

## Badania nad mechanizmem toksycznego oddziaływania neutrofilów na chondrocyty hodowane w różnych stężeniach tlenu

*Experimental study of the cytotoxic effects of neutrophils on chondrocytes cultivated in different oxygen concentrations*

Michał Gajewski<sup>1</sup>, Ewa Warnawin<sup>2</sup>, Joanna Gajewska<sup>3</sup>, Grażyna Sygitowicz<sup>4</sup>, Maria Rell-Bakalarska<sup>5</sup>, Tomasz Burakowski<sup>2</sup>, Wojciech Dziewczopolski<sup>5</sup>, Szymon Szczepanik<sup>6</sup>, Łukasz Wysocki<sup>6</sup>, Jan Pachecka<sup>4</sup>, Włodzimierz Maśliński<sup>2</sup>, Sławomir Maśliński<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biochemii Instytutu Reumatologii w Warszawie, kierownik Zakładu prof. dr hab. med. Sławomir Maśliński

<sup>2</sup>Zakład Patofizjologii i Immunologii Instytutu Reumatologii w Warszawie, kierownik Zakładu prof. dr hab. biol. Włodzimierz Maśliński

<sup>3</sup>Zakład Biochemii Klinicznej Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie, kierownik Zakładu prof. dr hab. Teresa Laskowska-Klita

<sup>4</sup>Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej Akademii Medycznej w Warszawie, kierownik Katedry prof. dr hab. med. Jan Pachecka

<sup>5</sup>Przychodnia Przykliniczna Instytutu Reumatologii, kierownik Przychodni dr med. Maria Rell-Bakalarska

dyrektor Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher prof. dr hab. med. Sławomir Maśliński

<sup>6</sup>Katedra i Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej Akademii Medycznej w Warszawie, kierownik Katedry prof. dr hab. med. Sławomir Maśliński

**Słowa kluczowe:** chemiluminescencja, cytotoksyczność, neutrofile, chondrocyty, tlen.

**Key words:** chemiluminescence, cytotoxicity, neutrophils, chondrocytes, oxygen.

### Streszczenie

Celem pracy było zbadanie mechanizmu cytotoksycznego oddziaływania neutrofilów ludzkich na chondrocyty chrząstki stawowej, hodowanych w różnych warunkach tlenowych. Badano zależności pomiędzy aktywacją neutrofilów (CL) a dostępnością glukozy, poziomem energii i aktywnością szlaku pentozofosforanowego. Wykazano, że aktywność NADPH oksydazy warunkuje intensywność odpowiedzi zapalnej. Nie znalazły potwierdzenia doniesienia, sugerujące bezpośrednią zależność CL od poziomu dostępnej energii (ATP).

Hodowle chondrocytów prowadzone w zróżnicowanych warunkach tlenowych wykazały, że w wysokich stężeniach tlenu (21%) komórki chrząstki znajdują się w stanie hiperoksji, choć ich żywotność nie różni się zasadniczo od komórek hodowanych w niskich stężeniach tlenu.

Komórki chrząstki hodowane w wysokich stężeniach tlenu są jednak zdecydowanie bardziej narażone na toksyczny wpływ neutrofilów. Zahamowanie szlaku produkcji NADPH, obniżające w sposób zdecydowany poziom uszkodzeń chondrocytów, może sugerować zastosowanie blokera tego szlaku – DOG jako środka zmniejszającego intensywność odpowiedzi zapalnej.

### Summary

The main objective of our work was to examine how different oxygen levels affects cytotoxic interactions between human neutrophils and chondrocytes obtained from the cartilage. We studied the connections between neutrophils activation (CL) and the availability of glucose, the amount of energy and the activity of the pentose phosphate pathway. We found that NADPH oxidase affects the intensity of the inflammation process but the amount of energy (ATP) had no direct influence on neutrophils activation.

Chondrocytes cultivation in different oxygen conditions demonstrated that although in high oxygen levels (21%), the survival of the cells being in hyperoxia- state varies not from cells cultivated in low oxygen conditions, they are significantly more exposed to the toxic influence of neutrophils.

The inactivation of NADPH production, noticeably lowering the level of damage delivered to the chondrocytes, could suggest that a blocker of this pathway (DOG) might be a useful remedy, reducing the intensity of the inflammation process.

---

### Adres do korespondencji:

dr med. Michał Gajewski, Zakład Biochemii, Instytut Reumatologii im. prof. dr hab. med. E. Reicher, ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa

Praca wpłynęła: 6.02.2006 r.

## Wstęp

Neutrofile jako pierwsze zjawiają się w miejscach obszaru procesu zapalnego, dlatego też często są nazywane *pierwszą linią obrony*. Po ich aktywacji, na skutek kontaktu z czynnikami obcymi lub własnymi uszkodzonymi tkankami, obserwuje się wzrost zapotrzebowania na tlen oraz uwalnianie do środowiska dużych ilości aktywnych metabolitów tlenowych (AMT). To zjawisko, określone jako *wybuch tlenowy (respiratory burst)*, jest spowodowane aktywacją NADPH oksydazy i jest uzależnione m.in. od NADPH wytwarzanego w cyklu pentozofosforanowym. Uruchomienie systemu NADPH oksydazy prowadzi do powstania czynników niezbędnych do dalszych przemian katalizowanych przez mieloperoksydazę (MPO) [1].

Już w 1972 r. Allen [2] udowodnił, że wskutek wytwarzania AMT w aktywnych neutrofilach zachodzi zjawisko chemiluminescencji (CL). CL pojawia się wówczas, gdy jeden z czynników powstających w wyniku reakcji chemicznych jest w stanie elektronowo wzbudzonym i powraca do stanu wyjściowego, emitując światło. Natężenie tego światła jest niezwykle małe, ale można je wzmocnić, dodając substancje o dużej wydajności kwantowej. Szerokie zastosowanie znalazła lucygenina (wzmocnienie CL zależnej od NADPH oksydazy) oraz luminol (wzmocnienie CL zależnej od MPO) [3, 4].

Do tej pory przeprowadzono wiele badań nad wzajemnymi interakcjami pomiędzy toksycznym oddziaływaniem komórek zapalnych, płynem stawowym a komponentami biorusztowań, na których zasiedla się komórki w celu rekonstrukcji danej tkanki [5]. Interakcje te są tak bardzo skomplikowane, że już w tej chwili można sądzić, że to właśnie one, a nie sama hodowla komórek czy ich późniejsza implantacja, mogą być głównym problemem inżynierii tkankowej.

Proces przekształcania się różnych typów komórek w komórki chrząstki powinien odbywać się w warunkach maksymalnie odzwierciedlających warunki panujące w jamie stawu *in vivo*. W przekroju chrząstki występują bardzo znaczne różnice w wartościach stężenia tlenu. Na jej powierzchni wynosi ono do 10%, w warstwie środkowej 1–6%, natomiast w warstwach położonych najgłębiej warunki są już praktycznie beztlenowe [6]. Z tych powodów w wyniku ewolucyjnej adaptacji komórki chrząstki przystosowały się do pozyskiwania energii na drodze beztlenowej glikolizy, a konieczność zachowania niskich ciśnień tlenu do utrzymania fenotypu chondrocytów została wykazana już w 1969 r. [7].

Ostatnio pojawiły się doniesienia, że standardowe warunki hodowli komórek chrząstki (21% tlenu) są jednak dla nich zdecydowanie niekorzystne [8, 9]. Komórki takie znajdują się bowiem w warunkach stresu oksydacyjnego, polegającego – w dużym skrócie – na przewadze produkcji aktywnych metabolitów tlenowych

nad możliwościami ich detoksykacji. Badania nad wpływem zróżnicowanych ciśnień tlenu na chondrocyty prowadzono w standardowych warunkach hodowli, przy różnych stężeniach tlenu (w granicach 2–21%). Oznaczano poziom wolnej energii – adenozynotrójfosforanu (ATP), parametry stresu oksydacyjnego – poziom peroksydacji lipidów (LPO) oraz poziomy aktywności enzymów inaktywujących aktywne metabolity tlenowe – katalazy (KAT), dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) oraz peroksydazy glutationowej (GPx).

