

LAVORO ORIGINALE

Ruolo della migrazione cellulare nella patogenesi dell'artrite reumatoide: studi in vivo in topi SCID trapiantati con membrana sinoviale umana*

Role of cell migration in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: in vivo studies in SCID mice transplanted with human synovial membrane

F. Ingegnoli, M. Blades, A. Manzo, S. Wahid, M. Perretti, G. Panayi, C. Pitzalis

Rheumatology Unit, Thomas Guy House, GKT School of Medicine, Guy's Campus, London, UK

SUMMARY

Objective: *adhesion mechanisms play a central role in the recruitment of leukocytes which characteristically infiltrate rheumatoid synovium. Therefore, we adapted an animal model, in which human rheumatoid synovium was transplanted into severe combined immunodeficient (SCID) mice, to study the effects of Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) in modulating leukocyte migration and to investigate the chemotactic potential of Stromal Derived Factor-1 α (SDF-1 α).*

Materials and Methods: *human synovium samples, obtained from patients undergoing joint replacement, were divided into two parts. One was analysed by immunohistology and the other was implanted subcutaneously into SCID mice under general anaesthesia. Four weeks post-transplantation, grafts were injected with optimal dose of SDF-1, TNF- α or saline (negative control). At the same time, animals were injected iv with fluorescently labelled cells. 48 hours later mice were sacrificed and grafts removed for cryo-histology. The number of cells migrating to the grafts was determined by UV-microscopy and the results expressed as cells per high power field.*

Results and Conclusions: *in these studies we provide the evidence that: 1) the animal model, in which human tissues are grafted into SCID mice, can be used to study cell migration under controlled experimental conditions (1); 2) direct intragraft injection of TNF- α increases lymphocytes migration and up-regulates the expression of human adhesion molecules (CAMs) (1) and 3) SDF-1 α injected intragraft increases the migration of the pro-myelo-monocytic U937 cells to synovial transplants, even more efficiently than TNF- α , but without modifications of CAMs' expression (2).*

Reumatismo, 2002; 54(2):128-132

INTRODUZIONE

L'artrite reumatoide (AR) è una patologia infiammatoria caratterizzata da una polisinovite cronica. Istologicamente, la membrana sinoviale (MS) reumatoide evidenzia fenomeni di neoangiogenesi, ispessimento del lining ed un infiltrato cellulare costituito prevalentemente da macrofagi, linfociti T attivati (CD45RO+, HLA-DR+) (3-5), linfociti B e plasmacellule. La formazione dell'infiltrato infiammatorio, ritenuto fondamentale nel mantenimento e nella progressione del processo

patologico, richiede una serie di passaggi coordinati che coinvolgono interazioni sequenziali tra i leucociti, l'endotelio e la matrice extracellulare tissutale (4, 6-8). Tali interazioni portano allo stravasamento ed alla ritenzione locale di cellule preferenzialmente di natura linfocitaria e monocitaria (4, 6-8). A livello molecolare, il processo di migrazione leucocitaria prevede quattro fasi. Nella prima (fase di "rolling") intervengono legami transitori, a bassa affinità tra molecole glicoproteiche leucocitarie ed endoteliali (P- ed E-selettina), che permettono un rallentamento nella velocità di scorrimento dei leucociti nel distretto microcircolatorio (9-11). Nella seconda e terza fase (attivazione e ferma adesione) si ha l'arresto dei leucociti sulla superficie endoteliale grazie alla stabilizzazione di legami tra le integrine leucocitarie, attivate da chemochine (CK) e gli specifici ligandi endoteliali (12). La

*Lavoro premiato al XXXVII Congresso SIR di Milano, 2000

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott.ssa Francesca Ingegnoli, Cattedra di Reumatologia, Università Degli Studi di Milano, Istituto Ortopedico G. Pini, 20122 Milano.

quarta fase, infine (diapedesi), prevede il passaggio dei leucociti attraverso le cellule endoteliali e la membrana basale. Durante il processo infiammatorio, vengono prodotti numerosi fattori (ad esempio il TNF- α) capaci di indurre un aumento dell'espressione delle molecole di adesione vascolari, o di attivare le integrine (come le CK), inducendo la cascata di eventi che porta alla tras migrazione delle cellule nei tessuti (13-17).

