

Функціональні характеристики культивованих хондроцитів міжхребцевих дисків та мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини людини[#]

UDC 57.085.23:576.536

D.O. ZUBOV

Functional Characteristics of Human Cultured Intervertebral Disc Chondrocytes and Adipose-Derived Stem Cells[#]

Насьогодні в лікуванні дегенеративних захворювань міжхребцевих дисків (МД) перспективним виявляється підхід із застосуванням клітинної терапії за допомогою культивованих хондроцитів та мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) у складі клітинних носіїв для заповнення післяопераційного тканинного дефекту МД [2, 4]. Не зважаючи на те, що ці типи клітин легко піддаються моношаровому культивуванню, ранове мікрооточення не сприяє продукуванню компонентів матриксу пересадженими клітинами *in situ*. Однак існують дані, що адипозні ММСК з жирової тканини (аММСК) володіють потужним потенціалом щодо лікування хворих на грижі МД [2, 3]. Так, ці клітини в умовах тривимірної культури та інкубації з TGFβ продукують позаклітинний матрикс, багатий на протеоглікани та колаген II типу.

Отже, метою дослідження є вивчення деяких функціональних властивостей клітинних культур ММСК з жирової тканини та хондроцитів пульпозного ядра (ХЦПЯ) міжхребцевого диску *ex vivo*.

Донорський матеріал людини одержано з ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» під час секвестрэктомії. Дослідження схвалені Комісією з питань біоетики ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України». Робота виконана в межах запланованої по НАМН України НДР (шифр 3.20/2010.06.11).

Ізолювання і субкультивування адипозних ММСК (з фрагментів епідурального жиру, Мм 1,3 г) та ХЦПЯ (з фрагментів видаленого пульпозного ядра МД, Мм 3,3 г) проводили за загально прийнятими методиками з використанням 0,2% розчину колагенази ІА та ростового середовища DMEM/F12 з додаванням 10%

At present the treatment of degenerative diseases of the herniated intervertebral discs (ID) is a promising approach of cell therapy with human cultured *nucleus pulposus* chondrocytes (hNPCs) and adipose-derived stem cells (hADSCs, or multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue) required for postoperative ID tissue defect filling [2,4]. Despite a fact that these cell types are easily cultured as the monolayer cultures, the wound microenvironment is not permissive to the production of matrix components by transferred cells *in situ*. There is evidence that hADSCs possess strong potential for the treatment of patients suffered a herniated ID [2, 3]. It is known, these cells under three-dimensional (3D) culture conditions and when incubated with TGFβ, produce the extracellular matrix rich in proteoglycans and collagen type II.

The aim of the study is to explore some functional properties of hADSCs and the intervertebral disc hNPCs *ex vivo*.

Human donor material has been obtained from State Institute of Neurosurgery named after Acad. A.P. Romodanov (National Academy of Medical Sciences of Ukraine) during sequestrectomy surgery. Studies have been approved by the Bioethics Commission of State Institute of Genetic and Regenerative Medicine. The project was performed within the research planned by NAMS (ref. number 3.20/2010.06.11).

Isolating and subculturing of hADSCs from the epidural fat biopsy (Mm 1.3 g) and hNPCs from ID biopsy (Mm 3.3 g) were carried-out using conventional enzymatic method with 0.2% collagenase IA and DMEM/F12 medium supplemented with 10% fetal calf serum and 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich, USA) [1, 3–5]. hADSCs and hNPCs co-cultivation performed in 6-well

¹ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», м. Київ

*Адреса для кореспонденції: вул. Вишгородська, 67; Київ, Україна 04114; електронна пошта: zoubov77@yahoo.com

[#]Дослідження було представлено на міні-симпозіумі «День стовбурової клітини», що відбувся 22 травня 2012 року в місті Харкові.

¹State Institute of Genetic and Regenerative Medicine, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

*Address for correspondence: 67, Vyshgorodska str., Kyiv, Ukraine 04414; e-mail: zoubov77@yahoo.com

[#]This reseach was presented at minisimposium Stem Cell Day, held in Kharkov, Ukraine, on the 22th of May, 2012.

