

# Uszkodzenia i regeneracja nabłonka górnych i dolnych dróg oddechowych – walidacja doświadczalnych metod oceny

## Wound repair and regeneration of upper and lower airway epithelium – validation of experimental methodology

ANNA LEWANDOWSKA-POLAK<sup>1</sup>, MARZANNA JARZĘBSKA<sup>1</sup>, MAŁGORZATA BRAUNCAJS<sup>2</sup>,  
JANINA GRZEGORCZYK<sup>2</sup>, MAREK L. KOWALSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinika Immunologii, Reumatologii i Alergii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>2</sup> Zakład Mikrobiologii i Laboratoryjnej Immunologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Praca finansowana przez Narodowe Centrum Nauki, Opus Grant, No 2012/05/B/NZ5/01859

### Streszczenie

**Wstęp.** Nabłonek dróg oddechowych stanowi barierę mechaniczną, pełniąc istotną rolę w odporności przeciwzakaznej, ale także w patofizjologii astmy oskrzelowej. Może ulegać uszkodzeniu pod wpływem działania czynników zewnętrznych takich jak bakterie, wirusy, czynniki drażniące.

**Cel pracy.** Celem badania było opracowanie i wystandaryzowanie doświadczalnego modelu uszkodzenia i metod oceny naprawy uszkodzonych komórek nabłonka górnych i dolnych dróg oddechowych.

**Materiał i metody.** Do badania wykorzystano dostępne komercyjnie linie komórkowe nabłonka górnych (RPMI 2650) i dolnych (BEAS-2B) dróg oddechowych. Komórki nabłonka dróg oddechowych hodowane do zlewności uszkodzono mechanicznie, i oceniano naprawę poprzez pomiar zregenerowanej powierzchni. Jednocześnie oceniano uszkodzenia połączeń ścisłych i regenerację wykonując pomiary śródnabłonkowej oporności (TER).

**Wyniki.** Komórki nabłonka górnych dróg oddechowych (RPMI2650) ulegały regeneracji średnio po 5±1 dniach, a w hodowlach komórek dolnych dróg oddechowych całkowitą regenerację uszkodzenia stwierdzano po średnio 24±2 godzinach. Uszkodzenie komórek linii RPMI 2650 ulegało naprawie w około 50% po 72 godzinach a do pełnej regeneracji potrzeba było 120 godzin. Komórki linii dolnych dróg oddechowych ulegały regeneracji znacznie szybciej i ponad 50% powierzchni ulegało naprawie już po 6 godzinach od uszkodzenia a do pełnej regeneracji dochodziło po 24 godzinach. Podczas regeneracji komórek stwierdzano wzrost wartości TER.

**Wnioski.** Opracowany model in vitro umożliwia prowadzenie badań nad identyfikacją czynników, które mogą modulować regenerację nabłonka dróg oddechowych.

**Słowa kluczowe:** nabłonek dróg oddechowych, regeneracja uszkodzenia

### Summary

**Introduction.** Airway epithelium is a mechanical barrier playing a protective role in anti-infectious immunity but also in pathophysiology of bronchial asthma. The epithelium can be damaged by endogenous or environmental factors.

**Aim.** The aim of this study was to develop and standardize experimental model of the epithelial damage and assess the repair of epithelial cells of the upper and lower respiratory tract.

**Material and methods.** Cell lines of epithelial upper (RPMI 2650) and lower airway (BEAS-2B) were employed in this study. The cells were cultured to confluence, damaged mechanically and the repair was evaluated by calculating the percentage of regenerated surface. Simultaneously the assessment of damage and regeneration of tight junction by measuring intraepithelial resistance (TER) was performed.

**Results.** Epithelial cells of the upper respiratory tract (RPMI 2650) underwent regeneration on average after 5±1 days and in cell cultures of lower respiratory tract complete regeneration of the damage was observed after 24±2 hours. The damage of RPMI 2650 cells took 72 hours to repair in 50% and full recovery was observed after 120 hours. Epithelial cells of the lower respiratory tract were much faster to regenerate and 50% of the damaged surface was regenerated within 6 hours from injury and complete recovery took 24 hours. During the regeneration of the cells the increase in the TER was observed.

**Conclusions.** The in vitro model of epithelial damage and repair is suitable for assessment of endogenous and environmental factors affecting regeneration of the respiratory epithelium.

**Keywords:** airway epithelium, wound repair

© *Alergia Astma Immunologia* 2016, 21 (3): 162-168

www.alergia-astma-immunologia.pl

Przyjęto do druku:

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Anna Lewandowska-Polak

Klinika Immunologii, Reumatologii i Alergii UM w Łodzi

ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź

tel. +48 42 6757309, fax +48 42 6782292

e-mail: anna.lewandowska-polak@umed.lodz.pl,

anlewa@csk.umed.lodz.pl

## WSTĘP

Nabłonek dróg oddechowych stanowi barierę mechaniczną pełniącą rolę obronną w odporności przeciwzakaznej. Jest zbudowany z komórek przylegających ściśle do siebie i jako bariera poddawany jest działaniu czynników zewnętrznych takich jak drobnoustroje oraz czynniki drażniące. Nabłonek dróg oddechowych jest nie tylko barierą mechaniczną, ale również źródłem cytokin i mediatorów pełniących rolę ochronną i uczestniczących w procesie zapalnym.