Celem badań było określenie stopnia zaawansowania stresu oksydacyjnego w chondrocytach hodowanych w różnych stężeniach tlenu oraz określenie mechanizmu i zakresu uszkodzeń, jakie mogą powodować neutrofile infiltrujące implanty z chondrocytami.

## Materiał i metody

### Odczynniki

Zymosan A (OZ) oraz ester forbolu (PMA – *phorbol 12-myristate 13 acetate*) otrzymano z firmy Sigma. Luminol (lum.-5-amino-2,3-dihydroftalazyno-1,4-dion), lucygeninę (luc.-dwuazotan10,10"-dimetylo-9,9"-dis-akrydynowy) oraz fMLP (n-formylo-metionilo-leucylo-feniloalanian) dostarczyła firma SERVA. Gradisol G otrzymano z firmy Polfa Kutnowskie Zakłady Farmaceutyczne, a PBS (zbuforowany roztwór 0,9% 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 Szczepionek w Lublinie. Antybiotyki – penicylina i streptomycyna pochodziły z Polfy Tarchomin. Kolagenazę otrzymano z firmy SERVA, surowicę cielęcą (NCS) z Bio-Whittaker. Firma Sigma dostarczyła DMEM/F12, amfoterycynę, hialuronidazę i trypsynę/EDTA.

### Izolacja neutrofilów z obwodowej krwi żyłnej

Krew obwodową ochotników (mężczyźni w wieku 25–45 lat) otrzymano z Instytutu Hematologii w Warszawie. Do izolacji komórek z krwi obwodowej wykorzystano technikę wirowania w gradiencie gęstości przy użyciu Gradisolu G, stosowano również wstrząs hipotoniczny w celu wyeliminowania erytrocytów. Otrzymane komórki (98% neutrofilów) zawieszano w PBS i przetrzymywano w temp. 4°C do momentu rozpoczęcia badań. Ich żywotność, określoną metodą barwienia z błękitem trypanu, oceniono na 96%.

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

Płyn stawowy, z którego izolowano neutrofile, otrzymano od 24 pacjentów z reumatoidalnym zapale-

niem stawów (RZS) obu płci, w wieku 31–79 lat, leczonych w Instytucie Reumatologii w Warszawie.

Liczba komórek w pobieranym płynie stawowym (SF) wahała się od  $1 \times 10^7$  do  $1 \times 10^8$ /ml.

Neutrofile stanowiły 75–98% wszystkich komórek (średnio 87%). Świeżo izolowany płyn stawowy był mieszany z RPMI 1640 (w proporcji 1:5) i wirowany. Komórki były 2-krotnie przemywane PBS, następnie przeprowadzano wirowanie w gradiencie Gradisolu G oraz wstrząs hipotoniczny. Neutrofile izolowane z SF, barwione techniką May-Grunewald-Giemsa, były morfologicznie prawidłowe, a ich żywotność wynosiła ponad 80% (barwienie z błękitem trypanu).

### Przygotowywanie płynu stawowego

Płyn stawowy pobrano od 25 pacjentów chorych na RZS, leczonych w Instytucie Reumatologii.

Płyn był pobierany i natychmiast wirowany w temp.  $2 \pm 8^\circ\text{C}$ , przez 30 min, przy obrotach 10 000/min. Płyn po odwirowaniu został rozpipetowany na porcje 1 ml w probówkach Eppendorfa, które następnie przechowywano w temp.  $-20^\circ\text{C}$ .

### Hodowle chondrocytów

Skrawki chrząstki ludzkiej, pobranej *post-mortem* od ludzi niechorujących na RZS, cięto skalpelem w warunkach sterylnych, zawieszano w mieszaninie antybiotyków (penicylina 200 j./ml, streptomycyna 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , amfoterycyna 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Jeden gram mokrej masy był trawiony w 3–4 ml pożywki, trawienie przeprowadzano za pomocą hialuronidazy, trypsyny, a następnie na całą noc pozostawiano w 0,2% roztworze kolagenazy i odsączano na gazie młyńskiej, po czym zawieszano w pożywce. Skład pożywki: DMEM/F12 plus 5% NCS plus antybiotyki plus 10% L-glutaminy 200 mM, zawieszano w niej 1 mln komórek na 5 ml pożywki.

### Pomiar chemiluminescencji

Do pomiarów CL wykorzystano Luminometr 1251 (Pharmacia LKB). Pomiar emisji światła (wartość CL) uznano za miarę aktywności neutrofilów. Podstawą do interpretacji pomiarów CL był odsetek maksymalnych przyrostów światła w określonym przedziale czasowym (30 min). Pomiar był przeprowadzany w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ . Badane próbki zawierały  $1 \times 10^5$  neutrofilów.

Pomiary CL wykonywano z udziałem luminolu i lucygeniny (substancje wzmacniające emisję światła). Neutrofile, niezależnie od źródła ich pochodzenia, były aktywowane opsonizowanym zymosanem (OZ) oraz eksponowane na wzrastające stężenia płynu stawowego (SF) w zakresie 0–50% SF.

### Pomiar NADPH oraz ATP

Oznaczenia poziomu ATP i NADPH prowadzono metodami bioluminescencyjnymi, z wykorzystaniem luminometru LKB-1251 (Wallac).

Pomiar NADPH prowadzono przy zastosowaniu LKB-Wallac 1243-104 NADPH Monitoring Kit, zestaw ten jest przeznaczony do oznaczeń zredukowanego nukleotydu w zakresie stężeń  $10^{-10}$ – $10^{-7}$  M.

Schemat przeprowadzanych reakcji:

- 1)  $\text{NADPH} + \text{FMN} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{FMNH}_2$  (NADPH:FMN oksydoreduktaza)
- 2)  $\text{FMNH}_2 + \text{RCHO} + \text{O}_2 \rightarrow \text{FMN} + \text{RCOOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{światło}$  (lucyferaza)

Poziom światła przeliczano na stężenie NADPH, stosując odpowiednie standardy zestawu.

Pomiaru ATP dokonano przy zastosowaniu zestawu 1243-107 ATP Assay Kit (firmy LKB-Wallac).

Schemat przeprowadzanych reakcji:

$\text{ATP} + \text{lucyferyna} + \text{O}_2 \rightarrow \text{oksydylucyferyna} + \text{AMP} + \text{P}_i + \text{CO}_2 + \text{światło}$ . Analogicznie jak w zestawie NADPH, odpowiednie standardy umożliwiły przeliczenie poziomu światła na stężenie ATP.

### Oznaczenia biochemiczne

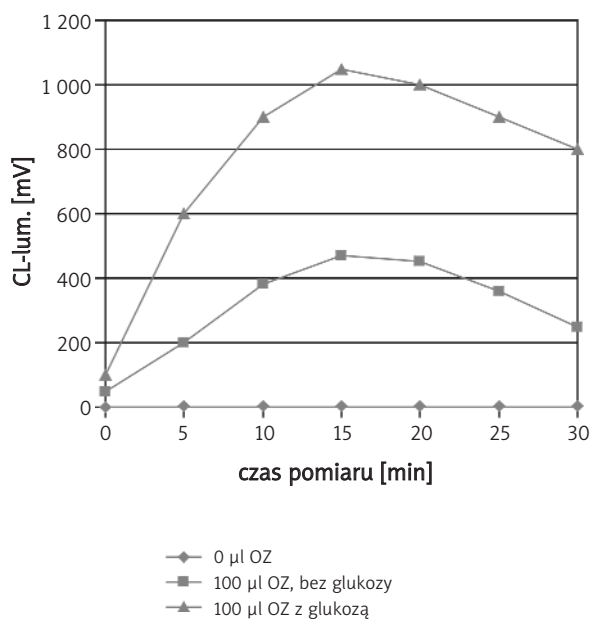
Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) oznaczano metodą Misra i Fridovich [10], aktywność katalazy (KAT) metodą Beers i Sizer [11], aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) metodą Paglia i Valentine [12], poziom glutationu (GSH i GSSG) oznaczano metodą fluorometryczną Hissin i Hilf [13], natomiast oznaczanie peroksydacji lipidów (LPO) przeprowadzono metodą Kramera i wsp. [14]. Opsonizację zymosanem (OZ) przeprowadzono wg Jamesa i wsp. [15].

