

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



**Patrik Škubica**

Vliv vybraných zánětlivých agens na proces osteoklastogeneze  
Effect of selected inflammatory agents on the osteoclastogenesis

Diplomová práce

Školitelka: RNDr. Pavlína Daňková, Ph.D.

Praha, 2018

**Prohlášení:**

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

V Praze, 10.08.2018

Patrik Škubica

### *Poděkování*

Rád bych poděkoval své školitelce RNDr. Pavlíně Daňkové, Ph.D. za její cenné rady a odborný dohled nad prací, Mgr. Ivě Brynychové a Mgr. Dominice Mravec Bencúrové za předání zkušeností v laboratorních metodách a celému kolektivu Laboratoře molekulární antropologie za vytvoření přátelského pracovního prostředí. Zvláštní poděkování patří všem dárčům biologického materiálu za účast ve studii.

# Abstrakt

**Úvod:** Kost je v průběhu života značně aktivní tkání, která podléhá konstantním remodelacím. Na střídavé resorpci a novotvorbě mají hlavní podíl osteoklasty, osteoblasty a osteocyty. Osteoklasty jsou jediné známé buňky se schopností odbourávat kostní tkáň. Tyto buňky vznikají fúzí prekursorů v kostní dřeni nebo monocytů v periferní krvi v procesu zvaném osteoklastogeneze. Vznik osteoklastů z periferních prekursorů může hrát významnou roli v souvislosti s chronickými zánětlivými chorobami, u nichž je známé zvýšené riziko rozvoje osteoporózy v průběhu života. Jednou z těchto chorob je celiakie, při níž u postižených jedinců po příjmu lepku v potravě dochází k rozpadu střevní sliznice a rozvoji chronického zánětu. V této práci jsme se zaměřili na potenciální roli osteoklastogeneze při rozvoji osteoporózy u pacientů s celiakií a ověřili jsme obecně vlivy vybraných zánětlivých agens (TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  a cfDNA) s předpokládanými nebo hypotetizovanými účinky v osteoklastogenezi.

**Materiál a metody:** V plazmě a séru nově diagnostikovaných pacientů s celiakií, pacientů na dietě a zdravých kontrol jsme analyzovali koncentrace cfDNA a cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ . Séra těchto pacientů a kontrol jsme spolu s rekombinantními cytokiny užívali v kultivacích. Pro ověření vlivu cfDNA jsme séra ošetřovali DNázou. Diferenciaci osteoklastů v přítomnosti různých faktorů jsme prováděli při 14denních kultivacích monocytů izolovaných z krve od zdravých dárců. Vyhodnocení osteoklastogeneze probíhalo mikroskopicky a na základě měření genových expresí, kde jsme sledovali exprese charakteristických genů *ACP5*, *CTSK* a *CALCR*.

**Výsledky:** Mezi skupinami pacientů a zdravými kontrolami jsme nenaměřili odlišné koncentrace žádného ze sledovaných zánětlivých faktorů. V přítomnosti séra nově diagnostikovaných pacientů vznikalo v průměru o více než 50 % vyšší množství osteoklastů, než v přítomnosti séra zdravých jedinců. Cytokin IL-6 v našich experimentech přímo inhiboval osteoklastogenezi, u TNF- $\alpha$  jsme pozorovali trend zvýšení osteoklastogeneze. V případě IFN- $\gamma$  jsme pozorovali stimulační i inhibiční efekty, které byly odlišné pro buňky různých dárců. V pilotních výsledcích z ověření role cfDNA jsme pozorovali trend několikanásobně nižší osteoklastogeneze po ošetření séra DNázou.

**Závěr:** Naše výsledky naznačují, že v séru nově diagnostikovaných pacientů s celiakií existuje faktor či více faktorů, které nemusí souviset se zánětem a které výrazně zvyšují osteoklastogenezi z periferních prekurzorů. Tento efekt se zdá být velmi významný a mohl by být jednou z příčin zvýšeného rizika osteoporózy v celiakii. V případě vlivu jednotlivých cytokinů se zdá, že by IFN- $\gamma$  mohl hrát důležitou roli v modulaci efektů ostatních cytokinů a že jeho působení na diferenciaci osteoklastů je u monocytů různých jedinců odlišné. Výsledky z ověření vlivu cfDNA ukazují na její možnou významnou roli v osteoklastogenezi a měly by být dále zkoumány na jiných modelech s užitím různých metod.

**Klíčová slova:** osteoklast, osteoklastogeneze, osteoporóza, zánět, zánětlivá onemocnění, celiakie, TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , cfDNA

# Abstract

**Introduction:** Bone is a highly active tissue throughout life and is a subject to constant remodelling. Main cells responsible for continuous resorption and *de novo* synthesis of bone matrix are osteoclast, osteoblasts and osteocytes. Osteoclasts are the only known type of cells able to resorb bone. These cells are formed by fusion of precursor cells in bone marrow or peripheral blood in a process called osteoclastogenesis. Formation of osteoclasts may be of importance concerning chronic inflammatory diseases that are linked with higher risk of developing osteoporosis during lifespan. Celiac disease is one of those diseases, which is characterized by destruction of intestinal mucosa after ingestion of gluten by susceptible individuals followed by induction of chronic inflammation. In this work, we focused on the potential role of osteoclastogenesis in the development of osteoporosis in patients with celiac disease and we studied roles of selected inflammatory agents (TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  and cfDNA) with supposed or hypothesised effects on osteoclastogenesis.

**Material & Methods:** We obtained plasma and serum samples from newly diagnosed patients with celiac disease, patients on gluten free diet and healthy controls and analysed concentrations of cfDNA and inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6 and IFN- $\gamma$  in those samples. Sera of these patients and controls were then used for subsequent *in vitro* cultivations. To verify effects of cfDNA, same sera were also used after DNase treatment. To verify effects of celiac sera and inflammatory factors on osteoclastogenesis, two-week cultivations of monocytes separated from peripheral blood of healthy donors were performed in presence of these factors. Osteoclastogenesis was then evaluated by count of osteoclasts using optical microscope and by qPCR quantitation of gene expression of typical osteoclast markers ACP5, CTSK and CALCR.

**Results:** No differences in concentrations of all studied inflammatory factors were found between groups of celiac patients and healthy donors. In presence of serum of newly diagnosed patients, about 50 % more osteoclasts in comparison to healthy serum have formed on average. IL-6 directly inhibited osteoclastogenesis in our experiments, while TNF- $\alpha$  showed a trend towards positive stimulation of osteoclastogenesis. In case of IFN- $\gamma$ , we found both stimulatory and inhibitory effects that seem to vary depending on an individual healthy

donor of monocytes. In our pilot experiments with cfDNA, we observed trend towards a several fold decrease of osteoclastogenesis in presence of serum treated with DNase.

**Conclusion:** Our results suggest there are one or more factors in sera of newly diagnosed patients with celiac disease that may not be directly linked to inflammation, but are responsible for significant increase of osteoclastogenesis in peripheral precursors. This effect may play an important role in higher risk of osteoporosis in celiac disease patients. Regarding inflammatory cytokines, IFN- $\gamma$  might play an important role in modulation of effects of other cytokines in osteoclastogenesis and its effects seem to be specific for monocytes from each particular healthy donor. The results from cfDNA experiments suggest its potentially significant role in osteoclastogenesis and should be further evaluated using other models and different methods in the future.

**Key words:** osteoclast, osteoclastogenesis, osteoporosis, inflammation, inflammatory diseases, celiac disease, TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , cfDNA

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	11
1.1. Kostní tkáň, její metabolismus a remodelace.....	11
1.1.1. Patologické změny v remodelacích.....	14
1.2. Buňky účastníci se remodelace.....	16
1.2.1. Osteoklasty.....	16
1.2.1.1 Osteoklastogeneze z periferních prekurzorů.....	19
1.2.2 Osteoblasty.....	21
1.2.3 Osteocyty.....	23
1.2.4. Další typy buněk.....	24
1.3. Zánětlivé faktory v osteoklastogenezi.....	25
1.3.1. Role cirkulující DNA.....	27
1.3.2. Role hlavních prozánětlivých cytokinů.....	28
1.3.2.1. TNF- $\alpha$ .....	28
1.3.2.2. IL-6.....	29
1.3.2.3. IFN- $\gamma$ .....	30
1.4. Celiakie, záněť a osteoporóza.....	31
<b>2. Cíle práce</b> .....	35
<b>3. Materiál a metody</b> .....	36
3.1. Dárci biologického materiálu.....	36
3.2. Separace plazmy a séra z plné krve.....	39
3.3. Analýza obsahu cytokinů ve vzorcích.....	40
3.4. Analýza obsahu cfDNA ve vzorcích.....	42
3.5. Separace monocytů z plné krve a diferenciacie osteoklastů.....	42
3.5.1. Příprava kompletního média DMEM pro kultivace.....	45
3.6. Barvení TRAP a obrazové vyhodnocení.....	46

3.7. Hodnocení genové exprese.....	48
3.7.1. Izolace RNA .....	48
3.7.2. Reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce (RT PCR) .....	49
3.7.3. Kvantitativní real-time polymerázová řetězová reakce.....	51
3.8. Zpracování výsledků .....	52
3.9. Statistické vyhodnocení.....	52
3.10. Optimalizace postupů .....	53
3.10.1. Použití plazmy a séra v kultivacích.....	53
3.10.2. Ošetření séra DNázou.....	54
3.10.3. Koncentrace cytokinů.....	59
<b>4. Výsledky .....</b>	<b>61</b>
4.1. Srovnání koncentrací cytokinů mezi pacienty s celiakií a kontrolami.....	61
4.1.1. Koncentrace TNF- $\alpha$ .....	61
4.1.2. Koncentrace IL-6.....	62
4.1.3. Koncentrace IFN- $\gamma$ .....	63
4.2. Srovnání koncentrací cfDNA mezi pacienty s celiakií a kontrolami .....	64
4.3. Analýza vlivu sér pacientů s celiakií a zdravých kontrol na osteoklastogenezi....	65
4.4. Vliv cytokinů na osteoklastogenezi.....	66
4.5. Vliv cytokinů a sér na osteoklastogenezi při zohlednění nepárovosti dat.....	67
4.6. Vliv cytokinů a sér na genové exprese markerů osteoklastů .....	69
4.6.1. Exprese <i>ACP5</i> .....	69
4.6.2. Exprese <i>CTSK</i> .....	70
4.6.2.1. Exprese <i>CTSK</i> přepočtená na osteoklast .....	72
4.6.3. Exprese <i>CALCR</i> .....	73
4.7. Vliv cfDNA na osteoklastogenezi.....	74
4.7.1. Vliv cfDNA na osteoklastogenezi při zohlednění nepárovosti dat .....	75
4.8. Vliv cfDNA na genové exprese markerů osteoklastů .....	77

4.8.1. Exprese <i>CALCR</i> .....	78
<b>5. Diskuze</b> .....	79
<b>6. Závěr</b> .....	86
<b>Seznam zkratek</b> .....	88
<b>Seznam citované literatury</b> .....	93
<b>Seznam internetových zdrojů</b> .....	102

# 1. Úvod

## 1.1. Kostní tkáň, její metabolismus a remodelace

Kost je značně heterogenní tkáň skládající se z anorganické, organické a buněčné složky. Hlavní anorganickou složku a zároveň hlavní stavební materiál kosti představuje hydroxyapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Poměr minerálů na celkové hmotnosti kosti se u většiny kostí pohybuje mezi 60 % – 70 %. Organickou složku představuje především kolagen typu I s obsahem kolem 90 %, který je zároveň hlavním strukturním proteinem. Ostatní nekolagenní minoritně zastoupené proteiny mají význam v organizaci matrix, buněčné signalizaci, mineralizaci a metabolismu kosti. Několika procenty jsou zastoupeny lipidy a voda, jejichž role je mnohem méně prozkoumána, ale pravděpodobně se také podílejí na metabolismu kosti – lipidy ovlivněním buněčné signalizace a funkce, voda skrze interakci s kolagenovými vlákny a krystalky minerálů (Boskey, 2013).