Większość badań w modelach doświadczalnych i klinicznych dotyczy znaczenia alergii w rozwoju astmy i zapalenia w drogach oddechowych. Jednakże zapalenie jest stwierdzane również u osób, które alergii nie mają. Zgodnie ze współczesnymi koncepcjami, w patogenezie astmy oskrzelowej należy uwzględnić defekt barierowej funkcji nabłonka [1-5]. Wykazano, że utrzymująca się wrażliwość nabłonka na czynniki środowiskowe takie jak wirusy, alergeny i zanieczyszczenia oraz nieprawidłowa regeneracja prowadzi do przetrwania zapalenia i przebudowy oskrzeli [6-9]. Badania regeneracji nabłonka dróg oddechowych mogą przyczynić się do zrozumienia początku, utrzymywania się i progresji astmy oraz przewlekłego zapalenia błony śluzowej nosa i zatok oraz wyjaśnienia dlaczego leczenie przeciwzapalne nie wpływa na historię naturalną tych chorób. Proces uszkodzenia i naprawy może być również obserwowany w błonie śluzowej górnych dróg oddechowych pacjentów chorych na przewlekłe zapalenie błony śluzowej nosa i zatok, które często współistnieje z astmą, jest zatem istotne porównanie mechanizmów naprawy w nabłonku górnych i dolnych dróg oddechowych.

Hodowla *in vitro* ludzkiego nabłonka dróg oddechowych stanowi użyteczny model doświadczalny, który może znajdować zastosowanie w badaniach patofizjologii komórek nabłonkowych. Umożliwia ponadto badanie zachowania komórek nabłonka w odniesieniu do ich funkcji barierowej, powstawania połączeń między komórkami, oddziaływań nabłonek-mezenchyma i odbudowy połączeń ścisłych po uszkodzeniu. W modelach eksperymentalnych wykorzystywane są hodowle pierwotne, w których komórki uzyskiwane są od osób zdrowych i chorych i następnie namnażane w warunkach *in vitro* na powierzchni naczynia hodowlanego lub w zawieszinie płynu odżywczego lub linie komórkowe, które w odróżnieniu od komórek izolowanych z organizmu zostały zmodyfikowane celem uzyskania większej odporności na czynniki zewnętrzne przy zachowaniu ich właściwości biologicznych.

Badanie podjęto w celu zwalidowania modelu uszkodzenia oraz metod oceny naprawy komórek nabłonka, możliwego do wykorzystania do badania wpływu czynników zewnętrznych na regenerację nabłonka.

## MATERIAŁ I METODY

### Hodowle komórkowe

W badaniu zastosowano dostępne komercyjnie linie komórkowe nabłonka górnych dróg oddechowych i oskrzeli. Do badania nabłonka górnych dróg oddechowych zastosowano linię RPMI 2650 (jest to linia wyprowadzona w 1962 r. z raka płaskonabłonkowego przegrody nosa, dostarczona przez *American Type Culture Collection*, ATCC, Manassas, VA, USA). Komórki hodowano w podłożu EMEM (Sigma, St. Louis, MO, USA) uzupełnionym 2 mM L-glutaminą (Sigma), 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS, Invitrogen, Life

Technologies, CA USA), antybiotykami: penicyliną 100 µg/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA), streptomycyną 100 µg/ml (Sigma) i amfoterycyną B 2,5 mg/ml (Sigma) w temperaturze 37°C w inkubatorze z dodatkiem 5% CO<sub>2</sub> w powietrzu. Komórki hodowano w butelkach 25 i 75 cm<sup>2</sup> (Becton Dickinson Ltd, Oxford, U.K) do 90% zlewności. Podłoże hodowlane zmieniano co 48 godzin.

Komórki nabłonka dolnych dróg oddechowych linii BE-AS-2B (ludzki nabłonek oskrzeli unieśmiertelniony adenowirusem 12-SV40 (Ad12SV40) i klonowany; dostawca ATCC, Manassas, VA, USA) hodowano w podłożu EMEM (Sigma) uzupełnionym 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS, Invitrogen) i antybiotykami: penicyliną 100 µg/ml (Sigma) i streptomycyną 100 µg/ml (Sigma) w temperaturze 37°C w inkubatorze z dodatkiem 5% CO<sub>2</sub>. Komórki wysiewano do butelek 25 i 75 cm<sup>2</sup> (Becton Dickinson Ltd.) i hodowano do 90% zlewności.

Po uzyskaniu zlewnego wzrostu komórki RPMI 2650 i BEAS-2B pasażowano na płytce Petriego o średnicy 35 mm z 2 mm siatką ułatwiającą analizę wizualną i pomiar uszkodzenia i regeneracji. Komórki hodowano przez 48 godzin, a następnie oceniano zlewny wzrost pod mikroskopem. Część komórek hodowano w systemie powietrze-płyn (*air-liquid interface*, ALI), wykonując pomiary śródnabłonkowej oporności elektrycznej (TER).