### Wyniki

#### Badania nad mechanizmem cytotoksyczności neutrofilów

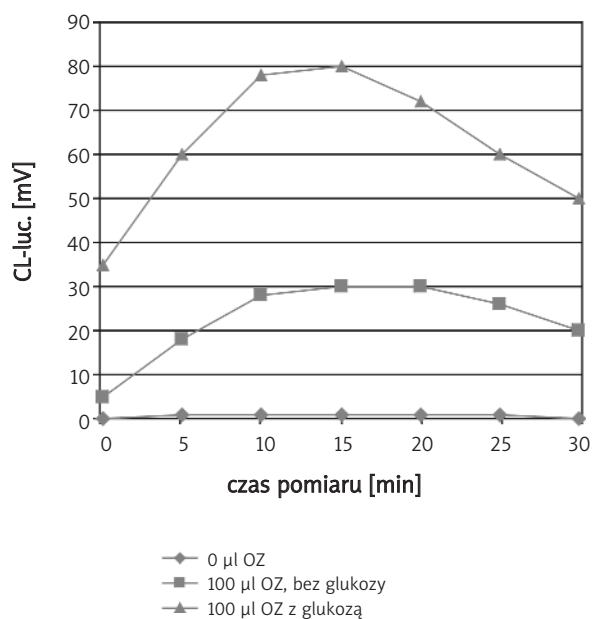
Poziomy CL-lum. oraz CL-luc. neutrofilów stymulowanych 100  $\mu\text{l}$  OZ w dwóch układach eksperymentalnych, w obecności glukozy lub bez niej, zostały przedstawione na ryc. 1. i 2.

Obydwa typy chemiluminescencji są wyraźnie zwiększone w obecności glukozy (ponaddwukrotnie w porównaniu z neutrofilami inkubowanymi bez glukozy), przy czym typowy *wybuch oddechowy* (*respiratory burst*) jest zauważalny jedynie wobec wyższych stężeń OZ. Zwraca uwagę fakt, że efekt nasilenia CL w obecności glukozy jest efektem natychmiastowym i można go zauważyć już podczas pierwszych pomiarów (pierwsze minuty eksperymentów) (ryc. 1. i 2.).



**Ryc. 1.** Wartość chemiluminescencji CL-lum. neutrofilów izolowanych z krwi w czasie do 30 min po stymulacji opsonizowanym zymosanem (100 µl OZ) w środowisku PBS z glukozą/bez glukozy w stosunku do kontroli (0 µl OZ).

**Fig. 1.** Chemiluminescence values (CL-lum) of neutrophils isolated from the blood up to 30 min after the stimulation with opsonized zymosan (OZ) (100 µl OZ) in PBS environment with/without glucose in comparison to the control (0 µl OZ).



**Ryc. 2.** Wartość chemiluminescencji CL-luc. neutrofilów izolowanych z krwi w czasie do 30 min po stymulacji opsonizowanym zymosanem (OZ) (100 µl OZ) w środowisku PBS z glukozą/bez glukozy w stosunku do kontroli (0 µl OZ).

**Fig. 2.** Chemiluminescence values (CL-luc) of neutrophils isolated from the blood up to 30 min after the stimulation with opsonized zymosan (OZ) (100 µl OZ) in PBS environment with/without glucose in comparison to the control (0 µl OZ).

W tab. I zamieszczono dane dotyczące poziomu wolnego ATP w neutrofilach izolowanych z krwi obwodowej zarówno spoczynkowych, jak i stymulowanych przez OZ (w obecności glukozy lub bez niej). Zbadano również poziom ATP w neutrofilach izolowanych z płynu stawowego i aktywowanych poprzez kontakt z OZ (tab. II).

W tab. I przedstawiono poziomy ATP oznaczone na neutrofilach jednego pacjenta (homogenat ze 100 000 komórek zawierał ATP w stężeniu  $\pm 5 \times 10^{-11}$  M), wyniki uzyskane z badań neutrofilów innych pacjentów (przebadano 8 pacjentów) nie różniły się między sobą. W żadnej z próbek od poszczególnych pacjentów i w żadnym układzie doświadczalnym nie stwierdzono znaczących zmian poziomu ATP podczas 30 min eksperymentu.

Podobne wyniki uzyskano, badając neutrofile izolowane z płynu stawowego pacjentów z RZS, przy czym wyjściowy poziom wolnego ATP był w tych komórkach 2-krotnie niższy (homogenat ze 100 000 komórek zawierał ATP w stężeniu  $\pm 2,5 \times 10^{-11}$  M) (tab. II).

W tab. II przedstawiono wyniki uzyskane w próbkach od jednego pacjenta, w wynikach uzyskanych w próbkach od 8 pozostałych pacjentów nie odnotowano znaczących zmian w poziomie ATP z tym, że zanotowano duże różnice w wyjściowym poziomie ATP w neutrofilach izolowanych z płynu stawowego. Poziom wolnej energii (w homogenatach uzyskanych ze 100 tys. komórek) wahał się w granicach  $1,75 \div 6,21 \times 10^{-11}$  M. W żadnym ze stosowanych modeli doświadczalnych nie zanotowano istotnych zmian w poziomach ATP w neutrofilach izolowanych z krwi czy SF w czasie do 30 min od ich aktywacji przez kontakt z OZ (tab. I i II).

W dalszych eksperymentach zastosowano 2-deoksy-glukozę (DOG), niemetabolizowalną pochodną glukozy, blokującą proces glikolizy.

Na ryc. 3. i 4. przedstawiono wpływ DOG na oba rodzaje CL (lum.- i luc.-zależną). Neutrofile krwi obwodowej i izolowane z płynu stawowego były ekspozowane na DOG, zastosowaną w szerokim zakresie stężeń,  $10^{-3}$ – $10^{-8}$  M. Na rycinach przedstawiono jedynie wybrane wyniki.

**Tabela I.** Wartości stężeń ATP (M) neutrofilów izolowanych z krwi w czasie do 30 min stymulacji wzrastającymi stężeniami opsonizowanym zymosanem (OZ) w środowisku PBS z glukozą/bez glukozy

**Table I.** ATP concentration values (M) of neutrophils isolated from the blood in time up to 30 min after the stimulation with opsonized zymosan (OZ) in PBS environment with/without glucose

