

Ponowne dojrzewianie odróżnicowanych w hodowlach *in vitro* chondrocytów w warunkach obniżonego stężenia tlenu

Low oxygen tension promotes redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes in vitro

Ewa Warnawin¹, Tomasz Burakowski¹, Michał Gajewski², Anna Kornatka¹, Weronika Rudnicka¹, Cezary Michalak³, Paweł Małydk³, Sławomir Maśliński², Włodzimierz Maśliński¹

¹Zakład Patofizjologii i Immunologii Instytutu Reumatologii w Warszawie, kierownik Zakładu prof. dr hab. biol. Włodzimierz Maśliński

²Zakład Biochemii Instytutu Reumatologii w Warszawie, kierownik Zakładu prof. dr hab. med. Sławomir Maśliński

³Klinika Reumortopedii Instytutu Reumatologii w Warszawie, kierownik Kliniki dr hab. med. Paweł Małydk

Dyrektor Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie prof. dr hab. med. Sławomir Maśliński

Słowa kluczowe: chrząstka, chondrocyty, hodowle *in vitro*.

Key words: cartilage, chondrocytes, *in vitro* culture.

Streszczenie

Degradacja chrząstki stawowej jest główną przyczyną zniszczenia stawów w wielu chorobach reumatycznych. Jedną z atrakcyjnych możliwości naprawy chrząstki jest jej regeneracja hodowanymi *in vitro* chondrocytami. Jednakże hodowane w standardowych warunkach chondrocyty ulegają odróżnicowaniu: zanika produkcja kolagenu II, a zwiększa się produkcja kolagenu I. Istnieje konieczność opracowania ulepszonych warunków hodowli chondrocytów *in vitro*.

Celem pracy była weryfikacja hipotezy, że chondrocyty hodowane *in vitro* w warunkach zbliżonych do fizjologicznych – zmiennego mechanicznego obciążenia i/lub niskiego stężenia O₂, wykazują ekspresję genów kodujących białka macierzy zewnątrzkomórkowej charakterystyczne dla chondrocytów chrząstki stawowej.

Do sprawdzenia tej hipotezy chondrocyty izolowane z chrząstki stawowej pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów były hodowane w atmosferze normalnego (21%) lub obniżonego (5%) stężenia tlenu (O₂), w warunkach normalnego (1 atm) lub podwyższonego (2 atm), cyklicznie zmieniającego się ciśnienia. W chondrocytach hodowanych w powyższych warunkach oceniano ekspresję genów charakterystycznych dla dojrzałych chondrocytów: agrekanu, kolagenu IIA i kolagenu IIB oraz genu obecnego w odróżnicowanych w warunkach *in vitro* chondrocytach kolagenu I.

Otrzymane wyniki wskazują, że chondrocyty hodowane w warunkach obniżonego do 5% stężenia tlenu wykazują wzrost pro-

Summary

Articular cartilage degradation is a main cause of joint destruction in rheumatic diseases. An attractive possibility for cartilage repair is the use of cultured *in vitro* chondrocytes. However, cultured chondrocytes undergo dedifferentiation with loss of collagen II production, and increased synthesis of collagen I. Therefore, optimization of chondrocyte culture conditions *in vitro* is required.

The aim of this work was to verify the hypothesis that chondrocytes cultured *in vitro* in conditions similar to their physiological environment: (1) fluctuating mechanical pressure, and/or (2) low oxygen tension, will express genes encoding extracellular matrix proteins characteristic for articular chondrocytes.

To verify this hypothesis, chondrocytes isolated from cartilage of rheumatoid arthritis patients were cultured in normal (21%) or low (5%) oxygen tension, normal (1 atm) or increased (2 atm) in cyclic fashion, atmospheric pressure. The expression of genes characteristic for mature chondrocytes: aggrecan, collagen IIA and IIB, and gene present in dedifferentiated chondrocytes, collagen I, were analyzed in chondrocytes cultured in modified conditions. The results confirm that chondrocytes cultured in low (5%) oxygen tension, increased expression of mRNA encoding aggrecan, collagen IIA and IIB with simultaneous decrease of collagen I. No changes of cell morphology or proliferation rate were observed. Chondrocytes exposed to fluctuating pressure exert lower, but not

Adres do korespondencji:

mgr farm. Ewa Warnawin, Zakład Patofizjologii i Immunologii, Instytut Reumatologii im. prof. dr hab. med. E. Reicher, ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa, tel./faks +48 22 844 25 40, e-mail: zpatiir@warman.com.pl