### Model uszkodzenia i ocena regeneracji

Po uzyskaniu zlewnego wzrostu, hodowle uszkodzono mechanicznie – zdrapując warstwę komórek równolegle i prostopadle do pionowych linii siatki za pomocą sterylnej końcówki pipety (10–200 µl) P100. Hodowle przepłukiwano w celu usunięcia odklejonych komórek i dodawano świeże podłoże hodowlane. Na każdej płytce wykonywano po 4 linie i oceniano regenerację w kilku punktach czasowych zawsze w tych samych zidentyfikowanych kwadratach siatki. Hodowle obserwowano i oceniono naprawę w czasie: 3, 6, 9, 12 i 24 godzin oraz po 1, 2, 3, 4, 5 i 6 dniach od uszkodzenia. Do oceny naprawy zastosowano mikroskop z kontrastem fazowym Olympus CK2 (Olympus Optical, Middlesex, UK), wyposażony w kamerę cyfrową 3040Z oraz system do wizualnej analizy obrazu CellSens Standard (Olympus Optical, Middlesex, UK). Dokonywano pomiaru pola powierzchni uszkodzenia i oceniano naprawę wyliczając procent regeneracji ze wzoru wg Koff i wsp. [10]: (początkowe pole powierzchni uszkodzenia – pole powierzchni uszkodzenia w określonym punkcie czasowym) / początkowe pole powierzchni uszkodzenia x 100 = % regeneracji uszkodzonego nabłonka.

### Pomiar nabłonkowego oporu elektrycznego (*Transepithelial Electrical Resistance*, TER)

Do doświadczeń z pomiarem nabłonkowego oporu elektrycznego wykorzystywano komórki hodowane na powierzchni insertów zanurzonych w studzienkach na płytkach wielodołkowych. Do hodowli stosowano inserty PTFE o średnicy porów 0,4 µm (system Transwell inserts firmy Corning Costar Corporation, Cambridge, MA). Komórki linii RPMI 2650 wysiewano do insertów pokrytych kolagenem i hodowano zanurzone w podłożu przez 8 dni, wykonując pomiary TER, następnie usuwano płyn z insertu i komórki hodowano w warunkach powietrze-płyn przez kolejne 8 dni mierząc TER. Następnie wykonywano uszkodzenie w insercie i wykonywano pomiar TER po uszkodzeniu. Po

miary śródnabłonkowej oporności (TER) wykonywano przy użyciu urządzenia Millicel ERS-2 Volt – Ohm Meter, Merck Millipore, Darmstadt, Niemcy).

Powstawanie warstwy komórek na insercie obserwowano w mikroskopie z kontrastem fazowym. Przed obserwacją pod mikroskopem komórki przepłukiwano roztworem PBS (Sigma). Przed każdym pomiarem TER w hodowlach powietrze-płyn uzupełniano podłoże na płytkach hodowlanych dodając 0,5 ml do górnej studzienki – na insert i 1,5 ml do dolnej studzienki.

### Monitorowanie oporności elektrycznej komórek w czasie rzeczywistym przy zastosowaniu systemu RTCA-DP xCELLigence (Roche Applied Science, USA)

System RTCA-DP xCELLigence wykonuje pomiary oporności elektrycznej komórek wysianych na płytce wielodołkowej, w których dnie znajdują się mikroelektrody. Odczyt oporności jest wyrażany jako indeks komórkowy (CI, *cell index*) i odzwierciedla zmiany we właściwościach barierowych monowarstwy komórek, zmianę przepuszczalności monowarstwy i zmianę liczby komórek. Komórki RPMI 2650 i komórki BEAS-2B wysiewano na płytce wielodołkowej E-16 i obserwowano wzrost oporności elektrycznej. Po uzyskaniu w obrazie wizualnym plateau, obrazującym powstanie zlewnej hodowli warstwę komórek uszkodzono mechanicznie i monitorowano zmianę wskaźnika indeksu komórkowego CI (*cell index*). Obserwowano również zmiany morfologiczne komórek w hodowli w mikroskopie świetlnym.

### Analiza statystyczna

Dane wyrażono jako średnie  $\pm$  błąd standardowy średniej (SEM). Do wyliczeń stosowano oprogramowanie Statistica wersja 10 (StatSoft Inc.).

