

IMPLICAȚIILE CULTURILOR CELULARE ÎN DERMATOLOGIE

DRAGOȘ TEODORESCU BRÎNZEU*, VIRGIL FEIER*, CRISTODOR PATRICIA*, RYM BEN HADID**,
MAGDALENA PĂUNESCU*, SMARANDA LAURA GOȚIA***

Timișoara

Rezumat

Tegumentul este format din epiderm, derm și anexe cutanate. Pentru înțelegerea funcțiilor acestui sistem complex este necesară înființarea culturilor celulare din diferitele compartimente celulare tegumentare. Deoarece în momentul de față nu se poate concepe cercetare fundamentală în dermatologie fără utilizarea culturilor celulare, scopul acestui studiu este de a prezenta experiența noastră cu privire la culturile celulare obținute din keratinocite, fibroblaști, melanocite și sebocite.

Liniile celulare epidermice și dermice au fost izolate din prepuț de origine umană sau din tegumente de la persoane care au suferit intervenții chirurgicale. În prima etapă s-a realizat izolarea și purificarea din tegument a diferitelor linii celulare ca ulterior acestea să fie cultivate în mediile de cultură corespunzătoare. Celulele au avut o rată de supraviețuire limitată în cultură, astfel limitându-se numărul maxim de subcultivări. La examinarea microscopică s-a putut observa că, în culturi, celulele prezintă funcții și structuri asemănătoare cu cele ale celulelor din vitro.

Culturile celulare reprezintă modele experimentale importante pentru studiul fiziologiei și biologiei tegumentului, al patogenezei diferitelor boli, precum și pentru studii de farmacologie.

Cuvinte cheie: Culturi celulare, keratinocite, fibroblaști, melanocite, sebocite.

Summary

The skin consists of the epidermis, dermis and appendages. To understand the functions of this complex structure, it is necessary to establish pure cell cultures of each cellular compartment of the skin. Because today it is impossible to conceive fundamental research in dermatology without using cell cultures, the aim of this study is to present our experience regarding the cell cultures of keratinocyte, fibroblasts, melanocyte and sebocyte.

Epidermal and dermal cell lines were isolated from neonatal foreskin or from the skin of individuals undergoing surgery. First we isolated and purified the cell lines from the tegument and then we cultivated them in the corresponding growth media. The cells had a limited life-span in cultures so that the maximum number of passages was limited. Microscopically we observed that the cells in cultures presented structures and functions similar to those of the cells in vitro.

Cell cultures are important experimental models for the physiological and biological study of the tegument, in the etiology of various diseases and in pharmacological researches.

Key words: keratinocyte, fibroblasts, melanocyte, sebocyte.

DermatoVenerol. (Buc.), 53: 215-220

* Disciplina de Dermatologie, Universitatea de Medicină și Farmacie "Victor Babeș", Timișoara.

** Clinica de Dermatologie, Spitalul Clinic Municipal de Urgență, Timișoara.

*** Disciplina de Fiziologie, Universitatea de Medicină și Farmacie "Victor Babeș", Timișoara.

Introducere

Tegumentul este un înveliș conjunctivo-epitelial [1] și este cel mai mare organ al corpului uman. Are rol protectiv față de leziuni externe, dar și rol senzorial pentru stimulii din exterior [2]. Acest organ constă din epiderm, derm și anexe cutanate. Pentru înțelegerea funcțiilor acestui sistem complex este necesară studierea unor aspecte parțiale în modele de dimensiuni care să permită manipularea lor și reintegrarea ulterioară a rezultatelor în contextul general. Acest lucru este realizabil prin înființarea unor culturi celulare din diferitele compartimente celulare tegumentare. Culturile celulare și echivalenții tegumentari reprezintă o alternativă pentru experimentele pe animale, fiind acceptate atât de oamenii de știință, cât și de comisiile de etică și de legislația în vigoare. În ultimele 3 decenii, s-a ajuns la cultivarea selectivă a tuturor liniilor celulare din care este format tegumentul.