Praca wpłynęła: 15.11.2005 r.

dukcji mRNA kodującego agrekan, kolagen IIA, kolagen IIB, przy jednoczesnym obniżeniu produkcji mRNA dla kolagenu I. Nie zaobserwowano znaczących różnic w proliferacji i morfologii hodowanych komórek. Chondrocyty poddane stymulacji mechanicznej wykazywały tendencję do obniżenia produkcji białek macierzy zewnątrzkomórkowej charakterystycznej dla chrząstki. Wyniki te sugerują, że hodowle chondrocytów w warunkach obniżonego (5%) stężenia tlenu prowadzą do ponownego funkcjonalnego różnicowania się chondrocytów odróżnicowanych w warunkach *in vitro*. Mechaniczna stymulacja nie jest niezbędna na tym etapie hodowli.

Wstęp

Tkanka chrzęstna jest tkanką łączną pełniącą istotne funkcje mechaniczne. Aby wypełniać te funkcje, chrząstka ma wiele unikalnych właściwości – jest twarda, ale elastyczna i wytrzymała [1]. W obrębie stawu tworzy idealnie gładkie powierzchnie, które z niewielką ilością płynu stawowego mogą się przesuwać względem siebie bez uszkodzenia. Dzięki temu może funkcjonować w warunkach dużych obciążeń. W skład chrząstki wchodzi chondrocyty i syntetyzowana przez nie macierz zewnątrzkomórkowa. Ekspresja białek macierzy zewnątrzkomórkowej jest regulowana przez wiele czynników wzrostu, jak również przez czynniki mechaniczne.

Związkami, które zapewniają unikalne właściwości chrząstki, są kolageny, proteoglikany i białka niekolagenowe. Spośród kolagenów najistotniejszy jest kolagen typu II [2]. Typ II kolagenu jest głównym białkowym składnikiem chrząstki. Jest syntetyzowany jako cząsteczka prokolagenu składająca się z 3 identycznych łańcuchów α . Istnieją 2 izoformy mRNA kodującego kolagen II. Różnią się obecnością jednego eksonu. Dodatkowy ekson, obecny w mRNA kodującym kolagen typu IIA, jest odpowiedzialny za syntezę domeny, która przypuszczalnie może wiązać czynniki wzrostu. Ten typ kolagenu jest syntetyzowany przez komórki ulegające procesowi chondrogenyzy. Istnieją doniesienia świadczące o tym, że forma IIA ulega ponownej ekspresji w trakcie degradacji chrząstki w przebiegu zwyrodnienia stawów [3]. Dojrzałe chondrocyty wykazują ekspresję kolagenu typu IIB [4].

Włókna kolagenowe są odporne na rozciąganie. Bardzo istotną rolę w utrzymaniu odpowiednich właściwości mechanicznych chrząstki pełnią proteoglikany, które nadają sprężystość tej tkance dzięki zdolności wiązania wody. Głównym proteoglikanem chrząstki jest agrekan.

Nieodwracalna degradacja chrząstki stawowej obserwowana w przebiegu wielu chorób reumatycznych jest jedną z najistotniejszych przyczyn prowadzących do zniszczenia stawu. Na tym etapie jedynym rozwiązaniem umożliwiającym funkcjonowanie stawu jest wstawienie endoprotezy. Mimo że techniki endoprotezopla-

significant extracellular matrix synthesis. Cells cultured in 5% O₂ exerted increased expression of mRNA encoding genes characteristic for differentiated chondrocytes i.e. aggrecan, collagen IIA and IIB, with simultaneous decreased expression of collagen I, a marker of dedifferentiated chondrocytes.

These results suggest that low oxygen tension stimulates cultured chondrocytes toward functional redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes. Mechanical stimulation is not required at this stage of culture.

