

## Interakcje neutrofilów i chondrocytów hodowanych na biorusztowaniach zawieszonych w płynie stawowym i poddanych działaniu zmiennych ciśnień

*Interactions between neutrophils and chondrocytes seeded on scaffolds in an environment supplemented with synovial fluid exposed to the influence of variable atmospheric pressure*

Michał Gajewski<sup>1</sup>, Przemysław Rzodkiewicz<sup>1,2</sup>, Szymon Szczepanik<sup>2</sup>, Łukasz Wysocki<sup>2</sup>, Wojciech Dziewczopolski<sup>3</sup>, Joanna Gajewska<sup>4</sup>, Jerzy Szaciłło-Kosowski<sup>5</sup>, Janusz Wichniak<sup>5</sup>, Sławomir Maśliński<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biochemii Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

<sup>3</sup>Poliklinika Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie

<sup>4</sup>Zakład Badań Przesiewowych Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie

<sup>5</sup>Instytut Automatyki i Robotyki Politechniki Warszawskiej

**Słowa kluczowe:** neutrofile, chondrocyty, biorusztowania, aktywacja struktur błonowych, nekroza.

**Key words:** neutrophils, chondrocytes, scaffolds, membrane activation, necrosis.

### Streszczenie

Wszczepienie do organizmu implantów może być przyczyną licznych działań niepożądanych skutkujących problemami klinicznymi. Sugeruje się, że za większość z nich są odpowiedzialne aktywujące się neutrofile. W badaniach nad relacjami neutrofile–biorusztowania *in vitro*, opisywanych w literaturze światowej, wykazano, że śmierć neutrofilów nie ma charakteru typowej apoptozy czy nekrozy i jest związana z nadmierną produkcją wolnych rodników tlenowych (WRT).

W niniejszej pracy doświadczenia nad relacjami neutrofile–biorusztowania przeprowadzono w warunkach maksymalnie zbliżonych do warunków panujących w jamie stawu. Biorusztowania były zasiedlone chondrocytami. Hodowle komórkowe były inkubowane w zróżnicowanych mediach: klasyczne środowisko z typowymi mediami hodowlanymi (DMEM/F12), środowisko z 50-procentową płodową surowicą bydłą (*fetal bovine serum* – FBS) oraz środowisko z 50-procentowym stężeniem płynu stawowego (SF), pobranego od pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS). Hodowle poddano działaniu zmiennych ciśnień atmosferycznych.

### Summary

Implantation of an implant into the body can cause several side effects resulting in clinical problems. Activated neutrophils are responsible for most of them. In most published studies on the relationship between scaffolds and neutrophils *in vitro*, it is reported that the death of neutrophils is not a typical apoptosis or necrosis and is associated with excessive production of oxygen free radicals.

In this study, we examined the relationship between scaffold and neutrophils under conditions similar to those prevailing in the joint. Scaffolds were settled by chondrocytes, and were incubated in different media: typical medium (DMEM/F12), medium supplemented with 50% FBS, or medium supplemented with physiological concentrations of synovial fluid (SF), collected from patients with rheumatoid arthritis. Cell cultures were exposed to the influence of variable atmospheric pressure.

We demonstrated that death of neutrophils in the above experimental conditions is typically necrotic. These studies suggest that only experimental conditions maximally similar to physiological

### Adres do korespondencji:

Michał Gajewski, Zakład Biochemii, Instytut Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher, Spartańska 1, 02-637 Warszawa, e-mail: [michal.gajewski@ir.ids.pl](mailto:michal.gajewski@ir.ids.pl)

Praca wpłynęła: 21.09.2010 r.

Wykazano, że neutrofile w powyższych warunkach doświadczalnych podlegają typowej nekrozie. Badania te sugerują, że jedynie maksymalnie wierne odzwierciedlenie warunków panujących w organizmie może dostarczyć wiarygodnych informacji o przebiegu zdarzeń zachodzących *in vivo*.

## Wstęp

Metody leczenia z wykorzystaniem biorusztowań zasiedlanych komórkami własnymi pacjenta (implanty) będą w przyszłości jednym z głównych kierunków rozwoju medycyny. Zastosowanie produktów inżynierii tkankowej oraz medycyny regeneracyjnej daje pacjentom szansę m.in. na skrócenie okresu leczenia i rehabilitacji oraz zmniejsza ryzyko powikłań. Inżynieria tkankowa nie jest jednak pozbawiona ograniczeń, ponieważ układ odpornościowy zawsze reaguje na nowo wprowadzone do organizmu implanty [1]. Na aktywację powyższego układu przez implanty wpływ może mieć wiele czynników. Powszechnie akceptowany jest pogląd, że to komórki neutrofilów odpowiadają w dużym stopniu za tę reakcję [1–5].

Szczegółowy mechanizm tej odpowiedzi nie jest jeszcze w pełni poznany. Jedną z teorii sugeruje, że same implanty mogą być zanieczyszczone i zawierać bakterie [2]. Inna teoria mówi, iż materiał, z którego wykonane są implanty, oddziałuje na komórki, np. neutrofile izolowane z tkanki, w obrębie której dokonano wcześniej implantacji implantu teflonowego, wykazują słabszą aktywność przeciwbakteryjną [3]. Neutrofile te, w porównaniu z neutrofilami izolowanymi z krwi, charakteryzuje znaczna redukcja produkcji wolnych rodników tlenowych (WRT), zawartości mieloperoksydazy (MPO),  $\beta$ -glukuronidazy, lizosomów oraz możliwości produkcji białek. Przyczyną tego zjawiska jest nadmierna aktywacja komórek infiltrujących implanty [3].

W badaniach nad powierzchniami polistyrenowymi opłaszczonymi fibronektyną, witronektyną lub laminą, wykazano, że komórki neutrofilów stymulowane TNF- $\alpha$  uruchamiają natychmiast masową produkcję nadtlenu wodoru – zjawisko to jest podobne do wywoływanego poprzez stymulację PMA lub bakterie [4]. Henson i wsp. sugerują [5], że degranulacja i produkcja WRT przez neutrofile w wyniku kontaktu z niektórymi implantami jest efektem braku możliwości wchłonięcia przez nie dużych cząstek. Zjawisko to zostało potocznie nazwane „sfrustrowaną fagocytozą” [5].

