

A fibroblastok szerepe az implantátumok körüli csontfogyásban

Ph.D. értekezés tézisei

Dr. Koreny Tamás

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Komoly Sámuel DSc.

Programvezető: Prof. Dr. Bellyei Árpád DSc.

Témavezető: Dr. Vermes Csaba PhD.

Pécsi Tudományegyetem

Klinikai Központ

Mozgásszervi Sebészeti Intézet

Traumatológiai és Kézsebészeti Klinikai Tanszék

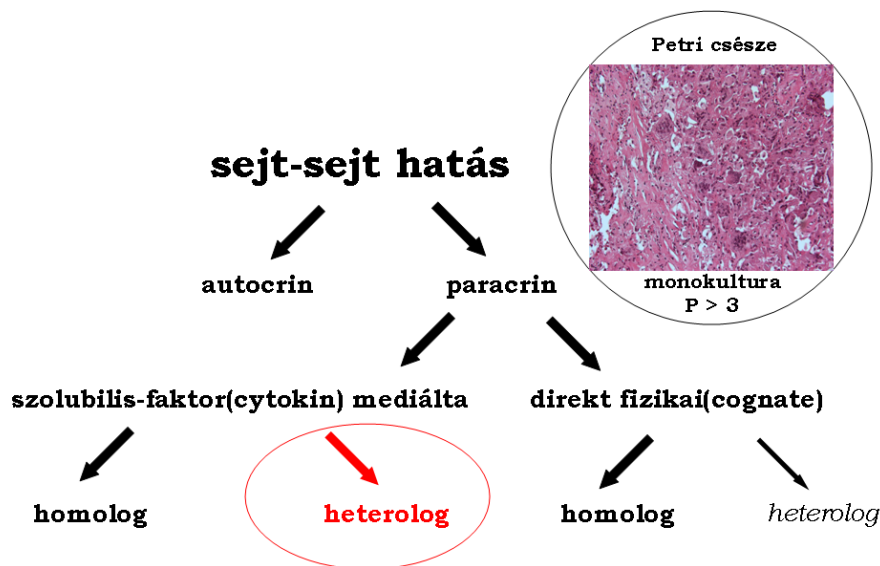
PÉCS

2011

1. BEVEZETÉS

A végtagsebészeti implantátumok környezetében megfigyelhető osteolysis (csontfogyás) jelentős klinikai probléma. A kilazult imlantátumok körül idővel megjelenő osteolysis területén észlelt patológiai elváltozások gyakori eleme a hegszöveteszerű pseudomembrán (interfaciális membrán) kialakulása a csont/implantátum határán. Az interfaciális membrán (IFM) granulomatosus szövet, amely főként fibroblastokból, macrophagokból, és idegentest óriás sejtekből áll.

Általánosan elfogadott, hogy a metallosisból és kopásból származó felületi particulumokat a környező sejtek phagocytálják, ettől aktiválódnak, majd proliferálódnak és gyulladásos mediátorokat termelnek, mint például a TNF- α (tumor necrosis faktor- α), IL-1 β (interleukin-1 β) és az IL-6 (interleukin-6). Végso soron ezek a “csontlebontó” ágensek aktiválják az interfaciális membrán minden sejtípusát paracrin, vagy autocrin módon (**1. ábra**).



1. ábra Az „összes” *in vivo* sejt-sejtaktiváló tényező. A feketével jelöltek megfelelnek a korábbi *in vitro* modelleknek. Fekete+bekarikázott az általunk továbbfejlesztett *in vitro* modellnek felel meg. Fekete+bekarikázott+dőlt felelne meg egy tökéletes modellnek.

Számos tanulmány kimutatta, hogy a macrophagok particulumok phagocytálása során aktiválódnak és olyan gyulladásos cytokineket termelnek, amelyek elősegítik az osteoclastogenesisist és a fokozódó csontlebontást. Az osteoblastok is phagocytálnak particulumokat, amely következtében szignifikánsan megnő a TNF- α (tumor necrosis faktor- α) és IL-6 (interleukin-6) kibocsátásuk, ezzel egyidejűleg jelentősen csökken a procollagen E1[I] termelésük.

Ezekkel szemben a fibroblastok particulumokra adott válaszárol jóval kevesebb információval rendelkezünk annak ellenére, hogy az interfaciális membrán alkotó sejtek többsége fibroblast. Fontos kiindulási pont, hogy a fibroblastok aktiváltsági foka IL-6 (interleukin-6) és MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) termelésük alapján mérhető.

Egy korábbi tanulmányban interfaciális membrán fibroblastokat kisméretű (<3 µm) titánium particulumokkal próbálták aktiválni, mely hatására jelentős collagenase és stromelysin, valamint mérsékelten emelkedett TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) átíródást tudtak elérni. Ezek az eredmények azonos kísérleti körülmények között korreláltak a rheumatoid synoviumból izolált fibroblast tenyészetekben mérhetővel és jelentősen eltértek a normál synoviális fibroblastoknál mértektől. Arra a következtetésre jutottak, hogy a particulumok közvetlenül képesek fibroblastokat aktiválni, és csontlebontó metalloproteinázokat szintetizálni olyan komponensekkel együtt, amelyek gátolják az osteoblastok csontfelépítő funkcióját. Néhány fibroblast eredetű faktornak autocrin hatást, vagy más sejt típusra (macrophag, osteoclast) gyakorolt paracrin hatást is tulajdonítottak implantátum környezetében.

