



F. Randelli, A. Menon,
M. Mazzoleni, A. Gaià Via,
F. Sciancalepore, M. Brioschi,
N. Gagliano



Prof.ssa Nicoletta Gagliano

XXIX CONGRESSO NAZIONALE A.M.I.O.T.
La sostenibile efficacia della Medicina delle Basse Dosi – Evidenza vs Pregiudizio –
Bologna, 30 Giugno 2018

CARATTERIZZAZIONE DEL TURNOVER DEL COLLAGENE IN TENOCITI UMANI COLTIVATI SU MATRICE DI COLLAGENE MD-TISSUE

CHARACTERIZATION OF COLLAGEN TURNOVER IN HUMAN TENOCYTES CULTURED ON THE COLLAGEN-BASED MEDICAL DEVICE MD-TISSUE

RIASSUNTO

I tenociti sono fibroblasti specializzati che svolgono un ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi della matrice extracellulare (ECM) del tendine e che, quindi, ne influenzano le proprietà biomeccaniche e le capacità riparative in condizioni patologiche (1,2).

– La capacità del tendine di resistere alle forze meccaniche a cui è sottoposto si basa sulla struttura ed organizzazione della ECM, il cui componente principale è il collagene di tipo I (COL-I).

Il turnover del collagene è controllato dai tenociti; questi agiscono a diversi livelli quali la sintesi, la maturazione e la degradazione del collagene.

In particolare, la maturazione del collagene è determinata dalla formazione di *cross-link*, grazie all'attività di enzimi, quali la forma lunga della lisil-idrossilasi 2 (LH2b), che conferiscono alle fibrille di collagene stabilità e resistenza alle forze di trazione (3). La degradazione del collagene avviene ad opera delle metalloproteinasi della matrice (MMPs), la cui attivazione ed attività sono regolate dai loro inibitori naturali, i TIMP (4,5).

L'omeostasi della ECM è, inoltre, mantenuta grazie alla migrazione dei tenociti,

il che costituisce un importante meccanismo durante i processi di guarigione e di riparazione del tendine.

– Un dispositivo medico contenente COL-I (MD-Tissue, Guna) è stato formulato allo scopo di contrastare la degenerazione del Tessuto connettivo del tendine in situazioni fisiologiche e patologiche. Scopo del nostro studio è stato quello di caratterizzare *in vitro* l'effetto di tale dispositivo medico su tenociti umani, focalizzando il nostro interesse sui meccanismi di turnover del collagene, al fine di comprendere come il prodotto potesse influenzare le proprietà biologiche del tendine.

A tal fine, tenociti ottenuti da 8 pazienti sani (età $64,8 \pm 7,2$ anni) sottoposti ad intervento di protesi totale d'anca per via anteriore sono stati isolati mediante *out-grow* da frammenti del tendine del muscolo piccolo gluteo. La proliferazione e la migrazione cellulare sono state analizzate, rispettivamente, mediante curve di crescita e *wound healing assay*.

L'espressione dei geni e delle proteine coinvolti nei meccanismi di turnover del collagene è stata indagata con tecniche di biologia molecolare: i livelli di mRNA

per LH2b e TIMP-1 sono stati quantificati mediante *real time* PCR; l'espressione del COL-I e della MMP-1 è stata valutata mediante Slot blot, mentre i livelli di MMP-2 sono stati analizzati con SDS-zimografia.

– I nostri risultati evidenziano che i tenociti coltivati su MD-Tissue sono caratterizzati da una più elevata proliferazione e migrazione.

Inoltre, MD-Tissue è in grado di stimolare la sintesi di COL-I, il principale componente della ECM del tendine, mentre MMP-1 e -2 non risultano modificate, suggerendo che i tenociti coltivati su MD-Tissue presentano un fenotipo anabolico.

– Considerati nel loro insieme, i risultati di questo studio indicano che MD-Tissue potrebbe favorire i processi riparativi del tendine, stimolando la proliferazione e la migrazione cellulare e, allo stesso tempo, inducendo la sintesi e la deposizione di COL-I.