ембріональної телячої сироватки та 2 мМ *L*-глутаміну («Sigma-Aldrich», США) [1, 3–5]. Спільне культивування аММСК та ХЦПЯ проводили в 6-ямових плашках («Costar», США) по групах ($n = 3$) з початковою посівною концентрацією 10^4 клітин/см²: 1) аММСК, 4-й пасаж, 10^5 /ямку; 2) ХЦПЯ, 4-й пасаж, 10^5 /ямку; 3) аММСК + ХЦПЯ, по 5×10^4 /ямку (сумарна щільність посіву 10^5 /ямку). Проліферативні властивості клітинних культур оцінювали непрямим спектрофотометричним методом (фарбування культур 1%-м розчином толуїдинового блакитного («Sigma-Aldrich») з 1% тетраборнокислого натрію («Макрохім», Україна), що полягає в статистичному порівнянні вимірної оптичної щільності розчину вимитого фарбника, який зв'язався з клітинним моношаром. Оптична щільність розчину відрізняється в залежності від щільності моношару досліджуваних клітинних типів.

Поверхневі рецептори досліджуваних клітин визначали методом проточної цитофлуорометрії з використанням клітинного сортеру «BD FACSAria I» та програмного забезпечення «FACSDiva 6.1.1» («BD Biosciences», США) за допомогою моноклональних антитіл виробництва «BD Pharmingen» (США), та «Beckman Coulter» (США) (оператор В. Кирик).

Процес колонієутворення обома клітинними типами вивчали шляхом посіву 10^2 клітин на чашку Петрі (діаметр 100 мм, «Costar») та інкубації протягом 14 діб в стандартному ростовому середовищі з визначенням ефективності посіву (PE, %) [1].

Число клітинних подвоєнь в популяції (n) та час подвоєння клітинної популяції (t_D) визначали за загальноприйнятими формулами [1]: $n = C \times \lg(X_k/X_0)$ та $t_D = C \times \lg(X_k/X_0)$, де C – константа переведення логарифму в десятковий логарифм для клітин, що культивуються; X_0 – число посіяних клітин; X_k – число нарощених клітин; T – тривалість логарифмічної фази росту культури клітин.

Остеогенне та адипогенне диференціювання культур аММСК і ХЦПЯ проводили за загальноприйнятими методиками протягом 21-ї доби з подальшим цитохімічним фарбуванням алізариновим червоним S та жировим червоним O відповідно («Sigma-Aldrich») [5]. Хондрогенне диференціювання культур здійснювали методом мікромас-культури: 3×10^5 клітин центрифугували задля отримання осаду в 15 мл пробірках («Nunc», США) та далі інкубували в загальноприйнятому хондроіндуктивному середовищі протягом 21-ї доби. Утворені хондроїди нарізали на мікротомі 20 мкм завтовшки та зрізи фарбували 1%-м розчином толуїдинового блакитного з 1% тетраборнокислого натрію [5].

Візуалізацію і фотодокументування культур клітин проводили за допомогою інвертованого мікроскопа «Axiovert 40C», програмного забезпечення «AxioVision Rel. 4.8» («Carl Zeiss», Німеччина).

cell culture plates (Costar, USA) with an initial cell plating density of 10^4 per cm² by groups ($n = 3$): 1) hADSCs, passage 4 (P4), 10^5 per well; 2) hNPCs, P4, 10^5 per well; 3) hADSCs + hNPCs, 5×10^4 per well (total plating density of 10^5 per well). Proliferative capacity of the cell cultures was assessed indirectly by spectrophotometric method: cell cultures staining with 1% Toluidine blue stain (Sigma-Aldrich) and 1% sodium tetraborate (Makrohim, Ukraine). It is a statistical comparison of measured optical density of the absorbed by cell monolayer and washed dye solution. So, the optical density of the dye solution varies depending on the monolayer density of studied cell types. Surface receptors of target cells were determined by flow cytometry with BD FACSAria I cell sorter and FACSDiva 6.1.1 software (BD Biosciences, USA) using monoclonal antibodies (BD Pharmingen, USA; Beckman Coulter, USA).

The CFU-assay (the colony-forming units) for both cell types was performed by 10^2 cells plating per 100 mm Petri dish (Costar) with subsequent incubation for 14 days in standard cell growth medium with final Plating Efficiency definition (PE, %) [1].

The cell population doubling number (PDN, n) and population doubling time (t_D) were determined with conventional formulas [1]: $n = C \times \lg(X_k/X_0)$ and $t_D = C \times \lg(X_k/X_0)$, where C – a constant of decimal logarithm conversion for cultured cells; X_0 – a number of plated cells; X_k – a number of propagated cells, T – duration of cell culture exponential growth.

