

# Realizzazione di colture di sinoviociti da liquido sinoviale

## *Synoviocyte cultures from synovial fluid*

A. Scanu<sup>1</sup>, F. Oliviero<sup>1</sup>, L. Braghetto<sup>2</sup>, R. Ramonda<sup>1</sup>, R. Luisetto<sup>1</sup>, F. Calabrese<sup>2</sup>,  
A. Pozzuoli<sup>3</sup>, L. Punzi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cattedra e UOC di Reumatologia, <sup>2</sup>Istituto di Anatomia Patologica, <sup>3</sup>Clinica Ortopedica; Università di Padova

### SUMMARY

*The study of the pathogenetic mechanisms of rheumatic diseases is in general carried out through "in vitro" systems based on cellular cultures models. The difficulties to achieve fresh human tissue prompted us to develop a simpler method to obtain fibroblast-like synovial cells from synovial fluid (SF).*

*Methods: SF was collected from the knees of 5 patients with rheumatoid arthritis (RA), 4 with osteoarthritis (OA) and 5 with psoriatic arthritis (PsA). The pellet obtained after centrifugation was resuspended in DMEM/HamF12 containing 10% fetal calf serum, 1% peni-streptomycin, 4ng/ml of fibroblast grow factor and incubated at 37°C in T25 culture flasks. Synoviocytes were also obtained from fresh synovial membranes (SM) by explants technique. Both types of cells were characterized by immunocytochemistry and their inflammatory response to synthetic monosodium urate crystals was studied through the measurement of nitric oxide (NO).*

*Results: Adherent synoviocytes were obtained from the culture of 2/5 SF from RA, 4/4 SF from OA and 5/5 SF from PsA. Synoviocytes isolated from both SF and SM expressed surface antigens CD90, CD55, and the intracellular prollyl-4-hydroxylase. Morphologically, the cells showed the typical spindle-shape fibroblast-like appearance. NO levels induced by UMS crystals in SF synoviocytes were similar to those obtained in SM synoviocytes.*

*Conclusion: Adherent cells obtained from SF showed the phenotype and the reactivity of tissue synoviocytes. Due to the easy accessibility of SF, this method may represents an useful alternative when synovial tissues is not promptly available.*

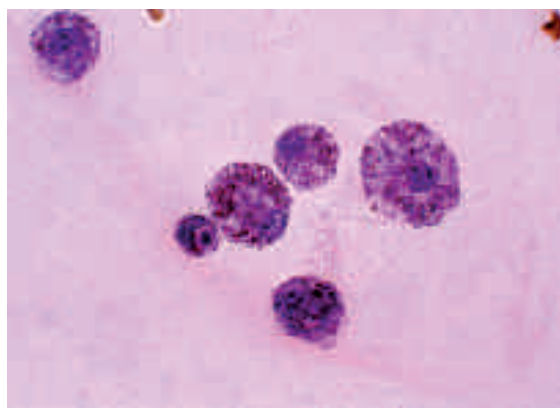
Reumatismo, 2007; 59(1):66-70

Il volume e la composizione del liquido sinoviale (LS) riflettono l'integrità dei tessuti articolari. Le modificazioni a cui vanno incontro durante i processi flogistici rappresentano utili indici diagnostici e/o prognostici di malattia (1).

La popolazione cellulare del LS, che dipende dal grado di infiammazione e dal tipo di affezione, è rappresentata prevalentemente da leucociti mono- e polimorfo-nucleati.

Non è raro, tuttavia, riscontrare durante l'analisi a fresco del LS, altri tipi cellulari la cui morfologia riflette quella dei sinoviociti di tipo A e B della membrana sinoviale (Fig. 1) (2). Verosimilmente queste cellule derivano dall'erosione o dal turnover del tessuto sinoviale.

Recentemente Neidhart et al. hanno caratterizzato cellule fibroblastiche aderenti provenienti da LS di pazienti con artrite reumatoide (AR) e dimostrato la loro azione modulatrice nei confronti della distruzione cartilaginea (3).



