

# Výsledky srovnání chondrogenní diferenciace mezenchymálních kmenových buněk získaných z tukové tkáně s kultivovanými chondrocyty a mezenchymálními kmenovými buňkami z kostní dřeně

## Comparison of Chondrogenic Differentiation of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells with Cultured Chondrocytes and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

V. HAVLAS<sup>1</sup>, P. KOS<sup>1</sup>, P. JENDELOVÁ<sup>2,3</sup>, P. LESNÝ<sup>2</sup>, T. TRČ<sup>1</sup>, E. SYKOVÁ<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Ortopedická klinika UK 2. LF a FN Motol, dětská a dospělá ortopedie a traumatologie, Praha

<sup>2</sup> Centrum buněčné terapie a tkáňových náhrad 2. LF UK a FN Motol, Praha

<sup>3</sup> Ústav experimentální medicíny AV ČR, Praha

### ABSTRACT

#### PURPOSE OF THE STUDY

Many congenital and acquired disorders as well as sequelae of injury are associated with articular cartilage degeneration, which adversely affects the patient's quality of life. The currently used cell therapy with cultured chondrocytes has its disadvantages due to a process of de-differentiation of chondrocytes during cultivation. We believe that the mesenchymal stem cell therapy offers a new treatment options.

#### MATERIAL AND METHODS

The adult mesenchymal stem cells (MSCs) for chondrocyte differentiation are usually obtained from bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). In this study these cells were compared with mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (AMSCs). The aim of the study was to verify the ability of human BMSCs and AMSCs to differentiate into chondrocytes in vitro in the presence or absence of transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ 1). Human BMSCs and AMSCs were collected from healthy donors during orthopaedic surgeries, in vitro cultured in three passages to obtain the required quantity of cells. A pellet culture system was used for chondrocyte differentiation.

#### RESULTS

At 21 days of cultivation, cell aggregates grown in the chondrogenic medium were larger than those cultured in the control medium. Both the BMSCs and AMSCs pellet cultures showed spontaneous chondrogenesis. Histological staining with haematoxylin and eosin and Masson's trichrome stains, as well as immunohistochemical staining to detect type II collagen revealed no apparent differences between the pellet cultures with TGF- $\beta$ 1 presence and those without it. The real-time RT-PCR detected expression of the type II collagen gene in all tested cultures. In the BMSCs pellet culture only, TGF- $\beta$ 1 presence resulted in a decrease in type I collagen mRNA levels and in an increase in type II collagen mRNA values.

#### DISCUSSION

Our results showed an in vitro chondrogenic potential of mature human mesenchymal stem cells derived from both bone marrow and adipose tissue. In agreement with the relevant literature data, we suggest that both cell types have an equal prospect for use in cartilage tissue engineering.

**Key words:** bone marrow, adipose tissue, transforming growth factor beta, cartilage, pellet culture system.

## ÚVOD

Léčba poškozené kloubní chrupavky je relativně obtížná především díky základním biomechanickým a histologickým vlastnostem a velmi omezené schopnosti regenerace hyalinní kloubní chrupavky (3, 10, 15). Hyalinní chrupavka je nízkobuněčná avaskulární tkáň bez inervace, s převládajícím objemem extracelulární matrix. Defekty chrupavky se většinou hojí vazivovou chrupavkou, která je ve srovnání s hyalinní chrupavkou biologicky i mechanicky méněcenná (3, 10, 15, 17, 21, 22). Ve většině případů dochází následkem poškození chrupavky k pozdnímu rozvoji artrózy (6), kde je chirurgický výkon (např. totální náhrada kloubu) často jediným možným konečným řešením (27).

Současné metody léčby defektů chrupavky jsou limitovány a zahrnují abrazivní chondroplastiku, mikrofraktury či subchondrální návrty, transplantaci autologního osteochondrálního autoštěpu (mozaiková plastika), překrytí defektu periostem či perichondriem, transplantaci kultivovaných autologních chondrocytů, či implantaci čerstvých alogenních osteochondrálních štěpů (3, 4, 7, 10, 15, 17, 21, 23, 28). I když mají uvedené postupy léčby slibné výsledky, v převážné většině případů se defekt hojí méně kvalitní vazivovou chrupavkou. Z literatury víme, že u metod využívajících in vitro kultivovaných chondrocytů dochází k nežádoucí dediferenciaci buněk. Následkem toho dojde ke změně morfologie chondrocytů směrem k řadě fibroblastů, čímž je žádoucí produkce kolagenu II. typu nahrazena produkcí kolagenu I. typu, typickým pro vazivovou chrupavku (17, 25).

V literatuře bylo v posledních letech popsáno několik studií zaměřujících se na využití zralých mezenchymálních kmenových buněk kostní dřene (Mesenchymal Stem Cells – dále jen MSCs) jako alternativy k využití autologních chondrocytů (1, 19). MSCs izolované z kostní dřene jsou multipotentní progenitorové buňky, které se při kultivaci mohou diferencovat směrem k řadě osteoblastů, chondrocytů, adipocytů či myoblastů (24). K diferenciaci MSCs in vitro se využívá specifických mezibuněčných interakcí za přítomnosti růstových faktorů, jako jsou např. transformující růstový faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), kostní morfogenetické proteiny (Bone Morphogenetic Proteins – BMPs) či insulin-like růstový faktor-1 (IGF-1) (12, 13). Bosnakovski a spolupracovníci však popisují také spontánní chondrogenní diferenciaci MSCs v peletovém kultivačním systému, bez nutnosti podpory růstovými faktory (1, 2).