În momentul de față, modelele tisulare cultivate variază de la simple monoculturi celulare, la cultivarea simultană a mai multor tipuri celulare și culminează cu echivalenți tegumentari tridimensionali. Acești echivalenți sunt culturi organotipice ce prezintă derm și epiderm bine organizate și diferențiate, cu o arhitectură asemănătoare tegumentului uman normal [3].

Deoarece în momentul de față nu se poate concepe o cercetare fundamentală în dermatologie fără utilizarea culturilor celulare, scopul acestui studiu este de a prezenta experiența noastră privind caracteristicile principale ale culturilor celulare obținute din keratinocite, fibroblaști, melanocite și sebocite.

Material și metodă

Liniile celulare epidermice și dermice au fost izolate din prepuț de origine umană (în special de la nou-născut) sau de la persoane care au suferit intervenții de chirurgie plastică. Într-o primă etapă, epidermul a fost separat de derm prin tratament peste noapte cu termolizină (Sigma). Ulterior, epidermul a fost incubat într-o soluție cu tripsină (Invitrogen) până s-a disociat complet în celule separate. țesutul conjunctiv a fost disociat prin incubare într-o soluție cu colagenază (Sigma). După ce s-a stabilit numărul de celule

extrase și viabilitatea celulară la hemocitometru (camera Neubauer), culturile primare au fost inițiate cu o densitate celulară de $2-6 \times 10^4$ celule/cm².

Keratinocitele au fost cultivate cu mediu pentru keratinocite „serum-free” (Invitrogen) suplimentat cu EGF (epidermal growth factor) și 1% L-glutamină. Fibroblaștii au fost cultivați cu DMEM + high glucose (Sigma) și 10% ser bovin fetal. Melanocitele au fost cultivate cu mediu bazal pentru melanocite (PromoCell) și 2% ser bovin fetal. Sebocitele au fost cultivate cu mediul bazal Sebomed (Biochrom) suplimentat cu EGF. La toate mediile de cultură s-a adăugat același procentaj de 1% antibiotic (penicilină (100 U/ml) și streptomycină (100 μg/ml)). Culturile au fost păstrate în recipiente de 150 cm² la incubator în atmosferă cu o concentrație de 5-7% CO₂ și 95% umiditate. Mediul de cultură a fost schimbat la două zile pentru a menține un pH ideal între 7,6 și 7,8.

Subcultivarea (pasajul) keratinocitelor, fibroblastelor, melanocitelor și sebocitelor a fost efectuat cu tripsină la o confluință celulară de 70-80%. Culturile au fost urmărite periodic, pe întreaga durată de cultivare, la microscopul optic cu fază de contrast inversă.

Analiza imunohistochimică (IHC) a colagenului de tip I s-a efectuat cu anticorp anti-colagen I (IgG de iepure; Novotec) într-o diluție de 1:40 cu TBS (tris-buffered saline) și marcat fluorescent cu anticorpul secundar anti iepure Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) într-o diluție de 1:20 cu TBS. Nucleul a fost contracolorat cu fluorocromul Hoechst. Pentru evidențierea lipidelor intracelulare s-a folosit 10 μg/ml Nile Red (Sigma), un colorant lipofilic fluorescent. Rezultatele au fost examinate la microscopul cu imunofluorescență.

Rezultate

În experiența noastră viabilitatea celulelor izolate a fost de 90-95%. La 4 ore după inițierea culturilor primare s-a observat la microscopul optic cum majoritatea celulelor au plutit încă liber în mediul de cultură, fiind de formă sferică. După 8-24 ore celulele viabile au început să adere de recipientul de cultivare și au prezentat morfologii caracteristice care urmează a fi detaliate. Celulele care au supraviețuit, în special celulele stem cu

potențial mare de diviziune, au început să prolifereze după o perioadă variabilă de 24-72 de ore.