Istotny wpływ na oddziaływanie pomiędzy neutrofilami a rusztowaniem implantu może mieć obecność w środowisku fizjologicznych mediów. Żywotność neutrofilów na biorusztowaniach powleczonych czynnikami występującymi naturalnie w organizmie (płodowa surowica bydłęca; *fetal bovine serum* – FBS), po 6 godzinach

circumstances can provide reliable information about the course of events occurring *in vivo*.

adhezji do biorusztowania wynosi ok. 98%, natomiast w przypadku neutrofilów przylegających do samego biorusztowania, np. w takich rusztowaniach, jak ePTFR oraz Dacron, wynosi odpowiednio 41% i 56% [1]. Śmierć neutrofilów na skutek kontaktu z biorusztowaniem wg Nadzam i wsp. [1] nie ma charakteru typowej apoptozy czy nekrozy i jest związana z nadmierną produkcją WRT. Potwierdzają to wcześniejsze badania Tsan [6], w których wykazano, że śmierć aktywowanych neutrofilów nie wynika z niespecyficznej toksyczności, lecz jest zależna od produkcji nadtlenu wodoru. Katalaza, enzym detoksykujący nadtlenek wodoru, zmniejsza bowiem śmiertelność neutrofilów, natomiast inhibitory MPO, szlaku aktywacji tego właśnie nadtlenu, takiego efektu nie powodują [6]. Takkei i wsp. [7] wręcz sugerują, że śmierć neutrofilów, będąca rezultatem aktywacji przez obcy materiał, jest efektem unikalnych, nieopisanych jeszcze reakcji komórki i należy ją traktować jako nowy rodzaj śmierci, określane mianem „*synxenatosis*” [7].

Celem prowadzonych eksperymentów było zbadanie relacji pomiędzy neutrofilami, chondrocytami oraz biorusztowaniem w warunkach *in vitro*, możliwie maksymalnie zbliżonych do warunków panujących *in vivo*. W badaniach wstępnych określono już rolę fizjologicznych stężeń SF na proces aktywacji neutrofilów [8].

W badaniach prezentowanych poniżej zbadano interakcje neutrofilów z chondrocytami, zawieszonymi na biorusztowaniach, nie tylko w obecności płynów fizjologicznych (FBS), lecz również występujących w warunkach patologicznych, np. w płynie stawowym izolowanym od pacjentów z RZS. Według wiedzy autorów niniejszej pracy nie przeprowadzono dotychczas podobnych badań. Wyniki sugerują, że śmierć neutrofilów na skutek kontaktu z biorusztowaniem, w warunkach maksymalnie zbliżonych do panujących w jamie stawu pacjentów z RZS, ma charakter typowej nekrozy.

## Materiał i metody

### Odczynniki

Luminol (5-amino-2,3-dihydroftalazyno-1,4-dion) oraz lucigeninę (dwuazotan 10,10"-dimetylo-9,9"-disakrydynowy) dostarczyła firma Serva. Gradisol G otrzymano z firmy Kutnowskie Zakłady Farmaceutyczne, a PBS (zbuforowany roztwór 0,9-procentowy NaCl z CaCl<sub>2</sub> i MgCl<sub>2</sub>) z firmy BIO-MED w Lublinie, RPMI 1640 z L-glutaminą otrzymano z Wytwórni Surowic i Szczepio-

nek w Lublinie, Ester forbolu (PMA-phorbol-12-myristate 13 acetate), DMEM/F12 z L-glutaminą i trypsynę/EDTA, Triton X-100, dysmutazę ponadtlenkową (SOD), katalazę oraz deoksyglukozę (DOG) z firmy Sigma Co. (St. Louis, USA). Antybiotyki – penicylina i streptomycyna – pochodziły z Polfy Tarchomin, kolagenazę otrzymano z firmy Serva, natomiast surowicę cielęcą (FBS) z firmy Bio-Whittaker.

### Pobieranie płynu stawowego

Płyn stawowy pobrano od 23 pacjentów chorych na RZS, leczonych w Instytucie Reumatologii w Warszawie. Płyn był pobierany i natychmiast wirowany w temperaturze 2–8°C przez 30 min, przy obrotach 10 000/min. Płyn po odwirowaniu był rozpipetowany na porcje 1 ml i w probówkach Eppendorfa przechowywany w temperaturze –20°C.

### Izolacja neutrofilów z płynu stawowego pacjentów chorych na reumatoidalne zapalenie stawów

Płyn stawowy, z którego izolowano neutrofile, otrzymano od 7 pacjentów obu płci chorych na RZS, w wieku 34–65 lat, leczonych w Instytucie Reumatologii w Warszawie. Liczba komórek w pobieranym płynie wahała się od  $1 \times 10^{-7}$  do  $1 \times 10^{-8}$ /ml. Neutrofile stanowiły 80–98% wszystkich komórek. Świeżo izolowany płyn stawowy był mieszany z RPMI 1640 (w proporcji 1 : 5) i wirowany. Komórki były przemywane solą fizjologiczną buforowaną fosforanami (*phosphate buffered saline* – PBS), a następnie wirowane w Gradisolu G; ich żywotność wahała się od 80% do 90%.

### Izolacja neutrofilów z obwodowej krwi żyłnej

Krew obwodową pobierano u ochotników (mężczyźni w wieku 25–56 lat) w Instytucie Reumatologii. Do izolacji komórek z krwi obwodowej wykorzystano technikę wirowania w gradiencie gęstości przy zastosowaniu Gradisolu G z równoczesnym wstrząsem hipotonicznym, w celu wyeliminowania erytrocytów. Otrzymane komórki (98% neutrofilów) zawieszano w PBS i przetrzymywano w temperaturze 4°C. Żywotność neutrofilów, określoną metodą barwienia błękitem trypanu, oceniono na 96%.

### Hodowle chondrocytów

Skrawki ludzkiej chrząstki, pobierane *post mortem* od osób niechorujących na RZS, zawieszano w mieszaninie antybiotyków (penicylina 200 j./ml, streptomycyna 200 µg/ml), trawiono następnie kolagenazą (o stężeniu 0,2%) przez całą noc, po czym filtrowano przez gazę młyńską i finalnie zawieszano w pożywce hodowlanej

(DMEM/F12 plus 5-proc. FBS plus antybiotyki i L-glutamina [200 mM]). W tej pożywce zawieszano 1 mln komórek na skrawek biorusztowania z kwasu poliglikolowego (Scaffold PGA Transome typ 02-001 i 02-001A, otrzymane z firmy MedBioOrgan, Polska) o wymiarach  $5 \times 2,5 \times 1$  mm.