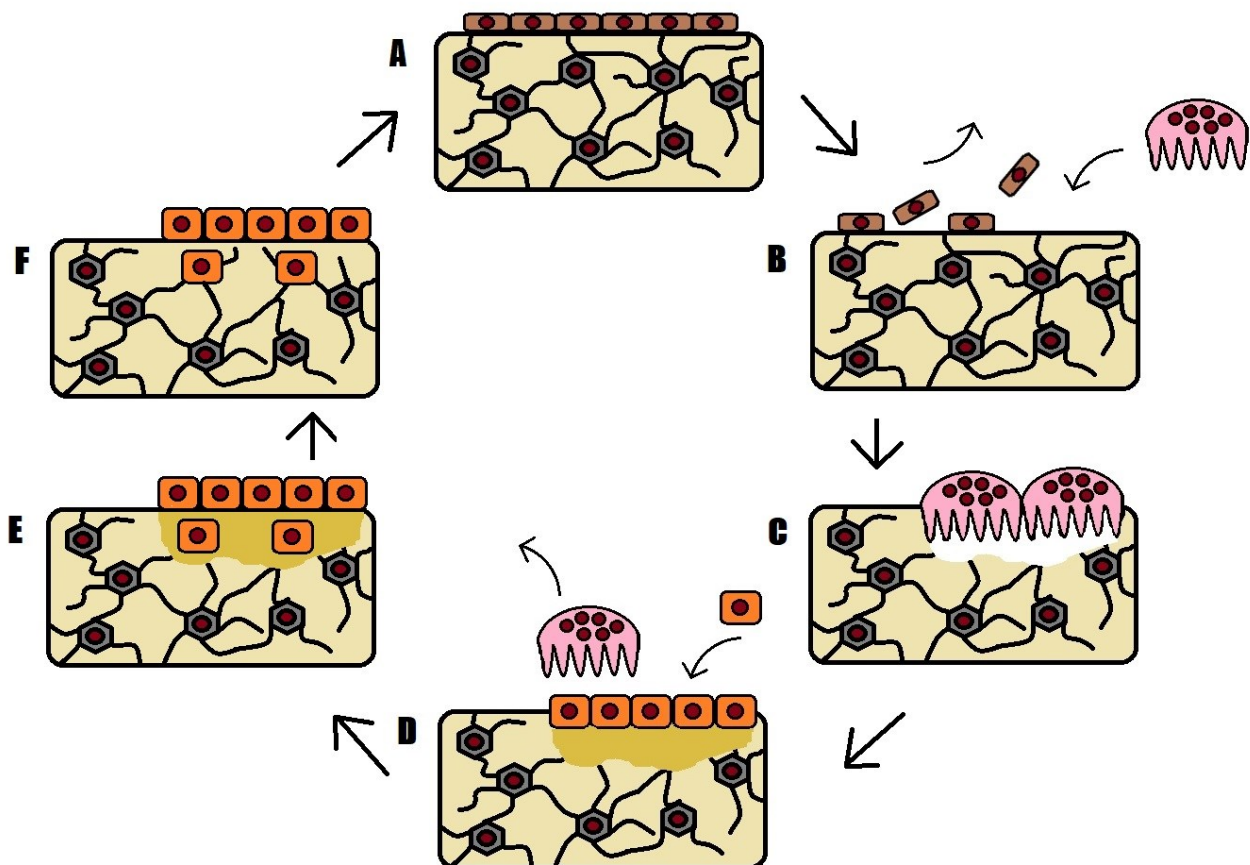
Buněčná složka se přímo podílí na struktuře kosti a představují ji zejména osteoblasty, osteocyty a osteoklasty. Důležitou úlohu související s tvorbou a funkcí těchto tří typů buněk hrají dále i jiné buňky s kostí přímo nebo nepřímo spojené, například kmenové buňky kostní dřene, tzv. bone-lining cells (BLC) nebo lymfocyty.

Mimo to, že je kost nezbytnou součástí pohybového a opěrného aparátu, zastává v těle další významné úlohy týkající se krve tvorby, imunitního systému a metabolismu. Je zásobárnou vápníku a fosforu, které mohou být v případě potřeby uvolněny do krevního oběhu, slouží jako úložiště některých růstových faktorů a cytokinů, úložiště tuků, podílí se na detoxifikaci organismu a udržování stálého pH krve a produkuje také endokrinní hormony osteokalcin a fibroblastový růstový faktor. Samotná kost pak podléhá vlastnímu kostnímu metabolismu regulovanému kostními buňkami, jejich progenitory a jinými, například výše zmíněnými, typy buněk. Kostní metabolismus je dále ovlivňován mnohými regulačními faktory, mezi něž patří hormony (např. kalcitonin a parathyroidní hormon), růstové faktory, vitamín D a cytokiny (Kini & Nandeesh, 2012).

Vlastní metabolismus kosti, při němž dochází ke střídavé resorpci tkáně a její následné novotvorbě, probíhá po celý život a je označován jako remodelace kosti. Týká se jak hutné,

tak houbovitě kostní tkáň, ale výrazněji je remodelována právě *substantia spongiosa*. Ta sice představuje pouze kolem 20 % celkové kostní hmoty, ale má vyšší poměr povrchu vůči objemu a je tedy přístupnější k působení remodelujících buněk (Hadjidakis & Androulakis, 2006). Odhaduje se, že během jednoho roku dojde u dospělých k remodelaci až 10 % kostní tkáň, z čehož asi 4 % představuje *s. compacta* a 6% *s. spongiosa* (Manolagas, 2000).

Remodelace kosti zahrnuje několik fází (obr. 1). V klidovém období neprobíhá resorpce ani novotvorba kosti. V resorpční fázi dochází k aktivaci osteoklastů a rozrušení anorganické i organické složky kosti. V místech, kde došlo k resorpci, je následně osteoblasty dotvořena nová kostní tkáň a celý proces opět přechází do klidového období.



**Obr. 1:** Jednotlivé fáze remodelace kosti. *Upraveno podle Kini & Nandeesh (2012)*

A: Klidová fáze, v níž je povrch kosti lemován BLC. B: Místo resorpce se uvolňuje pro působení osteoklastů. C: Osteoklasty resorbují kostní tkáň. D: Osteoklasty jsou nahrazeny osteoblasty, které tvoří novou kostní matrix. E: Osteoblasty hluboko v resorpčním důlku jsou zavzaty do matrix a zároveň pokračuje tvorba matrix výše položenými buňkami. F: Nově vytvořená kostní matrix se mineralizuje, osteoblasty uvnitř matrix se stávají osteocyty, povrchové osteoblasty se mění na BLC.

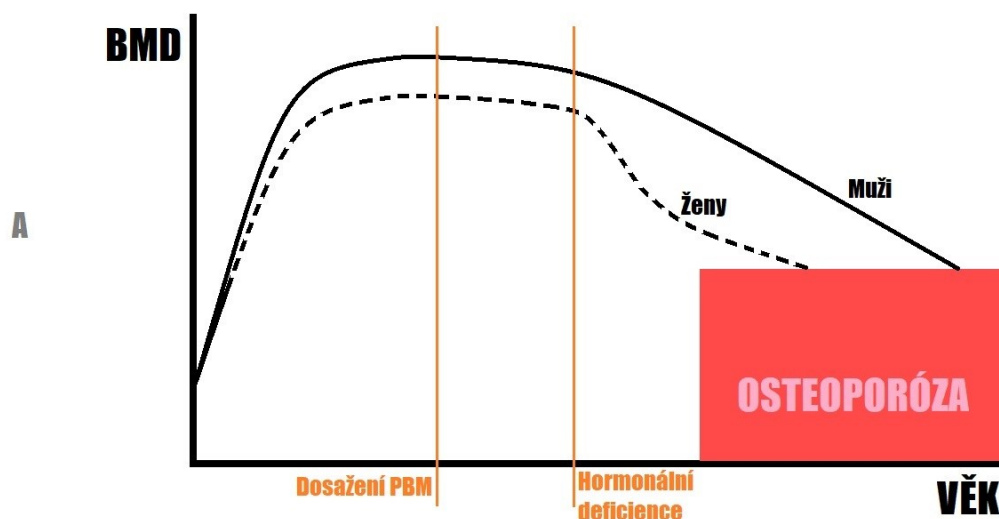
Trvalá schopnost remodelace je zcela nezbytnou vlastností kostní tkáně. V průběhu života se uplatňuje při samotném růstu kostí, ať už u změn v tloušťce spojených s periostálním apozičním růstem a současnou endostální resorpcí, nebo u změn celkových rozměrů a tvaru, kde je kooperace apozyce a resorpce velmi dobře prozkoumána například u mandibuly. Remodelační proces je dále nenahraditelný v závěrečné fázi opravy poškozené kostní tkáně při zlomeninách (Schindeler et al., 2008). Nakonec nelze opomenout ani zásadní význam remodelace spongiózní tkáně jakožto adaptivní reakce na mechanickou zátěž kosti, kde však doposud není přesně známo, jakým způsobem fungují mechanické stimuly na buněčné úrovni (Sasal et al., 2017).