Al fine di analizzare i meccanismi di adesione e migrazione cellulare nell'uomo abbiamo realizzato un modello animale che permette, tramite trapianto in topi immunodeficienti (SCID), lo studio di tessuti umani in vivo senza problematiche di rigetto. Abbiamo dimostrato che i tessuti umani trapiantati rimangono vitali, vengono coinvolti da processi di neovascolarizzazione murina con la formazione di anastomosi tra questa e il sistema vascolare umano e mantengono immutate le caratteristiche strutturali basali del tessuto originale. È stato quindi possibile, tramite iniezione endovenosa nell'animale di cellule umane marcate, effettuare lo studio della migrazione cellulare nei tessuti trapiantati, in condizioni basali e dopo stimolazione del tessuto trapiantato con citochine o CK. In particolare, il nostro interesse si è focalizzato sugli effetti del TNF- α sulla migrazione linfocitaria e su quelli chemotattici dell'SDF-1 α sui macrofagi (1-2-18).

MATERIALI E METODI

Casistica: pazienti affetti da AR, diagnosticata secondo i criteri dell'ACR (19), che necessitavano interventi di artroprotesi, sono stati reclutati dagli ambulatori di reumatologia degli ospedali Guy's, King's e Lewisham. Tutte le procedure, approvate dal comitato etico, sono state eseguite su consenso informato del paziente.

Cellule: sono stati utilizzati linfociti umani separati da sangue periferico per gradiente di densità e la linea cellulare U937 come modello di differenziazione in vitro dei monociti-macrofagi (20).

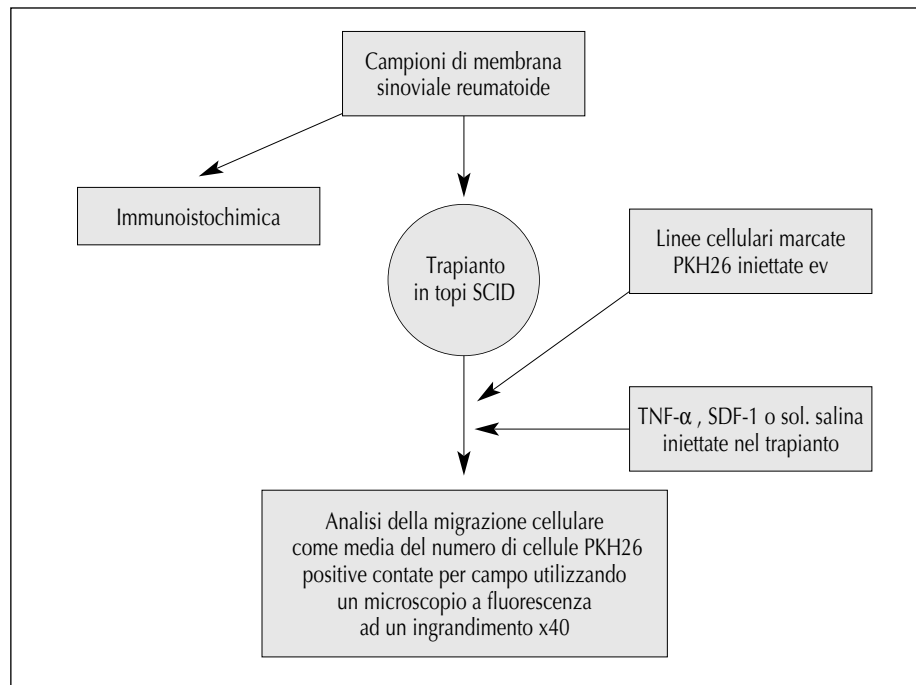
Colonie di Topi Beige SCID: una colonia di topi Beige SCID C.B-17 è stata mantenuta in condizioni sterili negli stabulari del Kings College (St. Thomas' Campus).

