

Vývoj in vitro modelu kosti pro testování kostních náhrad

Mgr. Radmila Žižková <radmila.kudlackova@tul.cz>, prof. RNDr. David Lukáš, CSc.

Vývoj in vitro modelu kosti umožní detailnější testování kostních náhrad in vitro a omezí počet in vivo pokusů. In vitro model kosti je tvořen buňkami produkujícími kostní hmotu, osteoblasty a buňkami degradujícími kostní hmotu, osteoklasty. Dosažení osteoklastogeneze in vitro není snadné a proto byly testovány různé koncentrace suplementů podporujících tvorbu osteoklastů, prostaglandin E2 (PGE2), dihydroxyvitamin D3 (vit.D3) a růstové faktory makrofág-kolonie stimulující faktor (M-CSF) a receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL). Bylo zjištěno, že přidání M-CSF a RANKL je nezbytné pro tvorbu osteoklastů a že 10^{-8} M vit.D3 v kombinaci s M-CSF a RANKL nejlépe podporuje osteoklastogenezi.

Klíčová slova: osteoblast, osteoklast, ko-kultura, prostaglandin E2, dihydroxyvitamin D3

Úvod

Testování kostních náhrad zahrnuje in vitro testy na buněčné monokultuře a následně in vivo testy na modelových organizmech. Pro snížení počtu použitých modelových organismů je zapotřebí detailnější testování v in vitro podmínkách, které bude co nejvíce simulovat podmínky v živé kostní tkáni. Z toho důvodu je současný výzkum zaměřen na vývoj in vitro modelů tkání, které obsahují více buněčných typů. In vitro model kosti zpravidla obsahuje osteoblasty, buňky produkující kostní hmotu a osteoklasty, buňky degradující kostní hmotu [1], [2]. Osteoblasty mohou být přímo izolovány z kosti, nebo diferencovány ze stromálních kmenových buněk izolovaných z kostní dřevě [3], [4]. Izolace osteoklastů z kosti není efektivní a proto se nejčastěji diferencují z monocytů a makrofágů, které se izolují z periferní krve, kostní dřevě nebo sleziny [5]–[7]. Pro osteoklastogenezi jsou nezbytné růstové faktory M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) a RANKL (receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand), které jsou produkovány osteoblasty, osteocyty nebo stromálními kmenovými buňkami a váží se na receptory na membráně monocytů a makrofágů [8]. Rovnováha mezi degradací a produkcí kostní hmoty je zajištěna osteoprotegerinem, který se váže na RANKL a tím kompetuje s RANK (receptor activator of nuclear factor-kappa B) receptorem monocytů/makrofágů [9]. Expresí RANKL osteoblasty může být stimulována prostaglandinem E2 či $1\alpha,25$ dihydroxyvitaminem D3.

Metodika

Buňky byly izolovány z 3-měsíčních samic potkanů Wistar. Osteoblasty byly izolovány explantační metodou s enzymatickým před-ošetřením. Osteoklasty byly izolovány jako monocyty/makrofágy z periferní krve centrifugací v hustotním gradientu.

Nejprve byly nasazeny osteoblasty a druhý den byly přidány monocyty/makrofágy v poměru 1:10. 2 hodiny po adhezi monocytů/makrofágů byly odsáty neadherentní buňky a u příslušných skupin byl přidán M-CSF (25 ng/ml). Další den byl u příslušných skupin přidán RANKL (30 ng/ml), PGE2 a vit.D3 (Tab. 1).

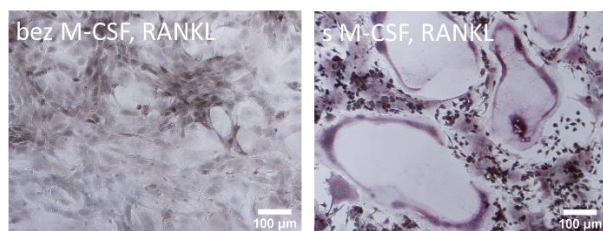
Tab. 1: Skupiny testovaných suplementů.

Bez M-CSF, RANKL	S M-CSF, RANKL
Bez PGE2 a vit.D3	Bez PGE2 a vit.D3
PGE2 10^{-6} M	PGE2 10^{-6} M
PGE2 10^{-8} M	PGE2 10^{-8} M
Vit.D3 10^{-8} M	Vit.D3 10^{-8} M
Vit.D3 10^{-9} M	Vit.D3 10^{-9} M
PGE2 10^{-8} M + vit.D3 10^{-8} M	PGE2 10^{-8} M + vit.D3 10^{-8} M

7. a 14. den po nasazení monocytů/makrofágů byla sledována tvorba osteoklastů histologickým barvením jader hematoxylinem a tartarát-rezistentní kyselý fosfatázy specifické pro osteoklasty. Dále byla kvantifikována aktivita karbonické anhydrázy II specifické pro osteoklasty.

