

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Imunologie



Bc. Eliška Krčmářová

Regulace tvorby kostní tkáně pomocí osteogenních suplementů
v modelu osteoporózy

Regulation of bone formation using osteogenic supplements
in an osteoporotic model

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Eva Filová, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 4.1.2022

.....

Podpis

Poděkování:

Ráda bych poděkovala školitelce Mgr. Evě Filové, PhD. za odborné vedení, cenné rady, její čas a lidský přístup, který mi věnovala. Zároveň bych ráda poděkovala celému kolektivu Oddělení tkáňového inženýrství AV ČR, za jejich ochotu a přátelský přístup. Práce vznikla za finanční podpory GAČR v rámci projektu 18-09306S. Závěrem bych ráda velice poděkovala své rodině a příteli Filipu Hájkovi za podporu a vstřícnost v průběhu celého studia.

Abstrakt

Osteoporóza je onemocnění kostního metabolismu charakteristické úbytkem kostní hmoty. Příčinou tohoto onemocnění je dysbalance mezi tvorbou nové kostní hmoty osteoblasty a resorpcí kostní tkáně osteoklasty, ve prospěch kostní resorpce. Rizikovou skupinou pro rozvoj tohoto onemocnění jsou ženy po menopauze, u kterých v tomto období přirozeně dochází k poklesu hormonu estrogenu. Estrogen působí jako inhibitor proosteoklastových faktorů, jako je ligand vážící se na receptor aktivující jaderný faktor κ B (RANKL), interleukin (IL)-1, IL-6, nebo faktor nádorové nekrózy (TNF)- α . Nerovnováha kostního metabolismu může být mimo jiné zapříčiněna i dysbalancí v produkci Prostaglandinu E2 (PGE2) a $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D₃. Jedná se o silné mediátory, které mohou stimulovat i inhibovat osteoklastogenezi *in vitro* v závislosti na podmínkách kultury/ko-kultury. V této práci byl přezkoumán vliv těchto mediátorů (PGE2 v koncentraci 10^{-6} M a 10^{-8} M; $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ v koncentraci 10^{-8} M a 10^{-9} M) na osteoklastogenezi potkaních mononukleárních buněk periferní krve (PBMC) v přítomnosti osteoblastů, bez nebo s kombinací proosteoklastových faktorů stimulujících kolonie makrofágů (M-CSF) a RANKL. Osteoklastogeneze byla stimulována, pokud byly PGE2 a $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ kombinovány s M-CSF a RANKL s výjimkou PGE2 10^{-6} M, který vykazoval inhibiční efekt. Přidávání pouze PGE2 nebo $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D₃, bez kombinace M-CSF a RANKL, nebylo dostatečné pro iniciaci osteoklastogeneze. Potenciál osteoklastogeneze byl sledován i u buněk izolovaných z potkanů s indukovanou osteoporózou pomocí ovariektomie. PBMC izolované z těchto jedinců ukázaly schopnost diferenciaci v osteoklasty v přítomnosti osteoblastů i bez další přidané suplementace. Dále byl sledován efekt PGE2 a $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D₃ na produkci prozánětlivých cytokinů IL1- β , IL-6 a TNF- α , jejichž hladina je v krvi osteoporotických jedinců zvýšena. Nejvyšší hladiny byly naměřeny 14. den ko-kultivace. TNF- α byl nejvyšší při použití suplementace M-CSF a RANKL a IL-6 byl nejvyšší při kombinaci M-CSF a RANKL s $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminem D₃ 10^{-8} M. IL-1 β nebyl detekován ani u jedné ze sledovaných skupin.

Klíčová slova: osteoblasty, PBMC, osteoklastogeneze, osteoklasty, M-CSF, RANKL, PGE2, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃, osteoporóza, ovariektomie, cytokiny IL1- β , IL-6 a TNF- α

Abstract

Osteoporosis is a disease of the bone metabolism which is characterised with a decrease of bone substance. The cause of this disease is the imbalance between the creation of a new bone substance by osteoblasts and the resorption of a bone tissue by osteoclasts, in favour of the bone resorption. The risk group of the development of this disease are women after menopause, who naturally register a decline of the estrogen hormone. Estrogen operates as an inhibitor of proosteoclastic factors such as receptor activator of NF κ B ligand (RANKL), interleukin (IL)-1, IL-6 or TNF- α . The imbalance of the bone metabolism can also be caused by a disbalance in the production of Prostaglandin E2 (PGE2) and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. They are strong mediators which can both stimulate and inhibit an osteoclastogenesis *in vitro* in concordance with the conditions of the culture/co-culture. This thesis focuses on the examination of an influence of those mediators (PGE2 in the concentration of 10⁻⁶ M and 10⁻⁸ M; 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in the concentration of 10⁻⁸ M and 10⁻⁹ M) on the osteoclastogenesis from the rat PBMC at the presence of osteoblasts, with or without the combination of proosteoclastic factors macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and RANKL. Osteoclastogenesis was stimulated if PGE2 and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ were combined with M-CSF and RANKL with the exception of PGE2 10⁻⁶ M, which recorded the inhibitory effect. The exclusive addition of PGE2 or 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, without the combination of M-CSF and RANKL, was not sufficient enough for the initiation of the osteogenesis. A potential of the osteoclastogenesis was tested within the cells isolated from rats with osteoporosis induced by ovariectomy. PBMC isolated from these individuals presented the ability of the differentiation in osteoclasts at the presence of osteoblasts with no other added supplementation. In addition, the effect of PGE2 and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ was observed on the production of inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α , which level is increased in the blood of the osteoporotic individuals. The highest levels were recorded on 14th day of the co-culture. TNF- α was increased mainly during the supplementation of M-CSF, RANKL. IL-6 was the highest during the combination of M-CSF and RANKL with 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ 10⁻⁸ M. IL-1 β was not detected at any of the monitored group.

Key words: osteoblasts, PBMCs, osteoclastogenesis, osteoclasts, M-CSF, RANKL, PGE2, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, osteoporosis, ovariectomy, cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α

Obsah

Abstrakt	3
Abstract	4
Seznam použitých zkratk	7
1. Úvod	9
2. Cíle práce	11
3. Literární přehled	12
3.1 Kost a kostní buňky.....	12
3.1.1 Osteoblasty.....	12
3.1.2 Osteocyty	14
3.1.3 Osteoklasty.....	14
3.1.3.1 Resorpce kosti	17
3.2 Remodelace kosti	18
3.2.1.1 Faktory regulující remodelaci kosti.....	19
3.3 <i>In vitro</i> modely	21
3.3.1 Suplementy používané pro stimulaci osteoklastogeneze <i>in vitro</i>	22
3.3.1.1 PGE2	23
3.3.1.2 1 α ,25-dihydroxyvitamin D ₃	24
3.4 Osteoporóza.....	25
3.4.1 Postmenopauzální osteoporóza	26
3.4.2 Léčba osteoporózy	26
3.4.3 <i>In vivo</i> model osteoporózy	28
4. Materiál a metody	29
4.1 Zvířata	29
4.2 Roztoky, média a chemikálie	29
4.3 Technické vybavení	31
4.4 Použitý software.....	31
4.5 Izolace a kultivace osteoblastů.....	31

4.6	Izolace a kultivace mononukleárních buněk periferní krve	32
4.7	Zmrazení a rozmrazení buněk	32
4.8	Ko-kultivace osteoblastů a monocytů/makrofágů	33
4.9	Test metabolické aktivity	33
4.10	Stanovení aktivity alkalické fosfatázy	34
4.11	Stanovení aktivity tartarát rezistentní kyselé fosfatázy	34
4.12	Stanovení aktivity karbonické anhydrázy II	34
4.13	Vizualizace aktivity tartarát rezistentní kyselé fosfatázy a jader	35
4.14	Kvantifikace obsahu buněčné DNA	35
4.15	Vizualizace buněk	36
4.16	Bio-Plex	37
4.17	Statistická analýza	38
5.	Výsledky	39
5.1	Optimalizace kultivačního média	39
5.2	Optimalizace poměrů buněk	42
5.3	Ověření vlivu poolování buněk na osteoklastogenezi PBMC v ko-kultuře s osteoblasty	45
5.4	Stimulace osteoklastogeneze pomocí PGE2	50
5.5	Stimulace osteoklastogeneze 1 α ,25-dihydroxyvitaminem D ₃	55
5.6	Stimulace osteoklastogeneze u OVX buněk	58
5.7	Porovnání osteoklastogeneze u ko-kultur stimulovaných PGE2 nebo 1 α 25-dihydroxyvitaminem D ₃ s OVX ko-kulturou	62
5.8	Stanovení produkce cytokinů IL-6 a TNF- α metodou Bio-Plex	70
6.	Diskuze	72
7.	Závěr	84
8.	Seznam literatury	85
9.	Příloha	92

Seznam použitých zkratek

ACP5	acid phosphatase 5, kyselá fosfatáza 5
ALP	alkaline phosphatase, alkalická fosfatáza
ALPL	alkaline phosphatase gene, gen pro alkalickou fosfatázu
BMP	bone morphogenetic proteins, kostní morfogenetické proteiny
BMU	basic multicellular unit, základní mnohobuněčná jednotka
CAII	carbonic anhydrase II, karbonická anhydráza II
cAMP	cyclic adenosine monophosphate, cyklický adenosin monofosfát
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2, ligand chemokinu s C-C motivem 2
c-fms	receptor for macrophage colony stimulating factor, receptor pro faktor simulující kolonie makrofágů
CFU-M	colony forming unit macrophage, jednotky tvořící kolonie makrofágů
CK	cathepsin K, katepsin K
COX	cyklooxygenáza
CTHRC1	collagen triple helix repeat containing 1, kolagenové trojitě šroubovice obsahující repetice 1
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
dH ₂ O	destilovaná voda
DiOC6(3)	3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's médium – high glucose (s glutaminem)
DMEM-Q	Dulbecco's modified Eagle's médium – high glucose (bez glutaminu)
dsDNA	double-stranded deoxyribonucleic acid, dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
FasL	Fas ligand
FBS	fetal bovine serum, fetální hovězí sérum
FGF	fibroblast growth factors, fibroblastové růstové faktory
HGF	hepatocyte growth factors, hepatocytární růstové faktory
HSC	hematopoietic stem cells, hematopoetické kmenové buňky
IFN- γ	interferon γ
IGF	inzulin like growth factor, růstový faktor podobný inzulinu
IL	interleukin

IL1-RA	IL-1 receptor antagonist, antagonista IL-1 receptoru
KOL I	type I collagen, kolagen typu I
LPA	lysophosphatidic acid, kyselina lysofosfatidová
LPS	lipopolysacharid
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor, faktor stimující kolonie makrofágů
MHC	major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex
MMP	matrix metalloproteinases, matricové metaloproteinázy
MSC	mesenchymal stem cells, mezenchymální kmenové buňky
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NK buňky	natural killer cells, přirození zabíječi
OPG	osteoprotegerin
Osx	osterix
OVX	ovariektomie
P/S	antibiotika penicilin/streptomycin
PBMC	peripheral blood mononuclear cells, mononukleární buňky periferní krve
PDGF	platelet derived growth factor, růstový faktor odvozený od krevních destiček
PGE2	prostaglandin E2
PK	proteinkináza
PTH	parathormon
RANK	receptor activator of NF- κ B, receptor aktivující jaderný faktor κ B
RANKL	receptor activator of NF κ B ligand, ligand vážící se na receptor aktivující jaderný faktor κ B
RF	růstové faktory M-CSF a RANKL
RT	room temperature, pokojová teplota
Runx2	runt-related transcription factor 2, runt příbuzný transkripční faktor 2
S1P	sphingosine-1-phosphate, sfingosin-1-fosfát
SD	standard deviation, směrodatná odchylka
TGF- β	transforming growth factor β , transformující růstový faktor β
TNF	tumor necrosis factor, faktor nádorové nekrózy
TRAP	tartrate-resistant acid phosphatase, tartarát-rezistentní kyselá fosfatáza
Z	zdraví jedinci

1. Úvod

Kost je mineralizovaná tkáň, která se po celý život neustále remodeluje. Ročně je nahrazeno přibližně 10 % celkového obsahu kostí, což odráží důležitost tohoto mechanismu. Remodelace kosti je založena především na vzájemné koordinaci mezi osteoklasty, buňkami resorbujícími kost a osteoblasty, které vytvářejí a mineralizují novou kostní hmotu. Dysbalance tohoto mechanismu se může projevit onemocněním jako je osteoporóza, při které nadměrná resorpce kosti osteoklasty způsobuje řidnutí kostní hmoty, čímž se zvyšuje riziko zlomenin (Asagiri *et* Takayanagi, 2007). Mezinárodní nadace pro osteoporózu udává, že u 1 ze 3 žen a 1 z 5 mužů starších 50 let, dochází ke zlomenině kosti právě v důsledku osteoporózy. S prodlužováním průměrného věku dochází ke stárnutí populace, což je i jeden z důvodů, proč se prevalence osteoporózy stále zvyšuje. Odhaduje se, že v současnosti trpí osteoporózou více než 200 milionů lidí, a proto je také velkým předmětem výzkumu (Sozen *et al.*, 2017).

Příčinou osteoporózy jsou především endokrinní změny spojené se stárnutím organismu, které vedou k nadměrné resorpci kosti a inhibici tvorby nové kostní hmoty. Ženy trpí osteoporózou častěji, vzhledem k poklesu hormonu estrogenu po menopauze, který je silným regulátorem kostní remodelace. Estrogen inhibuje expresi ligandu vážícího se na receptor aktivující jaderný faktor κ B (NF κ B /RANKL), který ve spolupráci s faktorem stimulujícího kolonie makrofágů (M-CSF) zprostředkovává osteoklastogenezi. Působí také jako inhibitor dalších proosteoklastových faktorů, jako jsou prozánětlivé cytokiny interleukin (IL)-1, IL-6, faktor nádorové nekrózy α (TNF- α) (Feng *et* McDonald, 2011). U pacientů s osteoporózou je v krvi hladina těchto cytokinů zvýšena (Zheng *et al.*, 1997). Prostaglandin E2 (PGE2) a $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ jsou také silnými regulátory kostního metabolismu. Je známo, že dlouhodobá nadměrná produkce PGE2, například při chronickém zánětu, může přispívat k rozvoji osteoporózy (Chen *et al.*, 2019). Stejně tak dysbalance v koncentraci $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D₃ je spojována s rozvojem tohoto onemocnění (Lips *et* van Schoor, 2011).

Nejběžnější metodou studia osteoporózy a testování nových léčiv je použití zvířecích modelů. Ačkoliv jsou považovány za zlatý standard pro testování nových léčiv a jsou zásadním krokem v preklinickém vývoji, kvůli rozdílné fyziologii člověka a zvířat nemohou tyto modely zcela nahradit reakci probíhající u lidí. Navíc určité metody používané k navození osteoporózy u zvířat jsou poměrně invazivní, a proto pokud lze některé aspekty modelů *in vivo* replikovat *in vitro*, je možné částečně nahradit testování

na zvířatech. Osteoblasty a osteoklasty lze ko-kultivovat v *in vitro* podmínkách. K stimulaci diferenciaci osteoklastů z prekurzorových buněk, je typicky používána kombinace růstových faktorů M-CSF a RANKL. Za použití vhodných suplementů, například PGE2 a $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D_3 , je možné v ko-kultuře navodit obdobné podmínky, jako je tomu právě u osteoporózy.

V předkládané práci byl sledován účinek PGE2 a $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D_3 na osteoklastogenezi z mononukleárních buněk periferní krve (PBMC) ko-kultivovaných s osteoblasty. Osteoklastogeneze navozená působením PGE2 a $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D_3 byla porovnáována s osteoklastogenezí buněk izolovaných z potkanů s indukovanou osteoporózou. Dále byl sledován efekt PGE2 a $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D_3 na produkci prozánětlivých cytokinů IL1- β , IL-6 a TNF- α , jejichž hladina je v krvi osteoporotických jedinců zvýšena. Navržený model by se následně mohl využít pro vývoj anti-resorpčních léků, studium mechanismů uplatňujících se při remodelaci kosti a při jejích patologických stavech.

2. Cíle práce

Navržení *in vitro* modelu osteoporózy:

- optimalizace ko-kultivace osteoblastů a PBMC *in vitro* (optimalizace média, počtu a poměrů buněk, ověření vlivu poolování buněk na osteoklastogenezi)
- stimulace osteoklastogeneze PBMC v ko-kultuře s osteoblasty izolovaných ze zdravých samic potkanů – určení účinné koncentrace a kombinace suplementů (M-CSF, RANKL, PGE2, 1 α ,25-dihydroxyvitaminu D₃)
- sledování potenciálu osteoklastogeneze u buněk izolovaných ze samic potkanů s indukovanou osteoporózou pomocí ovariektomie
- určení vlivu použité suplementace na produkci prozánětlivých cytokinů IL-1 β , IL-6 a TNF- α

3. Literární přehled

3.1 Kost a kostní buňky

Kost je dynamická mineralizovaná tkáň, která je neustále remodelována. Poskytuje mechanickou podporu a chrání životně důležité orgány. Remodelace kosti pomáhá udržovat rovnováhu klíčových elektrolytů ukládáním vápníkových a fosfátových iontů a chrání orgány akumulací těžkých kovů. (Amini *et al.*, 2013). V kostní dřeni dochází k hematopoéze a k diferenciaci mnoha buněk imunitního systému. Mezi kostní buňky patří osteoblasty, osteocyty, kost lemující buňky a osteoklasty (Kim *et al.*, 2020).

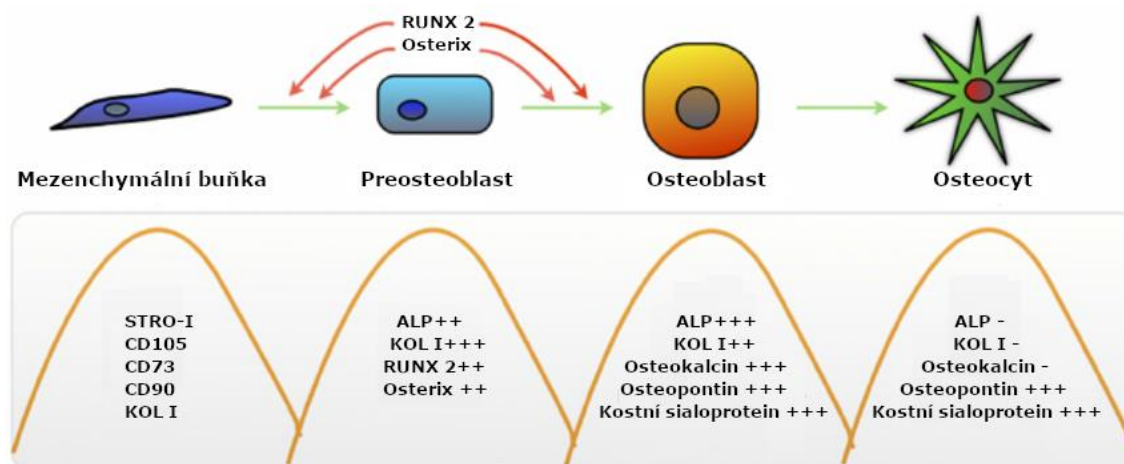
3.1.1 Osteoblasty

Osteoblasty jsou 20-50 μm velké jednojaderné stromální buňky, jejichž hlavní funkcí je tvorba, ukládání a mineralizace kostní matrix (Capulli *et al.*, 2014). Pro svoji funkci jsou vybaveny rozsáhlým Golgiho aparátem a endoplazmatickým retikulem (Florencio-Silva *et al.*, 2015). Průměrná délka jejich života se pohybuje mezi několika až 100 dny a nejčastěji se vyskytují v klastrech na povrchu kostí (Rosenberg *et al.*, 2012). Diferencují se z mezenchymálních kmenových buněk (mesenchymal stem cells, MSC) nacházejících se v kostní dřeni, ze kterých mimo jiné vznikají chondrocyty, adipocyty nebo myoblasty (Caplan *et Bruder*, 2001).

Z MSC vznikají nejprve osteoprogenitory, které rychle proliferují a diferencují v preosteoblasty. Preosteoblasty mají zpočátku zploštělý, větvenovitý tvar a jsou přítomny v endostu a periostu. Během remodelace kosti dochází k zesílení jejich cytoplazmy a zvětšení jader, která mají typický oválný tvar. Z preosteoblastů se poté diferencují zralé osteoblasty, které mají tvar kvádry a jsou schopné tvořit kostní matrix (Phan *et al.*, 2004, Nahian *et Davis*, 2021). Osteoblasty mohou být následně (1) zabudovány do nově vytvořené kostní matrix a diferencovány na osteocyty – terminálně diferencované buňky, (2) transformovány do kost lemujících buněk, které chrání neaktivní povrchy kostí, nebo (3) iniciovat apoptózu (Manolagas, 2000).

Pro iniciaci diferenciaci MSC do osteoblastů je zásadní exprese genů pro kostní morfogenetické proteiny (bone morphogenetic proteins, BMP) a aktivace signální dráhy Wnt (Capulli *et al.*, 2014). Nezbytná je také exprese 2 transkripčních faktorů: Runt příbuzný transkripční faktor 2 (Runx2) a Osterix (Osx) (obrázek č.1). Exprese těchto transkripčních faktorů vede k expresi dalších genů typických již pro zralé osteoblasty. Runx2 reguluje expresi genů pro kolagen typu I (KOL I), alkalickou fosfatázu (ALP), kostní sialoprotein II a osteokalcin (Florencio-Silva *et al.*, 2015, Borciani *et al.*, 2020).

Dalšími typickými markery zralých osteoblastů je exprese genů pro osteopontin a přítomnost receptorů pro parathormon (PTH), růstový faktor podobný inzulinu (Inzulin Like Growth Factor, IGF), glukokortikoidy a také řadu dalších integrinů a cytokinů (Phan *et al.*, 2004).



Obrázek č. 1: Přehled diferenciačních markerů pro MSC, preosteoblasty, osteoblasty a osteocyty během diferenciace MSC na osteoblasty a osteocyty (Upraveno dle Miron *et al.*, 2012).

Zralé osteoblasty tvoří novou kostní hmotu produkcí organické extracelulární matrix, která tvoří lešení pro ukládání krystalů hydroxyapatitu. Organická matrix obsahuje především kolagenní proteiny (90 %), jako je KOL I a nekolagenní proteiny včetně osteokalcinu, osteonektinu, fibronektinu, osteopontinu, kostního sialoproteinu II, BMP a růstové faktory (Florencio-Silva *et al.*, 2015, Borciani *et al.*, 2020). Tato extracelulární matrix je nejprve vylučována polarizovanými osteoblasty jako nemineralizovaný osteoid a následně mineralizována akumulací fosforečnanu vápenatého ve formě hydroxyapatitu (Blair *et al.*, 2017). Pro tvorbu krystalů hydroxyapatitu je nezbytný anorganický fosfát, který vzniká hydrolyzou anorganického pyrofosfátu pomocí enzymu ALP (Orimo, 2010). Tento enzym, kódovaný *ALPL* genem, je vylučovaný osteoblasty a jedná se o časný indikátor osteogenní diferenciace. Z tohoto důvodu se jeho aktivita často stanovuje během *in vitro* analýz (Hoemann *et al.*, 2009).

Osteoblasty také syntetizují několik mediátorů, jako je M-CSF a RANKL, které iniciují diferenciaci osteoklastů z prekursorových buněk hematopoetické linie (Kim *et al.*, 2020). M-CSF je exprimován konstitutivně, zatímco exprese RANKL je upregulována několika osteotropními faktory podporujícími osteoklastogenezi, jako je IL-11, PTH, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃, IL-1, PGE2 nebo LPS (Kobayashi *et al.*, 2005) (Take *et al.*, 2005). Osteoblasty také produkují solubilní osteoprotegerin (OPG), který váže

membránový RANKL, čímž dochází k inhibici osteoklastogeneze. Osa RANK-RANKL-OPG má zásadní vliv na rovnováhu kostní remodelace (Nelson *et al.*, 2012).

3.1.2 Osteocyty

Osteocyty jsou terminálně diferencované osteoblasty, které byly zabudovány v kostní matrix a jedná se o nejhojnější buňky kostní tkáně (90–95 % celkových kostních buněk) (Franz-Odenaal *et al.*, 2006). Osteocyty zůstávají v kostní matrix zabudovány i několik let, poté buď podstoupí apoptózu, nebo v případě potřeby mohou opět diferencovat ve funkční osteoblasty (Torreggiani *et al.*, 2013). Ačkoli mají osteoblasty a osteocyty stejné prekurzory, významně se liší svou morfologií i funkcí. Na rozdíl od osteoblastů jsou osteocyty mnohem menší (5-20 μm), ploché buňky, které tvoří rozsáhlou syncytiální síť pomocí malých dendritických a cytoplazmatických výběžků, jejíž prostřednictvím komunikují s okolním prostředím (Nahian *et al.*, 2021). Osteocyty mají redukovaný Golgiho aparát a endoplazmatické retikulum. Sekretují tedy i méně kostní matrix a genová exprese ALP, KOL I, osteokalcinu a BMP-2 je snížena (obrázek č.1) (Phan *et al.*, 2004, Miron *et al.*, 2012).

Osteocyty především udržují strukturální integritu kosti a podílejí se na udržování kostního metabolismu. Reagují na mechanické zatížení uvolněním signálních molekul, jako jsou prostaglandiny, ATP, oxid dusnatý, nebo protein Wnt1, které mohou modulovat diferenciaci a aktivitu kostních buněk (Lisowska *et al.*, 2018). Mechanické zatížení osteocytů vede k produkci faktorů s anabolickým efektem na kost. Zatímco snížením jejich mechanické zátěže dochází například k produkci sklerostinu, inhibitoru aktivity osteoblastů, a k faktorům stimuluji lokální osteoklastogenezi. Apoptóza osteocytů je dalším faktorem, který má na osteoklasty chemotaktický účinek. Kromě toho jsou osteocyty důležitým zdrojem RANKL a jsou proto někdy považovány za hlavní modulatory kostní remodelace. (Florencio-Silva *et al.*, 2015).

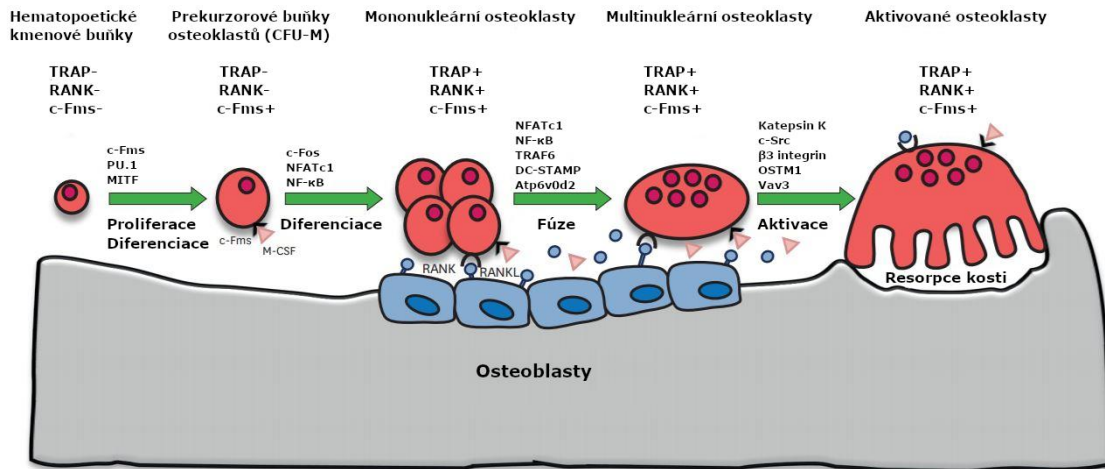
3.1.3 Osteoklasty

Osteoklasty jsou velké specializované buňky, které mohou resorbovat kostní matrix sekrecí kyselých a lytických enzymů. Vznikají v místech kostní resorpce fúzí mononukleárních hematopoetických buněk monocyto-makrofágové linie, pocházejících z kostní dřene, periferní krve a dalších hematopoetických orgánů (Boyle *et al.*, 2003). Průměr osteoklastu se pohybuje mezi 10-300 μm a obvykle má 3-12 jader. Jejich počet se může pohybovat i okolo 100 jader na buňku, zejména při některých patologických stavech (Bar-Shavit, 2007, Tiedemann *et al.*, 2017). Bylo prokázáno, že velké osteoklasty

s velkým počtem jader vznikají při zánětlivých stavech organismu, jelikož diferenciace osteoklastů je úzce spjata s imunitním systémem (Tiedemann *et al.*, 2017). Pro resorpci kosti jsou osteoklasty přizpůsobeny velmi vyvinutými organelami s velkým počtem mitochondrií a rozsáhlým Golgiho aparátem (Phan *et al.*, 2004). Osteoklasty jsou terminálně diferencované buňky a délka jejich života se pohybuje okolo 12 dní. Jakmile přestanou resorbovat kost, dostanou signál k apoptóze (Phan *et al.*, 2004, Rosenberg *et al.*, 2012).

Diferenciace prekurzorových buněk v osteoklasty je řízena jejich interakcemi s osteoblasty, ke kterým dochází v prostředí kosti. Prekurzory osteoklastů exprimují receptor pro faktor simulující kolonie makrofágů (c-fms) a receptor aktivující jaderný faktor κ B (RANK), receptory pro M-CSF a RANKL. V přítomnosti M-CSF, který se váže na c-fms na hematopoetických buňkách, jsou hematopoetické buňky diferencovány do jednotek tvořících kolonie makrofágů (CFU-M), což je společný prekurzor makrofágů a osteoklastů. Po navázání RANKL na receptor RANK se CFU-M dále diferencují na mononukleární osteoklasty, které následně fúzí a vytvoří vícejaderný osteoklast (obrázek č. 2) (Kim *et al.*, 2020). Úplný sled událostí od stimulace osteoklastogeneze RANKL k vytvoření velkých vícejaderných osteoklastů schopných resorpce kosti však není zcela znám. Cytokiny M-CSF a RANKL jsou produkovány především sousedními stromálními buňkami, osteoblasty, ale také aktivovanými T lymfocyty (Amarasekara *et al.*, 2018). Diferenciace osteoklastů může být inhibována solubilním OPG, exprimovaným osteoblasty, který váže membránový RANKL s vysokou afinitou a brání tak jeho připojení k RANK receptoru (Nelson *et al.*, 2012). Poměr exprese RANKL/OPG určuje diferenciaci osteoklastů (Hofbauer *et al.*, 2000). RANKL patří do superrodiny faktorů nádorové nekrózy (TNF). TNF- α , patřící do stejné superrodiny, také stimuluje diferenciaci osteoklastů mechanismem nezávislým na přítomnosti RANKL (Kobayashi *et al.*, 2005). U zánětlivých onemocnění TNF- α může podporovat osteoklastogenezi a způsobovat tak poruchu kostní density (Farmer *et al.*, 2000). RANKL i TNF- α iniciují osteoklastogenezi upregulací RANK receptoru skrze NF- κ B signální dráhu (Luo *et al.*, 2018) a TNF- α zvyšuje expresi RANKL v osteocytech (Marahleh *et al.*, 2019). Několik dalších faktorů bylo navrženo jako stimulanty osteoklastogeneze, např. IL-11, PTH, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃, IL-1, PGE2 nebo LPS (Kobayashi *et al.*, 2005, Take *et al.*, 2005). Mechanismus účinku poté spočívá především v modulaci osy RANK-RANKL-OPG. M-CSF má roli v osteoklastogenezi: a) indukuje expresi RANK receptoru, b) jedná se o faktor pro diferenciaci a c) stimuluje buněčné přežití a proliferaci. Zvýšení exprese

RANK skrze c-fms (receptor pro M-CSF) je vyšší v přítomnosti IL-3 a M-CSF (Arai *et al.*, 1999).



Obrázek č. 2: **Diferenciace osteoklastů:** Hematopoetické kmenové buňky (HSC) diferencují v osteoklasty v závislosti na přítomnosti transkripčních faktorů PU.1 a MITF, které jsou aktivovány signalizací skrze M-CSF. V přítomnosti M-CSF jsou HSC diferencovány v CFU-M, což je společný prekursor makrofágů a osteoklastů. Diferenciace na vícejaderné osteoklasty je dále modulována signalizací RANKL-RANK a M-CSF. Pro fúzi osteoklastů je důležitá řada molekulárních mediátorů, včetně DC-STAMP, Atp6v0d2, $\beta 3$ integrin, katespin K a OSTM1. Atp6v0d2, podjednotka v-ATPázy d2; DC-STAMP, transmembránový protein specifický pro dendritické buňky; MITF, mikroftalmický transkripční faktor; OSTM1, transmembránový protein 1 spojený s osteopetrózou (Upraveno dle Amarasekara *et al.*, 2018).

Diferencované osteoklasty lze odlišit od makrofágů kombinací znaků typických pro osteoklasty. Patří mezi ně: intenzivní aktivita tartarát rezistentní kyselé fosfatázy (TRAP) a karbonické anhydrázy II (CAII) nebo upregulace receptorů pro kalcitonin a vitronektin (Phan *et al.*, 2004). Při *in vitro* kultivaci je exprese TRAP standardním měřítkem diferenciace osteoklastů a aktivitu tohoto enzymu je možné stanovit i histochemicky. Jedná se o metaloenzym, kódovaný genem *ACP5*, jehož exprese je dramaticky zvýšena během diferenciace osteoklastů a zejména pak při jejich resorpční aktivitě (Yu *et al.*, 2009). V séru se vyskytují 2 izoformy: TRAP 5a a TRAP 5b; TRAP 5a je sekretován makrofágy a dendritickými buňkami, zatímco TRAP 5b je převládající formou u osteoklastů. V nižších hladinách je TRAP také produkován v kůži, thymu, slezině, játrech, plicích a gastrointestinálním traktu. Tento enzym má fosfatázovou aktivitu a je schopen generovat kyslíkové radikály v přítomnosti peroxidu vodíku a zabíjí tak bakterie účinněji, než samotný peroxid vodíku (Hayman, 2008). V resorbujících osteoklastech se TRAP vyskytuje v transportních vezikulech, které se účastní transportu endocytované matrix určené k degradaci (Yu *et al.*, 2009). U makrofágů kyslíkové radikály produkované TRAP nejspíše pomáhají zpracovat antigen před prezentací (Hayman, 2008).

CAII je také metaloenzym, kódovaný genem *CA2*. Tento enzym se podílí na několika fyziologických funkcích, včetně kostní resorpce. Řídí sekreci H^+ , důležitých pro udržení nízkého pH v resorpčních lakunách a také reguluje koncentraci Ca^{2+} . Mimo jiné také ovlivňuje diferenciaci a pohyb osteoklastů (Grüneberg *et al.*, 2002). Kromě TRAP nebo CAII testu se pro stanovení diferenciaci a funkčnosti osteoklastů kultivovaných *in vitro* často posuzuje i jejich schopnost resorbovat mineralizovanou matrix a vytvářet tak resorpční důlky. Tato metoda se nazývá pit assay (Rao *et al.*, 2010).

3.1.3.1 Resorpce kosti

Osteoklasty je možné rozdělit na aktivované osteoklasty, resorbující kostní matrix, a neaktivované, neresorbující. Aktivované osteoklasty jsou vysoce polarizované a obsahují samostatné membránové domény. Oproti tomu neaktivované osteoklasty polarizaci nevykazují a nemají žádné charakteristické membránové domény. Mají také menší objem i sníženou pohyblivost (Suda *et al.*, 1996).

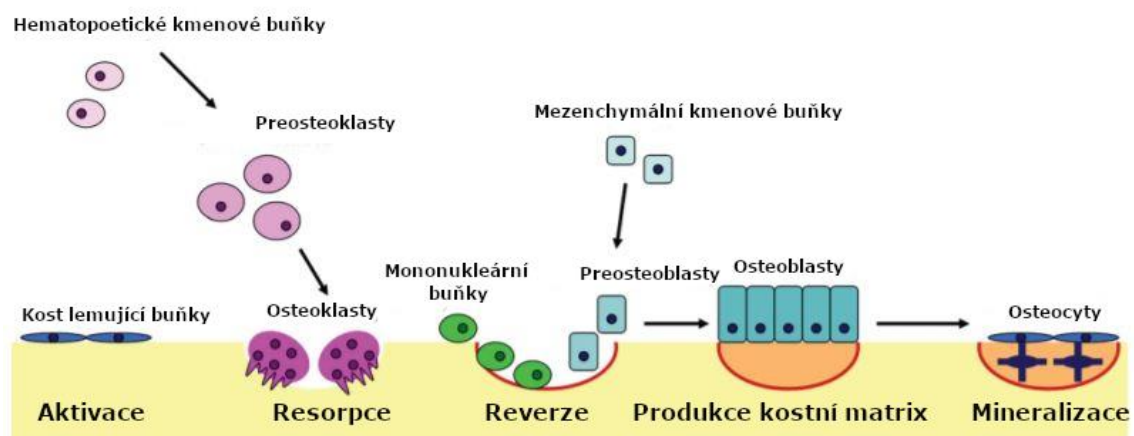
Resorpce kosti osteoklasty začíná adhezí osteoklastu na kost. Na buněčném povrchu osteoklastu se začíná exprimovat několik integrinových receptorů, které se specificky vážou na adhezivní molekuly, usnadňující připojení osteoklastu k povrchu kosti. Jedním z hlavních integrinů exprimovaných osteoklasty je $\alpha\beta3$ integrin, který se váže na vitronektin a umožňuje tak připojení osteoklastu k povrchu kosti (Rao *et al.*, 2006). Po připojení osteoklastu k povrchu kosti dojde k jeho polarizaci a tím i k jeho aktivaci. Plazmatická membrána se reorganizuje a vytváří dlouhé, prstovité výběžky, které pronikají do kostní matrix a vytváří resorpční lakunu. Aktivovaný osteoklast pak vykazuje čtyři různé membránové domény. První doména se nazývá „sealing zone“ a upevňuje osteoklast k povrchu kosti. Na periférii zralých osteoklastů je velké množství vláknitého aktinu (F-aktin), který tvoří prstencovou strukturu (F-aktinový kroužek) (Phan *et al.*, 2004). Jedná se o typický znak osteoklastů, barvitelný Phalloidinem. Po vytvoření „sealing zone“ dochází k její polarizaci, což usnadňuje vytvoření dalších membránových domén: bazolaterální membrána a zvlněný lem. Bazolaterální membrána je vystavena vnějšímu prostředí a není zcela homogenní, mohou v ní být přítomny další membrány, například sekretorická membrána, která slouží k exocytóze váčků. Zvlněný lem je oblast osteoklastu, kde dochází k resorpci kosti (Kim *et al.*, 2020).

Při degradaci kosti je nejprve rozpuštěna anorganická část kosti, které je tvořena především hydroxyapatitem. Dochází k okyselení intracelulárních váčků a sekreci kyselin, jako je kyselina chlorovodíková, která udržuje nízké pH v resorpčních lakunách.

Pro udržení nízkého pH mají osteoklasty protonovou ATPázovou pumpu, pro kterou generuje protony CA II (Baron *et al.*, 1985). Díky nízkému pH dochází k odbourávání hydroxyapatitu a následně k odbourávání organické části extracelulární matrix. Organická část kosti je tvořena především KOL I a na její degradaci se podílí řada proteáz a proteolytických enzymů produkovaných osteoklasty. Mezi nejvýznamnější patří matrixové metaloproteinázy (MMP), především MMP-1, MMP-9. Další lyzozomální cysteinové proteinázy, především katepsin K (CK), které mohou štěpit kolagen (Delaissé *et al.*, 2003).