Studio in vivo: i tessuti (delle dimensioni di circa 0.5 cm³) sono stati congelati in DMSO (Sigma) in fetal calf serum (FCS) inattivato al calore (PAA Labs GmbH, Linz, Austria) e conservati in azoto liquido fino al trapianto (18); sono stati successivamente tolti dall'azoto liquido, immediatamente

prima dell'intervento, lavati in soluzione salina e posti in garza sterile imbevuta della medesima soluzione di lavaggio. Previa anestesia con iniezione intraperitoneale di 0.2 ml Dormitor e 0.1 ml Ketamine, sono state effettuate due piccole incisioni sul dorso dei topi (di 4-6 settimane di età) in sede retroauricolare e il tessuto sinoviale inserito sottocute. La ferita è stata suturata con filo riassorbibile (Ethicon) (18). Il completo attecchimento dei trapianti veniva realizzato dopo 4 settimane (1). Dopo questo periodo, le cellule pro-mielo-monocitiche umane venivano lavate e risospese in PBS senza siero per la marcatura. Le cellule venivano incubate con il colorante PKH26 (Sigma) a temperatura ambiente, alla concentrazione di 100ml per 20x10⁶ cellule in 5ml di diluente per 2 minuti bloccando la reazione tramite l'aggiunta di FCS inattivato. Le cellule venivano quindi lavate due volte, per rimuovere il colorante non legato e risospese in PBS sterile (pH 7.6) alla concentrazione di 50x10⁶ cellule /ml. La vitalità delle cellule, determinata con trypan blue, risultava in ogni esperimento maggiore del 95%. L'efficacia del legame del PKH26 è stata confermata prima del trapianto esaminando una preparazione a fresco delle cellule U937 al microscopio a fluorescenza. 5x10⁶ cellule per animale sono state iniettate ev nella vena della coda e, contemporaneamente una dose di 100 μ l di SDF-1 α (Peprotech, EC), TNF- α (Genzyme) o soluzione salina (controllo negativo) venivano iniettate nel trapianto. Dopo 48 ore gli animali venivano sacrificati, i trapianti rimossi, ricoperti in OCT compound (OCT, Miles, CA), congelati rapidamente in azoto liquido raffreddato in isopentano (BDH) e conservati a -70° C fino al momento dell'analisi. La valutazione della vitalità del trapianto è stata fatta sia macroscopicamente che microscopicamente su sezioni tagliate al criostato, fissate in acetone e colorate con blu di toluidina. La migrazione cellulare è stata quantificata con un'analisi numerica effettuata tramite microscopio a fluorescenza (Olympus BX-60). I risultati sono stati espressi come media del numero di cellule positive alla colorazione con PKH26 identificate per campo microscopico (x40) di tessuto esaminato. Per ogni tipo di trattamento (soluzione salina, TNF α , SDF-1 α) sono stati studiati almeno 3 animali e per ogni trapianto sono state analizzate almeno tre sezioni criostatiche non consecutive. Approssimativamente sono stati contati 100 campi per ogni trapianto (Fig. 1).

Analisi Statistica: i risultati sono stati espressi come media \pm SEM del numero di cellule contate per

Figura 1 - Schema dello studio eseguito utilizzando topi SCID per l'analisi in vivo della migrazione cellulare nella MS reumatoide.



campo. Per l'analisi statistica con test non parametrici è stato utilizzato il programma statistico SigmaStat 2.0 (Jandel Scientific). Inizialmente sono stati utilizzati il Kruskal Wallis, ANOVA non parametrico o l'analisi della varianza a una via. Successivamente i test di significatività statistica sono stati condotti usando il confronto multiplo di Dunn per dati non parametrici o il test di Dunnett per dati parametrici.

RISULTATI

La prima parte del nostro studio è stata dedicata alla validazione del modello-sperimentale. È stato dimostrato che i trapianti di MS umana attecchiscono e rimangono vitali nell'animale SCID come dimostrato da esame macro e microscopico del tessuto (1). In aggiunta, abbiamo evidenziato, a livello dei trapianti, fenomeni di neovascolarizzazione murina e rilevato la presenza di anastomosi tra quest'ultima e la componente vascolare umana. Questo è stato possibile con tecniche di immunoistochimica, utilizzando anticorpi monoclonali (mAb) specifici per le due componenti (anti-human VWFVIII e anti-murine CD31). Al fine di valutare la pervietà delle anastomosi alcuni animali venivano iniettati endovena con cellule marcate con un colorante dotato di fluorescenza

(PKH26) ed altri con anti-human ICAM-1 biotinilato o con un Ab di controllo (MOPC21), in modo da ottenere una reazione colorimetrica aggiungendo direttamente il substrato (ABCcomplex) (1). Questo ha permesso di dimostrare che la rete vascolare del topo entra in connessione con quella del trapianto, la quale mantiene la capacità di esprimere CAMs umane. In particolare, sempre avvalendoci di tecniche di immunistochemica, è stato dimostrato che le CAMs nelle quattro settimane dopo il trapianto subiscono una "downregulation", mentre in seguito alla stimolazione, mediante iniezione diretta nel trapianto di TNF- α , vanno incontro ad una "upregulation" (1). A questo punto, dopo aver dimostrato il mantenimento da parte del tessuto sinoviale trapiantato delle capacità funzionali del tessuto originale, il modello è stato utilizzato per lo studio dei fenomeni che regolano la migrazione dei leucociti nella MS.