După 5 zile, keratinocitele au prezentat legături intercelulare (desmozomi) și au format cuiburi de 5-12 celule cu aspect poligonal. În zilele următoare, numărul keratinocitelor a crescut exponențial și ariile cu celule aderente au crescut rapid, acoperind suprafața recipientului de cultivare (Figura 1). Deoarece keratinocitele sunt celule care necesită contacte intercelulare

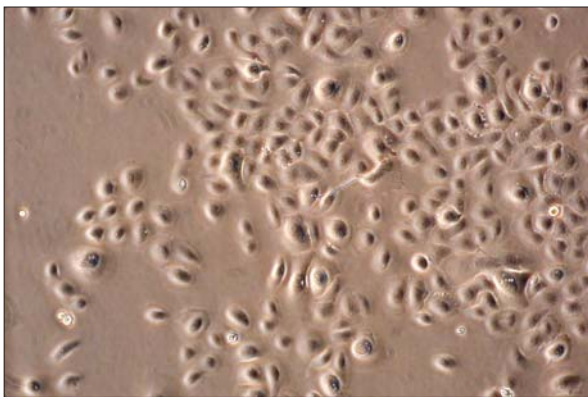


Figura 1. Cultură primară de keratinocite (20x)

strânse, am observat că o confluență de 60% este potrivită pentru o diviziune celulară bună. Când celulele ajung la o confluență de 70-80% este momentul pentru subcultivarea (pasajul) lor. Cultura primară a ajuns la confluență în aproximativ 21 de zile, iar keratinocitele din pasajele următoare în aproximativ 7 zile. După 5-6 pasaje rata de proliferare a keratinocitelor a scăzut progresiv și acestea au ajuns mai greu la confluență. Celulele au dezvoltat un fenotip senescent care s-a caracterizat morfologic la microscopul optic prin celule mari, plate, cu frecvente anomalii nucleare. În cazul în care cultivarea keratinocitelor s-a efectuat la o densitate celulară prea mare, celulele au început să se stratifice și consecutiv să se diferențieze. Diferențierea keratinocitelor s-a observat și în cazul cultivării lor într-o concentrație prea mare de Ca^{++} . Keratinocitele diferențiate în stadiul terminal au prezentat o morfologie diferită, celulele au avut un contur neregulat, au fost aplatizate cu tendință la stratificare și cu un nucleu de dimensiuni mici (Figura 2).



Figura 2. Keratinocite senescente diferențiate terminal (20x)

Culturile primare din fibroblaști au ajuns la confluență relativ repede, în aproximativ 7 zile. Fibroblastele fiind celule cu capacitate proliferativă foarte mare, s-a reușit cultivarea a peste 50 de pasaje. În monocultură, fibroblastele s-au aliniat și au format clustere paralele (Figura 3). La microscopul optic, celulele au avut un aspect elongat, fusiform, cu unul sau doi nuclei eliptici proeminenți și cu un reticul endoplasmatic rugos

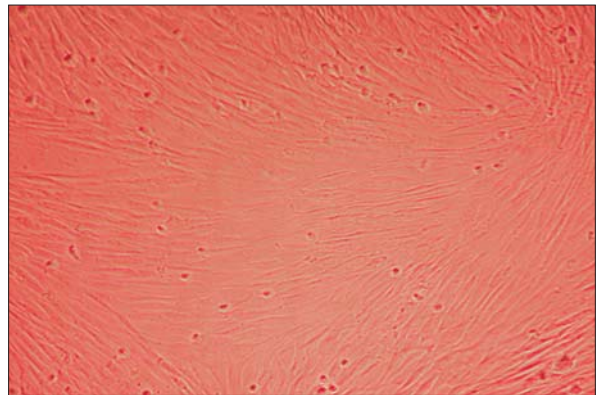


Figura 3. Cultură de fibroblaști (20x)

bine dezvoltat. Funcția principală a fibroblastelor este menținerea integrității structurale a țesutului conjunctiv prin sinteza componentelor matricei extracelulare și, în special, al colagenul de tip I, care este sintetizat în reticulul endoplasmatic rugos, în apropierea nucleului. Acest aspect s-a evidențiat în urma pozitivării reacției imunohistochemice cu anticorp anti-colagen I (Figura 4). Fibroblaștii au fost cultivați până la densități celulare foarte mari $>15 \times 10^4$ celule/cm² moment