Ugyanakkor valószínű, hogy az interfaciális membrán különféle sejt típusa mind képes particulumot phagocytálva, vagy egyéb módon aktiválódni, számos cytokint, chemokint, valamint növekedési faktort termelni, és általuk paracrin módon a fibroblastok funkcióját befolyásolni.

A korábban használt kísérletes modellekben (cytokinekkal vagy particulumokkal aktivált sejtek) az interfaciális membrán fibroblastok nem tudtak TNF- α (tumor necrosis faktor- α), IL-1 β (interleukin-1 β), TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1), MCP-2 (monocyte chemotactic protein-2), MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α), RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted), vagy PDGF (platelet-derived growth factor) mediátorokat termelni, amiből arra is lehetne következtetni, hogy erre *in vivo* sem képesek. Hipotézisünk szerint azonban a korábban használt *in vitro* modellek nem közelítették meg eléggé a valós körülményeket.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Elsődleges célkitűzésünk volt jobban megismerni az interfaciális membrán legdominánsabb sejttípusának szerepét az implantátum körüli osteolysis pathogenesisében.

Ennek érdekében célul tűztük ki egy olyan *in vitro* modell létrehozását, mely az összes *in vivo* sejtaktiváló tényezőt (**1. ábra**) egyszerre modellezi.

Be kívántuk bizonyítani, hogy a fibroblastok particulumok, vagy egyéb környezeti tényezők hatására a korábbi *in vitro* vizsgálatoknál fokozottabban is képesek aktiválódni, vagy hatékonyabb gyulladásozó cytokineket is termelni.

Igazolni kívántuk, hogy a fibroblastok az implantátumok környezetében fellelhető sejtmediátorok legjelentősebb mennyiségi forrása.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 Particulumok és laborvegyületek

Minden vegyszert a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) vagy a Fisher Scientific (Chicago, IL) cégektől vásároltunk. A kereskedelmi forgalomban kapható tiszta titánium particulumok (<3 µm; Johnson Matthey, Danvers, MA) szennyezettségét tisztítást követő, endotoxin/lipopolysaccharide *Limulus* amoebocyte cell lysate assay (Biowhittaker, Walkersville, MD) segítségével zártuk ki. Szedimentációt követően az átlagos ± SD particulum méret 1.42 ± 0.83 µm volt, 91% kisebb mint 3 µm, és 72% 1 µm-nél is kisebb. Korábbi tanulmányok alapján a 0.075% (volume/volume: v/v) particulum suspensio - megközelítőleg 6x10⁷ particulum/ml – átlagos kezelési mennyiségnek felel meg, ezért alkalmaztunk ennyit a kísérleteink során.

3.2 Páciensek és szövetminták

A humán szövetmintákat nagyizületi protézis beültetés és revízió során, a betegek beleegyezésével nyertük. Normál synoviumot (negatív kontroll) 5 szervdonor (hirtelen, vagy baleseti halál) térd- és bokaizületéből nyertünk (28-62 év) 3-6 órával a halál beállta után. További “normál” synoviumot nyertünk olyan combnyaktörést szenvedett betegekből, akiknél egyértelműen kizárható volt synoviális érintettség, vagy porckárosodás. Összesen 12 normál synoviumot teszteltünk. Pozitív kontrollként 8 ismert rheumatoid arthritises (RA) beteg (47–63 év) térdprotézis beültetése során kivett synoviumot használtunk.

Implantátum körüli interfaciális membránhoz kilazult protézisek (23 csípő és 9 térd) revíziós műtéte során jutottunk, átlagosan 10.1 évvel a primer beültetés után. Ez a csoport 18 férfi és 14 nőbetegből állt, átlagéletkoruk 62.2 (34–91) év volt. A radiológiailag egyértelmű osteolysis mellett a betegek fő panasza a fájdalom, mozgáskorlátozottság és instabilitás volt. A primeren beültetett implantátum típusa, helye, a beültetés módszere és a beültetés oka szándékosan széles skálán mozgott.

3.3 *Ex vivo* szövet explantációs tenyészetek és kondicionált médiumok

A szövetminták a kivételüket követő 5-20 percen belül steril tápoldatban kerültek a laborba. Minden mintából tenyésztettünk explantációs kultúrát, izoláltunk RNS-t és fibroblastot, valamint szövettani vizsgálatot is végeztünk.

Kérdéseink megválaszolására terveztük meg az *ex vivo* szövet explantációs tenyészetet, amelyből a szöveti kondicionált médiumot (CM) nyertük: Megközelítőleg 0.5g synovium, vagy interfaciális membrán került 2.5 ml DMEM (Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium) és FBS (fetal bovine serum) (HyClone, Logan, UT) tápoldatba, amelyet 7 napig 24 óránként cseréltünk. A gyűjtött kondicionált médiumban (CM) mértük a cytokinek mennyiségét és ezzel a médiummal kezeltük a sejteket is. Egyidejűleg inkubált, szövettenyészet nélküli DMEM szolgált nulla kontroll médiumként.

3.4 Fibroblast izolálás

Fibroblastokat friss szövetből és 7 napos szövettenyészetből egyaránt izoláltunk, hogy összehasonlítsuk a mennyiségüket és az életképességüket. Petri-csészében (Ø10-cm Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) DMEM/10% FBS tápoldatban tenyésztettük az adherens sejteket. A fibroblastok mennyisége mintánként eltérő volt, de nem volt különbség az életképes sejtek arányában (85-95% trypan blue teszt szerint) a friss és a tenyésztett mintákat illetően.