Tabela I. Średnie powierzchnie uszkodzeń w kolejnych punktach czasowych w komórkach nabłonka górnych (RPMI 2650) i dolnych dróg oddechowych (BEAS-2B) ( $\mu\text{m}^2$ )

Rodzaj komórek	Czas od uszkodzenia						
	RPMI 2650	0 godz.	24 godz.	48 godz.	72 godz.	96 godz.	120 godz.
Średnia		119997	115459	93001	63864	50017	1275
SD		23742	25596	95213	11275	26001	3606
SEM		8394	9050	33663	5638	15011	1275
	BEAS-2B	0 godz.	3 godz.	6 godz.	12 godz.	24 godz.	
Średnia		141900	139380	93790	56451	11806	
SD		30369	29608	19654	33208	22281	
SEM		11479	13241	6949	11741	7878	

## WYNIKI

### Ocena regeneracji komórek nabłonka górnych dróg oddechowych

Uszkodzenie i regenerację nabłonka górnych dróg oddechowych linii RPMI 2650 oceniono morfometrycznie w 8 niezależnych doświadczeniach. Komórki nabłonka górnych dróg oddechowych linii RPMI 2650 ulegały spontanicznej regeneracji średnio po  $5 \pm 1$  dniach od uszkodzenia. Średnie procenty regeneracji w kolejnych dobach wynosiły:  $11,96 \pm 4,3$  po 24 godz.;  $24,76 \pm 19,8$  po 48 godz.;  $54,46 \pm 14,0$  po 72 godz.;  $73,63 \pm 11,6$  po 96 godz. i  $99,08 \pm 1$  po 120 godz. (dane wyrażono jako średni procent  $\pm$  błąd standardowy średniej).

### Ocena regeneracji komórek nabłonka dolnych dróg oddechowych

Regenerację nabłonka dolnych dróg oddechowych oceniono w 10 niezależnych doświadczeniach. W odróżnieniu od komórek nabłonka górnych dróg oddechowych, w hodowlach komórek dolnych dróg oddechowych całkowitą regenerację uszkodzenia stwierdzano już po średnio  $24 \pm 2$  godz. Wyliczone średnie procenty regeneracji wynosiły:  $6,83 \pm 1,3$  po 3 godz.;  $32,94 \pm 4,1$  po 6 godz.;  $61,4 \pm 6,3$  po 9 godz.;  $81,37 \pm 5,4$  po 12 godz. i  $98,5 \pm 1$  po 24 godz.

Średnie pola powierzchni uszkodzeń przedstawiono w tabeli I. Procenty regeneracji oraz zmianę pola powierzchni uszkodzeń w czasie przedstawiono na rycinie 1.

Na każdej płytce wykonywano po 2 uszkodzenia prostopadłe do siebie i dokonywano pomiaru pola powierzchni uszkodzenia w 4 punktach, a następnie wyliczono średnią. Na podstawie średniej z 4 punktów wyliczono % regeneracji. W pierwszych doświadczeniach oceniono powtarzalność uszkodzenia. Średnia  $\pm$  SD pól powierzchni wyliczana przy zastosowaniu oprogramowania CellSens standard dla

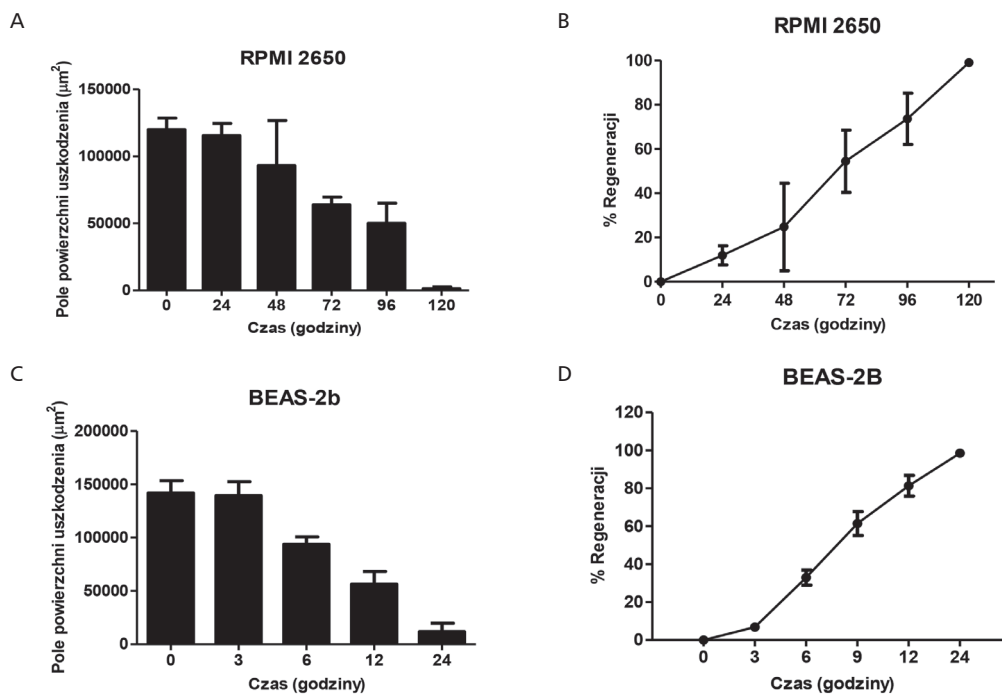
komórek RPMI 2650 wynosiła  $153336,00 \pm 32724,81$ ; a dla komórek BEAS-2B  $178908 \pm 2367$ . Przykładowe pomiary pola powierzchni uszkodzenia w różnych punktach czasowych w linii BEAS-2B pokazano na rycinie 2.