**Figura 1** - Sinoviociti nel liquido sinoviale. Luce ordinaria, ingrandimento 100x.

Indirizzo per la corrispondenza:  
Dott.ssa Anna Scanu  
Cattedra e UOC di Reumatologia  
Università di Padova  
Via Giustiniani 2, 35128 Padova  
E-mail: anna.scanu@unipd.it

La disponibilità di colture primarie di cellule sinoviali è di fondamentale importanza nella ricerca di base dedicata allo studio delle patologie reumatiche. Tali colture vengono in genere allestite avendo a disposizione membrana sinoviale fresca prelevata possibilmente da soggetti sani. La difficoltà relativa al recupero di tessuto umano fresco ci ha indotti a sviluppare una metodica più semplice ma ugualmente valida per l'ottenimento di sinoviociti fibroblasto-simili.

Abbiamo pertanto deciso di realizzare e caratterizzare colture cellulari isolate da LS di pazienti affetti da differenti artropatie confrontando poi la loro risposta infiammatoria a quella indotta in sinoviociti provenienti da tessuto sinoviale.

## MATERIALI E METODI

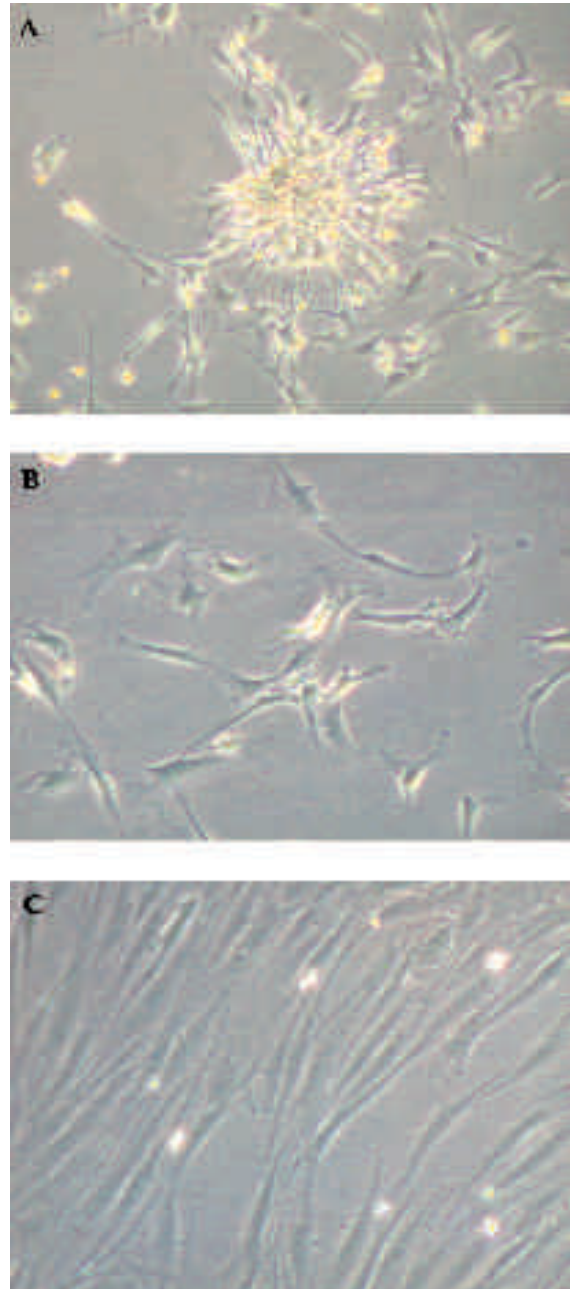
Il liquido sinoviale prelevato da 14 pazienti, 5 con artrite reumatoide (AR), 4 con osteoartrite (OA), 5 con artrite psoriasica (AP) e mantenuto in condizioni sterili, è stato centrifugato a 1.500 rpm per 10 minuti. Il pellet così ottenuto è stato lavato per 2 volte con PBS e risospeso con terreno di coltura DMEM/HAM-F12 con 10% di siero bovino fetale, 1% di penicillina, 1% di glutammina e FGF 4 ng/ml. La sospensione cellulare è stata trasferita in fiasche sterili T-25 e incubate a 37° C e 5% CO<sub>2</sub>. Il giorno successivo le cellule non aderenti sono state rimosse e il medium sostituito ogni 2 o 3 giorni. Dopo circa 20-25 giorni le cellule a confluenza sono state tripsinizzate e trasferite in fiasche T-75. Le cellule utilizzate per gli esperimenti si trovavano al 2° o al 3° passaggio.