3.2 Remodelace kosti

Remodelace kosti je velice komplexní proces, ve kterém je zahrnuto široké spektrum buněk. Na remodelaci kosti se podílejí především osteoklasty, osteoblasty, osteocyty a kost lemující buňky, které společně tvoří dočasnou anatomickou strukturu nazývanou se základní mnohobuněčná jednotka (basic multicellular unit, BMU) (Rosenberg *et al.*, 2012, Florencio-Silva *et al.*, 2015). Obvykle se rozděluje do čtyř fází: (1) aktivační fáze, kdy preosteoklasty migrují do místa poškození kosti, (2) fáze resorpce, kdy dochází k resorpci poškozené kosti již zralými osteoklasty, (3) fáze reverzní, kdy osteoklasty odumírají a do místa resorpce jsou atrahovány progenitory osteoblastů a (4) fáze tvorby kosti, kdy dochází k produkci nové kostní matrix zralými osteoblasty, osteoidu, která je následně mineralizována (obrázek č. 3) (Kim *et al.*, 2020).



Obrázek č. 3: **Fáze remodelace kosti:** Po stimulaci buněk osteoblastové linie (např. hormony, mechanicky) tyto buňky produkují faktory (např. M-CSF a RANKL), které stimulují diferenciaci hematopoetických buněk v osteoklasty. Osteoklasty resorbují kost a vytváří resorpční lakunu. Následně místo resorpce opouštějí a podstoupí apoptózu. V místě resorpční lakuny mononukleární buňky diferencují na makrofágy a odstraňují zbývající debris. Poté makrofágy uvolňují resorpční lakunu a nastává produkce a mineralizace nové kostní matrix osteoblasty. Během tohoto procesu některé osteoblasty diferencují v osteocyty (Kohli *et al.*, 2018) (Upraveno dle Kapinas *et Delany*, 2011).

3.2.1.1 Faktory regulující remodelaci kosti

Během kostní remodelace dochází mezi buňkami k přímé i nepřímé komunikaci, která ovlivňuje celý tento proces. Jedná se o velice komplexní systém, ve kterém je zahrnuto široké spektrum molekul s odlišnou funkcí. Pro představu komplexity tohoto systému jsou dále popsány hlavní molekuly účastníci se kostní remodelace (tabulka č. 1). Jako zdroje těchto molekul byly uváděny především kostní buňky, ačkoliv je mohou produkovat i další buněčné typy.

Tvorba, proliferace, diferenciaci a aktivita kostních buněk je řízena lokálními a systémovými faktory. Lokální faktory zahrnují autokrinní a parakrinní molekuly, jako jsou růstové faktory, cytokiny a prostaglandiny. Klíčovou roli v kostní remodelaci má osa RANKL-RANK-OPG a zachování její rovnováhy je nezbytné pro správnou přestavbu kosti. Na kostní rovnováhu mají vliv i solubilní faktory uvolněné z kostní matrix během resorpce, např. IGF, TGF- β , BMP, FGF PDGF. Osteoklasty také produkují semaforiny, které inhibují diferenciaci a aktivitu osteoblastů, aby mohlo dojít k odstranění poškozené nebo staré kosti. Oproti tomu produkují také řadu faktorů, které naopak stimulují diferenciaci osteoblastů a tvorbu nové kostní hmoty, např. Wnt10b, BMP, či sfingolipidy (Florencio-Silva *et al.*, 2015). Mezi systémové faktory, které jsou důležité pro udržení kostní homeostázy, patří celá řada hormonů, např. tyroidní hormony, růstový hormon, progesteron, estrogen, androgeny, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ nebo PTH. Mechanismus účinku těchto hormonů je velmi široký, mohou hrát roli jak v tvorbě nové kostní tkáně, tak v její resorpci, nebo se podílet na regulaci hladin vápníku a fosfátu (Siddiqui *et Partridge*, 2016, Wein *et Kronenberg*, 2018).

Na remodelaci kosti má velký vliv i imunitní systém, jelikož rovnováha mezi tvorbou a resorpcí kosti je také udržována regulací cytokinových sítí. Zatímco fyziologické hladiny cytokinů jsou důležité pro udržení integrity kosti, dysregulované a patofyziologické hladiny cytokinů jsou klíčovými hráči ve vývoji kostních onemocnění jako je osteoporóza nebo revmatoidní artritida (Farmer *et al.*, 2000). Cytokiny podporující osteoklastogenezi jsou TNF- α , IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-15, IL-17, IL-23, a IL-34 a cytokiny spojované s inhibicí osteoklastogeneze jsou IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-3, IL-4, IL-10, IL-12, IL-27, a IL-33 (Amarasekara *et al.*, 2018). Při některých patologických stavech organismu mají i nezralé DC potenciál diferencovat v osteoklasty po stimulaci M-CSF a RANKL (Wu *et al.*, 2019). Neutrofily, T a B lymfocyty se také podílejí na remodelaci kostí např. produkcí cytokinů modulujících dráhu RANKL/RANK/OPG (Lisowska *et al.*, 2018).

Tabulka č. 1: Faktory ovlivňující remodelaci kosti.

Faktory	Zdroje	Hlavní funkce při kostní remodelaci	Autor
BMP2 (Kostní morfogenetický protein 2)	Osteoblasty, kostní matrix, MSC	Osteogeneze – indukují expresi <i>Osx</i> a <i>Runx2</i> u progenitorových buněk osteoblastů.	(Capulli <i>et al.</i> , 2014)
CTHRC1 (kolagenové trojitě šroubovice obsahující repetice 1)	zralé resorbující osteoklasty	Stimulace osteogeneze u stromálních buněk.	(Takeshita <i>et al.</i> , 2013)
Estrogen	Folikulární buňky	Inhibice resorpce – stimulace OPG, inhibice RANKL u osteoblastů, modulace signalizace RANK receptoru v osteoklastech, indukce apoptózy osteoklastů; inhibice IL-1, IL-6 a TNF- α .	(Khosla <i>et al.</i> , 2011) (Zheng <i>et al.</i> , 1997)
FGF2,9,18 (Fibroblastové růstové faktory)	Osteoblasty, MSC, makrofágy	osteoblastogeneze	(Charoenlarp <i>et al.</i> , 2017)
HGF (Hepatocytární růstový faktor)	Osteoklasty, osteoblasty	Zvýšení intracelulární koncentrace Ca ²⁺ , ovlivňuje tvar a migraci osteoklastů.	(Grano <i>et al.</i> , 1996)
IGF-I (růstový faktor podobný inzulinu I)	Stromální buňky v místě formování osteoklastů	Stimulace osteoklastogeneze vazbou na receptor IGF-I – exprese <i>c-fms</i> a RANK u PBMC, produkce M-CSF a RANKL u stromálních buněk.	(Rubin <i>et al.</i> , 2002)
IL-1	Stromální buňky a další buněčné typy	Stimulace osteoklastogeneze – zvyšuje hladiny M-CSF, PGE2 a snižuje hladiny OPG.	(Tanabe <i>et al.</i> , 2005).
IL-11	Stromální buňky a další buněčné typy	Stimulace formování osteoklastů a kostní remodelace.	(Kespohl <i>et al.</i> , 2021)
IL-6	Stromální buňky a další buněčné typy	Stimulace formování osteoklastů a kostní remodelace.	(Liu, 2006)
Katepsin K	Osteoklasty	Degradace kolagenu a dalších proteinů během kostní resorpce.	(Delaisé <i>et al.</i> , 2003).
LPA (Kyselina lysofosfatidová)	Osteoblasty a několik dalších buněk	Fúze progenitorových buněk osteoklastů.	(McMichael <i>et al.</i> , 2010)
MCP-1/CCL2 (ligand chemokinu s C-C motivem 2)	Osteoblasty, typicky při zánětu	Migrace prekurzorů osteoklastů.	(Li <i>et al.</i> , 2007)
PDGF (růstový faktor odvozený od krevních destiček)	Osteoblasty a další buněčné typy	Tvorba kosti, mineralizace.	(Davies <i>et al.</i> , 2018)
PGE2	Osteoblasty, MSC a další buňky	Inhibice OPG v osteoblastech, stimulaci produkce RANKL v osteoblastech a zvýšení exprese RANK receptoru v osteoklastech, stimulace produkce IL-6.	(Liu, 2006)

PTH	Příštítná tělíska	Regulace kostního metabolismu – stimulace formování nové kostní hmoty osteoblasty; regulace metabolismu vápníku a fosfátu.	(Wein <i>et Kronenberg</i> , 2018)
S1P (sfingosin-1-fosfát)	Osteoklasty a další	Migrace prekursorů osteoblastů, podpora přežití zralých osteoblastů.	Pederson <i>et al.</i> , 2008)
Semaphorin 4D	osteoklasty	Vazbou na plexin-B1 receptor na osteoblastech inhibuje tvorbu kostní tkáně, inhibuje aktivitu ALP.	(Zhang <i>et al.</i> , 2015)
Sklerostin	Osteoblasty, osteocyty, osteoklasty	Inhibice tvorby kostní tkáně osteoblasty.	(Pietrzyk <i>et al.</i> , 2017)
Složka C3 komplementu	Osteoklasty a další	Stimulace diferenciací osteoblastů, zvýšení aktivity ALP u osteoblastů.	(Matsuoka <i>et al.</i> , 2014)
TGF- β (Transformující růstový faktor β)	Kostní matrix během resorpce, stromální buňky	Ovlivňuje aktivitu osteoblastů, migraci buněk, expresi RANKL.	(Chen <i>et al.</i> , 2018)
TNF- α	Stromální buňky a další buněčné typy	Stimulace exprese RANKL a M-CSF osteoblasty, osteocyty a dalšími stromálními buňkami.	(Marahleh <i>et al.</i> , 2019)
1 α ,25-dihydroxyvitamin D ₃	Keratinocyty, ledviny, osteoblasty	Regulace formování i resorpce kostí. Stimulace RANKL a inhibice OPG ve stromálních buňkách a aktivace receptoru RANK na prekurzorech osteoklastů.	(Bikle, 2011)

3.3 *In vitro* modely

Pro hlubší pochopení buněčné morfologie, procesu diferenciací, či signálních drah se běžně využívají monokultury. V těchto systémech ale není možné sledovat buněčnou komunikaci mezi různými typy buněk, která je pro studium kostní remodelace klíčová. Výhody využití *in vitro* ko-kultur oproti monokulturám spočívají ve větší podobnosti *in vivo* situaci, kdy spolu buňky mohou komunikovat pomocí mezibuněčných signálů, například prostřednictvím přímého spojení nebo exozomů a rozpustných signálních molekul. Pro správnou funkčnost systému je třeba správně zvolit parametry pro koexistenci obou typů buněk, například jejich poměr, sdílené kultivační médium, dobu kultivace, vhodnou suplementaci a adekvátní metody pro rozlišení kultivovaných typů buněk. Při správně zvoleném nastavení nám *in vitro* ko-kultury mohou poskytnout rozšíření znalostí o přímé i nepřímé komunikaci mezi buňkami (Borciani *et al.*, 2020).

Pro vytvoření ko-kultury se používají jak primární buňky, tak buněčné linie. Výhodou použití primárních buněk je přiblížení se fyziologické situaci a případně jejich možnost dalšího využití v regenerativní medicíně. Nevýhodou oproti liniím, je jejich

dostupnost a také délka jejich kultivace. Po čase totiž dochází k ukončení proliferace Hayflickovým limitem. Oproti tomu linie je možné kultivovat neomezeně dlouho, ale mohou mít odlišné vlastnosti (Pastor *et al.*, 2010, Borciani *et al.*, 2020).

Pro studium kostní remodelace se typicky ko-kultivují osteoblasty a osteoklasty. Jako zdroj primárních osteoblastů se často používají MSC, které lze izolovat z kostní dřene, periferní krve či tukové tkáně a následně u nich indukovat diferenciaci v osteoblasty (Borciani *et al.*, 2020). Osteoblasty je také možné izolovat pomocí explantační metody z kostí zvířat, kdy buňky spontánně migrují z použitých explantátů (Czekanska *et al.*, 2012). Primární prekurzory osteoklastů se typicky získávají z periferní krve, konkrétně odběrem „buffy coatu“ po centrifugaci. Izolované buňky je možné specifikovat a pro další kultivaci jsou často používány CD14⁺ (cluster of differentiation, CD) buňky. Potenciál tvořit osteoklasty *in vitro* mají také buňky izolované ze sleziny (Borciani *et al.*, 2020). Protože je ale obtížné osteoklasty izolovat, purifikovat a kultivovat *in vitro* a také nelze zakládat subkultury, je studium OC náročné. Z tohoto důvodu se jako prekurzory osteoklastů často používají buněčné linie, např. THP-1, RAW 264.7. Při využití linií u osteoblastů se typicky používají linie Saos-2, MC3T3-E1, MG-63. (Schröder *et al.*, 2012, Jeon *et al.*, 2016, Sun *et al.*, 2016, Pagani *et al.*, 2018). Jedna z nejčastěji používaných buněčných linií prekurzorů osteoklastů, RAW264.7, byla založena z nádoru indukovaného virem myši leukémie Abelson. Z tohoto důvodu mohou existovat biologické nesrovnalosti a výsledky získané pomocí této buněčné linie mohou být kontroverzní. Buněčné linie RAW264.7 mohou diferencovat v osteoklasty po přidání TNF- α i bez přítomnosti RANKL (Moreno *et al.*, 2003).

Buňky lze následně ko-kultivovat několika různými způsoby ve 2D a 3D systémech. Výhodou využití 3D systémů je přiblížení se organizovanému mikroprostředí v lidském těle. Rozlišovány jsou také přímé a nepřímé ko-kultury. U nepřímých ko-kultur je sledován vliv rozpustných molekul, jelikož nedochází k přímému kontaktu mezi buňkami. Vývojem nových nosičů a způsobů kultivace se zabývá obor tkáňového inženýrství.

3.3.1 Suplementy používané pro stimulaci osteoklastogeneze *in vitro*

Cílem několika studií bylo navodit osteoklastogenezi v ko-kultuře. Autoři studie Schulze *et al.*, 2018 indukovali tvorbu osteoklastů v přítomnosti osteoblastů, bez přidaných suplementů. Osteoblasty hrají v osteoklastogenezi zásadní roli, např. produkcí M-CSF a RANKL. Autoři studie Burgess *et al.*, 1999 ukázaly, že rozpustný

rekombinantní RANKL spolu s M-CSF přímo indukují tvorbu osteoklastů *in vitro*, a to i v nepřítomnosti osteoblastů. K navození osteoklastogeneze v ko-kultuře se dají využít suplementy ovlivňující osu RANKL-RANK-OPG, která má zásadní význam při formování osteoklastů. Mezi tyto suplementy patří např. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ nebo PGE2.

3.3.1.1 PGE2

Prostaglandin E2 je tkáňový hormon patřící mezi prostanoidy. Jedná se o důležité mediátory, které mají mnoho funkcí v biologických procesech, jako je bolest, horečka, regenerace, zánět nebo vaskulární oběh. Mají také zásadní vliv na funkci kostního metabolismu. PGE2 vzniká z kyseliny arachidonové pomocí cyklooxygenázy 1 (COX1), která exprimována konstitutivně, a COX2, která je exprimována inducibilně (Sander *et al.*, 2017). PGE2 je produkován mnoha buňkami, včetně makrofágů, fibroblastů a stromálními buňkami, zejména osteoblasty (Sander *et al.*, 2017). Produkce PGE2 je stimulována několika prozánětlivými cytokiny, jako je IL-1, IL-6 a TNF- α , a to zejména jejich společným působením (Park *et al.*, 2004).

PGE2 působí skrze receptory spřaženými s G proteiny – EP1R, EP2R, EP3R, EP4R. Signalizace skrze EP1R zvyšuje hladinu intracelulárního Ca²⁺ aktivací proteinkinázy C (Legler *et al.*, 2010) a potlačuje tak tvorbu kosti. Vazba PGE2 na EP2R i EP4R stimuluje adenylátcyklázu, čímž dochází ke zvýšené tvorbě cyklického adenosin monofosfátu (cAMP) a expresi BMP-2 a RANKL. Tyto faktory zlepšují hojení a regeneraci kostí (Suzawa *et al.*, 2000). Senzorické nervy snímají hustotu kostí právě prostřednictvím PGE2 a jeho vazba na EP4R reguluje aktivitu sympatického nervu pro tvorbu kosti osteoblasty skrze centrální nervový systém (Chen *et al.*, 2019). PGE2 také prostřednictvím EP2R zvyšuje expresi c-Fos, který řídí diferenciaci osteoblastů a osteoklastů. Vazba PGE2 na EP3R však poskytuje opačný účinek inhibicí adenylátcyklázy a omezenou syntézou cAMP (Sander *et al.*, 2017, Lisowska *et al.*, 2018).

Účinek PGE2 na osteoklastogenezi se liší v závislosti na koncentraci a načasování podávání. Studie Tian *et al.*, 2007 ukázala, že kontinuálně podávaný PGE2 významně stimuloval kostní resorpci, zatímco přerušované podávání vedlo ke kostní tvorbě. Mechanismus účinku PGE2 na kostní metabolismus ale není doposud zcela objasněn. V *in vitro* podmínkách může mít PGE2 jak stimulační, tak inhibiční efekt na osteoklastogenezi v závislosti na koncentraci a fázi diferenciaci osteoklastů, ke kterým je PGE2 přidáván (Lutter *et al.*, 2016). Bylo zjištěno, že exogenní PGE2 stimuluje kostní

resorpci v orgánových kulturách a v kulturách buněk kostní dřene, zatímco inhibice kostní resorpce byla pozorována u osteoklastů izolovaných z kostí potkanů (Fuller *et al.*, 1989, Take *et al.*, 2005). Přítomnost osteoblastů v ko-kultuře má zásadní modulační efekt na tvorbu osteoklastů z buněčných prekurzorů (Kaji *et al.*, 2009), jelikož PGE2 stimuluje osteoklastogenezi inhibicí OPG a stimulací produkce RANKL v osteoblastech a RANK receptoru v osteoklastech (Liu, 2006).

PGE2 je také silným imunomodulátorem. Inhibuje Th1 odpověď a podporuje odpověď Th2 a Th17 (Kalinski, 2012). Stimuluje také produkci IL-1 v osteoblastech, který zvyšuje expresi RANKL a snižuje expresi OPG, čímž PGE2 nepřímo podporuje formování osteoklastů (Suda *et al.*, 2004). Stejně tak může stimulovat produkci IL-6 (Gruber *et al.*, 2000) a TNF, které zvyšují expresi RANKL a podporují osteoklastogenezi (Suzawa *et al.*, 2000, Park *et al.*, 2017). Produkce IL-6 také zvyšuje produkci PGE2, COX2 a expresi EPOR4/EPOR2 v kostních buňkách (Liu, 2006). Další *in vitro* studie podpořily roli zánětlivých cytokinů při kostní resorpci. Přidávání IL-1 α do ko-kultury vedlo ke zvýšení exprese M-CSF, PGE2 a snížení exprese OPG (Tanabe *et al.*, 2005).

Dlouhodobá a nadměrná produkce PGE2, např. při chronickém zánětu, může přispívat k rozvoji onemocnění, jako je osteoporóza nebo revmatoidní artritida. Nedávno byla také zjištěna korelace mezi zvýšenou hladinou PGE2 během poklesu kostní hustoty u různých zvířecích modelů, včetně osteoporotických myší (Chen *et al.*, 2019).

3.3.1.2 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃

Vitamin D je nezbytný pro metabolismus vápníku a fosfátu a je získáván ze slunečního záření. Známý jsou dvě formy: vitamin D₃ a vitamin D₂. Vitamin D se v játrech přeměňuje pomocí 25-hydroxylázy na 25-hydroxyvitamin D, který je následně pomocí D-1 α -hydroxylázy v ledvinách přeměněn na aktivní formu 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, neboli kalcitriol (Charoenngam *et al.*, 2019). Jedná se o steroidní hormon důležitý pro kostní remodelaci i funkci imunitního systému. Expresí receptoru pro vitamin D (VDR) byla pozorována u osteoblastů, osteocytů, osteoklastů a jejich prekurzorů. Tyto buňky mohou lokálně syntetizovat aktivní metabolit 1 α ,25-dihydroxyvitaminu D₃, pomocí exprese CYP27B1, a také mají schopnost lokálně katabolizovat vitamin D expresí enzymu CYP24A1 (St-Arnaud, 2008). Účinek 1 α ,25-dihydroxyvitaminu D₃ na osteoklastogenezi je zprostředkován skrze stimulaci osteoblastů a osteocytů k produkci RANKL a inhibici OPG (Zarei *et al.*, 2016). 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ zároveň podporuje formaci a mineralizaci nové kostní tkáně.

Analogy Eldecalcitol a Alfacalcidol, byly použity jako terapeutická činidla pro osteoporózu, protože zvyšují hustotu minerálů v kosti. V *in vivo* podmínkách se $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 nejspíše vyskytuje v odlišné koncentraci než při studiích *in vitro* a může snižovat počet prekurzorů osteoklastů (Suda *et al.*, 2012).

V *in vitro* podmínkách $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 podporuje osteoklastogenezi v orgánových kulturách (Lee *et al.*, 2002) a zvyšuje aktivitu zralých osteoklastů v závislosti na použitém typu buněk a modelových organismech (Takeda *et al.*, 1999) (Zarei *et al.*, 2016). Oproti tomu v kultuře buněk kostní dřene působil $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 inhibičně na osteoklastogenezi i na kostní resorpci (Wang *et al.*, 2015a). Studie Kogawa *et al.*, 2010 ukázala, že $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 podporuje formaci kosti, ale inhibuje resorpční aktivitu zralých osteoklastů odvozených z lidských PBMC a buněčné linie RAW 264.7 V myším modelu, kde byly použity osteoblasty izolované z oblasti kalvárie a hemopoetických slezinných buňkách $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 v kombinaci s IL-1 stimuloval osteoklastogenezi skrze stimulaci osteoblastů k produkci RANKL a inhibici OPG (Lee *et al.*, 2002). $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 také inhibuje produkci IL-2 v T lymfocytech a stimuluje produkci IL- 1β v monocytech/makrofázích (Bhalla *et al.*, 1986). Osteoblasty reagují na přítomnost $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D_3 produkcí cytokinů IL-1 a IL-6 (Miao *et Scutt*, 2002).

Reakce na $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 může být snížena u pacientů s osteoporózou a revmatoidní artritidou. Při těchto poruchách je nadměrně produkován TNF- α , který přispívá ke ztrátě kostní hmoty stimulací buněčné rezistence vůči $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D_3 (Farmer *et al.*, 2000).

3.4 Osteoporóza

Osteoporóza je porucha remodelace kostí charakteristická úbytkem kostní hmoty a strukturálním poškozením kosti, což snižuje její pevnost a vede ke zvýšené náchylnosti ke zlomeninám (Raisz, 2005). Z hlediska příčiny se tradičně klasifikuje na primární a sekundární typ. Mezi primární typ je řazena postmenopauzální osteoporóza, způsobená nedostatkem estrogenu, který u žen klesá v důsledku menopauzy. Dále i senilní osteoporóza, ke které dochází přirozeným procesem stárnutí. Mezi sekundární typ patří osteoporóza zapříčiněná nežádoucí reakcí na léčbu např. glukokortikoidy, konkordancí s jiným onemocněním nebo snížením fyzické aktivity v důsledku imobilizace (Feng *et McDonald*, 2011). Nedostatek vápníku a vitamínu D ve stravě zvyšuje kostní obrat, což

vede ke ztrátě kostní hmoty, a také nepříznivě ovlivňuje mineralizaci kostí, čímž se zvyšuje riziko zlomenin.

3.4.1 Postmenopauzální osteoporóza

Postmenopauzální osteoporóza je způsobena primárně poklesem hladin estrogenu v souvislosti s menopauzou. Nedostatek estrogenu pak vede ke zrychlení kostního obratu, avšak resorpce kosti převyšuje kostní tvorbu, což způsobuje nerovnováhu kostní remodelace. Estrogen stimuluje produkci OPG a snižuje produkci RANKL u osteoblastů. Potlačuje také produkci pro-zánětlivých cytokinů podporujících resorpci kosti, např. IL-1, IL-6 a TNF- α (Feng *et* McDonald, 2011). Snížením hladin estrogenu po menopauze dochází ke zvýšení produkce těchto pro-zánětlivých cytokinů a také M-CSF a RANKL u monocytů, lymfoidních a stromálních buněk. Zvýšené hladiny těchto faktorů stimulují diferenciaci myeloidních prekursorových buněk v osteoklasty (Salamanna *et al.*, 2015). Nedostatek estrogenu u potkanů s indukovanou osteoporózou pomocí ovariektomie vedl ke zvýšení počtu osteoklastů a ke zvýšené resorpci kosti (Saleh *et al.*, 2020). Studie Zheng *et al.*, 1997 ukázala zvýšení hladin cytokinů IL-1, IL-6 a TNF- α v krvi pacientek s postmenopauzální osteoporózou, u kterých byla také pozorována zrychlená přestavba kosti. Mechanismus působení estrogenu je ale velmi široký, estrogen také moduluje produkci IL1-RA, antagonistického receptoru pro IL-1, který má vyšší expresi u zdravých postmenopauzálních žen, ale nikoliv u žen trpících osteoporózou (Pacifci *et al.*, 1993). Estrogen může také vyvolat apoptózu osteoklastů zvýšením FasL v osteoblastech, což vede k apoptóze preosteoklastů/osteoklastů s FasR (Krum *et al.*, 2008). U myši s indukovanou osteoporózou pomocí OVX byla exprese FasL u osteoblastů snížena, čímž dochází ke snížené schopnosti indukovat apoptózu osteoklastů. Je zajímavé, že exprese FasR je u prekursorů osteoklastů nižší, než u zralých osteoklastů (Wang *et al.*, 2015b).

Estrogen redukuje osteoklastogenezi skrze osteoblasty a také zřejmě působením skrze T lymfocyty. U osteoklastů a jejich prekursorů estrogen také moduluje signalizaci RANK receptoru a hraje roli v diferenciaci osteoblastů (Khosla *et al.*, 2011). Estrogen je důležitý i pro udržení kostní tvorby, zvýšením počtu osteoblastů v místech kostní remodelace nebo zvýšením viability osteoblastů (Khastgir *et al.*, 2001).

3.4.2 Léčba osteoporózy

Současná léčba osteoporózy je fyzikální, dietní nebo farmakologická. Používá se např. léčba bisfosfonáty, hormony, nebo monoklonálními protilátkami. Mezi bisfosfonáty

patří mimo jiné alendronát, ibandronát, nebo kyselina zolendrová. Bisfosfonáty potlačují kostní obrat tím, že inhibují enzym farnesylpyrofosfát syntetázu, který je nezbytný pro tvorbu cytoskeletu u osteoklastů, čímž dochází k potlačení resorpce kosti (Tella *et* Gallagher, 2014). Podávání bisfosfonátů ale může způsobovat gastrointestinální potíže, jako je zánět jícnu nebo žaludeční potíže (Lanza, 2002). V léčbě osteoporózy se také využívá hormonální terapie, např. podávání estrogeneru či progesteronu, nebo jejich kombinace. Tato terapie ale může mít závažné vedlejší účinky, jako je rakovina prsu nebo hyperplazie endometria. Zdá se, že vedlejší účinky jsou silně závislé na dávce a načasování podávání (Levin *et al.*, 2018). Mezi hormonální terapii patří také podávání rekombinantního lidského parathormonu (PTH; přípravek Teriparatid/Forteo), který bývá podáván pacientům nereagujícím na bisfosfonáty. Nicméně i tato léčba má vedlejší účinky a je spojována s výskytem osteosarkomu u pacientů léčených PTH (Gilsenan *et al.*, 2018).

V léčbě osteoporózy se využívají také monoklonální protilátky. První schválenou monoklonální protilátkou proti RANKL byl Denosumab (přípravek Prolia). Má silnou účinnost a pomáhá předcházet zlomeninám páteře a kyčle. Podává se jednou za šest měsíců a potlačuje kostní resorpci o 80-90 %. Na rozdíl od bisfosfonátů anti-resorpční účinek Denosumabu ustupuje za 4-6 měsíců, tudíž nedochází k celkovému potlačení kostní remodelace a zajišťuje tak jistou bezpečnost. Na druhou stranu, jelikož anti-resorpční účinek rychle klesá, hrozí po ukončení léčby návrat zvýšeného rizika zlomenin (Cummings *et al.*, 2009, Zebaze *et al.*, 2016). Další používanou monoklonální protilátkou proti osteoporóze je Romosozumab. Tato monoklonální protilátka se vážně na sklerostin a pomáhá podporovat kostní novotvorbu a inhibovat resorpci kosti. Sklerostin je přirozeně sekretován osteocyty a jedná se o negativní regulátor kostní novotvorby. Inhibuje Wnt signalizaci, nezbytnou pro vývoj a funkci osteoblastů. Inhibicí sklerostinu je tedy podpořen vývoj osteoblastů a tvorba nové kostní hmoty. Podávání Romosozumabu pomáhá předcházet zlomeninám páteře a zvyšuje kostní novotvorbu a minerální hustotu kostí o 13-15 % za jeden rok (Li *et al.*, 2009, Cosman *et al.*, 2016).

Navzdory pozitivním účinkům při podávání bisfosfonátů, nebo při hormonální terapii nelze pominout vedlejší účinky, které jsou s těmito způsoby léčby spojeny. Je proto zřejmé, že hlubší porozumění mechanismům onemocnění i kostní remodelace je nezbytné pro zlepšení současné léčby a prevence. Výzkum pro léčbu osteoporózy se proto v současnosti zaměřuje na mechanismy aktivující kostní progenitorové buňky, procesy

řídící apoptózu nebo na osteolytické enzymy, jako nový směr potenciální léčby (Stoch *et Wagner*, 2008).

3.4.3 *In vivo* model osteoporózy

Pro *in vivo* modely osteoporózy se jako modelová zvířata se používají myši, ovce, primáti vyjma člověka, ale nejrozšířenějším modelovým zvířetem je potkan. Potkani dosahují pohlavní zralosti ve věku 2,5 měsíce, ale jejich kostra je považovaná za dokončenou ve věku 10 měsíců. Z tohoto důvodu se potkani často používají jako modelová zvířata v tomto časovém rozmezí, kdy skelet není zcela dokončen a obsahuje málo kostní hmoty, což je rizikový faktor i pro lidské zlomeniny v důsledku osteoporózy. Jedná se také o velmi dostupné modelové zvíře, nenáročné na chov. Osteoporóza se u potkanů indukuje několika způsoby. Jedním z nich je imobilizace, která může být provedena chirurgicky (odstraněním nervů, šlach, míchy) nebo bandáží končetin. Další možností, jak indukovat osteoporózu je úpravou stravy. Zvířatům je podávána strava, která neobsahuje téměř žádné nebo nízké hladiny vápníku, nebo obsahující alkohol či glukokortikoidy. Jedná se o faktory, které mohou vyvolávat osteoporózu i u lidí. Pro výzkum postmenopauzální osteoporózy se osteoporóza indukuje pomocí ovariektomie (Lelovas *et al.*, 2008, Komori, 2015).

Ovariektomie u potkanů vyvolává zvýšenou kostní resorpci, kterou lze pozorovat pomocí histologického vyšetření, sníženou hladinou vápníku a fosforu v krvi, či zvýšenou hodnotou ALP, která indikuje zrychlenou přestavbu kosti (Saleh *et al.*, 2020). Další možností pro ověření osteoporózy pomocí ovariektomie je stanovení hladin osteokalcinu (během kostní tvorby se jeho hladina zvyšuje), β -crosslaps (během degradace kosti se jeho hladina zvyšuje), estradiolu nebo estrogenu (ženské pohlavní hormony, po ovariektomii/menopauze jejich hladina klesá) a C-terminálního telopeptidu kolagenu typu I (Yoon *et al.*, 2012, Chung *et al.*, 2021).

4. Materiál a metody

4.1 Zvířata

Na pokusy byly použity zdravé a ovariektomizované (OVX) samice outbredních potkanů typu Wistar. Zdravé samice byly ve věku 3 měsíců. OVX samice podstoupily ve věku 6 měsíců ovariektomii a následně byly chovány do věku 12 měsíců. Zdravé samice byly chovány za standartních podmínek v chovech na Fyziologickém ústavu Akademie věd České republiky, v. v. i (FGÚ AV ČR). OVX samice byly chovány v Biomedicinském centru, Lékařské fakulty v Plzni, Univerzity Karlovy.

4.2 Roztoky, média a chemikálie

Osteoblasty byly kultivovány v médiu Dulbecco's modified Eagle's medium – high glucose with glutamine (DMEM, Sigma-Aldrich, USA) a PBMC/osteoklasty v médiu Dulbecco's modified Eagle's medium – high glucose without glutamine (DMEM-Q, EuroClone, Itálie) Do média DMEM bylo přidáno 10% tepelně inaktivovaného fetálního bovinního séra (FBS, fetal bovine serum) a antibiotika penicilin (P, 100 U/ml) /streptomycin (S, 100 µg/ml). Do média DMEM-Q bylo přidáno 10% FBS, 2mM L-glutamin, P/S (100 U/ml). Pro ko-kultivaci osteoblastů a osteoklastů byl vybrán poměr těchto médií 1:1. V tabulce č. 2 je uveden seznam použitých chemikálií a v tabulce č. 3 seznam používaných přístrojů.

Tabulka č. 2: **Abecední seznam použitých chemikálií**

Název chemikálie	Výrobce	Země původu	Katalogové číslo
1 – Step PNPP	Thermo Scientific	USA	37621
1 α 25-dihydroxyvitamin D ₃	Sigma Aldrich	USA	17936 -100UG-F
4 – Nitrophenol, spectrophotometric grade	Sigma Aldrich	USA	1048-5G
4-NPO	Sigma Aldrich	USA	1048-56
Acetát sodný	Sigma Aldrich	USA	S5636-250G
Aceton	AppliChem	Německo	A1600.1000
Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) kit	Sigma Aldrich	USA	387A-1KT
Bio-Plex Calibration Kit	Bio-Rad Laboratories	USA	171-203060
Bio-Plex Pro™ Reagent Kit V rat, TNF- α , IL-6, IL-1 β	Bio-Rad Laboratories	USA	12002798
Bio-Plex Validation Kit 4.0	Bio-Rad Laboratories	USA	171-203001
BoneTRAP (TRAcP 5b) ELISA	Immunodiagnostic Systems	USA	SB-TR2014A

Carbonic Anhydrase II Activity Assay kit	BioVision (distributor Biotech)	USA	BV-K472-100
CellTiter 96® Aqueous MTS Reagent Powder	Promega corp.	USA	G1112
Collagenase Type I 300U/mg	Life Technologies	USA	17100-017
Collagenase Type II 210U/mg	Life Technologies	USA	17101-015
DAPI, D9542 – 10MG	Sigma Aldrich	USA	D9542
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich	USA	D2438-50ML
DiOC6(3)	Enzo	Německo	D273
DMEM high glucose	Sigma Aldrich	USA	D6429
DMEM high glucose, bez L-glutaminu	Euroclone	Itálie	ECB7501L
EDTA 2% solution	Sigma Aldrich	USA	2854
Etanol 96%	Penta	ČR	70390-12500
FBS	Gibco	USA	10270-106
Ficoll® Paque Plus	Sigma Aldrich	USA	GE17-1440-02
Formaldehyd p.a. 36-38%	Penta	ČR	14150-11000
HBSS	LifeTechnologies	USA	14175095
Hematoxylin solution, gill No. 3	Sigma Aldrich	USA	GHS3-50ML
Heparin	Zentiva	ČR	16/171/69-C
Hoechst 34580	Life Technologies	USA	H21486
Human M-CSF	Peprtech	USA	AF-300-25
Human RANKL	Peprtech	USA	AF-310-01
Hydroxid sodný p.a.	Penta	ČR	15760-31000
Chlorid sodný p.a.	Penta	ČR	16610-31000
INF- γ	PreproTech	USA	AF-315-05
Kyselina chlorovodíková 35%	Penta	ČR	-
LPS	Difco Laboratories	USA	L2880
Metanol	Penta	ČR	21210-11000
Naphtol AS-BI phosphate	Sigma Aldrich	USA	N2125-500MG
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich	USA	16005
PBS	Složky od Penta	ČR	-
Penicilin/Streptomycin	Invitrogen	USA	15140-122
Phalloidin-iFluor555 Reagent, ab176756	Abcam	Velká Británie	AB176756
Prostaglandin E2	Sigma Aldrich	USA	P0409-1MG
Quant-iT™ dsDNA Assay	LifeTechnologies	USA	Q33120
Tartarát dihydrát sodný	Sigma Aldrich	USA	PHR1409-4X1G
Triton X-100	Sigma Aldrich	USA	T8787-100ML
Trizma hydrochloride (TRIS - Tris(hydroxymethyl)amino- methane hydrochloride)	Sigma Aldrich	USA	75941-100G
TrypLE™ Express Enzyme (1X)	Gibco	USA	12604013
Trypsin EDTA 10x	Sigma Aldrich	USA	59418C
Tween 20	Sigma Aldrich	USA	P9416-50ML

4.3 Technické vybavení

Tabulka č. 3: Abecední seznam technického vybavení

Přístroj	Výrobní název	Výrobce	Země původu
Analytické váhy	T5939	Kern	Německo
Centrifuga	NF800R	Nüve	Turecko
Centrifuga	Spectrafuge 24D	Labnet	USA
CO2 inkubátor	2424-2	Shel Lab	USA
Fluorescenční reader	M200 Infinite Pro	Tecan	Švýcarsko
Konfokální mikroskop	Zeiss LSM 880 Airyscan	Zeiss	Německo
Laboratorní třepačka	Rotamax 120	Heidolph	Německo
Laminární box	Safe flow 1.2	Bioair	Itálie
Multiplexová analýza	Bio-Plex200 Systems	Bio-Rad	USA
Ohřívací lázeň	NB-301	BioTek	USA
Světelný mikroskop	TH4-200	Olympus	Japonsko
Vortex	S0200 Vortex Mixer	LabnetInternational	Mexiko

4.4 Použitý software

- Bio-Plex Manager 6.1 – ovládací software pro Bio-Plex
- GIMP 2.10.20 – úprava obrázků
- ImageJ – úprava obrázků a měřítek
- Microsoft Excel – vyhodnocení dat
- SigmaStat 4.0 - statistická analýza dat
- Tecan i-control , 1.10.4.0 – ovládací software spektrofotometru
- ZEN 2.3 SP1 – ovládací software pro konfokální mikroskopii

4.5 Izolace a kultivace osteoblastů

Osteoblasty byly izolovány z femuru potkanů pomocí explantační metody v kombinaci s enzymatickým ošetřením. Práce probíhala v laminárních boxu a všechny použité roztoky byly sterilní. Femury potkana byly opláchnuty v médiu DMEM s 1% P/S a mechanicky očištěny od měkkých tkání. Následně byly odstraněny epifýzy a diafýzy byly propláchnuty PBS pro odstranění kostní dřeně. Kostí byly nadrceny kleštěmi, přeneseny do 15 ml falkony (2 femury z jednoho zvířete) a 3x vortexovány s výměnou DMEM a 1% P/S. Následně byl přidán 1 ml Trypsinu s EDTOU (5x koncentrovaný) a probíhala 10 minut inkubace při 37°C na třepačce (0,90 g). Po uplynutí této doby byly kosti propláchnuty v médiu a byla přidána kolagenáza I (300 U/ml), opět 1ml. Kostí byly inkubovány při 37°C na třepačce, po dobu 30 minut. Po uplynutí této doby byly kosti propláchnuty v médiu a následně byl opět přidán 1 ml kolagenázy I. Falkony s kostmi byly opět inkubovány při 37°C, po dobu 1 hodiny. Následně byly kosti propláchnuty a

přendány do lahví se dnem potaženým kolagenem (125-50, Sigma-Aldrich). V těchto lahvích (75 cm²) byly kosti inkubovány při 37°C v 15 ml média složeného z DMEM, 10% FBS a P/S. Po 48 hodinách kultivace byly odumřelé buňky odstraněny výměnou média. Osteoblasty postupně vyrůstaly z kostí a proliferovaly až do doby, kdy dosahovaly cca 80% konfluence. Následně byly buňky opláchnuty v PBS a uvolněny ze dna kultivační láhve roztokem TrypLE™ Express Enzyme (1x). Buňky byly následně zamrazeny dle níže uvedeného postupu.

