

Vývoj *in vitro* modelu kosti pro testování kostních náhrad

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

Úvod

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. Pro tvorbu osteoklastů jsou nezbytné růstové faktory produkované osteoblasty, makrofág-kolonie stimulující faktor (M-CSF) a receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL). Tvorba osteoklastů *in vitro* není snadná a proto byly testovány různé koncentrace stimulačních suplementů, prostaglandin E2 (PGE2), dihydroxyvitamin D3 (vit.D3), M-CSF a RANKL.

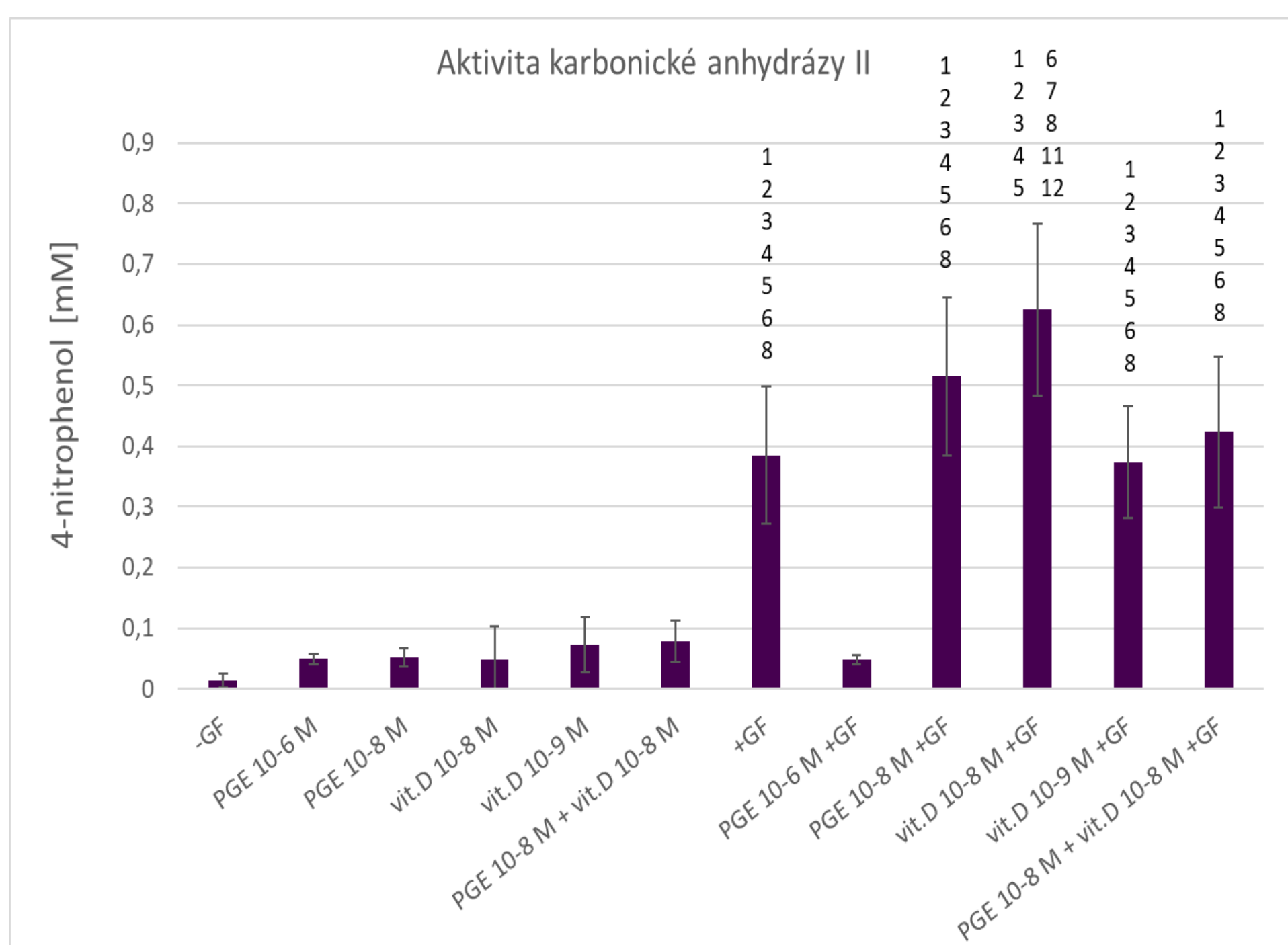
Metody

- Izolace primárních osteoblastů z femuru 3-měsíční samice potkana explantační metodou s enzymatickým před-ošetřením
- Nasazeno 2000 buněk na jamku 96-jamkové destičky
- Po 24 hodinách přidány monocyty/makrofágy izolované z periferní krve centrifugací v hustotním gradientu – 20000 buněk na jamku
- Po 2 hodinách adheze monocytů/makrofágů odmytí neadherentních buněk, případně přidán M-CSF
- Po 24 hodinách odmytí neadherentních buněk, případně přidán M-CSF (25 ng/ml), RANKL (30 ng/ml), prostaglandin E2 (PGE2), 1 α ,25-dihydroxyvitaminu D3 (Vit.D3)
- 7. a 14. den po nasazení monocytů/makrofágů sledována tvorba osteoklastů histologickým barvením jader hematoxylinem a tartarát-rezistentní kyselá fosfatázy specifické pro osteoklasty. Dále kvantifikace aktivity karbonické anhydrázy II specifické pro osteoklasty.