V nedávné době byl popsán potenciál diferenciaci do různých buněčných linií včetně chondrocytů také u MSCs získaných z lidské tukové tkáně při liposukci (8, 9, 30). Možnost využití tohoto typu buněk se zdá být velmi atraktivní, neboť podkožní tuk je v lidském těle v nadbytku a jeho odběr představuje pro pacienta minimálně invazivní výkon.

V naší studii jsme hodnotili chondrogenní potenciál MSCs izolovaných jak z kostní dřene, tak z tukové tkáně, přičemž u obou skupin buněk jsme porovnali jejich povrchové markery pomocí průtokové cytometrie (FACS analýza). Chondrogenese obou řad buněk byla

indukována in vitro za využití peletového kultivačního systému. Testování jsme provedli za přítomnosti TGF-1 i bez něj. Chondrogenní potenciál obou řad buněk jsme srovnali s chondrocyty izolovanými ze zdravé hyalinní chrupavky.

## MATERIÁL A METODY

### Získání vzorků

Kostní dřeň jsme získali v průběhu chirurgické náhrady kolenního kloubu aspirací metafyzární krve z oblasti proximální tibie, tuková tkáň byla získána z podkožního tuku v oblasti kolenního kloubu. Vzorky kloubní chrupavky (chondrocyty) jsme získali od dárců v průběhu artroskopických výkonů s cílem ošetření defektů chrupavky. Odběr byl proveden vždy po informovaném souhlasu pacienta. Všechny odběry vzorků jsme prováděli v souladu s Helsinskou deklarací a se souhlasem etické komise Fakultní nemocnice v Motole.

### Izolace a kultivace buněk

*Mezenchymální kmenové buňky získané z kostní dřene* (bone marrow mesenchymal stem cells – dále jen BMSCs) jsme izolovali z čerstvých vzorků transportovaných s příměsí 20 U/ml heparinu ve sterilním fyziologickém roztoku (1, 2, 24). Separace buněk byla provedena za 30minutové gradientové centrifugace Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Švédsko) při otáčkách 1800/min. Získané buňky jsme 2krát promyli ve fosfátovém solném roztoku (PBS), poté centrifugovali 5 minut při otáčkách 1200/min. Buňky ( $2 \times 10^5$  buněk/ml) jsme poté kultivovali v Petriho miskách o velikosti 100 mm při 37° C ve zvlhčené atmosféře s obsahem 5% CO<sub>2</sub> v kultivačním médiu složeném z  $\alpha$ -MEM (Gibco, USA), 10% fetálního bovinního séra (FBS, PAA, Rakousko), 100 U/ml Penicilinu a 100 g/ml Streptomycinu (PAA, Rakousko). Po 24 hodinách jsme výměnou kultivačního média dosáhli odstranění neadherujících buněk. V průběhu následné kultivace bylo médium měněno každé 3 dny. Po 7–10 dnech byly získané buňky izolovány pomocí 0,25% trypsinu (Gibco, USA) a rekultivovány třetí pasáží.

*Mezenchymální kmenové buňky z tukové tkáně* (adipose tissue-derived mesenchymal stem cells – dále jen AMSCs) jsme získali z čerstvě odebraného podkožního tuku (8). Tukovou tkáň jsme opatrně promyli v PBS a mechanicky rozmělnili skalpelem. Poté jsme tukové vzorky nechali 60 minut při 37° C naštěpit 0,1% kolagenázou (Serva, Německo) v PBS obohaceném 1% lidským albuminem (Grifols, Španělsko), za protřepávání s frekvencí 75/min. Uvolněné buňky a zbytkovou tukovou tkáň jsme centrifugovali po dobu 5 minut při otáčkách 1200/min. Odsáli jsme supernatant obsahující olej, tuk, primární adipocyty a spodní vrstvu kolagenázy. Peletu jsme poté resuspendovali v PBS s 1% lidským albuminem a centrifugovali 5 minut při otáčkách 1200/min. Buňky jsme dále kultivovali při 37° C na 100 mm Petriho miskách s počáteční hustotou  $2 \times 10^5$  buněk/ml ve zvlhčené atmosféře s obsahem 5% CO<sub>2</sub> v kultivačním médiu složeném z D-MEM/F12 1:1 (Gib-

co, USA) s 10% FBS, 100 U/ml Penicilinu a 100 g/ml Streptomycinu. Po 24 hodinách kultivace jsme neadhe-rující buňky odsáli spolu s médiem a doplnili čerstvé médium. Kultivační médium jsme měnili každé 3 dny. Pro získání dostatečného množství AMSCs jsme buňky takto kultivovali ve 3 pasážích.

*Chondrocyty* jsme získali odběrem kloubní chrupavky při artroskopii kolenního kloubu podle dříve publikovaných protokolů (3). Získanou chrupavku jsme promyli PBS a mechanicky rozmělnili skalpelem. Získaný vzorek jsme nechali 1 hodinu naštěpit v 0,25% trypsinu a následně 12 hodin při 37° C v 0,1% kolagenáze. K uvolněným buňkám jsme přidali D-MEM/F12 1:1 s 10% FBS a centrifugovali 10 minut při otáčkách 1200/min. Peletu jsme naložili do D-MEM/F12 1:1 s 10% FBS, 100 U/ml Penicilinu a 100 g/ml Streptomycinu. Buňky jsme dále kultivovali při 37° C na 100 mm Petriho miskách s počáteční hustotou  $2 \times 10^5$  buněk/ml ve zvlhčené atmosféře s obsahem 5% CO<sub>2</sub>. Chondrocyty jsme kultivovali ve 3 pasážích, přičemž kultivační médium bylo měněno každé 3 dny.