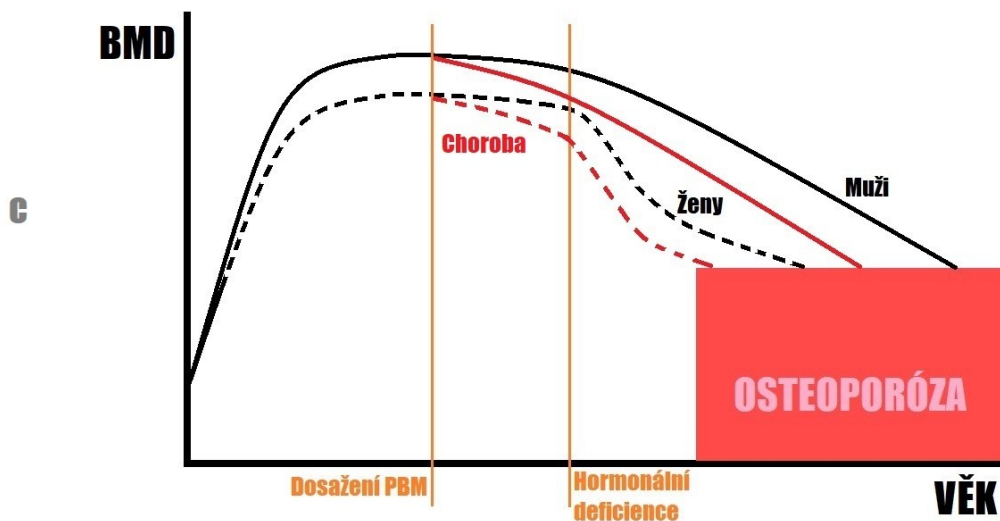
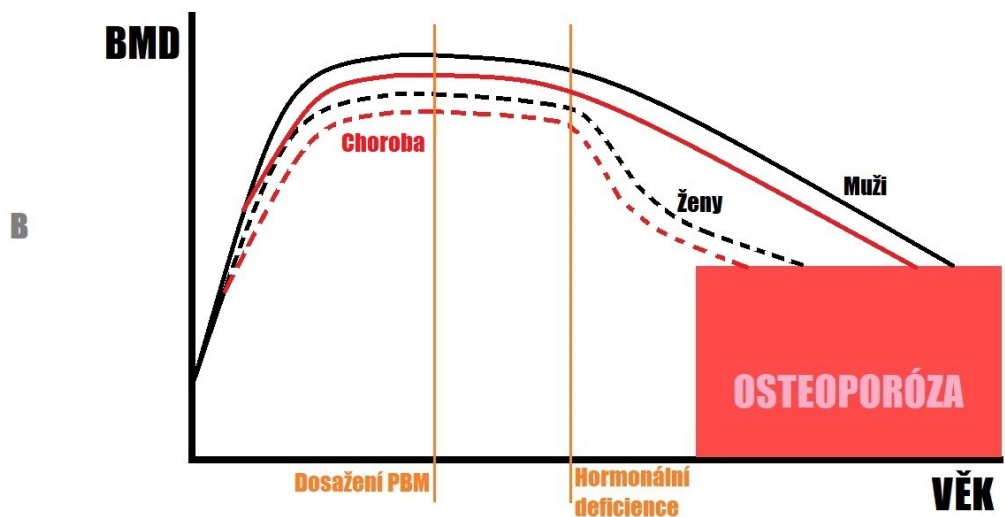
Velká pozornost je v lékařském výzkumu věnována souvislosti remodelací s úbytkem kostní tkáně a následným rizikem rozvoje osteoporózy. V průběhu růstu kostí dochází ke zvýšené novotvorbě kosti až do ukončení růstu a dosažení vrcholu kostní hmoty (PBM), který podle různých autorů nastává v časně dospělosti, nejpozději však ke konci třetí dekády života (Recker et al., 1992; Berger et al., 2010; Baxter-Jones et al., 2011). Podle Hernandez et al. (2003) způsobí 10% zvýšení maxima PBM oddálení rozvoje osteoporózy až o 13 let. V průběhu dospělosti dochází obzvláště ve spongiózní tkáni k úbytku, který začíná už na přelomu třetí a čtvrté dekády života (Riggs et al., 2008). Tento úbytek nesouvisící s hormonální deficiencí se týká obou pohlaví a nebyl doposud zcela objasněn. Kolem 50. roku života je pak tento úbytek výrazně podpořen obzvláště u žen vlivem menopauzy, protože estrogen různými mechanismy brání nadbytečné resorpci tkáně (Demontiero et al., 2012).

S ohledem na věkové změny v kostní remodelaci je nezbytné zaměřit pozornost na výkyvy v procesech novotvorby a resorpce oproti přirozenému stavu. Změny v míře osteoklastogeneze, neboli tvorby osteoklastů, mohou být příčinou nadměrného úbytku kostní tkáně a následného časného rozvoje osteoporózy (Teitelbaum, 2000). Ta je na základě kritérií Světové zdravotnické organizace definována jako hodnota hustoty kostní tkáně (BMD) ležící pod  $-2,5$  SD ve srovnání s průměrem mladých dospělých (WHO, 1994). Její současná prevalence se ve vyspělých zemích liší mezi jednotlivými zeměmi a dále také dle analýzy konkrétních kostí. V maximech je pro páteřní obratle, kde leží v rozpětí 16 % (USA) – 38 % (Japonsko) u žen a 3 % (Kanada) – 8 % (Francie, Německo, Španělsko, Itálie) u mužů (Wade et al., 2014).

### 1.1.1. Patologické změny v remodelacích

Nepřirozené změny oproti běžnému poměru v remodelačních procesech mohou mít vážné důsledky spočívající v časném rozvoji osteoporózy, a to jak v souvislosti s dosažením nižšího PBM při výskytu patologie v dětství (např. Kavak et al., 2003), tak při rozvoji patologie během dospělosti, která následně vede k výraznějšímu úbytku kostní tkáně oproti normálu. Způsoby, jakými mohou nerovnováhy mezi remodelačními procesy vést k časnému rozvoji osteoporózy, jsou shrnuty na obr. 2.





**Obr. 2:** Přirozené a patologické změny v kostních remodelacích. *Autor*

A: Po dosažení PBM nejpozději ve třetí dekádě života dochází k pozvolnému hormonálně nezávislému úbytku kostní tkáně, který obzvláště u žen výrazně zrychluje v souvislosti s menopauzou. B: V případě výskytu patologie v dětství, při níž nedochází k dostatečné tvorbě kosti nebo je zvýšená resorpce, dosáhne jedinec nižšího PBM a při zohlednění věkově závislých změn pak časněji rozvine osteoporózu. C: Při výskytu patologie související s nadměrnou resorpcí v dospělosti je hormonálně nezávislý věkový úbytek výraznější a u postiženého jedince může vést k časnému rozvoji osteoporózy.

K narušení rovnováhy ve prospěch resorpčních procesů může dojít při různých infekčních onemocněních. Tento jev se týká především bakteriálních onemocnění, protože bakteriální lipopolysacharidy (LPS) mohou stimulovat tvorbu osteoklastů (Mörmann et al., 2008). Modelovým příkladem je periodontitída, zánětlivé onemocnění ozubice, při němž navíc dochází k aktivaci hostitelského imunitního systému a vzniku zánětu doprovázeného odbouráváním alveolární kostní tkáně (Cochran, 2008).

Velmi intenzivně je zkoumána zvýšená resorpce kostní tkáně v dospělosti při výskytu zánětu. Vysoká koincidence osteoporózy je pozorována u mnoha chorob spjatých se zánětem, ať už jsou jednotlivé aspekty jejich etiopatogeneze více či méně odlišné. Pozornost se tak upírá na řadu systémových zánětlivých onemocnění, z nichž lze zmínit například revmatoidní artritidu (RA), ankylozující spondylitidu, systémový lupus erythematoses (SLE), Crohnovu chorobu nebo celiakii, ale také na neautoimunitní onemocnění, u nichž se vyskytuje chronický zánět, například cystickou fibrózu nebo chronickou obstrukční plicní nemoc (Lacativa & Farias, 2010; Amarasekara et al., 2015).

Tato diplomová práce je zaměřena na působení zánětlivých látek především v souvislosti s celiakií, jedním z autoimunitních onemocnění s vysokým rizikem rozvoje osteoporózy. Bližší pojednání o celiakii a její vysoké koincidenci s osteoporózou jsou předmětem závěrečné kapitoly teoretického úvodu.

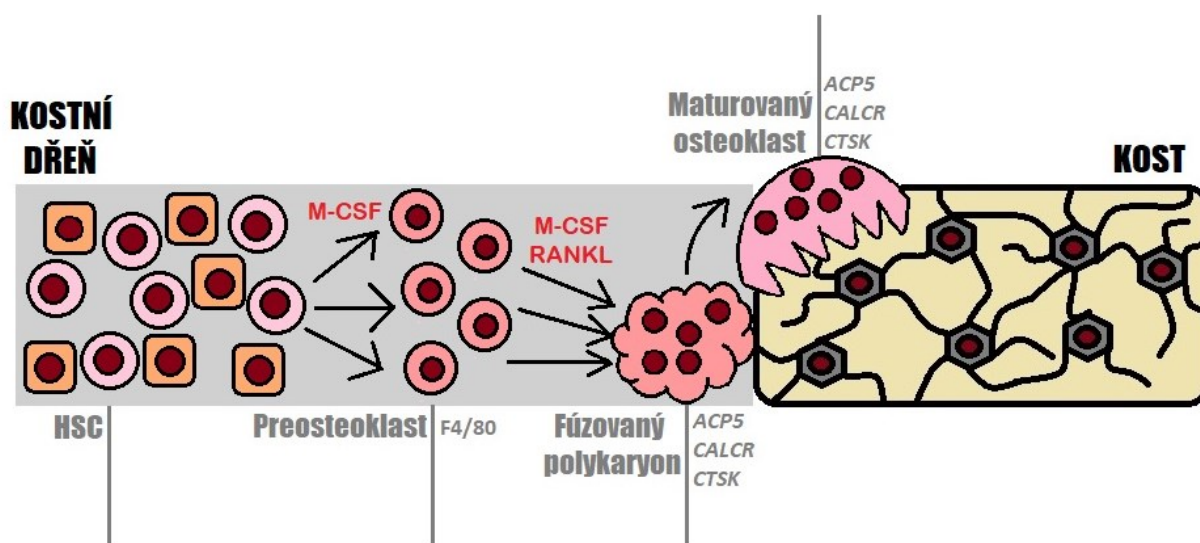
## 1.2. Buňky účastnící se remodelace

### 1.2.1. Osteoklasty

Osteoklasty jsou jediné buňky známé pro schopnost resorbovat kostní tkáň. Jsou to mnohjaderné buňky vznikající z monocyto-makrofágové linie poblíž povrchu kosti (Boyle et al., 2003). Prekurzory osteoklastů se nacházejí mezi monocyty cirkulujícími v periferní krvi, mezi peritoneálními makrofágy a kmenovými buňkami kostní dřeně (Quinn et al., 1998).

V kostní dřeni vznikají osteoklasty pod vlivem makrofágového kolonie stimulujícího faktoru (M-CSF) mnohonásobným dělením hematopoetických kmenových buněk (HSC) v preosteoklasty s povrchovým markerem F4/80. Ty následně splývají za účasti cytokinů M-

CSF a ligandu receptor-aktivátoru jaderného faktoru kappa B (RANKL) v mnohjaderné buňky charakterizované vysokou expresí genů *ACP5*, *CALCR* a *CTSK*. Po kontaktu s kostní tkání dochází k aktivaci polykaryonů v maturované resorbující osteoklasty, které se vyznačují stejnými markery (obr. 3; Robling et al., 2006). Produkty výše zmíněných genů jsou přímo odpovědné za funkci osteoklastů. *ACP5* a *CTSK* produkují lysozomální enzymy tartrát rezistentní kyselou fosfatázu (TRAP) a kathepsin K (CTSK) zodpovědné za rozrušení kostní tkáně v místě resorpce, produktem genu *CALCR* je receptor pro kalcitonin, který se uplatňuje v inhibici aktivity osteoklastů skrze interakci s kalcitoninem (Boyle et al., 2003).