4.6 Izolace a kultivace mononukleárních buněk periferní krve

Krev z potkanů byla odebrána do falkon s heparinem. Tato krev byla následně poolována ze 4-6 jedinců a smíchána s HBSS (Hank's Balanced Salt solution, Gibco, USA) v poměru 1:1. Do 15 ml falkon byly napipetovány 3 ml Ficollu, na který se vrstvila krev s HBSS. Následně byly falkony stočeny při 360 g po dobu 30 minut při RT. Po uplynutí této doby byly izolované buňky periferní krve promyty v HBSS a také v HBSS stočeny při 402 g po dobu 10 minut při 16°C. Poté byly buňky opět resuspendovány v HBSS a stočeny při 280 g po dobu 10 minut při 16°C. Postup se opakoval a buňky byly stočeny při 120 g po dobu 10 minut při 16°C. Následně byly mononukleární buňky spočítány pomocí Bürkerovy komůrky a zamrazeny za pomoci dimethylsulfoxidu (DMSO) při -80°C.

4.7 Zmrazení a rozmrazení buněk

Pro zmrazení buněk byla připravena 2 média: DMEM nebo DMEM-Q (v závislosti na typu buněk) s přidaným 20% FBS a s/bez 20% DMSO. Obě složky byly předem vychlazeny v lednici po dobu 60 minut. Osteoblasty byly mrazeny po uvolnění z kultivační lahve v počtu do 2 milionů/vialka. PBMC byly mrazeny po izolaci z periferní krve v počtu 5 milionů/vialka. Buňky byly chlazeny v lednici v 0,5 ml média DMEM/DMEM-Q + 20% FBS po dobu 45 minut. Poté bylo do vialek přidáno 0,5 ml média s 20% DMSO a vialky byly přendány do zmrazovací nádoby s 250 ml isopropylalkoholu. Zmrazovací nádoba byla následně uložena do mrazáku při -80°C.

Pro rozmrazení buněk bylo připraveno klasické kultivační médium DMEM nebo DMEM-Q (viz výše). Vialky s buňkami byly vloženy do vodní lázně při 37°C. Po rozmrznutí obsahu bylo médium s buňkami přepipetováno do 15 ml nebo 50 ml falkony (v závislosti na počtu buněk) a po dobu 10 minut bylo postupně přidáváno malé množství připraveného média. Zkumavky byly následně stočeny při 258 g. Poté bylo médium odsáto a buňky resuspendovány v novém kultivačním médium.

Osteoblasty byly následně opět nasazeny do kultivační lahve a proliferovaly do doby, dokud nedosáhly 80% konfluence. Následně byly buňky uvolněny stejným způsobem, jako při izolaci z kostí (viz výše) a nasazeny do jamek. PBMC byly po rozmrazení nasazeny do jamky s osteoblasty v médiu DMEM-Q. Pro izolaci monocytů/makrofágů z PBMC se vychází z předpokladu, že jsou adherentní k plastu. Po nasazení mononukleárních buněk periferní krve do jamek se po 2 hodinách vyměnilo médium, čímž došlo k odstranění většiny ostatních buněk periferní krve, kromě monocytů/makrofágů.

4.8 Ko-kultivace osteoblastů a monocytů/makrofágů

Pro vytvoření ko-kultury byly použity osteoblasty z femuru potkanů a monocyty/makrofágy z periferní krve potkanů. Osteoblasty byly nasezeny do 24/48 nebo 96-jamkových destiček v médiu DMEM s 10% FBS a P/S a kultivovány po dobu 24 hodin v inkubátoru při 37°C. Po uplynutí této doby byly k osteoblastům přidány rozmrazené mononukleární buňky periferní krve ve zvoleném poměru 1:10. Pro nasazení těchto buněk bylo použito medium DMEM-Q. Po 2h inkubace bylo vyměněno médium složeného z DMEM a DMEM-Q ve zvoleném poměru 1:1. Výměna média byla opakována každý 3. den ko-kultivace. Pokud byly do jamek přidávány suplementy, byly přidány spolu s výměnou média. Pro stimulaci monocytů/makrofágů k diferenciaci do osteoklastů v ko-kultuře s osteoblasty, byl použit některý z následujících suplementů, nebo jejich kombinace, v těchto koncentracích: M-CSF (v koncentraci 25 ng/ml), RANKL (v koncentraci 30 ng/ml), PGE2 (v koncentraci 10^{-6} M a 10^{-8} M), $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ (v koncentraci 10^{-8} M a 10^{-9} M). Sledována byla také tvorba osteoklastů u buněk izolovaných z OVX samic potkanů. Postup nasazení a kultivace byl stejný, pouze nebyla do ko-kultury přidávána žádná suplementace. Ko-kultury byly kultivovány 14 dní. V průběhu této doby byla sledována tvorba osteoklastů z monocytů/makrofágů za pomoci níže uvedených metod.

4.9 Test metabolické aktivity

Pomocí MTS testu (CellTiter 96[®] Aqueous MTS Reagent Powder, Promega corp. USA) byla stanovena metabolická aktivita osteoblastů a PBMC/osteoklastů. Princip metody spočívá v metabolizaci MTS substrátu pomocí mitochondriální dehydrogenázy na rozpustný barevný produkt formazan. V příslušný den bylo do jamek přidáno 100 μ l bazálního média a 20 μ l MTS substrátu (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). Poté probíhala 2 hodiny

inkubace buněk s MTS substrátem v inkubátoru při 37°C. Po uplynutí této doby bylo přepipetováno 100 µl media do 96-jamkové destičky a vzniklý formazan byl spektrofotometricky měřen pomocí spektrofotometru M200 Infinite Pro, Tecan při vlnových délkách 490 nm a referenční hodnota byla měřena při 690 nm. Od naměřených hodnot byla odečítána referenční hodnota naměřená při 690 nm a absorbance MTS substrátu bez buněk.

4.10 Stanovení aktivity alkalické fosfatázy

Enzymatická aktivita ALP byla stanovena pomocí substrátu 1-Step PNPP. Princip metody spočívá v hydrolyze bezbarvého ρ -nitrofenylfosfátu, kterou katalyzuje ALP na barevný produkt ρ -nitrofenol. Detekce nitrofenolu probíhá při vlnové délce 405 nm. Každý 1., 7., 14. den bylo do jamek přidáno 100 µl 1-Step PNPP. Poté probíhala inkubace buněk 30 min při pokojové teplotě, ve tmě. Po inkubaci se celkový obsah jamek přepipetoval do 96-jamkové mikrotitrační destičky s 2M roztokem NaOH 50 µl/jamka, který zastavil reakci. Vzniklý ρ -nitrofenol byl detekován pomocí spektrofotometru M200 Infinite Pro, Tecan při vlnové délce 405 nm. Od výsledných hodnot byla odečtena absorbance ALP substrátu bez buněk.

4.11 Stanovení aktivity tartarát rezistentní kyselé fosfatázy

Každý 7. a 14. den bylo od vzorků odsáto kultivační médium a přidán roztok 1% Triton X-100 v PBS pro vytvoření buněčného lyzátu. Vzorky byly 50 minut chlazeny v lednici a následně zmrazeny při -20°C. Před měřením byly vzorky rozmrazeny na třepačce po dobu 10 minut. Vzniklý buněčný lyzát byl následně použit i pro stanovení aktivity CA II. Do černé 96-jamkové destičky bylo napipetováno 10 µl buněčného lyzátu a 10 µl standardů. Standardy byly použity z komerčního Bone TRAP kitu (TRAcP5b) ELISA (ref. SB-TR201A, IDS, UK) v koncentracích (0-10.4 U/l). Následně bylo ke vzorkům i standardům přidáno 50 µl reakčního pufru složeného z 2,5 mM naftolu AS-BI fosfátu rozpuštěného v DMSO, 100 mM acetát sodný a 50 mM tartrát dihydrát sodný rozpuštěné v dH₂O, pH= 6.1. Destička byla následně 30 minut inkubována při 37°C na třepačce (0,4 g). Po uplynutí této doby byla reakce zastavena přidáním 150 µl 0,1 M NaOH. Fluorescence byla spektrofotometricky měřena pomocí spektrofotometru M200 Infinite Pro, Tecan při vlnové délce $E_x/E_m = 405/520$ nm.

4.12 Stanovení aktivity karbonické anhydrázy II

Princip metody spočívá v přeměně 4-nitrophenylacetátu (4-NPA) na 4-nitrophenol (4-NPO) enzymem CA II. Koncentrace vzniklého 4-NPO je

spektrofotometricky měřena při 405 nm. 7. a 14. den ko-kultivace bylo do 96-jamkové destičky přidáno 50 μ l buněčného lyzátu (viz výše) a 50 μ l standardů v koncentracích 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0 mM 4-NPO. Následně bylo ke všem vzorkům a standardům přidáno 50 μ l reakčního pufru složeného z 12,5 mM Trizma hydrochloridu (TRIS), pH 7,5 a 75 mM NaCl rozpuštěné v dH₂O a 2mM 4-NPA rozpuštěného v metanolu. Následně byly vzorky 1 hodinu inkubovány při 37°C. Absorbance vzniklého 4-NPO byla spektrofotometricky měřena pomocí spektrofotometru M200 Infinite Pro, Tecan, při vlnové délce 405 nm po 1 hodině.

4.13 Vizualizace aktivity tartarát rezistentní kyselé fosfatázy a jader

Osteoklasty mají vysoce aktivní TRAP, jejíž aktivitu lze vizualizovat za použití Leukocyte Acid Phosphatase (TRAP) kitu (387A-1KT, SigmaAldrich). Každý 7. a 14. den byly vzorky opláchnuty v PBS a 30 sekund fixovány roztokem složeného z formaldehydu (82 μ l 37% roztok), citrátového pufru (255 μ l, součást kitu) a acetonu (663 μ l) po dobu 30 sekund. Vzorky byly následně opláchnuty deionizovanou vodou a barveny za pomoci Leukocyte Acid Phosphatase (TRAP) kitu. Před barvením byl připraven roztok obsahující diazotizovaný rychlý granát GBC a nitrid sodný, ke kterým byla uplynutí 2 minut přidána deionizovaná voda, naftol AS-BI kyseliny fosforečné, acetát a roztok vlnanu. Naftol AS-BI uvolněný enzymatickou hydrolyzou se poté spojuje s rychlým granátem GBC a tvoří nerozpustné kaštanově zbarvené usazeniny v místech aktivity enzymu. Jádra byla vizualizována za pomoci hematoxilinu, jeho oxidačním produktem – hemateinem. Destičky byly inkubovány 1 hodinu při 37°C. Po uplynutí této doby byly vzorky opláchnuty deionizovanou vodou a barveny 2 minuty hematoxylinem. Poté byly vzorky opláchnuty vodou a vizualizovány pomocí světelné mikroskopie (mikroskop TH4-200, Olympus).

4.14 Kvantifikace obsahu buněčné DNA

Proliferace buněk byla stanovena pomocí kitu Quant-iT™ dsDNA Assay, kterým lze kvantifikovat DNA. Princip metody spočívá ve vazbě fluoroforu Quant-iT™ dsDNA Assay Reagent (Q33120, Life Technologies Corporation, USA) na dvouvláknovou dsDNA a následné emitaci fluorescenčního signálu, který je fluorescenčně měřen. Vzorky z 1., 3., 7., a 14. dne byly inkubovány v 96-jamkových destičkách s 200 μ l lyzačního pufru (10mM tris(hydroxymethyl)aminometan (Tris), 1mM EDTA, 0,2% Triton-X-100). Následně byly destičky zmrazeny při – 20°C. Tyto destičky byly poté rozmrazeny a opět zmrazeny při – 80°C. Zmrazení bylo celkem 3× opakováno. Při každém rozmrazení byly

vzorky mícháány pomocí vortexu S0200 Vortex Mixer, Labnet International, Inc. Do černé 96-jamkové destičky bylo napipetováno 200 μ l roztoku Quant-iT™ dsDNA Assay Reagent a 10 μ l buněčného lyzátu. Součástí eseje jsou i DNA standardy bakteriofágu lambda, které byly v daných koncentracích (0–10 ng/ μ l) přidávány po 10 μ l k reagentu. Fluorescence reagentu byla měřena pomocí fluorescenčního spektrofotometru Infinite M200 Pro, Tecan při hodnotách excitace 485 nm a emise 528 nm. Hodnoty množství dsDNA byly vypočítány z kalibrační křivky standardů.

4.15 Vizualizace buněk

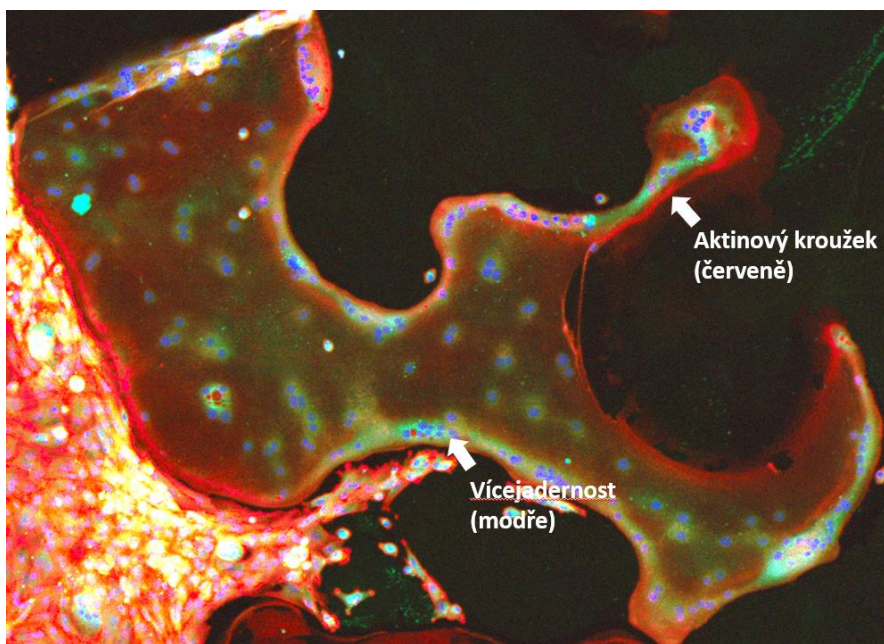
Pro vizualizace buněk bylo využito fluorescenční barvení za pomoci:

- Phalloidin-iFluor 555 Reagent (AB176756, Abcam), který se váže na aktinová vlákna (F-aktin), maximum E_x (excitace)/ E_m (emise) = 556/574 nm,
- Hoechst 34580 (H21486, Life Technologies) po navázání na DNA v buňkách emituje modrou fluorescenci, maximum E_x/E_m = 357/490 nm,
- 4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride (DAPI, D9542, Sigma Aldrich), emituje modrou fluorescenci po navázání na AT oblasti DNA, maximum E_x/E_m = 358/461 nm,
- 3,3'-Dihexyloxacarbo-cyanine iodide (DiOC6(3), D273, Life Technologies) je zelené fluorescenční membránové barvivo, které se používá k detekci membránového mitochondriálního potenciálu v živých buňkách, maximum E_x/E_m = 482/504nm.

Jednotlivé vzorky na 96-jamkových destičkách byly 7., a/nebo 14. den fixovány ve 100 μ l 2% paraformaldehydu ředěném v PBS. Vzorky byly fixovány po dobu 15 min při RT a následně opláchnuty v PBS. Poté byly jednotlivé jamky barveny za pomoci 1 \times Phalloidin-iFluor 555 Reagent (ředěno 1:1000), Hoechst 34580 v koncentraci 2 μ g/ml nebo DAPI v koncentraci 0,1 μ g/ml, DiOC6(3) v koncentraci 10 μ g/ml. Pokud bylo použito DiOC6(3) barvení, předcházela barvení permeabilizace membrán za pomoci 120 μ l 0,1% Triton™ X-100 (Sigma Aldrich, USA) v PBS. Následně probíhala inkubace 20 minut při RT a poté byl roztok vyměněn za 120 μ l 1% Tween (Sigma Aldrich, USA) v PBS – inkubace 20 minut při RT. Po uplynutí této doby byly vzorky 2 \times opláchnuty v PBS.

Protilátky byly ředěny v PBS ve výše uvedených koncentracích a do každé jamky bylo přidáno 50 μ l roztoku. Následně byly destičky inkubovány při RT po dobu 45 minut, za tmy. Po uplynutí této doby byly vzorky propláchnuty v PBS. Nabarvené buňky byly

pozorovány fluorescenčním mikroskopem TH4-200, Olympus anebo konfokálním mikroskopem Zeiss LSM 880 Airyscan. Při konfokální mikroskopii byla využívána funkce Z-stack. Osteoklasty byly detekovány dle typických morfologických znaků, jako je vícejadernost způsobená fúzí prekurzorových buněk (modrá barva – DAPI, Hoechst), seskupením aktinu na periferii buněk a vytvořením aktinového kroužku (červená barva – Phalloidin). Membrána je při použití DiOC6(3) vizualizována zeleně (obrázek č. 4).



Obrázek č. 4: Detail osteoklastu odvozeného od potkaních PBMCv ko-kultuře s osteoblasty. Za osteoklasty byly považovány buňky mající 3 a více jader.

4.16 Bio-Plex

Pomocí multiplexové analýzy Bio-Plex byla detekována produkce cytokinů IL-1 β , IL-6, TNF- α osteoblasty a PBMC/osteoklasty. Buňky byly stimulovány pomocí suplementů M-CSF a RANKL, PGE2, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ v různých kombinacích (viz kapitola 4.8) nebo snížením estrogenu v důsledku ovariektomie u samic potkanů.

Pomocí metody Bio-Plex je možné současně detekovat více analytů v jednom vzorku. Princip metody spočívá v tvorbě komplexů mezi kuličkami s kovalentně vázanými protilátkami a proteiny, které jsou přítomny ve vzorku. Před samotným měřením byl přístroj kalibrován a validován pomocí kalibračního kitu (Bio-Plex Calibration Kit) a validačního kitu (Bio-Plex Validation Kit 4.0). Přístroj byl několikrát promyt promývacím roztokem (součást kitu) a destilovanou vodou (dH₂O). Následně bylo do destiček přidáno 50 μ l smíchaných kuliček pro detekci cytokinů IL-1 β , IL-6 a TNF- α . Poté byla destička 2x promyta 100 μ l promývacího roztoku a bylo přidáno

50 μ l standardů, vzorků a pozitivní kontroly. Hladina uvedených cytokinů byla měřena ze supernatantu odebraného od kultivovaných buněk 3., 7. a 14. den ko-kultivace. Vzhledem k detekčnímu limitu metody Bio-Plex byly buňky v tomto experimentu ko-kultivovány v 24-jamkové destičce a pouze v 0,5 ml média, přičemž počet buněk byl úměrně navýšen. Osteoblasty byly nasazeny v hustotě 7 000 buněk/cm² a PBMC v hustotě 70 000 buněk/cm². Jako pozitivní kontrola byl použit supernatant odebraný z kultury PBMC stimulovaných 5 μ l/ml LPS a 10 ng/ml INF- γ . Pro kontrolní monokulturu byly PBMC nasazeny do 24-jamkové destičky v hustotě 530 000 buněk/cm² a kultivovány 0,5 ml média DMEM-Q s M-CSF (v koncentraci 25 ng/ml). Supernatant byl odebrán po 48h kultivace. LPS se skládá z lipidů a polysacharidů spojených kovalentní vazbou a je hlavní složkou vnější membrány gramnegativních bakterií.

Destička byla inkubována při 850 rpm za pokojové teploty. Následně byla destička opět 3x promyta 100 μ l promývacího roztoku a přidáno 25 μ l detekční protilátky a probíhala inkubace 30 min při 850 rpm za pokojové teploty. Poté se opět opakoval promývací krok a bylo přidáno 50 μ l streptavidinu-PE (součást kitu). Destička byla inkubována při RT po dobu 10 min a při 850 rpm. Po dalším promytí byla destička resuspendována v 125 μ l pufru (assay buffer, součást kitu) při 850 rpm po dobu 30 sekund. Následně byla měřena absorbance pomocí Bio-Plex systému. Výsledné hodnoty koncentrace cytokinů byly vypočteny softwarem Bio-Plex Manager 6.1 z lineárních rovnic standardů. Vzorky byly v rámci skupin poolovány a výsledné hodnoty jsou průměrem 2 jamek.

4.17 Statistická analýza

Statistické hodnoty uváděné u MTS testu, dsDNA testu, měření aktivity ALP, CA II a TRAP byly počítány v programu SigmaStat4, byla hodnocena normalita. Hodnoty uvedené v grafu jsou průměrem 4-5 paralelních jamek/skupina. Hodnoty byly hodnoceny pomocí testu One Way ANOVA nebo ANOVA on Ranks v závislosti od rozložení dat. Zvolená úroveň signifikance byla 0,05. Hodnoty označené * jsou s úrovní signifikace 0,001. Statistická signifikance byla stanovena pomocí Dunn's testu. Pokud nebylo možné měřit normalitu, byl použit Tukey test. Výsledná data jsou aritmetickým průměrem se směrodatnou odchylkou (SD, standard deviation).

5. Výsledky

Cílem práce bylo navodit osteoklastogenezi PBMC v ko-kultuře s osteoblasty. K tomuto účelu byla použita suplementace M-CSF, RANKL, PGE2 a $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D₃ v různých koncentracích a kombinacích, viz tabulka č.4. Pro tyto experimenty byly použity buňky izolované ze zdravých samic potkanů typu Wistar (věk 3 měsíce). Získané výsledky byly porovnány s ko-kulturami buněk izolovaných ze samic potkanů s indikovanou osteoporózou pomocí ovariektomie (věk 12 měsíců). Tyto buňky byly ko-kultivovány bez přidané suplementace.

Tabulka č. 4: **Koncentrace použitých suplementů**

Suplementace	Koncentrace
M-CSF	25 ng/ml
RANKL	30 ng/ml
PGE2	10^{-6} M, 10^{-8} M
$1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D ₃	10^{-8} M, 10^{-9} M

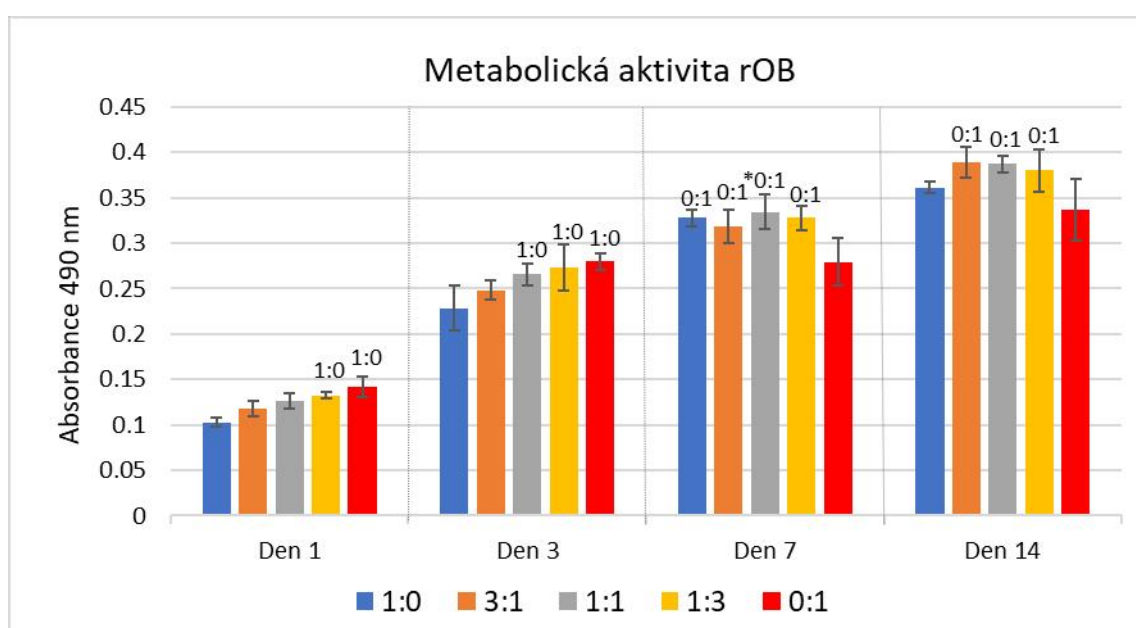
5.1 Optimalizace kultivačního média

Před ko-kultivací buněk byly nejprve optimalizovány kultivační podmínky v monokulturách osteoblastů a PBMC. Optimální kultivační médium bylo nejprve testováno v 5 různých poměrech médií (tabulka č. 5). Osteoblasty byly nasazeny v koncentraci 16 000 buněk/cm² a PBMC v koncentraci 330 000 buněk/cm². Buňky byly nasazeny v kultivačním médiu běžně určeném pro jejich kultivaci, osteoblasty v DMEM a osteoklasty v DMEM-Q, do 96-jamkových destiček. Následně byly buňky inkubovány po dobu 2 hodin. Po uplynutí této doby bylo médium vyměněno za různé poměry kultivačního média, viz tabulka č. 5. Buňky byly kultivovány po dobu 14 dní. PBMC byly stimulovány růstovými faktory M-CSF v koncentraci 25 ng/ml a RANKL v koncentraci 30 ng/ml, nezbytných pro přežití PBMC a indukci osteoklastogeneze.

Proliferace a aktivita buněk v různých poměrech média byla stanovena měřením metabolické aktivity a kvantifikací buněčné DNA. Metabolická aktivita buněk byla měřena pomocí MTS testu a proliferace buněk byla stanovena kvantifikací buněčné DNA pomocí QuanT-iT dsDNA Assay Kitu. Naměřené hodnoty u potkaních osteoblastů (rat-rOB) a mononukleárních buněk periferní krve (rPBMC) jsou uvedeny v grafech č. 1-4.

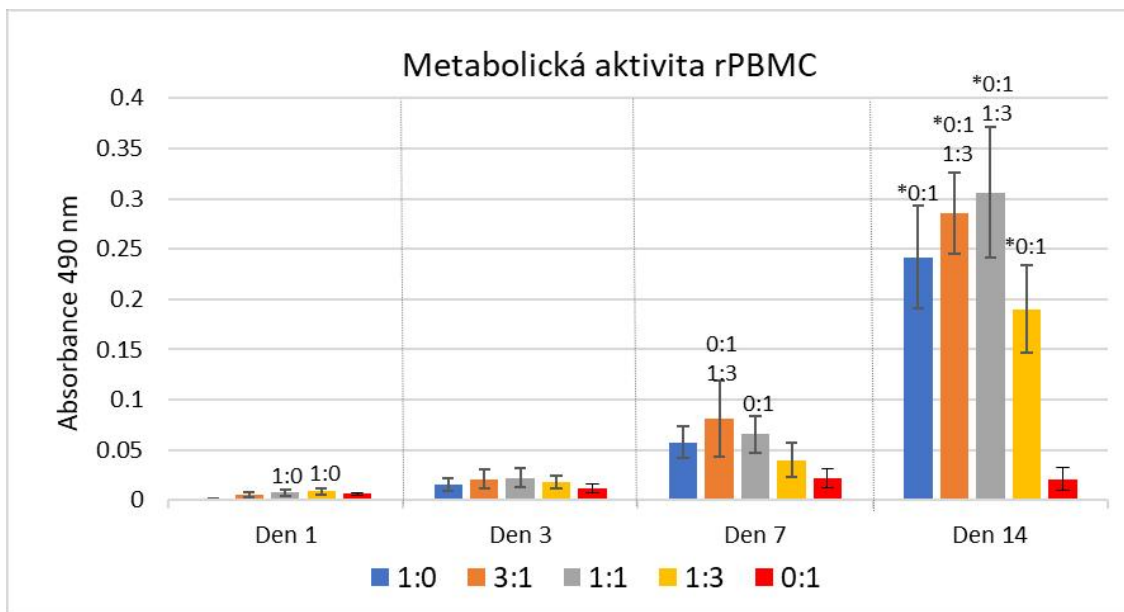
Tabulka č. 5: Poměry použitých médií

DMEM DMEM high glucose (Sigma-Aldrich), 10% FBS, 1% P/S	DMEM-Q DMEM high glucose, bez L-glutaminu (EuroClone), 2mM L-glutamine, 10% FBS, 1% P/S
1	0
3	1
1	1
1	3
0	1

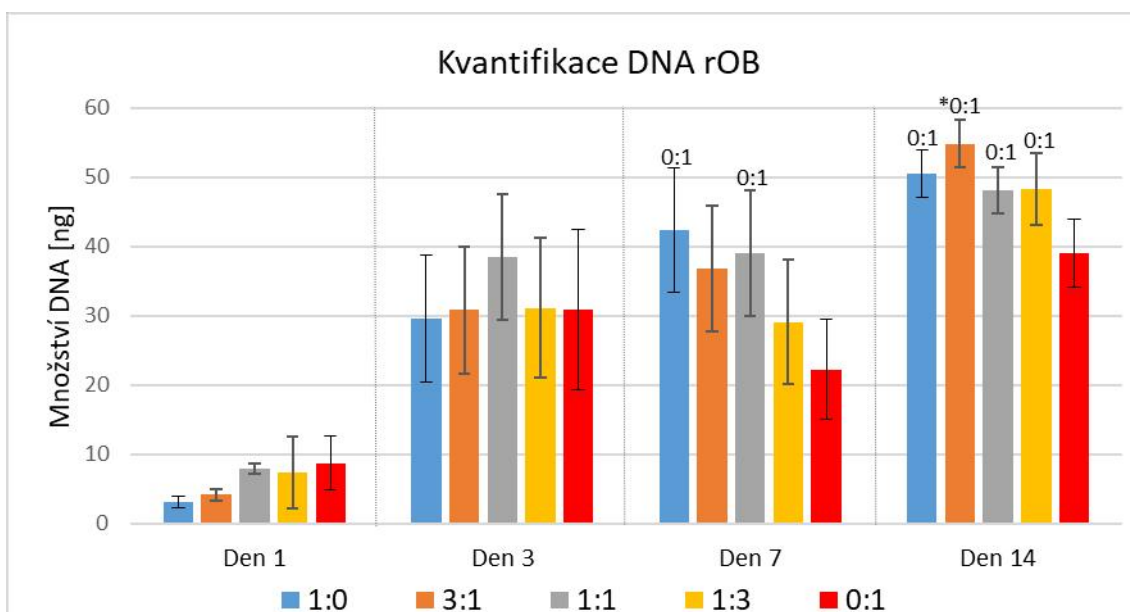


Graf č. 1: Metabolická aktivita: Naměřené hodnoty metabolické aktivity osteoblastů kultivovaných v různých poměrech kultivačního média DMEM a DMEM-Q, viz tabulka č. 5. Metabolická aktivita osteoblastů byla stavena v 1., 3., 7. a 14 den kultivace pomocí MTS testu. Označení nad sloupci značí statisticky významný rozdíl se zvolenou úroveň signifikance 0,05. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,001.

Během 14denní kultivace nebyly pozorovány výrazné rozdíly v metabolické aktivitě buněk kultivovaných v různých poměrech média. Z grafu č. 1 vyplývá, že metabolická aktivita osteoblastů byla po celou dobu kultivace obdobná. Metabolická aktivita PBMC uvedená v grafu č. 2 byla stejná na začátku kultivace buněk. 7. kultivace byly hodnoty vyšší v poměrech kultivačního média 3:1 než v poměru 1:3 a 0:1 - DMEM (EuroClone). V poměru 1:1 byla také naměřena vyšší metabolická aktivita, než v poměru odpovídajícímu čistě kultivačnímu médiu DMEM-Q (EuroClone). Podobně i 14. den kultivace byly nejvyšší hodnoty naměřeny v poměrech média 3:1 a 1:1.



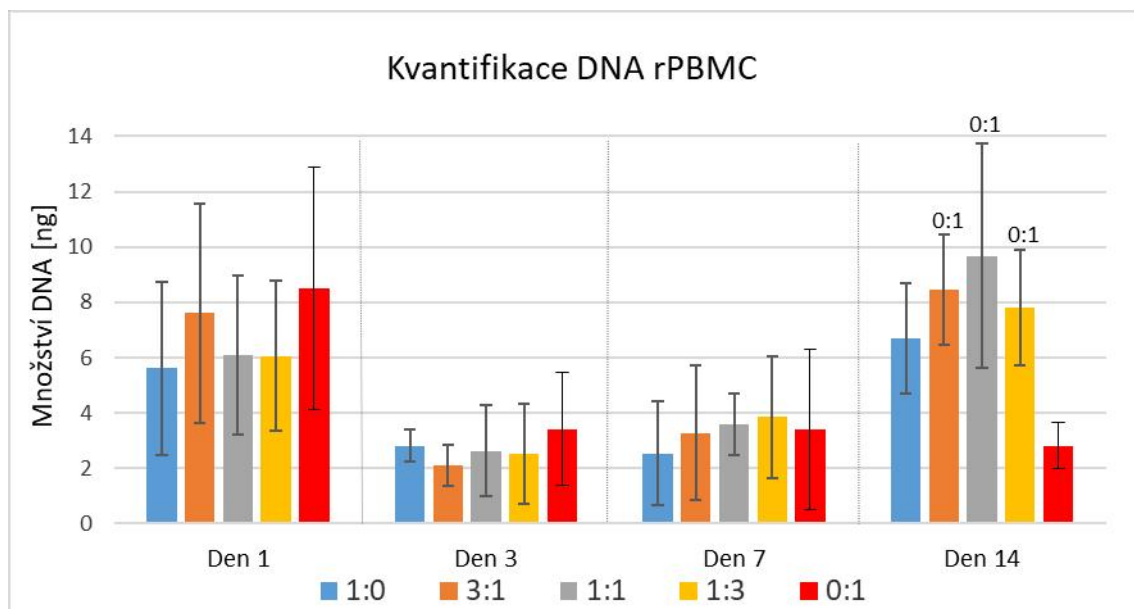
Graf č. 2: Metabolická aktivita: Naměřené hodnoty metabolické aktivity PBMC kultivovaných v různých poměrech kultivačních médií DMEM a DMEM-Q, viz tabulka č. 5. Metabolická aktivita osteoblastů byla stanovena 1., 3., 7. a 14. den kultivace pomocí MTS testu. Označení nad sloupci značí statisticky významný rozdíl se zvolenou úroveň signifikance 0,05. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,001.



Graf č. 3: Kvantifikace obsahu buněčné DNA: Naměřené hodnoty kvantifikace buněčné DNA u osteoblastů kultivovaných v různých poměrech kultivačních médií DMEM a DMEM-Q, které jsou běžně používány pro kultivaci osteoblastů a PBMC, viz tabulka č. 5. Proliferace osteoblastů byla stanovena 1., 3., 7. a 14. den kultivace kvantifikací buněčné DNA pomocí dsDNA kitu. Označení nad sloupci značí statisticky významný rozdíl se zvolenou úroveň signifikance 0,05. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,001.

1. a 3. den kultivace nebyly zřetelné žádné signifikantní rozdíly v proliferaci obou typů buněk (grafy č. 3 a 4). 7. den kultivace byla proliferace osteoblastů vyšší v samotném médiu DMEM a v poměru médií a 1:1 než pouze v médiu DMEM-Q. 14. den kultivace byly u osteoblastů všechny testované poměry signifikantně zvýšeny oproti skupině

s kultivačním médiem DMEM-Q. Proliferace PBMC v poměru kultivačního média neprokázala žádné signifikantní rozdíly v 1., 3. ani 7. den kultivace. 14. den kultivace byly skupiny v poměrech 3:1, 1:1, 1:3 signifikantně zvýšeny oproti skupině s kultivačním médiem DMEM-Q. Na základě těchto výsledků jsme se rozhodli použít poměr 1: 1 pro společné kultury.



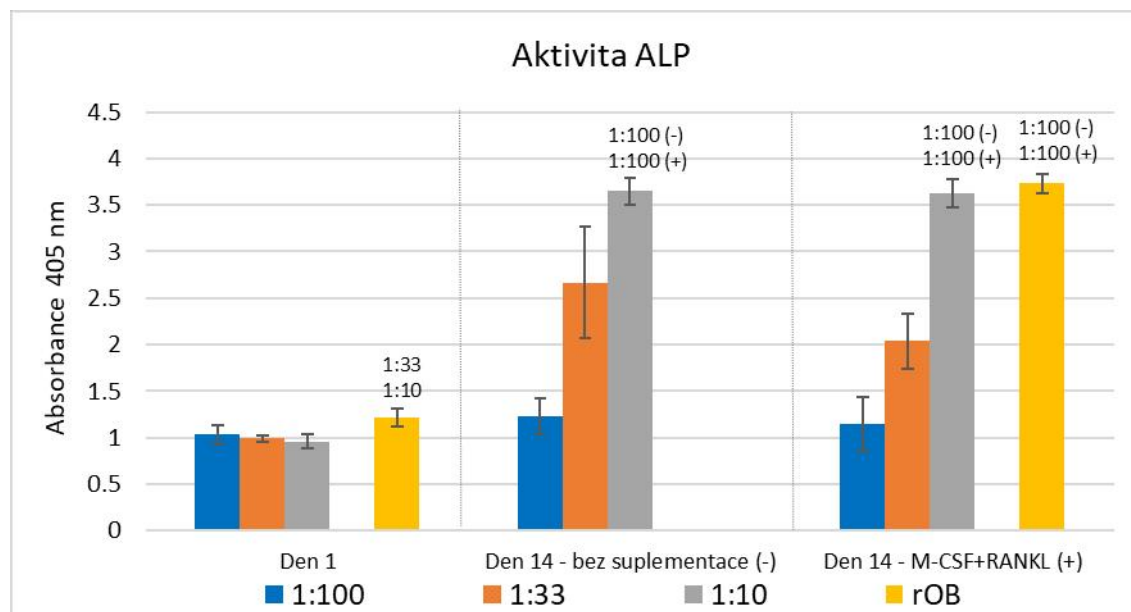
Graf č. 4: Kvantifikace obsahu buněčné DNA: Naměřené hodnoty kvantifikace buněčné DNA u PBMC kultivovaných v různých poměrech kultivačního média běžně používaného pro kultivaci osteoblastů a PBMC, viz tabulka č. 5. Proliferace PBMC byla stanovena 1., 3., 7. a 14. den kultivace kvantifikací buněčné DNA pomocí dsDNA kitu. Označení nad sloupci značí statisticky významný rozdíl se zvolenou úroveň signifikance 0,05. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,001.

5.2 Optimalizace poměrů buněk

Pro získání vyvážené ko-kultury je nutné buňky nasadit ve správném množství a poměru. Z toho důvodu byly testovány různé poměry nasazených buněk - 1:100, 1:33 a 1:10. Osteoblasty byly nasazeny v hustotě 7 000 buněk/cm². Po 24 hodinách byly k osteoblastům nasazeny PBMC v hustotě 700 000 buněk/cm², 220 000 buněk/cm² a 70 000 buněk/cm². Osteoklastogeneze byla následně sledována ve 2 skupinách: bez suplementace a s přidanými růstovými faktory M-CSF a RANKL pro podpoření osteoklastogeneze. Buňky byly následně ko-kultivovány po dobu 14 dní. U suplementovaných skupin byla suplementace přidávána při výměně média každý 3. den ko-kultivace.