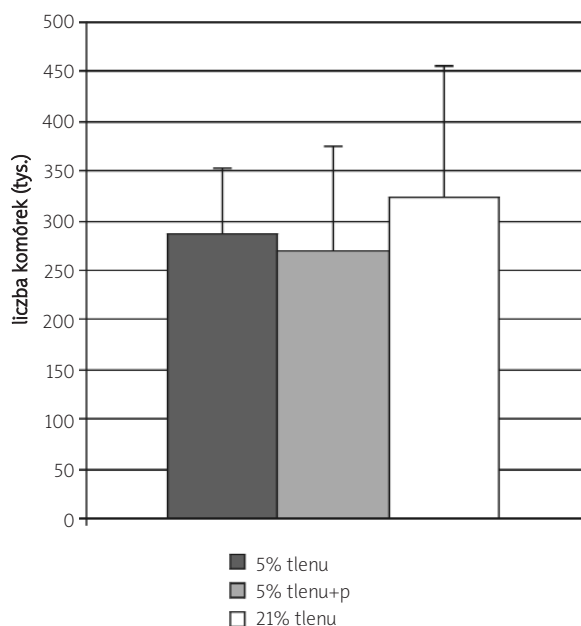
styki są ciągle ulepszone, trwają poszukiwania innych możliwości odbudowy struktury chrząstki. Wśród nich bardzo dużo uwagi poświęcono próbom regeneracji chrząstki z użyciem autologicznych chondrocytów, które po namnożeniu *in vitro* i osadzeniu w biodegradowalnym nośniku (rusztowaniu) można byłoby wszczepić do uszkodzonych stawów [5]. Jednym z problemów takiej strategii jest fakt, że chondrocyty hodowane w standardowych warunkach *in vitro* (jedna warstwa komórek, 37°C, 5% CO₂ i 21% O₂) ulegają odróżnicowaniu: przestają produkować kolagen typu II, a zaczynają produkować kolagen typu I [6]. Tkanka wytworzona z tak odróżnicowanych komórek, które zachowują się jak fibroblasty, może znacznie odbiegać swoimi właściwościami od funkcjonalnej, zdrowej chrząstki stawowej. W tej sytuacji istnieje potrzeba opracowania takich warunków hodowli chondrocytów *in vitro*, które umożliwią ich namnożenie z zachowaniem cech charakterystycznych dla dojrzałych, zróżnicowanych chondrocytów.

Materiał i metody

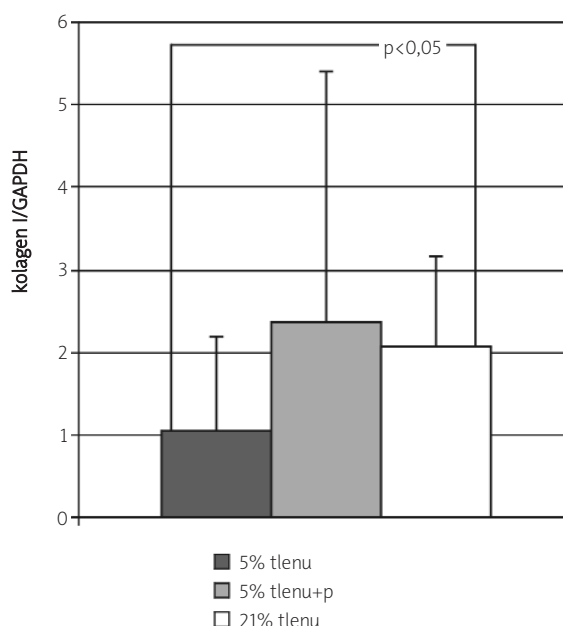
Chrząstka stawowa była pobierana od pacjentów (n=5) chorujących na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) w trakcie operacji wstawienia endoprotezy stawu kolanowego. Chondrocyty były izolowane z chrząstki podczas trawienia enzymatycznego z udziałem kolagenazy, hialuronidazy i trypsyny wg standardowych metod i hodowane *in vitro*. W trakcie pierwszego pasażu komórki były hodowane w podłożu zawierającym DMEM, 4 500 mg/l glukozy, 5% surowicy wołowej, antybiotyki (penicylinę, streptomycynę i amfoterycynę), w atmosferze zawierającej 5% CO₂ i 21% O₂. Podczas drugiego pasażu komórki były hodowane (w takim samym podłożu) w środowisku: 5% CO₂ i 21% O₂ lub 5% CO₂ i 5% O₂.

Komórki hodowane w atmosferze o obniżonej zawartości tlenu były także poddawane cyklicznym zmianom ciśnienia atmosferycznego (30 min 1 atm, 30 min 2 atm).

Po upływie 7 dni komórki były trypsynizowane, zbierane, liczone, a ich żywotność była sprawdzana przy użyciu błękitu trypanu. Całkowite RNA było izolowane z uży-



Ryc. 1. Proliferacja chondrocytów.
Fig. 1. Proliferation of chondrocytes.