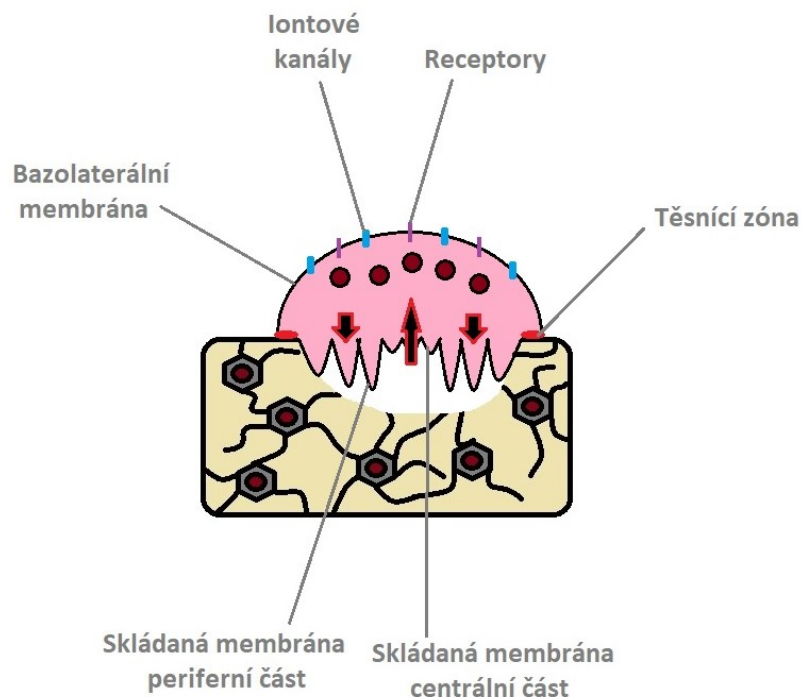


**Obr. 3:** Vznik osteoklastů z jejich prekurzorů. *Upraveno podle Robling et al. (2006)*

Aktivace osteoklastů do značné míry souvisí s polarizací a celkovou morfologií těchto buněk. Enzym CTSK je fúzovanými polykaryony produkován už během jejich výskytu v cirkulaci, ale nachází se v nich ve své neaktivní prekurzorové formě. Výrazná převaha aktivní formy CTSK je až v buňkách, které se nachází na místě resorpce. Zde dochází také k funkční polarizaci osteoklastu, při níž je enzym selektivně lokalizován směrem k té části buněčné membrány, jež je v kontaktu s kostí (Dodds et al., 2001).

Ke své funkci vyvinuly osteoklasty unikátní morfologii spočívající v rozdělení buněčné membrány na tři hlavní okrsky – skládanou membránu, těsnicí zónu a bazolaterální membránu (obr. 4). Skládaná membrána je část, která zajišťuje resorpci a následné odstranění resorbované tkáně, dochází pod ní k tvorbě resorpčních důlků. Sama se ještě dělí na dvě

subdomény – periferní a centrální část. Periferní část sekretuje lysozomální enzymy, centrální část zajišťuje endocytózu degradované matrix, která je buňkou nakonec vyloučena do mezibuněčného prostoru (Mulari et al., 2003). Těsnicí zóna obklopuje oblast skládané membrány a odděluje resorpční důlky od vnějšího prostředí. Na její formaci se podílí komplexní aparát podozómů, aktinových filament a proteinů asociovaných s aktinem (Luxenburg et al., 2007). Nejméně studovanou částí ze tří domén je bazolaterální membrána. Tato část buňky obsahuje množství iontových kanálů a receptorů, což ukazuje na její schopnost udržování iontové homeostáze a buněčné komunikace (Bethel et al., 2012).



**Obr. 4:** Morfologie osteoklastu. *Autor*

Podobně jako osteoklasty uzpůsobily svou membránu k efektivnímu odbourávání kostní matrix, tak i mnohojadernost pravděpodobně úzce souvisí s touto funkcí. Ačkoliv jsou možné závěry stále předmětem debat, zdá se, že počet jader osteoklastu vysoce koreluje s plochou, kterou dokáže resorbovat (Boissy et al., 2002). Rozporuplné jsou výsledky studií zaměřujících se na aktivitu jednotlivých jader v rámci osteoklastu. Podle některých jsou v rámci jednoho osteoklastu všechna jádra stejně transkripčně aktivní (Boissy et al., 2002), jiní popsali selektivní aktivitu jader (Youn et al., 2010).

Je zřejmé, že osteoklastogeneze *sensu lato*, zahrnující vznik neaktivovaných mnohojaderných osteoklastů a jejich aktivaci, resorpční aktivitu, respektive inhibici, může být ovlivněna na mnoha různých úrovních. Osteoklastogeneze *sensu stricto*, kdy hovoříme především o samotné diferenciaci mnohojaderných osteoklastů, poskytuje tedy pouze částečný obrázek, protože výsledný efekt osteoklastů na resorpci tkáně je dán kombinací jejich vzniku, aktivace a funkce. Až na některé výjimky, mezi něž patří například osteopetróza s vysokým počtem vznikajících nefunkčních osteoklastů (Thudium et al., 2014), je ale obecně chápán vyšší počet vznikajících osteoklastů jako jedna z hlavních příčin rozvoje osteoporózy (Henriksen et al., 2007).

### 1.2.1.1 Osteoklastogeneze z periferních prekurzorů

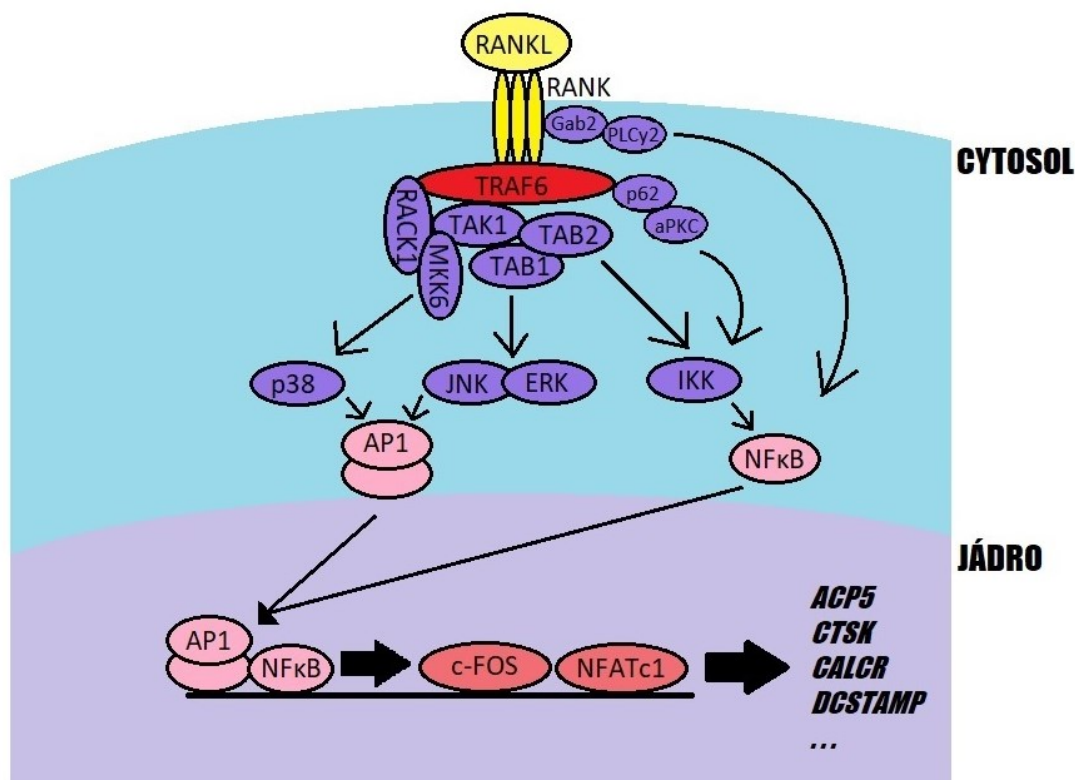
Obzvláště velká pozornost se v posledních desetiletích upírá na schopnost monocytů v periferní krvi diferencovat v osteoklasty, což je další cesta, jakou mohou funkční, kost resorbující osteoklasty vznikat.

Monocyty jsou jedním z typů cirkulujících krevních leukocytů s významnou úlohou ve vrozené imunitní odpovědi. V závislosti na konkrétním jedinci mohou představovat až 10 % všech leukocytů. Vyvíjejí se v kostní dřeni a jejich nejznámější úlohou je diferenciaci v tkáňově specifické makrofágy a dendritické buňky (Auffray et al., 2009). Na základě exprese povrchových markerů CD14 a CD16 lze dále rozlišit subpopulace monocytů, z nichž nejvíce zastoupená populace CD16<sup>-</sup> je schopná diferencovat v osteoklasty (Komano et al., 2006). Role CD14 a CD16 markerů však doposud není plně objasněna, protože bylo ukázáno, že osteoklastogenní potenciál se může týkat i snížené exprese CD14 (Kindlund et al., 2012).

Diferenciaci probíhá stejně jako u HSC po stimulaci cytokiny M-CSF a RANKL (Komano et al., 2006). Cytokin M-CSF je důležitý ve všech fázích procesu osteoklastogeneze, protože se podílí na proliferaci, diferenciaci i fúzi prekurzorů a následně pak i na ustavení resorpční aktivity (Hodge et al., 2007). RANKL se uplatňuje více v pozdějších fázích osteoklastogeneze. Jeho signální dráha je spuštěna interakcí s receptor-aktivátorem jaderného faktoru kappa B (RANK). Tato dráha zahrnuje kaskádu dějů, které vedou až k amplifikaci transkripčního faktoru NFATc1 (obr. 5), často považovaného za hlavní osteoklastogenní

signální protein, který cílí na charakteristické geny související s fúzí a aktivací osteoklastů (Park et al., 2017).

V *in vitro* kultivacích je pro správnou diferenciaci klíčová prestimulace prekurzorů s M-CSF bez současné stimulace cytokinem RANKL (Arai et al., 1999) a zároveň volba optimální koncentrace M-CSF, protože koncentrace vyšší než 25 ng/ml mohou působit inhibičně na diferenační i resorpční schopnost osteoklastů (Hodge et al., 2007).



**Obr. 5:** RANKL-RANK signalizace. *Upraveno podle Park et al. (2017)*

Po interakci ligandu RANKL s receptorem RANK dojde intracelulárně k vazbě adaptorového proteinu TRAF6. Ten aktivuje jaderný faktor NF-κB interakcí s molekulami p62 a aPKC nebo foforylací TAK1. Zároveň vznikem TAK1 komplexů TRAF6 aktivuje některé MAP kinázy, např. p38, JNK a ERK, což vede až k translokaci transkripčního faktoru AP1 do jádra. Aktivace NF-κB může být navíc TRAF6 nezávislá způsobená vazbou Gab2 a PLCy2 přímo na RANK. Transkripční faktory AP1 a NF-κB dále spouští transkripci důležitých osteoklastogenních faktorů c-FOS a NFATc1 a nakonec expresi typických genů osteoklastů.