Pro stanovení optimální ko-kultury byla sledována aktivita ALP u osteoblastů v 1. a 14. den ko-kultivace, jak je možné vidět v grafu č. 5. Na začátku ko-kultivace byla aktivita ALP stejná pro všechny 3 buněčné poměry. 14. den byla aktivita ALP vyšší

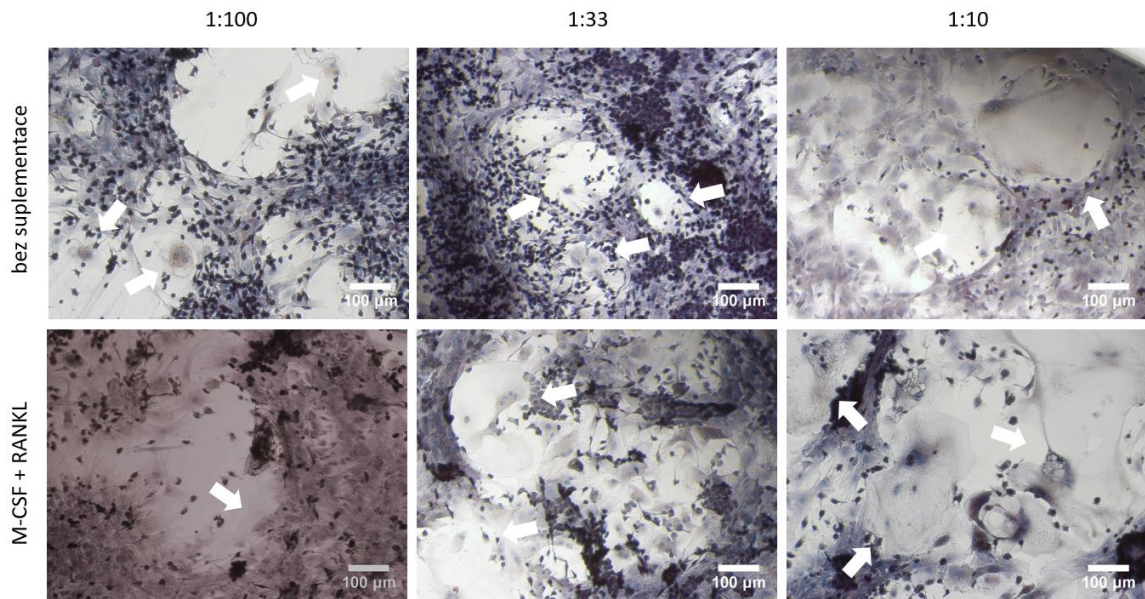
v ko-kulturách s buněčným poměrem 1:10 než 1:100, bez ohledu na přidání růstových faktorů. Kontrolní monokultura osteoblastů vykazovala vyšší aktivitu ALP než ko-kultury v poměru 1:100 ve skupinách bez i s přidávanými růstovými faktory M-CSF a RANKL.



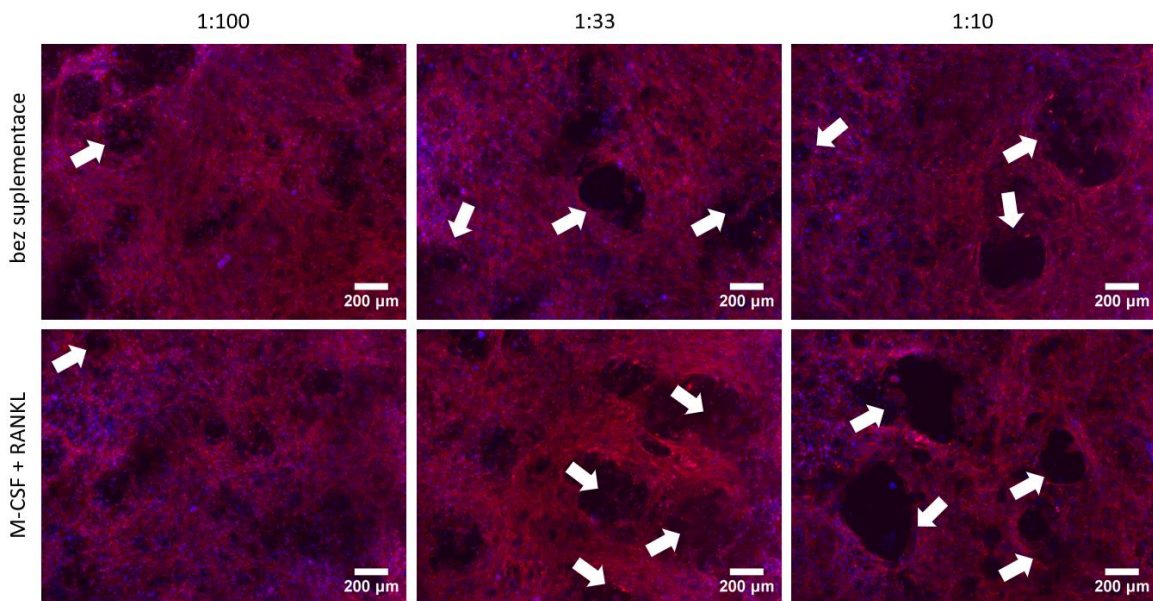
Graf č. 5: Aktivita ALP u osteoblastů v ko-kulturách s různými poměry buněk v 1. a 14. den ko-kultivace. Buňky byly ko-kultivovány bez nebo s přidávanými růstovými faktory M-CSF a RANKL. Jako kontrola byla použita monokultura osteoblastů. Označení nad sloupci značí statisticky významný rozdíl se zvolenou úroveň signifikance 0,05. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,001.

Následně byla pomocí TRAP barvení a barvením jader hematoxylinem sledována schopnost diferenciaci PBMC v osteoklasty v daných poměrech média. Z TRAP barvení a barvení hematoxylinem je vidět, že PBMC diferencovaly v osteoklasty ve všech poměrech buněk bez ohledu na přidanou suplementaci, viz obrázek č. 5. Z mikroskopie byl ale zřetelný trend zvýšené osteoklastogeneze v poměru 1:10.

Osteoklastogeneze PBMC byla také sledována pomocí fluorescenční mikroskopie. Černé díry ve vrstvách buněk jsou tvořeny osteoklasty. Mezi ko-kulturami s různými buněčnými poměry bez nebo s přidávanými M-CSF a RANKL nejsou žádné výrazné rozdíly, viz obrázek č. 6. Pro další ko-kultivaci osteoblastů a PBMC byl zvolen buněčný poměr 1:10, protože TRAP a fluorescenční barvení neodhalilo žádné zásadní rozdíly mezi buněčnými poměry a aktivita ALP byla nejvyšší v buněčném poměru 1:10.



Obrázek č. 5: TRAP barvení a barvení jader hematoxylinem u ko-kultur osteoblastů a PBMC v buněčném poměru 1:100, 1:33 a 1:10. Ko-kultury byly kultivovány bez a s přidáním suplementací M-CSF a RANKL. Snímky byly pořízeny v 14. den ko-kultivace za pomoci světelné mikroskopie. Měřítka je 100 μm .



Obrázek č. 6: Snímky z fluorescenční mikroskopie ko-kultury v buněčných poměrech 1:100, 1:33 a 1:10. Ko-kultury byly kultivovány bez nebo s přidáním růstových faktorů M-CSF a RANKL. Snímky byly pořízeny 14. den ko-kultivace. Aktinový cytoskelet byl barven Phalloidin-iFluor555 (červená barva), jádra byla barvena pomocí Hoechst 34580 (modrá barva). Měřítka je 100 μm .

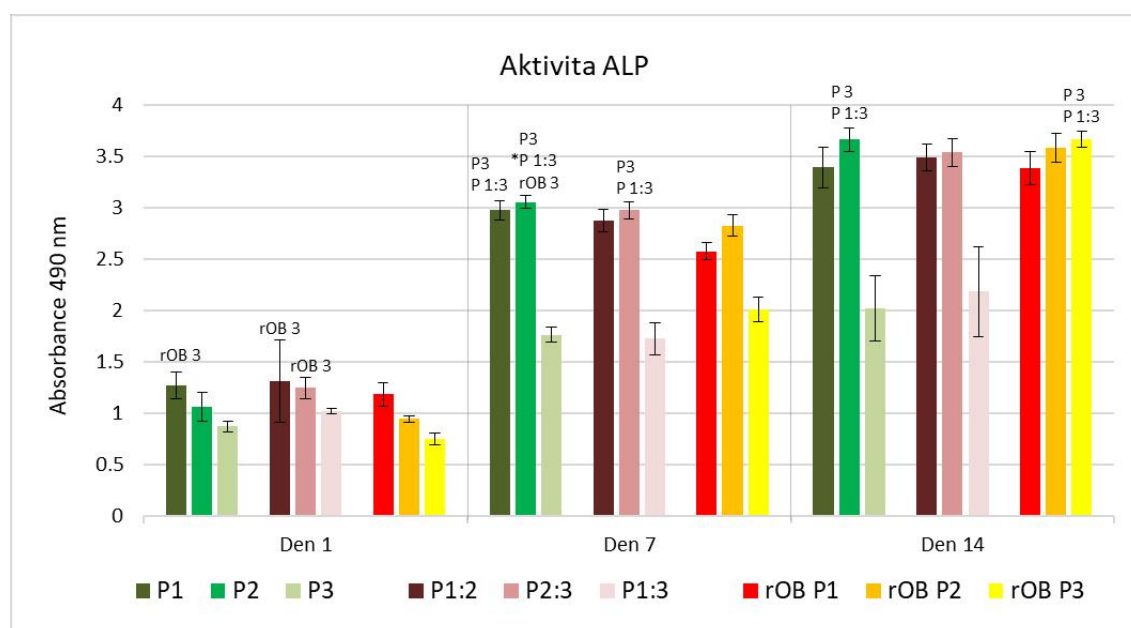
5.3 Ověření vlivu poolování buněk na osteoklastogenezi PBMC v ko-kultuře s osteoblasty

V rámci optimalizace *in vitro* modelu bylo sledováno, zda má poolování krve potkanů při izolaci vliv na osteoklastogenezi buněk z PBMC. K experimentu byly izolovány buňky ze tří samic potkanů. Ve skupině č. 1 (potkan 1–P 1, potkan 2–P 2, potkan 3–P 3) nebyla krev při izolaci poolována a taktéž osteoblasty (rOB) byly izolovány separátně z jednotlivých samic potkanů. K osteoblastům byly následně nasazeny PBMC tak, aby spolu byly kultivovány vždy buňky ze stejného jedince. Ve skupině č. 2 byla krev ze stejných tří samic potkanů při izolaci poolována, a to vždy v poměru 1:1 mezi jednotlivými jedinci. Rozdělení do skupin je uvedeno v tabulce č. 6. Následně byly buňky izolovány standardním způsobem, jak je popsáno v metodách. Osteoblasty byly nasazeny v hustotě 7 000 buněk/cm². Po 24 hodinách byly k osteoblastům nasazeny PBMC v hustotě 70 000 buněk/cm². Buňky byly ko-kultivovány bez přidané suplementace. Kontrolní monokultury PBMC byly nasazeny v hustotě 300 000 buněk/cm² a stimulovány M-CSF a RANKL, nezbytných pro jejich přežití. Ke stanovení, zda má potenciální alogenní reakce vliv na osteoklastogenezi z PBMC byly použity standardní metody pro detekci osteoklastů: stanovení aktivity CAII a TRAP. Sledován byl i vliv na proliferaci osteoblastů pomocí ALP testu. Dále byla měřena metabolická aktivita obou typů buněk v ko-kultuře.

Tabulka č. 6: Rozdělení do skupin dle způsobu izolace buněk

Skupiny	Nasazení buněk		
Skupina č.1 – izolace PBMC bez poolování krve potkanů	jedinec č.1 (P 1) – PBMC byly nasazeny k rOB pocházejících se stejného jedince (rOB 1)	jedinec č.2 (P 2) – PBMC byly nasazeny k rOB pocházejících se stejného jedince (rOB 2)	jedinec č.3 (P 3) – PBMC byly nasazeny k rOB pocházejících se stejného jedince (rOB 3)
Skupina č. 2 – izolace PBMC s poolováním krve potkanů	krev jedince č. 1 byla poolována s krví jedince č. 2 v poměru 1:1 (označeno P 1:2), PBMC byly nasazeny k rOB 1	krev jedince č. 2 byla poolována s krví jedince č. 3 v poměru 1:1 (označeno P 2:3), PBMC byly nasazeny k rOB 2	krev jedince č. 1 byla poolována s krví jedince č. 3 v poměru 1:1 (označeno P 1:3), PBMC byly nasazeny k rOB 3

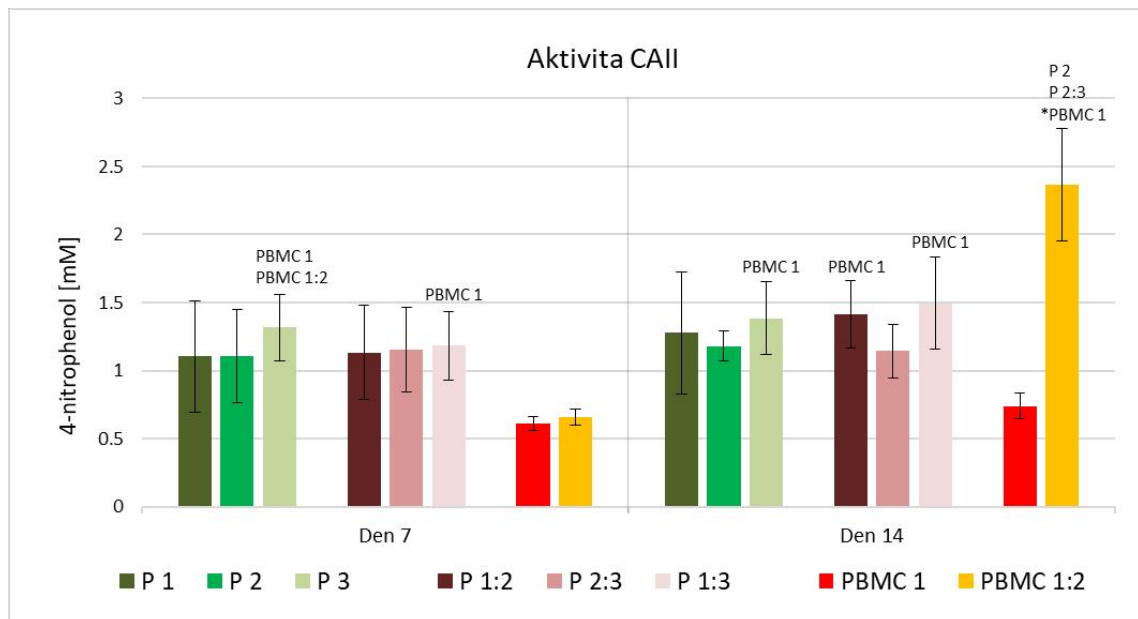
Pro stanovení optimální ko-kultury byla sledována aktivita ALP u osteoblastů 1., 7. a 14. den ko-kultivace, viz graf č. 6. 1. den ko-kultivace nebyl v rámci sledovaných ko-kultur zaznamenán žádný signifikantní rozdíl. Naměřené hodnoty u skupiny P 1, P 1:2 a P 2:3 byly vyšší než monokultura osteoblastů rOB 3. 7. den ko-kultivace byly hodnoty u skupin P 1, P 2 a P 2:3 vyšší než u skupin P 3 a P 1:3. Skupina P 2 převyšovala také kontrolu rOB 3. Během 14. dne ko-kultivace nebyly zaznamenány žádné výrazné rozdíly. Skupina P 2 byla vykazovala vyšší hodnoty než skupiny P 3 a P 1:3. Aktivita ALP u sledovaných ko-kultur vykazovala obdobný trend bez výrazných rozdílů. Kontrola rOB 3 se oproti 7. dni ko-kultivace zvýšila a naměřená aktivita byla vyšší než ve skupinách P 3 a P 1:3.



Graf č. 6: Aktivita ALP u osteoblastů v ko-kulturách 1., 7. a 14. den ko-kultivace. Buňky byly ko-kultivovány bez přidání suplementů. Aktivita ALP byla sledována u skupiny ze separátně izolované krve (P 1, P 2, P 3) a u skupiny, kde byla krev při izolaci poolována v rámci těchto tří jedinců (P 1:2, P 2:3, P 1:3). Jako kontrola byla použita monokultura osteoblastů izolovaných ze všech tří jedinců (rOB P1, rOB P2, rOB P3). Označení nad sloupci značí statisticky významný rozdíl se zvolenou úroveň signifikance 0,05. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,001.

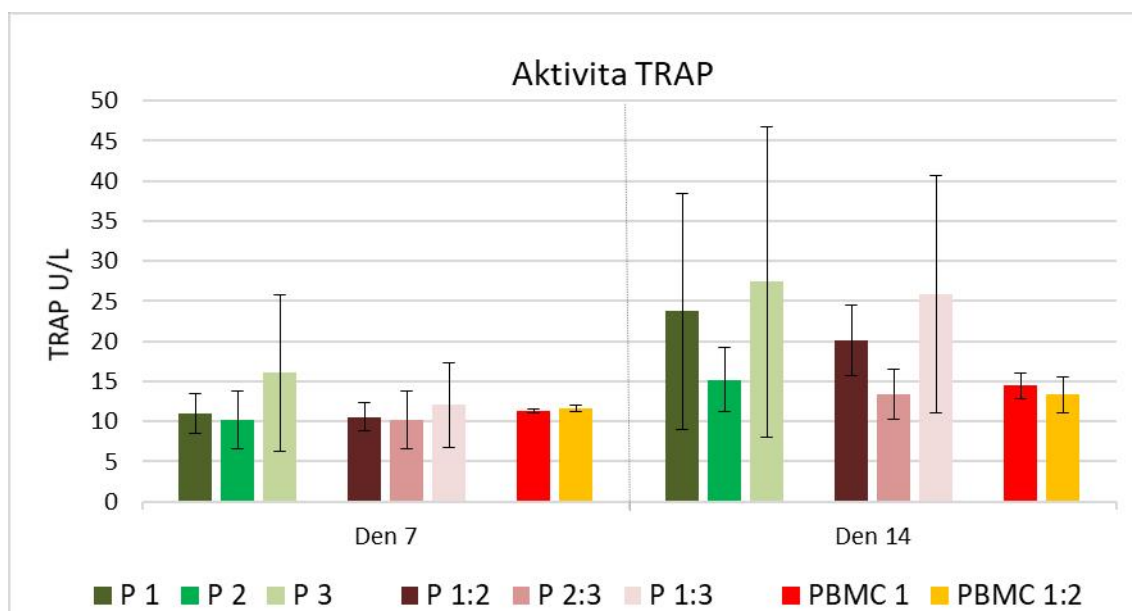
Pro stanovení vlivu poolování krve samic potkanů na osteoklastogenezi byla sledována aktivita CA II u PBMC/osteoklastů v 7. a 14. den ko-kultivace, jak je možné vidět v grafu č. 7. 7. ani 14. den nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly mezi ko-kulturami. Aktivita CAII byla obdobná u všech sledovaných ko-kultur. Signifikantní rozdíl byl pozorován pouze ve vztahu ke kontrolám, a to ve skupině P 3, která vykazovala vyšší hodnoty než kontroly PBMC 1 a PBMC 1:2 a skupina P 1:3, která byla signifikantně vyšší než PBMC 1. 14. den ko-kultivace byly u ko-kultur opět zřetelné signifikantní

rozdíly pouze ve vztahu ke kontrole PBMC 1, a to ve skupinách P 3, P 1:2 a P 1:3. Kontrola PBMC 1:2 byla signifikantně vyšší než kontrola PBMC 1 a také vyšší než ko-kultury P 3 a P 2:3.



Graf č. 7: Stanovení aktivity CAII u PBMC/osteoklastů v ko-kulturách. Aktivita CAII byla stanovena 7. a 14. den ko-kultivace. Buňky byly ko-kultivovány bez přidané suplementace. Schopnost tvořit osteoklasty byla sledována u skupiny buněk ze separátně izolované krve (P1, P2, P3) a u skupiny, kde byla krev poolována v rámci těchto tří jedinců (P 1:2, P 2:3, P 1:3). Jako kontroly byly použity dvě monokultury PBMC. Monokultura PBMC 1 byla izolována separátně a u monokultury PBMC 1:2 byla krev poolována ze dvou jedinců v poměru 1:1. K monokulturám PBMC1 a PBMC 1:2 byl přidáván M-CSF a RANKL. Uvedené výsledky jsou průměrem dvou opakování. Označení nad sloupci značí statisticky významný rozdíl se zvolenou úrovní signifikance 0,05. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,001.

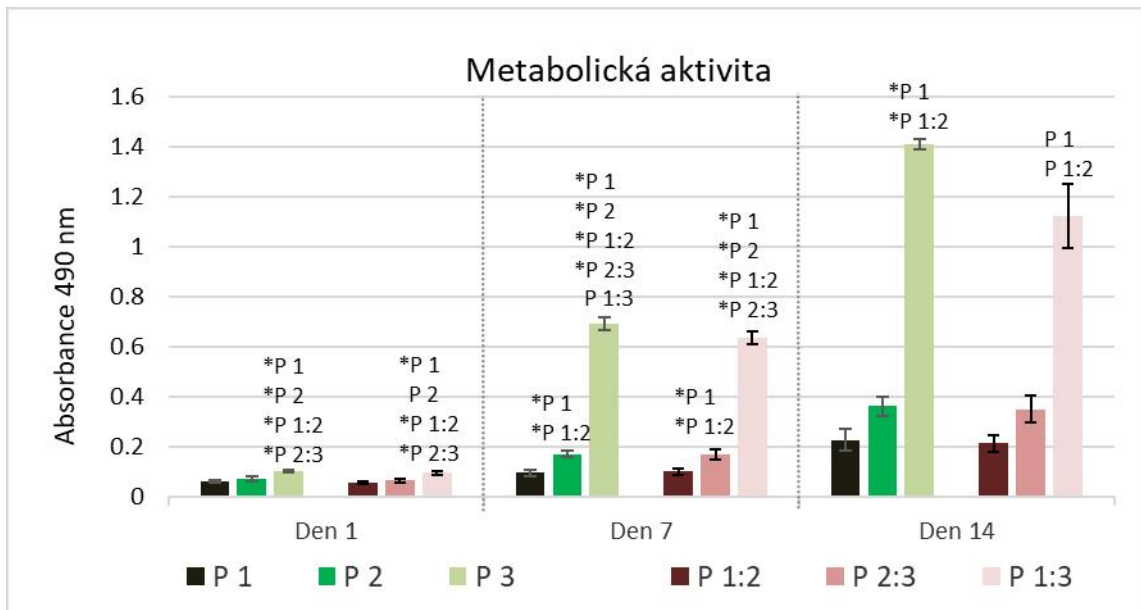
Pro ověření výsledků z předchozího měření byla osteoklastogeneze z PBMC stanovena pomocí měření aktivity TRAP. Výsledky měření jsou zaznamenány v grafu č. 8. 7. a 14. den nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly mezi ko-kulturami ani kontrolními monokulturami. Aktivita TRAP vykazovala obdobný trend u všech sledovaných ko-kultur. Oproti měření aktivity CAII nebyl zaznamenán žádný signifikantní rozdíl vzhledem ke kontrolním monokulturám.



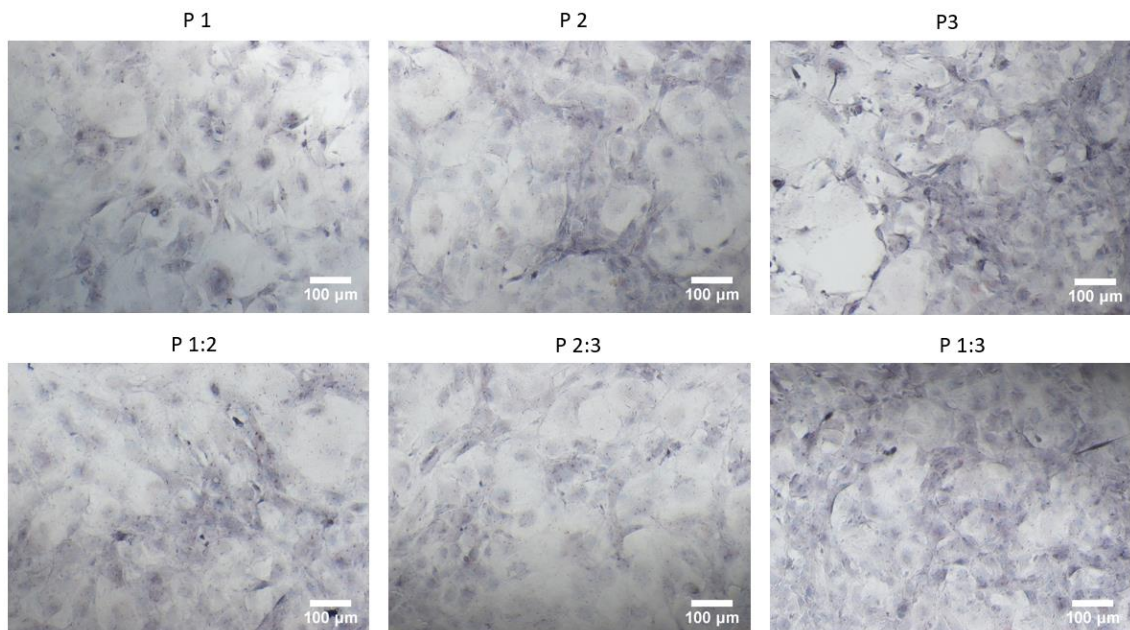
Graf č. 8: Stanovení aktivity TRAP u PBMC/osteoklastů v ko-kulturách. Aktivita TRAP byla stanovena 7. a 14. den ko-kultivace. Buňky byly ko-kultivovány bez přidané suplementace. Schopnost tvořit osteoklasty byla sledována u skupiny buněk ze separátně izolované krve (P1, P2, P3) a u skupiny, kde byla krev poolována v rámci těchto tří jedinců (P 1:2, P 2:3, P 1:3). Jako kontroly byly použity dvě monokultury PBMC. Monokultura PBMC 1 byla izolována separátně a u monokultury PBMC 1:2 byla krev poolována ze dvou jedinců v poměru 1:1. K monokulturám PBMC1 a PBMC 1:2 byl přidáván M-CSF a RANKL. Uvedené výsledky jsou průměrem dvou opakování. Označení nad sloupci značí statisticky významný rozdíl se zvolenou úroveň signifikance 0,05. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,001.

Následně bylo pomocí MTS testu stanoveno, zda má poolování buněk vliv na metabolickou aktivitu buněk v ko-kulturách. Výsledky tohoto měření jsou zaznamenány v grafu č. 9. 1. den ko-kultivace byly u skupiny P 3 zaznamenány signifikantní rozdíly oproti skupinám P 2, P 1:2 a P 2:3. Naměřené hodnoty u skupiny P 1:3 byly signifikantně vyšší než ve skupinách P 1, P 2, P 1:2 a P 2:3. 7. den ko-kultivace byl zaznamenán obdobný trend jako 1. den ko-kultivace. Skupina P 3 byla signifikantně nejvyšší oproti všem ostatním sledovaným skupinám. Podobně i hodnoty u skupiny P 1:3 byly signifikantně zvýšeny oproti ostatním skupinám, vyjma skupiny P 3. Metabolická aktivita u skupin P 2 a P 2:3 byla vyšší než ve skupinách P 1 a P 1:2. 14. den ko-kultivace vykazovaly nejvyšší hodnoty skupiny P 3 a P 1:3, které byly signifikantně vyšší než skupiny P 1 a P 1:2.

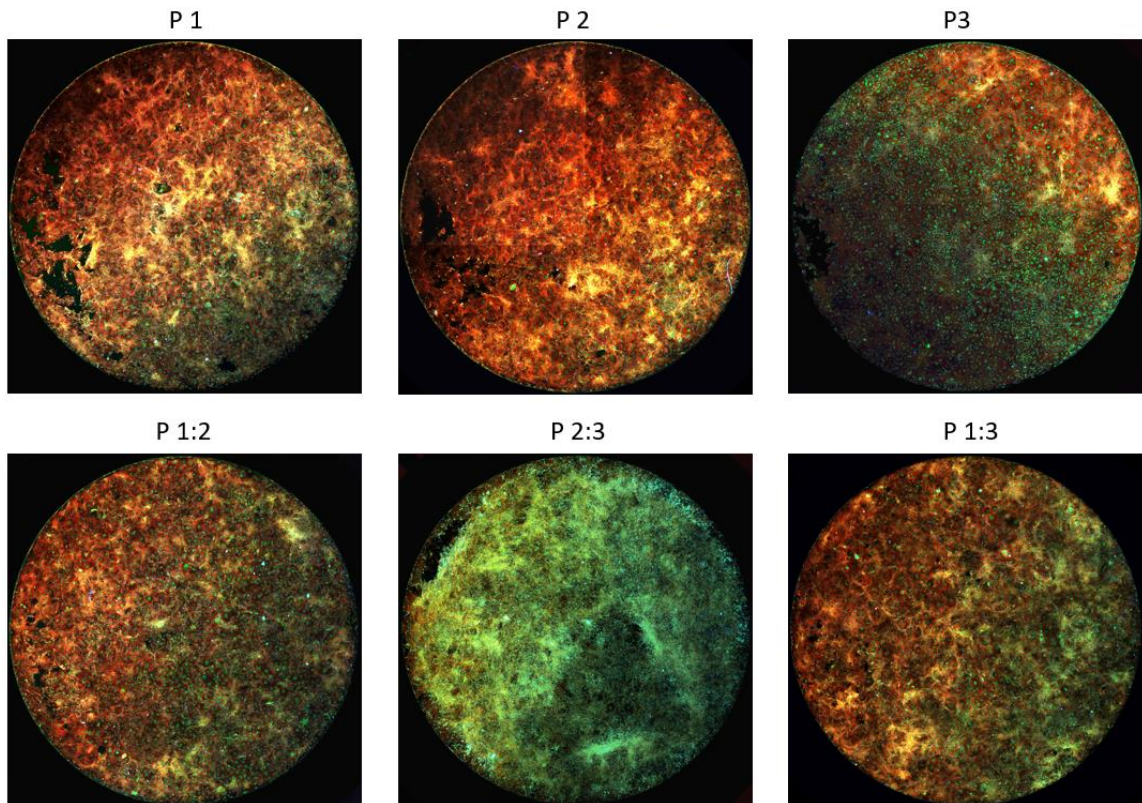
Pro ověření výsledku z předchozích měření byla pomocí TRAP barvení a barvením jader hematoxylinem sledována schopnost diferenciaci PBMC v osteoklasty v daných skupinách, viz obrázek č. 7. Následně byla osteoklastogeneze sledována pomocí konfokální mikroskopie, viz obrázek č. 8. TRAP ani fluorescenční barvení neprokázalo tvorbu osteoklastů u obou skupin. Poolování buněk tedy v tomto nastavení experimentu nemělo na tvorbu osteoklastů zřetelný vliv.



Graf č 9: Metabolická aktivita: Naměřené hodnoty metabolické aktivity v ko-kultuře PBMC a osteoblastů. Metabolická aktivita byla sledována v rámci skupiny nepoolovaných a poolovaných buněk. Měření probíhalo 1., 7. a 14. den ko-kultivace pomocí MTS testu. Označení nad sloupci značí statisticky významný rozdíl se zvolenou úroveň signifikance 0,05. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,001.



Obrázek č. 7: TRAP barvení a barvení jader hematoxylinem u ko-kultur osteoblastů a PBMC Sledována byla tvorba osteoklastů u nepoolovaných a poolovaných buněk. Ko-kultury byly kultivovány bez přidání suplementace. Snímky byly pořízeny v 14. den ko-kultivace za pomoci světelné mikroskopie. Na obrázku jsou výběry snímků zaměřené na okraj jamek, kde se typicky tvoří osteoklasty. Objektiv 10x. Měřítko je 100 µm.



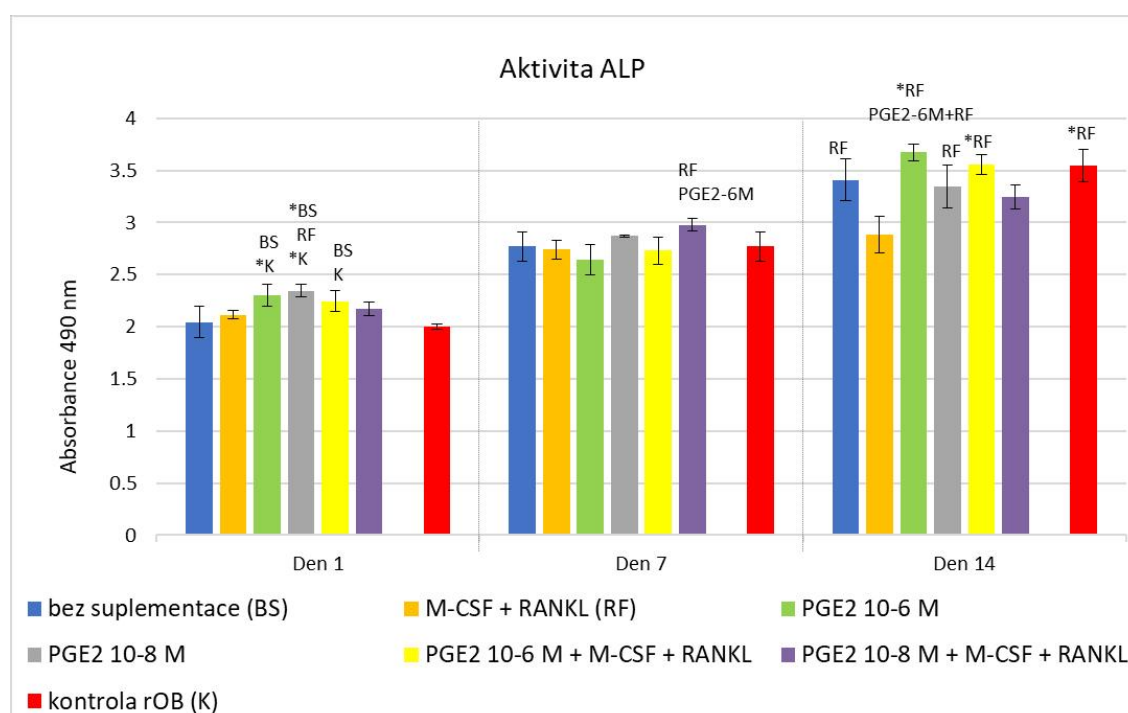
Obrázek č. 8: Snímky z fluorescenční konfokální mikroskopie ko-kultury osteoblastů a PBMC. Sledována byla tvorba osteoklastů u nepoolovaných a poolovaných buněk. Ko-kultury byly ko-kultivovány bez přidaných suplementů. Snímky byly pořízeny 14. den ko-kultivace. Aktinový cytoskelet byl barven Phalloidin-iFluor555 (červená barva), jádra byla barvena pomocí DAPI (modrá barva) a membrány pomocí DiOC6(3) (zelená barva). Snímáno bylo vždy celé dno jamky za pomoci funkce tile scan. Objektiv 10x

5.4 Stimulace osteoklastogeneze pomocí PGE2

Do *in vitro* ko-kultury osteoblastů a PBMC byl přidáván PGE2 a následně byl sledován vliv toho suplementu na schopnost PBMC diferencovat v osteoklasty v průběhu 14denní ko-kultivace. Pro stanovení ideální koncentrace PGE2 byly sledovány dvě koncentrace tohoto suplementu: PGE2 10^{-6} M a PGE2 10^{-8} M s/bez kombinace růstových faktorů M-CSF+RANKL. Potenciál indukovat osteoklastogenezi byl v rámci tohoto experimentu sledován také v ko-kulturách bez přidané suplementace a ko-kulturách stimulovaných pouze M-CSF+RANKL. Ke stanovení vlivu uvedených suplementů na osteoklastogenezi byly použity standardní metody pro detekci osteoklastů: stanovení aktivity CAII, TRAP. Sledován byl i vliv na aktivitu osteoblastů pomocí ALP testu.

Pro stanovení vlivu osteoklastogeneze a použité suplementace na aktivitu osteoblastů byla sledována aktivita ALP v 1., 7. a 14. den ko-kultivace, viz graf č. 10. V rámci 14denní ko-kultivace nebyly v aktivitě ALP zaznamenány výrazné rozdíly. 1. den ko-kultivace byla aktivita ALP signifikantně vyšší u ko-kultur s přidaným PGE2 10^{-6} M a 10^{-8} M a PGE2 10^{-6} M+M-CSF+RANKL oproti kontrolní monokultuře

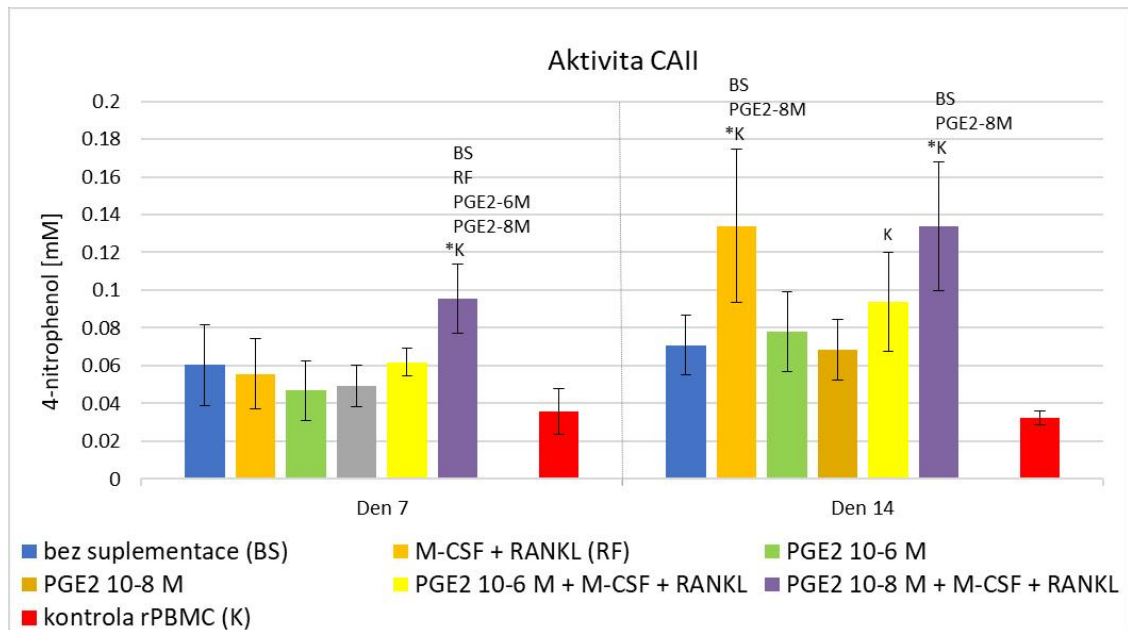
osteoblastů (K) a ko-kultuře bez suplementů (BS). Ko-kultura s přidáním PGE2 10^{-8} M vykazovala také vyšší hodnoty oproti skupině se suplementy M-CSF a RANKL. 7. den ko-kultivace byl zaznamenán signifikantní rozdíl v ko-kultuře s přidáním PGE2 10^{-8} M v kombinaci s M-CSF+RANKL oproti ko-kulturám pouze s M-CSF+RANKL a PGE2 10^{-6} M. 14. den ko-kultivace byla aktivita ALP vyšší v případě použití suplementace PGE2 10^{-6} oproti ko-kultuře s M-CSF+RANKL a PGE2 10^{-6} M+M-CSF + RANKL. Ko-kultury se suplementací PGE2 10^{-8} M, PGE2 10^{-6} M+M-CSF+RANKL, bez suplementace a kontrolní monokultura osteoblastů vykazovaly vyšší aktivitu ALP oproti ko-kultuře s přidáním růstovými faktory M-CSF+RANKL.



Graf č. 10: Aktivita ALP u osteoblastů v ko-kulturách 1., 7. a 14. den ko-kultivace. Buňky byly ko-kultivovány bez přidání suplementů a s přidáním suplementy: M-CSF+RANKL, PGE2 10^{-6} M, PGE2 10^{-8} M, PGE2 10^{-6} M+M-CSF+RANKL, PGE2 10^{-8} M+M-CSF+RANKL. Jako kontrola byla použita monokultura rOB. Označení nad sloupci značí statisticky významný rozdíl se zvolenou úrovní signifikance 0,05. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,001.