Ryc. 2. Ekspresja kolagenu I przez chondrocyty.
Fig. 2. Expression of collagen I by chondrocytes.

ciem trizolu. Ekspresja genów kodujących GAPDH, agrekan, kolagen IIA, kolagen IIB i kolagen I była oceniana przy użyciu półilościowej metody RT-PCR. Ekspresja genu kodującego białko uczestniczące w podtrzymywaniu podstawowych funkcji komórek (*house keeping gene*) GAPDH stanowiła kontrolę ilości izolowanego RNA i podstawę do obliczania relatywnej ekspresji badanych genów.

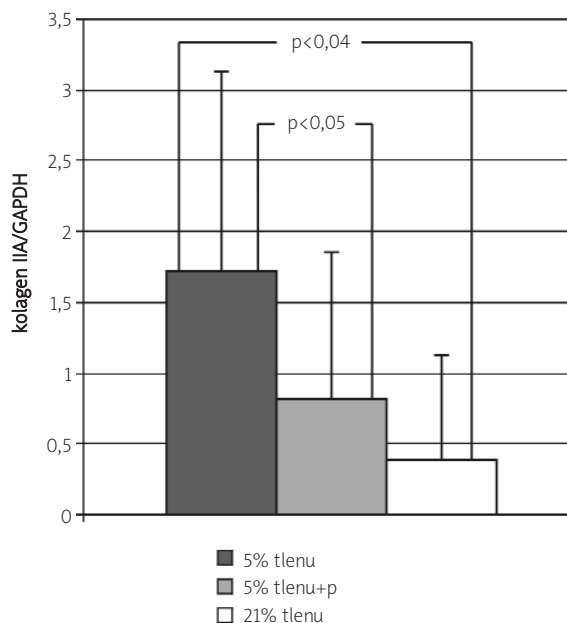
Analiza statystyczna była wykonana za pomocą testu t-Studenta. Wartości $p < 0,05$ uznawano za istotne statystycznie.

Wyniki

Bez względu na zastosowane warunki hodowli komórki wykazywały 90–95% żywotność, ich morfologia nie ulegała zmianom, a szybkości proliferacji była porównywalna (ryc. 1).

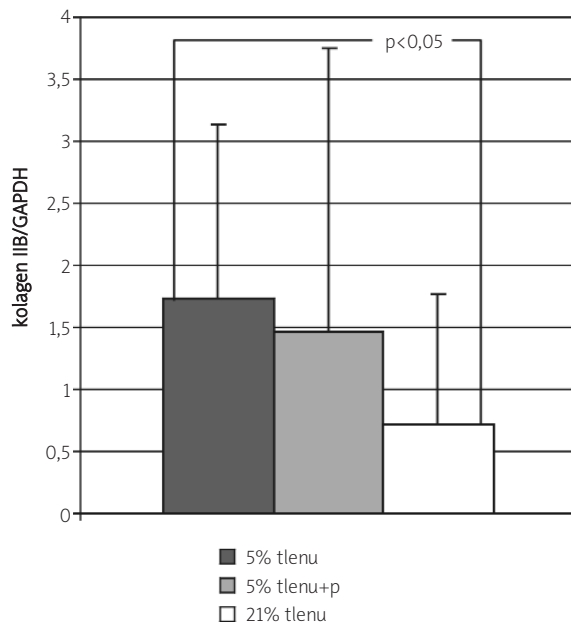
Chondrocyty hodowane w warunkach obniżonego stężenia tlenu (5%) wykazywały niższą ekspresję syntezy mRNA dla kolagenu I ($p < 0,05$) (ryc. 2.), co sugeruje ponowne różnicowanie się tych komórek w kierunku dojrzałych, funkcjonalnych chondrocytów. Dodatkowa mechaniczna stymulacja, z zastosowaniem cyklicznie zmieniającego się ciśnienia atmosferycznego w granicach 1–2 atm, powodowała powrót ekspresji kolagenu I do stanu obserwowanego dla normalnego stężenia tlenu (21%), charakterystycznego dla odróżnicowanych chondrocytów (ryc. 2.).