### Hodowle neutrofilów i chondrocytów na biorusztowaniach

Komórki chondrocytów zawieszano na biorusztowaniach i hodowano w inkubatorze, w warunkach kontrolowanej wilgotności przy 5-procentowej zawartości CO<sub>2</sub>, w temperaturze 37°C. Hodowle prowadzono w standardowych plastikowych butelkach (Nunc) bądź bezpośrednio w 1-milimetrowych plastikowych fiolkach, w których następnie mierzono poziom CL, w luminometrze, w określonych przedziałach czasowych. Aby dokonać pomiarów biochemicznych, pobierano próbki płynu z nad hodowli (pomiar zewnątrzkomórkowych stężeń określonych związków) lub traktowano hodowle 1-procentowym Tritonem X-100 (pomiar ogólnego poziomu tych związków). Hodowle chondrocytów prowadzono, inkubując  $1 \times 10^{-6}$  komórek na skrawek biorusztowania. Neutrofile zawieszano na analogicznych skrawkach w stężeniu  $10 \times 10^{-6}$ , wspólne hodowle prowadzono, zawieszając  $10 \times 10^{-6}$  neutrofilów i  $1 \times 10^{-6}$  chondrocytów.

### Pomiar chemiluminescencji

Do pomiarów chemiluminescencji wykorzystano Luminometr 1251 (Pharmacia LKB). Pomiar emisji światła (maksymalną wartość CL uznano za miarę oksydacyjnej aktywności neutrofilów) przeprowadzono w temperaturze 37°C. Neutrofile stymulowano PMA (40 µl/ml, stężenie końcowe 320 nM). Pomiar CL wykonywano z udziałem luminolu (pomiar ogólnej oksydacyjnej aktywności neutrofilów, stężenie końcowe 150 µM) lub lucygeniny (pomiar aktywności zewnątrzkomórkowej, stężenie końcowe 200 µM).

### Pomiar bioluminescencji

Oznaczenie stężenia ATP przeprowadzono metodą bioluminescencyjną, przy zastosowaniu zestawu 1243-107 ATP Assay Kit (firmy LKB-Wallac). Schemat przeprowadzanej reakcji: ATP + lucyferyna + O<sub>2</sub> (w obecności lucyferazy) = oksylucyferaza + AMP + PPI + CO<sub>2</sub> + światło. Odpowiednie standardy umożliwiały przeliczenie poziomu światła na stężenie ATP. Pomiar uwalnianego przez uszkodzone komórki ATP przeprowadzono w próbkach płynu z nad hodowli komórkowych, natomiast pomiar ogólnego poziomu ATP, po wykonaniu lizy komórek, przy zastosowaniu Tritonu X-100.

## Oznaczenia biochemiczne

Pomiar stężenia glutationu (GSH i GSSG) przeprowadzono metodą fluorymetryczną Hissin i Hilf [9]. Oznaczenie poziomu dialdehydu malonylowego [MDA, poziom peroksydacji lipidów (LPO)] metodą Kramera i wsp. [10]. Stężenie dehydrogenazy mleczanowej (LDH) oznaczono za pomocą zestawu firmy Promega.

## Wyniki

Założeniem badań było porównanie interakcji, które zachodzą pomiędzy neutrofilami pozyskanymi od osób zdrowych bądź chorych na RZS a biorusztowaniem oraz chondrocytami zasiedlającymi biorusztowania z kwasu poliglikolowego (PGA). Doświadczenia prowadzono w klasycznym układzie doświadczalnym (pożywka hodowlana), w obecności 50-proc. FBS oraz w obecności 50-proc. SF, pozyskanego od pacjentów z RZS. W przeprowadzonych doświadczeniach wykorzystano stworzony uprzednio przez autorów niniejszej pracy model doświadczalny, umożliwiający uzyskanie warunków hodowli maksymalnie zbliżonych do panujących *in vivo* w jamie stawu [8].

Zważając na to, iż w każdym przypadku skrawki biorusztowań różniły się swoją wagą, oraz uwzględniając trudności z oceną końcowej liczby komórek na biorusz-

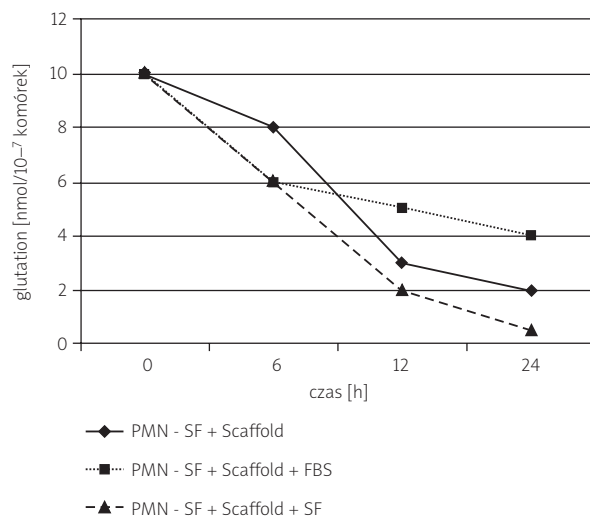
towaniach, w wynikach zaprezentowano rezultaty pojedynczych eksperymentów.

Pierwszym etapem badań było badanie wpływu biorusztowań na metabolizm oksydacyjny neutrofilów. W tym celu oznaczono w nich stężenie wewnątrzkomórkowego glutationu zredukowanego (GSH), a następnie stosunku GSH do glutationu utlenionego (GSSG).

W doświadczeniach neutrofile inkubowano z biorusztowaniami w medium hodowlanym, w medium hodowlanym zawierającym ponadto 50-proc. FBS oraz w medium hodowlanym zawierającym 50-proc. SF. Kontakt neutrofilów z biorusztowaniem powodował zmniejszenie się stężenia GSH w komórkach neutrofilów (ryc. 1).

Stężenie GSH w neutrofilach izolowanych z krwi osób zdrowych jest większe niż w komórkach izolowanych z płynu stawowego pacjentów chorych na RZS. Wraz z upływem czasu inkubacji, stężenie GSH w neutrofilach krwi się zmniejsza, a największe zmniejszenie poziomu następuje w wyniku kontaktu neutrofilów z biorusztowaniem w klasycznej pożywce hodowlanej. W przypadku inkubacji neutrofilów pacjentów chorych na RZS największe zmniejszenie poziomu GSH zaobserwowano w przypadku kontaktu tych komórek z biorusztowaniem w środowisku 50-proc. SF (ryc. 1).

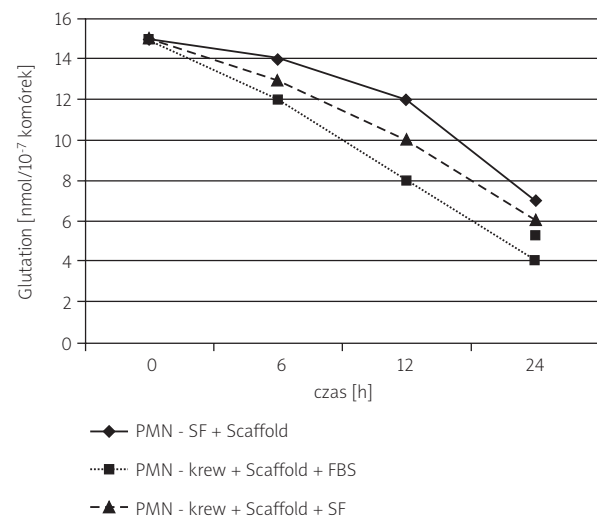
Na rycinie 2 zaprezentowano wyniki eksperymentów, w których – po upływie 12 i 24 godzin inkubacji neutrofi-



PMN – neutrofile, SF – płyn stawowy, FBS – surowica bydlęca

**Ryc. 1a.** Stężenie wewnątrzkomórkowego glutationu w neutrofilach izolowanych z płynu stawowego osadzonych na biorusztowaniach w czasie do 24 godzin.