### Fenotypizace

BMSCs a AMSCs ze třetí pasáže byly analyzovány metodou přímé a nepřímé imunofluorescence podle protokolu specifického pro danou protilátku. Ve všech případech jsme získali 10 000 záznamů analýzy pomocí BD FACS Aria průtokového cytometru s využitím BD FACS-Diva softwaru (Becton Dickinson, USA). Pro buněčné barvení jsme použili následující protilátky: anti-CD29-PE, anti-CD44-FITC, anti-CD90-FITC (BD Pharmingen, USA); anti-CD45-PE-Cy5, anti-CD235a-PE (DakoCytomation, Dánsko); anti-CD34-FITC, anti-HLA třídy I-FITC, anti-HLA DR+DP (Exbio, Česká Republika); protilátku proti povrchovému proteinu lidského fibroblastu (Sigma) se sekundárně-konjugovanou oslí protilátkou proti myšimu IgG (Chemicon, USA). Neimunizované myši izotypy byly vybrány jako kontroly.

### Peletový kultivační systém

K chondrogenní diferenciaci BMSCs a AMSCs jsme použili třírozměrný peletový kultivační systém. Jednotlivé buněčné pelety byly získány 10minutovou centrifugací  $2 \times 10^6$  BMSCs či AMSCs, vždy v 15ml polypropylenových zkumavkách (TPP, Švýcarsko) při 1500 ot/min. Chondrogenní médium se skládalo z DMEM/F12 1:1, 10% FBS, 100 U/ml Penicilinu, 100 g/ml Streptomycinu a 10 ng/ml TGF-1 (R&D systems, USA). Spontánní diferenciaci chondrocytů získaných z odebrané chrupavky jsme prováděli za stejných kultivačních podmínek, pouze bez přítomnosti TGF-β1. Jako kontrolu jsme vždy použili chondrocyty z druhé pasáže. Všechny zkumavky jsme uchovávali v inkubátoru při 37° C se zvlhčenou atmosférou s podílem 5% CO<sub>2</sub>. Kultivační médium jsme pečlivě každé 3 dny měnili po celkovou dobu 21 dní.

### Histologické barvení a imunohistochemie

Po 21 dnech jsme získané pelety 4 hodiny fixovali 4% paraformaldehydem, poté dehydratovali etanolem a za-

lili do parafínu. Parafínové bločky jsme nařezali na 5 m řezy, deparafinovali xylenem a rehydratovali destilovanou vodou. Získané řezy jsme barvili hematoxylin – eozinem (Sigma, USA) k zobrazení buněčné morfologie a Massonovým trichromem (Sigma, USA) k zobrazení kolagenní matrix.

Přítomnost kolagenu II. typu jsme prokazovali imunohistochemicky s využitím cílených monoklonálních protilátek proti kolagenu II. typu (Chemicon, USA) podle doporučení výrobce.

### Transmisní elektronová mikroskopie

Vzorky pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) jsme fixovali 4 hodiny při 4° C v 2,5% glutaraldehydu (Serva, Německo), při pH 7,2. Po fixaci jsme vždy vzorky promyli PBS a refixovali v 2% osmium tetroxidem (Serva, Německo) po dobu 2 hodin, poté promyli destilovanou vodou a postupně dehydratovali etanolem. Následně byly vzorky zalaty do parafínu a nařezány. Získané ultratenké řezy byly po dvojím obarvení uranyl acetátem a citrátem olovnatým (Serva, Německo) následně vyšetřeny na TEM typu Philips Morgagni 268.

### Detekce RNA pomocí real-time reverzní transkripční polymerázové řetězové reakce (RT-PCR)

Bezprostředně po ukončení chondrogenní diferenciacie jsme ze všech vzorků izolovali vzorovou m-RNA za použití „Oligotex Direct mRNA micro kit“ (Qiagen, USA) s dodržением protokolu výrobce. Přítomnost sledovaných genů (kolagen I, kolagen II, aggrecan) jsme analyzovali pomocí „QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit“ (Qiagen, USA) na BioRad IQ5 optickém systému (Bio-Rad laboratories, USA). Pro vnitřní kontrolu jsme zvolili β-aktin jako referenční gen. Získaná data jsme vyhodnotili pomocí programu BioRad. Konečné stanovení hladiny m-RNA cílových genů bylo provedeno vydělením jejich hodnot hodnotou hladiny m-RNA β-aktinu.

### Statistická analýza

Data ze tří nezávislých experimentů jsme vyhodnotili a vyjádřili jako průměr ± standardní odchylka. Ke srovnání kvantitativních parametrů jsme použili Studentův t-test. Za signifikantní jsme považovali rozdíly s hodnotou  $p < 0,05$ .