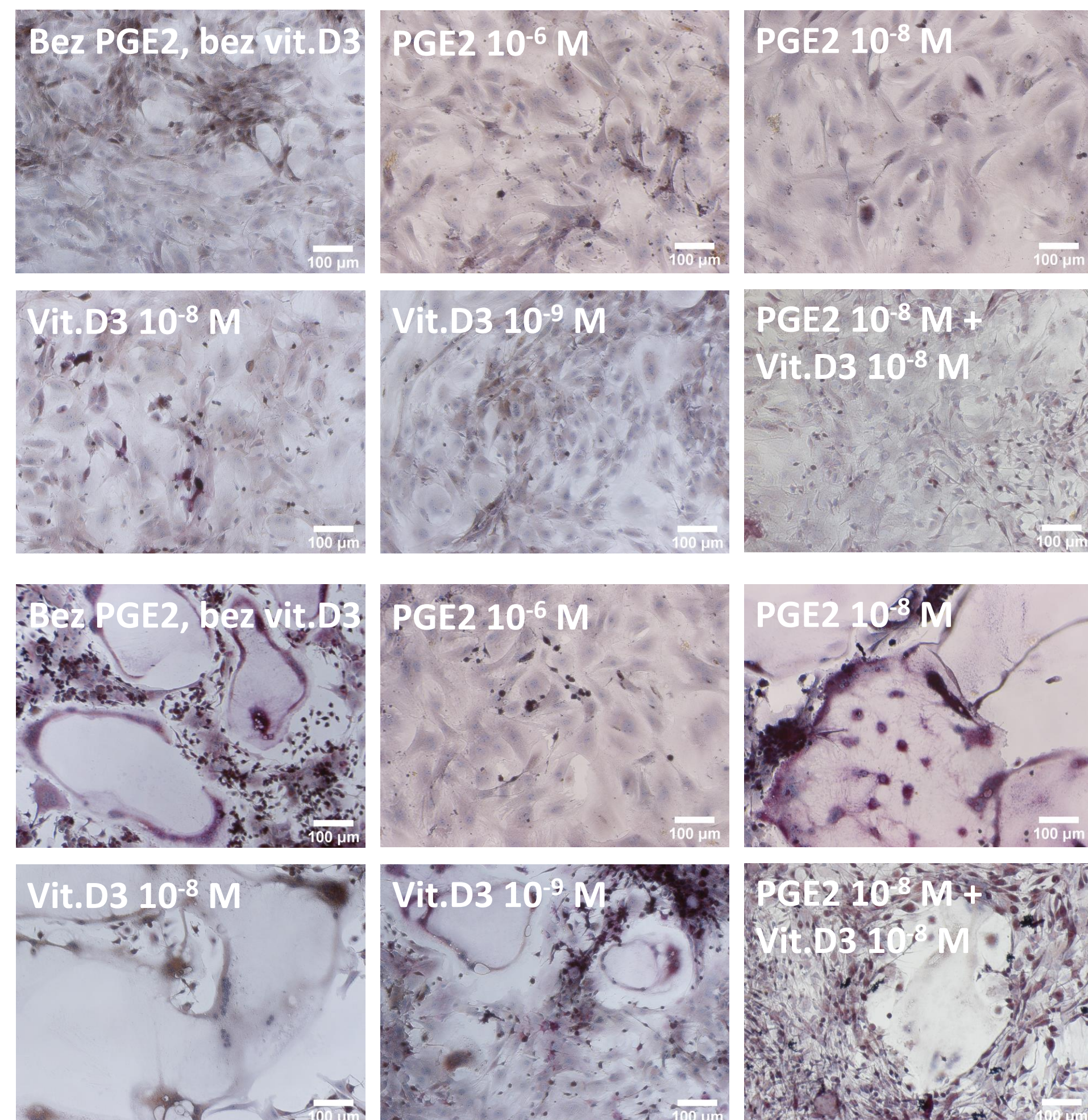
Bez M-CSF, RANKL	S M-CSF, RANKL
Bez PGE2, bez vit.D3	Bez PGE2, bez vit.D3
PGE2 10 ⁻⁶ M	PGE2 10 ⁻⁶ M
PGE2 10 ⁻⁸ M	PGE2 10 ⁻⁸ M
Vit.D3 10 ⁻⁸ M	Vit.D3 10 ⁻⁸ M
Vit.D3 10 ⁻⁹ M	Vit.D3 10 ⁻⁹ M
PGE2 10 ⁻⁸ M + vit.D3 10 ⁻⁸ M	PGE2 10 ⁻⁸ M + vit.D3 10 ⁻⁸ M

Výsledky

Vliv suplementace PGE2 a vit.D3 na indukci osteoklastogeneze. Osteoklastogeneze hodnocena měřením aktivity karbonické anhydrázy II produkované osteoklasty. Vliv suplementů PGE2 a vit.D3 sledován bez i s přidáním M-CSF, RANKL.



Barvení tartrát-rezistentní kyselá fosfatázy (fialovo-hnědá) specifické pro osteoklasty. Jádra barvena hematoxylinem (modrá). Měřítka 100 μ m.



Závěr

Bylo zjištěno, že pro tvorbu osteoklastů je nezbytné přidání M-CSF a RANKL, přidání PGE2 a vit.D3 není dostatečné. Optimální koncentrace vit.D3 a PGE2 je 10⁻⁸ M. Přítomnost pouze vit.D3 nebo pouze PGE2 stimuluje osteoklastogenezi lépe než jejich kombinace, ale nejlepších výsledků dosáhl vit.D3 10⁻⁸ M. PGE2 10⁻⁶ M neindukuje osteoklastogenezi ani s přidáním M-CSF, RANKL.