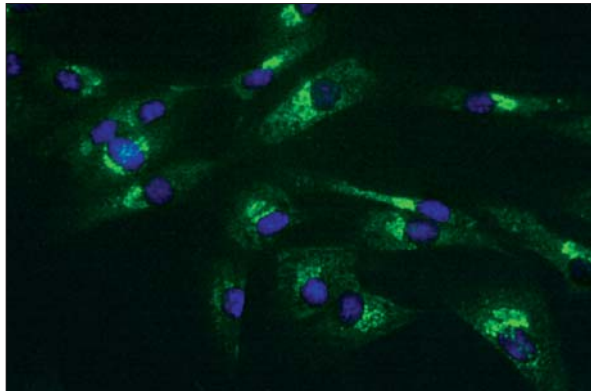


Figura 4. Colagen de tip I sintetizat de către fibroblaști (reacție IHC, 40x)

din care s-a observă stratificarea lor și transformarea în fibrocite, celule cu dimensiuni mai mici care nu se mai divid. Acest stadiu este reversibil.

Melanocitele au crescut inițial în cultură împreună cu keratinocitele. După diferențierea keratinocitelor, melanocitele au continuat să prolifereze formând monoculturi. La microscopul optic, melanocitele obținute din prepuțul nou-născuților au fost bipolare, mai subțiri și au prezentat o tendință mai scăzută de a forma dendrite în comparație cu melanocitele obținute de la adulți (Figura 5). În cazurile în care am cultivat keratinocite cu melanocite, ultimele s-au dispus astfel încât prelungirile lor dendritice au intrat în contact cu cât mai multe colonii învecinate de keratinocite.

Sebocitele au prezentat o morfologie poligonală asemănătoare cu cea a keratinocitelor. Pe măsură ce densitatea celulară a crescut, la

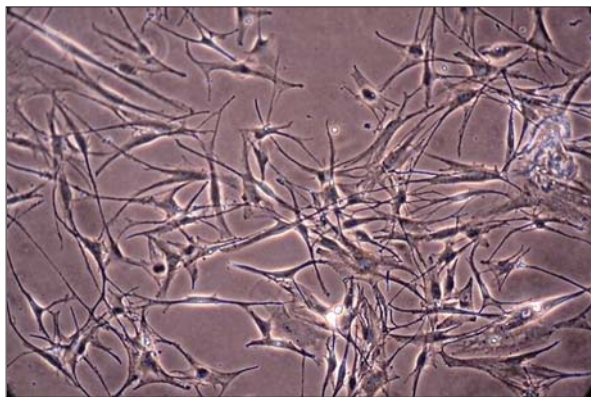


Figura 5. Cultură de melanocite (20x)

microscopul optic s-a observat cum sebocitele s-au rearanjat astfel încât au imitat arhitectura lobulară specifică glandelor sebacee (Figura 6). Principala caracteristică a sebocitelor fiind sinteza lipidelor, am evidențiat vacuolele cu conținut lipidic din interiorul sebocitelor cu colorația Nile Red la microscopul cu fluorescență (Figura 7). S-a observat că procesul principal de diferențiere este caracterizat de mărirea volumului celular, creșterea numărului de vacuole cu lipide și, în final, de destrucția nucleului cu moarte celulară și eliberarea conținutului lipidic.