In particolare, abbiamo indagato l'effetto del TNF- α sul reclutamento dei linfociti umani. Nei trapianti di MS è stato iniettato TNF- α o soluzione salina, mentre linfociti umani marcati con colorante fluorescente rosso PKH26 sono stati iniettati endovena nella coda del topo. I trapianti sono stati successivamente analizzati con tecniche di immunoistochimica. Questo ci ha permesso di dimostrare un significativo aumento della migrazione cellulare

nei trapianti trattati con TNF- α determinato da una regolazione positiva sull'espressione delle CAMs, in particolare di ICAM-1 (1).

Successivamente abbiamo indagato l'azione chemotattica della CK SDF-1 α nei confronti dei macrofagi. Questa CK, capace di indurre fenomeni di neogenesi vascolare e di mobilitare i precursori ematopoietici dal midollo (21-22), è stata ritrovata in abbondante quantità nella MS reumatoide (23). Inoltre, è stato recentemente dimostrato come il TGF β contenuto nel liquido sinoviale sia in grado di indurre l'aumento dell'espressione di CXCR4 (recettore specifico per l'SDF-1 α) sulle cellule T, regolando in vitro l'adesione integrina dipendente (24). Per questo motivo abbiamo utilizzato il nostro modello animale, stimolando il trapianto con SDF-1 α o con soluzione salina come controllo, ed iniettando e.v. nell'animale cellule U937 (2). Abbiamo dimostrato che l'SDF-1 α induce un significativo aumento della migrazione di cellule U937 in vivo, in modo dose dipendente. Ad una successiva analisi immunostochimica dei trapianti, abbiamo poi evidenziato che questo non era

associato ad un aumento di espressione delle CAMs, ma probabilmente ad un meccanismo di gradiente diretto (2).

CONCLUSIONI

I topi SCID, grazie ad una mutazione autosomica recessiva identificata sul cromosoma 16, hanno alterazioni nella linea linfoide che si manifestano come mancanza dei linfociti T e B. Per questa caratteristica sono stati utilizzati precedentemente nello studio in vivo di malattie autoimmuni (25-27). In conclusione, riteniamo che l'utilizzo di topi SCID, trapiantati con tessuti umani, sia non solo un modello riproducibile per lo studio in vivo dei processi patologici che avvengono nella MS-AR, ma anche un approccio ottimale per ottenere nuovi dati morfologici e funzionali sul ruolo giocato dalle citochine, nella regolazione della migrazione organo-specifica per identificare e studiare nuovi bersagli terapeutici nel trattamento della malattia (18).

RIASSUNTO

Scopo dello studio: i meccanismi di adesione e migrazione cellulare giocano un ruolo centrale nella patogenesi delle malattie infiammatorie croniche come la artrite reumatoide (AR). Pertanto abbiamo messo a punto un modello animale, in cui la MS reumatoide è stata trapiantata in topi SCID, per studiare in vivo gli effetti del TNF- α nel regolare la migrazione leucocitaria e per valutare il potere chemotattico dell'SDF-1 α .

Materiali e metodi: campioni di MS reumatoide, ottenuti da pazienti sottoposti ad interventi di artroprotesi, sono stati divisi in due parti. Una è stata assegnata allo studio istologico del tessuto originale ed una è stata trapiantata sottocute in topi SCID. Quattro settimane dopo, una dose di SDF-1 α , TNF- α o soluzione salina (controllo negativo) è stata iniettata nel trapianto. Contemporaneamente, cellule di derivazione pro-mielo-monocitiche umane, precedentemente marcate con PKH-26, venivano iniettate endovena negli animali. Dopo 48 ore, gli animali venivano sacrificati e i trapianti congelati in azoto liquido fino al momento dell'analisi istologica. La migrazione cellulare veniva quantificata come media del numero di cellule, positive alla colorazione con PKH-26, -per superficie di area analizzata microscopicamente.