Osteogenic and adipogenic differentiation tests for hADSCs and hNPCs cultures were performed during 21 days with conventional method use, followed by cytochemical staining with Alizarin Red S and Oil Red O stains, respectively (Sigma-Aldrich) [5]. Chondrogenic differentiation test for cell cultures was performed by micromass culture method: 3×10^5 cells were centrifuged to obtain a cell precipitate in 15 ml centrifuge tube (Nunc, USA) and then incubated by conventional method for 21 days. Microtomed 20 μ m chondroid sections were stained with 1% Toluidine blue stain and 1% sodium tetraborate [5].

Visualization and photo-documentation of cell cultures were performed using the inverted microscope Axiovert 40C, software AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss, Germany).

Quantitative characteristics of random variables are presented as mean values and standard errors of the average values. The significance of differences was assessed by Student t-test.

As a result, $6,7 \times 10^6$ nucleated cells of stromal-vascular fraction were isolated from 1.3 g of epidural fat; $1,8 \times 10^6$ chondrocytes were isolated from 3.3 g of ID *nucleus pulposus*. These cultures were subcultured within 9 and 7 passages, respectively. Split ratios ranged from 1:6 to 1:30 (Fig. 1). The effect of hADSCs, P4, and hNPCs, P4, co-culturing was assessed. When exploring

Кількісні характеристики випадкових величин представлені як середні значення та стандартні помилки середніх значень. Значимість розбіжностей показників оцінювалася за t-критерієм Стьюдента.

Проведені дослідження дозволили одержати наступні результати. У середньому з 1,3 г жирової тканини виділяли $6,7 \times 10^6$ ядровмісних клітин стромально-судинної фракції, а з 3,3 г пульпозного ядра – $1,8 \times 10^6$ хондроцитів. Отримані культури субкультивували до дев'ятого пасажу (аММСК), і до сьомого пасажу (хондроцити). Коефіцієнт пасирування становив від 1:6 до 1:30 (рис. 1). Досліджено ефект спільного культивування аММСК (4-й пасаж) та ХЦПЯ (4-й пасаж). При дослідженні темпів проліферації цих клітинних типів непрямим спектрофотометричним методом не вдалось одержати метахроматичного забарвлення культур толуїдиновим блакитним, що, таким чином, не відображає продукцію кислих мукополісахаридів (МПС) клітинами, а лише проліферативну активність досліджуваних клітинних груп за кількістю зв'язаної клітинним моношаром фарби. Тобто виявлена відсутність ко-стимулюючого синергетичного анаболічного ефекту *in vitro* в спільній культурі аММСК та ХЦПЯ щодо продукції МПС.

За показниками оптичної щільності найшвидше проліферували аММСК: $0,33 \pm 0,004$ од. (100%); найповільніше – ХЦПЯ МД: $0,12 \pm 0,001$ од. (36%), що втричі повільніше, ніж аММСК; та спільні культури обох клітинних типів проліферували в середньому темпі: $0,24 \pm 0,001$ од. (73%).

Досліджено колонієутворюючий потенціал аММСК і хондроцитів на 4-му пасажі: на 10^2 аММСК в середньому за 14 діб утворювалося $52,2 \pm 3,9$ колоній (PE = 52%), $n = 5$; на 10^2 хондроцитів пульпозного ядра в середньому за 14 діб утворювалося $38,4 \pm 1,8$ колоній (PE = 38%), $n = 5$.

Найважливішими параметрами оцінки ефективності нарощування клітин *in vitro* є такі параметри кінетики росту, як число клітинних подвоєнь в популяції та час подвоєння клітинної популяції за умов, що остання знаходиться в фазі логарифмічного росту в межах стандартної кривої росту клітинної популяції (таблиця). Під терміном «ріст клітин» мається на увазі збільшення числа клітин [1]. Початкова щільність посіву клітин обох типів за стандартних умов культивування складала 3×10^3 клітин/см².