Az egyrétegű, összefüggő fibroblast tenyészeteket legalább 5 generáción keresztül szaporítottuk, mielőtt $\sim 0.7 \times 10^6$ sejt/Petri-csésze mennyiségben felhasználtuk a kísérletekhez. A fibroblast fenotípust flow cytometria és immunhistochemia segítségével igazoltuk. A frissen izolált interfaciális membrán fibroblastokban kimutattunk phagocytált particulumot. Az *in vivo* körülményeket *in vitro* modellezve interfaciális membrán fibroblastokat kezeltünk titánium particulummal (0.075%, v/v). Az *in vitro* kezelt fibroblastok is jelentős mennyiségű titánium particulumot phagocytáltak.

3.5 A fibroblastok kezelése kondicionált médium, particulum, vagy mindkettő felhasználásával

A továbbfejlesztett *in vitro* modell lényege a sejtek aktiválása szöveti kondicionált médium és particulum egyidejű adásával.

A fibroblast tenyészeteket DMEM (médium kontroll) vagy CM-IFM (interfaciális membrán kondicionált médium) adásával kezeltük, melyekhez titánium particulumokat adtunk. A kezelt fibroblastokról 6-96 óráig sejt által kondicionált médiumot gyűjtöttünk további vizsgálatok céljára.

Három különböző szövet kondicionált médiumát hasonlítottuk össze cytokin termelésük alapján. A normál synovium negatív, a rheumathoid synovium pozitív kontrollként szolgált.

3.6 *In vitro* osteoclastogenesis vizsgálat

A csontvelőt olyan (28–57 év közötti) betegek csigolyatesteiből nyertük, akiken gerincstabilizáló műtétet hajtottak végre. Az ebből izolált és tenyésztett csontvelő őssejteket alakítottuk osteoclast sejtekké a kísérleteink során. Ennek lényege, hogy az így elkülönített csontvelő őssejteket 10% FBS-t tartalmazó alpha-minimal essential médiumban (GIBCO Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) tenyésztettük 12-24 óráig, majd átranzferáltuk őket olyan edénybe, amelyben interfaciális membrán fibroblastok voltak. Az ily módon együtt tenyésztett sejteket kezeletlenül hagytuk, vagy titánium, TNF- α , illetve CM-IFM (interfaciális membrán kondicionált médium) hozzáadásával kezeltük.

Ezekben a közös tenyészetekben 50 ng/ml recombináns M-CSF (macrophage colony stimulating factor; R&D Systems Minneapolis, MN) 8-14 napi hozzáadásával indukáltunk osteoclastogenesisist. A fibroblastokat CD90, RANKL és TRAP (tartarate-resistant acid phosphatase, Sigma) felismerő festékkel kezeltük. A több magvú (> 4 mag sejtenként) TRAP+ sejteket vettük differenciálódott osteoclastnak. A kezeletlen interfaciális membrán fibroblastok, a csak M-CSF vagy RANKL hozzáadásával kezelt fibroblastok és a csak M-CSF hozzáadásával kezelt csontvelő őssejtek szolgáltak negatív kontrollként. Az M-CSF (50 ng/ml) és RANKL (100 ng/ml; R&D Systems) egyidejű hozzáadásával kezelt csontvelő őssejtek szolgáltak pozitív kontrollként. További fibroblastokat kezeltünk 48 óráig titánium particulummal (0.075% [v/v]) majd frissen izolált csontvelő őssejteket (0.8×10^6 /csésze) és 50 ng/ml M-CSF-t adtunk hozzájuk. Kezeletlen fibroblastok önmagukban, csontvelő őssejtek önmagukban, illetve ezek együtt; M-CSF hozzáadásával, vagy nélküle szolgáltak negatív kontrollként.

3.7 RNS (Ribonukleinsav) izolálás és RPA (RNase protection assay)

Friss és 1 hétig tenyésztett szövetből, valamint 6, 12, 24, 48, 72 óráig kezelt fibroblastokból izoláltunk RNS-t. Az RPA vizsgálathoz 8 µg RNS-t használtunk (Riboquant Multiprobe RNase Protection Assay System BD PharMingen). A vásárolt templatok felhasználásával (BD Bioscience) mértük többek közt a human TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL-4 (interleukin-4), MMP-1 (matrix metalloproteinase-1), IL-1 α (interleukin-1 α), IL-1 β (interleukin-1 β), MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1), TGF β RI (transforming growth factor- β receptor-I), IL-6 (interleukin-6), IL-8 (interleukin-8), VEGF (vascular endothelial growth factor), Cox-1 és Cox-2 (cyclooxygenases), valamint LIF (leukemia inhibitory factor) átíródást. Normalizáló génként ribosomális protein (L32) és glyceraldehyde-6-phosphate dehydrogenase (GAPDH) szolgált.

A mérni kívánt, jelölt ([E-32P]UTP) mRNS (messenger ribonukleinsav) minták eltérő méreteik alapján helyezkedtek el a gélben. A radioaktivitás mértéke az átírt RNS mennyiségét tükrözte (Storm PhosphorImager, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

3.8 Reverse transcription real-time quantitative polymerase chain reaction (QRT-PCR)

Mivel a kísérletek folytatása idején sem RANKL sem OPG nem állt rendelkezésre RPA templaton, ezek mRNS termelődését real-time quantitative PCR (Smart Cycler System Cepheid, Sunnyvale, CA) segítségével mértük. A RANKL-specifikus forward (5'-CGT TGG ATC ACA GCA CAT CAG) és reverse primer (5'-GCT CCT CTT GGC CAG ATC TAA C) volt, az OPG-specifikus forward (5'-GCA GCG GCA CAT TGG AC) és reverse primer (5'-CCC GGT AAG CTT TCC ATC AA) volt. A normalizálást L32 forward (5'-CAA CAT TGG TTA TGG AAG CAA CA) és reverse primer (5'-TGA CGT TGT GGA CCA GGA ACT) felhasználásával végeztük.