### Pomiary TER w komórkach nabłonka górnych i dolnych dróg oddechowych

Monitorowanie TER w linii komórkowej RPMI 2650 wykonano w 4 niezależnych doświadczeniach uzyskując maksymalną wartość  $200 \Omega \text{cm}^2$  w warunkach hodowli powietrze-płyn. Obserwowano stopniowe wzrosty TER po wysianiu komórek do insertów, a maksymalny wzrost TER rejestrowano w warunkach powietrze-płyn. Maksymalna zarejestrowana wartość TER w linii RPMI wynosiła  $200$

$\Omega \text{cm}^2$ . Po mechanicznym uszkodzeniu pojedynczej warstwy komórek następował spadek wartości TER i następnie stopniowy wzrost TER w kolejnych dniach, jednak nie obserwowano powrotu wartości TER do wartości początkowych.

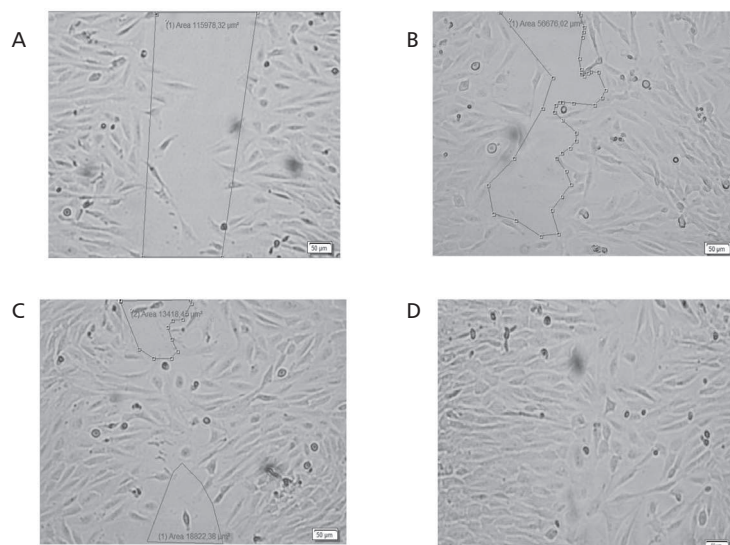
W komórkach BEAS-2B hodowanych w insertach również obserwowano wzrost TER w pierwszych dniach po wysianiu komórek na insert. Maksymalna zarejestrowana wartość TER w linii BEAS-2 B wynosiła  $210 \Omega \text{cm}^2$ . Nie było dalszego wzrostu TER po usunięciu warstwy podłoża z górnego przedziału. Uszkodzenie mechaniczne nabłonka powodowało spadek TER i następnie wzrost do wartości początkowych w czasie 24-48 godzin po uszkodzeniu. Wyniki pomiarów TER przedstawiono na rycinie 3.



Ryc. 1. Regeneracja nabłonka dróg oddechowych po uszkodzeniu mechanicznym (dane z 8 niezależnych doświadczeń):

A i B - Komórki górnych dróg oddechowych (RPMI 2650); C i D - Komórki dolnych dróg oddechowych (BEAS-2B);

A i C - Regeneracja wyrażona polem powierzchni uszkodzenia; B i D - Regeneracja wyrażona jako % zregenerowanej powierzchni uszkodzenia



Ryc. 2. Przykładowe pomiary pola powierzchni uszkodzenia nabłonka dróg oddechowych linii BEAS-2B po uszkodzeniu mechanicznym:

A – Pierwsza godzina po uszkodzeniu, B – 9 godz. po uszkodzeniu, C – 12godz. po uszkodzeniu, d – 24 godz. po uszkodzeniu

## Monitorowanie oporności elektrycznej komórek w czasie rzeczywistym przy zastosowaniu systemu RTCA-DP xCELLigence

W trakcie monitorowania w czasie rzeczywistym komórek RPMI 2650 i BEAS-2B obserwowaliśmy stopniowy wzrost znormalizowanego indeksu komórkowego, który obrazuje zwiększanie liczby komórek oraz powstawanie bariery między nimi. Wartość nCI wzrastała w komórkach RPMI 2650 w czasie 2 godzin hodowli, osiągała plateau i utrzymywała się na stałym poziomie przez cały okres monitorowania, to jest do 90 godz. Zmiana podłoża nie wpływała na nCI.

W komórkach BEAS-2B maksymalny wzrost nCI obserwowano po 3-6 godz. i nie obserwowano istotnego spadku nCI w pierwszej dobie hodowli. Hodowle monitorowano przez 72 godz., stwierdzając w tym czasie powolny spadek wartości nCI, który jednak w okresie 24-72 godz. pozostawał na stałym poziomie.