Здійснено стандартні тести для аММСК і хондроцитів на остеогенне, адипогенне та хондрогенне диференціювання з подальшим фарбуванням (позитивна

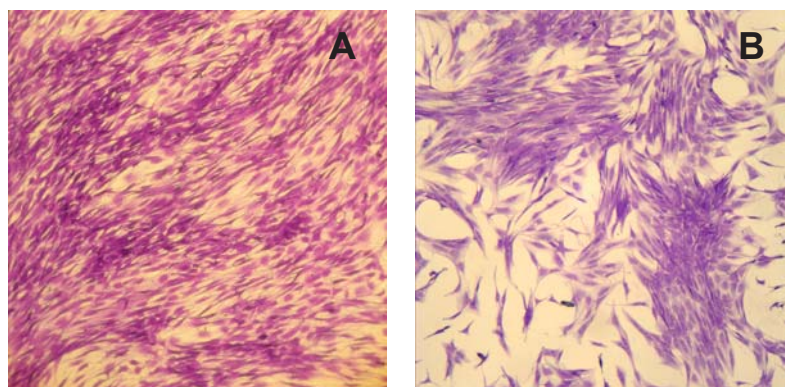


Рис. 1. Конфлуентна культура адипозних ММСК людини, 9-й пасаж (А); субконфлуентна культура ХЦПЯ міжхребцевого диску людини, 4-й пасаж (В); $\times 100$; фарбування кристалічним фіолетовим.

Fig. 1. hADSCs confluent culture, P9 (A); intervertebral disk hNPCs subconfluent culture, P4 (B); $\times 100$; Crystal violet stain.

the proliferation rate of these cell types, the indirect spectrophotometric method was implemented. It failed to get exact metachromatic Toluidine blue staining of cultures; therefore, it does not reflect the production of sulfated glycosaminoglycans (sGAG), but only the indirect proliferative activity of the investigated cell groups via the quantity of absorbed by cell monolayer dye. It revealed any co-stimulation synergistic anabolic effect for hADSCs and hNPCs co-cultures on sGAG production *in vitro*.

By optical density values, hADSCs had the highest proliferation rate, $0,33 \pm 0,004$ optical units, o.u., (100%); hNPCs had the lowest proliferation rate $0,12 \pm 0,001$ o.u., or 36%, about three times slower than hADSCs, and co-cultures of both cell types had the intermediate proliferation rate, $0,24 \pm 0,001$ o.u., or 73%.

CFU potential of hADSCs and hNPCs was assessed (P4, $n = 5$): on day 14 hADSCs formed $52,2 \pm 3,9$ CFUs per 10^2 cells (PE = 52%) and hNPCs formed $38,4 \pm 1,8$ CFUs per 10^2 cells (PE = 38%).

The most important parameters for *in vitro* cell expansion evaluation are growth kinetics, such as cell

Параметри кінетики росту клітинних популяцій протягом 4-х пасажів
Cell growth kinetics within four passages

Культура Culture	$X_0, \times 10^5$	$X_k, \times 10^5$	T_r , год./hrs	n	t_{dr} , год./hrs
аММСК hADSCs	2	23	$114 \pm 11,5$	3,5	32,3
ХЦПЯ hNPCs	0,92	8,6	$174 \pm 15,1$	3,2	54,0