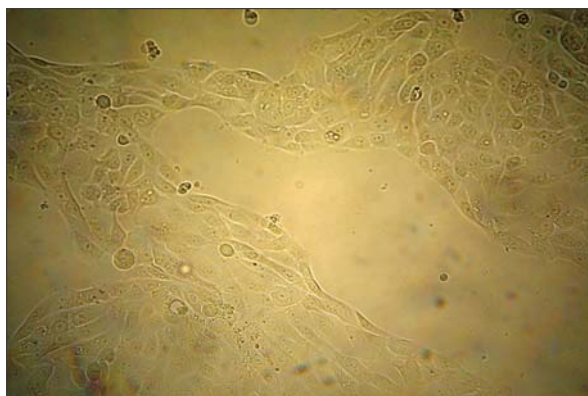


Figura 6. Cultură de sebocite (20x)

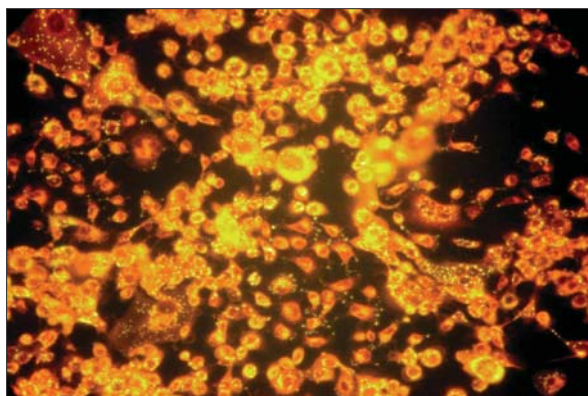


Figura 7. Vacuole de lipide sintetizate de către sebocite (reacție Nile Red, 20x)

Discuții

În medie, din 1 cm² de tegument se pot obține 2-4 x 10⁶ celule [4]. În experiența noastră, culturi celulare cu creștere rapidă și morfologie normală s-au obținut din culturi care s-au inițiat cu o densitate celulară de 2-6 x 10⁴ celule viabile/cm².

În cazul experimentelor, rezultate optime se obțin dacă se folosesc keratinocite în pasajul 2-4, confluențe în proporție de 60-70%. Dacă peste 80-90% din keratinocite sunt confluențe, celulele devin senescente prin inhibiție de contact [5].

Numărul de pasaje este limitat în cazul culturilor de keratinocite deoarece majoritatea celulelor separate din tegumentul persoanelor adulte sunt diferențiate terminal. Keratinocitele separate din prepuțul nou-născutului conțin un număr mult mai mare de celule nediferențiate (celule stem) comparativ cu cele din tegumentul adultului și, din acest motiv, se poate efectua un număr mai ridicat de pasaje. Celulele stem keratinocitare sunt celule cu potențial proliferativ superior, ele se diferențiază în celule amplificatoare de tranzit (AT) cu un potențial proliferativ limitat, ca în final să devină celule postmitotice diferențiate terminal [6]. La adult majoritatea celulelor stem sunt localizate la nivelul foliculului pilos [7]. Celulele din zona superioară a foliculului prezintă *in vitro* capacitatea cea mai mare de creștere comparativ cu celulele din alte zone ale foliculului pilos sau ale epidermului. Keratinocitele umane au un potențial de replicare limitat în cultură și proliferarea celulară este încetinită de două procese: diferențierea și senescența [8].

Keratinocitele izolate din 1 cm² de tegument pot fi cultivate în monoculturi în decurs de 6 săptămâni la o suprafață de 1 m². Această imensă expansiune populațională permite folosirea culturilor pentru grefare în cazul defectelor cutanate largi (la pacienții arși, în urma exciziei nevilor nevolcelulari giganti) și a ulcerelor cronice [9-10].

Cultivarea fibroblaștilor *in vitro* este extrem de ușoară deoarece necesită cerințe minime în comparație cu alte tipuri celulare. Fibroblaștii sunt cultivați în mediul DMEM cu 10% ser bovin fetal, dar aceste celule se pot adapta și la mediu fără ser. Fibroblaștii obținuți de la nou-născut au o activitate mitotică crescută în comparație cu cei de la persoanele adulte. Aceste celule posedă o capacitate replicativă limitată de 50-100 de pasaje [11]. Fibroblaștii sunt cele mai numeroase celule din țesutul conjunctiv și sunt responsabile atât de sinteza majorității elementelor din matricea extracelulară, cât și de proprii precursori. Procolagenul este sintetizat de reticulul endo-

plasmatic rugos și după exocitoză în spațiul extracelular are loc agregarea la fibre de collagen mari care intră în constituirea matricei extracelulare. Fibroblastele sunt extrem de utile în studii asupra patologiei diverselor afecțiuni cutanate dermice (sclerodermie, scorbut, keloide etc.) [12, 13].