**Fig. 1a.** Level of intracellular glutathione in neutrophils isolated from synovial fluid, seeded on scaffolds for 24 hours.



PMN – neutrofile, FBS – surowica bydlęca

**Ryc. 1b.** Stężenie wewnątrzkomórkowego glutationu w neutrofilach izolowanych z krwi osadzonych na biorusztowaniach w czasie do 24 godzin.

**Fig. 1b.** Level of intracellular glutathione in neutrophils isolated from blood, seeded on scaffolds for 24 hours.

łów osadzonych na biorusztowaniach – w trzech powyższych układach doświadczalnych (pożywka, FBS, SF) oznaczano proporcje pomiędzy GSH/GSSG. Zmiana proporcji, polegająca na wzroście GSSG kosztem GSH, świadczy o narastającym stresie oksydacyjnym w komórkach. W neutrofilach izolowanych z krwi i hodowanych na biorusztowaniu w warunkach standardowych stosunek GSH/GSSG był zazwyczaj podobny (1 : 1). Na biorusztowaniu opłaszczonym 50-proc. FBS zdecydowanie większe było stężenie GSH niż GSSG, odwrotną sytuację zanotowano w przypadku neutrofilów izolowanych z krwi i hodowanych na biorusztowaniu w obecności 50-proc. SF (ryc. 2a).

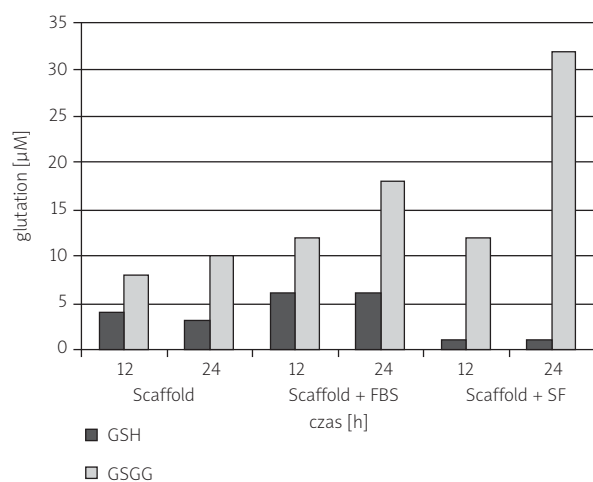
W przypadku neutrofilów izolowanych z SF we wszystkich przypadkach stężenie GSSG było zdecydowanie większe niż GSH. Powyższy efekt ulegał nasileniu wraz ze zmianą środowiska doświadczalnego – w stopniu najmniejszym w środowisku z dodatkiem 50-proc. FBS, w największym zaś w środowisku 50-proc. SF, w którym to przypadku stosunek GSH/GSSG określono jako odzwierciedlający najsilniejszy z zanotowanych w niniejszych doświadczeniach stres oksydacyjny (ryc. 2b).

W tabeli I przedstawiono wyniki oznaczeń poziomu chemiluminescencji (CL) lucygeninozależnej oraz luminolozależnej. Część doświadczeń przeprowadzono w układzie doświadczalnym umożliwiającym zbadanie wpływu ciśnienia na metabolizm oksydacyjny neutrofilów.

Chondrocyty hodowane wraz z neutrofilami nasilają poziom CL, a więc destrukcję, szczególnie gdy są hodowane w środowisku z 50-proc. SF. Wraz z upływem czasu poziom CL luminolozależnej (ogólnej) obniża się, w przypadku środowiska patologicznego praktycznie do zera. Inkubacja z deoksyglukozą (DOG), inhibitorem glikolizy i produkcji komponentów NADPH oksydazy, odwraca efekt zarówno obniżenia CL luminolozależnej, jak i zwiększenia CL lucygeninozależnej.

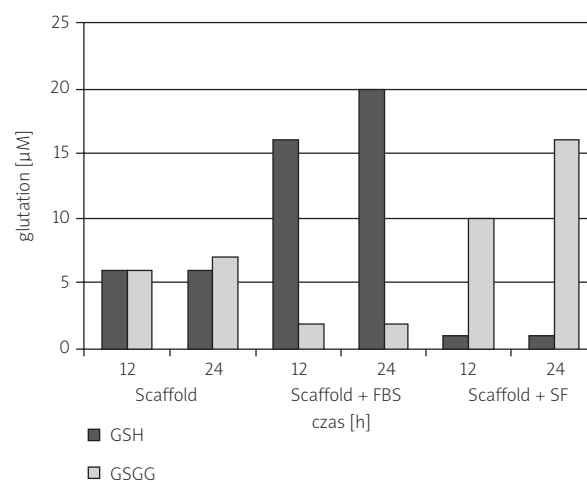
Kolejnym etapem badania była ocena żywotności neutrofilów w środowisku patologicznym (50-proc. SF), w tym wpływu powstającego w tych warunkach stresu oksydacyjnego na żywotność komórek. W tym celu oznaczano stężenia zewnątrzkomórkowego adenylozotryjfosforanu (ATP), dialdehydu malonowego (MDA) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w płynie lub znad hodowli chondrocytów bądź chondrocytów hodowanych wspólnie z neutrofilami, w różnych warunkach hodowlanych (standardowe medium, 50-proc. FBS, 50-proc. SF). Wraz z upływem czasu hodowli żywotność neutrofilów się zmniejsza, co jest najbardziej widoczne w środowisku patologicznym (50-proc. SF) (ryc. 3).

W tabeli II zaprezentowano wyniki stężenia biochemicznych markerów śmierci nekrotycznej chondrocytów. Stężenie zewnątrzkomórkowego ATP uwalnianego z chondrocytów było większe w przypadku hodowli w środowisku 50-proc. SF. Najniższy poziom zewnątrzkomórkowego



**Ryc. 2a.** Stężenie wewnątrzkomórkowego glutationu (GSH) oraz glutationu zredukowanego (GSSG) w neutrofilach izolowanych z płynu stawowego osadzonych na biorusztowaniach przez 12 godzin lub 24 godziny.