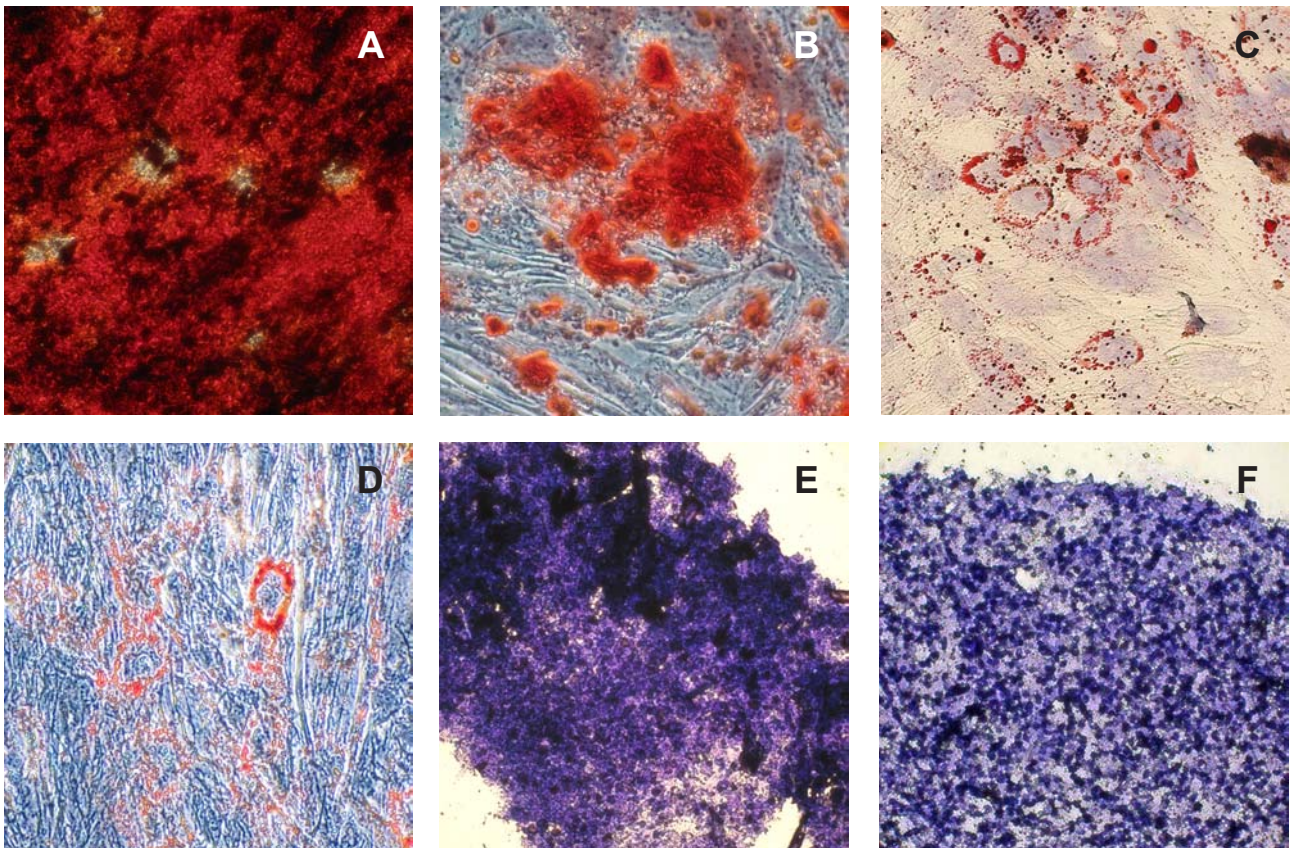


Рис. 2. Osteogenic differentiation test, 5×10^4 cells per well, day 21, Alizarin Red S stain: A – aMMCK, 5-й пасаж, $\times 200$; B – ХЦПЯ, 8-й пасаж, $\times 200$. Adipogenic differentiation test, 5×10^4 per well, day 21, Oil Red O stain, Eosin Azure counterstain: C – aMMCK, 5-й пасаж, $\times 320$; D – ХЦПЯ, 8-й пасаж, $\times 320$. Chondrogenic differentiation test, 3×10^5 per 15 ml tube, micromass culture, day 21; 20 μm section; Toluidine Blue stain/sodium tetraborate; E – aMMCK, 2-й пасаж, $\times 200$; F – ХЦПЯ, 5-й пасаж, фарбування толуїдиновим синім/тетраборнокислим натрієм, $\times 200$.

Fig. 2. Osteogenic differentiation test, 5×10^4 cells per well, day 21, Alizarin Red S stain: A – hADSCs, P5, $\times 200$; B – hNPCs, P8, $\times 200$. Adipogenic differentiation test, 5×10^4 per well, day 21, Oil Red O stain, Eosin Azure counterstain: C – hADSCs, P5, $\times 320$; D – hNPCs, P8, $\times 320$. Chondrogenic differentiation test, 3×10^5 per 15 ml tube, micromass culture, day 21; 20 μm section; Toluidine Blue stain/sodium tetraborate; E – hADSCs, P2, $\times 200$; F – hNPCs, P5, $\times 200$.

реакція) алізариним червоним S з метою виявлення відкладення солей кальцію, в контрольній групі забарвлення не спостерігали (рис. 2, A, B), жировим червоним O – на ліпідні вакуолі, в контрольній групі забарвлення не спостерігали (рис. 2, C, D) та толуїдиновим синім/тетраборнокислим натрієм на кислі МПС (в контрольній групі не спостерігали формування хондроїду) після 21-денної індукції (рис. 2, E, F).