## 1.2.2 Osteoblasty

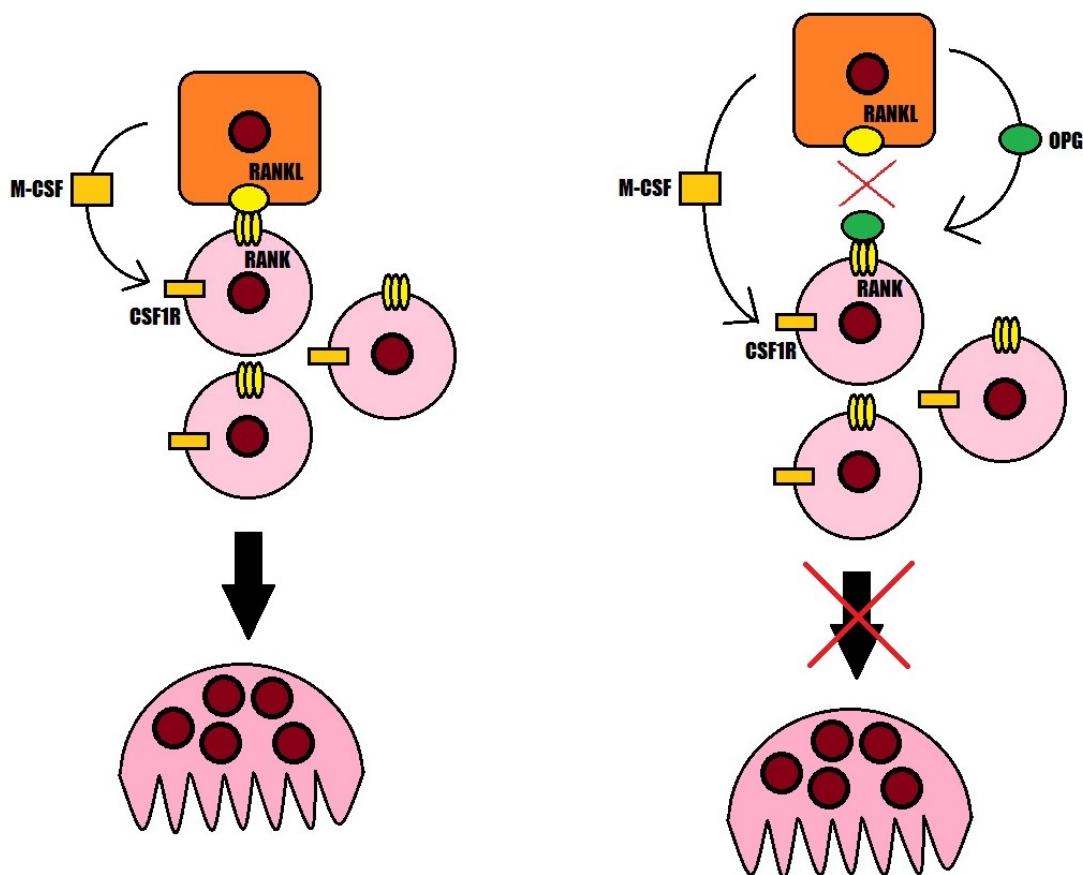
Osteoblasty jsou jednojaderné buňky, které vznikají v kostní dřeni z mezenchymálních kmenových buněk (MSC). Ty diferencují mimo jiné právě v preosteoblasty, které po maturaci produkují *de novo* kostní matrix. Osteoblasty obklopené kostní matrix následně dále mění svůj fenotyp a stávají se osteocyty. Jednotlivá stádia lze rozlišit na základě typických povrchových markerů (Robling et al., 2006).

Kultivační experimenty s osteoklasty byly po dlouhou dobu závislé na přítomnosti osteoblastů a MSC v ko-kulturách, což ukazovalo na jejich zásadní význam pro formaci osteoklastů. Zvrat nastal s pochopením, že nezbytnými faktory pro osteoklastogenezi jsou právě cytokiny M-CSF a RANKL, které jsou, ne však výhradně, těmito buňkami produkovány (Udagawa et al., 1999). Zatímco M-CSF patří mezi sekreční cytokiny (Stanley et al., 1997), RANKL je osteoblasty a MSC exprimován jako membránově vázaný protein a ke stimulaci osteoklastogeneze v kostní dřeni s jejich pomocí se tedy v *in vivo* systému předpokládá vzájemný kontakt s osteoklasty, respektive jejich prekurzory (obr. 6; Horwood et al., 1998; Singh et al., 2012).

Osteoblasty dále hrají klíčovou úlohu v řízení osteoklastogeneze skrze aktivačně-inhibiční osu RANKL-RANK-OPG a endokrinní hormonální systém. Osteoprotegerin (OPG) patří spolu s RANKLem do TNF cytokinové skupiny. *In vitro* blokuje osteoklastogenezi a *in vivo* byla prokázána jeho schopnost zvyšovat BMD (Simonet et al., 1997). Inhibice probíhá skrze interakci s RANKLem, na nějž se OPG váže a zabraňuje tak interakci RANKL-RANK a spuštění signalizační dráhy osteoklastogeneze (Yasuda et al., 1998). OPG je produkován mnoha buněčnými typy, včetně osteoblastů, kde jeho produkce podléhá regulaci cytokiny, růstovými faktory, hormony a na úrovni signálních drah Wnt/ $\beta$ -katenin a Jagged1/Notch1 (Boyce & Xing, 2008). Narušení běžného poměru RANKLu vůči OPG je pozorováno u mnoha patologií charakterizovaných ztrátou kostní tkáně (např. Grimaud et al., 2003; Bostanci et al., 2007; Pilichou et al., 2008).

Hormonální řízení osteoklastogeneze může probíhat přes již dříve zmíněný kalcitonin inhibující aktivitu osteoklastů vazbou na CALCR nebo přes estrogen způsobující časnou apoptózu osteoklastů dráhou Fas/FasL (Nakamura et al., 2007). Estrogen však může působit také přes osteoblasty posunem RANKL-OPG produkce ve prospěch OPG (Hofbauer et al.,

1999). Klíčové prostředníky nakonec představují osteoblasty například v působení kalcitriolu a parathyroidního hormonu, jejichž vlivy jsou pozorovatelné především *in vivo*, v kultivacích osteoklastů pak pouze při současné přítomnosti osteoblastů, ale ne u samotných osteoklastů (Suda et al., 1999). Novější zjištění ukazují na další dodatečné role osteoblastů v osteoklastogenezi mimo dráhu RANKL-OPG, v nichž se uplatňují IL-34, Wnt5A a semaforin 3A produkované osteoblasty (Yamashita et al., 2012).



**Obr. 6:** RANKL-RANK-OPG řízení osteoklastogeneze osteoblasty. *Autor*

Osteoblasty produkují sekreční M-CSF, který se váže na CSF1R receptor na prekurzorech osteoklastů. Současně exprimují membránově vázaný RANKL, který po kontaktu buněk interaguje s receptorem RANK na povrchu prekurzorů a spouští diferenciaci. Po signálu (např. hormonálním) produkují osteoblasty OPG, který funguje jako antagonist RANKLu a po navázání na RANK brání interakci receptoru s ligandem. Tím je zablokována osteoklastogeneze u příslušných buněčných prekurzorů.

### 1.2.3 Osteocyty

Osteocyty, jednojaderné buňky vzniklé z osteoblastů, byly relativně donedávna považovány za „hráče v pozadí“ v procesu kostní remodelace, tedy spíše za pasivní buňky. Ukazuje se však, že je jejich role dlouhodobě podceňována a že se na remodelacích *in vivo* pravděpodobně podílí významnou měrou různými procesy – od regulace metabolismu minerálů, přes mechanosenzorickou schopnost až po chemotaxi osteoklastů a podporu osteoklastogeneze (Bonewald, 2011).

Nakashima et al. (2011) provedli experimenty s populacemi osteocytů a osteoblastů, z nichž vyplynulo, že exprese *TNFSF11*, genu kódujícího RANKL, je u osteocytů desetkrát vyšší, než u osteoblastů. *In vitro* ko-kultury prekurzorů osteoklastů následně vyprodukovaly více než dvojnásobek osteoklastů, než podobné kultury s osteoblasty. V následných *in vivo* myších modelech ukázali, že specifický knock-out genu *TNFSF11* u osteocytů vede k silnému potlačení osteoklastogeneze a osteopetrotickému fenotypu myší.

Osteocyty jsou, stejně jako osteoblasty, schopné produkce M-CSF (Harris et al., 2012) a OPG (Kramer et al., 2010). V místech zvýšené apoptózy osteocytů, tedy v místech mikrodefektů kostní tkáně (mikrotrhlin, mikroprasklin) a v oblastech nedostatečného mechanického stimulu dochází k vyšší mobilizaci osteoklastů. Přesné molekulární stimuly nejsou známy, ale mezi možné kandidáty se řadí například chromatinový protein high-mobility group box 1 (HMGB1; Plotkin, 2014). Mechanicky nestimulované osteocyty produkují více RANKLu než stimulované a v jejich blízkosti dochází k vyšší mobilizaci osteoklastů (Middleton et al., 2017).

Současné poznání o roli osteocytů v remodelacích naznačuje minimálně zásadní úlohu v souvislosti s opravou mikrodefektů kosti a adaptací na mechanické stimuly. Budoucí výzkum nepochybně přinese další zajímavá zjištění, která mohou vést až ke zboření paradigmatu „všemocné“ interakce mezi osteoblasty a osteoklasty.

## 1.2.4. Další typy buněk

Kromě osteoklastů, osteoblastů a osteocytů se na remodelaci mohou podílet i další typy buněk více či méně související přímo s kostní tkání.

Osteoblasty, které se účastnily *de novo* syntézy kostní matrix, se mohou přeměnit v osteocyty, podstoupit apoptózu nebo zůstat na povrchu jako BLC, nezavzaté do kostní matrix. Tyto oploštělé buňky s odlišnými markery oproti osteoblastům a osteocytům se nachází na většině povrchu spongiózní tkáně. Současný výzkum naznačuje jejich významnou úlohu například v souvislosti s mobilizací osteoklastů na místo resorpce, aktivací osteoblastů, nebo diferenciací v osteoblasty během dospělosti (Wein, 2017).

Kostní homeostáze může být dále výrazně ovlivněna aktivací B a T-lymfocytů a produkcí zánětlivých faktorů. Tento vliv pak nepřekvapivě nabývá na významu u zánětlivých autoimunitních a infekčních onemocnění, kde mohou imunitní procesy zásadně ovlivnit podobu kosti a jedná se tak o významnou a pozornosti hodnou interakci.