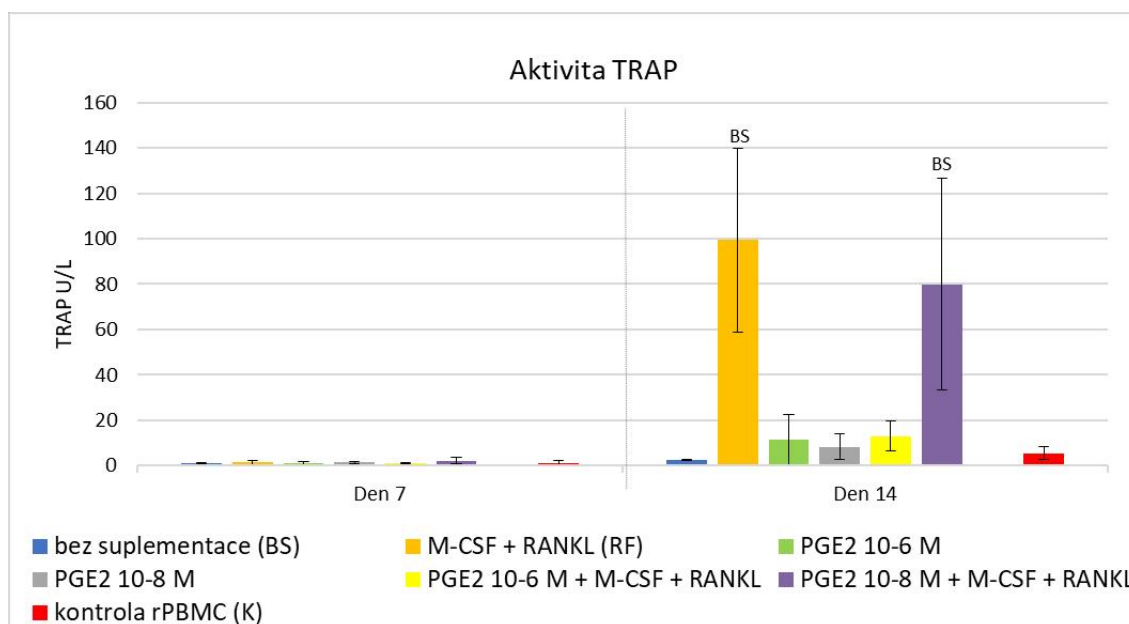
Pro stanovení vlivu použitých suplementů na osteoklastogenezi byla sledována aktivita CAII u PBMC/osteoklastů v 7. a 14. den ko-kultivace, jak je možné vidět v grafu č. 11. 7. den ko-kultivace byla aktivita CAII nejvyšší v ko-kultuře se suplementací PGE2 10^{-8} M+M-CSF+RANKL oproti skupinám bez suplementace, pouze s růstovými faktory M-CSF+RANKL, PGE2 10^{-6} M, PGE2 10^{-8} M a monokultuře PBMC (K). 14. den ko-kultivace byla aktivita CAII vyšší u skupin s přidáním suplementy M-CSF+RANKL a PGE2 10^{-8} M+M-CSF+RANKL oproti ko-kulturám bez přidání suplementace (BS), se

suplementací PGE2 10⁻⁸ M a monokultuře PBMC. Vyšší hodnoty byly také zaznamenány v ko-kultuře se suplementací PGE2 10⁻⁶ M+M-CSF+RANKL oproti monokultuře PBMC.



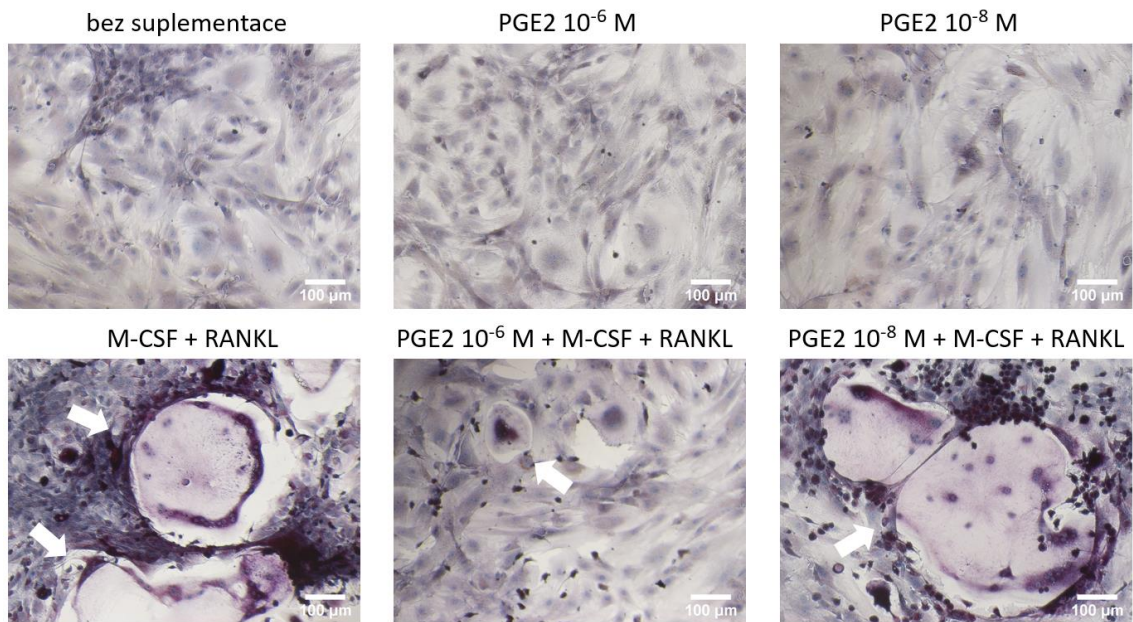
Graf č. 11: Stanovení aktivity CAII u PBMC/osteoklastů v ko-kulturách 7. a 14. den ko-kultivace. Buňky byly ko-kultivovány bez přidaných suplementů a s přidanými suplementy: M-CSF+RANKL, PGE2 10⁻⁶ M, PGE2 10⁻⁸ M, PGE2 10⁻⁶ M+M-CSF+RANKL, PGE2 10⁻⁸ M+M-CSF+RANKL. Jako kontrola byla použita monokultura PBMC s přidanými růstovými faktory M-CSF a RANKL. Označení nad sloupci značí statisticky významný rozdíl se zvolenou úroveň signifikance 0,05. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,001.

Pro ověření výsledků z předchozího měření byla osteoklastogeneze PBMC stanovena pomocí měření aktivity TRAP. Výsledky měření jsou zaznamenány v grafu č. 12. 7. den ko-kultivace nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly mezi ko-kulturami ani kontrolní monokulturou. Aktivita TRAP vykazovala obdobný trend u všech sledovaných ko-kultur. 14. den ko-kultivace byla aktivita TRAP vyšší v ko-kulturách s M-CSF+RANKL a PGE2 10⁻⁸ M+M-CSF+RANKL oproti ko-kultuře bez přidané suplementace.

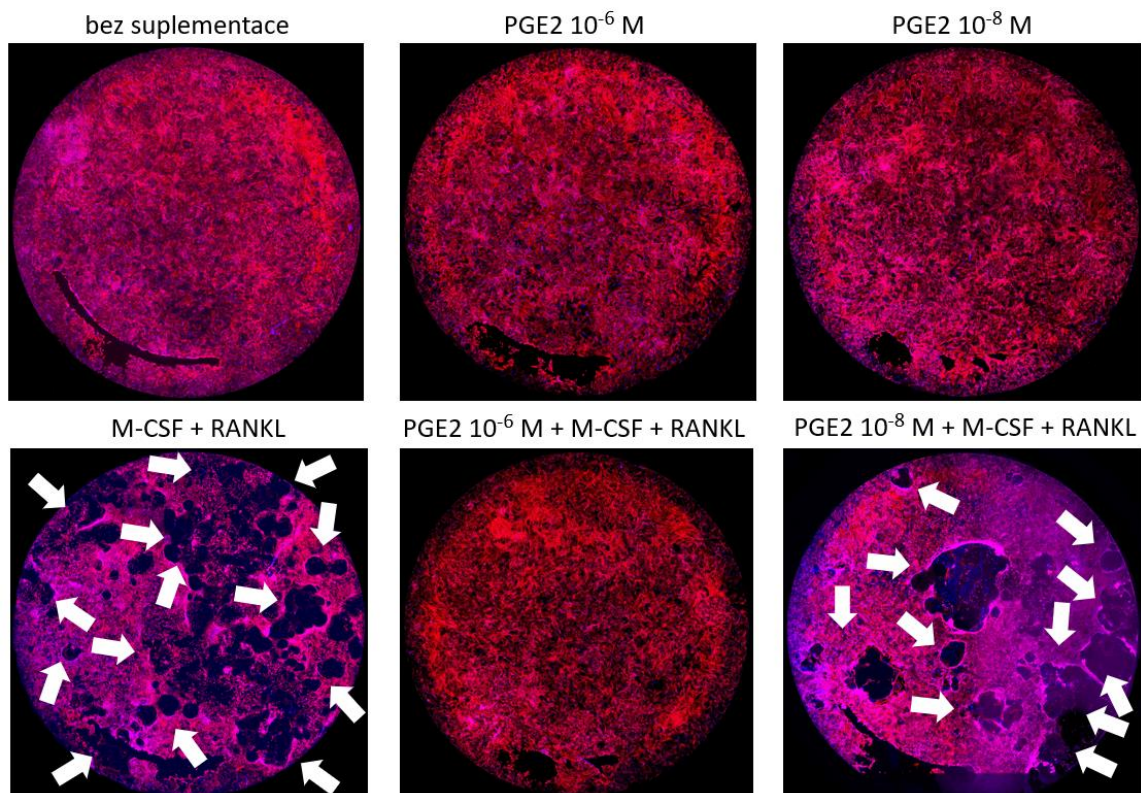


Graf č. 12: Stanovení aktivity TRAP u PBMC/osteoklastů v ko-kultúrách. Aktivita TRAP byla stanovena 7. a 14. den ko-kultivace. Buňky byly ko-kultivovány bez přidaných suplementů a s přidanými suplementy: M-CSF+RANKL, PGE2 10⁻⁶ M, PGE2 10⁻⁸ M, PGE2 10⁻⁶ M+M-CSF+RANKL, PGE2 10⁻⁸ M+M-CSF+RANKL. Jako kontrola byla použita monokultura PBMC s přidanými růstovými faktory M-CSF a RANKL. Označení nad sloupci značí statisticky významný rozdíl se zvolenou úroveň signifikance 0,05. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,001.

Následně byla pomocí TRAP barvení a barvením jader hematoxylinem sledována schopnost diferenciacie PBMC v osteoklasty 14. den ko-kultivace, viz obrázek č. 9. Pomocí mikroskopie byla tvorba osteoklastů zaznamenána ve skupinách s M-CSF+RANKL s i bez přidaného PGE2. Ve skupině s M-CSF+RANKL docházelo ke tvorbě vyššího počtu osteoklastů menšího objemu, zatímco ve skupině se suplementací PGE2 10⁻⁸+M-CSF+RANKL bylo osteoklastů méně, ale s větším objemem. Osteoklasty byly v malé míře zaznamenány i ve skupině se suplementací PGE2 10⁻⁶ M +M-CSF+RANKL. Pro ověření těchto zjištění byla osteoklastogeneze sledována pomocí fluorescenční mikroskopie a snímáno bylo celé dno jamky, viz obrázek č. 10. Tvorba osteoklastů korelovala s výsledky z předchozích měření. Nejvyšší počet osteoklastů byl zaznamenán v ko-kultuře s přidanými růstovými faktory M-CSF+RANKL, kde se potvrdil trend tvorby několika menších osteoklastů. Ve skupině s přidaným PGE2 10⁻⁸ M+M-CSF+RANKL byl zřetelný trend tvořit osteoklasty s větším objemem.



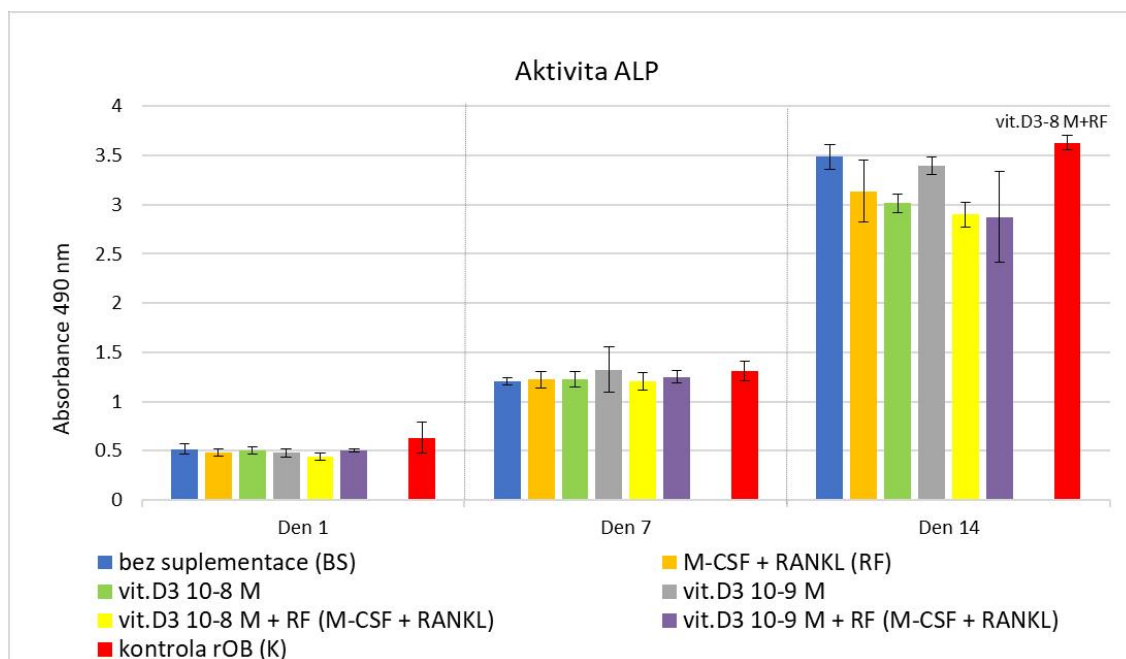
Obrázek č. 9: TRAP barvení a barvení jader hematoxylinem u ko-kultur osteoblastů a PBMC v poměru 1:10. Buňky byly ko-kultivovány bez přidaných suplementů, a s přidanými suplementy: M-CSF+RANKL, PGE2 10⁻⁶ M, PGE2 10⁻⁸ M, PGE2 10⁻⁶ M+M-CSF+RANKL, PGE2 10⁻⁸ M+M-CSF+RANKL. Snímky byly pořízeny v 14. den ko-kultivace za pomoci světelné mikroskopie. Měřítka je 100 µm, objektiv 10x.



Obrázek č. 10: Snímky z fluorescenční konfokální mikroskopie ko-kultury. Buňky byly ko-kultivovány bez přidaných suplementů a s přidanými suplementy: M-CSF+RANKL, PGE2 10⁻⁶ M, PGE2 10⁻⁸ M, PGE2 10⁻⁶ M+M-CSF+RANKL, PGE2 10⁻⁸ M+M-CSF+RANKL. Snímky byly pořízeny 14. den ko-kultivace. Aktinový cytoskelet byl barven Phalloidin-iFluor555 (červená barva), jádra byla barvena pomocí Hoechst 34580 (modrá barva). Snímáno bylo vždy celé dno jamky za pomoci funkce tile scan. Objektiv 10x.

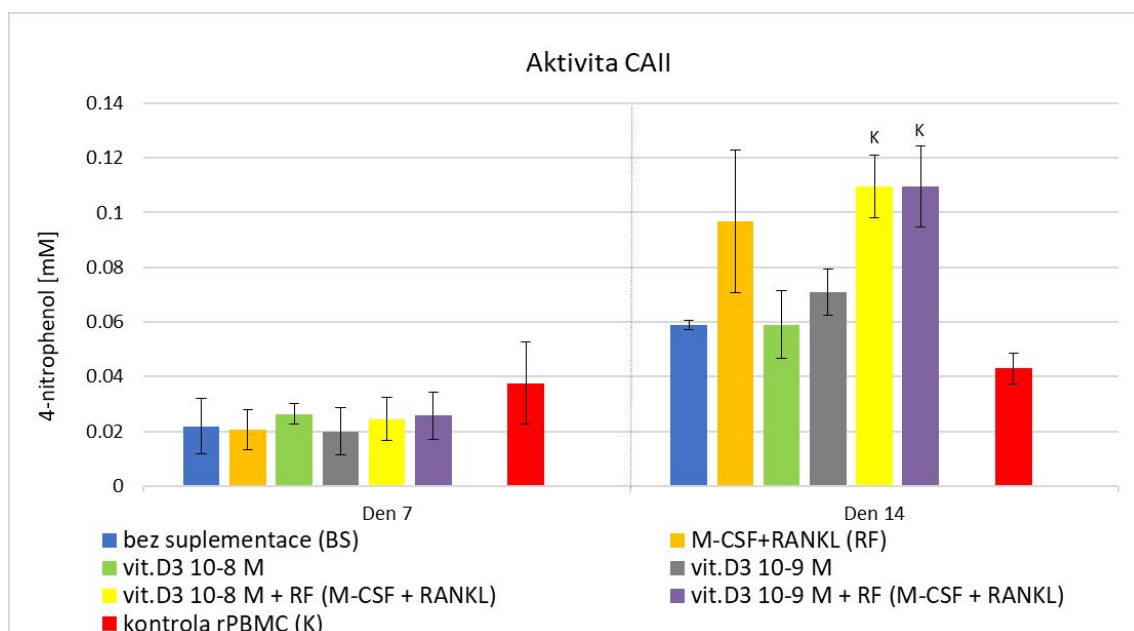
5.5 Stimulace osteoklastogeneze 1 α ,25-dihydroxyvitaminem D₃

V dalším experimentu byl do ko-kultur přidáván 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ v koncentraci 10⁻⁸ M a 10⁻⁹ M s nebo bez přidáných růstových faktorů M-CSF a RANKL. Stejně jako v předchozím experimentu byla sledována aktivita ALP u osteoblastů, viz graf č. 13. Mezi jednotlivými ko-kulturami nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v aktivitě ALP, pouze kontrolní monokultura vykazovala 14. den vyšší aktivitu oproti skupině s přidáním 1 α ,25-dihydroxyvitaminem D₃ 10⁻⁸ M+M-CSF+RANKL.



Graf č. 13: Aktivita ALP u osteoblastů v ko-kulturách 1., 7. a 14. den ko-kultivace. Buňky byly ko-kultivovány bez přidáných suplementů a s přidáními suplementy: M-CSF+RANKL, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ 10⁻⁸ M (vit.D3), 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ 10⁻⁹ M, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ 10⁻⁸+M-CSF+RANKL, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ 10⁻⁹+M-CSF+RANKL. Jako kontrola byla použita monokultura rOB. Označení nad sloupci značí statisticky významný rozdíl se zvolenou úroveň signifikance 0,05. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,001

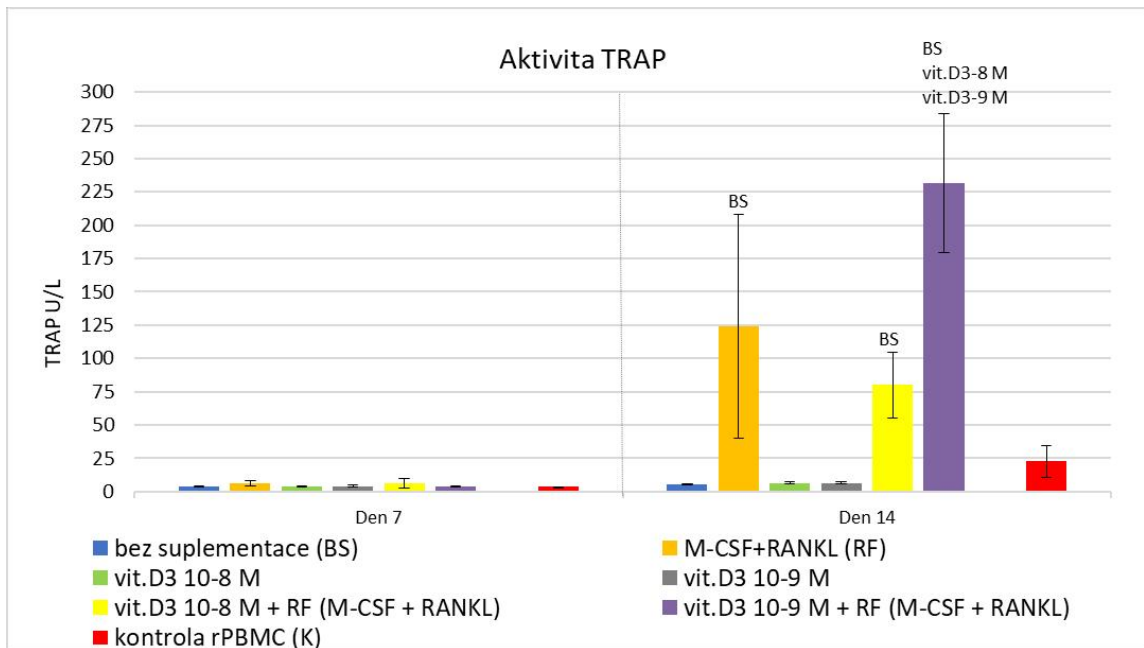
Pro stanovení vlivu přidáných suplementů na osteoklastogenezi byla sledována aktivita CAII, viz graf č. 14. Mezi sledovanými ko-kulturami nebyl zaznamenán žádný signifikantní rozdíl 7. ani 14. den ko-kultivace. Rozdíly byly pouze u kontrolní monokultury PBMC, která vykazovala vyšší hodnoty než bylo dosaženo ve skupinách s 1 α ,25-dihydroxyvitaminem D₃ 10⁻⁸ M+M-CSF+RANKL a 1 α ,25-dihydroxyvitaminem D₃ 10⁻⁹ M +M-CSF+RANKL.



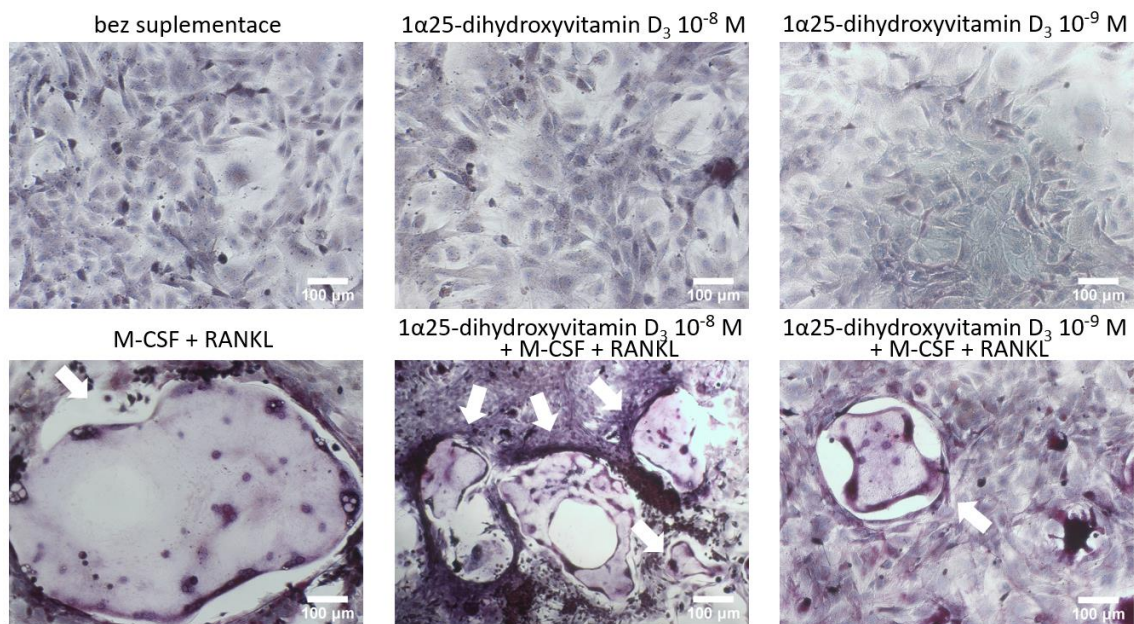
Graf č. 14: Stanovení aktivity CAII u PBMC/osteoklastů v ko-kulturách 7. a 14. den ko-kultivace. Buňky byly ko-kultivovány bez přidání suplementů a s přidáním suplementů: M-CSF+RANKL, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 10^{-8} M, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 10^{-9} M, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 10^{-8} M+M-CSF+RANKL, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 10^{-9} M+M-CSF+RANKL. Jako kontrola byla použita monokultura PBMC s přidáním růstových faktorů M-CSF a RANKL. Označení nad sloupci značí statisticky významný rozdíl se zvolenou úrovní signifikance 0,05. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,001.

Následně byla osteoklastogeneze sledována pomocí měření aktivity TRAP, viz graf č. 15. Vyšší aktivita TRAP byla zaznamenána 14. den v ko-kultuře s přidáním růstových faktorů M-CSF+RANKL a v obou sledovaných koncentracích s $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 v kombinaci s M-CSF+RANKL oproti skupině bez suplementace. Vyšší aktivity TRAP bylo také dosaženo ve skupině se suplementací $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminem D_3 10^{-9} M+M-CSF+RANKL, oproti ko-kulturám, kde byl přidán pouze $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 .

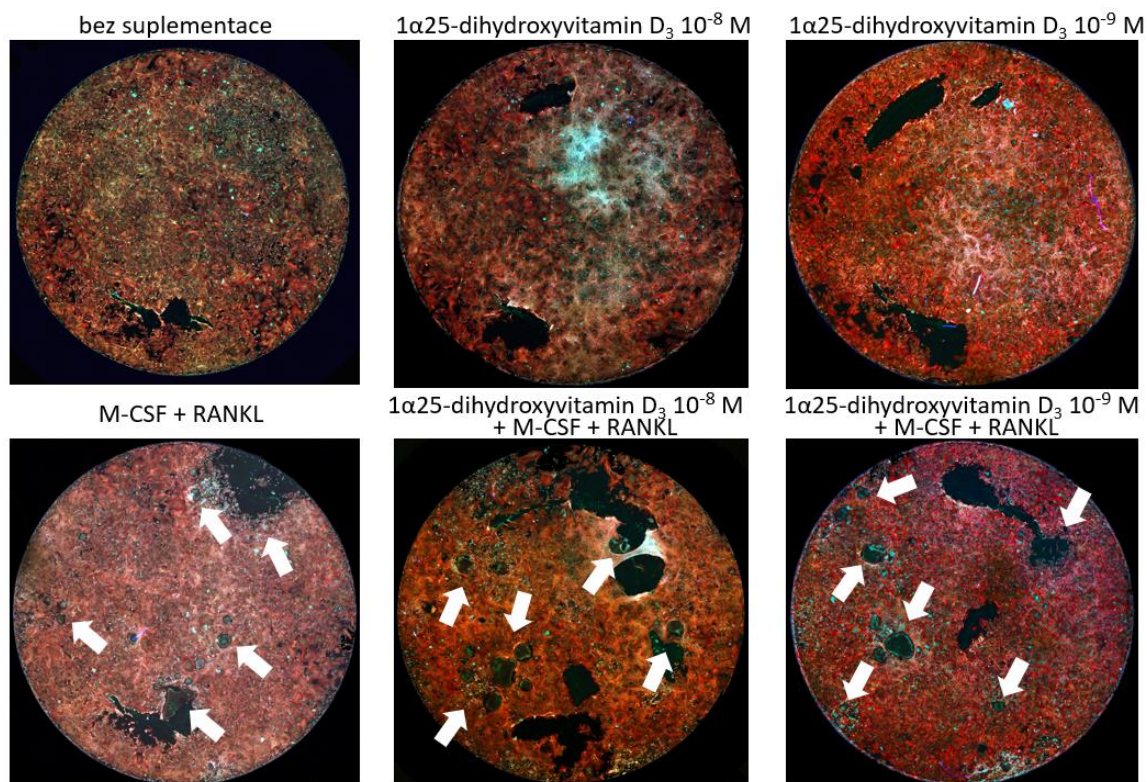
Výsledky byly opět ověřeny pomocí mikroskopie. TRAP barvení a barvení jader hematoxylinem odhalilo tvorbu osteoklastů ve všech skupinách s přidáním suplementace M-CSF+RANKL a taktéž u $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D_3 +M-CSF+RANKL v obou testovaných koncentracích. Ve skupinách pouze s $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminem D_3 nebyla tvorba osteoklastů zaznamenána, viz obrázek č. 11. Stejná zjištění byla pozorována i pomocí fluorescenční mikroskopie, viz obrázek č. 12.



Graf č. 15: Stanovení aktivity TRAP u PBMC/osteoklastů v ko-kultuřách 7. a 14. den ko-kultivace. Buňky byly ko-kultivovány bez přidání suplementů a s přidáními suplementy: M-CSF+RANKL, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 10^{-8} M, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 10^{-9} M, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 10^{-8} +M-CSF+RANKL, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 10^{-9} +M-CSF+RANKL. Jako kontrola byla použita monokultura PBMC s přidáními růstovými faktory M-CSF a RANKL. Označení nad sloupci značí statisticky významný rozdíl se zvolenou úrovní signifikance 0,05. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,001.



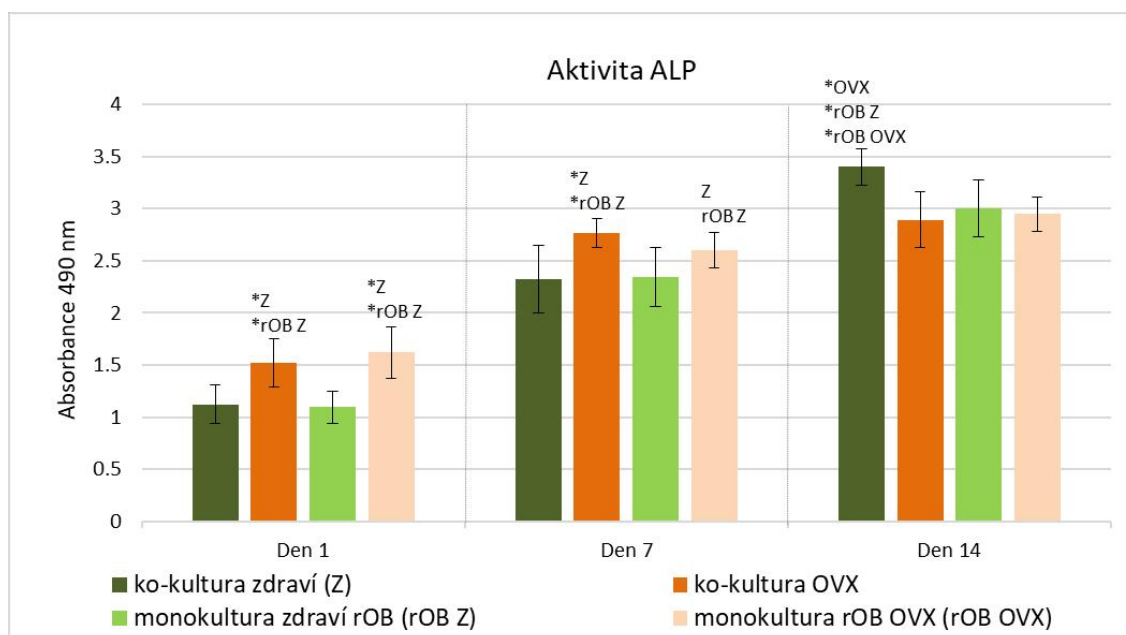
Obrázek č. 11: TRAP barvení a barvení jader hematoxylinem u ko-kultur osteoblastů a PBMC. Buňky byly ko-kultivovány bez a s přidáními suplementy: M-CSF+RANKL, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 10^{-8} M, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 10^{-9} M, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 10^{-8} +M-CSF+RANKL, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 10^{-9} +M-CSF+RANKL. Snímky byly pořízeny v 14. den ko-kultivace za pomoci světelné mikroskopie. Měřítka je 100 μ m, objektiv 10x.



Obrázek č. 12: Snímky z fluorescenční konfokální mikroskopie ko-kultury. Buňky byly ko-kultivovány bez přidaných suplementů a přidanými suplementy: M-CSF+RANKL, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 10^{-8} M, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 10^{-9} M, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 10^{-8} M+M-CSF+RANKL, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 10^{-9} M +M-CSF+RANKL. Snímky byly pořízeny 14. den ko-kultivace. Osteoklasty jsou na obrázku vyznačeny šipkami. Aktinový cytoskelet byl barven Phalloidin-iFluor555 (červená barva), jádra byla barvena pomocí DAPI (modrá barva) a membrány pomocí DiOC6(3) (zelená barva). Snímáno bylo vždy celé dno jamky za pomoci funkce tile scan. Objektiv 10x.

5.6 Stimulace osteoklastogeneze u OVX buněk

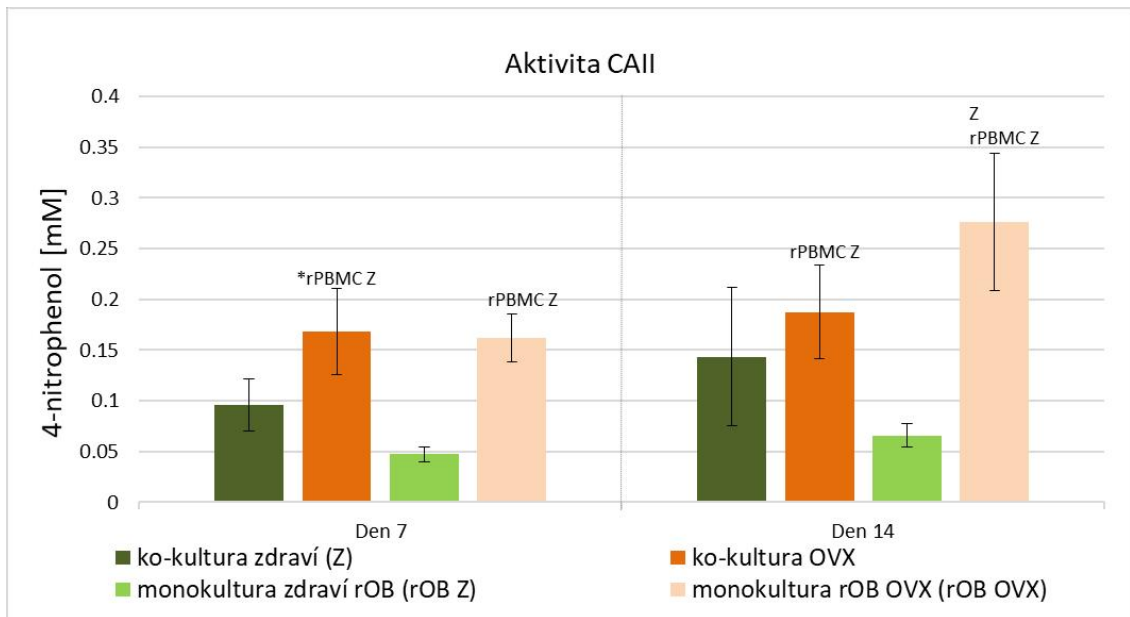
V následujícím experimentu byl sledován potenciál PBMC diferencovat v osteoklasty u buněk vyizolovaných z potkanů s indukovanou osteoporózou v ko-kultuře s osteoblasty. Osteoporóza byla u těchto zvířat indukována pomocí ovariektomie. Ko-kultury tvořené osteoblasty a PBMC izolované z ovariektomizovaných jedinců (OVX ko-kultury) byly srovnávány s ko-kulturami buněk izolovaných ze zdravých zvířat (Z ko-kultury). Jako kontrolní monokultury byly použity buňky ze zdravých i OVX jedinců. Sledována byla aktivita osteoblastů 1., 7. a 14. den ko-kultivace pomocí měření aktivity ALP, viz graf č. 16. 7. den ko-kultivace byla zaznamenána vyšší aktivita ALP u osteoblastů izolovaných z OVX jedinců, jak v ko-kultuře, tak v kontrolní monokultuře. 14. den ko-kultivace naopak aktivita ALP statisticky významně vzrostla u z ko-kultury oproti všem ostatním skupinám.



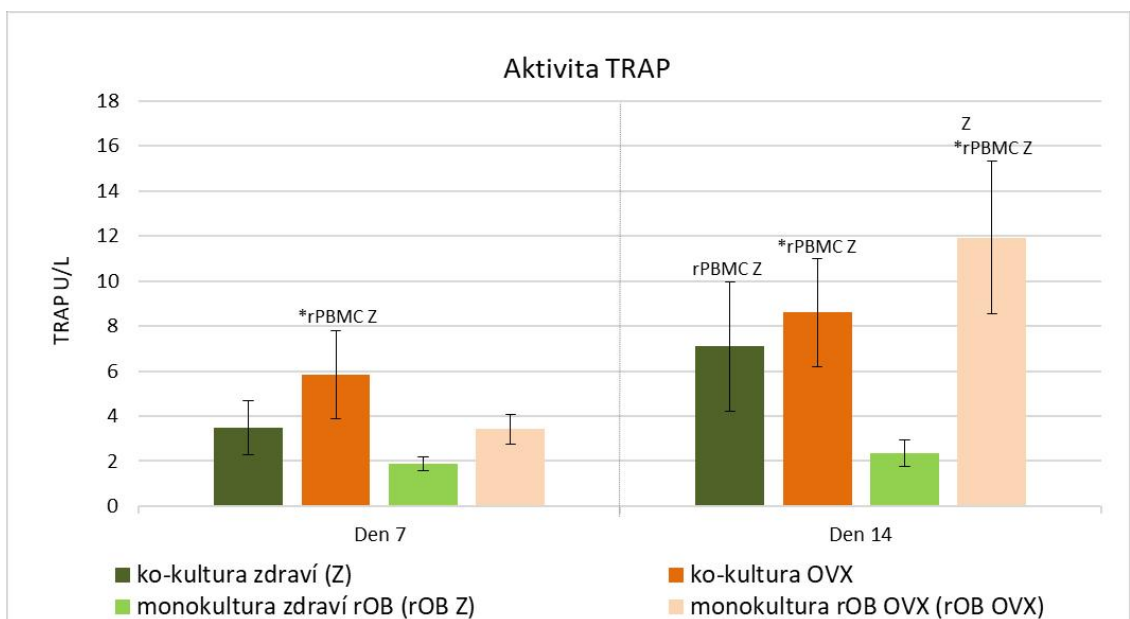
Graf č. 16: Aktivita ALP u osteoblastů v ko-kulturách 1., 7. a 14. den ko-kultivace. Srovnávána byla aktivita ALP osteoblastů v ko-kultuře s PBMC. Buňky byly izolovány buď ze zdravých (Z) nebo ovariektomizovaných potkanů (OVX). Jako kontrola byly použity monokultury rOB ze zdravých (Rob Z) a ovariektomizovaných (rOB OVX) potkanů. Označení nad sloupci značí statisticky významný rozdíl se zvolenou úroveň signifikance 0,05. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,001.

Osteoklastogeneze byla sledována pomocí měření aktivity CAII. 7. ani 14. den ko-kultivace (graf č. 17) nebyly zaznamenány signifikantní rozdíly mezi sledovanými ko-kulturami. 7. i 14. den byla aktivita CAII vyšší u OVX ko-kultury a OVX monokultury PBMC oproti monokultuře PBMC Z. 14. den navíc OVX monokultura vykazovala vyšší aktivitu CAII než Z ko-kultura.

Pomocí měření aktivity TRAP nebyly mezi Z a OVX ko-kulturami zaznamenány žádné signifikantní rozdíly, viz graf č. 18. 7. den OVX ko-kultura vykazovala vyšší aktivitu TRAP oproti monokultuře PBMC Z. 14. den byla aktivita TRAP vyšší v ko-kulturách s buňkami zdravých i OVX zvířat oproti monokultuře PBMC Z. Vyšší aktivita byla také zaznamenána v kontrolní OVX monokultuře PBMC, oproti Z ko-kultuře i oproti kontrolní monokultuře PBMC Z.