Fibroblasti sinoviali di controllo sono stati ottenuti mediante la tecnica dell'espanto a partire da membrane sinoviali prelevate da 2 pazienti sottoposti ad artroprotesi. Raggiunta la confluenza le cellule sono state tripsinizzate e trasferite in fiasche T-75. Negli esperimenti sono state utilizzate cellule dal 3° al 5° passaggio.

Nei sinoviociti ottenuti dal LS (s-LS) e da membrana sinoviale (s-MS) sono stati ricercati gli antigeni di superficie CD55, CD90 (Thy-1) e la prolil-4-idrossilasi mediante immunocitochimica. Le cellule, fatte aderire precedentemente in slide-chamber a 8 pozze, sono state fissate con paraformaldeide al 4%, permeabilizzate con Triton X-100 e incubate 1 h con l'anticorpo primario (monoclonale antimouse CD55, CD90, prolil-4-idrossilasi, Chemicon). Le cellule sono state lavate tre volte con PBS e incubate 30 minuti con l'anticorpo secondario coniugato con pe-

rossidasi (goat antimouse, Chemicon). Per visualizzare l'immunoperossidasi e permettere l'osservazione alla microscopia ottica, sono state usate rispettivamente la diaminobenzidina come substrato cromogeno e l'ematosilina di Mayer. L'anticorpo secondario è stato utilizzato per i controlli negativi.

I cristalli di UMS sono stati preparati usando il metodo descritto da Denko (4). La loro forma e biri-



**Figura 2** - Colture di sinoviociti da LS dopo pochi giorni di coltura (A), dopo 2 settimane (B) e a confluenza (C).

frangenza è stata verificata al microscopio a luce polarizzata e compensata. Prima di ogni esperimento i cristalli sono stati triturati e sterilizzati per 2 ore a 180°C.

Raggiunta la confluenza del 70%, le cellule sono state tripsinizzate, seminate in piastre da 24 pozzetti ( $4 \times 10^4$ /pozzetto) e lasciate aderire a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Il medium di coltura è stato quindi sostituito con diverse sospensioni di cristalli di UMS (0,01-0,05-0,1-0,5-1) mg/ml in terreno al 2% di siero. I supernatanti sono stati raccolti dopo 24h di stimolazione, centrifugati a 3.000 rpm per 10 min e conservati a 20°C.

La produzione di ossido nitrico (ON) è stata valutata mediante reazione di Griess (5) usando NaNO<sub>2</sub> come standard.