Minden kísérletet háromszor, 3 RNS mintából végeztünk el. Ugyanazon mintákat használtuk QRT-PCR mérésnél, mint amiket RPA során.

3.9 Kibocsátott fehérje mérése ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) segítségével

A szöveti és sejti kondicionált médiumokat 6–96 óra között gyűjtöttük. A TNF- α , IL-1 β , MCP-1, IL-6, IL-8, és VEGF meghatározáshoz capture ELISA-t (R&D Systems Minneapolis, MN) használtunk.

3.10 RANKL kimutatás Western blot hybridizáció és flow cytometria segítségével

Annak érdekében, hogy a kibocsátott RANKL fehérjét (a leghatékonyabb osteoclast aktiváló faktor) kimutassuk, a kezelt fibroblastok kondicionált médiumát sodium duodecyl sulfate (SDS)-10% polyacrylamide gélen (PAGE) futtattuk. A nem kibocsátott (feltehetően fibroblast membránhoz kötött) RANKL kimutatása érdekében a sejteket lysis buffer segítségével bontottuk meg. A sejt szuszpenziókat ugyancsak polyacrylamide gélen (PAGE) futtattuk. A fehérjéket anti-RANKL mAb (clone 70513; R&D Systems) vagy nyúl polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, San Diego, CA) segítségével jelöltük. A 24 és 48 kDa méretű fehérjéket recombináns humán RANKL alapján azonosítottuk be.

A flow cytometriához is kezelt és kezeletlen fibroblast tenyészeteket használtunk. A sejteket 10 ng/μl egér anti-humán-RANKL mAb (clone 70513) és biotin-jelölt kecske anti-egér Ig antibody (10 ng/μl; BD Pharmingen) felhasználásával jelöltük meg. A reakció előhívására streptavidin-phicoerythrin (Gibco) alkalmaztunk. A mintákat 2%-os formalinban fixáltuk és FACSCalibur CellQuest software (Becton Dickinson, San Jose, CA) segítségével analizáltuk. A kísérletek során egy IgG1 isotype control mAb szolgált nem specifikus háttérszint mérésre.

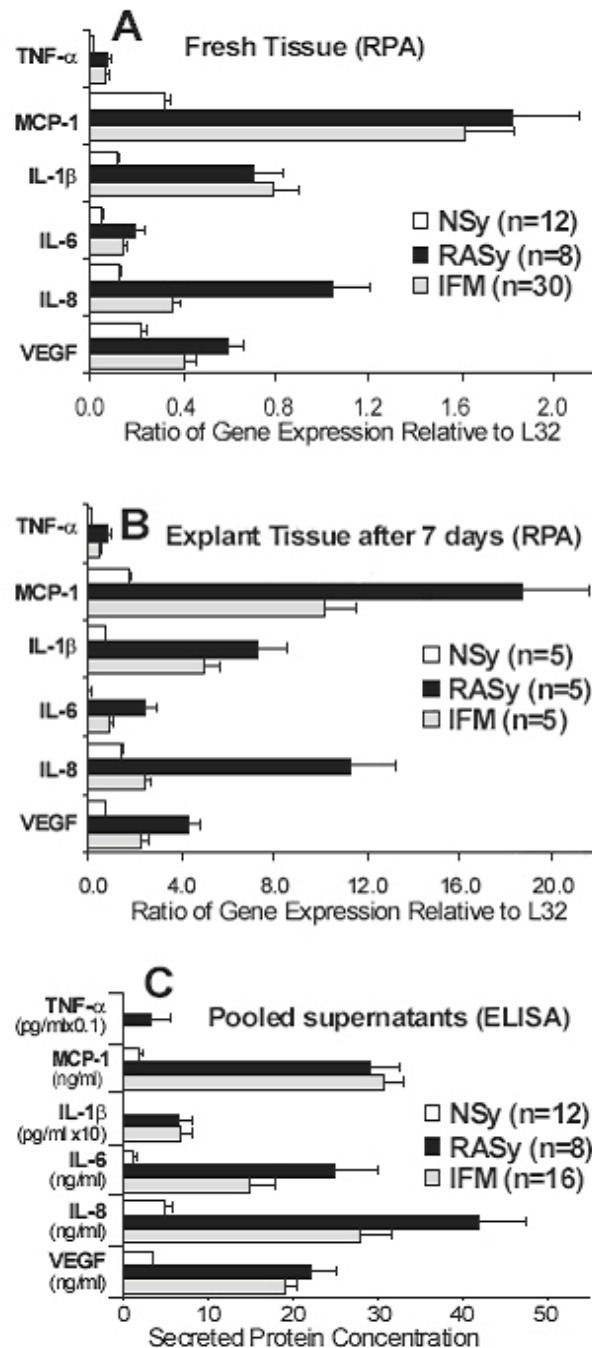
3.11 Statisztikai analízis

A Mann Whitney U tesztet használtuk. A 0.05-nél kisebb P értéket tekintettük szignifikánsnak. Az összes statisztikai analízist az SPSS/PC+ version 10.1 program (SPSS, Chicago, IL) segítségével végeztük.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Csontlebontó faktorok mérése és kiválasztása

Egészséges normál synoviumot és patológiás rheumatoid synoviumot hasonlítottunk interfaciális membránhoz. Bár számos faktort mértünk, itt csak a TNF- α , MCP-1, IL-1 β , IL-6, IL-8 és VEGF mérési eredményeit mutatjuk (2. ábra).