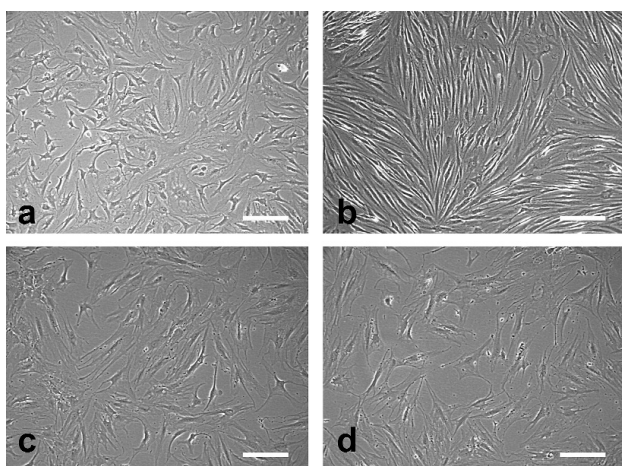
## VÝSLEDKY

### Buněčné kultury

Kultivované chondrocyty vykazovaly typický polygonální vzhled (obr. 1a). V průběhu postupného pasážování (až do třetí pasáže) získané chondrocyty postupně ztrácely svůj původní tvar a jejich morfologie se podobala fibroblastům (obr. 1b). Tento nálezný byl v souladu s dobře známým faktem, že chondrocyty kultivované in vitro podléhají procesu dediferenciacie (17, 25).

Při primární kultivaci BMSCs a AMSCs buňky v obou případech rostly jako izolované kolonie. Po 7–10 dnech





Obr. 1a–d. Buněčná kultura rostoucí v monovrstvě za in vitro podmínek: a – chondrocyty po první pasáži; b – chondrocyty po druhé pasáži (prodloužení buněk svědčí pro dediferenciaci); c – BMSCs po třetí pasáži; d – AMSCs po třetí pasáži (oba typy kultivovaných mezenchymálních kmenových buněk mají bipolární až polygonální tvar podobný fibroblastům). Měřítka = 100 µm.

rostly již buňky v souvislé vrstvě. Oba typy kultivovaných buněk měly též bipolární až polygonální tvar, typický pro kultivované MSCs (obr. 1c, d). V průběhu další kultivace (až do třetí pasáže) si však buňky dále udržely tuto morfologii a žádné další změny v jejich morfologii či proliferaci (resp. dediferenční) aktivitě jsme již nepozorovali.

### Fenotypizace

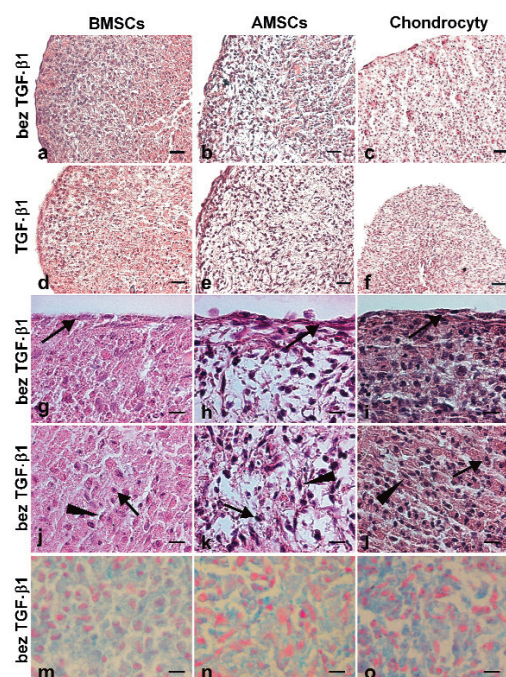
Výsledky fenotypizace buněk po třetím pasážování ukázaly, že téměř všechny BMSCs a AMSCs byly CD29, CD44 a CD90 pozitivní. Všechny buňky byly HLA I pozitivní a HLA II negativní. Naproti tomu expresi markerů hematopoetické řady CD34 a CD45 jsme neprokázali ani v jednom z případů. Navíc u BMSCs a AMSCs nebyla prokázána exprese povrchového proteinu proti lidským fibroblastům.

### Morfologie pelet

Ve všech buněčných kulturách, nezávisle na přítomnosti TGF-β1, byla po 24 hodinách pozorována kondenzace jednotlivých shluků buněk do pelet. Morfologie pelet byla shodná u buněčných kultur BMSC, AMSC i chondrocytů. V průběhu kultivace se rozměr pelet plynule zvětšoval a pelety postupně získaly opákní vzhled. Na konci experimentu byl průměrný rozměr pelet kultivovaných za přítomnosti TGF-β1  $5,2 \pm 0,8 \text{ mm}^2$ , zatímco pelety kultivované bez TGF-β1 byly signifikantně menší,  $3,4 \pm 0,6 \text{ mm}^2$  ( $p < 0,05$ ).

### Histologie a imunohistochemie

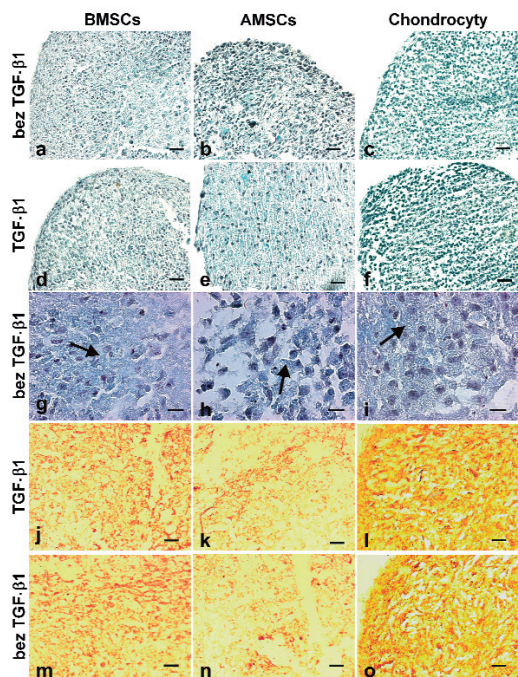
Mikrofotografie řezů barvených hematoxylinem a eosinem (obr. 2a–f) ukázaly ve všech peletách homogenní distribuci buněk. Periferie každé pelety se skládala z jedné či dvou vrstev podlouhlých buněk