PAROLE CHIAVE

TENDINE, TURNOVER DEL COLLAGENE, METALLOPROTEINASI DELLA MATRICE, CITO-SCHELETRO

SUMMARY: Tenocytes are specialized fibroblasts playing a key role in the maintenance of tendon extracellular matrix (ECM) homeostasis and, therefore, determining the tendon ability to resist mechanical forces and repair in response to injury (1,2).

Tendon mechanical properties are based on the underlying ECM structure and composition, in particular consisting of collagen, mainly type I collagen (COL-I).

COL turnover is controlled by tenocytes acting at the level of collagen synthesis, maturation and degradation.

COL maturation is determined by cross-linking by enzymes such as long lysyl-hydroxylase 2 (LH2b), providing collagen fibril stabilization and increased tendon tensile strength (3). COL degradation is driven by matrix metalloproteinases (MMPs), whose activation and activity are regulated by their inhibitors TIMPs (4,5). ECM homeostasis is also based on the

migration of tenocytes, playing a key role during tendon healing and repair.

– A medical device containing COL-I (MD-Tissue, Guna) has been formulated with the aim to counteract the physiological and pathological degeneration of tendon connective tissue.

In this study we aimed at characterizing the effect of this medical device on cultured human tenocytes, especially focusing on the collagen turnover pathways, in order to understand how the medical device could influence tendon biology.

For this purpose, gluteal tendon fragments were obtained from 8 healthy patients (mean age 64.8 ± 7.2 years) undergoing total hip replacement through an anterior approach, and tenocytes were isolated by outgrowth from tendon fragments.

Cell proliferation and migration were investigated by growth curves and wound healing assay, respectively.

The expression of genes and proteins

involved in collagen turnover were analysed by molecular biology techniques: mRNA levels for LH2b and TIMP-1 were assessed by real time PCR; Slot blot and SDS-zymography were used to quantify COL-I and MMP-1 and -2, respectively.

– Our data show that tenocytes cultured on MD-Tissue have increased proliferation rate and migration potential.

MD-Tissue induced COL-I synthesis, the main protein of tendon ECM, but matrix MMP-1 and -2 were not affected, suggesting that tenocytes cultured on MD-Tissue have an anabolic phenotype.

– Considered as a whole, our results suggest that MD-Tissue could favour tendon repair by inducing tenocyte proliferation and migration, stimulating COL-I synthesis and deposition.

KEY WORDS: TENDON, COLLAGEN TURNOVER, MATRIX METALLOPROTEINASES, CYTOSKELETON

Bibliografia

1. Kannus P. – Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports* 10: 312-320; **2000**.
2. Kjaer M. – Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev* 84: 649-698; **2004**.
3. Silver F.H., Christiansen D., Snowhill P.B., Chen Y., Landis W.J. – The role of mineral in the storage of elastic energy in turkey tendons. *Biomacromolecules* 1:180-185; **2000**.
4. Woessner F.J. – Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelling. *FASEB J* 5:2145-2154; **1991**.
5. Brew K., Dinakarpanian D., Nagase H. – Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477:267-283; **2001**.

Riferimento bibliografico

RANDELLI F., MENON A., MAZZOLENI M., GIAVIA A., SCIANCALEPORE F., BRIOSCHI M., GAGLIANO N. – Caratterizzazione del *turnover* del collagene in tenociti umani coltivati su matrice di collagene MD-Tissue. *La Med. Biol.*, **2018/4**; 67-68.

corresponding author

Prof.ssa Nicoletta Gagliano
– Professore associato di Istologia
Dipartimento di Scienze Biomediche
per la Salute
Università degli Studi di Milano
Via Mangiagalli, 31
I – 20133 Milano

Il lavoro è stato presentato, dopo il XXIX Congresso Nazionale A.M.I.O.T. – Bologna, 30 Giugno 2018, anche presso:

- ▶ **72° Congresso della Società Italiana di Anatomia e Istologia – Parma, 20-22 Settembre 2018, con il titolo “Effects of a collagen-based medical device on morpho-functional properties of cultured human tenocytes”;**
- ▶ **I.S.H.A., International Society for Hip Arthroscopy 2018 - Melbourne (Australia), 4-6-Ottobre 2018, con il titolo “Greater Trochanteric Pain Syndrome (GTPS). A Collagen-Based Medical Device Improves Gluteal Tendon Tenocyte Proliferation and Collagen Synthesis: an *in vitro* study”.**