMEM suplimentat cu IGF-I. Organizarea celulară a rămas tridimensională, cu numeroase grupuri celulare formate din condrocite tinere în apozitie strânsă. Ocazional s-au observat și condrocite cu dispoziție trabeculară, dispuse în șiruri (figura 5). În acest caz concentrația celulară finală a fost de 820×10^3 celule/ml.

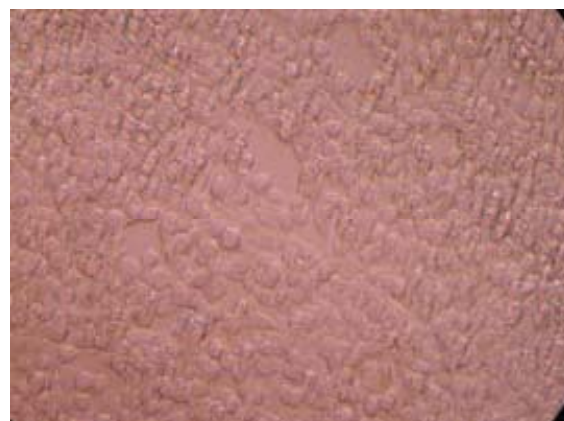


Figura 5: Condrocite în mediu DMEM cu supliment de IGF-I

Discuții

Utilizarea de condrocite autologe pentru repararea defectelor cartilajului articular datează din 1994, atunci când Brittberg a raportat primele 23 de cazuri tratate pentru defecte izolate ale cartilajului genunchiului datorate unor traume sau de către osteocondrita disecantă [13].

În ceea ce privește creșterea experimentală in vitro a condrocitelor, experimentul nostru a arătat o arhitectură tridimensională a structurii celulelor. Studiul densității celulare finale a arătat că suplimentarea mediului de cultură cu IGF-I a indus cea mai mare rată de proliferare celulară, urmată îndeaproape de suplimentarea cu albumină umană. Atunci când nu s-a adăugat nici un supliment la mediul de cultură rata de proliferare a fost extrem de scăzută.

Deși a fost observată o creștere condrocitară in vitro semnificativă, este de asemenea bine cunoscut faptul că condrocitele își pierd în timp caracteristicile morfologice și biochimice și devin nefolositoare pentru ingineria țesutului cartilaginuos atunci când sunt înmulțite in vitro [14], de asemenea condrocitele trebuie obținute artroscopic, iar necesitatea a două intervenții chirurgicale consecutive duce la creșterea riscului pentru cartilajul rămas [15].

Chiar dacă transplantul autolog de condrocite pare a fi unul promițător, această metodă este rezervată unei categorii mici de pacienți, atent selecționați, ca abordare terapeutică secundară [16].

Concluzii

Datele noastre arată că obținerea unui număr suficient de condrocite necesită o perioadă lungă de timp, procesul fiind stimulat prin suplimentarea cu proteine

și mai ales de IGF-I. Acest proces este, de asemenea, susținut de factori care promovează adeziune celulară la structuri tridimensionale.

Din păcate, agregarea celulară generată in vitro nu are structura și funcția unui cartilaj adecvat.

Această lucrare a fost finanțată prin Programul Operațional Sectorial de Dezvoltare a resurselor umane, program finanțat de Uniunea Europeană și Guvernul României, Contract nr. POSDRU / 6 / 1.5. / S / 17.

Bibliografie

1. Marlovits S, Zeller P, Singer P, Resinger C, Vecsei V. Cartilage repair: Generations of autologous chondrocyte transplantation. *European Journal of Radiology* 2006; 57: 24–31.
2. Buckley C T, Tatiana Vinardell, Thorpe S D, Haugh M G, Elena Jones, McGonagle D, Kelly D J. Functional properties of cartilaginous tissues engineered from infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stemcells. *Journal of Biomechanics* 2010; 43: 920–926.
3. Khan W S, Johnson D S, Hardingham T E. The potential of stem cells in the treatment of knee cartilage defects. 2010. *The Knee* 17: 369–374.
4. Behrens P, Bitter T, Kurz B, Russlies M. Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI)—5-year follow-up. 2006; *The Knee* 13: 194 – 202.
5. Noyes FR, Bassett RW, Grood ES, et al: Arthroscopy in acute traumatic hemarthrosis of the knee: incidence of anterior cruciate tears and other injuries. 1980 *J Bone Joint Surg Am* 62:687-695.
6. Federico DJ, Lynch JK, Jokl P: Osteochondritis dissecans of the knee: a historical review of etiology and treatment. 1990. *Arthroscopy* 6:190-197.
7. Aroen A, Loken S, Heir S, et al: Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. 2004. *Am J Sports Med* 32:211-215.
8. Curl WW, Krome J, Gordon ES, et al: Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. 1997. *Arthroscopy* 13:456-460.
9. Hjelle K, Solheim E, Strand T, et al: Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. 2002. *Arthroscopy* 18:730-734.
10. Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. 2002. *Osteoarthritis Cartilage* 10:432-63.
11. Bentley G, Biant LC, Carrington RW, Akmal M, Goldberg A, Williams AM, et al. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. 2003. *J Bone Joint Surg Br*; 85(2):223– 30.
12. Fu FH, Zurakowski D, Browne JE, Mandelbaum B, Erggelet C, Moseley JB Jr, et al. Autologous chondrocyte implantation versus debridement for treatment of full-thickness chondral defects of the knee: an observational cohort study with 3-year follow-up. 2005 *Am J Sports Med*; 33 (11):1658-66.
13. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. 1994. *N. Engl. J. Med.* 331:889–895.
14. Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, Schlegel J: Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. 2002 *Osteoarthr. Cartil.* 10:62–70.
15. Danišovič L, Lesný P, Havlas V, Teyssler P, Syrová Z, Kopáni M, Gabriela Fajeriková, Trč T, Eva Syková, Jendelová P. Chondrogenic differentiation of human bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. 2007 *J. Appl. Biomed.*; 5: 139–150.
16. ***Autologous Chondrocyte Transplant. Aetna Coverage Policy Bulletins Nr. 0247.