Risultati e Conclusioni: in questi studi abbiamo dimostrato che: 1) il modello animale descritto può essere usato per lo studio della migrazione cellulare (1); 2) la stimolazione diretta del trapianto con TNF- α aumenta la migrazione linfocitaria con una up-regulation dell'espressione delle molecole di adesione (CAMs) (1) e 3) SDF-1 α iniettato nel trapianto induce un aumento della migrazione delle cellule pro-mielo-monocitiche U937 nei trapianti, più del TNF- α , ma senza alterazione dell'espressione delle CAMs (2).

Parole chiave: Migrazione cellulare, membrana sinoviale, artrite reumatoide.

Key words: Cell migration, synovial membrane, rheumatoid arthritis.

BIBLIOGRAFIA

1. Wahid S, Blades MC, De Lord D, Brown N, Blake G, Gianni G et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) enhances lymphocyte migration into rheumatoid synovial tissue transplanted into severe combined immunodeficient (SCID) mice. Clin Exp Immunol 2000; 122: 133-42.
2. Blades MC, Ingegnoli F, Wheller SK, Manzo A, Wahid S, Panayi GS, et al. Stromal Cell Derived Factor-1 (CXCL12) induces monocyte migration into human synovium transplanted onto SCID mice. Arthritis Rheum 2002; 46: 824-36.
3. Koch AE. Angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1998; 41: 951-62.

4. Pitzalis C. Role of adhesion mechanisms in the pathogenesis of chronic synovitis. The Michel Mason Prize Essay 1996. *Br J Rheum* 1996; 35: 1198-215.
5. Pitzalis C, Kingsley GH, Lanchbury JS, Murphy J, Panayi GS. Expression of HLA-DR, DQ and DP antigens and interleukin-2 receptor on synovial fluid T lymphocyte subsets in rheumatoid arthritis: evidence for "frustrated" activation. *J Rheumatol* 1987; 14: 662-6.
6. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-14.
7. Butcher EC, Picker JL. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996; 272: 60-6.
8. Davenport MP, Grimm MC, Lloyd AR. A homing selection hypothesis for T-cell trafficking. *Immunol Today* 2000; 21: 315-7.
9. Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 1991; 65: 859-73.
10. Springer TA, Lasky LA. Cell adhesion. Sticky sugar for selectins. *Nature* 1991; 349: 196-7.
11. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest* 1993; 91: 379-87.
12. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999; 285: 1028-32.
13. Schall TJ, Bacon KB. Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 865-73.
14. Pitzalis C. Adhesion, migration, and cell trafficking. *Rheumatoid Arthritis*. Oxford University Press 2000; 137-46.
15. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998; 392: 565-8.
16. Pavalko FM, Otey CA, Simon KO, Burridge K. Alpha-actinin: a direct link between actin and integrins. *Biochemical Society Transactions* 1991; 19: 1065-9.
17. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annual Review of Immunology* 1997; 15: 675-705.
18. Geiler T, Kriegsmann J, Keyszner GM, Gay R, Gay S. A new model for rheumatoid arthritis generated by engraftment of rheumatoid synovial tissue and normal human cartilage into SCID mice. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1664-71.
19. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24.
20. Harris P, Ralph P. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J Leuk Biol* 1985; 37: 407-22.
21. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 1996; 184: 1101-9.
22. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996; 382: 635-8.
23. Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Muctafchieva L, Taylor P, Maini RN. Mesenchymal cells, stromal Derived Factor-1 and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42: S250.
24. Buckley CD, Amft N, Bradfield PF, Pilling D, Ross E, Arenzana-Seisdedos F, et al. Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGFb1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium. *J Immunol* 2000; 165: 3423-9.
25. Duchosal MA. SCID mice in the study of human autoimmune diseases. *Springer Semin Immunopathol* 1992; 14: 159-77.
26. Vladutiu AO. The severe combined immunodeficient (SCID) mouse as a model for the study of autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol* 1993; 93: 1-8.
27. Elkon KB, Ashany D. The SCID mouse as a vehicle to study autoimmunity. *Brit J Rheumatol* 1993; 32: 4-12.