**Fig. 2a.** Level of intracellular glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG) in neutrophils isolated from synovial fluid, seeded on scaffolds for 12 or 24 hours.



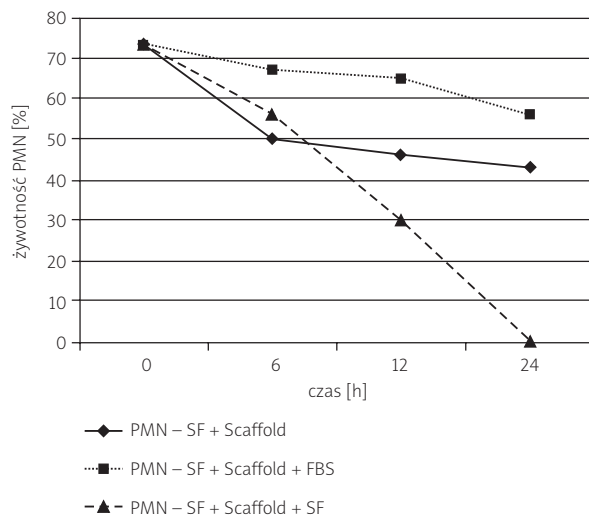
**Ryc. 2b.** Stężenie wewnątrzkomórkowego glutationu oraz glutationu zredukowanego (GSH/GSSG) w neutrofilach izolowanych z krwi osadzonych na biorusztowaniach przez 12 godzin lub 24 godziny.

**Fig. 2b.** Level of intracellular glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG) in neutrophils isolated from blood, seeded on scaffolds for 12 or 24 hours.

**Tabela I.** Poziom chemiluminescencji neutrofilów inkubowanych z chondrocytami i poddanych zmiennym ciśnieniom atmosferycznym w różnych środowiskach hodowlanych

**Table I.** Level of chemiluminescence of neutrophils incubated with chondrocytes under different pressure and in different culture conditions

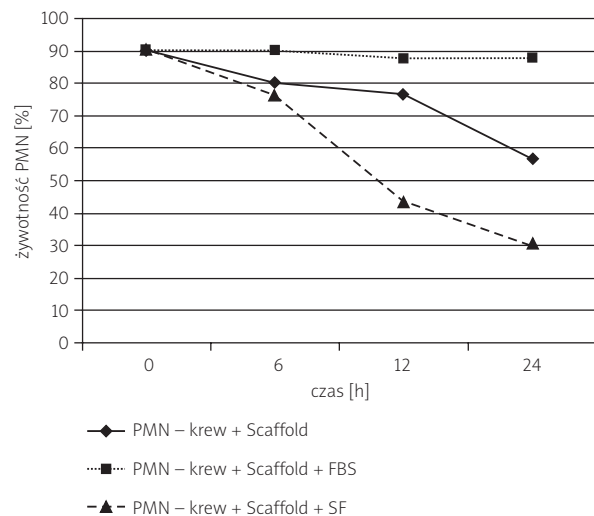
	Stymulacja PMA			Stymulacja PMA po 24 godz.		
	Scaffold	Scaffold + FBS	Scaffold + SF	Scaffold	Scaffold + FBS	Scaffold + SF
<b>stymulacja luminolem</b>						
PMN + ciśnienie	100	50	50	50	17	18
PMN + chondrocyty	95	45	50	34	23	2
PMN + chondrocyty + ciśnienie	67	78	30	15	17	0
PMN + chondrocyty + ciśnienie + DOG	87	48	49	54	67	23
<b>stymulacja lucygeniną</b>						
PMN + ciśnienie	100	300	360	87	165	156
PMN + chondrocyty	123	324	389	231	281	189
PMN + chondrocyty + ciśnienie	223	546	613	210	334	437
PMN + chondrocyty + ciśnienie + DOG	134	333	321	123	124	102



PMN – neutrofile, SF – płyn stawowy, FBS – surowica bydlęca

**Ryc. 3a.** Odsetek żywności komórek neutrofilów izolowanych z płynu stawowego, osadzonych na biorusztowaniach w czasie do 24 godzin.

**Fig. 3a.** Percentage viability of neutrophils isolated from synovial fluid, seeded on scaffolds for 24 hours.



PMN – neutrofile, SF – płyn stawowy, FBS – surowica bydlęca

**Ryc. 3b.** Odsetek żywności komórek neutrofilów izolowanych z krwi, osadzonych na biorusztowaniach w czasie do 24 godzin.

**Fig. 3a.** Percentage viability of neutrophils isolated from blood, seeded on scaffolds for 24 hours.

MDA zaobserwowano w hodowli chondrocytów w środowisku 50-proc. FBS, a najwyższy w środowisku 50-proc. SF.

Stężenie uwalnianej LDH proporcjonalnie się zwiększało w czasie doświadczenia, najwyższy wzrost odno-

towano w przypadku hodowli chondrocytów na biorusztowaniu w środowisku 50-proc. SF. Hodowla chondrocytów na biorusztowaniu, w standardowym medium hodowlanym, widoczna jest na rycinie 4.

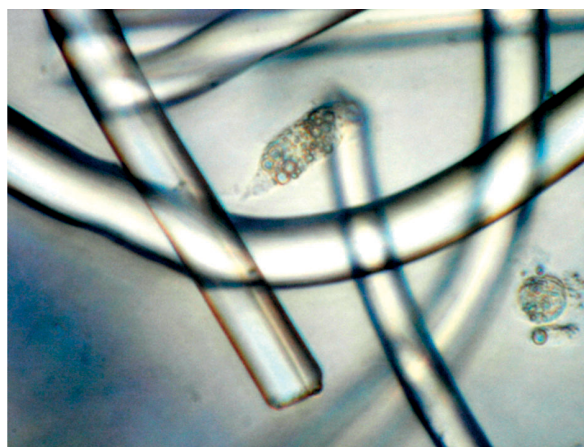


**Tabela II.** Stężenia zewnątrzkomórkowego adenozyntotrójfosforanu (ATP), dialdehydu malonowego (MDA) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w płynie znad hodowli chondrocytów zawieszonych w różnych środowiskach hodowlanych

**Table II.** Level of extracellular adenosine triphosphate (ATP), malondialdehyde (MDA) and lactate dehydrogenase (LDH) in fluid collected from different chondrocyte cell culture media

Czas [h]	Chondrocyty + Scaffold			Chondrocyty + Scaffold + FBS			Chondrocyty + Scaffold +SF		
	ATP [nM]	MDA [%]	LDH [%]	ATP [nM]	MDA [%]	LDH [%]	ATP [nM]	MDA [%]	LDH [%]
0	0	100	100	0	100	100	0	100	100
12	4	105	170	10	130	100	25	145	350
24	6	350	240	12	160	130	19	650	670

Stężenia markerów śmierci nekrotycznej komórek w układzie doświadczalnym, w którym inkubowano neutrofile łącznie z chondrocytami, przedstawiono w tabeli III. Stężenie uwalnianej z obu typów komórek LDH było mniejsze w warunkach „optymalnych” (50-proc. FBS), natomiast jego proporcjonalny wzrost następuje w warunkach hodowli, kolejno na biorusztowaniu w standardowym medium hodowlanym oraz w obecności 50-proc. SF. Inkubacja hodowli komórkowej z DOG hamuje jednak zwiększenie zarówno stężeń zewnątrzkomórkowego LDH, ATP, jak i MDA we wszystkich hodowlach. Wspólna hodowla chondrocytów i neutrofilów na biorusztowaniu w środowisku 50-proc. SF została przedstawiona na rycinie 5.