PBS					
czas pomiaru (min)	0 $\mu$ l OZ	5 $\mu$ l OZ	25 $\mu$ l OZ	50 $\mu$ l OZ	100 $\mu$ l OZ
0	$5,36 \times 10^{-11}$	$5,60 \times 10^{-11}$	$6,00 \times 10^{-11}$	$5,88 \times 10^{-11}$	$5,50 \times 10^{-11}$
5	$5,18 \times 10^{-11}$	$5,80 \times 10^{-11}$	$5,00 \times 10^{-11}$	$5,55 \times 10^{-11}$	$5,45 \times 10^{-11}$
10	$4,00 \times 10^{-11}$	$5,57 \times 10^{-11}$	$5,51 \times 10^{-11}$	$6,07 \times 10^{-11}$	$5,96 \times 10^{-11}$
15	$4,20 \times 10^{-11}$	$5,60 \times 10^{-11}$	$5,60 \times 10^{-11}$	$5,63 \times 10^{-11}$	$5,17 \times 10^{-11}$
30	$4,28 \times 10^{-11}$	$5,28 \times 10^{-11}$	$5,88 \times 10^{-11}$	$6,31 \times 10^{-11}$	$5,18 \times 10^{-11}$
PBS+glukoza+albumina					
czas pomiaru (min)	0 $\mu$ l OZ	5 $\mu$ l OZ	25 $\mu$ l OZ	50 $\mu$ l OZ	100 $\mu$ l OZ
0	$5,60 \times 10^{-11}$	$5,30 \times 10^{-11}$	$5,80 \times 10^{-11}$	$5,10 \times 10^{-11}$	$5,00 \times 10^{-11}$
5	$5,16 \times 10^{-11}$	$5,19 \times 10^{-11}$	$5,88 \times 10^{-11}$	$5,11 \times 10^{-11}$	$5,65 \times 10^{-11}$
10	$5,83 \times 10^{-11}$	$5,74 \times 10^{-11}$	$5,20 \times 10^{-11}$	$5,25 \times 10^{-11}$	$5,75 \times 10^{-11}$
15	$5,32 \times 10^{-11}$	$6,07 \times 10^{-11}$	$5,00 \times 10^{-11}$	$5,81 \times 10^{-11}$	$5,69 \times 10^{-11}$
30	$5,00 \times 10^{-11}$	$6,53 \times 10^{-11}$	$5,43 \times 10^{-11}$	$5,11 \times 10^{-11}$	$5,47 \times 10^{-11}$

Najwyższe wartości CL-lum. i CL-luc. uzyskano przy stężeniach  $10^{-6}$  M DOG i niższych.

Zarówno CL-luc., jak i CL-lum. zdecydowanie się obniżyły dopiero w obecności DOG w stężeniu  $10^{-5}$  M i wyższym ( $10^{-4} \div 10^{-3}$  M – dane niezamieszczone).

Wpływ dwóch wybranych stężeń DOG ( $10^{-5}$  i  $10^{-6}$  M) na CL-lum. i CL-luc. neutrofilów izolowanych z SF pacjentów z RZS był słabiej zaznaczony w porównaniu z neutrofilami izolowanymi z krwi, tendencja hamowania CL jest identyczna we wszystkich 10 przebadanych przypadkach (ryc. 3., 4.).

Na ryc. 5. przedstawiono wyniki eksperymentów ukazujących wpływ 30-minutowej inkubacji różnych stężeń DOG na poziomy ATP, NADPH w neutrofilach, zarówno izolowanych z krwi, jak i z SF pacjentów z RZS (warunki spoczynkowe i po stymulacji 50% SF i OZ).

Zaobserwowano stopniowe zmniejszenie poziomu ATP, proporcjonalne do zastosowanego stężenia DOG, blokera glikolizy. Zwraca uwagę fakt, że ekspozycja neutrofilów stymulowanych OZ na DOG (w zakresie  $10^{-4} \div 10^{-3}$  M) nie nasila dalej procesu obniżenia poziomu ATP. Obie wielkości zmniejszenia poziomu są praktycznie identyczne, mimo że w drugim zaktywowane neutrofile (100  $\mu$ l OZ) rozpoczęły już proces fagocytozy (ryc. 5.).

Podobne rezultaty uzyskano w badaniu neutrofilów izolowanych z SF pacjentów z RZS.

Spadek (procentowy) jest bardzo podobny, dodatkowa stymulacja tych neutrofilów przez kontakt z SF bądź łącznie przez 50% SF i 100  $\mu$ l OZ nie nasila już dalej zmniejszenia poziomu ATP (ryc. 5.). Należy zauważyć, iż po 30 min eksperymentu zmniejszenie poziomu ATP (wrażone w procentach) jest słabiej zaznaczone w neutrofilach izolowanych z SF w porównaniu z neutrofilami izolowanymi z krwi.

W neutrofilach izolowanych z krwi DOG obniża poziom NADPH już przy stężeniu  $10^{-5}$  M. Spadek ten jest niewielki (ok. 20%), zastosowanie większego stężenia DOG ( $10^{-4}$  M) znacznie bardziej obniża poziom NADPH. W neutrofilach izolowanych z krwi i stymulowanych OZ relacja jest podobna, przy stężeniu DOG  $10^{-5}$  M wykazano obniżenie poziomu NADPH o 23% (a jest to stężenie DOG, przy którym następuje już znaczący spadek obu typów CL), natomiast DOG w stężeniu  $10^{-4}$  M znacząco obniża poziom dostępnego NADPH – nawet o 75%, w neutrofilach izolowanych z krwi i płynu stawowego chorych na RZS. Na ryc. 5. przedstawiono typowe wyniki uzyskane w próbkach od pojedynczych pacjentów (z przebadanych 12 zdrowych dawców krwi i 10 chorych na RZS).

Podobnie jak w przypadku ATP, również i tempo obniżania poziomu NADPH po ekspozycji na DOG jest słabiej zaznaczone w neutrofilach izolowanych z SF niż w neutrofilach izolowanych z krwi (ryc. 5.).

**Tabela II.** Wartości stężeń ATP (M) neutrofilów izolowanych z płynu stawowego w czasie do 30 min stymulacji wzrastającymi stężeniami opsonizowanym zymosanem (OZ) w środowisku PBS z glukozą/bez glukozy

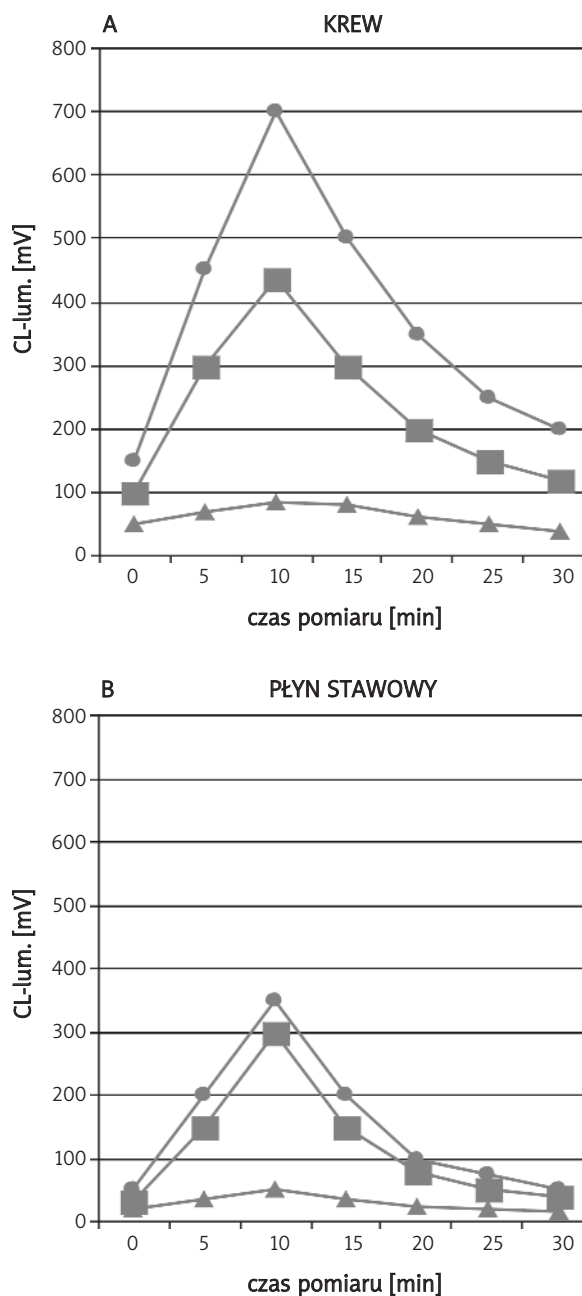
**Table II.** ATP concentration values (M) of neutrophils isolated from the synovial fluid in time up to 30 min. after the stimulation with opsonized zymosan (OZ) in PBS environment with/without glucose