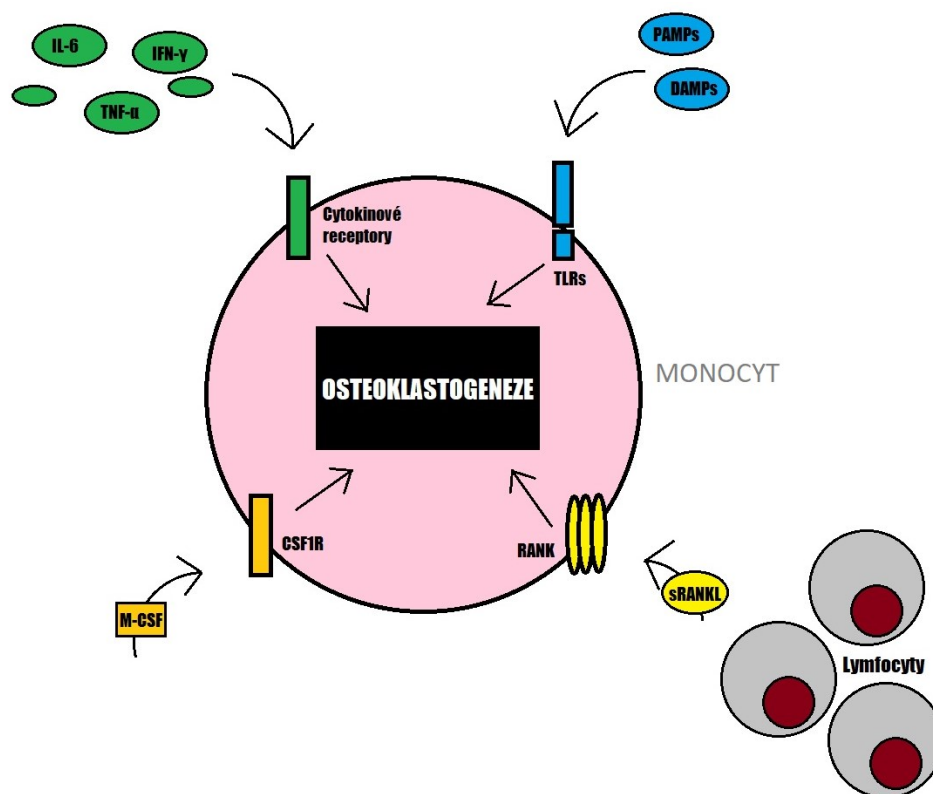
Aktivované T-lymfocyty podporují *in vitro* osteoklastogenezi (Horwood et al., 1999) a spolu s aktivovanými B-lymfocyty produkují sekreční sRANKL. Vylučování sekreční formy RANKLu je u lymfocytů umožněno aktivací metaloproteináz, které štěpí membránový RANKL (Lum et al., 1999). B-lymfocyty navíc produkují OPG a ukazuje se, že jejich význam v tomto směru může být minimálně stejně důležitý, jako u osteoblastů (Li et al., 2007).

Méně než 20 % neaktivovaných lymfocytů vytváří sRANKL oproti 50 % T-lymfocytům a 90 % B-lymfocytům aktivovaným při periodontitidě. Lymfocyty získané z gingiválních biopsií navíc podporují *in vitro* osteoklastogenezi, zatímco podobný efekt není přítomen u neaktivovaných lymfocytů izolovaných z periferní krve zdravých dárců (Kawai et al., 2006). Podobně T-lymfocyty izolované z periferní krve pacientů s RA podporují oproti lymfocytům od zdravých jedinců osteoklastogenezi z monocytů a tento jejich efekt se vytrácí po залéčení a klinickém zlepšení nemoci (Miranda-Carús et al., 2006). Jedním z vysvětlení role lymfocytů v osteoklastogenezi může být jejich produkce zánětlivých cytokinů, které mohou působit synergisticky spolu s RANKLem (Gillespie, 2007).

Ovlivnění osteoklastogeneze aktivací imunitního systému a vznikem zánětu může představovat značný problém především s ohledem na chronická autoimunitní onemocnění charakteristická dlouhodobým systémovým zánětem.

### 1.3. Zánětlivé faktory v osteoklastogenezi

Monocyty schopné diferencovat v osteoklasty jsou v cirkulaci ovlivňovány řadou zánětlivých faktorů, které rozpoznávají svými receptory. Tyto zánětlivé faktory, například cytokiny, molekuly asociované s neinfekčním zánětem (DAMP) a molekuly asociované s infekčním zánětem (PAMP), mohou následně vstupovat do procesu osteoklastogeneze (obr. 7).



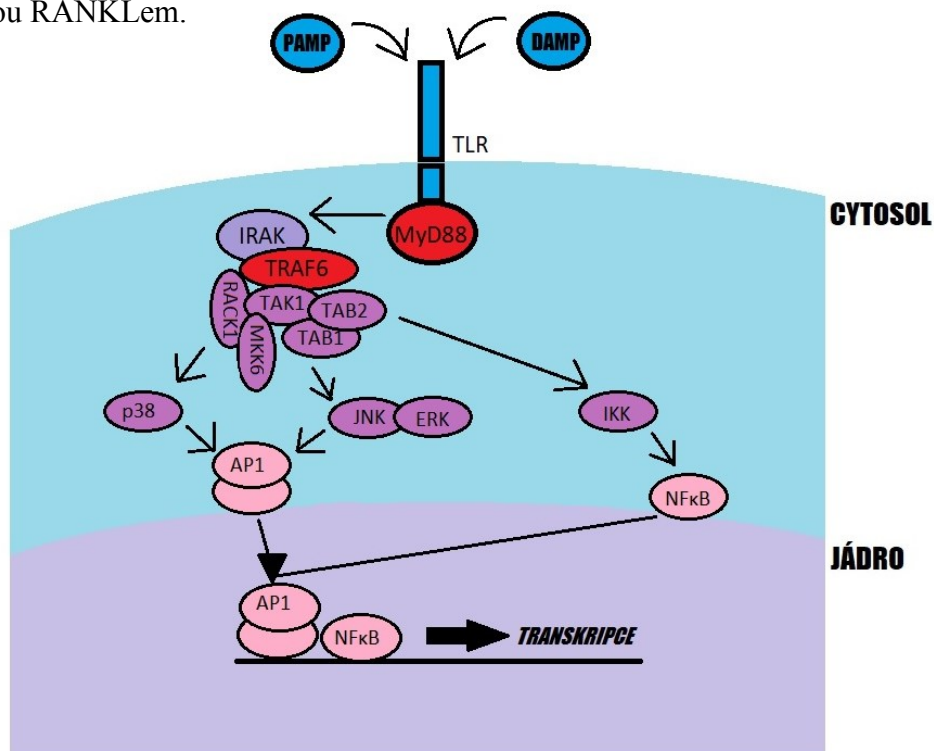
**Obr. 7:** Působení zánětlivých faktorů na cirkulující monocyty. *Autor*

Narušení kostní homeostáze u infekčních onemocnění je mimo jiné způsobeno LPS, jedním z hlavních PAMP, který je složkou stěny gram-negativních bakterií. Po indukci prekurzorů LPS dochází k tvorbě vyššího počtu osteoklastů (Mörmann et al., 2008; Hou et al., 2013).

DAMP jsou široká skupina molekul endogenního původu, jejichž zvýšený obsah v krvi je odrazem zánětu, respektive poškození organismu. Od tohoto funkčního významu se

odvíjí také jejich nejznámější názvy „damage-associated“ či „danger-associated“, tedy spojené s poškozením a nebezpečím. Patří mezi ně například volné nukleové kyseliny, komplexy proteinů a nukleových kyselin, HMGB1 a heat-shock proteiny. Spolu s PAMP jsou rozpoznávány skrze toll-like receptory (TLR) a hrají za normálních okolností důležitou úlohu v hostitelské odpovědi na poškození související s patogeny. K chronicky zvýšené aktivaci TLR přes DAMP však dochází u mnoha systémových zánětlivých onemocnění, která jsou spojena s vysokým rizikem rozvoje osteoporózy (Piccinini & Midwood, 2010).

Signální dráha spuštěná aktivací TLR je buď nezávislá na MyD88, vedoucí k produkci interferon regulujících faktorů a interferonů, nebo na MyD88 závislá, která se spouští u všech TLR s výjimkou TLR3 a vede až k aktivaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B (obr. 8; Piccinini & Midwood, 2010). Aktivace této dráhy naznačuje možnou spojitost pro diferenciaci osteoklastů z jejich prekurzorů v krvi, protože se jedná o významnou dráhu osteoklastogeneze, běžně aktivovanou RANKLem.



**Obr. 8:** MyD88 závislá signalizace přes toll-like receptory. *Upraveno podle Li et al. (2012)*

Interakce PAMP nebo DAMP s příslušným toll-like receptorem vede k vazbě adaptorového proteinu MyD88, který signalizuje skrze kinázu IRAK a následně probíhá další signalizace podobně jako u RANKL-RANK interakce. Za běžných okolností je hlavním úkolem aktivace NF- $\kappa$ B skrze toll-like receptory produkce zánětlivých cytokinů u kompetentních buněk.

U systémových zánětlivých onemocnění dále dochází k dlouhodobé nadprodukcii zánětlivých cytokinů, např. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-7, IL-17 a IFN- $\gamma$ , jejichž význam pro riziko osteoporózy s ohledem na prekuzory osteoklastů je obecně přijímán u onemocnění jako RA, SLE, ankylozující spondylitída a Crohnova choroba (Amarasekara et al., 2015).

### 1.3.1. Role cirkulující DNA

Imunitní buňky v krevním oběhu přichází do styku s volnými (mimobuněčnými) cirkulujícími nukleovými kyselinami širokého původu, exogenního i endogenního. Převážnou část volné cirkulující DNA (cfDNA) představuje tělu vlastní „self-DNA“ pocházející z mrtvých i živých buněk organismu. Historicky byl za hlavní zdroj cfDNA považován zánik buněk a s ním související uvolnění nukleových kyselin. V současnosti je však čím dál více brán na vědomí také mechanismus aktivního uvolňování DNA z buněk, především v souvislosti s netózou. O roli a funkci cfDNA podle jejího původu a zdroje probíhá nadále intenzivní debata a možná zjištění a závěry v tomto odvětví výzkumu jsou předmětem a zároveň výzvou následujících let, která bude vyžadovat zlepšení a sjednocení metodiky (Aucamp et al., 2018).

Receptorem pro cfDNA je TLR9, který je vysoce aktivován například nemetylovanou DNA nebo CpG oligodeoxynukleotidy. Tento proces je významnou součástí obrany před infekčními onemocněními, protože vede k produkci prozánětlivých cytokinů, spuštění Th1 imunitní odpovědi a proliferaci B-lymfocytů (Kumagai et al., 2008). Aktivace TLR9 však pravděpodobně zaujímá významnou úlohu i u mnoha autoimunitních onemocnění. Blokace TLR9 nebo jeho aktivační dráhy vede ke zlepšení symptomů u myších modelů např. pro SLE (Barrat et al., 2007), RA (Herman et al., 2011) a roztroušenou sklerózu (Prinz et al., 2006). Objevují se i poznatky o protektivních účincích stimulace TLR9 (Fallarino et al., 2009).

Bylo prokázáno, že u pacientů s autoimunitními zánětlivými chorobami dochází ke kvantitativním a kvalitativním změnám cfDNA. Vyšší hladiny cfDNA oproti zdravým

kontrolám byly z chorob charakterizovaných zvýšeným rizikem rozvoje osteoporózy naměřeny např. u SLE (Tug et al., 2014) a RA (Rykova et al., 2017). Navíc se u této cfDNA zvyšuje zastoupení sekvencí bohatých na GC páry (Veiko et al., 2006). U buněk stimulovaných cfDNA od pacientů s RA, která obsahuje vysoký počet GC párů, se následně také výrazně zvyšuje exprese TLR9 a faktorů NF- $\kappa$ B dráhy (Kostjuk et al., 2012).