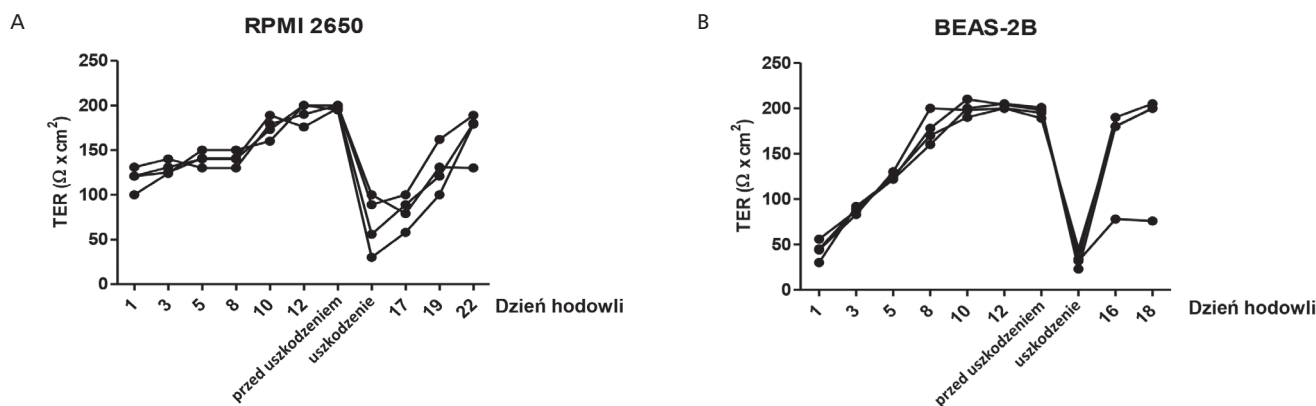
Przeprowadzono 4 niezależne doświadczenia. W każdym wykonywano pomiary w kwadryplikatach. Średnie znormalizowane indeksy komórkowe przedstawiono na rycinie 4.

## DYSKUSJA

W pracy tej przedstawiamy wdrożenie i charakterystykę modelu oceny regeneracji nabłonka górnych i dolnych dróg oddechowych. Model ten opisany wcześniej przez Bove i wsp. [11] oraz Koffa i wsp. [10] został przez nas dostosowany do linii komórkowych RPMI 2650 i BEAS-2B. Hodowle linii komórkowych RPMI 2650 zostały poprzednio

scharakteryzowane przez Pace i wsp. [12], Reichla i wsp. [13] oraz Salib i wsp. [14], którzy wykazali, że komórki te pod względem kariotypu, ekspresji cytokeratyny i produkcji śluzu wykazują cechy pierwotnych komórek nabłonka nosa. Linię tę wykorzystywano z powodzeniem w badaniach interakcji międzykomórkowych, uwalniania mediatorów i oddziaływań nabłonka z alergenami i cytokinami [12,15,16]. Komórki linii BEAS-2 B również znalazły zastosowanie jako model nabłonka dolnych dróg oddechowych [17], a wcześniejsze badania pokazały, że wykazują one cechy pierwotnego nabłonka oskrzeli i zdolność do różnicowania się [17-19]. W naszym badaniu potwierdziliśmy, że linie komórek RPMI 2650 i BEAS-2B w ustalonych warunkach hodowli wykazują zlewny wzrost formując pojedynczą warstwę komórek, co potwierdza ich przydatność do badań regeneracji nabłonka. We wcześniejszych pracach obserwowano, że zarówno komórki RPMI 2650, jak i BEAS-2B zależnie od warunków hodowli, rosną niekiedy w skupiskach nie dając zlewego wzrostu, co uniemożliwiałoby badanie regeneracji [13,20]. W naszym badaniu zastosowaliśmy warunki hodowli testowane wcześniej [13,20] umożliwiające uzyskanie pojedynczej warstwy komórek charakteryzującej się zlewym wzrostem.

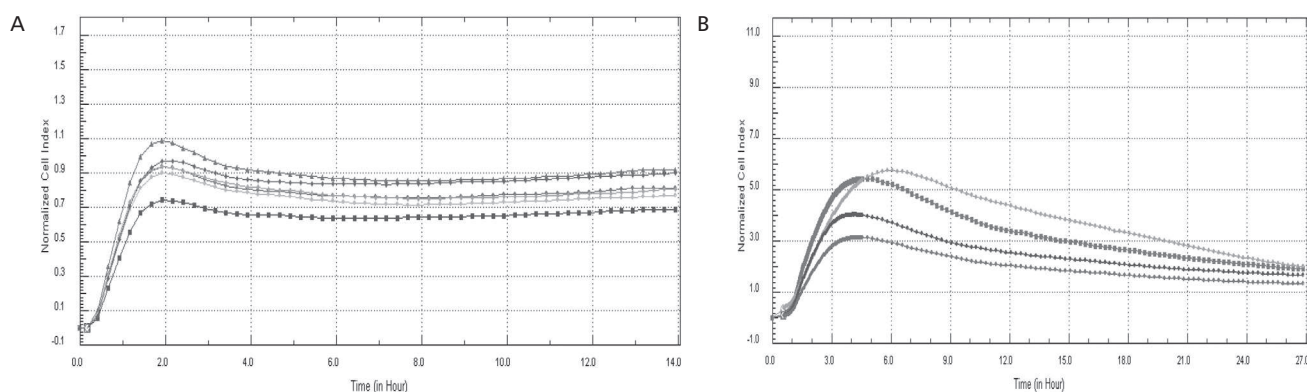
Powstawanie pojedynczej warstwy potwierdziliśmy w badaniu z zastosowaniem urządzenia do monitorowania oporności RTCA-DP xCELLigence, w którym ustaliliśmy optymalną ilość komórek do dalszych doświadczeń. Jest to nowoczesna metoda badania funkcji barierowych komórek w hodowli, której zasada opiera się na wzroście oporności