PBS				
czas pomiaru (min)	0 µl OZ	20 µl OZ	50 µl OZ	100 µl OZ
0	2,50x10 <sup>-11</sup>	2,30x10 <sup>-11</sup>	2,45x10 <sup>-11</sup>	2,55x10 <sup>-11</sup>
5	2,65x10 <sup>-11</sup>	2,43x10 <sup>-11</sup>	2,40x10 <sup>-11</sup>	2,05x10 <sup>-11</sup>
10	2,70x10 <sup>-11</sup>	2,00x10 <sup>-11</sup>	2,10x10 <sup>-11</sup>	3,05x10 <sup>-11</sup>
15	2,60x10 <sup>-11</sup>	2,15x10 <sup>-11</sup>	2,19x10 <sup>-11</sup>	2,70x10 <sup>-11</sup>
30	2,70x10 <sup>-11</sup>	2,11x10 <sup>-11</sup>	2,17x10 <sup>-11</sup>	2,15x10 <sup>-11</sup>
PBS+glukoza+albumina				
czas pomiaru (min)	0 µl OZ	20 µl OZ	50 µl OZ	100 µl OZ
0	2,50x10 <sup>-11</sup>	2,55x10 <sup>-11</sup>	2,15x10 <sup>-11</sup>	2,18x10 <sup>-11</sup>
5	2,78x10 <sup>-11</sup>	2,35x10 <sup>-11</sup>	2,16x10 <sup>-11</sup>	3,05x10 <sup>-11</sup>
10	2,52x10 <sup>-11</sup>	2,30x10 <sup>-11</sup>	2,19x10 <sup>-11</sup>	2,75x10 <sup>-11</sup>
15	3,02x10 <sup>-11</sup>	2,15x10 <sup>-11</sup>	2,53x10 <sup>-11</sup>	2,15x10 <sup>-11</sup>
30	2,72x10 <sup>-11</sup>	2,48x10 <sup>-11</sup>	2,17x10 <sup>-11</sup>	2,29x10 <sup>-11</sup>

**Badania nad chondrocytami hodowanymi w różnych warunkach tlenowych i ich podatnością na cytotoksyczny wpływ neutrofilów**

Badania nad wpływem niskich (zbliżonych do fizjologicznych) stężeń tlenu prowadzono na hodowlach chondrocytów ekspozowanych na zróżnicowane warunki tlenowe (21% – ciśnienie tlenu atmosferyczne jako kontrola oraz 10, 5 i 2% tlenu).

Wyniki badań nad poziomem aktywności antyoksydantów oraz enzymów inaktywujących AMT w chondrocytach ludzkich po 1. i 2. tyg. hodowli w zróżnicowanych warunkach tlenowych są przedstawione na ryc. 6. Na tej rycinie są zaprezentowane wyniki otrzymane w próbkach od pojedynczego pacjenta (z przeprowa-



● – kontrola/control, ■ – 10<sup>-6</sup> M DOG, ▲ – 10<sup>-5</sup> M DOG

**Ryc. 3.** Wpływ różnych stężeń DOG (2-deoksy-D-glukozy) na wartość CL-lum. neutrofilów izolowanych z krwi i płynu stawowego w czasie do 30 min.

**Fig. 3.** The influence of different DOG (2-deoxy-D-glucose) concentrations on CL-lum values of neutrophils isolated from the blood and the synovial fluid after incubation up to 30 min.

dzonych 5 eksperymentów). W każdym z 5 przypadków procentowe zmiany w poziomie aktywności KAT i SOD były zmienne i nie można było skorelować ich ani ze stężeniem tlenu, ani z czasem trwania eksperymentu.

Badania nad GPx oraz pomiary GPH i GSSG wykazały, że wraz ze zwiększeniem stężenia tlenu zmieniał się zarówno poziom aktywności GPx, jak i ilości GSH oraz GSSG. Poziomy aktywności GPx zwiększały się już przy 5% tlenu i są znamienne podwyższone w hodowlach z wyższymi stężeniami tlenu (10–21%), niezależnie od czasu trwania eksperymentu (do 2 tyg. hodowli).

Poziomy GSH i GSSG znacząco zmieniały się dopiero przy najwyższych stężeniach tlenu (21%). Po tygodniu hodowli poziom GSSG zwiększył się o ok. 30%, natomiast nie było widać różnic w poziomach GSH. Nie zauważono również żadnych dalszych zmian w poziomach GSH po 2 tyg. hodowli w 10% stężeniu tlenu.

W hodowlach prowadzonych w najwyższych ze stosowanych stężeń tlenu (21%) już po tygodniu zauważono bardzo znaczne obniżenie GSH (10-krotne) i 20-krotny wzrost poziomu GSSG, natomiast po 2 tyg. poziom GSSG zwiększył się 30-krotnie (ryc. 6.).

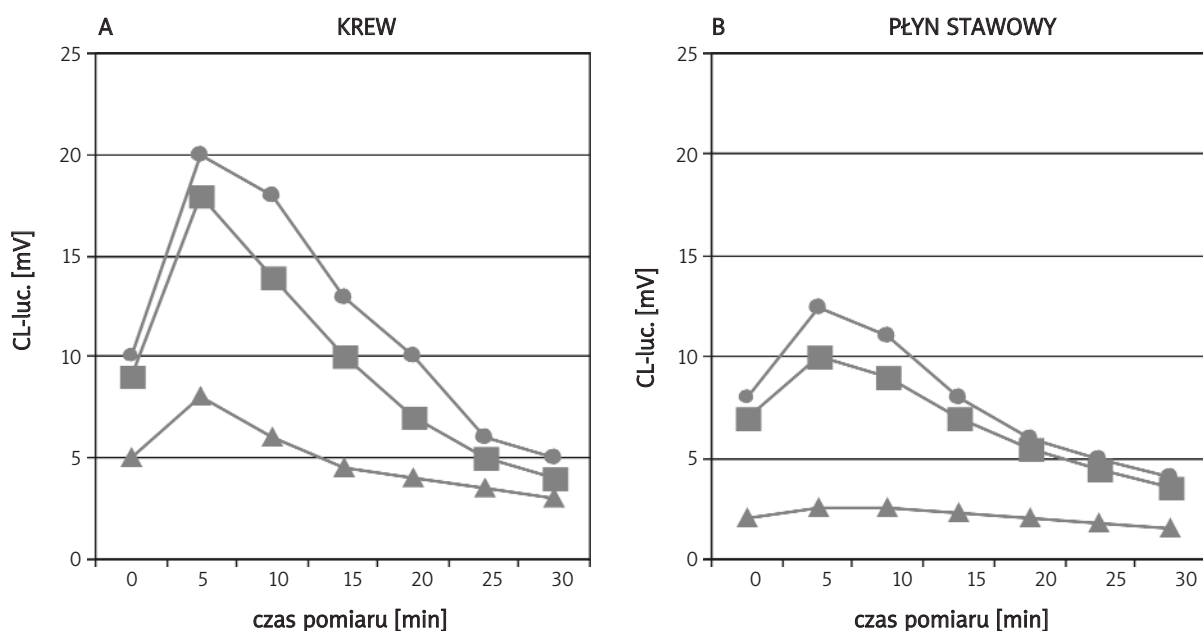
W ostatniej serii eksperymentów badano podatność chondrocytów hodowanych w różnych stężeniach

tlenu (5 vs 21%) na uszkodzające działanie neutrofilów. Eksperymenty wstępne wykazały, że stymulowane OZ odpowiadają z taką samą intensywnością, niezależnie od tego, czy przebywają w środowisku 5% czy 21% tlenu (dane niezamieszczone).