2. ábra Három különböző synoviális szövet cytokin termelése NSy – normál synovium, RASy – rheumatoid synovium, IFM – interfaciális membrán. Frissen izolált (A), vagy 7 napos szövettenyészetben (B) mért mRNS szintek. C – szövettenyészetek által termelt fehérjék szintje a szöveti kondicionált médiumokban.

4.2 Synoviális szövetek és az interfaciális membrán mRNS szintje, valamint ezen szövettenyészetek cytokin/chemokin fehérje kibocsátása a kondicionált médiumba

A normál synovium messenger RNS szintje minden cytokin, chemokin és növekedési faktor tekintetében jóval alacsonyabb volt a patológiás synoviális szövetekénél, akár rheumatoid ízületekből, akár periprotetikus környezetből származtak (**2A ábra**).

Az mRNS-ek szintje a szövettenyészetekben a 7. napig fokozatosan nőtt, (**2B ábra**), ekkorra a mennyiségük 4-10-szer lett nagyobb a friss szövetmintákban mértékhez képest (**2A ábra**). Ezek az eredmények korrelálnak az általuk termelt cytokin, chemokin és növekedési faktor fehérjék mennyiségével is (**2C ábra**).

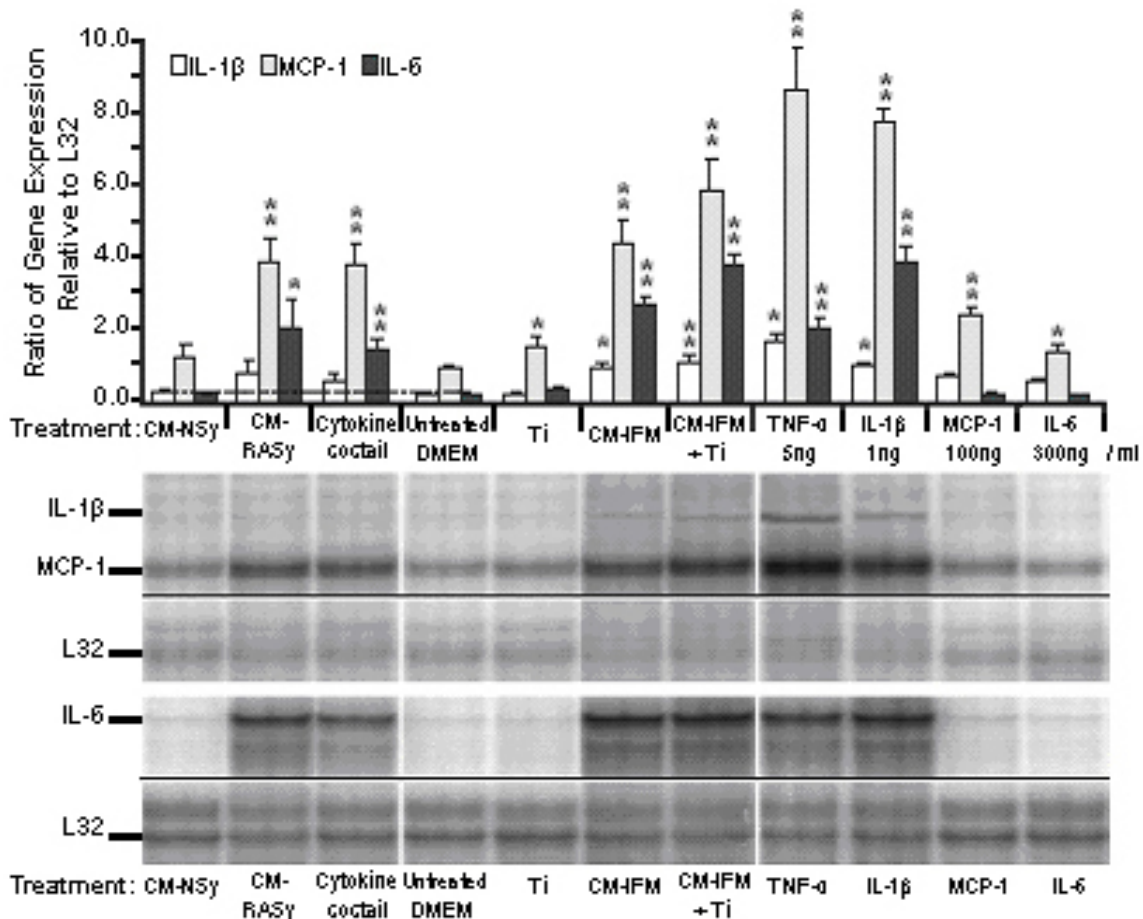
4.3 Fibroblastok és fibroblast aktivációs markerek

Előkísérleteink során különféle szövetek fibroblastjait tesztelve azt tapasztaltuk, hogy az IL-1 β , de főként az MCP-1 és az IL-6 a legérzékenyebb fibroblast aktivációs marker.

Készítettünk egy "cytokin keveréket" (mesterséges pozitív kontroll céljából) 6 ismert cytokin/chemokin interfaciális membránban mért átlagos koncentrációja alapján (**2C ábra**). Ezzel a keverékkel a patológiás szövettenyészetek kondicionált médiumaihoz mérhető IL-6, IL-1 β , és MCP-1 fehérje termelést tudunk provokálni interfaciális membrán fibroblastokban (**3. ábra**).