Ekspresja mRNA dla kolagenu IIA zwiększała się podczas hodowli chondrocytów w 5% O_2 ($p < 0,04$) w kierunku bardziej zróżnicowanych chondrocytów, na-

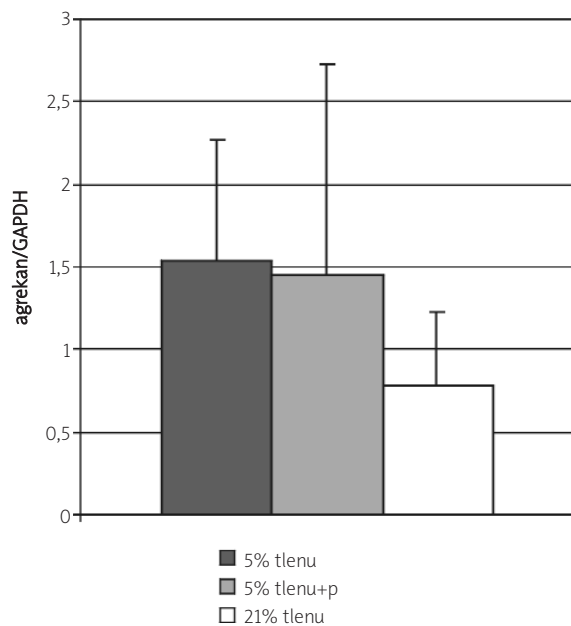


Ryc. 3. Ekspresja kolagenu IIA przez chondrocyty.
Fig. 3. Expression of collagen IIA by chondrocytes.

tomiast w komórkach hodowanych w 5% tlenie oraz dodatkowo w warunkach zmiennego ciśnienia obserwowano obniżenie produkcji mRNA dla kolagenu IIA ($p < 0,05$) (ryc. 3.). Wpływ zmiennego ciśnienia wywierał więc negatywne działanie na chondrocyty hodowane w warunkach niskiego tlenu.



Ryc. 4. Ekspresja kolagenu IIB przez chondrocyty.
Fig. 4. Expression of collagen IIB by chondrocytes.



Ryc. 5. Ekspresja agrekanu przez chondrocyty.
Fig. 5. Expression of aggrecan by chondrocytes.

Ekspresja kolagenu IIB zwiększała się w środowisku zawierającym 5% tlenu ($p=0,05$) (ryc. 4.). Dodatkowa stymulacja w warunkach zmiennego ciśnienia atmosferycznego nie doprowadzała do istotnych zmian produkcji kolagenu IIB.

Zaobserwowano również tendencję do podwyższenia ekspresji mRNA dla agrekanu przez chondrocyty hodowane w warunkach niskiego stężenia tlenu, choć bez osiągnięcia istotności statystycznej ($p < 0,1$). W tym przypadku nie obserwowano dodatkowego wpływu mechanicznej stymulacji (ryc. 5.).

Dyskusja

Przedstawione badania stanowią część prowadzonych prób określenia takich warunków hodowli *in vitro* chondrocytów, które zapewniłyby proliferację tych komórek z jednoczesnym zachowaniem produkcji charakterystycznych dla nich białek tworzących macierz zewnątrzkomórkową. Chrzątka jest tkanką pozbawioną naczyń krwionośnych. Gradient stężenia tlenu waha się od 10% (na powierzchni chrząstki) do 1% (w głębszych warstwach chrząstki) [7]. W związku z tym faktem komórki chrząstki, chondrocyty, przystosowały się do funkcjonowania w warunkach hipoksji. Szczególnie istotna jest rola czynnika transkrypcyjnego HIF-1 α . Odgrywa on kluczową rolę w modyfikowaniu ekspresji genów w warunkach obniżonego stężenia tlenu. W chondrocytach odpowiada za regulację ekspresji genów związanych z procesem glikolizy i produkcji białek macierzy zewnątrzkomórkowej [8].

Próby hodowli chondrocytów w standardowych warunkach tlenu (21%) prowadzą do ich wcześniejszego starzenia, zmiany ekspresji genów, a co za tym idzie – utraty funkcji [9].

W licznych pracach przeprowadzonych na chondrocytach wyizolowanych z chrząstek zwierzęcych pokazano, że komórki te hodowane w warunkach obniżonego stężenia tlenu ponownie się różnicują [7, 10]. Obserwuje się wzrost ekspresji kolagenu II i agrekanu, przy jednoczesnym obniżeniu ekspresji kolagenu I. Podobne wyniki zaobserwowano, badając chondrocyty wyizolowane z ludzkiej chrząstki pobranej z nosa [11] czy stawu kolanowego [12]. Brak jest doniesień opisujących reakcję chondrocytów wyizolowanych z chrząstki stawowej pacjentów chorujących na RZS na obniżone stężenie tlenu. W przebiegu tej choroby chrząstka jest narażona na działanie zwiększonego stężenia cytokin prozapalnych. Udowodniono, że te substancje powodują zahamowanie syntezy białek macierzy zewnątrzkomórkowej przy jednoczesnym nasileniu syntezy enzymów degradujących chrząstkę [13]. Dodatkowo w stawie objętym procesem zapalnym dochodzi do patologicznego obniżenia stężenia tlenu [14]. Dlatego autorzy postanowili zbadać reakcję chondrocytów wyizolowanych z chrząstki stawowej pobranej od pacjentów chorujących na RZS na obniżone stężenie tlenu. Wyniki przedstawione w tej pracy wyraźnie wskazują, że obniżenie stężenia tlenu podczas hodowli powoduje wzrost