## RISULTATI

### *Culture di sinoviociti da LS*

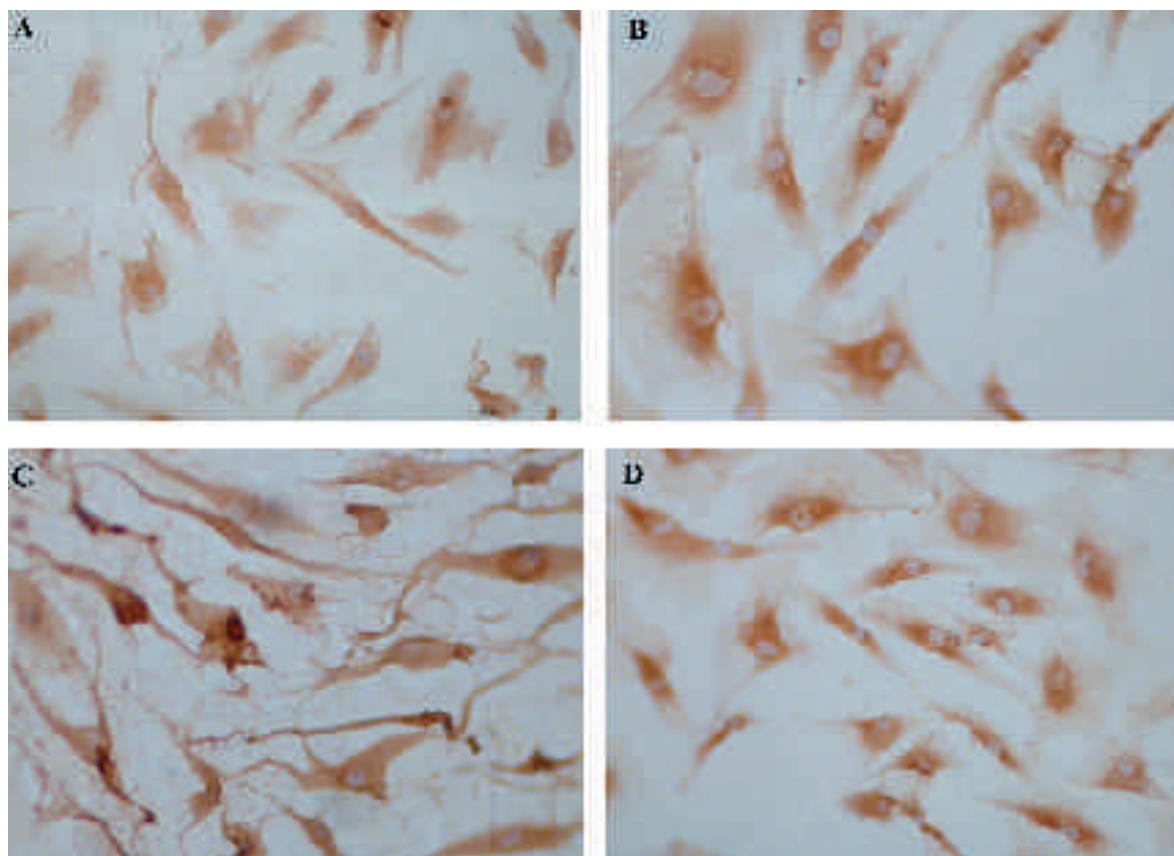
Cellule aderenti sono state ottenute da 4/4 LS di OA, 5/5 LS di AP, e 2/5 di AR. Dopo pochi giorni

di coltura le cellule in grado di aderire presentano due tipi di morfologia: rotondeggiante ed allungata. La prima tende a scomparire con il progredire della coltura e con i primi passaggi. La seconda, tipica dei sinoviociti fibroblasto-simili, tende ad aggregarsi in cluster (Fig. 2A), che sembrano favorire la proliferazione cellulare.