Obr. 2a–o. BMSCs, AMSCs a chondrocyty barvené hematoxylinem–eosinem (H-E) 21. den po kultivaci v peletovém systému: a–f: přehledné záznamy pelet, barvení H-E (měřítko = 100 µm); g–i: detaily periferie pelet barvených H-E (měřítko = 10 µm), šipky označují vrstvu podlouhlých buněk; j–l: detaily centrální oblasti pelet barvených H-E (měřítko = 10 µm), šipky ukazují okrouhlé (chondrocytům podobné) buňky, resp. podlouhlé buňky mezenchymálního typu; m–o: barvení alcianovou modří, buněčná jádra se barví červeně; měřítko = 10 µm.

(obr. 2g–i). Centrální oblast obsahovala jak podlouhlé buňky se slabě se barvicím jádrem, odpovídající řídké mezenchymální tkáni, tak okrouhlé, chondrocytům podobné buňky se sytější barvicím jádrem, obklopené extracelulární matrix (obr. 2j–l). Pelety BMSCs a chondrocytů obsahovaly více okrouhlých buněk než pelety AMSCs, převažující tvar buněk ve středu AMSC pelet byl podlouhlý. Buněčná hustota v AMSC peletách byla nižší ve srovnání s BMSC a chondrocytárními peletami. Barvení trichromem dle Massona ukázalo, že buňky v každé skupině byly odděleny rozsáhlými oblastmi extracelulární matrix, tvořené převážně kolagenem (obr. 3a–c). Zajímavé bylo zjištění, že přítomnost TGF-β1 v testovaných koncentracích neměla při barvení hematoxylinem–eosinem (obr. 2d–f) či Massonovým trichromem (obr. 3d–f) vliv na buněčnou morfologii či produkci extracelulární matrix. Imunohistochemické barvení na kolagen II. typu prokázalo jeho přítomnost ve všech peletových kulturách, intenzivněji v centru pelet. Intenzita imunohistochemického barvení byla nejvyšší v chondrocytárních peletách a nejnižší v AMSC peletách (obr. 3g–i). U pelet s vlivem TGF-β1 (obr. 3j–l) se produkce kolagenu II. typu signifikantně neměnila ve srovnání s kulturami bez přítomnosti růstového faktoru (obr. 3m–o).





Obr. 3a-o. Histologický a imunohistochemický obraz BMSCs, AMSCs a chondrocytů kultivovaných 21. den v peletovém kultivačním systému. a-f: barvení Massonovým trichromem (měřítko = 100  $\mu$ m); g-i: centrální části pelet barvené Massonovým trichromem (měřítko = 100  $\mu$ m), šipky označují difuzní extracelulární matrix obklopující buňky; j-o: imunohistochemické barvení s využitím monoklonálních protilátek proti kolagenu II. typu; měřítko = 100  $\mu$ m.

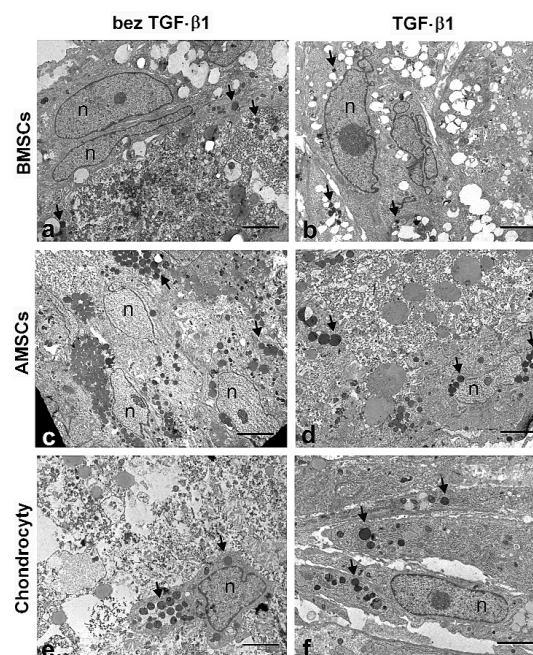
### Transmisní elektronová mikroskopie

TEM obrazy (obr. 4) ukázaly normální ultrastrukturu buněk u BMSCs, AMSCs i chondrocytů. Chondrocyty byly ve všech případech obklopeny nově syntetizovanou ECM. Buňky obsahovaly jádra s jadérky, rozsáhlé endoplasmatické reticulum a transportní vezikuly, charakteristické pro novotvorbu chrupavky. Patologické změny (apoptózu, nekrózu) jsme nepozorovali v žádném ze vzorků.