Výsledky a diskuze

Světelná mikroskopie ko-kultur barvených hematoxylinem a TRAP barvením ukázala, že pro tvorbu osteoklastů nestačí přítomnost osteoblastů, ale je nezbytné přidání M-CSF a RANKL (Obr. 1). PGE2 ani vit.D3 nevyvolaly dostatečnou expresi RANKL pro indukci osteoklastogeneze bez přidaného M-CSF a RANKL. Kvantifikace karbonické anhydrázy II ukázala, že PGE2 10^{-6} M i v přítomnosti M-CSF a RANKL neindukuje osteoklastogenezi, ale koncentrace 10^{-8} M indukuje osteoklastogenezi lépe, než pouze M-CSF a RANKL. Obě koncentrace dihydroxyvitaminu D3 indukovaly osteoklastogenezi lépe, než pouze M-CSF a RANKL. 10^{-8} M dihydroxyvitamin D3 v kombinaci s M-CSF a RANKL byl pro dosažení osteoklastogeneze nejúčinnější. Koncentrace 10^{-8} M PGE2 a 10^{-8} M vit.D3 byly testovány v kombinaci, ale překvapivě samotný 10^{-8} M vit.D3 dosahoval lepších výsledků.



Obr. 1: Tvorba osteoklastů v ko-kultuře osteoblastů a monocytů/makrofágů pouze po přidání růstových faktorů M-CSF a RANKL.

Závěr

Z dosažených výsledků vyplývá, že pro tvorbu in vitro modelu kosti z osteoblastů a monocytů/makrofágů izolovaných z 3-měsíčních potkanů je nutná suplementace růstovými faktory M-CSF a RANKL a je vhodné dodat i vit.D3 v koncentraci 10^{-8} M. Pro testování kostních náhrad je však potřeba kromě degradace zajistit i produkci nové mezibuněčné hmoty, kolagenu a jeho mineralizaci. Pro tvorbu kolagenu je nezbytné přidání kyseliny askorbové a pro úspěšnou mineralizaci β -glycerofosfát. Vliv těchto dalších suplementů na osteoklastogenezi a výběr vhodných koncentrací musí být dále zkoumán.

Poděkování

Tato práce byla podpořena z projektu Studentské grantové soutěže (SGS) na Technické univerzitě v Liberci v roce 2021.

Poděkování dále patří školiteli prof. RNDr. Davidovi Lukášovi, CSc. a dále Mgr. Michale Rampichové, PhD., RNDr. Věře Hedvičkové, PhD. a Mgr. Evě Filové, PhD.

Reference

- [1] R. Owen a G. C. Reilly, „In vitro Models of Bone Remodelling and Associated Disorders“, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, roč. 6, 2018, doi: 10.3389/fbioe.2018.00134.
- [2] A. Sieberath, E. Della Bella, A. M. Ferreira, P. Gentile, D. Eglin, a K. Dalgarno, „A Comparison of Osteoblast and Osteoclast In Vitro Co-Culture Models and Their Translation for Preclinical Drug Testing Applications“, *Int. J. Mol. Sci.*, roč. 21, č. 3, s. 912, led. 2020, doi: 10.3390/ijms21030912.
- [3] H. Hanna, L. M. Mir, a F. M. Andre, „In vitro osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties“, *Stem Cell Res. Ther.*, roč. 9, s. 203, čvc. 2018, doi: 10.1186/s13287-018-0942-x.
- [4] P. G. Robey, „Collagenase-Treated Trabecular Bone Fragments: A Reproducible Source of Cells in the Osteoblastic Lineage“, *Calcif. Tissue Int.*, roč. 56, č. 1, s. S11–S12, led. 1995, doi: 10.1007/BF03354641.
- [5] S. Greiner, A. Kadow-Romacker, G. Schmidmaier, a B. Wildemann, „Cocultures of osteoblasts and osteoclasts are influenced by local application of zoledronic acid incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating“, *J. Biomed. Mater. Res. A*, roč. 91A, č. 1, s. 288–295, 2009, doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32245>.
- [6] S.-K. Lee, J. Kalinowski, S. Jastrzebski, a J. A. Lorenzo, „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.*, roč. 169, č. 5, s. 2374–2380, zář. 2002, doi: 10.4049/jimmunol.169.5.2374.
- [7] K. Nakagawa, H. Abukawa, M. Y. Shin, H. Terai, M. J. Troulis, a J. P. Vacanti, „Osteoclastogenesis on Tissue-Engineered Bone“, *Tissue Eng.*, roč. 10, č. 1–2, s. 93–100, led. 2004, doi: 10.1089/107632704322791736.
- [8] N. Udagawa *et al.*, „Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways“, *J. Bone Miner. Metab.*, roč. 39, č. 1, s. 19–26, led. 2021, doi: 10.1007/s00774-020-01162-6.
- [9] H. Yasuda, „Discovery of the RANKL/RANK/OPG system“, *J. Bone Miner. Metab.*, roč. 39, č. 1, s. 2–11, led. 2021, doi: 10.1007/s00774-020-01175-1.