Není doposud známo, zda může u autoimunitních onemocnění být jednou z příčin nadměrné tvorby osteoklastů zvýšená aktivace NF- $\kappa$ B skrze interakci TLR9 se „zánětlivou“ cfDNA, nebo půjde o jiný mechanismus týkající se cfDNA. Toto zjištění by mohlo přispět k objasnění některých principů vzniku a etiologie osteoporózy a také přidat nové poznatky k diskuzi o funkcích cfDNA v organismu.

## 1.3.2. Role hlavních prozánětlivých cytokinů

### 1.3.2.1. TNF- $\alpha$

Faktor nádorové nekrózy alfa (TNF- $\alpha$ ) je cytokin patřící, stejně jako RANKL, do cytokinové TNF superrodiny. Je to silný zánětlivý faktor produkovaný především makrofágy, monocyty, natural killer (NK) buňkami a aktivovanými lymfocyty. Je exprimován na membránách a uvolňován v rozpustné formě po štěpení příslušnými metaloproteinázami. K rozpoznávání na cílových buňkách slouží receptor faktoru nádorové nekrózy 1 (TNFR1) a receptor faktoru nádorové nekrózy 2 (TNFR2). Signalizace přes tyto receptory spouští dráhy vedoucí k proliferaci, migraci, apoptóze a zánětlivé odpovědi. Většina signalizací často končí právě zánětlivou odpovědí, jejímž zprostředkovatelem je NF- $\kappa$ B (Sedger & Mcdermott, 2014).

Význam TNF- $\alpha$  v osteoklastogenezi podporují mnohé modelové případy TNFR deficientních myší nebo užití inhibitorů TNF- $\alpha$ , kdy dochází k potlačení pozorovaných efektů tohoto cytokinu (Roggia et al., 2001; Zhang et al., 2001; Redlich et al., 2004).

Působení TNF- $\alpha$  v osteoklastogenezi může být dvojího druhu, přímé i nepřímé. U chronických zánětů a estrogenové deficiencie dochází vlivem TNF- $\alpha$  ke zvýšené aktivitě a produkci lymfocytů (Takemura et al., 2001; Roggia et al., 2001), které jsou významným zdrojem RANKLu v cirkulaci. TNF- $\alpha$  navíc také přímo podporuje produkci RANKLu u MSC

(Abu-Amer et al., 2004). Přímá interakce se týká působení na prekurzory osteoklastů, kde signální dráha spuštěná vazbou TNF- $\alpha$  a TNFR1 působí synergisticky s dráhou spuštěnou interakcí RANKL-RANK (Zhang et al., 2001). Rozpor panuje v otázce, zda je tato synergie závislá nebo nezávislá na RANKLu. Podle Azumy et al. (2000) jsou některé prekurzory osteoklastů schopné diferenciaci v přítomnosti M-CSF a TNF- $\alpha$  bez současné přítomnosti RANKLu, přičemž tato schopnost je asi poloviční oproti té zprostředkované RANKLem. Podobně popsali RANKL nezávislou schopnost diferenciaci osteoklastů např. Kobayashi et al. (2000), v jejichž studii efekt TNF- $\alpha$  dokonce mírně předčil efekt RANKLu. Naopak podle Redlicha et al. (2002) zcela vymizí účinek TNF- $\alpha$  na osteoklastogenezi při deficienci faktorů RANKL-RANK dráhy.

### 1.3.2.2. IL-6

Interleukin 6 (IL-6) je členem relativně úzké cytokinové interleukinové skupiny 6, jehož výskyt je pro záněty velmi specifický. Je mimo imunitní buňky uvolňován v mnoha dalších typech buněk v místech poškození nebo infekce od prvotních fází zánětu a jeho výskyt v cirkulaci spouští produkci některých faktorů akutní fáze, jako například C-reaktivního proteinu. Následně podporuje rozvoj chronického zánětu diferenciací naivních T-lymfocytů v cytotoxické T-lymfocyty a Th17 lymfocyty. Rozpoznáván je IL-6 receptorem (IL6R), jehož aktivace způsobí homodimerizaci proteinu gp130 a spuštění signální dráhy JAK/STAT3 a MAP kinázové dráhy (Tanaka et al., 2014).

Zvýšené hladiny IL-6 nebo zvýšená exprese IL6R jsou nalézány v séru pacientů s chronickými zánětlivými chorobami (např. Cohick et al., 1994; Mitsuyama et al., 1995; Ripley et al., 2005). Vliv na narušení kostní homeostáze může probíhat opět přímo i nepřímo. Do nepřímého působení se, podobně jako u TNF- $\alpha$ , řadí aktivace lymfocytů. Jiným mechanismem může být působení na osteoblasty, kde stimuluje produkci RANKLu (O'Brien et al., 1999), ale také brání v maturaci osteoblastů (Peruzzi et al., 2012).

Přímé působení na diferenciaci samotných osteoklastů je u IL-6 předmětem kontroverze. Podle Kudy et al. (2003) podporuje IL-6 osteoklastogenezi RANKL nezávislým mechanismem, protože pozitivní efekt v jejich experimentu zůstal zachován i po přidání OPG do kultur, ale vytratil se po přidání antagonisty gp130. Osteoklasty získané kultivací s IL-6

bez RANKLu byly nicméně menší, obsahovaly méně jader a měly menší resorpční schopnost. Podle Yoshitakeho et al. (2008) naopak IL-6 přímo snižuje osteoklastogenezi u prekurzorů osteoklastů inhibicí faktorů NF- $\kappa$ B dráhy. K podobnému závěru dospěli souběžně Duplomb et al. (2008), kteří dodávají, že stimulace prekurzorů cytokinem IL-6 podporuje k diferenciaci spíše směrem k makrofágovému fenotypu než osteoklastům.

### 1.3.2.3. IFN- $\gamma$

Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) se řadí do interferonové skupiny cytokinů, kde je však jediným zástupcem druhé třídy interferonů a od ostatních se liší svou konformací, receptorem i chromozómovým lokusem. Je významným spouštěčem imunitní odpovědi a obrany proti patogenům, ovlivňuje buněčnou proliferaci, migraci a apoptózu. Produkují jej lymfocyty, NK buňky i antigen prezentující (APC) buňky. K rozpoznávání slouží receptor pro interferon gama (IFNGR), jehož stavba je druhově specifická. U člověka je pro jeho aktivitu nezbytný vznik heterodimerické struktury z řetězců IFNGR1 a IFNGR2, přičemž druhý zmíněný je vytvářen v deficitu a slouží jako regulační faktor aktivace. Po navázání IFN- $\gamma$  na aktivní receptor se spouští JAK/STAT dráha a exprese interferonem indukovaných genů (Schroder et al., 2004).

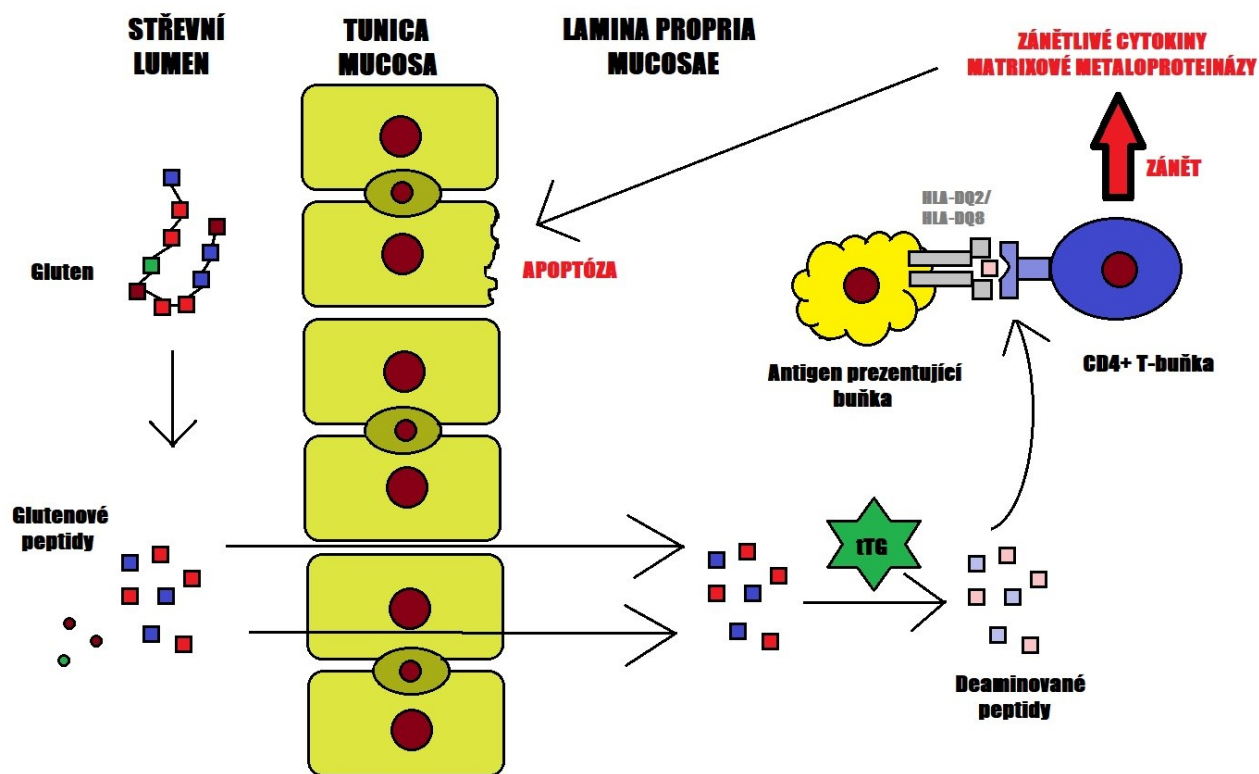
Celkový účinek IFN- $\gamma$  může mít prozánětlivý i protizánětlivý charakter, kdy na jedné straně aktivuje imunitní systém, na druhé straně může tlumit účinky ostatních cytokinů, spouštět produkci protizánětlivých antagonistů a indukovat apoptózu aktivovaných leukocytů (Mühl & Pfeilschifter, 2003).

Role IFN- $\gamma$  v kostních remodelacích se zdá být rovněž dvojitá a není doposud dořešena. Osteoklasty na své buněčné membráně exprimují IFNGR a v reakci na vazbu IFN- $\gamma$  se u nich zvyšuje produkce superoxidů, což by mohlo napomáhat časné apoptóze (Yang et al., 2002). U HSC stimulovaných IFN- $\gamma$  dochází k inhibici NF- $\kappa$ B dráhy skrze regulaci exprese adaptorového proteinu TRAF6. Deficience IFNGR je u myši navíc spojená se zvýšenou osteoklastogenezí a resorpcí kostní tkáně (Takayanagi et al., 2000). Inhibiční schopnost vykazuje IFN- $\gamma$  také u TNF- $\alpha$  indukované osteoklastogeneze (Kohara et al., 2011). Na druhou stranu ale bylo v jiné studii zjištěno, že IFN- $\gamma$  podporuje fúzi preosteoklastů v mnohojaderné osteoklasty a zvyšuje jejich resorpční schopnost indukcí faktorů NFATc1 a c-Fos a faktoru

DC-STAMP souvisejícího právě s fúzí (Kim et al., 2012). Podpora osteoklastogeneze interferonem gama může navíc probíhat nepřímo aktivací lymfocytů a s ní související produkcí osteoklastogenních faktorů (Gao et al., 2007).