Ryc. 3. Wyniki pomiarów śródnabłonkowego oporu elektrycznego (TER) w hodowlach nabłonka:

A - górnych dróg oddechowych (RPMI 2650)

B - dolnych dróg oddechowych (BEAS-2 B), n=4



Ryc. 4. Monitorowanie w czasie rzeczywistym powstawania monowarstwy komórek RPMI 2650 (A) i BEAS-2B (B) (n=4)

przy zwiększeniu ilości komórek i ich silniejszym związaniu ze sobą. Metoda ta była z powodzeniem wykorzystywana do dynamicznej oceny wpływu czynników zewnętrznych na właściwości barierowe nabłonka [21,22]. W odróżnieniu od monitorowania śródnabłonkowej oporności TER może ona znaleźć zastosowanie w przypadku komórek, które w mniejszym stopniu niż komórki pierwotne podlegają różnicowaniu w hodowli, gdyż wzrost TER jest ściśle związany z różnicowaniem komórek, a linie takie jak RPMI 2650 i BEAS-2B wykazują ograniczone zdolności różnicowania.

Wykorzystując obie te linie w modelu uszkodzenia nabłonka z oceną mikroskopową powierzchni, mogliśmy określić dynamikę regeneracji spontanicznej oraz powtarzalność stopnia uszkodzenia. Obie linie różniły się istotnie pod względem dynamiki regeneracji. Uszkodzenie komórek linii RPMI 2650 ulegało naprawie w około 50% po 72 godzinach, a do pełnej regeneracji potrzeba było 120 godzin. Komórki linii dolnych dróg oddechowych ulegały regeneracji znacznie szybciej i ponad 50% powierzchni ulegało naprawie już po 6 godzinach od uszkodzenia a do pełnej regeneracji dochodziło po 24 godzinach.

Z uwagi na wykonywane manualnie uszkodzenie warstwy komórek początkowo oceniono powtarzalność uszkodzenia mierząc wielkość pola powierzchni uszkodzenia. W celu zmniejszenia różnic, uszkodzenia wykonywała zawsze ta sama osoba, a pomiaru dokonywano w 4 miejscach na płytce. Wartością, którą brano pod uwagę w wyliczaniu % regeneracji była średnia z 4 pomiarów na jednej płytce.

W naszym badaniu udało się również utrzymać hodowle w modelu powietrze-płyn (*air-liquid interface*, ALI). Model ten umożliwia pełne różnicowanie się komórek nabłonka dróg oddechowych i jest najbardziej zbliżony do warunków *in vivo*. Wiadomo, że pierwotne komórki nabłonka uzyskiwane zarówno od pacjentów np. metodą cytologii złuszczeniowej błony śluzowej oskrzeli lub nosa, jak i dostępne komercyjnie w bankach komórkowych np. ATCC wykazują zdolność do wzrostu i różnicowania w warunkach hodowli ALI, co można potwierdzić przez pomiar wzrostu śródnabłonkowego oporu TER. Jednak z uwagi na ograni-

czenia w możliwości prowadzenia hodowli pierwotnych, takie jak wyższy koszt, krótsze przeżycie komórek, większą zmienność między pacjentami oraz ograniczoną możliwość pasażowania, linie komórkowe stanowią alternatywny i przydatny model.

Monitorowanie TER umożliwia badanie wpływu czynników zewnętrznych na barierowość nabłonka i regenerację. W naszym modelu uzyskaliśmy wzrost TER w czasie hodowli w warunkach ALI. Podobne wartości uzyskiwano w badaniach TER w komórkach BEAS-2B [20] oraz w badaniach z linią RPMI 2650 [13,23]. Udało nam się również zaobserwować wzrost TER obrazujący regenerację po mechanicznym uszkodzeniu, co odzwierciedla regenerację nabłonka. Wartości TER w liniach komórkowych były niższe niż w hodowlach pierwotnych nabłonka dróg oddechowych oraz nie obserwowaliśmy istotnego wzrostu TER po usunięciu podłoża z górnego przedziału i hodowli w warunkach ALI, co potwierdza, że linie komórkowe w mniejszym stopniu wykazują zdolność różnicowania się niż komórki hodowli pierwotnych. Jednak uzyskane wzrosty TER stanowią istotne uzupełnienie doświadczeń z analizą wizualną obrazu i mogą być wykorzystywane do obserwacji wpływu czynników zewnętrznych na regenerację. Jedną z największych korzyści płynących ze stosowania w linii komórkowych jest lepsza dostępność i większa możliwość proliferacji tych komórek co decyduje o ich przydatności do badań fizjologii nabłonka. Hodowla linii daje również możliwość ścisłego kontrolowania warunków doświadczalnych i modyfikacji właściwości środowiska komórek poprzez aplikację substancji biologicznie czynnych w wielu stężeniach i dobrania warunków, które potem można zastosować w hodowlach pierwotnych.