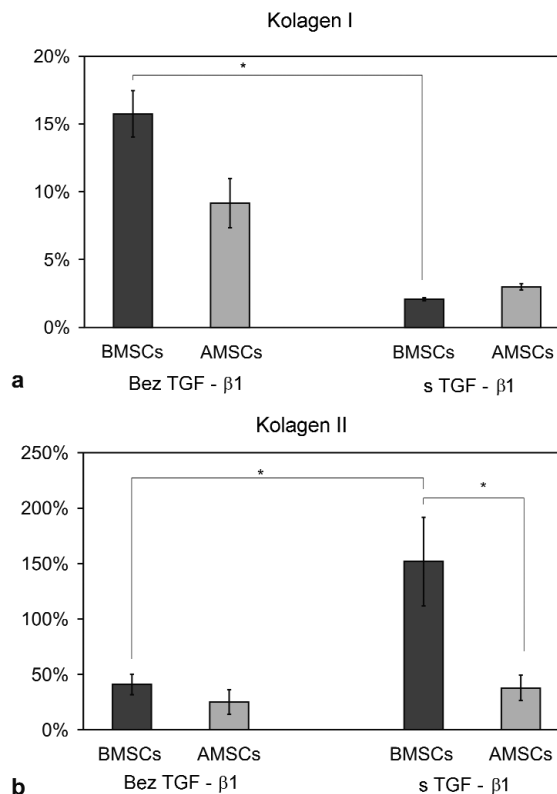
### Real-time RT-PCR kolagenu a aggrecanu

Kvantitativní analýza m-RNA kolagenu u peletových kultur BMSCs a AMSCs bez přítomnosti TGF- $\beta$ 1 ukázala, že hladiny m-RNA kolagenu I. a II. typu byly signifikantně nižší než hodnoty prokázané u chondrocytů (graf 1). V peletových kulturách BMSCs a AMSCs s přítomností TGF- $\beta$ 1 byla hladina m-RNA kolagenu I. typu v obou případech nižší než hodnoty zjištěné v peletových kulturách bez TGF- $\beta$ 1 (graf 1, část a). Kultivace za přítomnosti TGF- $\beta$ 1 vedla u BMSCs k významnému vzrůstu hodnoty m-RNA kolagenu II. typu, překonávající hodnoty zjištěné u chondrocytů kultivovaných ve stejném diferenciacním médiu. Množství m-RNA pro kolagen II. typu se u AMSCs za přítomnosti TGF- $\beta$ 1 neměnilo (graf 1, část b).

U chondrocytárních peletových kultur s i bez přítomnosti TGF- $\beta$ 1 bylo možné detekovat m-RNA pro aggrecan, nicméně u peletových kultur mezenchymálních



Obr. 4. Zobrazení BMSCs, AMSCs a chondrocytů kultivovaných 21. den v peletovém kultivačním systému transmisním elektronovým mikroskopem. Šipky označují transportní vehikuly, n = buněčné jádro (měřítko = 1  $\mu$ m).



Graf 1a-b. RT-PCR analýza m-RNA pro kolagen typu I (a) a II (b), hodnoty jsou vypočteny jako podíl hladin kolagenu a  $\beta$ -actinu a jsou uvedeny jako procento kolagenní produkce v chondrocytech za shodných kultivačních podmínek; \*  $p < 0.05$ .

kmenových buněk jsme v průběhu tří týdnů kultivace přítomnost m-RNA aggrecanu neprokázali.

## DISKUSE

Použití autologních chondrocytů k léčbě defektů kloubních chrupavek publikoval poprvé roku 1994 Brittberg, kdy operoval 23 pacientů pro izolovaný defekt chrupavky kolena způsobený úrazem nebo dissekující osteochondrózou (3). Tato, dnes široce využívaná technika léčby fokálních chondrálních defektů, je limitována především dvěma důležitými faktory: chondrocyty ke kultivaci musí být artroskopicky odebrány ze zdravé kloubní chrupavky, přičemž je nezbytná následná operace se zvýšením rizika pro pacienta; dále je známo, že chondrocyty ztrácejí při kultivaci in vitro své morfologické a biochemické vlastnosti a stávají se tak stále méně vhodné pro tkáňové inženýrství (17, 25).

Z těchto důvodů je v posledních několika letech snaha nalézt jiný zdroj snadno dostupných buněk s chondrogenním diferenciatčním potenciálem. Bylo provedeno několik studií s MSCs zvířecího i lidského původu izolovaných z kostní dřeně (1, 2, 19). Bohužel využití BMSCs má své limity spojené především s diskomfortem a bolestivostí při odběru kostní dřeně (1, 2). Jako slibná alternativa k BMSCs se do budoucna jeví využití AMSCs, které mohou být snadno odebrány ve velkém množství a s minimální traumatizací pacienta (29). Tuková tkáň je snadno odebratelná v hojném množství a z relativně malého množství tkáně je možné získat velké množství AMSCs (30). V naší studii jsme při vyšetřování povrchových markerů charakteristických pro mezenchymální buňky našli podobný fenotyp u AMSCs i BMSCs. Dále jsme prokázali schopnost diferenciaci AMSCs směrem k chondrocytárnímu fenotypu, podobně jako je tomu u BMSCs.

Mnoho autorů používá peletový kultivační systém za účelem studia chondrocytární diferenciaci při indukci chondrogenese růstovými a diferenciatními faktory jako TGF- $\beta$ 1, BMP či IGF. Nejčastěji využívaným růstovým faktorem je TGF- $\beta$ 1, který působí prostřednictvím třírozměrného komplexu obsahujícího membránové receptory a nitrobuněčnou signalizační kaskádu (12).

V naší studii jsme však docílili spontánní chondrogenese u AMSCs i BMSCs bez přítomnosti TGF- $\beta$ 1, která byla doposud považována za nezbytnou (13, 20). Tato zjištění jsou zcela v souladu s výsledky Bosnakovského, který pozoroval spontánní chondrogenní diferenciaci v peletových kulturách u hovězích BMSCs (1, 2). Podmínky v peletové kultuře zjevně napodobují kondenzační proces buněk a hypoxické prostředí objevující se v průběhu in vivo chondrogenese (5).