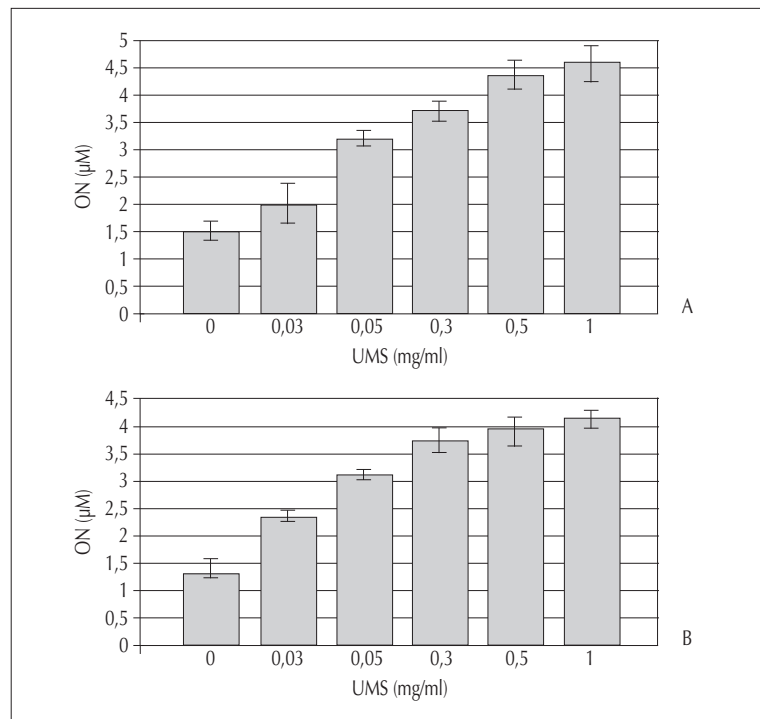
Culture in proliferazione sono in grado di raggiungere la confluenza in media dopo circa 20-25 giorni; tuttavia è stato osservato che il tempo impiegato dalle cellule per raggiungere la confluenza dipende dal tipo di affezione del paziente da cui proviene il LS ed è minore per l'AP. Già al 1° passaggio le cellule perdono la capacità di raggrupparsi in cluster (Fig. 2B). Le cellule provenienti dal LS sono state confrontate al microscopio ottico con quelle provenienti dalla membrana sinoviale ed è stato osservato che i due tipi di colture appaiono morfologicamente identici.

### *Immunocitochimica*

La colorazione immunocitochimica ha evidenziato positività agli antigeni di superficie CD90 (Thy-



**Figura 3** - Positività agli antigeni CD90 (a,c) e prolil-4-idrossilasi (b,d) dei s-LS e s-MS rispettivamente. Luce ordinaria, ingrandimento 40x.



**Figura 4** - Livelli di ON indotti dai cristalli di UMS nei sinoviociti isolati da LS di OA (A) e da MS (B).

1), CD55 e alla prolil-4-idrossilasi citoplasmatica in tutte le cellule adese ottenute dal LS (Fig. 3).

#### **Stimolazione cellulare**

Per verificare la risposta infiammatoria delle cellule ottenute dal LS, i sinoviociti sono stati stimolati per 24 h con cristalli di UMS ed è stata quindi misurata la produzione di ON nel supernatante. È stato osservato che i s-LS rilasciano quantità di ON paragonabili a quelle ottenute dai s-MS (Fig. 4). Inoltre i livelli di ON sono proporzionali alla concentrazione di cristalli utilizzata.

#### **CONCLUSIONI**

La metodica da noi adottata ha permesso di ottenere e sviluppare colture di sinoviociti a partire da LS fresco di diverse patologie.

Le cellule aderenti del LS presentano la stessa morfologia e lo stesso fenotipo dei sinoviociti ottenuti da membrana sinoviale, come dimostra la posi-

tività immunocitochimica per gli antigeni CD90, CD55 e prolil-4-idrossilasi.

Inoltre, dopo stimolazione con cristalli sintetici di UMS, i due tipi cellulari producono quantità di ON confrontabili.

L'immediato vantaggio offerto da questa metodica riguarda la possibilità di avere a disposizione un sistema cellulare in vitro a partire da un substrato facilmente accessibile e disponibile, quale il LS. Si rende pertanto possibile non solo caratterizzare le cellule dal punto di vista genetico e individuarne con precisione il fenotipo, ma anche studiare le variazioni dell'intero sistema in rapporto a diversi stimoli.

Una delle maggiori sfide per la medicina del nuovo secolo è quella di poter fornire terapie basate sull'esatta biologia di ciascun individuo (6). La possibilità di saggiare in vitro l'attività di un farmaco in condizioni specifiche per ogni paziente si presta indubbiamente allo sviluppo di forme di terapia "personalizzata" nell'ambito dell'approccio innovativo della biologia sistemica.