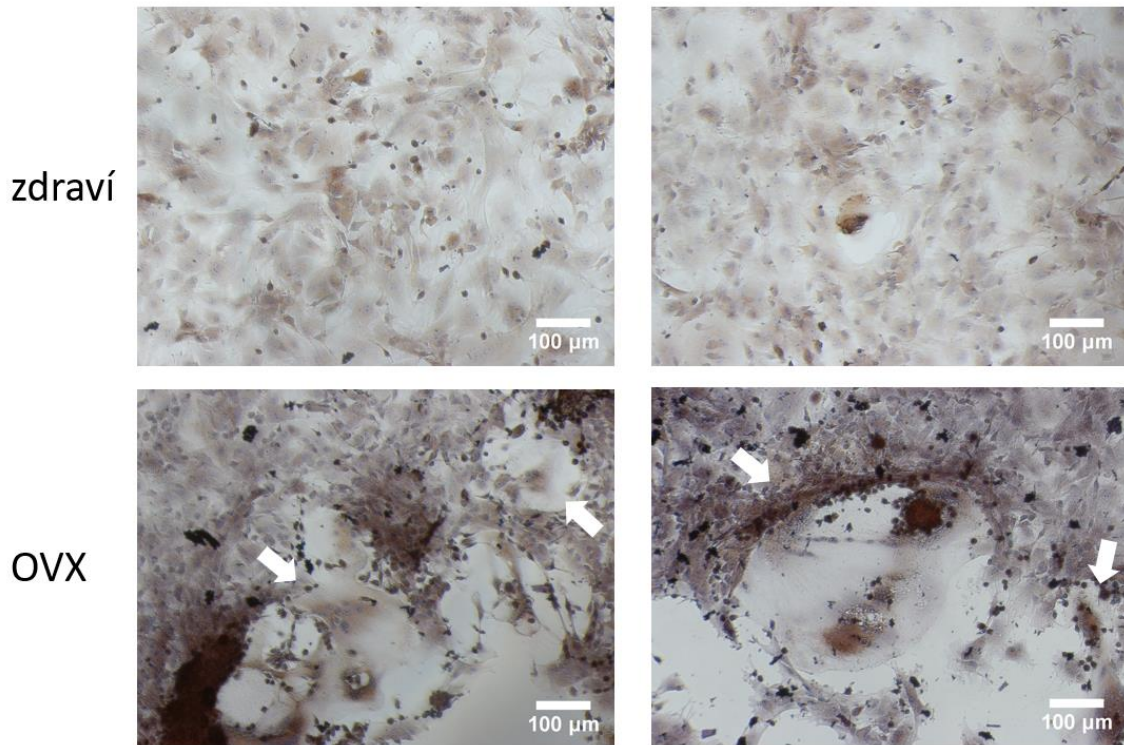


Graf č. 17: Aktivita CAII u PBMC/osteoklastů v ko-kulturách 7. a 14. den ko-kultivace. Srovnávána byla aktivita CAII u buněk izolovaných ze zdravých a ovariektomizovaných potkanů. Jako kontrola byly použity monokultury PBMC ze zdravých (rPBMC Z) a ovariektomizovaných (rPBMC OVX) potkanů s přidáním růstových faktorů M-CSF a RANKL. Označení nad sloupci značí statisticky významný rozdíl se zvolenou úrovní signifikance 0,05. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,001.

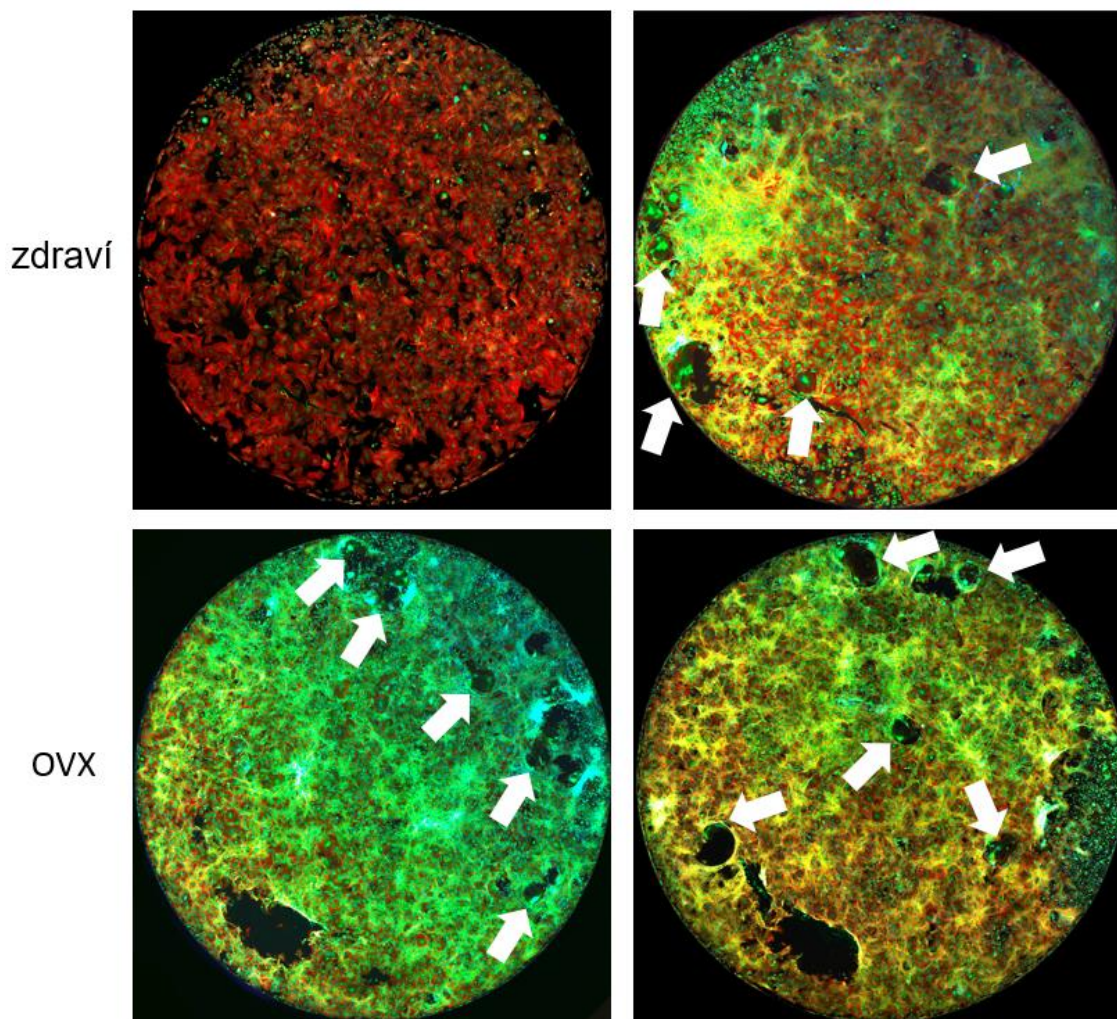


Graf č. 18: Aktivita TRAP u PBMC/osteoklastů v ko-kulturách 7. a 14. den ko-kultivace. Srovnávána byla aktivita TRAP u buněk izolovaných ze zdravých a ovariektomizovaných potkanů. Jako kontrola byly použity monokultury PBMC ze zdravých (rPBMC Z) a ovariektomizovaných (rPBMC OVX) potkanů s přidáním růstových faktorů M-CSF a RANKL. Označení nad sloupci značí statisticky významný rozdíl se zvolenou úrovní signifikance 0,05. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,001.

Tvorba osteoklastů byla detekována také pomocí mikroskopie. TRAP barvení a barvením jader hematoxylinem odhalilo zvýšenou tvorbu osteoklastů u OVX ko-kultur oproti Z ko-kultuře s buňkami ze zdravých zvířat, viz obrázek č. 13. Podobné výsledky byly zaznamenány také pomocí fluorescenční mikroskopie, viz obrázek č. 14. Zde byl potenciál tvorby osteoklastů zaznamenán i u ko-kultur se zdravými buňkami. Při bližším zkoumání byl ale zřetelný trend zvýšené osteoklastogeneze v ko-kulturách s buňkami OVX jedinců.



Obrázek č. 13: TRAP barvení a barvení jader hematoxylinem u ko-kultur osteoblastů a PBMC. Srovnávána byla tvorba osteoklastů u ko-kultur s buňkami ze zdravých zvířat (2 snímky v horní řadě) s ko-kulturami buněk z ovariektomizovaných jedinců (OVX – 2 snímky v dolní řadě). Ko-kultury byly kultivovány bez přidané suplementace. Snímky byly pořízeny v 14. den ko-kultivace za pomoci světelné mikroskopie. Měřítka je 100 µm, objektiv 10x.



Obrázek č. 14: Snímky z fluorescenční konfokální mikroskopie ko-kultur osteoblastů a PBMC. Srovnávána byla tvorba osteoklastů u ko-kultur s buňkami ze zdravých zvířat (2 snímky v horní řadě) s ko-kulturami buněk z ovariektomizovaných jedinců (OVX – 2 snímky v dolní řadě). Ko-kultury byly kultivovány bez přidané suplementace. Snímky byly pořízeny 14. den ko-kultivace. Osteoklasty jsou na obrázku vyznačené šipkami. Aktinový cytoskelet byl barven Phalloidin-iFluor555 (červená barva), jádra byla barvena pomocí DAPI (modrá barva) a membrány pomocí DiOC6(3) (zelená barva). Snímáno bylo vždy celé dno jamky za pomoci funkce tile scan. Objektiv 10x.

5.7 Porovnání osteoklastogeneze u ko-kultur stimulovaných PGE2 nebo 1 α 25-dihydroxyvitaminem D₃ s OVX ko-kulturou

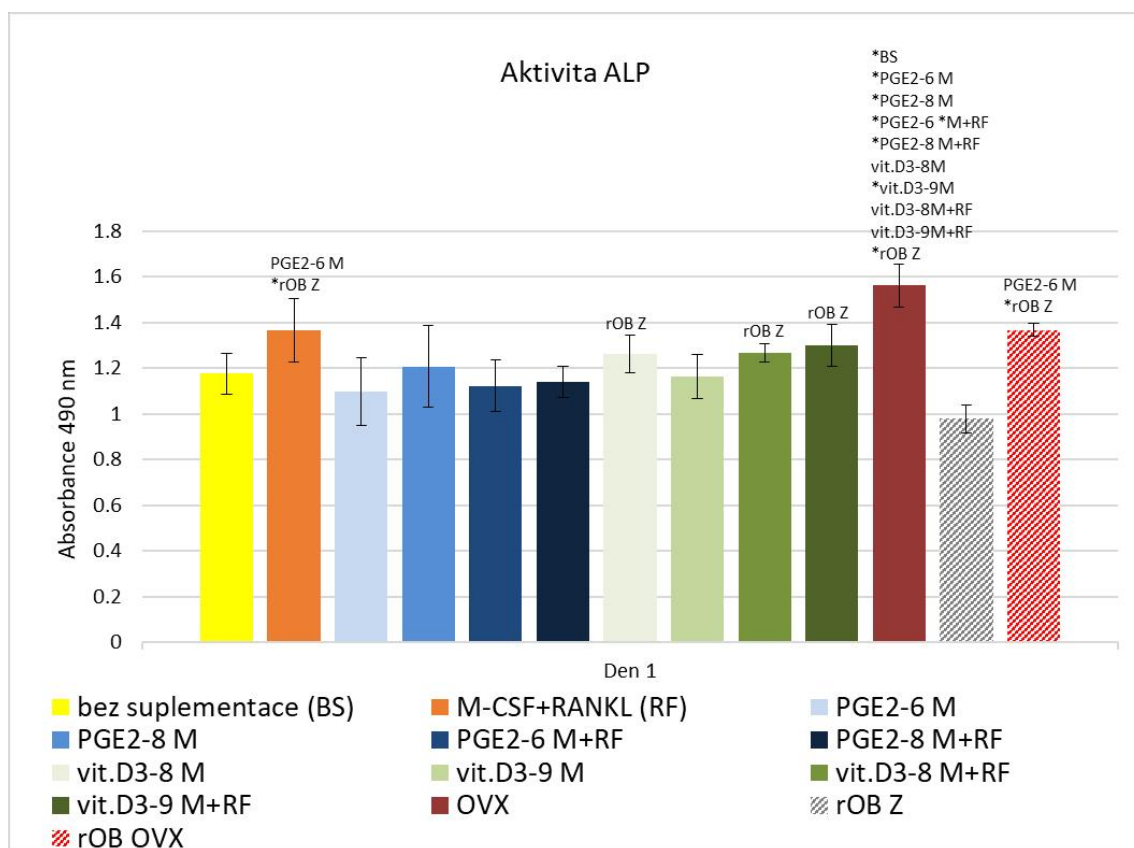
V následujícím experimentu byly sledován potenciál tvorby osteoklastů u buněk ze zdravých jedinců stimulovaných suplementy a u buněk pocházejících z OVX potkanů. Rozdělení do skupin je uvedeno v tabulce č.7. Buňky byly v tomto pokusu nasazeny ve stejném čase, aby bylo možné porovnat tvorbu osteoklastů mezi testovanými skupinami. Buňky byly ko-kultivovány po dobu 14 dní. Osteoklastogeneze byla detekována pomocí standardních metod pro detekci osteoklastů: stanovení aktivity CAII, TRAP.

Sledována byla také aktivita ALP u osteoblastů. Pro kontrolu byly při měření aktivity ALP sledovány také monokultury osteoblastů ze zdravých (rOB Z) a ovariektomizovaných potkanů (rOB OVX). U metod zaměřených na markery typické pro osteoklastogenezi, tedy aktivita TRAP a CAII, byly sledovány monokultury PBMC taktéž ze zdravých (rPBMC Z) a OVX potkanů (rPBMC OVX).

Tabulka č. 7: Sledované ko-kultury

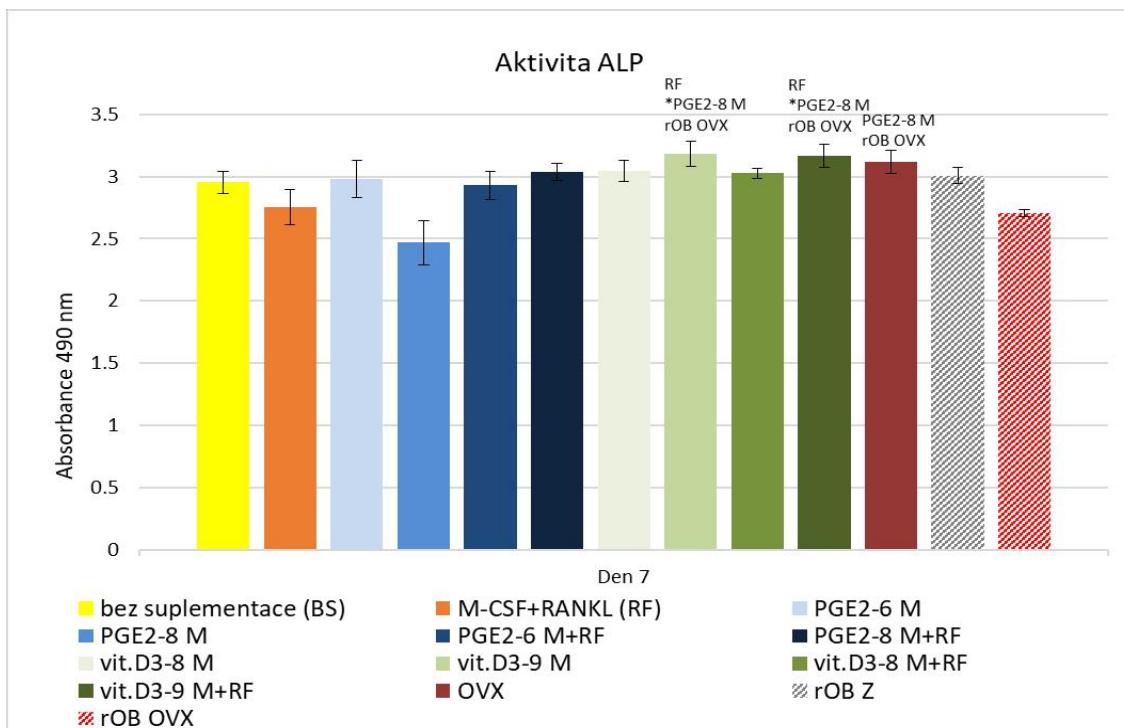
Skupina		
bez suplementů	zdravé samice potkanů	
růstové faktory (RF): M-CSF + RANKL		
PGE2 10 ⁻⁶ M		
PGE2 10 ⁻⁸ M		
PGE2 10 ⁻⁶ M + RF (M-CSF + RANKL)		
PGE2 10 ⁻⁸ M + RF (M-CSF + RANKL)		
1 α 25-dihydroxyvitamin D ₃ 10 ⁻⁸ M		
1 α 25-dihydroxyvitamin D ₃ 10 ⁻⁹ M		
1 α 25-dihydroxyvitamin D ₃ 10 ⁻⁸ M + RF (M-CSF + RANKL)		
1 α 25-dihydroxyvitamin D ₃ 10 ⁻⁹ M + RF (M-CSF + RANKL)		
OVX		samice potkanů s indukovanou osteoporózou pomocí ovariektomie

Pro vytvoření optimálního *in vitro* modelu byla sledována aktivita ALP u osteoblastů 1., 7., a 14. den ko-kultivace. Pro přehlednost jsou jednotlivé dny rozděleny do samostatných grafů. Aktivita ALP se 1., 7. ani 14. den výrazně nelišila. 1. den byly zaznamenány signifikantně vyšší hodnoty ve skupině s přidanými růstovými faktory M-CSF+RANKL (RF) a rOB OVX oproti skupině s přidaným PGE2 10⁻⁶ M a kontrolní monokulturou rOB Z. Aktivita ALP u OVX ko-kultury byla vyšší, než ve skupinách: bez suplementů, PGE2 10⁻⁶ M, PGE2⁻⁸ M, PGE2⁻⁶ M+RF, PGE2⁻⁸ M+RF, 1 α 25-dihydroxyvitamin D₃ 10⁻⁸ M, 1 α 25-dihydroxyvitamin D₃ 10⁻⁹ M, 1 α 25-dihydroxyvitamin D₃ 10⁻⁸ M+RF, 1 α 25-dihydroxyvitamin D₃ 10⁻⁹ M+RF, rOB Z, viz graf č. 19. Vyšší aktivita ALP byla také zaznamenána u skupin s přidaným 1 α 25-dihydroxyvitaminem D₃ 10⁻⁸ M, 1 α 25-dihydroxyvitaminem D₃ 10⁻⁸+RF, 1 α 25-dihydroxyvitaminem D₃ 10⁻⁹ M+RF oproti kontrolní monokultuře rOB Z.

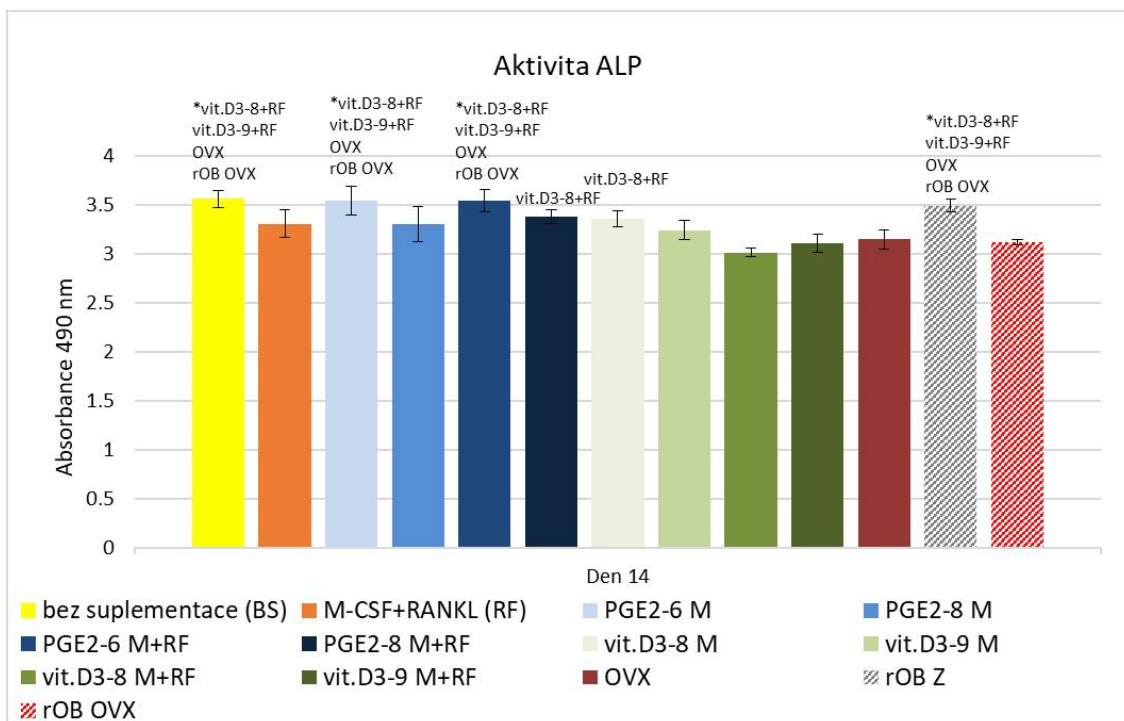


Graf č. 19: Aktivita ALP u osteoblastů v ko-kulturách 1. den ko-kultivace. Srovnávána byla aktivita ALP osteoblastů u buněk izolovaných ze zdravých a OVX potkanů. Sledované skupiny jsou uvedeny v tabulce č. 7. Jako kontrola byly použity monokultury rOB ze zdravých/OVX potkanů. Označení nad sloupci značí statisticky významný rozdíl se zvolenou úroveň signifikance 0,05. Hodnoty označené * jsou s úrovní signifikace 0,001.

7. den ko-kultivace (graf č. 20) byla zaznamenána vyšší aktivita ALP u skupiny s přidáním $1\alpha 25$ -dihydroxyvitaminem D_3 10^{-9} M s a bez kombinace RF oproti skupinám suplementovaných pouze RF, PGE2 10^{-8} M a kontrolní monokultuře rOB OVX. Aktivita ALP byla také vyšší v OVX ko-kultuře oproti skupinám s s přidáním PGE2 10^{-8} M a kontrolní monokultuře rOB OVX. 14. den ko-kultivace došlo k vzrůstu aktivity ALP u skupin bez suplementů, s přidáním PGE2 10^{-6} M s a bez kombinace RF a u kontrolní monokultury rOB Z oproti ko-kulturám s přidáním $1\alpha 25$ -dihydroxyvitaminem D_3 v koncentracích 10^{-8} M i 10^{-9} M v kombinaci s růstovými faktory M-CSF+RANKL (vit. D_3 -8+RF, vit. D_3 -9+RF) i oproti ko-kultuře s buňkami z OVX potkanů a kontrolní monokultuře rOB OVX. Vyšší aktivita ALP byla také u skupin s přidáním $1\alpha 25$ -dihydroxyvitaminem D_3 10^{-8} M oproti skupině s přidáním $1\alpha 25$ dihydroxyvitaminem D_3 10^{-8} M+M-CSF+RANKL (vit. D_3 -8+RF), viz graf č. 21.

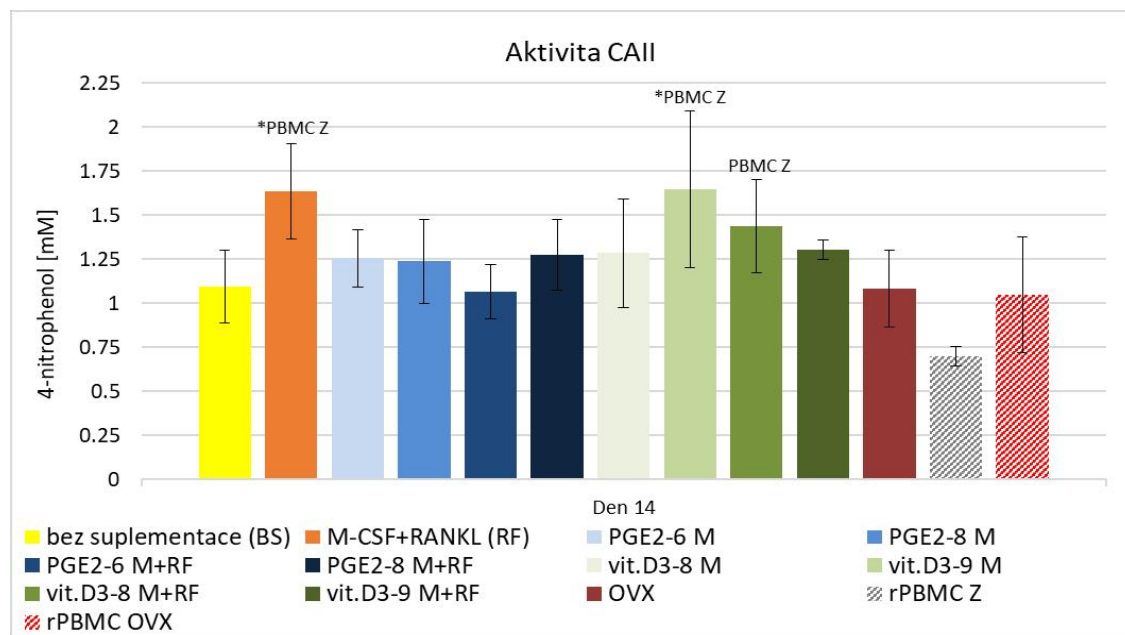


Graf č. 20: Aktivita ALP u osteoblastů v ko-kulturách 7. den ko-kultivace. Srovnávána byla aktivita ALP osteoblastů u buněk izolovaných ze zdravých a OVX potkanů. Sledované skupiny jsou uvedeny v tabulce č. 7. Jako kontrola byly použity monokultury rOB ze zdravých/OVX potkanů. Označení nad sloupci značí statisticky významný rozdíl se zvolenou úroveň signifikance 0,05. Hodnoty označené * jsou s úrovní signifikace 0,001.



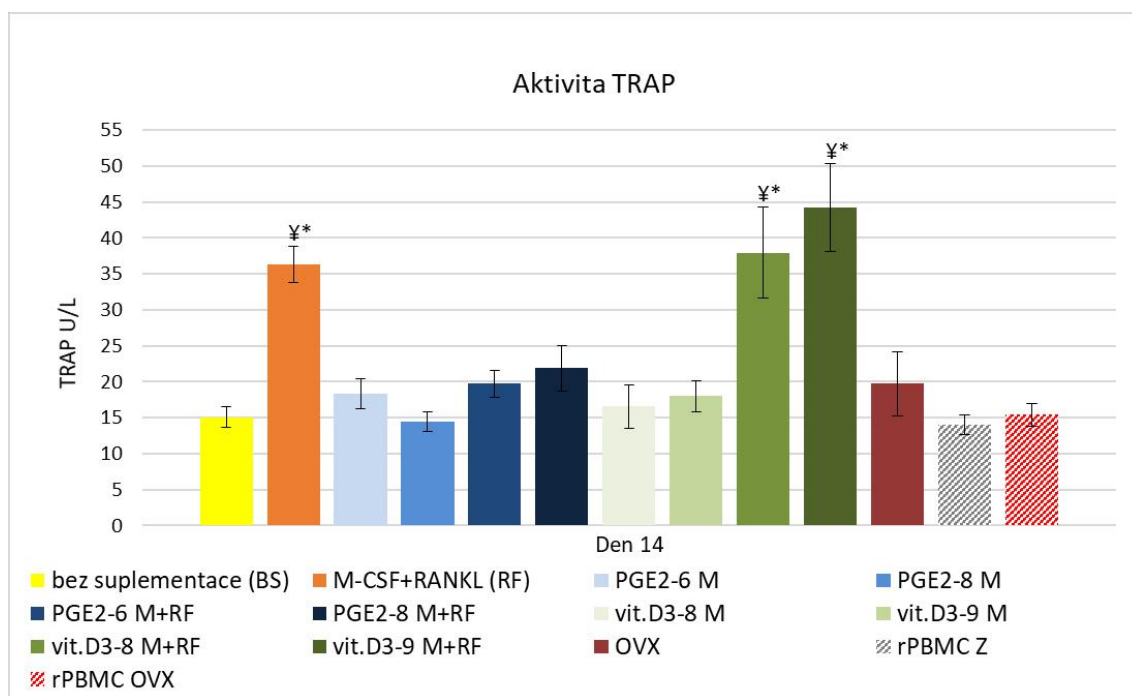
Graf č. 21: Aktivita ALP u osteoblastů v ko-kulturách 14. den ko-kultivace. Srovnávána byla aktivita ALP osteoblastů u buněk izolovaných ze zdravých a OVX potkanů. Sledované skupiny jsou uvedeny v tabulce č. 7. Jako kontrola byly použity monokultury rOB ze zdravých/OVX potkanů. Označení nad sloupci značí statisticky významný rozdíl se zvolenou úroveň signifikance 0,05. Hodnoty označené * jsou s úrovní signifikace 0,001.

Osteoklastogeneze byla sledována pomocí měření aktivity CAII 14. den ko-kultivace, viz graf č. 22. Pomocí této metody nebyly zaznamenány žádné signifikantní rozdíly mezi sledovanými ko-kulturami. Aktivita CAII byla vyšší u skupin se suplementací: M-CSF+RANKL, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 10^{-9} M, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 10^{-8} M+RF oproti kontrolní monokultuře PBMC ze zdravého potkana (PBMC Z).



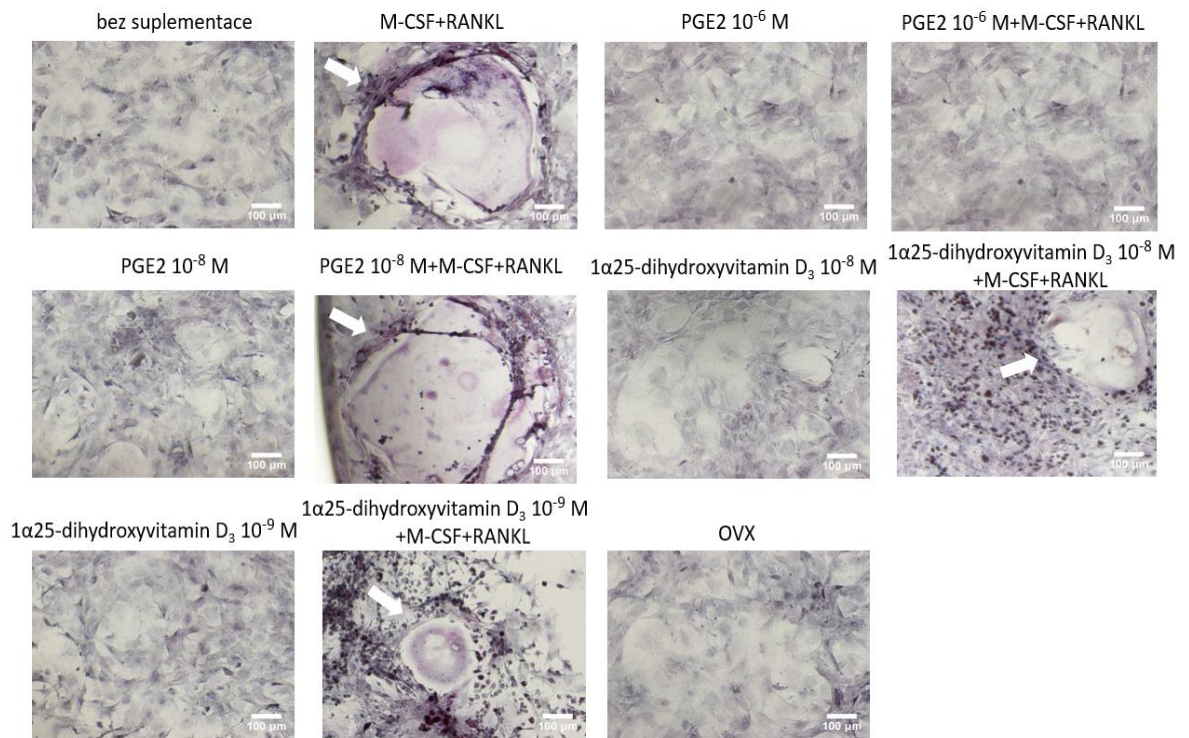
Graf č. 22: Stanovení aktivity CAII u PBMC/osteoklastů v ko-kulturách 14. den ko-kultivace. Srovnávána byla aktivita CAII PBMC/osteoklastů u buněk izolovaných ze zdravých a OVX potkanů. Sledované skupiny jsou uvedeny v tabulce č. 7. Jako kontrola byla použita monokultura rPBMC s přidávanými růstovými faktory M-CSF a RANKL ze zdravých i OVX potkanů. Označení nad sloupci značí statisticky významný rozdíl se zvolenou úroveň signifikance 0,05. Hodnoty označené * jsou s úrovní signifikace 0,001.

Následně byla osteoklastogeneze sledována pomocí stanovení aktivity TRAP, jak je možné vidět na grafu č. 23. 14. den ko-kultivace bylo nejvyšší aktivity TRAP dosaženo pomocí přidávání suplementace: RF, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D_3 10^{-8} M+RF, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D_3 10^{-9} +RF. Naměřené hodnoty u těchto skupin byly vyšší než u skupin: bez suplementů, PGE2 10^{-6} M, PGE2 10^{-8} M, PGE2 10^{-6} M+RF, PGE2 10^{-8} M+RF, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D_3 10^{-9} M, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D_3 10^{-9} M, OVX ko-kultury a zdravé a OVX monokultury.

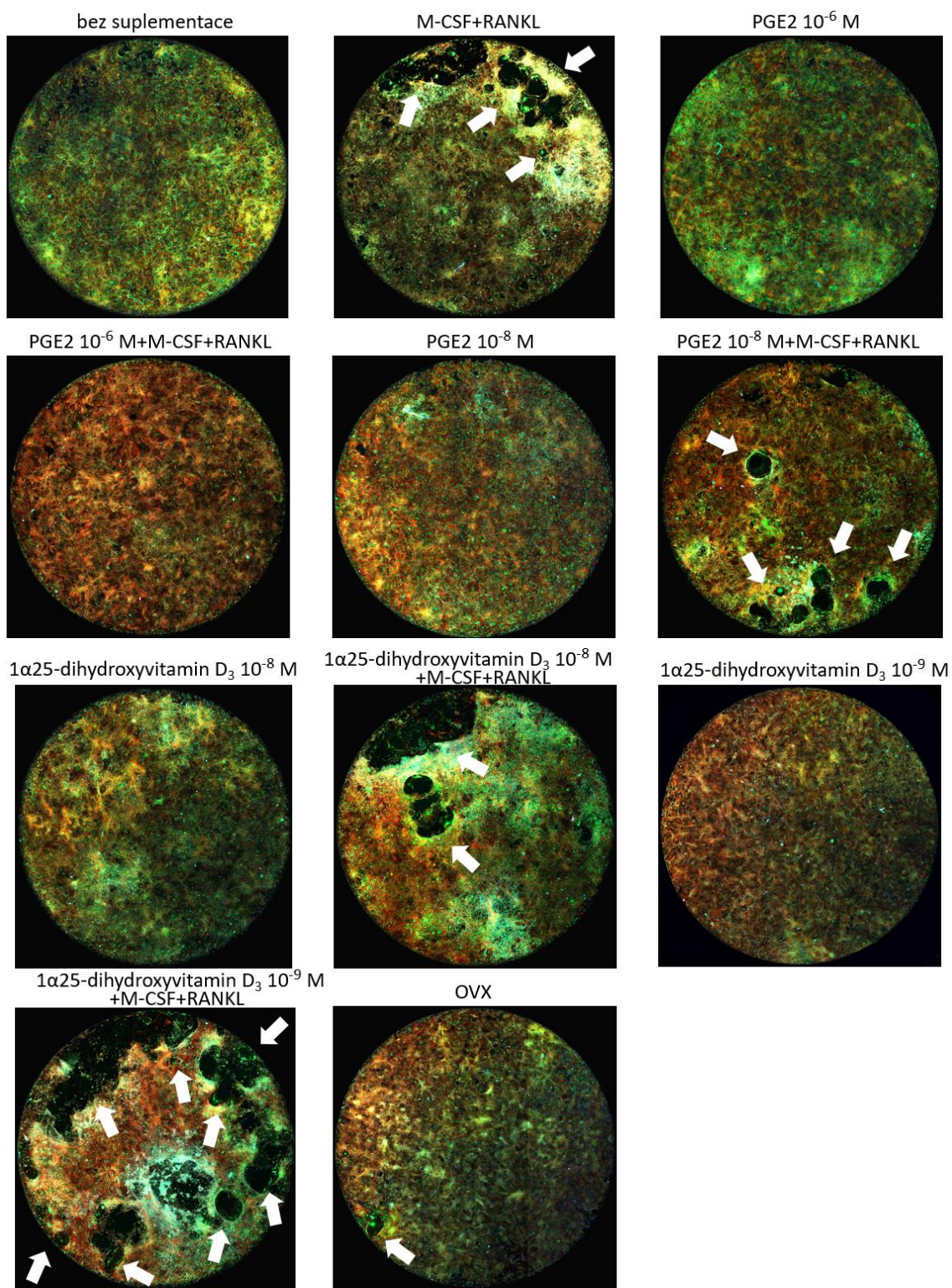


Graf č. 23: Stanovení aktivity TRAP u PBMC/osteoklastů v ko-kulturách 14. den ko-kultivace. Srovnávána byla aktivita TRAP PBMC/osteoklastů u buněk izolovaných ze zdravých a OVX potkanů. Sledované skupiny jsou uvedeny v tabulce č. 7. Jako kontrola byla použita monokultura rPBMC s přidáním růstových faktorů M-CSF a RANKL ze zdravých i OVX potkanů. Označení nad sloupci značí statisticky významný rozdíl se zvolenou úrovní signifikance 0,05. Hodnoty označené Ξ* jsou s úrovní signifikace 0,001 a znamenají rozdíl vůči BS, PGE2⁻⁶ M, PGE2⁻⁸ M, PGE2⁻⁶ M+RF, PGE2⁻⁸ M+RF, vit. D3⁻⁸ M, vit. D3⁻⁹ M, OVX, PBMC Z, PBMC OVX.

Pro ověření výsledků z enzymatických esejí byla tvorba osteoklastů detekována také pomocí mikroskopie. TRAP barvení a barvením jader hematoxylinem odhalilo zvýšenou tvorbu osteoklastů u ko-kultur s přidáním RF, PGE2 10⁻⁸ M+RF, 1α25-dihydroxyvitaminem D₃ 10⁻⁸ M+RF a 1α25-dihydroxyvitaminem D₃ 10⁻⁹ M+RF. Samotné přidávání PGE2 a 1α25-dihydroxyvitaminu D₃ v obou koncentracích nevedlo k tvorbě osteoklastů, viz obrázek č. 15. Obdobná zjištění byla pozorována i pomocí fluorescenčního barvení, viz obrázek č. 16. Snímáno bylo vždy celé dno jamky. Tvorba osteoklastů byla pomocí této metody zaznamenána kromě výše uvedených skupin i u OVX ko-kultury.



Obrázek č. 15: TRAP barvení a barvení jader hematoxylinem u ko-kultur osteoblastů a PBMC. Srovnávána byla tvorba osteoklastů u ko-kultur s buňkami ze zdravých zvířat (Z) s ko-kulturami buněk z OVX jedinců. Sledované skupiny jsou uvedeny v tabulce č. 7. Snímky byly pořízeny v 14. den ko-kultivace za pomoci světelné mikroskopie. Měřítko je 100 μm, objektiv 10x.