4.4 Titánium particulum, interfaciális membrán kondicionált médium vagy mindkettő hatásának kitett fibroblastok fokozott mRNS átírása és fehérje termelése

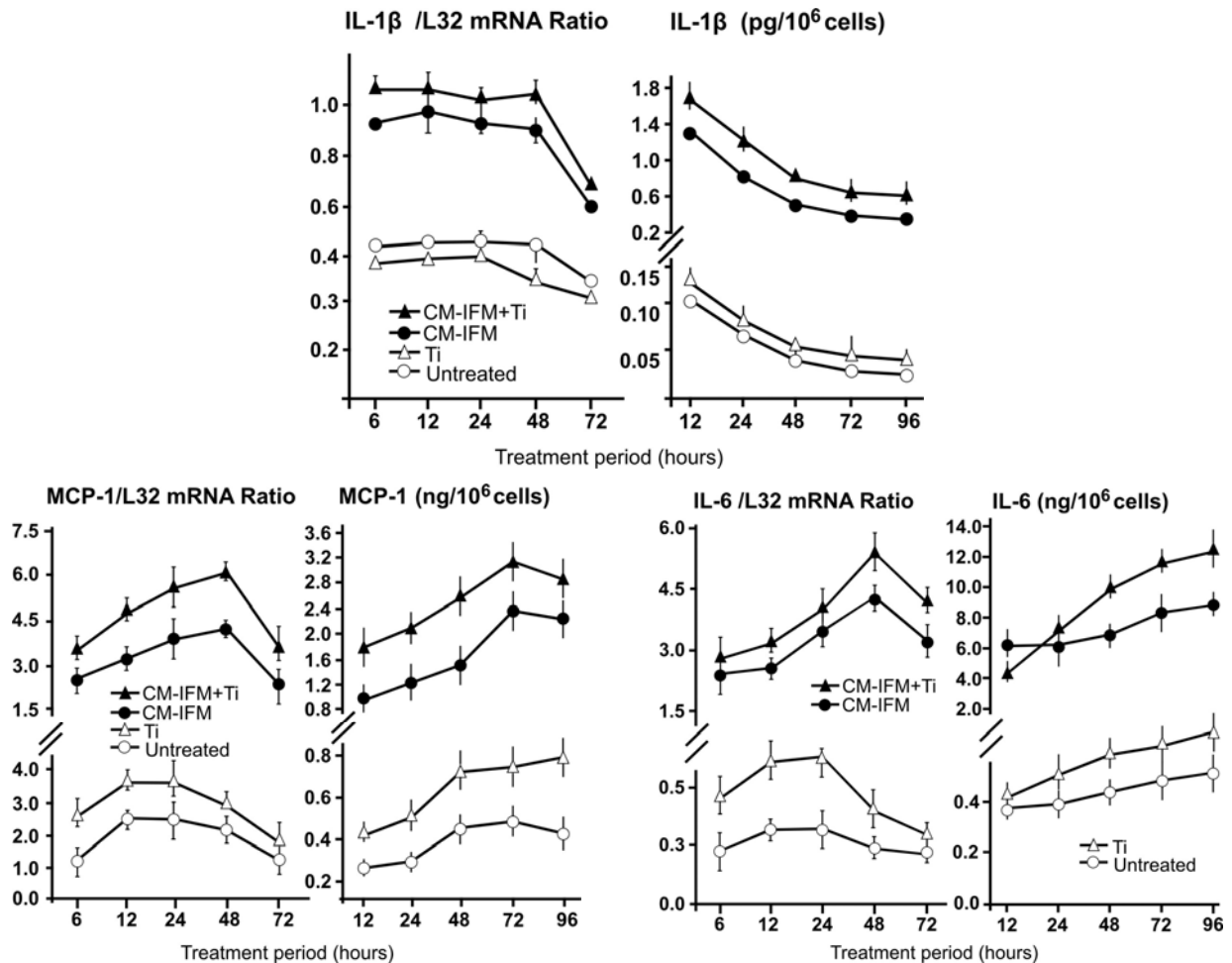
Bemutattuk, hogy a fibroblastok *in vivo* és *in vitro* is képesek kopási particulumokat fagocitálni. Igazoltuk továbbá, hogy a fibroblastok titánium particulumokkal, gyulladáscitokinekkal, és kondicionált médiumokkal is stimulálhatóak (**3. ábra**). A sejtek válasza transcripcionális és translacionális szinten is jelentősnek bizonyult.



3. ábra Interfaciális membrán fibroblastok IL-1 β , MCP-1 és IL-6 mRNS átírása normál synovium (CM-NSy), rheumatoid synovium (CM-RASy), és interfaciális membrán (CM-IFM) szövettenyésztési kondicionált médiumok, valamint “cytokin keverék”, titánium particulum, TNF- α , IL-1 β , MCP-1 és IL-6 kezelés hatására.

Ezek után azt vizsgáltuk, hogy (1) mi a különbség a titánium-indukálta és a kondicionált médium-indukálta gén expresszió között, (2) mekkora a szintje és milyen az időbeli lefutása a titánium-indukálta és a kondicionált médium-indukálta gén expresszióknak, valamint (3) mely csontlebontható faktorokat kódoló gének átírása növekszik meg jelentősen titánium particulumok, vagy szöveti kondicionált médiumok hatására. A méréseket kezeletlen, interfaciális membrán kondicionált médiummal és/vagy 0.075% (v/v) titánium particulummal kezelt interfaciális membrán fibroblastokon végezzük. A titánium particulumoknak önmagukban csekély hatása volt a vizsgált gének expressziójára. Az interfaciális membrán kondicionált médiummal kezelt sejtekben az MCP-1, IL-6, IL-8, TGF β 1, VEGF, Cox-1, és Cox-2 gének átíródása volt a legkifejezettebb. Ezen gének expressziója kombinált kezelés (Ti+CM-IFM) hatására még tovább növekedett. A titánium particulum és interfaciális membrán kondicionált médium együttadása additív vagy szinergista hatással volt az MCP-1, IL-8, Cox-2, IL-6 és LIF átírásra, melyek jól ismert osteoclast érést és aktiválást elősegítő faktorok.