## RIASSUNTO

L'utilizzo di sistemi cellulari "in vitro" è fondamentale per lo studio dei meccanismi patogenetici delle artropatie. Tuttavia, il tessuto umano, in particolare membrana sinoviale e cartilagine, non è facilmente e ripetutamente disponibile. Per tale motivo abbiamo deciso di sviluppare una metodica più semplice ma ugualmente valida per l'ottenimento di sinoviociti fibroblasto-simili.

*Scopo dello studio:* Realizzare colture primarie di sinoviociti a partire da liquido sinoviale (LS).

*Materiali e metodi:* Il LS è stato raccolto da 14 pazienti, 5 con artrite reumatoide (AR), 4 con artrosi (OA), 5 con artrite psoriasica (AP). Il pellet ottenuto dopo centrifugazione è stato lavato, risospeso in terreno di coltura e posto in fiasche sterili a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Il giorno successivo le cellule non aderenti sono state rimosse e il medium sostituito con terreno fresco. Fibroblasti sinoviali di controllo sono stati ottenuti mediante la tecnica dell'espanto a partire da membrane sinoviali prelevate da 2 pazienti sottoposti ad artroprotesi. La caratterizzazione fenotipica delle cellule è stata effettuata mediante colorazione immunocitochimica. Per testare la reattività cellulare, i sinoviociti sono stati stimolati con cristalli sterili di urato monosodico ed è stata valutata la produzione di ossido nitrico (ON) attraverso metodo spettrofotometrico di Griess.

*Risultati:* Cellule aderenti sono state ottenute da 4/4 LS di OA, 5/5 LS di AP e 2/5 di AR. Queste mostrano la morfologia tipica dei sinoviociti fibroblasto-simili. La colorazione immunocitochimica ha evidenziato positività agli antigeni di superficie CD 90 (Thy-1) e CD 55 e alla prolil-4-idrossilasi. Gli stessi marcatori sono risultati espressi dalle cellule sinoviali di origine tessutale. La stimolazione delle cellule derivanti dal LS con cristalli sintetici di UMS ha provocato il rilascio di quantità di ON paragonabili a quelle ottenute dopo stimolazione dei sinoviociti di origine tessutale.

*Conclusioni:* Le cellule aderenti ottenute da colture di LS mostrano il fenotipo e la reattività dei sinoviociti isolati da membrane sinoviali. Data l'accessibilità e la facile disponibilità di LS da pazienti affetti da artropatie, questa metodica può rappresentare una utile alternativa qualora campioni di tessuto sinoviale non siano prontamente disponibili per studi "in vitro".

**Parole chiave** - Sinoviociti, liquido sinoviale, colture cellulari.

**Key words** - *Synoviocytes, synovial fluid, cell cultures.*

## BIBLIOGRAFIA

1. Punzi L. Per un corretto approccio all'analisi del liquido sinoviale. In "Manuale di Analisi del Liquido Sinoviale" Edimes editore, II edizione 2005; 9-17.
2. Schiavon F, Valvason C. L'analisi citologica. In "Manuale di Analisi del Liquido Sinoviale" Edimes editore, II edizione 2005; 33-44.
3. Neidhart M, Seemayer CA, Kummel KM, Michel BA, Gay RE, Gay S. Functional characterization of adherent synovial fluid cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1873-80.
4. Denko CW, Whitehouse MW. Experimental inflammation induced by natural occurring microcrystalline salts. *J Rheumatol* 1976; 3: 54.
5. Kim H, Lee HS, Chang KT, Ko TH, Baek KJ, Kwon NS. Chloromethyl ketones block induction of nitric oxide synthase in murine macrophages by preventing activation of nuclear factor-kB. *J Immunol* 1995; 154: 4741-8.
6. Nicholson JK. Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology. *Mol Syst Biol* 2006; 52: 1-6.