Neutrofile były stymulowane OZ lub SF i inkubowane z hodowlami chondrocytów (po różnym czasie hodowli w zróżnicowanych warunkach tlenowych). Po 24 godz. pobierano płyn z takich wspólnych hodowli i oznaczano w nich poziom uwolnionego ATP oraz poziom LPO (jako markery uszkodzeń). Kontrolą były wspólne hodowle chondrocytów, do których dodawano niestymulowane neutrofile. Wyniki tych eksperymentów (otrzymane z próbek od jednego pacjenta, z przeprowadzonych 7 eksperymentów) są zamieszczone w tab. III.

Neutrofile niestymulowane i eksponowane na chondrocyty (zarówno w 5%, jak i 21% stężeniu tlenu) nie wykazywały znaczącego efektu cytotoksycznego, w próbkach płynu pobranego z takich hodowli nie stwierdzano występowania zauważalnych ilości ATP czy produktów LPO.

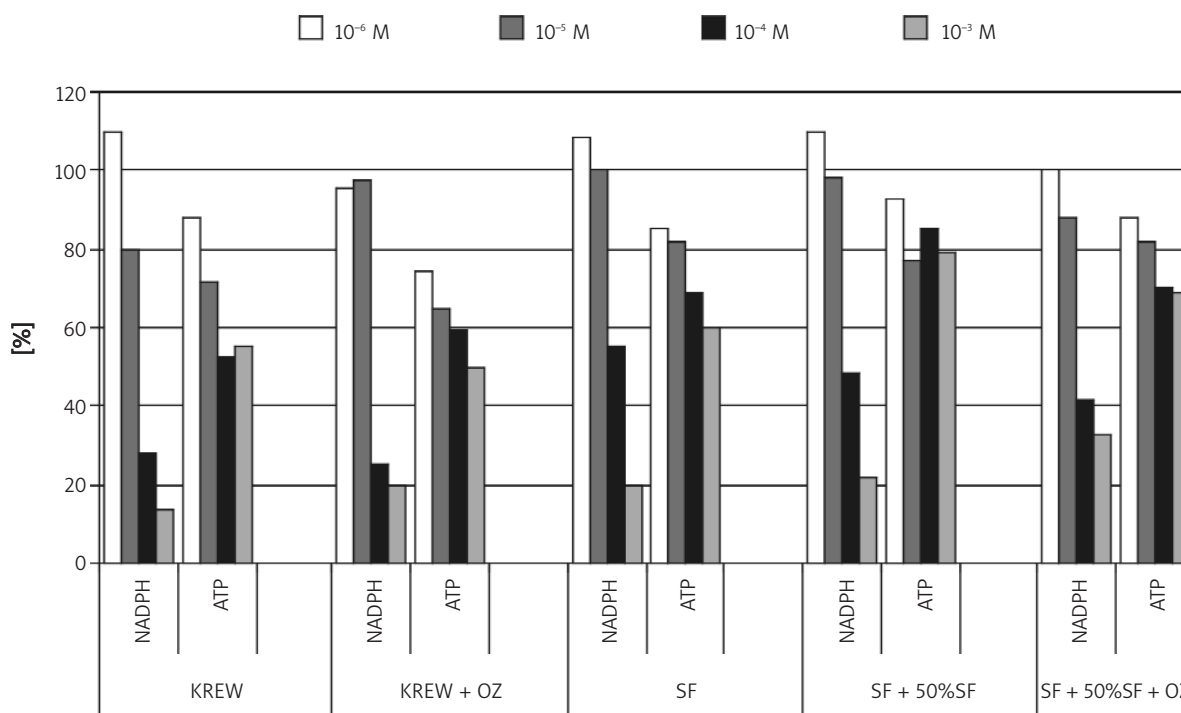
Neutrofile, stymulowane OZ i inkubowane z chondrocytami, oddziałują na nie toksycznie, w zależności od stężenia tlenu, w jakim były hodowane chondrocyty.



● – kontrola/control, ■ – 10<sup>-6</sup> M DOG, ▲ – 10<sup>-5</sup> M DOG

**Ryc. 4.** Wpływ różnych stężeń DOG (2-deoksy-D-glukozy) na wartość CL-luc. neutrofilów izolowanych z krwi i płynu stawowego w czasie do 30 min.

**Fig. 4.** The influence of different DOG (2-deoxy-D-glucose) concentrations on CL-luc values of neutrophils isolated from the blood and the synovial fluid after incubation up to 30 min.



**Ryc. 5.** Wpływ różnych stężeń DOG (2-deoksy-D-glukozy) ( $10^{-6}$ – $10^{-3}$  M) na poziom ATP i NADPH w neutrofilach izolowanych z krwi (KREW), krwi stymulowanej 100  $\mu$ l OZ (KREW+OZ), płynu stawowego (SF), płynu stymulowanego 50% SF (SF+50% SF), płynu stymulowanego 50% SF i 100  $\mu$ l OZ (SF+SF 50%+OZ) w czasie do 30 min.  
**Fig. 5.** The influence of different DOG (2-deoxy-D-glucose) concentrations on ATP and NADPH levels in neutrophils isolated from the blood (KREW), stimulated blood with 100  $\mu$ l OZ (KREW+OZ), synovial fluid (SF), synovial fluid stimulated with 50% SF (SF+50% SF), synovial fluid stimulated with 50% SF and 100  $\mu$ l OZ (SF+50% SF+OZ), after less than 30 min.

Ilość uwalnianego ATP i poziom LPO zależą jednoznacznie od stężenia tlenu i czasu trwania eksperymentu. Po 2 tyg. hodowli chondrocytów w najwyższych stężeniach tlenu (21%) zakres uszkodzeń powodowanych przez neutrofile aktywowane przez 100  $\mu$ l OZ był zdecydowanie większy (tab. III).

Blokowaniu aktywności neutrofilów przez DOG ( $10^{-4}$  M) towarzyszy praktycznie całkowite zahamowanie ich toksycznego oddziaływania na chondrocyty. Poziom uwalnianego ATP i produktów LPO zdecydowanie się obniżał do poziomu praktycznie niewykrywalnego (tab. III).

## Dyskusja

Zapalenie jest dynamicznym i uporządkowanym procesem zachodzącym w żywych tkankach po zadziałaniu bodźca uszkodzającego. Neutrofile są pierwszymi komórkami infiltrującymi jamę stawu, w której może zgromadzić się 30 ml płynu stawowego, a w nim  $5 \times 10^9$  neutrofilów. Mają one największy potencjał toksyczny ze wszystkich komórek infiltrujących jamę stawu, a jednym z najważniejszych mechani-