Chondrogenní povaha diferencovaných buněk v našich peletových kulturách je potvrzena následujícími zjištěními: 1) tvorba kartilaginózní matrix obsahující kolagen a proteoglykany ověřená histologickým barvením a imunohistochemickou analýzou, 2) přítomnost transportních vezikul na mikrofotografiích z TEM a 3) exprese m-RNA pro kolagen II. typu potvrzená real-time RT-PCR analýzou.

Přestože naše výsledky ukazují, že vzniklé pelety kultivované za přítomnosti TGF- $\beta$ 1 byly větší než pelety kultivované bez přítomnosti TGF- $\beta$ 1, neshledali jsme žádný patrný rozdíl v histologii těchto dvou skupin. Histologická analýza ukázala, že přítomnost TGF- $\beta$ 1 neměla efekt na buněčnou morfologii, což bylo potvrzeno i TEM analýzou. Efekt TGF- $\beta$ 1 je evidentně komplexní a tento faktor samotný nemůže přispět k řádnému vzniku zralých chondrocytů ve všech buněčných typech. Mnoho autorů zdůrazňuje význam TGF- $\beta$ 1 pro zrání chrupavky (2), nicméně někteří autoři uvádějí, že TGF- $\beta$ 1 je pouze jedním z faktorů, které udržují chondrocyty v diferencovaném stavu a brání jejich abnormální terminální dediferenciaci (12).

Analýza real-time RT-PCR ukázala signifikantně nižší hladiny m-RNA pro kolagen I. typu u BMSCs a AMSCs kultivovaných s TGF- $\beta$ 1. Toto zjištění je ve shodě s dalšími studiemi, které prokazují, že produkce kolagenu I. typu je jedním z limitujících faktorů chondrogenní diferenciaci (14,16). Množství m-RNA pro kolagen II. typu v peletových kulturách bez přítomnosti růstového faktoru nebylo signifikantně odlišné při srovnání BMSCs a AMSCs, přičemž oba buněčné typy jevíly přibližně stejnou míru spontánní chondrogenní diferenciaci.

V žádné z peletových kultur mezenchymálních kmenových buněk jsme nedetekovali m-RNA pro aggrecan. Je možné, že tento negativní výsledek může být způsoben námi zvoleným časováním analýzy aggrecanu (po třech týdnech v peletové kultuře). Bylo publikováno, že aggrecan se akumuluje na počátku chondrogenese, současně s buněčnou kondenzací (1, 2, 24). Jiná práce uvádí (9), že odebrané tukové buňky v peletových kulturách produkují aggrecan po 2 dnech kultivace a tvorba se zastavuje po 2 týdnech od indukce chondrogenese, kdy převládá produkce kolagenu II. typu.

Otázka, které buňky (AMSCs či BMSCs) jsou vhodnější náhradou za primárně kultivované chondrocyty, se stále diskutuje (18,24). Strem a kol. (26) analyzovali AMSCs a BMSCs od stejných pacientů za shodných podmínek a zjistili, že AMSCs mají větší chondrogenní potenciál než BMSCs. Naproti tomu Winter a kol. (29) prokázali, že zatím co AMSCs a BMSCs se ve své schopnosti chondrogenese ve dvourozměrných kulturách signifikantně neliší, BMSCs v jejich studii projevíly větší schopnost chondrogenese v třírozměrných kulturách.

## ZÁVĚR

V naší studii jsme potvrdili vysoký chondrogenní potenciál AMSCs i BMSCs. Naše výsledky také ukazují, že TGF- $\beta$ 1 nemusí jednoznačně být hlavní bioaktivní molekulou ovlivňující chondrogenní diferenciaci. V současnosti se zkoumají další růstové faktory a jejich kombinace, jako TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, BMP-6 a IGF-1 (11, 12).

Přestože je zatím peletová kultivace při náhradě chrupavky daleko od přímého klinického využití, schopnost MSCs diferencovat se do buněk podobných chondrocytům se zdá být slibná. AMSCs mají pravděpodobně niž-



ší chondrogenní potenciál než BMSCs, přesto je třeba dále studovat jejich schopnost diferenciaci v biomateriálech za přítomnosti jiných růstových faktorů než TGF- $\beta$ 1. Domníváme se, že oba typy zkoumaných MSCs budou v budoucnu hrát důležitou roli v tkáňovém inženýrství chrupavky.