Як культивовані aMMCK, так і ХЦПЯ МД мають фенотип, властивий клітинам мезенхімального ряду: $\text{CD90}^+\text{CD73}^+\text{CD105}^+\text{CD44}^+\text{CD34}^-\text{CD45}^-$.

Таким чином, можна підсумувати, що найшвидше з досліджених проліферують культури aMMCK, втричі повільніше – культури ХЦПЯ, а спільні культури обох клітинних типів проліферують в середньому темпі. Відсутній стимулюючий синергетичний анаболічний ефект *in vitro* в спільній культурі aMMCK та ХЦПЯ щодо продукції кислих МПС за результатами фарбу-

population doubling number (PDN, n) and population doubling time (t_d), which are calculated in Table 1. Cell population is in the exponential growth phase within the standard cell growth curve. The term 'cell growth' refers to cell number increasing [1]. Initial plating density of both cell types under standard culture conditions was 3×10^3 per cm^2 .

Standard tests for hADSCs and hNPCs for osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation were done followed by staining (positive reaction; staining didn't observed in control groups) with Alizarin Red S stain for the calcium salt depositions (Fig. 2A, B); Oil Red O stain for lipid vacuoles (Fig. 2C, D) and Toluidine blue stain/sodium tetraborate for sGAG (no chondroid formation in control group) after 21-days induction (Fig. 2E, F).

Both cultured hADSCs and hNPCs share the phenotype characteristics of mesenchymal cells: $\text{CD90}^+\text{CD73}^+\text{CD105}^+\text{CD44}^+\text{CD34}^-\text{CD45}^-$.

вання толуїдиновим синім. Ефективність посіву за результатами КУО-аналізу складала PE = 52% для аММСК, та PE = 38% для ХЦПЯ. Культури обох клітинних типів диференціювалися за трьома ортодоксальними напрямками мезенхімальних клітин: адипогенним, остеогенним та хондрогенним.

Література

1. *Фрешни Р. Я.* Культура животных клеток: практическое руководство. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2010. – 691 с.
2. *Dimar J.R., Glassman S.D., Carreon L.Y.* Juvenile degenerative disc disease: a report of 76 cases identified by magnetic resonance imaging // *Spine*. – 2007. – Vol. 7, №3. – P. 332–337.
3. *Gimble J., Guilak F.* Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential // *Cytotherapy*. – 2003. – Vol. 5, №5. – P. 362–369.
4. *Gruber H.E., Hanley E.N. Jr.* Human disc cells in monolayer vs 3D culture: cell shape, division and matrix formation // *BMC Musculoskeletal Disorders*. – 2000. – Vol. 1: 1.
5. *Prockop D.J., Phinney D.G., Bunnell B.A.* Mesenchymal stem cells: methods and protocols. – Totowa, NJ: Humana Press, 2008. – 192 p.

Надійшла 01.06.2012

In fine, we can conclude that hADSCs had the highest proliferation rate, hNPCs had the lowest proliferation rate, about three times slower than hADSCs, and co-cultures of both cell types had the intermediate proliferation rate. There is any co-stimulation synergistic anabolic effect in hADSCs and hNPCs co-cultures on sGAG production *in vitro* according to the Toluidine blue staining. The cell Plating Efficiency, as a result of CFU-assay, were PE = 52% for hADSCs, and PE = 38% for hNPCs. Both cell types' cultures differentiated via three orthodox lineages for mesenchymal cells: adipogenic, osteogenic and chondrogenic.

References

1. *Freshney R.I.* Culture of animal cells: Methods. – Moscow: BINOM, 2010. – 691 p.
2. *Dimar J.R., Glassman S.D., Carreon L.Y.* Juvenile degenerative disc disease: a report of 76 cases identified by magnetic resonance imaging // *Spine*. – 2007. – Vol. 7, №3. – P. 332–337.
3. *Gimble J., Guilak F.* Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential // *Cytotherapy*. – 2003. – Vol. 5, N5. – P. 362–369.
4. *Gruber H.E., Hanley E.N. Jr.* Human disc cells in monolayer vs 3D culture: cell shape, division and matrix formation // *BMC Musculoskeletal Disorders*. – 2000. – Vol. 1: 1.
5. *Prockop D.J., Phinney D.G., Bunnell B.A.* Mesenchymal stem cells: methods and protocols. – Totowa, NJ: Humana Press, 2008. – 192 p.

Accepted 01.06.2012