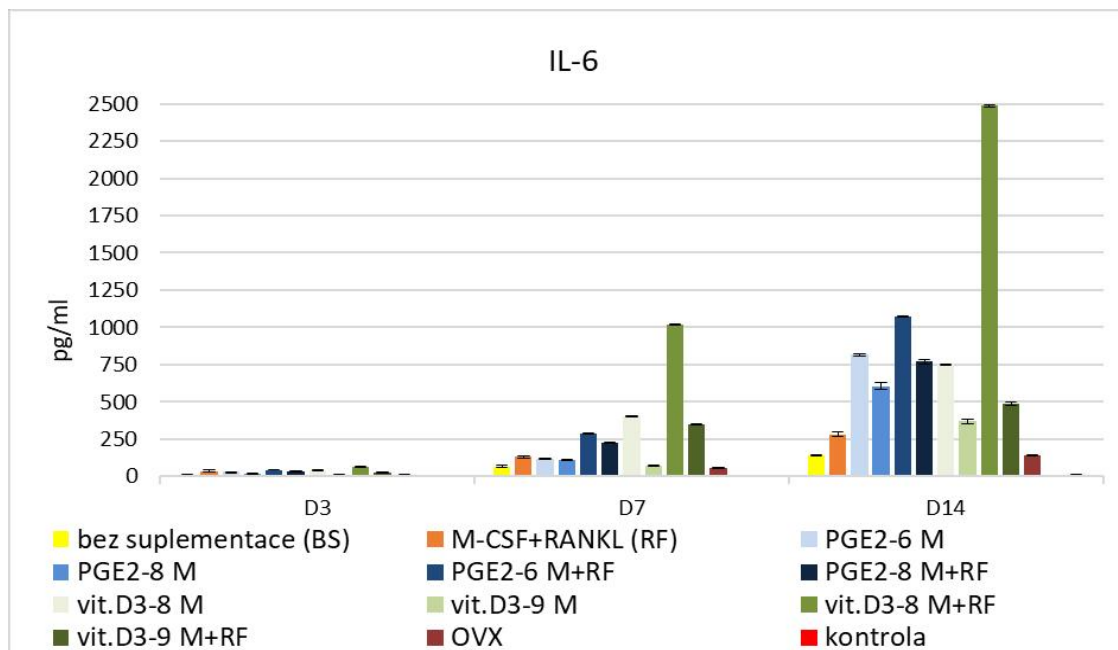


Obrázek č. 16: Snímky z fluorescenční konfokální mikroskopie ko-kultury osteoblastů a PBMC. Srovnávána byla tvorba osteoklastů u ko-kultur s buňkami ze zdravých zvířat (Z) s ko-kulturami buněk z OVX jedinců. Sledované skupiny jsou uvedeny v tabulce č. 7. Snímky byly pořízeny 14. den ko-kultivace. Osteoklasty jsou na obrázku vyznačeny šipkami. Aktinový cytoskelet byl barven Phalloidin-iFluor555 (červená barva), jádra byla barvena pomocí DAPI (modrá barva) a membrány pomocí DiOC6(3) (zelená barva). Snímáno bylo vždy celé dno jamky za pomoci funkce tile scan. Využívána byla také funkce Z-stack. Objektiv 10x.

5.8 Stanovení produkce cytokinů IL-6 a TNF- α metodou Bio-Plex

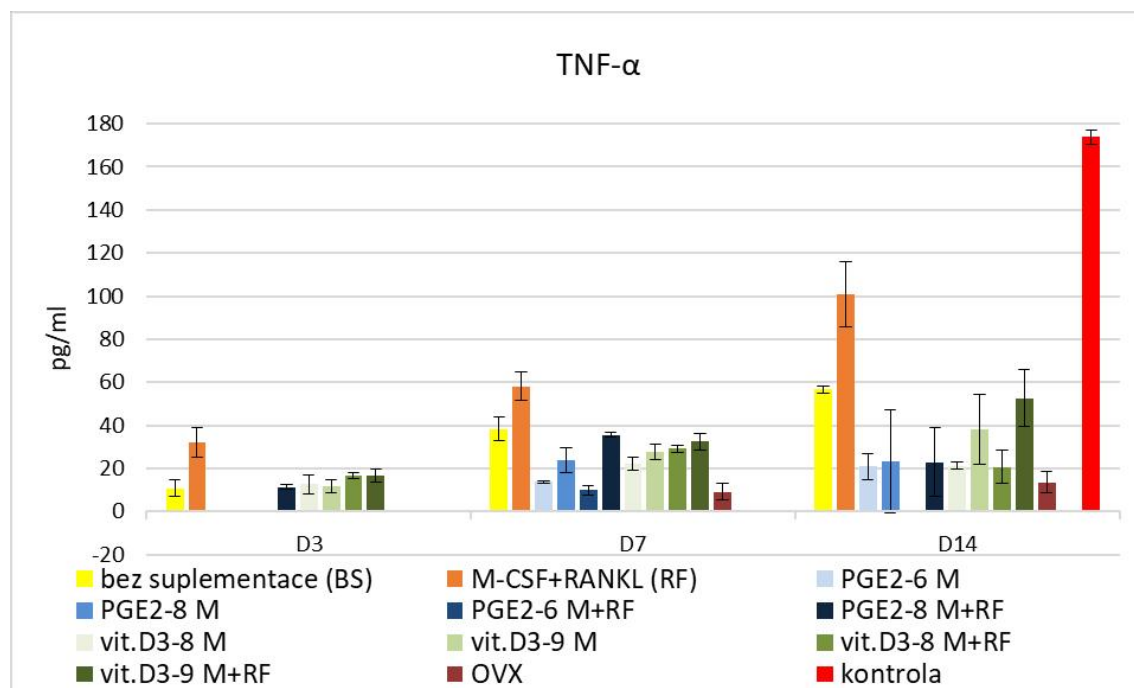
V následujícím experimentu byla pomocí multiplexové analýzy sledována produkce IL-1 β , IL-6 a TNF- α v ko-kulturách osteoblastů a PBMC. Použity byly buňky izolované ze zdravých samic potkanů, stimulované k osteoklastogenezi pomocí suplementace M-CSF, RANKL, PGE2 a 1 α ,25-dihydroxyvitaminu D₃ v různých kombinacích a koncentracích. Koncentrace cytokinů IL-1 β , IL-6 a TNF- α byla také sledována u buněk pocházejících ze samic potkanů po ovariektomii. Sledované skupiny byly stejné, jako v kapitole 5.7, viz tabulka č. 7. Vzhledem k detekčnímu limitu metody Bio-Plex byly buňky v tomto experimentu ko-kultivovány v 24-jamkové destičce, přičemž počet buněk byl úměrně navýšen. Další postup byl stejný jako u předchozích experimentů a buňky byly ko-kultivovány po dobu 14 dní. Produkce cytokinů v ko-kultuře byla měřena 3., 7. a 14. den ko-kultivace. Jako kontrolní skupina byly použity PBMC stimulované LPS a INF- γ . Supernatant kontroly byl odebírán po 48h kultivace.

V grafu č. 24 jsou zaznamenány výsledky z měření produkce IL-6. 3. den ko-kultivace nebyly zaznamenány znatelné rozdíly mezi sledovanými skupinami a hladina produkce IL-6 byla velmi nízká. 7. i 14. den ko-kultivace došlo k prudkému nárůstu produkce IL-6 ve skupině s přidaným 1 α ,25-dihydroxyvitaminem D₃ 10⁻⁸ M v kombinaci s M-CSF+RANKL oproti ostatním sledovaným skupinám. PBMC stimulované LPS a IFN- γ produkovaly pouze nízké hladiny IL-6.



Graf č. 24: Stanovení produkce IL-6 v ko-kultuře osteoblastů a PBMC 3., 7. a 14. den ko-kultivace. Srovnávána byla produkce IL-6 u buněk izolovaných ze zdravých a OVX potkanů. Sledované skupiny jsou uvedeny v tabulce č. 7. Jako pozitivní kontrola byly použity PBMC stimulované LPS a IFN- γ .

Produkce TNF- α je zaznamenána v grafu č. 25. V grafu je zřetelný trend zvyšování produkce tohoto cytokinu u skupiny s přidanými růstovými faktory M-CSF+RANKL, kde se hladina tohoto cytokinu v čase zvyšovala. Kontrolní PBMC stimulované LPS a IFN- γ produkovaly vysoké hladiny TNF- α .



Graf č. 25: Stanovení produkce TNF- α v ko-kultuře osteoblastů a PBMC 3., 7. a 14. den ko-kultivace. Srovnávána byla produkce TNF- α u buněk izolovaných ze zdravých a OVX potkanů. Sledované skupiny jsou uvedeny v tabulce č. 7. Pokud v grafu sloupec chybí, byly naměřené hodnoty pod detekčním limitem. Jako pozitivní kontrola byly použity PBMC stimulované LPS a IFN- γ .

Produkcí IL-1 β se použitou metodou nepodařilo detekovat ve vzorcích ani u pozitivní kontroly. Jelikož křivka standardů vyšla dle očekávání a nejednalo se tedy o chybu v metodice, byla zřejmě hladina tohoto cytokinu pod detekčním limitem metody.

6. Diskuze

Ko-kultivační systémy se běžně používají pro studium buněčné komunikace mezi různými typy buněk, nebo pro jejich využití v tkáňovém inženýrství za účelem regenerace tkání (Goers *et al.*, 2014). Pro studium kostní remodelace, či jejích patologických stavů, jsou ko-kultivační systémy vhodnou volbou, jelikož je známo, že právě komunikace mezi osteoblasty a osteoklasty je v tomto procesu klíčová (Phan *et al.*, 2004). Nedávno byly modely ko-kultivace osteoblastů a osteoklastů přezkoumány s cílem lépe porozumět patologickým změnám při metabolickém onemocnění kostí a navrhnout vhodnou léčbu. Stanovení standardního modelu ko-kultivace kostních buněk je ale náročný problém, vzhledem k různým typům buněk, které mohou být vybrány a parametrům ko-kultury, které mohou být v rámci výzkumu odlišně nastaveny v závislosti na hlavním cíli dané studie (Zhu *et al.*, 2018). Typicky jsou používány jak buněčné linie, tak primární buňky, které vykazují vysokou heterogenitu s ohledem na způsob izolace a manipulaci s buňkami. Výsledky se také mohou lišit v závislosti na nastavení ko-kultivačního systému, např. na počtu nasazených buněk, časovém rozestupu nasazení, výběrem kultivačního média, přidané suplementace či materiálu, na kterém jsou buňky ko-kultivovány.

V předkládané práci bylo cílem navodit osteoklastogenezi z PBMC v přítomnosti osteoblastů. K tomuto účelu byla do ko-kultury přidávána kombinace cytokinů M-CSF a RANKL, u nichž je již dlouho známo, že stimulují tvorbu osteoklastů (Burgess *et al.*, 1999). Sledována byla i účinná koncentrace PGE2 a $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D₃. Sledován byl také potenciál osteoklastogeneze u buněk pocházejících z OVX potkanů. Před ko-kultivací buněk byly nejprve optimalizovány kultivační podmínky v monokulturách osteoblastů a PBMC. Kultivační médium bylo nejprve testováno v 5 různých poměrech média, viz tabulka č.5. Následně byla sledována metabolická aktivita a buněčná proliferace u monokultur osteoblastů a PBMC. Metabolická aktivita byla stanovena MTS testem a proliferace buněk byla stanovena pomocí kitu Quant-iT™ dsDNA Assay 1.,3.,7. a 14. den kultivace. Jelikož u osteoblastů byla metabolická aktivita (graf č. 1) i proliferace buněk (graf č. 3) obdobná a u PBMC bylo nejvyšších hodnot dosaženo v poměru médií 1:1 (graf č. 2 a 4), byl pro následující experimenty zvolen tento poměr medií.

Pro získání vyvážené ko-kultury je nutné buňky nasadit ve správném množství a poměru. Z toho důvodu byly testovány různé poměry nasazených buněk - 1:100, 1:33 a 1:10. Osteoblasty byly nasazeny v hustotě 7 000 buněk/cm² a PBMC v hustotě 700 000

buněk/cm², 220 000 buněk/cm² a 70 000 buněk/cm². Osteoklastogeneze byla následně sledována ve 2 skupinách: bez suplementace a s přidanými růstovými faktory M-CSF a RANKL pro podpoření osteoklastogeneze. Pro další ko-kultivaci osteoblastů a PBMC byl zvolen buněčný poměr 1:10, jelikož barvení TRAP a fluorescenční barvení (obrázky č. 5 a 6) neodhalilo žádné zásadní rozdíly mezi buněčnými poměry a aktivita ALP (graf č.5) byla nejvyšší v buněčném poměru 1:10. Navíc v poměru 1:33 docházelo k agregaci TRAP pozitivních buněk, což může vést k jejich následné destrukci (Jolly *et al.*, 2018).

Experimenty v rámci této práce vyžadují použití poměrně velkého množství buněk, které by nebylo možné izolovat pouze z jednoho zvířete. Vzhledem k tomu byly buňky během izolace poolovány, což také umožňuje předejít rozdílným výsledkům způsobených interindividuální variabilitou mezi jednotlivými jedinci. Před izolací PBMC je periferní krev mezi jedinci poolována a při nasazení buněk do destičky mohou být, kromě monocytů a makrofágů, přítomny další buněčné typy. V populaci izolovaných buněk jsou mimo jiné typicky přítomny také T a B lymfocyty a NK buňky. Přítomnost těchto imunitních buněk by tedy mohla způsobit alogenní reakci vůči cizorodým buňkám. Ačkoliv tedy poolování buněk přináší jisté výhody, je zde riziko, že dojde ke stimulaci lymfocytů a tím k ovlivnění výsledků ko-kultury, jelikož produkované zánětlivé faktory by mohly podporovat osteoklastogenezi (Amarasekara *et al.*, 2018). Z tohoto důvodu bylo následně zjišťováno, zda má poolování buněk při izolaci vliv na tvorbu osteoklastů. Za tímto účelem byly vytvořeny dvě skupiny ko-kultur, kdy v rámci skupiny č. 1 nedocházelo k poolování buněk a skupiny č. 2, kde byly buňky poolovány. Ve skupině č. 1 byly porovnáváni 3 jedinci a ve skupině č. 2 jejich kombinace. Sledována byla aktivita ALP u osteoblastů a aktivita CAII a TRAP v případě PBMC/osteoklastů. Aktivita ALP byla v rámci sledovaných skupin obdobná (graf č. 6). Nižší aktivita ALP byla zaznamenána ve skupině č. 1. u jedince č. 3 a ve skupině č. 2, kde byly PBMC poolovány mezi jedincem č. 1 a č. 3 (označeno 1:3) a pro osteoblasty byly taktéž použity buňky jedince č. 3. Tento výsledek lze přisoudit interindividuálním rozdílům. Je zajímavé, že právě u těchto stejných skupin byla výrazně zvýšena metabolická aktivita buněk (graf č. 9), což by mohlo být způsobeno tím, že osteoblasty byly v odlišné fázi diferenciaci a výrazně proliferovaly. Nejvyšších hladin ALP je dosahováno, pokud mají osteoblasty již tvar kvádrů a produkce tohoto enzymu je spojena s tvorbou krystalů hydroxyapatitu v kostní matrix (Orimo, 2010). Tuto hypotézu by ale bylo třeba ověřit stanovením specifických markerů osteogenní diferenciaci, jako je například Runx2, Osterix pro preosteoblasty a osteokalcin, osteopontin a kostní sialoprotein II u zralých osteoblastů

(Miron *et* Zhang, 2012). Kontrolní monokultura osteoblastů izolovaných z jedince č. 3 vykazovala zpočátku kultivace obdobné hodnoty, jako osteoblasty jedince č. 3 v nepoolované i poolované ko-kultuře, ale 14.den dosahovala vyšších hodnot, srovnatelných se ostatními jedinci. Je tedy možné, že zmíněné skupiny osteoblastů byly ovlivněny PBMC, které k nim byly přidány, jelikož je známo, že i PBMC/osteoklasty ovlivňují diferenciaci osteoblastů, jak přímým kontaktem, tak produkcí solubilních signálních molekul. V obou skupinách byly použity PBMC ze stejného jedince, tedy ve skupině č.1 z jedince č.3 a ve skupině č.2 byly PBMC jedince č. 3 poolovány s buňkami jedince č.1. I v případě PBMC se může jednat pouze o interindividuální rozdíly. Osteoklastogeneze byla sledována měřením aktivity CAII a TRAP. Nicméně aktivita CAII a TRAP nebyla sledována v monokultuře všech použitých PBMC. Proto nebylo možné posoudit, zda měli PBMC izolované z odlišných zvířat různý diferenciační potenciál a vysvětlit tak zvýšené hladiny MTS a sníženou aktivitu ALP u výše zmíněných skupin osteoblastů. CAII a TRAP aktivita byla srovnatelná jak u nepoolovaných, tak poolovaných ko-kultur. Oproti tomu kontrolní monokultury PBMC ukázaly zvýšenou aktivitu CAII, pokud byly PBMC poolovány (graf č. 7). Výsledky měření aktivity TRAP ale tento rozdíl nepotvrdily, což mohlo být ovlivněno i velkými směrodatnými odchylkami mezi všemi zkoumanými skupinami (graf č. 8). Pro ověření těchto výsledků byly buňky následně barveny pomocí TRAP barvení v kombinaci s hematoxylinem a pomocí fluorescenčního barvení (obrázky č. 7 a 8). Mikroskopie neodhalila potenciál tvorby osteoklastů ani u jedné ze sledovaných skupin, tudíž jsme došli k závěru, že poolování buněk v našem nastavení neovlivňuje následnou osteoklastogenezi a i v dalších pokusech byly buňky nadále poolovány. Poolování buněk lze nalézt i v literatuře. Při testování vlivu poolování MSC buněk bylo zjištěno, že nedochází k negativnímu ovlivnění proliferace a osteogenní diferenciace lidských MSC za podmínek *in vitro* a naopak podporuje kompenzaci variability specifické pro dárce, čímž se zlepšuje kvalita dat (Widholz *et al.*, 2019). V rámci zmíněné studie byly zaznamenány mírné změny v chronologii diferenciačních vzorců, nicméně osteogenní potenciál diferenciace byl srovnatelný. K ověření těchto výsledků by bylo vhodné použít i další metody, jako je analýza genové exprese, které by pomohly lépe porozumět rozdílům v chronologii v rámci osteogenní diferenciace.

V následujících experimentech bylo cílem stimulovat osteoklastogenezi PBMC v ko-kultuře s osteoblasty pomocí suplementů PGE2 a 1 α ,25-dihydroxyvitaminu D₃. Nejprve byl sledován vliv prozánětlivého mediátoru PGE2. PGE2 stimuluje

osteoklastogenezi inhibicí OPG, stimulací RANKL a IGF-I v osteoblastech a stimulací produkce RANK receptoru v osteoklastech (Mccarthy *et al.*, 1991, Liu, 2006). Sledovány byly dvě koncentrace PGE2, 10^{-6} M a 10^{-8} M, bez nebo s přidáním M-CSF a RANKL. PGE2 byl přidán po 24 hodinách ko-kultivace a následně každý 3. den kultivace při výměně média bez nebo v kombinaci s M-CSF a RANKL. Aktivita CAII i TRAP (graf č.11 a 12) byla výrazně snížena, pokud byly buňky ošetřeny pouze PGE2 v obou testovaných koncentracích. Tyto hodnoty byly srovnatelné s kontrolní ko-kulturou, kde nebyly přidávány suplementy. Pokud byly k PGE2 v koncentraci 10^{-8} M přidávány suplementy M-CSF a RANKL, došlo v této skupině ke zvýšení aktivity CAII i TRAP. Tato zjištění korelují i s výsledky ze světelné a konfokální mikroskopie (obrázky č. 9 a 10), které v této skupině prokázaly tvorbu velkých osteoklastů s několika jádry. Velký počet menších osteoklastů se tvořil ve skupině, kde byly přidávány pouze faktory M-CSF a RANKL. Komplexní opakování experimentů (kapitola 5.7) ukázalo podobné výsledky. Rozdíly v aktivitě CAII a TRAP (grafy č. 22 a 23) nebyly signifikantně prokázány, avšak mikroskopie (obrázky č. 15 a 16) prokázala tvorbu osteoklastů ve skupinách se suplementací M-CSF a RANKL a PGE2 10^{-8} v kombinaci s M-CSF a RANKL. Na rozdíl od předchozího pokusu nebyl ale zřetelný rozdíl ve velikosti osteoklastů a jejich počet byl také obdobný. Pokud byl M-CSF a RANKL kombinován s PGE2 v koncentraci 10^{-6} M, nedocházelo ke zvýšení aktivity CAII a TRAP. Mikroskopie (obrázky č. 9 a 10) ukázala tvorbu menšího počtu menších osteoklastů než ve skupinách s přidáním M-CSF a RANKL a PGE2 10^{-8} v kombinaci s M-CSF a RANKL. Ve srovnání se skupinou suplementace pouze M-CSF a RANKL měl PGE2 v koncentraci 10^{-6} M v tomto případě inhibiční efekt na tvorbu osteoklastů. Ve skupině s přidáním PGE2 10^{-6} M v kombinaci s M-CSF a RANKL byla zaznamenána pouze vyšší aktivita CAII (graf č. 11) oproti kontrolní monokultuře PBMC. Další metody ovšem tato zjištění nepotvrdily, a to ani při opakování pokusů v kapitole 5.7. V porovnání získaných výsledků s aktivitou ALP osteoblastů (grafy č. 10, 19-21) je zajímavé, že tato aktivita má tendenci oproti ostatním skupinám klesat v čase ve skupinách, kde byla naopak zjištěna zvýšená osteoklastogeneze. To může mít souvislost s cyklem kostní remodelace, při kterém je během kostní resorpce potlačena aktivita osteoblastů a tím i tvorba nové kostní tkáně. Zralé osteoklasty totiž produkují několik faktorů, které inhibují osteogenezi, přímým i nepřímým buněčným kontaktem (Kim *et al.*, 2020). Samotný PGE2 tedy nestimuloval tvorbu osteoklastů, ale v koncentraci 10^{-8} M v kombinaci s M-CSF a RANKL byla zaznamenána osteoklastogeneze. Není jasné, jakou roli v tomto procesu hrálo přidání

PGE2, jelikož hodnoty CAII a TRAP nepřevyšovaly skupinu s M-CSF a RANKL. Ve studii Kobayashi *et al.*, 2005 s použitím myši linie RAW264.7 a myších makrofágů kostní dřeně PGE2 10^{-6} M v kombinaci s M-CSF a RANKL inicioval osteoklastogenezi, a na rozdíl od našich výsledků byl počet osteoklastů vyšší, než ve skupině pouze s M-CSF a RANKL. Skupina se samotným PGE2 nevedla k tvorbě osteoklastů, stejně jako v našich výsledcích. Mechanismus efektu se ale může lišit, jelikož se jednalo o monokultury bez přidaných osteoblastů a PGE2 stimuluje osteoklastogenezi především působením skrze osteoblasty. V další práci Kaji *et al.*, 2009 vedlo přidávání PGE2 v koncentracích 10^{-6} M a 10^{-8} M k tvorbě TRAP pozitivních multinukleárních buněk (MNC, mající 3 a více jader). Zde byly použity nefrakcionované kostní buňky izolované ze stehenní a holenní kosti 10-15denních ICR myši. Přítomné osteoklasty byly předem degradovány, aby byly pozorovány osteoklasty vytvořené pouze díky působení PGE2. Oproti tomu při použití hemopoetických buněk odvozených z myších buněk sleziny bez přidaných osteoblastů stejné koncentrace PGE2 v kombinaci s GM-CSF nevedly k tvorbě osteoklastů. Autoři této studie dále zjistili, že kultivační médium odebrané od kultury linií osteoblastů UMR-106 ošetřených PGE2, stimulovalo tvorbu TRAP pozitivních buněk u hemopoetických buněk myšího původu i bez přítomnosti osteoblastů. Tato zjištění potvrzují fakt, že PGE2 silně působí na osteoblasty k tvorbě proosteoklastových faktorů, jako je RANKL (Liu, 2006) nebo IGF-I (Mccarthy *et al.*, 1991). V porovnání s výsledky uvedených studií je možné, že množství osteoblastů v naší ko-kultuře nebylo dostatečné a produkovaná hladina RANKL byla příliš nízká pro indukci osteoklastogeneze. K potvrzení těchto výsledků by bylo vhodné stanovit koncentraci RANKL v ko-kultuře, což nebude snadné vzhledem k nízké koncentraci RANKL, která bude u řady metod pod detekčním limitem. Potenciál PGE2 stimulovat osteoklastogenezi může být také ovlivněn načasováním přidávání tohoto mediátoru. Autoři studie Lutter *et al.*, 2016 sledovali vliv PGE2 (v koncentracích 1, 5 a 10 μ M) na lidské PBMC a linii RAW264.7 *ab initio* a 4 dny po nasazení, tedy před a po indukci osteoklastogeneze. Osteoklastogeneze byla indukována pomocí M-CSF a RANKL a buňky byly kultivovány na extracelulární matrix odvozené od osteoblastů, ale bez přítomnosti osteoblastů. Diferenciace prekurzorových buněk v osteoklasty byla inhibována se zvyšující se dávkou PGE2, pokud byly buňky ošetřeny PGE2 *ab initio*. Pokud byl PGE2 podáván až 4. den kultivace, neinhibovaly osteoklastogenezi ani nejvyšší koncentrace. Při mechanickém poranění/zlomenině dochází k zánětlivé reakci spojené se zvýšenou tvorbou prostaglandinů (Ricciotti *et FitzGerald*, 2011), poté se aktivní osteoklasty rekrutují do místa poranění, kde začnou

resorbovat poraněnou kost, aby vyčistily kostní dutinu a připravily oblast na novou tvorbu kosti. Tento krok vyžaduje funkční aktivní osteoklasty, což může být důvodem, proč nejsou tyto buňky inhibovány prozánětlivými mediátory jako jsou prostaglandiny. PGE2 také brání apoptóze osteoklastů a tím prodlužuje jejich životnost. Jedním z důvodů, proč je diferenciaci prekurzorů osteoklastů na osteoklasty blokována PGE2, může být omezení počtu aktivních osteoklastů a kontrola oblasti resorpce kosti v reakci na zánět. Autoři této studie také zjišťovali expresi receptorů pro PGE2: EP2 a EP4, která byla snížena u zralých osteoklastů na rozdíl od prekurzorových buněk osteoklastů. Regulace těchto receptorů by mohla pomoci zralým osteoklastům udržet jejich funkci během akutního nebo chronického zánětu (Lutter *et al.*, 2016). V obrázku č. 10 je vidět, že kombinace PGE2 10^{-8} M a M-CSF a RANKL vedla k tvorbě větších osteoklastů, než pouze u skupiny s přidaným M-CSF a RANKL. Je tedy možné, že podávání M-CSF a RANKL přímo stimulovalo tvorbu osteoklastů a PGE2 zde působil protiapoptoticky na osteoklasty, které tak mohly dosahovat větší velikosti. Opakování experimentu (obrázek č. 16) ale nepřineslo stejné výsledky.

Autoři studie Take *et al.*, 2005 také detekovali inhibiční účinek PGE2, a to při použití lidských CD14⁺ prekurzorových buněk osteoklastů izolovaných z periferní krve. Účinek PGE2 byl sledován v koncentracích 10^{-9} – 10^{-6} M a osteoklastogeneze byla stimulována pomocí M-CSF a RANKL. Oproti výsledkům při použití myších makrofágů kostní dřeně byla osteoklastogeneze stimulována úměrně se zvyšující se koncentrací PGE2. Výsledky studií se tedy poměrně liší v závislosti na použitém typu buněk, modelovém organismu, jeho věku, nebo zdroji a způsobu izolace buněk. Jak vyplývá z uvedených studií, účinek PGE2 se mimo jiné liší i v závislosti na frekvenci podávání nebo jeho koncentraci. Je tedy možné, že v našem nastavení ko-kultury nebylo dostatečné množství osteoblastů. Pro ověření této hypotézy by bylo vhodné pokus zopakovat s vyšším množstvím buněk. Dále by bylo zajímavé nastavit různá časová okna pro přidávání PGE2.

Následně byl sledován také účinek $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D₃ v koncentracích 10^{-8} M a 10^{-9} M bez nebo v kombinaci s M-CSF a RANKL. $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ působí na osteoblasty i prekurzorové buňky osteoklastů/osteoklasty skrze osu RANKL-RANK-OPG (You *et al.*, 2008). Stejně jako PGE2, byl $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ přidáván po 24 hodinách ko-kultivace a následně každý 3. den kultivace při výměně média. 14. den kultivace byla aktivita CAII v ko-kultuře výrazně zvýšena oproti kontrolní monokultuře PBMC, pokud byly buňky ošetřeny $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminem D₃

v kombinaci s M-CSF a RANKL. Zvýšená aktivita CAII se projevila u obou testovaných koncentrací $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D_3 (graf č. 14). Hodnoty CAII naměřené u ko-kultur s přidaným $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminem D_3 bez M-CSF a RANKL byly obdobné, jako u ko-kultur bez suplementace nebo u monokultury PBMC. Při opakování experimentu (graf č.22) byla aktivita CAII vyšší u ko-kultury s přidaným M-CSF a RANKL, u ko-kultury s přidaným $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminem D_3 10^{-9} M bez M-CSF a RANKL a u ko-kultury s $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminem D_3 10^{-8} M v kombinaci s M-CSF a RANKL, než u kontrolní monokultury PBMC (PBMC Z). Aktivita TRAP (graf č. 15) dosahovala vyšších hodnot, pokud byl $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 kombinován s M-CSF a RANKL, a to v obou koncentracích. Samotné podávání $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D_3 nezvyšovalo aktivitu TRAP a naměřené hodnoty byly obdobné, jako ve skupině bez přidaných suplementů (graf č. 15). Obdobná zjištění přineslo i opakování experimentu (graf č. 23). Ačkoliv měření aktivity CAII a TRAP přineslo z obou experimentů nejednoznačné výsledky, následná mikroskopie potvrdila tvorbu osteoklastů ve skupinách suplementovaných $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminem D_3 v obou koncentracích, pokud byly kombinovány s růstovými faktory M-CSF a RANKL. TRAP barvení v kombinaci s hematoxylinem prokázalo tvorbu osteoklastů pouze ve skupinách s M-CSF a RANKL a ve skupinách s $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminem D_3 10^{-8} M a 10^{-9} M s přidaným M-CSF a RANKL (obrázek č. 11 a 15). Ve stejných skupinách byla prokázána tvorba osteoklastů i pomocí konfokální mikroskopie (obrázek č. 12 a 16). Při podávání $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D_3 bez M-CSF a RANKL nebyla osteoklastogeneze prokázána ani v jednom z proběhlých experimentů (kapitola 5.5 i 5.7). $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 má vliv i na osteoblasty, a to především na regulaci mineralizace (Orimo, 2010) Z naměřených hodnot ale nebyly zaznamenány zásadní rozdíly v aktivitě ALP. Pro určení vlivu $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D_3 na osteoblasty by bylo vhodné sledovat další markery specifické pro osteoblasty, které se účastní mineralizace extracelulární matrix, a jejichž exprese může být ovlivněna. Je ovšem zajímavé, že stejně jako v případě PGE2 byly zaznamenány nižší hodnoty ALP 14. den ko-kultivace ve skupinách, kde docházelo k osteoklastogenezi (grafy č. 13, 21).

Při porovnání získaných výsledků s publikovanými daty byly stejně jako u PGE2 zaznamenány stimulační i inhibiční účinky $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D_3 . V ko-kultuře myších primárních slezinných buněk převážně hemopoetického původu a osteoblastů odvozených od MSC stimuloval $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 osteoklastogenezi i bez M-CSF a RANKL (Lee *et al.*, 2002). Autoři studie sledovali stejné koncentrace

1 α ,25-dihydroxyvitaminu D₃, tedy 10⁻⁸ M a 10⁻⁹ M, a dále koncentrace 10⁻¹⁰ M a 10⁻¹¹ M. Počet TRAP pozitivních buněk byl výrazně vyšší při použití koncentrace 10⁻⁸ M a zvýšená hladina TRAP byla zaznamenána i v koncentraci 10⁻⁹ M. Naopak při použití koncentrace 10⁻¹⁰ M a 10⁻¹¹ M nebyla neprokázána tvorba TRAP pozitivních buněk. Účinek 1 α ,25-dihydroxyvitaminu D₃ byl závislý na změnách exprese RANKL a OPG, protože zvýšení tvorby osteoklastů korelovalo se zvýšenou hladinou mRNA RANKL a se sníženou hladinou mRNA OPG. Zdá se, že pokud je 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ přidávám spolu s IL-1, má aditivní synergický účinek na produkci RANKL a IL-1 a zároveň inhibiční účinek na produkci OPG v osteoblastech. Samotné podávání 1 α ,25-dihydroxyvitaminu D₃ nemělo na produkci IL-1 vliv. Autoři studie používali poměr buněk 1:100 a ve vyšším počtu. Jelikož 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ zprostředkuje osteoklastogenezi skrze indukci exprese RANKL v osteoblastech, je možné, že námi použitý počet buněk byl příliš malý a koncentrace produkovaného RANKL tudíž nedostatečná.

Studie Wang *et al.*, 2015a naopak poukázala na inhibiční vlastnosti tohoto hormonu, pokud byl přidáván pouze do monokultury. K mononukleárním buňkám izolovaných z kostní dřevě 3týdenních potkanů typu Wistar byly přidávány různé koncentrace 1 α ,25-dihydroxyvitaminu D₃ (v rozmezí 10⁻⁹ do 10⁻⁷ M) spolu s růstovými faktory M-CSF a RANKL. Skupiny s přidaným 1 α ,25-dihydroxyvitaminem D₃ vykazovaly sníženou schopnost osteoklastogeneze oproti kontrolní skupině pouze s M-CSF a RANKL a taktéž byla zjištěna snížená exprese CAII, CK a MMP-9, markerů kostní resorpce. Tyto výsledky ukázaly, že 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ může přímo regulovat metabolismus kostí inhibicí tvorby a zrání osteoklastů. Inhibiční účinky 1 α ,25-dihydroxyvitaminu D₃ nebyly v našem nastavení potvrzeny, což může být zapříčiněno přítomností osteoblastů v ko-kultuře. Ve studii Zarei *et al.*, 2016 byly přidávány deriváty vitamínu D, 500 nmol·L⁻¹ 25-hydroxyvitamin D₃ a 0,1 – 0,5 nmol·L⁻¹ 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, k CD14⁺ lidským monocytům izolovaných z buffy coatu. Tvorba osteoklastů byla zaznamenána ve všech sledovaných monokulturách. Pokud byly přidávány i M-CSF a RANKL, byl počet vytvořených osteoklastů vyšší, ale jejich velikost a počet jader byly sníženy. Zvýšena byla také resorpční aktivita diferencovaných osteoklastů, pravděpodobně v důsledku jejich zvýšeného počtu. qRT-PCR ukázala, že osteoklastogeneze byla deriváty vitamínu D stimulována zvýšenou expresí CYP27B1 a CYP24A1, ale markery fúze osteoklastů NFATC1 a TM7SF4, byly sníženy a docházelo tak k tvorbě vyššího počtu malých osteoklastů. Je zajímavé, že podobně i v našich

výsledcích (obrázek č. 12), byla zaznamenána tendence tvořit větší počet menších osteoklastů, pokud byly ošetřeny $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminem D_3 v kombinaci s M-CSF a RANKL, oproti skupině s M-CSF a RANKL. Pro ověření této hypotézy by bylo vhodné také posoudit resorpční aktivitu vzniklých osteoklastů. Podávání $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D_3 nevedlo v našem nastavení k inhibici, ani k výrazné stimulaci osteoklastogeneze, jelikož aktivita TRAP i CAII nepřevyšovala hodnoty získané z kultury s M-CSF a RANKL.

Pomocí ovariektomie je možné v modelových organismech sledovat některé mechanismy onemocnění, jako je postmenopauzální osteoporóza. Zajímalo nás, zda jsou některé projevy osteoporózy, jako je zvýšená osteoklastogeneze, přenositelné i do podmínek *in vitro* a zda má ovariektomie samic potkanů vliv na potenciál prekurzorů osteoklastů diferencovat v osteoklasty bez přidané suplementace. K tomuto účelu byly použity buňky izolované z 12měsíčních samic potkanů typu Wistar, kterým byla v 6. měsíci věku indukována osteoporóza pomocí ovariektomie (OVX). Navození osteoporózy bylo ověřováno stanovením hladin osteokalcinu, β -crosslapsu a estradiolu (viz příloha, graf P č.1). Hodnoty byly měřeny z krevní plazmy zdravých a OVX potkanů. Rozdíly mezi naměřenými hodnotami ale přinesly nejednoznačné výsledky a osteoporóza byla u zvířat ověřována pomocí mikroCT (data neprezentované). Následně byly sledovány markery osteoklastogeneze *in vitro* stanovením aktivity CAII, TRAP a pomocí mikroskopie. Jako kontrola byly použity buňky pocházející ze zdravých 3měsíčních samic potkanů. Aktivita CAII byla mírně zvýšena u OVX skupiny oproti zdravým buňkám, a to především u kontrolních monokultur (grafy č. 17 a 18). Při opakování experimentu (kapitola 5.7) tato zjištění ale nebyla potvrzena a hodnoty získané u zdravých jedinců (BS, PBMC Z) byly srovnatelné s OVX skupinou (OVX ko-kultura, PBMC OVX), viz grafy č. 22 a 23. Pomocí TRAP barvení v kombinaci s hematoxylinem byla odhalena tvorba osteoklastů u OVX skupiny (obrázek č. 13), zatímco u ko-kultury složené ze zdravých buněk bylo zaznamenáno pouze ojedinělé množství osteoklastů. Tato zjištění potvrdila i konfokální mikroskopie (obrázek č. 14). Podobně ve studii Schulze *et al.*, 2018 bylo zjištěno, že osteoklastogenezi je možné bez přidaných suplementů iniciovat i v kultuře buněk zdravých jedinců. Podobných výsledků bylo dosaženo i při opakování experimentu. Pomocí konfokální mikroskopie byla detekována tvorba osteoklastů v OVX skupině, ale zdravé buňky bez přidaných suplementů osteoklasty netvořily (obrázek č. 16). TRAP barvení neodhalilo tvorbu osteoklastů ani v jedné z uvedených skupin (obrázek č. 15). Z uvedených výsledků vyplynulo, že buňky izolované z OVX potkanů

mají potenciál tvořit osteoklasty, nicméně v naměřených hodnotách CAII a TRAP, a v počtu osteoklastů u zdravých a OVX potkanů nebyly pozorovány zásadní rozdíly. Porovnání ke zdravým jedincům je ale sporné, z důvodu rozdílného věku zvířat, jelikož na tvorbu osteoklastů má mimo jiné vliv i věk zvířete (Lelovas *et al.*, 2008). Ve studii Salamanna *et al.*, 2015 byla sledována osteoklastogeneze mononukleárních prekurzorů izolovaných ze zdravých a OVX samic potkanů. Buňky byly kultivovány s nebo bez faktorů stimulujících osteoklastogenezi (M-CSF, RANKL, PTH). Ve srovnání s kontrolními monocyty izolovaných ze zdravých potkanů, monocyty izolované z OVX potkanů diferencovaly v osteoklasty i v nepřítomnosti diferenciačních faktorů. Osteoklasty OVX potkanů vykazovaly vyšší produkci markerů osteoklastů, katepsinu K, MMP-7 i MMP-9, než zdravá kontrola. Z mikroskopie byla patrná byla také fúze buněk u OVX skupin, na rozdíl od zdravé skupiny bez suplementů. Podobně i v našich výsledcích byl u OVX skupiny zaznamenán zvýšený výskyt agregovaných buněk než u zdravých kontrol (obrázky č.13 a 15). Rozdíly v osteoklastogenezi ale nebyly výrazné, jako ve zmíněné studii. Důvodem rozdílných výsledků může být, že autoři studie použili buňky pocházející z mladších zvířat (cca 5 měsíců) a ve vyšším počtu. Dalším důvodem může být nedostatečně indukovaná osteoporóza u OVX potkanů, jelikož měření markerů z krevní plazmy přineslo nejednoznačné výsledky (viz graf P č. 1). Autoři studie navrhuji, aby kultivace PBMC byla zahrnuta mezi detekční metody pro osteoporózu.