Melanocitele sunt celule înalt diferențiate din creasta neurală. Elementul cel mai distinctiv îl constituie prezența melanozomilor, organite specializate în transportul melaninei [2]. Melanozomii sunt transferați keratinocitelor înconjurătoare prin intermediul dendritelor *in vivo* cât și în culturile celulare. Relația funcțională strânsă între keratinocit și melanocit în cultură întărește conceptul unității melano-epidermice [14]. În experiența noastră, adaosul de 2% ser bovin fetal la culturile primare de melanocite și în decursul pasajelor ulterioare stimulează aderarea celulelor de suprafața recipientului de cultivare și proliferarea celulară. Serul este esențial pentru aderarea melanocitelor adulte și, în absența lui, exploatarea celulară este scăzută. Melanocitele pot fi subcultivate de 12-14 ori până la apariția semnelor de senescență.

Sebocitele sunt celule epiteliale specializate în sinteza de sebum bogat în lipide. În mod normal, celulele migrează de la periferia lobulului pentru a forma un singur strat de celule poligonale, care se diferențiază terminal cu creșterea volumului celular, acumularea intracelulară de lipide și, în final, moartea celulară. Din această cauză, în experimente de amploare cu un număr mare de celule sunt necesare sebocite de la mai mulți donori simultan. De asemenea, experimente care se întind pe perioade mai îndelungate de timp sunt limitate de perioada scurtă de viață a sebocitelor. Experimente farmacologice se fac în mod curent pe culturi de sebocite, dar încă nu s-a reușit încorporarea cu succes a sebocitelor în echivalenții cutanați [11].

Cultivarea celulelor din tegumentul donatorilor umani sănătoși implică unele dificultăți tehnice și financiare. Astfel, cercetătorii preferă în multe situații folosirea unor linii celulare imortalizate. Acestea sunt constituite din celule tumorale care evită apoptoza cu ajutorul telomerazei, enzimă cu funcția de a repara telomerii [15-17]. Aceste celule respectă principalele funcții și structuri ale celulelor normale. Ele au nevoie de cerințe

minime de cultivare, au un ritm de creștere rapid și pot fi teoretic subcultivate nelimitat. În momentul de față există nenumărate linii imortalizate pentru keratinocite (ex. linia HaCaT), fibroblaste (ex. linia SV40), melanocite (ex. liniile SK-MEL) și sebocite (ex. linia SZ95) [17-19]. În dermatologie se pot cultiva și alte linii celulare de importanță mai mică. Acestea sunt celula Merkel, celula Langherhans și celulele endoteliale.

Concluzii

Monoculturile celulare in vitro nu pot reproduce condițiile din in vivo, unde celule sunt expuse la nivele constante de pH și temperatură. Importantă este și interacțiunea cu alte tipuri celulare care au rol în proliferare, deferențiere și apoptoză. În monoculturi, aceste interacțiuni lipsesc. Tehnica cultivării monoculturilor prezintă încă multe neajunsuri, ea fiind principala cauză de senescență și moarte celulară.

Cu toate acestea, culturile celulare oferă posibilități nelimitate cercetării experimentale în dermatologie. În momentul de față culturile celulare și echivalenții tegumentari reprezintă modele experimentale importante pentru studiul fiziologiei și biologiei tegumentului, al reglării melanogenezei, mecanismelor vindecării rănilor, patogenezei diferitelor boli și tumorogenezei, precum și pentru studii de toxicologie și farmacologie.