ekspresji kolagenu II i agrekanu oraz obniżenie syntezy kolagenu I. Wyniki doświadczeń potwierdziły naszą hipotezę, że hodowle chondrocytów w warunkach *in vitro* powinno się prowadzić w warunkach obniżonego stężenia tlenu. Mechaniczny stres powoduje obniżenie syntezy białek macierzy zewnątrzkomórkowej charakterystycznych dla chondrocytów, co jest zgodne z obserwacjami innych autorów [9]. Z tych powodów zastosowanie dodatkowych zmian fluktuacji ciśnienia atmosferycznego nie wydaje się wskazane.

Na dodatkową uwagę zasługuje fakt, że w hodowlanych przez nas chondrocytach występuje kolagen IIA, charakterystyczny dla niedojrzałych komórek chrząstki. Świadczy to o tym, że chondrocyty odróżnicowane podczas hodowli w jednej warstwie (*monolayer*) nie różnicują się całkowicie pod wpływem obniżenia stężenia tlenu. Nie jest wykluczone, że proces ten wymaga zapewnienia chondrocytom odpowiedniego przestrzennego zorganizowania hodowli w strukturach wielowarstwowych (tzw. hodowla w 3D) [15]. Badania, których celem jest zweryfikowanie tej hipotezy, są obecnie w toku.

Wnioski

Ponowne zróżnicowanie odróżnicowanych chondrocytów pochodzących od pacjentów chorujących na RZS jest częściowo możliwe, jeżeli komórki są hodowane w atmosferze zawierającej 5% O₂. Na tym etapie hodowli dodatkowa mechaniczna stymulacja nie jest konieczna.

Praca naukowa finansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych w latach 2003–2005 jako projekt badawczy.

Piśmiennictwo

1. Tallheden T, Bengtsson C, Brantsing C, et al. Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic. *Arthritis Res* 2005; 7: R560-8.
2. Eyre D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* 2002; 4: 30-5.
3. Gouttenoire J, Valcourt U, Ronziere MC, et al. Modulation of collagen synthesis in normal and osteoarthritic cartilage. *Biorheology* 2004; 41: 535-42.
4. Nah HD, Pacifici M, Gerstenfeld LC, et al. Transient chondrogenic phase in the intramembranous pathway during normal skeletal development. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 522-33.
5. Meyer U, Buchter A, Wiesmann HP, et al. Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cell Mater* 2005; 9: 23-32.
6. Goessler UR, Bieback K, Bugert P, et al. Human chondrocytes differentially express matrix modulators during *in vitro* expansion for tissue engineering. *Int J Mol Med* 2005; 16: 509-15.
7. Grimshaw MJ, Mason RM. Bovine articular chondrocyte function *in vitro* depends upon oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage* 2000; 8: 386-92.
8. Pfander D, Cramer T, Schipani E, et al. HIF-1 α controls extracellular matrix synthesis by epiphyseal chondrocytes. *J Cell Sci* 2003; 116: 1819-26.
9. Martin JA, Brown TD, Heiner AD, et al. Chondrocyte senescence, joint loading and osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* 2004; (427 Suppl): S96-103.
10. Grimshaw MJ, Mason RM. Modulation of bovine articular chondrocyte gene expression *in vitro* by oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9: 357-64.
11. Malda J, van Blitterswijk CA, van Geffen M, et al. Low oxygen tension stimulates the redifferentiation of dedifferentiated adult human nasal chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: 306-13.
12. Murphy CL, Polak JM. Control of human articular chondrocyte differentiation by reduced oxygen tension. *J Cell Physiol* 2004; 199:451-9.
13. Fraser A, Fearon U, Billingham RC, et al. Turnover of type II collagen and aggrecan in cartilage matrix at the onset of inflammatory arthritis in humans: relationship to mediators of systemic and local inflammation. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 3085-95.
14. Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 3085-95.
15. Domm C, Schunke M, Steinhagen J, et al. Influence of various alginate brands on the redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate bead culture under high and low oxygen tension. *Tissue Eng* 2004; 10: 1796-805.