Sledována byla také produkce pro-zánětlivých cytokinů v osteoklastogenezi. Studie (Caetano-Lopes *et al.*, 2011) potvrdila, že IL-1 β , IL-6 a TNF- α přispívají k remodelaci kosti, a to zejména v časném stádiu hojení zlomenin. Stejně tak jsou tyto cytokiny spojovány s postmenopauzální osteoporózou, jelikož estrogen působí jako inhibitor produkce těchto cytokinů. Snížení hladin estrogenu v důsledku menopauzy, a tím i zvýšení produkce těchto zánětlivých cytokinů vede k zrychlenému kostnímu obratu při postmenopauzální osteoporóze. IL-6 stimuluje produkci RANKL v osteoblastech (O'Brien *et al.*, 1999) a další cytokiny a hormony, které následně vedou ke zvýšené resorpci kosti. Produkce IL-6 je stimulována PGE2 a stejně tak IL-6 zvyšuje produkci PGE2 v kostních buňkách (Liu, 2006). Přidávání IL-1 α do ko-kultury vedlo ke zvýšení M-CSF, PGE2 a snížení hladin OPG (Tanabe *et al.*, 2005). PGE2 u myších makrofágů odvozených od buněk kostní dřene a lidských monocytů odvozených od PBMC stimuloval produkci IL-1 β , zatímco inhiboval produkci TNF- α (Kumolosasi *et al.*, 2014, Zaslona *et al.*, 2017). TNF α indukuje expresi RANK receptoru v osteoklastech, což vede

k vyšší vazbě RANKL a také stimuluje produkci RANKL v osteocytech (Marahleh *et al.*, 2019). Studie Pfeilschifter *et al.*, 1989 uvádí, že TNF spolu s $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminem D_3 a osteoblasty zprostředkují osteoklastogenezi. Autoři studie Lee *et al.*, 2002 zjistili, že $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 v kombinaci s IL-1 má také aditivní a synergické účinky na produkci RANKL a IL-1 v osteoblastech, nicméně samotný $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 neměl v této studii na produkci IL-1 vliv. V následujícím experimentu byla sledována hladina cytokinů IL-1 β , IL-6 a TNF- α po stimulaci M-CSF, RANKL, PGE2 a $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D_3 v ko-kultuře osteoblastů a PBMC/osteoklastů. Jelikož je produkce těchto cytokinů spojena s postmenopauzální osteoporózou, byla hladina těchto cytokinů také sledována v ko-kultuře kostních buněk pocházejících z OVX samic potkanů. Sledované skupiny jsou uvedeny v kapitole 5.7, viz tabulka č. 7. S ohledem na detekční limit metody Bio-Plex byly buňky nasazeny ve vyšším počtu a kultivovány v menším množství média než v předchozích experimentech. Supernatant byl odebírán 3., 7. a 14. den ko-kultivace. Jako kontrolní skupina byla použita monokultura PBMC stimulována LPS a IFN- γ , jelikož v monocytech a makrofázích je možné stimulovat produkci IL-1 β , IL-6 a TNF α pomocí LPS (Zasłona *et al.*, 2017). Jak je možné vidět v grafu č. 24, hladina IL-6 byla výrazně zvýšena, pokud byly buňky stimulovány $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminem D_3 10^{-8} M v kombinaci s M-CSF a RANKL, a to 7. a především 14. den ko-kultivace. Mírně zvýšené hodnoty oproti kontrole byly zaznamenány i ve skupinách s přidaným $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminem D_3 v obou použitých koncentracích a také ve skupině s $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminem D_3 10^{-9} M v kombinaci s M-CSF a RANKL. Zvýšené hodnoty byly také zaznamenány u skupin suplementovaných PGE2 v koncentracích 10^{-6} M a 10^{-8} M s i bez kombinace M-CSF a RANKL. Hladina IL-6 u kontrolní monokultury PBMC byla poměrně nízká, což mohlo být zapříčiněno nepřítomností osteoblastů v kultuře. Stejně tak ve studii Liu, 2006, vedlo přidávání PGE2 10^{-6} M ke zvýšení produkce IL-6 v osteoblastech a zejména poté v osteoklastech. Hladina TNF- α dosahovala nejvyšších hodnot ve skupinách s přidaným M-CSF a RANKL a ve skupině bez přidaných suplementů (graf č. 25). Mírně zvýšené hodnoty byly zaznamenány i po stimulaci PGE2 10^{-6} M i 10^{-8} M s i bez kombinace M-CSF a RANKL, a to zejména 7. den ko-kultivace. Stejně tak po stimulaci $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminem D_3 10^{-8} M i 10^{-9} M s nebo bez kombinace M-CSF a RANKL došlo ke zvýšení hladin TNF- α . Hladiny cytokinů IL-6 i TNF- α byly u OVX ko-kultury oproti ko-kultuře zdravých buněk výrazně nižší, což může být zapříčiněno rozdílným věkem zvířat. U potkanů je známo, že ve věku 3 měsíců převládá spíše modelace kostí, zatímco ve věku 12 měsíců dochází spíše k remodelaci,

což může být jeden z důvodů rozporuplných výsledků (Lelovas *et al.*, 2008). Je ale zajímavé, že v OVX ko-kultuře docházelo oproti ko-kultuře zdravých buněk k vyšší tvorbě osteoklastů, ačkoliv hladina prozánětlivých cytokinů byla nižší. Nízké hladiny IL-1 β , IL-6 a TNF jsou osteoblasty produkovány konstitutivně i bez stimulace, jak bylo zjištěno u myších osteoblastů z oblasti kalvárie (García-López *et al.*, 2013). To může být důvodem, proč byly nízké hladiny TNF- α i IL-6 produkovány v ko-kulturách i bez přidané suplementace. Hladinu cytokinu IL-1 β se nepodařilo detekovat ani v jedné z testovaných skupin a kontrolní skupině PBMC. Ve studii Lee *et al.*, 2002 byla měřena intracelulární hladina mRNA cytokinů IL-1 α a IL-1 β . IL-1 β oproti IL-1 α dosahoval velice nízkých hodnot. Je tedy možné, že v případě detekce tohoto cytokinu nebyla vhodně zvolená metoda a detekce cytokinů probíhala ze supernatantu. Na rozdíl od IL-1 α , je prekurzor IL-1 β v buňkách syntetizován až po stimulaci alarminy, což může být dalším důvodem, proč se IL-1 β nepodařilo detekovat. Osteoklastogeneze a produkce cytokinů mohla být v této práci také ovlivněna mrazením buněk, které snižuje jejich funkci a viabilitu (Hunt, 2019).

7. Závěr

První část práce byla zaměřena na optimalizaci podmínek ko-kultury osteoblastů a PBMC, aby bylo následně možné sledovat účinky PGE2 a $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D_3 na osteoklastogenezi. Byl určen vhodný poměr médií, počet a poměr buněk. V rámci optimalizace bylo také zjištěno, že poolování buněk nemělo na osteoklastogenezi vliv. PGE2 a $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 jsou silnými modulátory kostního metabolismu a mohou ovlivňovat produkci prozánětlivých cytokinů. V této práci bylo zjištěno, že přidávání PGE2 v koncentraci 10^{-6} M a 10^{-8} M nevedlo ke stimulaci osteoklastů a podávání PGE2 10^{-6} M v kombinaci s M-CSF a RANKL mělo inhibiční efekt na osteoklastogenezi. Při použití PGE2 10^{-8} M v kombinaci M-CSF a RANKL byla zaznamenána tvorba osteoklastů, avšak bez výrazných rozdílů od skupin suplementovaných pouze M-CSF a RANKL. PGE2 ve všech sledovaných koncentracích a kombinacích stimuloval produkci IL-6 v ko-kultuře a mírně zvýšené hladiny byly zjištěny i u cytokinu TNF- α . Podávání pouze $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D_3 v koncentraci 10^{-8} M a 10^{-9} M nestimulovalo osteoklastogenezi z potkaních PBMC. V kombinaci s M-CSF a RANKL byla zaznamenána osteoklastogeneze u obou testovaných koncentrací. $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 v kombinaci s M-CSF a RANKL také výrazně stimuloval produkci IL-6, a to zejména pokud byl podáván v koncentraci 10^{-8} M. Osteoklastogeneze byla zaznamenána i u OVX skupin, nicméně stimulace zdravých buněk pomocí zmíněné suplementace vedla k vyšší tvorbě osteoklastů.

Práce nabízí možnosti dalšího rozšíření. Pro ověření účinné koncentrace PGE2 a $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminu D_3 bez kombinace M-CSF a RANKL by bylo vhodné navýšit počet buněk v ko-kultuře, a to zejména osteoblastů, jelikož je známo, že tyto mediátory působí především skrze tyto buňky. Dále by bylo vhodné ověřit funkčnost osteoklastů pomocí testů resorpce, např. pit assay. Vzniklý model je možné využít v tkáňovém inženýrství, nebo pro testování anti-resorpčních léčiv.

8. Seznam literatury

- Amarasekara, D.S., Yun, H., Kim, S., Lee, N., Kim, H., and Rho, J. (2018). Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks. *Immune Netw* 18, e8.
- Amini, A.R., Laurencin, C.T., and Nukavarapu, S.P. (2013). Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 40, 363–408.
- Arai, F., Miyamoto, T., Ohneda, O., Inada, T., Sudo, T., Brasel, K., Miyata, T., Anderson, D.M., and Suda, T. (1999). Commitment and Differentiation of Osteoclast Precursor Cells by the Sequential Expression of c-Fms and Receptor Activator of Nuclear Factor κ B (RANK) Receptors. *J Exp Med* 190, 1741–54.
- Asagiri, M., and Takayanagi, H. (2007). The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 40, 251–264.
- Baron, R., Neff, L., Louvard, D., and Courtoy, P.J. (1985). Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. *The Journal of Cell Biology* 101, 2210–2222.
- Bar-Shavit, Z. (2007). The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *J Cell Biochem* 102, 1130–1139.
- Bhalla, A.K., Amento, E.P., and Krane, S.M. (1986). Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human lymphocytes and monocyte/macrophages: Inhibition of interleukin-2 and augmentation of interleukin-1 production. *Cellular Immunology* 98, 311–322.
- Bikle, D.D. (2011). Vitamin D metabolism and function in the skin. *Molecular and Cellular Endocrinology* 347, 80–89.
- Blair, H.C., Larrouture, Q.C., Li, Y., Lin, H., Beer-Stoltz, D., Liu, L., Tuan, R.S., Robinson, L.J., Schlesinger, P.H., and Nelson, D.J. (2017). Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation *In Vivo* and *In Vitro*. *Tissue Eng Part B Rev* 23, 268–280.
- Borciani, G., Montalbano, G., Baldini, N., Cerqueni, G., Vitale-Brovarone, C., and Ciapetti, G. (2020). Co-culture systems of osteoblasts and osteoclasts: Simulating *in vitro* bone remodeling in regenerative approaches. *Acta Biomaterialia* 108, 22–45.
- Boyle, W.J., Simonet, W.S., and Lacey, D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337–342.
- Caetano-Lopes, J., Lopes, A., Rodrigues, A., Fernandes, D., Perpétuo, I.P., Monjardino, T., Lucas, R., Monteiro, J., Konttinen, Y.T., Canhão, H., et al. (2011). Upregulation of Inflammatory Genes and Downregulation of Sclerostin Gene Expression Are Key Elements in the Early Phase of Fragility Fracture Healing. *PLoS ONE* 6, e16947.
- Caplan, A.I., and Bruder, S.P. (2001). Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in Molecular Medicine* 7, 259–264.
- Capulli, M., Paone, R., and Rucci, N. (2014). Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 561, 3–12.
- Cosman, F., Crittenden, D.B., Adachi, J.D., Binkley, N., Czerwinski, E., Ferrari, S., Hofbauer, L.C., Lau, E., Lewiecki, E.M., Miyauchi, A., et al. (2016). Romosozumab Treatment in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *N Engl J Med* 375, 1532–1543.
- Cummings, S.R., Martin, J.S., McClung, M.R., Siris, E.S., Eastell, R., Reid, I.R., Delmas, P., Zoog, H.B., Austin, M., Wang, A., et al. (2009). Denosumab for Prevention of Fractures in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *N Engl J Med* 361, 756–765.
- Davies, O.G., Grover, L.M., Lewis, M.P., and Liu, Y. (2018). PDGF is a potent initiator of bone formation in a tissue engineered model of pathological ossification: PDGF is a potent initiator of bone formation in a tissue engineered model of pathological ossification. *J Tissue Eng Regen Med* 12, e355–e367.

Delaissé, J.-M., Andersen, T.L., Engsig, M.T., Henriksen, K., Troen, T., and Blavier, L. (2003). Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities: MMPS and Cathepsin in Osteoclastic Activity. *Microsc. Res. Tech.* *61*, 504–513.

Farmer, P.K., He, X., Schmitz, M.L., Rubin, J., and Nanes, M.S. (2000). Inhibitory effect of NF- κ B on 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and retinoid X receptor function. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* *279*, E213–E220.

Feng, X., and McDonald, J.M. (2011). Disorders of Bone Remodeling. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* *6*, 121–145.

Florencio-Silva, R., Sasso, G.R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M.J., and Cerri, P.S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International* *2015*, 1–17.

Fuller, K., and Chambers, T.J. (2009). Effect of arachidonic acid metabolites on bone resorption by isolated rat osteoclasts. *J Bone Miner Res* *4*, 209–215.

García-López, S., Villanueva, R., and Meikle, M.C. (2013). Alterations in the Synthesis of IL-1 β , TNF- α , IL-6, and Their Downstream Targets RANKL and OPG by Mouse Calvarial Osteoblasts *In vitro*: Inhibition of Bone Resorption by Cyclic Mechanical Strain. *Front. Endocrinol.* *4*, 160.

Gilsenan, A., Harding, A., Kellier-Steele, N., Harris, D., Midkiff, K., and Andrews, E. (2018). The Forteo Patient Registry linkage to multiple state cancer registries: study design and results from the first 8 years. *Osteoporos Int* *29*, 2335–2343.

Goers, L., Freemont, P., and Polizzi, K.M. (2014). Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *J. R. Soc. Interface.* *11*, 20140065.

Grano, M., Galimi, F., Zambonin, G., Colucci, S., Cottone, E., Zallone, A.Z., and Comoglio, P.M. (1996). Hepatocyte growth factor is a coupling factor for osteoclasts and osteoblasts *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *93*, 7644–7648.

Gruber, R., Nothegger, G., Ho, G.-M., Willheim, M., and Peterlik, M. (2000). Differential Stimulation by PGE₂ and Calcemic Hormones of IL-6 in Stromal/Osteoblastic Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *270*, 1080–1085.

Grüneberg, S., Stubbs, M.T., and Klebe, G. (2002). Successful Virtual Screening for Novel Inhibitors of Human Carbonic Anhydrase: Strategy and Experimental Confirmation. *J. Med. Chem.* *45*, 3588–3602.

Hayman, A.R. (2008). Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity* *41*, 218–223.

Hoemann, C.D., El-Gabalawy, H., and McKee, M.D. (2009). *In vitro* osteogenesis assays: Influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathologie Biologie* *57*, 318–323.

Hofbauer, L.C., Khosla, S., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Boyle, W.J., and Riggs, B.L. (2000). The Roles of Osteoprotegerin and Osteoprotegerin Ligand in the Paracrine Regulation of Bone Resorption. *J Bone Miner Res* *15*, 2–12.

Hunt, C.J. (2019). Technical Considerations in the Freezing, Low-Temperature Storage and Thawing of Stem Cells for Cellular Therapies. *Transfus Med Hemother* *46*, 134–150.

Charoenlarp, P., Rajendran, A.K., and Iseki, S. (2017). Role of fibroblast growth factors in bone regeneration. *Inflamm Regener* *37*, 10.

Charoenngam, N., Shirvani, A., and Holick, M.F. (2019). Vitamin D for skeletal and non-skeletal health: What we should know. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma* *10*, 1082–1093.

Chen, H., Hu, B., Lv, X., Zhu, S., Zhen, G., Wan, M., Jain, A., Gao, B., Chai, Y., Yang, M., et al. (2019). Prostaglandin E₂ mediates sensory nerve regulation of bone homeostasis. *Nat Commun* *10*, 181.

- Chen, X., Wang, Z., Duan, N., Zhu, G., Schwarz, E.M., and Xie, C. (2018). Osteoblast–osteoclast interactions. *Connective Tissue Research* 59, 99–107.
- Chung, S.I., Ryu, S.N., and Kang, M.Y. (2021). Changes in Bone Metabolism and Antioxidant Defense Systems in Menopause-Induced Rats Fed Bran Extract from Dark Purple Rice (*Oryza sativa* L. Cv. Superjami). *Nutrients* 13, 2926.
- Jeon, O.H., Panicker, L.M., Lu, Q., Chae, J.J., Feldman, R.A., and Elisseeff, J.H. (2016). Human iPSC-derived osteoblasts and osteoclasts together promote bone regeneration in 3D biomaterials. *Sci Rep* 6, 26761.
- Jolly, J.J., Chin, K.-Y., Farhana, M.F.N., Alias, E., Chua, K.H., Hasan, W.N.W., and Ima-Nirwana, S. (2018). Optimization of the Static Human Osteoblast/Osteoclast Co-culture System. *Iran J Med Sci* 43, 208–213.
- Kaji, H., Sugimoto, T., Kanatani, M., Fukase, M., Kumegawa, M., and Chihara, K. (2009). Prostaglandin E2 stimulates osteoclast-like cell formation and bone-resorbing activity via osteoblasts: Role of cAMP-dependent protein kinase. *J Bone Miner Res* 11, 62–71.
- Kalinski, P. (2012). Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E₂. *J.I.* 188, 21–28.
- Kapinas, K., and Delany, A.M. (2011). MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. *Arthritis Res Ther* 13, 220.
- Kespohl, B., Schumertl, T., Bertrand, J., Lokau, J., and Garbers, C. (2021). The cytokine interleukin-11 crucially links bone formation, remodeling and resorption. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 60, 18–27.
- Khastgir, G., Studd, J., Holland, N., Alagband-Zadeh, J., Fox, S., and Chow, J. (2001). Anabolic Effect of Estrogen Replacement on Bone in Postmenopausal Women with Osteoporosis: Histomorphometric Evidence in a Longitudinal Study. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 289-95.
- Khosla, S., Melton, L.J., and Riggs, B.L. (2011). The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: Is a revision needed? *J Bone Miner Res* 26, 441–451.
- Kim, J.H., and Kim, N. (2016). Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. *Chonnam Med J* 52, 12.
- Kim, J.-M., Lin, C., Stavre, Z., Greenblatt, M.B., and Shim, J.-H. (2020). Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells* 9, 2073.
- Kobayashi, Y., Mizoguchi, T., Take, I., Kurihara, S., Udagawa, N., and Takahashi, N. (2005). Prostaglandin E2 Enhances Osteoclastic Differentiation of Precursor Cells through Protein Kinase A-dependent Phosphorylation of TAK1. *Journal of Biological Chemistry* 280, 11395–11403.
- Kogawa, M., Anderson, P.H., Findlay, D.M., Morris, H.A., and Atkins, G.J. (2010). The metabolism of 25-(OH)vitamin D3 by osteoclasts and their precursors regulates the differentiation of osteoclasts. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 121, 277–280.
- Kohli, N., Ho, S., Brown, S.J., Sawadkar, P., Sharma, V., Snow, M., and García-Garéta, E. (2018). Bone remodelling *in vitro*: Where are we headed? *Bone* 110, 38–46.
- Komori, T. (2015). Animal models for osteoporosis. *European Journal of Pharmacology* 759, 287–294.
- Krum, S.A., Miranda-Carboni, G.A., Hauschka, P.V., Carroll, J.S., Lane, T.F., Freedman, L.P., and Brown, M. (2008). Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival. *EMBO J* 27, 535–545.
- Kumolosasi, E., Salim, E., Jantan, I., and Ahmad, W. (2014). Kinetics of Intracellular, Extracellular and Production of Pro-Inflammatory Cytokines in Lipopolysaccharide- Stimulated Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Trop. J. Pharm Res* 13, 536.

- Lanza, F.L. (2002). Gastrointestinal Adverse Effects of Bisphosphonates: Etiology, Incidence and Prevention. *Treatments in Endocrinology* 1, 37–43.
- Lee, S.-K., Kalinowski, J., Jastrzebski, S., and Lorenzo, J.A. (2002). 1,25 (OH)₂ Vitamin D₃ -Stimulated Osteoclast Formation in Spleen-Osteoblast Cocultures Is Mediated in Part by Enhanced IL-1 α and Receptor Activator of NF- κ B Ligand Production in Osteoblasts. *J Immunol* 169, 2374–2380.
- Lelovas, P.P., Xanthos, T.T., Thoma, S.E., Lyritis, G.P., and Dontas, I.A. (2008). The Laboratory Rat as an Animal Model for Osteoporosis Research. *Comparative Medicine* 58, 424–430.
- Levin, V.A., Jiang, X., and Kagan, R. (2018). Estrogen therapy for osteoporosis in the modern era. *Osteoporos Int* 29, 1049–1055.
- Li, X., Qin, L., Bergenstock, M., Bevelock, L.M., Novack, D.V., and Partridge, N.C. (2007). Parathyroid Hormone Stimulates Osteoblastic Expression of MCP-1 to Recruit and Increase the Fusion of Pre/Osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry* 282, 33098–33106.
- Li, X., Ominsky, M.S., Warmington, K.S., Morony, S., Gong, J., Cao, J., Gao, Y., Shalhoub, V., Tipton, B., Haldankar, R., et al. (2009). Sclerostin Antibody Treatment Increases Bone Formation, Bone Mass, and Bone Strength in a Rat Model of Postmenopausal Osteoporosis*. *Journal of Bone and Mineral Research* 24, 578–588.
- Lips, P., and van Schoor, N.M. (2011). The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 25, 585–591.
- Lisowska, B., Kosson, D., and Domaracka, K. (2018). Lights and shadows of NSAIDs in bone healing: the role of prostaglandins in bone metabolism. *DDDT Volume* 12, 1753–1758.
- Liu, X.-H. (2006). Interactive Effect of Interleukin-6 and Prostaglandin E₂ on Osteoclastogenesis via the OPG/RANKL/RANK System. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1068, 225–233.
- Luo, G., Li, F., Li, X., Wang, Z., and Zhang, B. (2018). TNF- α and RANKL promote osteoclastogenesis by upregulating RANK via the NF- κ B pathway. *Mol Med Report. Mol Med Rep* 17, 6605-6611.
- Lutter, A.-H., Hempel, U., Anderer, U., and Dieter, P. (2016). Biphasic influence of PGE₂ on the resorption activity of osteoclast-like cells derived from human peripheral blood monocytes and mouse RAW264.7 cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 111, 1–7.
- Manolagas, S.C. (2000). Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis 21, 23.
- Marahleh, A., Kitaura, H., Otori, F., Kishikawa, A., Ogawa, S., Shen, W.-R., Qi, J., Noguchi, T., Nara, Y., and Mizoguchi, I. (2019). TNF- α Directly Enhances Osteocyte RANKL Expression and Promotes Osteoclast Formation. *Front. Immunol.* 10, 2925.
- Mccarthy, T.L., Centrella, M., Raisz, L.G., and Canalis, E. (1991). Prostaglandin E₂ Stimulates Insulin-Like Growth Factor I Synthesis in Osteoblast-Enriched Cultures from Fetal Rat Bone*. *Endocrinology* 128, 2895–2900.
- McMichael, B.K., Meyer, S.M., and Lee, B.S. (2010). c-Src-mediated Phosphorylation of Thyroid Hormone Receptor-interacting Protein 6 (TRIP6) Promotes Osteoclast Sealing Zone Formation. *Journal of Biological Chemistry* 285, 26641–26651.
- Miao, D., and Scutt, A. (2002). Recruitment, augmentation and apoptosis of rat osteoclasts in 1,25-(OH)₂D₃ response to short-term treatment with 1,25-dihydroxyvitamin D₃ *in vivo*. *BMC Musculoskelet Disord* 3, 16.
- Miron, R.J., and Zhang, Y.F. (2012). Osteoinduction: A Review of Old Concepts with New Standards. *J Dent Res* 91, 736–744.
- Moreno, J.L., Kaczmarek, M., Keegan, A.D., and Tondravi, M. (2003). IL-4 suppresses osteoclast development and mature osteoclast function by a STAT6-dependent mechanism:

irreversible inhibition of the differentiation program activated by RANKL. *Blood* 102, 1078–1086.

Nahian, A., and AlEssa, A.M. (2021). Histology, Osteocytes. In StatPearls, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing).

Nahian, A., and Davis, D.D. (2021). Histology, Osteoprogenitor Cells. In StatPearls, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing).

Nelson, C.A., Warren, J.T., Wang, M.W.-H., Teitelbaum, S.L., and Fremont, D.H. (2012). RANKL Employs Distinct Binding Modes to Engage RANK and the Osteoprotegerin Decoy Receptor. *Structure* 20, 1971–1982.

O'Brien, C.A., Gubrij, I., Lin, S.-C., Saylor, R.L., and Manolagas, S.C. (1999). STAT3 Activation in Stromal/Osteoblastic Cells Is Required for Induction of the Receptor Activator of NF- κ B Ligand and Stimulation of Osteoclastogenesis by gp130-utilizing Cytokines or Interleukin-1 but Not 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ or Parathyroid Hormone. *Journal of Biological Chemistry* 274, 19301–19308.

Orimo, H. (2010). The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease. *J Nippon Med Sch* 77, 4–12.

Pacifici, R., Vannice, J.L., Rifas, L., and Kimble, R.B. Monocytic secretion of interleukin-1 receptor antagonist in normal and osteoporotic women: effects of menopause and estrogen/progesterone therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 77, 1135-41.

Pagani, S., Torricelli, P., Veronesi, F., Salamanna, F., Cepollaro, S., and Fini, M. (2018). An advanced tri-culture model to evaluate the dynamic interplay among osteoblasts, osteoclasts, and endothelial cells. *J Cell Physiol* 233, 291–301.

Park, Y.-G., Kang, S.-K., Kim, W.-J., Lee, Y.-C., and Kim, C.-H. (2004). Effects of TGF- β , TNF- α , IL- β and IL-6 alone or in combination, and tyrosine kinase inhibitor on cyclooxygenase expression, prostaglandin E₂ production and bone resorption in mouse calvarial bone cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 2270–2280.

Pastor, D.M., Poritz, L.S., Olson, T.L., Kline, C.L., Iii, L.R.H., Koltun, A., Chinchilli, V.M., and Irby, R.B. Primary cell lines: false representation or model system? a comparison of four human colorectal tumors and their coordinately established cell lines. *Int J Clin Exp Med* 22, 69-83.

Phan, T.C.A., Xu, J., and Zheng, M.H. (2004). Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histol Histopathol* 19,1325-44.

Pietrzyk, B., Smertka, M., and Chudek, J. (2017). Sclerostin: Intracellular mechanisms of action and its role in the pathogenesis of skeletal and vascular disorders. *Adv Clin Exp Med* 26, 1283–1291.

Raisz, L.G. (2005). Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *Journal of Clinical Investigation* 115, 3318–3325.

Rao, H., Lu, G., Kajiya, H., Garcia-Palacios, V., Kurihara, N., Anderson, J., Patrene, K., Sheppard, D., Blair, H.C., Windle, J.J., *et al.* (2006). α 9 β 1: A Novel Osteoclast Integrin That Regulates Osteoclast Formation and Function. *J Bone Miner Res* 21, 1657–1665.

Regenerative Medicine Institute, National Centre for Biomedical Engineering Science, National University of Ireland, Galway, Czekanska, E., Stoddart, M., Richards, R., and Hayes, J. (2012). In search of an osteoblast cell model for *in vitro* research. *ECM* 24, 1–17.

Ricciotti, E., and FitzGerald, G.A. (2011). Prostaglandins and Inflammation. *ATVB* 31, 986–1000.

Rosenberg, N., Rosenberg, O., and Soudry, M. (2012). Osteoblasts in Bone Physiology – Mini Review. *RMMJ* 3, e0013.

Rubin, J., Ackert-Bicknell, C.L., Zhu, L., Fan, X., Murphy, T.C., Nanes, M.S., Marcus, R., Holloway, L., Beamer, W.G., and Rosen, C.J. (2002). IGF-I Regulates Osteoprotegerin (OPG)

and Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand *in Vitro* and OPG *in Vivo*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 87, 4273–4279.

Salamanna, F., Maglio, M., Giavaresi, G., Pagani, S., Giardino, R., and Fini, M. (2015). *In vitro* method for the screening and monitoring of estrogen-deficiency osteoporosis by targeting peripheral circulating monocytes. AGE 37, 82.

Saleh, NermineK., Nassef, N.A., Shawky, M.K., Elshishiny, M.I., and Saleh, H.A. (2020). Novel approach for pathogenesis of osteoporosis in ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoporosis. Experimental Gerontology 137, 110935.

Sander, W.J., O'Neill, H.G., and Pohl, C.H. (2017). Prostaglandin E2 As a Modulator of Viral Infections. Front. Physiol. 8, 89.

Schröder, H.C., Wang, X.H., Wiens, M., Diehl-Seifert, B., Kropf, K., Schloßmacher, U., and Müller, W.E.G. (2012). Silicate modulates the cross-talk between osteoblasts (SaOS-2) and osteoclasts (RAW 264.7 cells): Inhibition of osteoclast growth and differentiation. J. Cell. Biochem. 113, 3197–3206.

Schulze, S., Wehrum, D., Dieter, P., and Hempel, U. (2018). A supplement-free osteoclast-osteoblast co-culture for pre-clinical application. J Cell Physiol 233, 4391–4400.

Siddiqui, J.A., and Partridge, N.C. (2016). Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. Physiology 31, 233–245.

Sozen, T., Ozisik, L., and Calik Basaran, N. (2017). An overview and management of osteoporosis. Eur J Rheumatol 4, 46–56.

St-Arnaud, R. (2008). The direct role of vitamin D on bone homeostasis. Archives of Biochemistry and Biophysics 473, 225–230.

Stoch, S., and Wagner, J. (2008). Cathepsin K Inhibitors: A Novel Target for Osteoporosis Therapy. Clin Pharmacol Ther 83, 172–176.

Suda, K., Udagawa, N., Sato, N., Takami, M., Itoh, K., Woo, J.-T., Takahashi, N., and Nagai, K. (2004). Suppression of Osteoprotegerin Expression by Prostaglandin E₂ Is Crucially Involved in Lipopolysaccharide-Induced Osteoclast Formation. J Immunol 172, 2504–2510.

Suda, T., Takahashi, F., and Takahashi, N. (2012). Bone effects of vitamin D – Discrepancies between *in vivo* and *in vitro* studies. Archives of Biochemistry and Biophysics 523, 22–29.

Sun, K., Zhou, Z., Ju, X., Zhou, Y., Lan, J., Chen, D., Chen, H., Liu, M., and Pang, L. (2016). Combined transplantation of mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells for tissue engineering: a systematic review and meta-analysis. Stem Cell Res Ther 7, 151.

Suzawa, T., Miyaura, C., Inada, M., Maruyama, T., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Ichikawa, A., Narumiya, S., and Suda, T. (2000). The Role of Prostaglandin E Receptor Subtypes (EP1, EP2, EP3, and EP4) in Bone Resorption: An Analysis Using Specific Agonists for the Respective EPs. Endocrinology 141, 1554–9.

Take, I., Kobayashi, Y., Yamamoto, Y., Tsuboi, H., Ochi, T., Uematsu, S., Okafuji, N., Kurihara, S., Udagawa, N., and Takahashi, N. (2005). Prostaglandin E2 Strongly Inhibits Human Osteoclast Formation. Endocrinology 146, 5204–5214.

Takeda, S., Yoshizawa, T., Nagai, Y., Yamato, H., Fukumoto, S., Sekline, K., Kato, S., Matsumoto, T., and Fujita, T. (1999). Stimulation of Osteoclast Formation by 1,25-Dihydroxyvitamin D Requires Its Binding to Vitamin D Receptor (VDR) in Osteoblastic Cells: Studies Using VDR Knockout Mice. Endocrinology 140, 1005–1008.

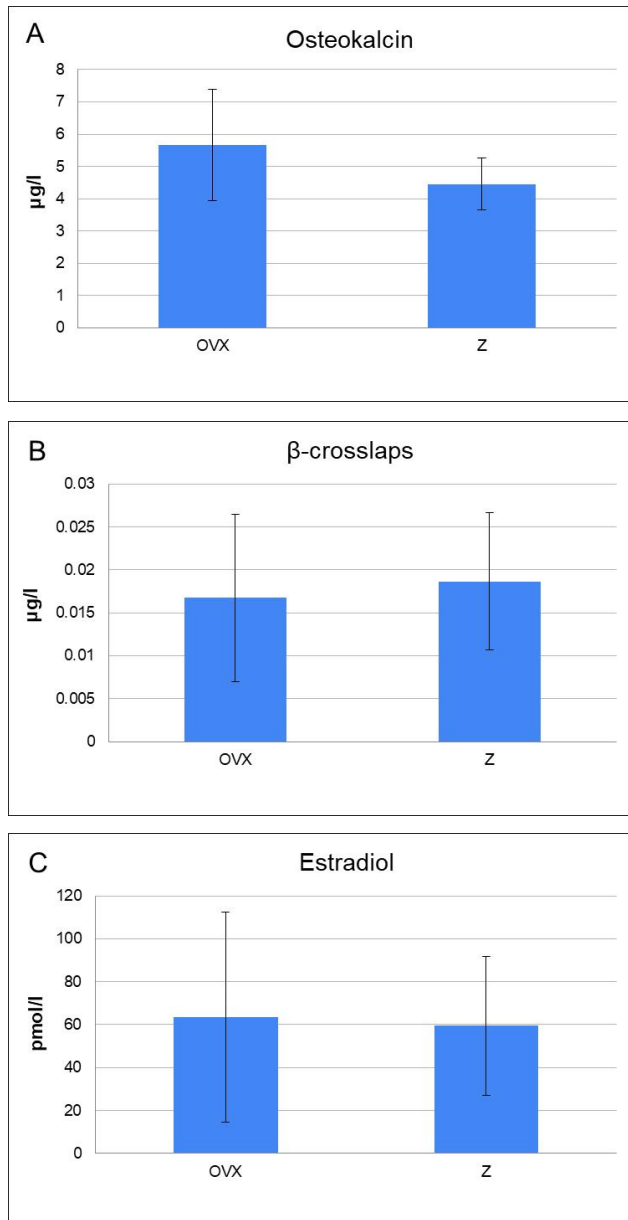
Tanabe, N., Maeno, M., Suzuki, N., Fujisaki, K., Tanaka, H., Ogiso, B., and Ito, K. (2005). IL-1 α stimulates the formation of osteoclast-like cells by increasing M-CSF and PGE2 production and decreasing OPG production by osteoblasts. Life Sciences 77, 615–626.

Tella, S.H., and Gallagher, J.C. (2014). Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 142, 155–170.

- Tiedemann, K., Le Nihouannen, D., Fong, J.E., Hussein, O., Barralet, J.E., and Komarova, S.V. (2017). Regulation of Osteoclast Growth and Fusion by mTOR/raptor and mTOR/riCTOR/Akt. *Front. Cell Dev. Biol.* 5, 54.
- Torreggiani, E., Matthews, B.G., Pejda, S., Matic, I., Horowitz, M.C., Grcevic, D., and Kalajzic, I. (2013). Preosteocytes/Osteocytes Have the Potential to Dedifferentiate Becoming a Source of Osteoblasts. *PLoS ONE* 8, e75204.
- Wang, D., Gu, J.-H., Chen, Y., Zhao, H.-Y., Liu, W., Song, R.-L., Bian, J.-C., Liu, X.-Z., Yuan, Y., and Liu, Z.-P. (2015a). $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ inhibits the differentiation and bone resorption by osteoclasts generated from Wistar rat bone marrow-derived macrophages. *Experimental and Therapeutic Medicine* 10, 1039–1044.
- Wang, L., Liu, S., Zhao, Y., Liu, D., Liu, Y., Chen, C., Karray, S., Shi, S., and Jin, Y. (2015b). Osteoblast-induced osteoclast apoptosis by fas ligand/FAS pathway is required for maintenance of bone mass. *Cell Death Differ* 22, 1654–1664.
- Wein, M.N., and Kronenberg, H.M. (2018). Regulation of Bone Remodeling by Parathyroid Hormone. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8, a031237.
- Widholz, B., Tsitlakidis, S., Reible, B., Moghaddam, A., and Westhauser, F. (2019). Pooling of Patient-Derived Mesenchymal Stromal Cells Reduces Inter-Individual Confounder-Associated Variation without Negative Impact on Cell Viability, Proliferation and Osteogenic Differentiation. *Cells* 8, 633.
- Yoon, K.-H., Cho, D.-C., Yu, S.-H., Kim, K.-T., Jeon, Y., and Sung, J.-K. (2012). The Change of Bone Metabolism in Ovariectomized Rats: Analyses of MicroCT Scan and Biochemical Markers of Bone Turnover. *J Korean Neurosurg Soc* 51, 323.
- You, L., Temiyasathit, S., Lee, P., Kim, C.H., Tummala, P., Yao, W., Kingery, W., Malone, A.M., Kwon, R.Y., and Jacobs, C.R. (2008). Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading. *Bone* 42, 172–179.
- Yu, M., Moreno, J.L., Stains, J.P., and Keegan, A.D. (2009). Complex Regulation of Tartrate-resistant Acid Phosphatase (TRAP) Expression by Interleukin 4 (IL-4). *Journal of Biological Chemistry* 284, 32968–32979.
- Zarei, A., Morovat, A., Javaid, K., and Brown, C.P. (2016). Vitamin D receptor expression in human bone tissue and dose-dependent activation in resorbing osteoclasts. *Bone Res* 4, 16030.
- Zasłona, Z., Pålsson-McDermott, E.M., Menon, D., Haneklaus, M., Flis, E., Prendeville, H., Corcoran, S.E., Peters-Golden, M., and O'Neill, L.A.J. (2017). The Induction of Pro-IL-1 β by Lipopolysaccharide Requires Endogenous Prostaglandin E₂ Production. *J.I.* 198, 3558–3564.
- Zebaze, R., Libanati, C., McClung, M.R., Zanchetta, J.R., Kendler, D.L., Høiseth, A., Wang, A., Ghasem-Zadeh, A., and Seeman, E. (2016). Denosumab Reduces Cortical Porosity of the Proximal Femoral Shaft in Postmenopausal Women With Osteoporosis. *J Bone Miner Res* 31, 1827–1834.
- Zheng, S.X., Vrindtsb, Y., Colletteb, J., Franchimont, N., Geenenb, V., Albert, A., and Reginstera, J.Y. (1997). Increase in cytokine production (IL-1p, IL-6, TNF-a but not IFN-y, GM-CSF or LIF) by stimulated whole blood cells in postmenopausal osteoporosis. *Maturitas* 26, 63-71.
- Zhu, S., Ehnert, S., Rouß, M., Häussling, V., Aspera-Werz, R., Chen, T., and Nussler, A. (2018). From the Clinical Problem to the Basic Research—Co-Culture Models of Osteoblasts and Osteoclasts. *IJMS* 19, 2284.

9. Příloha

Osteoporóza indukovaná u samic potkanů pomocí ovariektomie byla ověřována stanovením hodnot β -crosslapsu, estradiolu, osteokalcinu. Hladina uvedených markerů byla stanovena z plazmy potkanů na zakázku u společnosti Synlab Czech s.r.o.



Graf P č.1: Ověření osteoporózy u samic potkanů: A – Osteokalcin, B – β -crosslaps, C – Estradiol; OVX – ovariektomizované samice potkanů, Z – zdravé samice potkanů.