Az interfaciális membrán fibroblastok dózis-függően és idő-függően is reagáltak a kezelésekre. A három kiválasztott fibroblast aktivációs marker (IL-1 β , MCP-1 és IL-6) a legmagasabb mRNS szintet 12-48 órával a kezelés után érte el, míg a legmagasabb kibocsátott fehérje szint (az IL-1 β kivételével) 72-96 óra múlva volt mérhető a fibroblastok környezetében (4. ábra).



4. ábra Az interfaciális membrán fibroblastok titánium particulum (0.075% [v/v]), vagy interfaciális membrán kondicionált médium (CM-IFM) kezelésre, továbbá ezek kombinációjára adott idő-függő válasza.

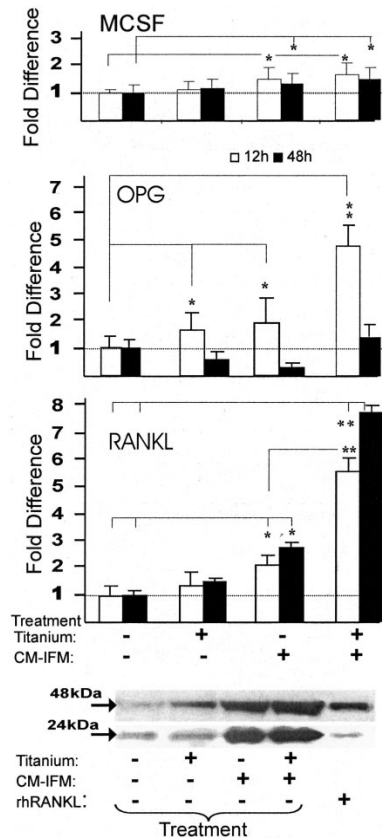
A bal oldali görbék az mRNS expresszió mértékét, a jobb oldali görbék a hozzájuk tartozó szekretált protein mennyiségét mutatják IL-1 β , MCP-1 és IL-6 tekintetében.

Figyelemre méltó, hogy a fibroblastok nanogram mennyiségben is képesek MCP-1 és IL-6 proteinek termelni!

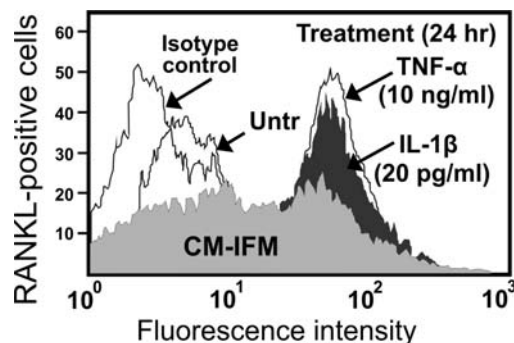
4.5 Interfaciális membrán fibroblastok M-CSF, OPG és RANKL expressziója

Az interfaciális membrán fibroblastok jelentős mennyiségű VEGF, M-CSF, OPG és RANKL mRNS-t expresszálnak interfaciális membrán kondicionált médium kezelés hatására titánium particulum jelenlétében, és valamivel kevesebbet utóbbi nélkül. Ezek a sejtek spontán is szekretálják a RANKL solubilis (24 kDa) formáját, és termelik a membránhoz kötött (48 kDa) formáját is, méginkább kezelés hatására. Fontos, hogy míg az OPG expresszió 12 órával a kezelés után elért maximumot követően szignifikánsan csökkent, addig a RANKL expresszió folyamatosan, idő-függően növekedett.

Tehát a proinflammatorikus cytokinekkal aktivált fibroblastok nagy mennyiségben termelték a legfontosabb osteoclastogenezist indukáló faktorokat (M-CSF és RANKL) és ezek kibocsátási szintje még tovább emelkedett titánium particulum jelenlétében. Az interfaciális membrán kondicionált médium kombinációban adva titánium particulummal szinergista hatással volt a RANKL expresszióra (5. ábra).



5. ábra Interfaciális membrán fibroblastok M-CSF, osteoprotegerin (OPG), és RANKL expressziója 12 vagy 48 órás titánium particulum és/vagy interfaciális membrán kondicionált médium (CM-IFM) kezelést követően. A Western blot panelek a médiumba szekretált/shedált (24-kDa), és a sejtmembránhoz-kötött (48-kDa) RANKL formát is mutatják. Pozitív kontrollként recombináns human RANKL proteint használtunk.



6. ábra Interfaciális membrán fibroblastok RANKL expressziója 24 órás TNF-α, IL-1β, vagy interfaciális membrán kondicionált médium (CM-IFM) kezelést követően. Az áramlási cytometria a kezelést követően egér anti-human monoclonális antitesttel jelölt interfaciális membrán fibroblastok RANKL expresszióját mutatja.

Mivel az OPG és a RANKL az interfaciális membrán kondicionált médiumban mérhető volt, továbbá az interfaciális membrán különböző sejttípusaiban egyaránt kimutatható volt, kíváncsiak voltunk az interfaciális membrán fibroblastok RANKL termelő kapacitására. Ennek érdekében a sejteket kondicionált médium, IL-1 β vagy TNF- α kezelésnek tettük ki, majd a RANKL expressziót áramlási cytometriával mértük (**6. ábra**).