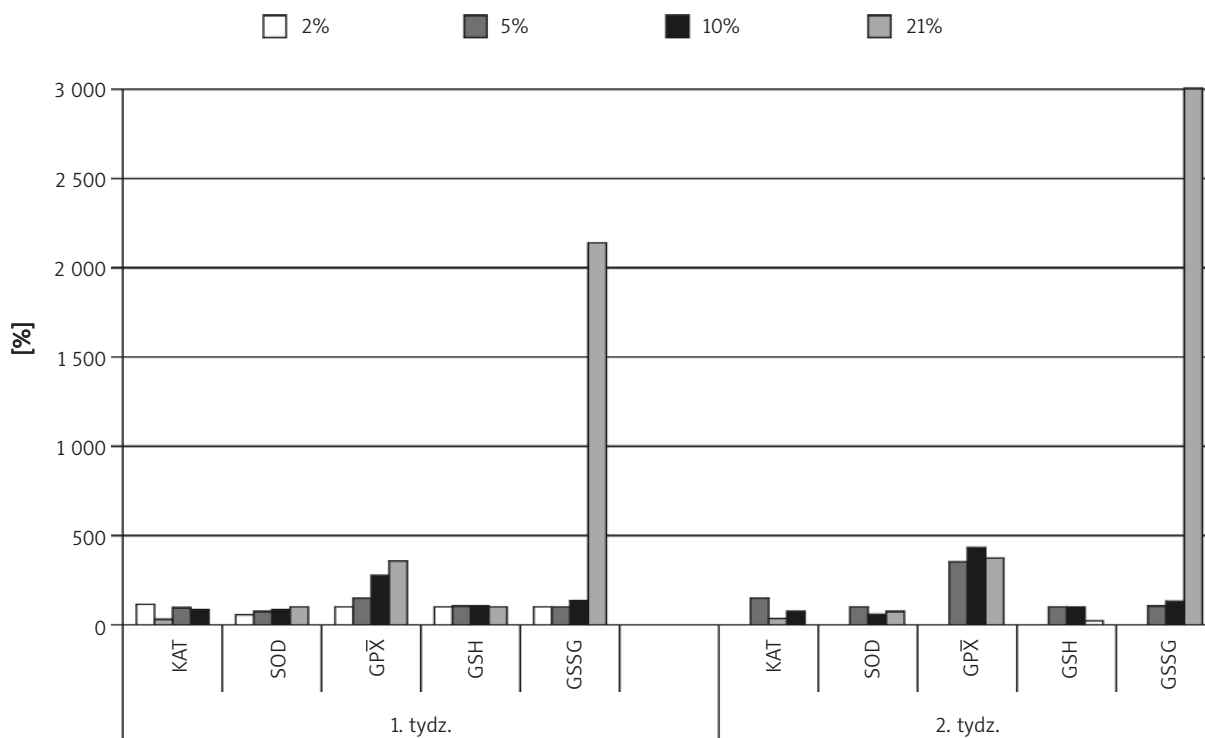
zmów toksycznego oddziaływania jest produkcja i wydzielenie do otoczenia AMT [1, 4].

Niewiele uwagi poświęcono dotychczas badaniom nad relacjami pomiędzy CL a metabolizmem energetycznym neutrofilów, opartym na beztlenowej glikolizie [16, 17]. Poziomy CL (wzmacnianej zarówno przez luminol, jak i lucygeninę) w istotny sposób zależy od obecności glukozy w środowisku, w jej obecności aktywacja neutrofilów jest natychmiastowa, i to znacznie nasiloną. Na tym etapie badań nie było jednakże jasne, czy glukoza zwiększa poziom CL przez podniesienie stanu energii w neutrofilach (ATP), czy następuje to przez zwiększenie produkcji NADPH, komponentu niezbędnego do produkcji i uwalniania AMT, a generowanego przez szlak pento-zofosforanowy (również zależny od glukozy).

Zgodnie z piśmiennictwem światowym relacja pomiędzy CL a poziomem energii jest prosta i bezpośrednia, a aktywacji neutrofilów towarzyszy szybkie zmniejszenie się poziomu ATP [17].

Borregaarg i Herlin [16] podają, iż już 5 min po zaktywowaniu neutrofilów przez OZ można wykazać znaczne obniżenie się poziomu ATP.





**Ryc. 6.** Procentowe zmiany w poziomach antyoksydantów (GSH, GSSG) oraz w aktywnościach enzymów inaktywujących AMT (KAT, SOD, GPx) – chondrocytów ludzkich hodowanych w zmiennych warunkach tlenowych (2–21% tlenu) w czasie 1. i 2. tyg. hodowli. Wszystkie wartości zmierzone w czasie 0 (czas wyjściowy) uznano za 100% (wartości niezamieszczone na rycinie).

**Fig. 6.** Percental changes of antioxidant levels (GSH, GSSG) and the activity of enzymes inactivating Reactive Oxygen Species (KAT, SOD, GPx) in human chondrocytes cultivated in different oxygen conditions (2-21% of oxygen) for a time of 1 and 2 weeks. All values measured at the time of 0 (starting time) were regarded as 100% (not to be found on the figure).

**Tabela III.** Zakres uszkodzeń chondrocytów na podstawie procentowych zmian w wartościach poziomów ATP i produktów LPO hodowanych w środowisku 5% lub 21% tlenu oraz eksponowanych na działanie stymulujące opsonizowanego zymosanu 100 μl OZ lub blokowanie DOG i stymulowanie opsonizowanym zymosanem 100 μl OZ

**Table III.** Range of impairment of chondrocytes cultivated in different oxygen conditions and exposed to the stimulating influence of opsonized zymosan 100 μl OZ or blocked with DOG and stimulated with opsonized zymosan 100 μl OZ basing on the percental changes of ATP and LPO product levels

	1. tydz.				2. tydz.			
	100 μl OZ		DOG+100 μl OZ		100 μl OZ		DOG+100 μl OZ	
zawartość tlenu (%)	5%	21%	5%	21%	5%	21%	5%	21%
LPO (%)	500	1350	250	330	400	2351	250	251
ATP (%)	350	970	300	358	512	2342	258	254

Za 100% poziomu ATP i produktów LPO, hodowanych w tych samych warunkach tlenowych uznano poziom ATP i produktów LPO wykrywany w medium po inkubacji chondrocytów z neutrofilami niestymulowanymi 100 μl OZ

As 100% ATP and LPO product levels cultivated in the same oxygen conditions were regarded ATP and LPO product levels detected in the medium after incubation of the chondrocytes with neutrophils not stimulated with 100 μl OZ

Nasze badania nie potwierdzają tych spostrzeżeń, w czasie trwania *wybuchu oddechowego* (do 30 min) nie zauważono spadku poziomu wolnego ATP, i to w każdym z zastosowanych modeli doświadczalnych – ani w neutrofilach izolowanych z krwi obwodowej (spoczynkowe, stymulowane SF czy OZ), ani w neutrofilach izolowanych z SF i stymulowanych OZ.

Obniżenie poziomu ATP w naszych eksperymentach można zaobserwować dopiero po zastosowaniu 2-dekso-glukozy (DOG), niemetabolizowalnej pochodnej glukozy. Spadek ten był szybki i proporcjonalny do stężenia blokera.

Na tym etapie badań wciąż nie było jasne, czy spadek ten jest wynikiem obniżenia poziomu ATP, czy zahamowania szlaku wytwarzania NADPH. Kinetyka spadku poziomu ATP w neutrofilach eksponowanych na DOG była identyczna, niezależnie od tego, czy neutrofile znajdowały się w stanie spoczynku, czy też były wcześniej zaktywowane. Taki sam spadek poziomu ATP w neutrofilach spoczynkowych i produkujących AMT sugerował, że produkcja AMT nie jest, a przynajmniej nie jest bezpośrednio związana z poziomem wolnego ATP. Dalsze badania wykazały, że DOG powoduje obniżenie poziomu NADPH, i to w stężeniach, w którym jednocześnie obniża znacznie poziom CL.

Można twierdzić, iż DOG obniża poziom CL przez zahamowanie cyklu pentozofosforanowego, a tym samym produkcji NADPH, komponentu niezbędnego w procesie produkcji i uwalniania AMT. Cytotoksyczność neutrofilów zależy więc przede wszystkim od aktywności układów produkujących komponenty systemu generującego AMT, a nie od poziomu ATP. Wydaje się również, że metody hamujące aktywność systemu generującego AMT w neutrofilach mogą w przyszłości być przydatne w ograniczaniu intensywności odczynu zapalnego.

Dalsze badania prowadzono w celu zbadania relacji pomiędzy neutrofilami a hodowanymi komórkami chrząstki. U zwierząt, którym implantuje się własne, hodowane *in vitro* komórki, które następnie są osadzone na biorusztowaniach, zawsze stwierdzaliśmy wystąpienie odczynu zapalnego, czasami znacznego (praca w przygotowaniu).

Opracowania warunków hodowli chondrocytów dokonano po analizie warunków tlenowych, jakim w rzeczywistości są poddane komórki chrząstki (w warstwie zewnętrznej ok. 10% tlenu, w średniej 1–6%, w warstwach głębokich praktycznie 0% tlenu).