Bibliografie

1. Feier V. - Dermato-Venerologie. Editura Amacord, Timișoara, 1998.
2. Feier V., Cristodor P., Teodorescu Brînzeu D. - Dermatology and Sexually Transmitted Diseases. Imprimeria Mirton, Timișoara, 2004.
3. Stark H.J., Bauer M., Breitkreutz D., Mirancea N., Fusenig N.E. - Organotypic keratinocyte coculture in defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation. *J Invest Dermatol* 1999; 112, 681-691.
4. Garcia Fernandez E., Bejar J.M., Alonso-Varona A., Garcia Masdevall M.D., Gabilondo F.J. - Study of the human keratinocyte isolation methods and in vitro culture techniques in a single laboratory. *Eur J Plast Surg* (1998) 21: 353±357
5. Teodorescu Brinzeu D., Feier V., Herbeck R., Olariu R., Chiselita I., Koreck I. - Optimizing human keratinocyte cell culture techniques. *5th EADV Spring Symposium Istanbul*, 2008, 57.
6. Pritinder K., Amy L. - Adhesive Properties of Human Basal Epidermal Cells: An Analysis of Keratinocyte Stem Cells, Transit Amplifying Cells, and Postmitotic Differentiating Cells. *J Invest Dermatol* (2000) 114, 413-420.
7. Lavker R., Sun T., Oshima H. et al. - Hair Follicle Stem Cells. *J Invest Dermatol Symposium Proceedings* (2003) 8, 28-38.
8. Teodorescu Brinzeu D., Feier V., Serban L., Paunescu M., Goția S.R., Koreck A. - Keratinocytes behavior over a cell culture lifespan. *The 16th Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology Vienna*, 2007, 209
9. Gallico G.G., O'Connor N.E., Compton C.C., Remensnyder J.P., Kehinde O., Green H. - Cultured epithelial autografts for giant congenital nevi. *Plast Reconstr Surg* 1989; 84: 1-9.
10. De Luca M., Albanese E., Cancedda R., Viacava A., Faggiuni A., Zambruno G., Giannetti A - Treatment of leg ulcers with cryopreserved allogenic cultured epithelium. *Arch Dermatol* 1992; 128: 633-638.
11. Abdel-Naser M.B., Abdallah M., Larangeira de Almeida H., Wollina U. - Human Skin Cell Culture and its Impact on Dermatology. *Egyptian Dermatology Online Journal* 1 (2): 1, December 2005
12. Uitto J., Kouba D. - Cytokine modulation of extracellular matrix gene expression: relevance to fibrotic skin diseases. *J Dermatol Sci* 2000; 24:S60-S69
13. Solovan C., Feier V. - Textbook of Dermatology for Dentistry. Editura Sedona, Timișoara, 1999.
14. Abdel-Naser M.B. - Differential effects on melanocyte growth and melanization of low vs high Ca⁺⁺ keratinocyte conditioned medium. *Brit J Dermatol* 1999; 140: 50-55.
15. Hahn W.C., Meyerson M. - Telomerase activation, cellular immortalization and cancer. *Ann Med.* 2001 Mar; 33 (2): 123-9.
16. Meyerson M. - Role of telomerase in normal and cancer cells. *J Clin Oncol.* 2000 Jul; 18 (13):2626-34.
17. Boukamp P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D., Hornung J, Markham A, Fusenig NE - Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 1988 Mar; 106 (3): 761-71.
18. Chatelut M., Harzer K., Christomanou H., Feunteun J., Pieraggi M., Paton B.C., Kishimoto Y., O'Brien J.S., Basile J.P., Thiers J.C., Salvayre R., Levade T. - Model SV40-transformed fibroblast lines for metabolic studies of human prosaposin and acid ceramidase deficiencies. *Clinica Chimica Acta*, 1997 Jun, 262 (1): 61-76 (16)
19. Zouboulis Ch.C., Seltmann H., Neitzel H., Orfanos C.E. - Establishment and characterization of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95). *J Invest Dermatol* 1999; 113: 1011-1020.