4.6 Osteoclastogenezis előidézés fibroblastok segítségével M-CSF jelenlétében

Létrehoztunk egy olyan közös sejtenyészetet, mely humán interfaciális membrán fibroblastokból és csontvelő őssejtekből állt. Ezek a csontvelőből származó őssejtek többmagvú TRAP+ sejtekké differenciálódtak M-CSF és RANKL jelenlétében, de csak akkor, ha mindkettő egyszerre jelen volt. Hasonló képpen, a titániummal kezelt humán interfaciális membrán fibroblastok (M-CSF jelenlétében) a csontvelőből származó őssejteket többmagvú TRAP+ sejtekké differenciálták. Azonban az őssejtek kezeletlen fibroblastokkal együtt tenyésztve, vagy M-CSF hiányában soha nem differenciálódtak többmagvú TRAP+ sejtekké. Tehát a megfelelő cytokinnel, vagy partikulummal aktivált interfaciális membrán fibroblastok folyamatos RANKL termelése M-CSF jelenlétében osteoclastogenezist eredményezett.

5. MEGBESZÉLÉS

Az implantátumok körüli hegyszövet (interfaciális membrán) mintegy 30%-a fibroblastból áll, és ezek a sejtek proliferálnak legintenzívebben az interfaciális membránban, mely aktivált állapotukat igazolja. Az implantátumok körüli hegyszövetben zajló magas fibroblast proliferáció aktív szövet remodellációra utal, mely folyamat során hegyszövet foglalja el az implantátum körül lebontott csontszövet helyét. Ebben a sajátos környezetben a kopási particulumok és a különféle sejt-sejthatások folyamatos szöveti aktivációs szintet tartanak fenn klinikailag kimutatható implantátum körüli csontfogyást okozva, ami az ízületi implantátumok kilazulását és elégtelenségét eredményezi. Kimutattuk, hogy az interfaciális membránban a macrophágok mellett a fibroblastok aktiválódása is része a természetes folyamatnak. Az aktivált fibroblastok osteoclastogenezist és következményes csont resorpciót generálnak, mely miatt jelentőségük - mennyiségileg biztosan, de aligha nem vezérlő szerepük miatt is - vetekszik a macrophágokéval. Bizonyíthatóan számos, az interfaciális membránban fellelhető indirekt (osteoclastogénikus) faktor és direkt csontbontó metalloproteináz aktivált fibroblastokból származik. A szöveti metalloproteináz gátlók alacsony szintje, valamint az osteoblast funkció gátlása mind arra utal, hogy a fibroblastoknak kulcsszerepe van az implantátumok körüli csontfogyásban.

2. ÚJ EREDMÉNYEK

Igazoltuk, hogy az interfaciális membrán sejtjei által kibocsátott gyulladásos cytokinek és/vagy kopási particulumok hatására aktiválódott fibroblastok számos, nagy mennyiségű chemokint szekretálva toborozzák a myeloid sejt vonal elemeit.

Bebizonyítottuk, hogy a humán fibroblastok aktív részvevői az implantátum körüli csontfogyásnak, mivel gátolják az osteoblast funkciót, csontlebontó enzimeket termelnek, valamint direkt és indirekt módon is hozzájárulnak a csontbontó macrophagok toborzásában és a többmagvú osteoclastok differenciálódásában.

Demonstráltuk, hogy a stimulált RANKL+ fibroblastok csontvelői őssejtekkel együtt tenyésztve osteoclastogenezist indukáltak.

Annak érdekében, hogy az *in vivo* körülményeket minél jobban reprodukáljuk, létrehoztunk egy olyan *in vitro* modellt, mely az összes *in vivo* sejtaktiváló tényezőt *egyszerre* modellezi. Ennek lényege, hogy az implantátumok körüli szövetekben fellelhető méretű kopási particulumok és a protézisek környezetéből származó szövettenyésztési kondicionált médiumok együttadásával kezeljük a humán sejteket.

Megmutattuk, hogy az interfaciális membrán fibroblastjai *in vivo* és *in vitro* is képesek particulumokat phagocytálni. A fibroblastok particulumokkal, gyulladásos cytokinokkal és szöveti kondicionált médiumokkal is stimulálhatók. A válasz mind transcripcionális mind translacionális szinten mérhető.

Azt találtuk, hogy az MCP-1 legalább olyan jó fibroblast aktivációs marker mint az IL-6, ezek proteinjeiből az általunk továbbfejlesztett *in vitro* modellben a fibroblastok nanogramnyi mennyiségeket termeltek.

A korábban alkalmazott *in vitro* modellek eredményeivel ellentétben, a kombinációs kezelésben részesült fibroblastok képesek voltak többek közt IL-1 β és TGF- β 1 kibocsátásra is.

Számos osteoclastogénikus faktor többlet expresszióját mutattuk ki. A legjelentősebb felregulált gének és kibocsátott fehérjék a következők voltak: matrix metalloproteinase-1, MCP-1, IL-1 β , IL-6, IL-8, Cox-1, Cox-2, LIF, TGF- β 1, TGF β receptor-I, RANKL, OPG és VEGF.

A kombinált kezelés - titánium particulumok és szöveti kondicionált médiumok együtt adása - legalább additív, de sok esetben szinergista hatást kifejtve, nanogramnyi mennyiségű osteoclast érlelő és aktiváló faktor termeléséhez vezetett.