Wykazaliśmy, że przy obniżonych stężeniach tlenu zakres stresu oksydacyjnego jest znacząco zmniejszony (poziom antyoksydantów, LPO). Warunki standardowe, w jakich hoduje się komórki (tj. 21% stężenie tlenu), powodują znaczące uszkodzenia komórek (nasiloną LPO, stanu antyoksydantów sugerujący ich wymuszoną

*nadaktywność*, obniżony poziom GSH, bardzo znacznie zwiększony poziom GSSG).

Chociaż żywotność komórek hodowanych w różnych stężeniach tlenu nie różniła się od siebie, to jednak komórki hodowane w warunkach obniżonego stężenia tlenu były znacznie mniej uszkodzone, jeśli uszkodzenia mierzyć parametrami stresu oksydacyjnego.

Dostępne dane na temat relacji pomiędzy CL a poziomem dostępnego tlenu są nieliczne. Edwards i wsp. [18] sugerują prostą zależność – w SF pacjentów z RZS stężenie tlenu pozwala jedynie na znacznie obniżony (ponad 2-krotnie) poziom CL. Davis i wsp. [19] potwierdzają obniżenie produkcji AMT (50% maksymalnej) w zmniejszonym stężeniu tlenu (0–700 Torr), ale dotyczy to jedynie AMT mniej chemicznie stabilnych. Produkty stabilniejsze (oraz produkty końcowe szlaku mieloperoksydazy – MPO, a także chlorowanych pochodnych AMT, takich jak HOCL) w warunkach obniżonego stężenia tlenu były wytwarzane nawet w większych ilościach [6, 10].

Z kolei Sanidas i wsp. [20] zauważyli, że hipoksja indukuje CL ludzkich neutrofilów. Badania prowadzone w warunkach obniżonego stężenia tlenu (z 21 do 6%) wskazują, że w czasie 6–45 min hipoksji produkcja i uwalnianie AMT uległy nasileniu [20].

Niewiele dotychczas prac poświęcono wzajemnym relacjom chondrocytów i aktywującym się przez kontakt z nimi neutrofilom [21–24]. W naszych eksperymentach stosowane stężenia tlenu (5 i 21%) nie wpływały w sposób znaczący na poziom CL neutrofilów stymulowanych OZ. Znamienne były natomiast różnice w poziomie uwalnianego ATP czy produktów LPO. Należy wnioskować, że powyższe różnice wynikają z różnej podatności samych chondrocytów na cytotoksyczny efekt stymulowanych neutrofilów. Poziom uwalnianego ATP i produktów LPO był znacznie wyższy w przypadku chondrocytów hodowanych w warunkach 21% stężenia tlenu. Zablockowaniu szlaku pentozofosforanowego w komórkach neutrofilów przez DOG towarzyszyło praktycznie całkowite zahamowanie procesów destrukcyjnych wobec chondrocytów.

Nieznane są nam prace dotyczące cytotoksycznego wpływu neutrofilów na chondrocyty chrząstki stawowej w zależności od zastosowania tak zróżnicowanych warunków tlenowych.

## Wnioski

1. Proces chemiluminescencji (CL) jest procesem zależnym od glukozy, w jej obecności procesy cytotoksyczne są znacznie nasilone. Intensywność tych procesów zależy od poziomu NADPH tworzonego w szlaku pentozofosforanowym, zależnym od glukozy.

2. Zablokowanie tego szlaku mogłoby być istotnym czynnikiem ograniczającym intensywność odpowiedzi zapalnej.
3. Standardowo prowadzone hodowle komórkowe (21% tlenu) powodują, że hodowane komórki znajdują się w stanie zbyt dużego stężenia tlenu (*hyperoxia*). Świadczy o tym zwiększony poziom markerów stresu oksydacyjnego.
4. Chondrocyty hodowane w warunkach wysokich stężeń tlenu są zdecydowanie bardziej podatne na uszkodzenia ze strony zaktywowanych neutrofilów.

*Praca finansowana z grantu KBN nr 3 PO5A 056 23.*

### Piśmiennictwo

1. Edwards SW, Hallett MB. Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Immunol Today* 1997; 18: 321-4.
2. Allen RC. Halide dependence of the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system of the polymorphonuclear leukocyte in the phenomenon of electronic excitation. *Biochem Biophys Res Commun* 1975; 63: 675-83.
3. Nurcombe HL, Edwards SW. Role of myeloperoxidase in intracellular and extracellular chemiluminescence of neutrophils. *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 56-62.
4. Edmonds SE, Blake DR, Morris CJ, et al. An imaginative approach to synovitis – the role of hypoxic reperfusion damage in arthritis. *J Rheumatol* 1993; 20 (Suppl 37): 26-31.
5. Gajewski M, Wysińska J, Wysiński Ł i wsp. Inżynieria tkankowa w chirurgii rekonstrukcyjnej kości i chrząstki. *Ortop Traumatol Rehab* 2000; 5: 58-65.
6. Gajewski M, Kamińska E, Burakowski T i wsp. Rola tlenu w metabolizmie chrząstki stawowej. *Reumatologia* 2002; 40: 176-87.
7. Pawelek JM. Effects of thyroxine and low level oxygen tension on chondrogenic expression in cell culture. *Dev Biol* 1969; 19: 52-72.
8. Kurz B, Schunke M. Articular chondrocytes and synoviocytes in culture: influence of antioxidants on lipid peroxidation and proliferation. *Ann Anat* 1997; 179: 439-46.
9. Tiku ML, Shah R, Allison GT. Evidence linking chondrocyte lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation. *J Biol Chem* 2000; 275: 20069-76.
10. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for the superoxide dismutases. *J Biol Chem* 1972; 247: 3170-5.
11. Beers RF Jr, Sizer JW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 1952; 195: 133-40.
12. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-69.
13. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochem* 1976; 74: 214-26.
14. Kramer K, Rademaker B, Rosendal WN, et al. Influence of lipid peroxidation on  $\beta$ -adrenoreceptors. *FEBS Lett* 1986; 198: 80-4.
15. James DW, Betts WH, Cleland IG. Chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes from rheumatoid joint. *J Rheumatol* 1983; 10: 184-9.
16. Borregaard N, Herlin T. Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis. *J Clin Invest* 1982; 70: 550-5.
17. Lane TA, Lamkin GE. A reassessment of the energy requirements for neutrophil migration: adenosine triphosphate depletion enhances chemotaxis. *Blood* 1984; 64: 986-93.
18. Edwards SW, Hallett MB, Campbell AK. Oxygen-radical production during inflammation may be limited by oxygen concentration. *Biochem J* 1984; 217: 851-4.
19. Davis WB, Husney RM, Wewers MD, et al. Effect of O<sub>2</sub> partial pressure on the myeloperoxidase pathway of neutrophils. *J Appl Physiol* 1988; 65: 1995-2003.
20. Sanidas D, Garnham A, Mian R. Hypoxia-induced chemiluminescence in human leukocytes; the role of Ca<sup>2+</sup>. *Eur J Pharmacol* 2002; 453: 183-7.
21. Chatham WW, Swaim R, Frohsin H Jr, et al. Degradation of human cartilage by neutrophils in synovial fluid. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 51-8.
22. De Clerk LS, De Gendt CM, Bridts CH, et al. Expression of neutrophil activation markers and neutrophil adhesion to chondrocytes in rheumatoid arthritis patients: relationship with disease activity. *Res Immunol* 1995; 146: 81-7.
23. Mitani Y, Honda A, Jasin HE. Polymorphonuclear leukocyte adhesion to articular cartilage is inhibited by cartilage surface macromolecules. *Rheumatol Int* 2001; 20: 180-5.
24. Moore AR, Iwamura H, Labre JP, et al. Cartilage degradation by polymorphonuclear leukocytes: in vitro assessment of the pathogenic mechanisms. *Ann Rheum Dis* 1993; 52: 27-31.