## Literatura

- BOSNAKOVSKI, D., MIZUNO, M., KIM, G., TAKAGI, S., OKUMURA, M., FUJINAGA, T.: Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res.*, 319: 243–253, 2005.
- BOSNAKOVSKI, D., MIZUNO, M., KIM, G., TAKAGI, S., OKUMURA, M., FUJINAGA, T.: Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis. *Biotechnol. Bioeng.*, 93: 1152–1163, 2006.
- BRITTBURG, M., LINDAHL, A., NILSSON, A., OHLSSON, C., ISAKSSON, O., PETERSON, L.: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.*, 331: 889–895, 1994.
- CONVERY, F. R., AKESON, W. H., AMIEL, D., MEYERS, M. H., MONOSOV, A.: Long-term survival of chondrocytes in an osteochondral articular cartilage allograft. A case report. *J. Bone Jt Surg.* 78-A: 1082–1088, 1996.
- DENKER, A. E., NICOLL, S. B., TUAN, R. S.: Formation of cartilage-like spheroids by micromass cultures of murine C3H10T1/2 cells upon treatment with transforming growth factor-beta 1. *Differentiation*, 59: 25–34, 1995.
- FRENKEL, S. R., DI CESARE, P. E.: Degradation and repair of articular cartilage. *Front Biosci.*, 4: D671–685, 1999.
- GILLOGLY, S. D., MYERS, T. H.: Treatment of full-thickness chondral defects with autologous chondrocyte implantation. *Orthop. Clin. N.* 36-A: 433–446, 2005.
- GIMBLE, J., GUILAK, F.: Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytherapy*, 5: 362–369, 2003.
- HUANG, J. I., ZUK, P. A., JONES, N. F., ZHU, M., LORENZ, H. P., HEDRICK, M. H., BENHAIM, P.: Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plast. Reconstr. Surg.*, 113: 585–594, 2004.
- HUNZIKER, E. B.: Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage*, 10: 432–463, 2002.
- IM, G. I., JUNG, N. H., TAE, S. K.: Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from patients in late adulthood: the optimal conditions of growth factors. *Tissue Eng.*, 12: 527–536, 2006.
- INDRAWATTANA, N., CHEN, G., TADOKORO, M., SHANN, L. H., OHGUSHI, H., TATEISHI, T., TANAKA, J., BUNYARATVEJ, A.: Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 320: 914–919, 2004.
- JOHNSTONE, B., HERING, T. M., CAPLAN, A. I., GOLDBERG, V. M., YOO, J. U.: In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.*, 238: 265–272, 1998.
- KIRSCH, T., VON DER MARK, K.: Remodelling of collagen types I, II and X and calcification of human fetal cartilage. *Bone Miner.*, 18: 107–117, 1992.
- KOMÁREK, J., VALIŠ, P., ŘEPKO, M., CHALOUPKA, R., KRBEC, M.: Léčba osteochondrálních defektů kolenního kloubu metodou implantace solidního chondrograftu – dlouhodobé výsledky. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 77, 291–295, 2010.
- KOSHER, R. A., KULYK, W. M., GAY, S. W.: Collagen gene expression during limb cartilage differentiation. *J. Cell Biol.*, 102: 1151–1156, 1986.
- LA PRADE, R. F., BURSCH, L., OLSON, E. J., HAVLAS, V., CARLSON, C. S.: Histological Characteristics of Failed Articular Cartilage Replacement Procedures: A Case Series. *Am J Sports Med.*, 36: 360–8, 2008.
- LEE, R. H., KIM, B., CHOI, I., KIM, H., CHOI, H. S., SUH, K., BAE, Y. C., JUNG, J. S.: Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol. Biochem.*, 14: 311–324, 2004.
- MACKAY, A. M., BECK, S. C., MURPHY, J. M., BARRY, F. P., CHICHESTER, C. O., PITTEGER, M. F.: Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng.*, 4: 415–428, 1998.
- MASTROGIACOMO, M., CANCEDDA, R., QUARTO, R.: Effect of different growth factors on the chondrogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage*, 9 Suppl. A: S36–40, 2001.
- MINAS, T., NEHRER, S.: Current concepts in the treatment of articular cartilage defects. *Orthopedics*, 20: 525–538, 1997.
- MUSIL, D., SADOVSKÝ, P., STEHLÍK, J., FILIP, L., VODIČKA, Z.: Artroskopický kapsulární release u syndromu zmrzlého ramene. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 76: 98–103, 2009.
- PODŠKUBKA, A., POVÝSIL, C., KUBEŠ, R., ŠPRINDRICH, J., SEDLÁČEK, R.: Treatment of deep cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte transplantation on a hyaluronic Acid ester scaffolds (Hyalograft C). *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 73: 251–63, 2006.
- SAKAGUCHI, Y., SEKIYA, I., YAGISHITA, K., MUNETA, T.: Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.*, 52: 2521–2529, 2005.
- 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. *Osteoarthritis Cartilage*, 10: 62–70, 2002.
- STREM, B. M., HEDRICK, M. H.: The growing importance of fat in regenerative medicine. *Trends Biotechnol.*, 23: 64–66, 2005.
- TULI, R., LI, W. J., TUAN, R. S.: Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Res Ther.*, 5: 235–238, 2003.
- VIŠŇA, P., PAŠA, L., HART, R., KOCIS, J., ČIŽMÁR, I., ADLER, J.: Treatment of deep chondral defects of the knee using autologous chondrocytes cultured on a support - results after one year. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 70: 356–62, 2003.
- WINTER, A., BREIT, S., PARSCH, D., BENZ, K., STECK, E., HAUNER, H., WEBER, R. M., EWERBECK, V., RICHTER, W.: Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum.*, 48: 418–429, 2003.
- ZUK, P. A., ZHU, M., MIZUNO, H., HUANG, J., FUTRELL, J. W., KATZ, A. J., BENHAIM, P., LORENZ, H. P., HEDRICK, M. H.: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.*, 7: 211–228, 2001.

## Korespondující autor:

As. MUDr. Vojtěch Havlas, Ph.D.

Ortopedická klinika 2. LF UK – dětská a dospělá ortopedie a traumatologie

V Úvalu 84,

150 06 Praha 5

E-mail: vojtech.havlas@lfmotol.cuni.cz

Tato práce byla podpořena grantovou agenturou MZČR č. NR 8121-3 a grantem MŠMT 2 B06130.