**Ryc. 4.** Hodowla komórkowa chondrocytów na biorusztowaniu w klasycznym medium hodowlanym (pow. 400 ×).

**Fig. 4.** 3D cell culture of chondrocytes in classical culture medium (magnification 400 ×).

## Dyskusja

W większości badań dotyczących patogenezy RZS zwracano przede wszystkim uwagę na znaczenie limfo-

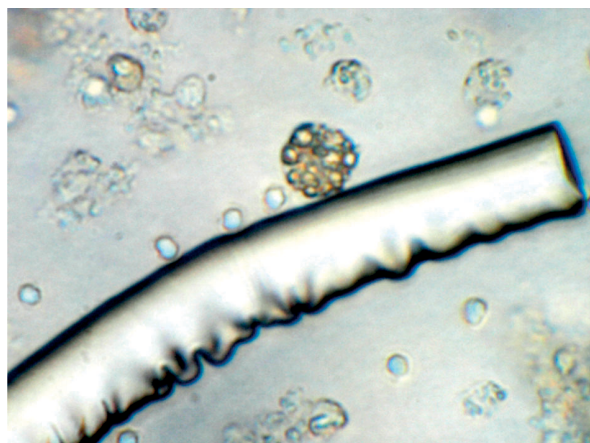
**Tabela III.** Stężenia zewnątrzkomórkowego ATP, MDA i LDH w płynie znad hodowli neutrofilów inkubowanych z chondrocytami zawieszonymi na biorusztowaniach i hodowanymi w różnych warunkach hodowlanych

**Table III.** Level of extracellular ATP, MDA and LDH in fluid collected from neutrophil and chondrocyte 3D cell cultures in different conditions

Czas [dni]	PMN + Chondrocyty + Scaffold			PMN + Chondrocyty + Scaffold + FBS			PMN + Chondrocyty + Scaffold + SF		
	ATP [nM]	MDA [%]	LDH [%]	ATP [nM]	MDA [%]	LDH [%]	ATP [nM]	MDA [%]	LDH [%]
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	34	56	23	6	2	5	65	87	45
2	54	54	45	22	43	12	56	78	67
2*	23	34	13	23	34	13	32	43	23
3*	24	37	15	7	4	5	34	35	28

2\* – inkubacja z katalizą i SOD ograniczającą emisję wolnych rodników tlenowych

3\* – inkubacja z DOG ( $10^{-4}M$ )



**Ryc. 5.** Inkubacja neutrofilów w hodowli chondrocytów na biorusztowaniu w środowisku płynu stawowego (pow. 400 ×).

**Fig. 5.** *Incubation of neutrophils in chondrocyte 3D cell culture with synovial fluid in culture medium (magnification 400 ×).*

cytów T w rozwoju tej choroby. Limfocyty T mają jednak jedynie nieznaczne możliwości uszkodzenia tkanek, główną rolę odgrywają zatem wyłącznie we wstępnych fazach RZS. Komórkami odpowiadającymi za większość realnych uszkodzeń w jamie stawu wydają się neutrofile, których liczba w płynie stawowym pacjenta z RZS może wynosić nawet do  $5 \times 10^{-9}$  [11].

Postępy inżynierii materiałowej oraz medycyny regeneracyjnej przybliżają coraz bardziej moment wykorzystania w leczeniu RZS implantów zasiedlonych własnymi komórkami pacjenta. W dotychczasowych badaniach autorzy niniejszej pracy zwrócili uwagę na to, że warunki panujące w stawie *in vivo* (podwyższone ciśnienie, środowisko o podwyższonej lepkości) powinny być przynajmniej częściowo odtworzone w warunkach *in vitro* [8]. Większość badań mających na celu opisanie relacji pomiędzy neutrofilami a biorusztowaniami do tej pory była wykonywana w warunkach mało zbliżonych do warunków panujących *in vivo*, w jamie stawu [12–14].

Aby zbadać dokładny charakter interakcji pomiędzy neutrofilami osób zdrowych oraz chorych na RZS a chondrocytami zasiedlającymi biorusztowania, badania prowadzono równocześnie w trzech układach doświadczalnych: klasyczne środowisko z typowymi mediami hodowlanymi (DMEM/F12), środowisko z 50-proc. FBS (uznane za najbardziej odpowiadające środowisku fizjologicznemu) oraz środowisko z 50-proc. SF pobranym od pacjentów z RZS (uznane za środowisko odpowiadające środowisku patologicznemu).

Zmniejszenie stężenia GSH może świadczyć o zwiększonej aktywności, a tym samym nasilającym się stresie

oksydacyjnym. Jak zauważyli Sato i wsp. [15], w neutrofilach pobranych z jamy ustnej, częściowo już zaktywowanych, stężenie wewnątrzkomórkowego GSH jest znacznie obniżone, w porównaniu z neutrofilami izolowanymi z krwi obwodowej tego samego pacjenta [15]. Również w badaniach autorów niniejszej pracy kontakt neutrofilów z biorusztowaniem powodował zmniejszenie się stężenia GSH w komórkach neutrofilów. Stężenie GSH w neutrofilach izolowanych z krwi osób zdrowych był wyższy niż w komórkach izolowanych z płynu stawowego pacjentów chorych na RZS. W przypadku inkubacji neutrofilów pacjentów chorych na RZS największe zmniejszenie stężenia GSH zaobserwowano w przypadku kontaktu tych komórek z biorusztowaniem w środowisku 50-proc. SF.