Zastosowany model *in vitro* uszkodzenia i naprawy umożliwi prowadzenie badań nad identyfikacją czynników, które mogą modulować regenerację nabłonka i których celem będzie wyjaśnienie zaburzeń funkcji barierowej nabłonka u pacjentów cierpiących z powodu astmy oskrzelowej i innych chorób zapalnych górnych i dolnych dróg oddechowych.

## Piśmiennictwo

1. Xiao C, Puddicombe SM, Field S i wsp. Defective epithelial barrier function in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128: 549-56.
2. Fahy JV, Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med* 2010; 363: 2233-47.
3. Swindle EJ, Collins JE, Davies DE. Breakdown in epithelial barrier function in patients with asthma: identification of novel therapeutic approaches. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 23-34.
4. Puddicombe SM, Polosa R, Richter A i wsp. Involvement of the epidermal growth factor receptor in epithelial repair in asthma. *FASEB J* 2000; 14: 1362-74.
5. Fedorov IA, Wilson SJ, Davies DE i wsp. Epithelial stress and structural remodelling in childhood asthma. *Thorax* 2005; 60: 389-94.
6. Kicic A, Hallstrand TS, Sutanto EN i wsp. Decreased fibronectin production significantly contributes to dysregulated repair of asthmatic epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 889-98.
7. Freishtat RJ, Watson AM, Benton AS i wsp. Asthmatic airway epithelium is intrinsically inflammatory and mitotically dysynchronous. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 44: 863-9.
8. Hackett TL, Singhera GK, Shaheen F i wsp. Intrinsic Phenotypic Differences of Asthmatic Epithelium and its Inflammatory Responses to RSV and Air Pollution. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 45:1090-100.
9. Holgate ST, Roberts G, Arshad HS i wsp. The role of the airway epithelium and its interaction with environmental factors in asthma pathogenesis. *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6: 655-9.
10. Koff JL, Shao MX, Kim S i wsp. Pseudomonas lipopolysaccharide accelerates wound repair via activation of a novel epithelial cell signaling cascade. *J Immunol* 2006; 177: 8693-700.
11. Bove PF, Wesley UV, Greul AK i wsp. Nitric oxide promotes airway epithelial wound repair through enhanced activation of MMP-9. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36: 138-46.
12. Pace E, Scafidi V, Di Bona D i wsp. Increased expression of IL-19 in the epithelium of patients with chronic rhinosinusitis and nasal polyps. *Allergy* 2012; 67: 878-86.
13. Reichl S, Becker K. Cultivation of RPMI 2650 cells as an in-vitro model for human transmucosal nasal drug absorption studies: optimization of selected culture conditions. *J Pharm Pharmacol* 2012; 64: 1621-30.
14. Salib RJ, Lau LC, Howarth PH. The novel use of the human nasal epithelial cell line RPMI 2650 as an in vitro model to study the influence of allergens and cytokines on transforming growth factor-beta gene expression and protein release. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 811-9.

15. Pace E, Ferraro M, Di Vincenzo S i wsp. Oxidative stress and innate immunity responses in cigarette smoke stimulated nasal epithelial cells. *Toxicol In Vitro* 2014; 28: 292-9.
16. Lewandowska-Polak A, Brauncajs M, Paradowska E i wsp. Human parainfluenza virus type 3 (HPIV3) induces production of IFN $\gamma$  and RANTES in human nasal epithelial cells (HNECs). *J Inflamm (Lond)* 2015; 12: 16.
17. Ke Y, Reddel RR, Gerwin BI i wsp. Human bronchial epithelial cells with integrated SV40 virus T antigen genes retain the ability to undergo squamous differentiation. *Differentiation* 1988; 38: 60-6.
18. Katoh Y, Stoner GD, McIntire KR i wsp. Immunologic markers of human bronchial epithelial cells in tissue sections and in culture. *JNCI* 1979; 62: 1177-85.
19. Reddel RR, Ke Y, Gerwin BI i wsp. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with plasmid containing SV40 early genes. *Cancer Res* 1988; 48: 1904-9.
20. Stewart CE, Torr EE, Mohd Jamili NH i wsp. Evaluation of differentiated human bronchial epithelial cell culture systems for asthma research. *J Allergy (Cairo)* 2012; 2012: 943982.
21. Chalubinski M, Wojdan K, Luczak E i wsp. IL-33 and IL-4 impair barrier functions of human vascular endothelium via different mechanisms. *Vascul Pharmacol* 2015; 73: 57-63.
22. Chalubinski M, Zemanek K, Skowron W i wsp. The effect of 7-ketocholesterol and 25-hydroxycholesterol on the integrity of the human aortic endothelial and intestinal epithelial barriers. *Inflamm Res* 2013; 62: 1015-23.
23. Wengst A, Reichl S. RPMI 2650 epithelial model and three-dimensional reconstructed human nasal mucosa as in vitro models for nasal permeation studies. *Eur J Pharm Biopharm* 2010; 74: 290-7.