Jest wiele markerów stresu oksydacyjnego [16, 17]. Za jeden z najbardziej charakterystycznych uznawana jest zmiana stosunku GSH do GSSG, na korzyść tego ostatniego. W naszych doświadczeniach w neutrofilach izolowanych z krwi osób zdrowych i hodowanych na biorusztowaniu w warunkach standardowych stosunek GSH/GSSG był zazwyczaj podobny (1 : 1). Na biorusztowaniu opłaszczonym 50-proc. FBS zdecydowanie większe było stężenie GSH niż GSSG, odwrotną sytuację zanotowano z kolei w przypadku neutrofilów izolowanych z krwi, a hodowanych na biorusztowaniu w obecności 50-proc. SF. W przypadku neutrofilów izolowanych z SF u chorych na RZS we wszystkich przypadkach stężenie GSSG było zdecydowanie większe niż stężenie GSH. Powyższy efekt ulegał nasileniu wraz ze zmianą środowiska doświadczalnego – w stopniu najmniejszym w środowisku z dodatkiem 50-proc. FBS, w największym zaś w środowisku 50-proc. SF.

Przedstawione wyniki potwierdzają, że na nasilenie stresu oksydacyjnego neutrofilów istotny wpływ wywiera środowisko, tym większy, im bardziej jest ono zmienione (kolejno; FBS, standardowa hodowla, SF). W badaniach Biagioni i wsp. [16] dotyczących neutrofilów izolowanych od pacjentów z chorobą Crohna, powodującą – jak wiadomo – silny stres oksydacyjny w komórkach neutrofilów, zaobserwowano równie znaczący, tak jak i w badaniach autorów niniejszej pracy wzrost GSSG kosztem GSH [22].

Poziom chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (CL zewnątrzkomórkowa) odpowiedzialnej za większość uszkodzeń tkanek wzrasta wraz ze wzrostem ciśnienia środowiska (zarówno 50-proc. FBS, jak i 50-proc. SF). Zależność ta utrzymuje się również po 24-godzinnej hodowli neutrofilów. Przeprowadzone doświadczenia potwierdzają wnioski z wcześniejszych badań autorów, wykazując nasilenie CL zewnątrzkomórkowej emitowanej przez neutrofile inkubowane w płynie stawowym o dużej gęstości [8].

Chondrocyty hodowane wraz z neutrofilami nasilają CL, szczególnie jeśli są hodowane w środowisku z 50-proc. SF.



Wraz z upływem czasu następuje osłabienie CL luminozależnej (ogólnej). Dalsza aktywacja neutrofilów przez chondrocyty wynika z faktu, że znajdując się w stanie stresu oksydacyjnego, mierzonego zmniejszonym stężeniem GSH [18], wydzielają one wiele czynników aktywujących komórki zapalne [18–20]. Badania Green i wsp. [20] oraz Kurz i wsp. [21] wykazały nasilony wpływ substancji wewnątrzkomórkowych z chondrocytów poddanych działaniu ciśnień, a Graff i wsp. [22] sugerują, że czynnikiem o najsilniejszym oddziaływaniu jest ATP. Eksperymenty przeprowadzone przez autorów niniejszej pracy potwierdzają sugestię o niezwykle ważnej roli chondrocytów i innych komórek docelowych [23] w modulowaniu przebiegu procesu zapalnego [24–27], a badania powyższych relacji w pełnym modelu doświadczalnym (neutrofile plus chondrocyty plus biorusztowania plus płyn stawowy plus zmienne ciśnienia) w pełni potwierdzają tę sugestię.

Obecność w powyższym układzie doświadczalnym DOG, inhibitora zarówno procesu glikolizy, jak i szlaku pentozofosforanowego (czyli produkcji komponentów NADPH oksydazy), odwraca efekt wszelkich zmian poziomu emisji WRT przez neutrofile, potwierdzając wcześniejsze doniesienia autorów niniejszej pracy o możliwości regulowania procesu zapalnego przez ten właśnie czynnik [28].

Analiza markerów stresu oksydacyjnego, którego efektem końcowym jest nekrotyczna śmierć komórki, wykazała, że w badanym układzie doświadczalnym komórki są uszkodzane przez ten właśnie stres, którego finalnym skutkiem jest nekroza. Wraz z upływem czasu hodowli żywotność neutrofilów się zmniejsza, najbardziej w środowisku patologicznym (50-proc. SF). Również stężenie biochemicznych markerów nekrozy chondrocytów, takich jak stężenie zewnątrzkomórkowego ATP uwalnianego z chondrocytów, było największe w przypadku hodowli w środowisku „patologicznym” (50-proc. SF).

Podobną relację zanotowano w przypadku zewnątrzkomórkowego MDA: najmniejsze jego stężenie zaobserwowano w hodowli chondrocytów w środowisku 50-proc. FBS, a największe w środowisku 50-proc. SF. Stężenie uwalnianego LDH zwiększało się proporcjonalnie w czasie doświadczenia, najwyższe zwiększenie stężenia również odnotowano w przypadku hodowli chondrocytów na biorusztowaniu w środowisku 50-proc. SF.

Inkubacja hodowli komórkowych z DOG ograniczała zwiększanie się zarówno stężeń zewnątrzkomórkowego LDH, ATP, jak i MDA, i to we wszystkich badanych hodowlach, co potwierdza możliwość ograniczenia stresu oksydacyjnego poprzez zablokowanie aktywności szlaku pentozofosforanowego w komórkach neutrofilów. Podobne wyniki autorzy uzyskali we wcześniejszych

pracach – nekroza hodowanych komórek w hodowlach mieszanych, tj. neutrofilów z chondrocytami, była znacznie ograniczona po zahamowaniu aktywności szlaku pentozofosforanowego [28].

## Podsumowanie

Z historycznego punktu widzenia śmierć komórek usiłowano zdefiniować już pod koniec XIX wieku [23]. Oprócz tradycyjnej nekrozy sugerowano istnienie innych rodzajów śmierci: koagulacyjnej nekrozy, autolizy, fizjologicznej śmierci komórek, chromatolizy (tak nazywano apoptozę w 1914 r.) czy onkozy (*oncosis*). Ostatnio dla określenia wszystkich śmierci niebędących apoptozą zaproponowano termin śmierci „wypadkowej” (*accidental cell death*) [23]. Zdaniem Takkei i wsp. [7] istnieje również bardzo specyficzny rodzaj śmierci, mianowicie śmierć neutrofilów będąca efektem ich aktywacji przez obcy materiał, która następuje w wyniku unikalnych, nieopisanych jeszcze reakcji komórki i którą należy określać mianem *synxenatosis*. Określenie to jest utworzone ze słów wskazujących na to, że śmierć komórki (*death*, *tanato*) jest wynikiem adhezji neutrofilów (*syndesi*) do zewnętrznego materiału (*xeno*) [7].

Wyniki badań autorów niniejszej pracy nie potwierdzają istnienia jakiejś nieznannej formy śmierci komórek przylegających do biorusztowań. W warunkach zbliżonych do warunków panujących w jamie stawu pacjentów z RZS komórki przylegające do biorusztowań podlegają typowej nekrozie. Wydaje się, że na rozbieżności w wynikach wpływają warunki przeprowadzanych doświadczeń, które powinny jednak maksymalnie wiernie odzwierciedlać warunki panujące *in vivo*. W swoich publikacjach autorzy niniejszej pracy sugerowali już konieczność stosowania fizjologicznych stężeń SF [8, 28]. Znaczący wpływ fizjologicznych stężeń SF na aktywność neutrofilów zanotowano również w innych doniesieniach [29, 30].

Dopiero w czasie eksperymentów prowadzonych na neutrofilach inkubowanych w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, tj. w obecności 50- i 75-procentowego stężenia SF, udało się wykazać znaczący wpływ SF na proces apoptozy neutrofilów [29]. Gdy w celu odtworzenia warunków *in vivo* Icking-Kunert i wsp. [30] inkubowali neutrofile w obecności 50-proc. SF, zanotowali ich przekształcenie się w komórki dendrytycznopodobne (*dendritic-like*). Według cytowanych autorów to właśnie może być jedną z głównych przyczyn przekształcania się procesów zapalnych w zapalenia przewlekłe [30].

Niniejsza praca stanowi podsumowanie wstępnych badań nad możliwościami oddziaływania na przebieg procesu RZS, przy zastosowaniu terapii z wykorzystaniem implantów [8, 28]. Nasuwa się wniosek, że tylko

badania prowadzone w warunkach możliwie maksymalnie wiernie odzwierciedlających warunki panujące *in vivo* mogą cokolwiek powiedzieć na temat rzeczywistych oddziaływań pomiędzy komórkami. Nie jest wykluczone, że umożliwi to nowe spojrzenie na wiele stosowanych dotąd procedur terapii biologicznej.

### Piśmiennictwo

- Nadzam GS, De La Cruz C, Greco RS, et al. Neutrophil Adhesion to Vascular Prosthetic Surfaces triggers Nonapoptotic Cell Death. *Ann Surg* 2000; 231: 587-599.
- Sedwitz MM, Hye RJ, Stabile BE. The changing epidemiology of pseudoaneurysm. *Arch Surg* 1988; 123: 473-476.
- Zimmerli W, Lew PD, Waldvogel FA. Pathogenesis of foreign body infection: evidence for a local granulocyte defect. *J Clin Invest* 1984; 73: 1191-1200.
- Nathan CF. Neutrophil activation on biological surfaces. *J Clin Invest* 1987; 80: 1550-1560.
- Henson PM, Johnston RB Jr. Tissue injury in inflammation. *J Clin Invest* 1987; 79: 669-674.
- Tsan MF. Phorbol myristate acetate induced neutrophil auto-toxicity. *J Cell Physiol* 1980; 105: 327-334.
- Takei H, Araki A, Watanabe H, et al. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis and necrosis. *J Leuko Biol* 1996; 59: 229-240.
- Gajewski M, Szczepanik S, Wysocki Ł i wsp. The effect of increasing amounts of synovial fluid isolated from patients with rheumatoid arthritis on the respiratory burst of human neutrophils. *Reumatologia* 2009; 47: 273-281.
- Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochem* 1976; 74: 214-226.
- Kramer K, Rademaker B, Rosendal WN, et al. Influence of lipid peroxidation on B-adrenoceptors. *FEBS Lett*. 1986; 198: 80-84.
- Edwards SW, Hallett MB. Seeing the wood for the trees: forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Immunology Today* 1997; 18: 320-324.
- Demaurex N, Downey GP, Wadell TK, et al. Intracellular pH regulation during spreading of human neutrophils. *J Cell Biol* 1996; 133: 1391-1402.
- Liu L, Elwing H, Karlson A, et al. Surface-related triggering of the neutrophil respiratory burst. Characterization of the response induced by IgG adsorbed to hydrophilic and hydrophobic glass surfaces. *Clin Exp Immunol* 1997; 109: 204-210.
- Katz DA, Haimovich B, Greco RS. Neutrophil activation by expanded polytertrachloroethylene is dependent on the induction of protein phosphorylation. *Surgery* 1994; 116: 446-455.
- Sato EF, Higashino M, Ikeda K, et al. Oxidative stress-induced cell death of human oral neutrophils. *Am J Physiol* 2003; 284: C1048-C1053.
- Biagioni C, Favilli F, Catarzi S, et al. Redox state and O<sub>2</sub>- production in neutrophils of Crohn's disease patients. *Expert Biol Med* 2006; 231: 186-195.
- Scheel-Toellner D, Wang K, Craddock R, et al. Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signaling. *Blood* 2004; 104: 2557-2564.
- Del Carlo M, Loeser RF. Increased oxidative stress with aging reduces chondrocyte survival. Correlation with intracellular glutathione levels. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 3419-3430.
- Del Carlo M, Loeser RF. Chondrocyte cell death mediated by reactive oxygen species-dependent activation of PKC-β1. *Amer J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C802-C811.
- Green DM, Noble PC, Ahuero JS, Birdsall HH. Cellular events leading to chondrocyte death after cartilage impact injury. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1509-1517.
- Kurz B, Lemke A, Kehn M, et al. Influence of tissue maturation and antioxidants on the apoptotic response of articular cartilage after injurious compression. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 123-130.
- Graff RD, Lazarowski ER, Banes AJ, et al. ATP release by mechanically loaded porcine chondrons in pellet culture. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1571-1579.
- Gibson JS, Milner PI, White R, et al. Oxygen and reactive oxygen species in articular cartilage: modulators of ionic homeostasis. *Pflugers Arch* 2008; 455: 563-573.
- Borsiczky B, Szabo Z, Jaberansari MT, et al. Activated PMNs leads to oxidative stress on chondrocytes: a study of swine kness. *Acta Orthop Scand* 2003; 74: 190-195.
- Chung R, Cool JC, Scherer MA, et al. Roles of neutrophil-mediated inflammatory response in the bony repair of injured growth plate cartilage in young rats. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 1272-1280.
- Castillo EC, Kouri JB. A new role for chondrocytes as non-professional phagocytes. An *in vitro* study. *Microsc Res Tech* 2004; 64: 269-278.
- Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-15.
- Gajewski M, Warnawin E, Gajewska J i wsp. Badania nad mechanizmem toksycznego oddziaływania neutrofilów na chondrocyty hodowane w różnych stężeniach tlenu. *Reumatologia* 2006; 44: 76-86.
- Bell AL, Magill MK, Irvine AE. Human blood and synovial fluid neutrophils cultured *in vitro* undergo programmed cell death which is promoted by the addition of synovial fluid. *Ann Rheum Dis* 1995; 54: 910-915.
- Iking-Konert C, Ostendorf B, Sander O, et al. Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils to dendritic-like cells at the site of inflammation in rheumatoid arthritis: evidence for activation by the T cells. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1436-1442.