## 1.4. Celiakie, zánět a osteoporóza

Celiakie je autoimunitní enteropatické onemocnění charakterizované ztrátou tolerance k lepku (glutenu), jehož příjem v potravě vede u postižených jedinců k rozpadu střevní sliznice a vzniku zánětu aktivací buněk imunitního systému. Jediným účinným známým způsobem léčby celiakie je striktní celoživotní dodržování bezlepkové diety. Jakožto lepek je označována široká skupina proteinů, souhrnně gliadiny a gluteniny, které jsou součástí zásobních proteinů v endospermu zrn některých obilovin (v běžné potravě je hlavním zdrojem pšenice) a vyznačují se vysokým obsahem aminokyselin prolinu a glutaminu. Díky nim není přijímaný lepek zcela naštěpen a ve formě větších fragmentů může para-buněčnou i trans-buněčnou cestou pronikat skrze epitelální střevní bariéru do *lamina propria mucosae*. Zde je tkáňovou transglutaminázou (tTG) deaminován a získává záporný náboj, což souvisí s další patogenezí. Hlavní riziko vzniku celiakie se totiž týká nositelů *HLA-DQ2* a *HLA-DQ8* alel genů hlavního histokompatibilního systému, kteří mají na povrchu svých antigen prezentujících buněk v *lamina propria mucosae* receptory HLA-DQ2 nebo HLA-DQ8, jež jsou vysoce afinitní právě pro záporně nabitě deaminované glutenové peptidy. Ty jsou takto navázané následně prezentovány CD4<sup>+</sup> T-lymfocytům, které se aktivují a spouští autoimunitní reakci zahrnující produkci zánětlivých cytokinů a s ní související apoptózu buněk střevní sliznice (obr. 9; Ciccocioppo et al., 2005; Kagnoff, 2007).

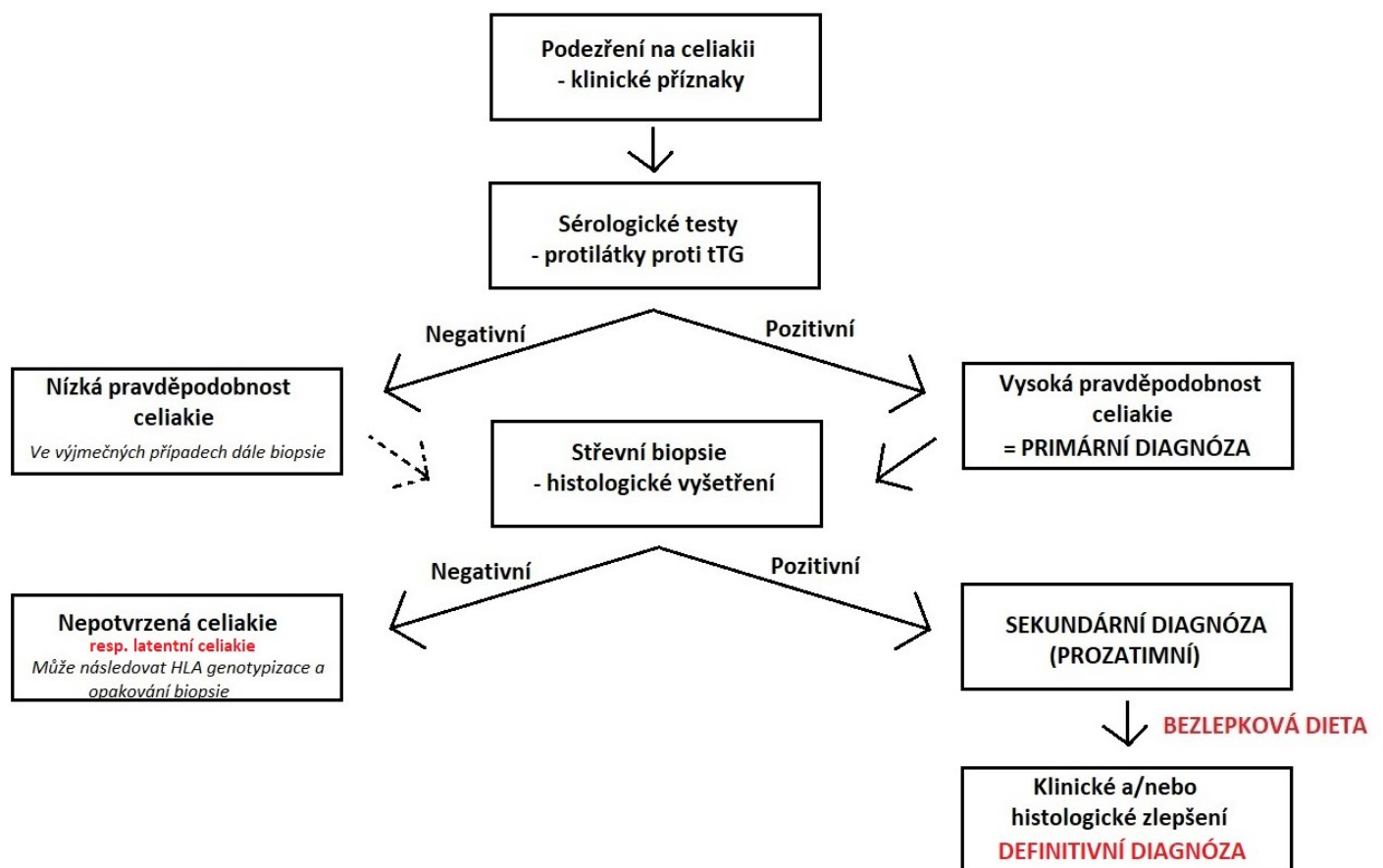


**Obr. 9:** Vznik zánětu u celiakie. *Upraveno podle Kagnoff (2007)*

Až 95 % lidí s diagnostikovanou celiakií jsou nositelé alely *HLA-DQ2*. Zároveň ale jen 3 % nositelů této alely rozvinou v průběhu života celiakii, ačkoliv celkové zastoupení *HLA-DQ2* v populaci je vyšší než 30% (Wolters & Wijmenga, 2008). Průměrná prevalence v Evropě založená na kompletní diagnóze se uvádí kolem 1 % (Mustalahti et al., 2010). Vznik onemocnění je mimo *HLA-DQ* systém pod vlivem dalších genetických a environmentálních faktorů. S ohledem na genetické predispozice jsou vytipovány další lokusy a geny, například lokus 2q33 zahrnující T-lymfocytární regulační geny a dále kandidátní geny jako *MYO9B* a *CTLA4* (Wolters & Wijmenga, 2008). Environmentální vlivy jsou chápány jako dodatečné

spouštěče patogeneze a jsou jimi například prodělané gastrointestinální infekce (Stene et al., 2006) nebo doba prvního podání lepku v potravě u novorozence (Norris et al., 2005).

Diagnostika celiakie je v současné době založena na kritériích stanovených Evropskou společností pro dětskou gastroenterologii, hepatologii a výživu (ESPGHAN) a Severoamerickou společností pro dětskou gastroenterologii, hepatologii a výživu (NASPGHAN) a zahrnuje primární diagnózu na základě klasických klinických symptomů (např. chronický průjem, nadýmavost, celková slabost, u dětí navíc poruchy růstu a pozdní nástup puberty) a protilátek v séru, a u dospělých dále potvrzující diagnózu dle střevní biopsie. Potvrzená celiakie je stanovena až na základě zlepšení symptomů po zavedení bezlepkové diety (obr. 10; Briani et al., 2008). Pozitivní diagnóza střevní biopsií spočívá v histologickém vyšetření míry atrofie klků střevní sliznice od normálního stavu až po úplnou atrofii (Marsh, 1992). Primární diagnóza ze séra se zakládá na měření zvýšených IgA a IgG protilátek proti tTG a vykazuje vysokou senzitivitu a specifitu (Troncone et al., 1999).



**Obr. 10:** Současná diagnostika celiakie. *Upraveno podle Briani et al. (2008)*

I přes zlepšování záchytu pacientů s celiakií zůstává v současnosti velké množství případů celiakie nezachycené. Pozornost je třeba věnovat i latentní celiakii, která je charakterizována pozitivním sérologickým nálezem bez současného aktuálního histologického nálezu (Choung et al., 2017).

Jedním z častých doprovodných onemocnění plně diagnostikované i latentní celiakie je osteoporóza, jejíž nález často předchází právě následné diagnóze celiakie. U lidí trpících osteoporózou je celiakie diagnostikována až 17× častěji než u zdravých kontrol bez osteoporózy (Stenson et al., 2005). Až 75 % pacientů s celiakií vykazuje snížené hodnoty BMD (Meyer et al., 2001) a četnost zlomenin je u nich oproti zdravým lidem až dvakrát vyšší (Heikkilä et al., 2015). Stále více se tedy ukazuje, že je nutné osteoporózu pokládat za jeden z typických projevů celiakie a pomýšlet na její prevenci.

Historicky je za hlavní příčinu zvýšeného rizika osteoporózy v celiakii považována malabsorpce způsobená rozpadem střevní sliznice a následná deficiencie vápníku, případně dalších nutričních faktorů jako například vitamínu D (Scott et al., 2000). V periferní krvi pacientů s celiakií však zároveň dochází k výraznému zvýšení hladin zánětlivých cytokinů (např. Cataldo et al., 2003; Taranta et al., 2004; Manavalan et al., 2010). Rozpad střevní sliznice naznačuje také možnost, že by v cirkulaci mohlo docházet rovněž ke změnám v obsahu cfDNA. Navíc se ukazuje, že ani po zavedení bezlepkové diety nedochází u pacientů s celiakií k úplné normalizaci BMD, a je tedy pravděpodobné, že existují příčiny zvýšeného rizika osteoporózy v celiakii, které nesouvisí přímo s malabsorpcí (Fouda et al., 2012).

Průkopnická práce Taranty et al. (2004) ukázala, že v přítomnosti séra pacientů s celiakií se mnohonásobně zvyšuje osteoklastogeneze oproti kultivaci v séru zdravých jedinců. Role diferenciací osteoklastů z periferních prekurzorů v rozvoji osteoporózy u celiakie však není dodnes plně pochopena a doplnění chybějících informací by mohlo v budoucnu výrazně rozšířit možnosti prevence a vést i k lepšímu pochopení etiopatogeneze samotné osteoporózy.

## 2. Cíle práce

V tomto výzkumu jsme se zaměřili na to, jak zánětlivé prostředí ovlivňuje diferenciaci osteoklastů vznikajících z jejich cirkulujících periferních prekurzorů. Objasnění efektů zánětu v tomto procesu by mohlo vést k lepšímu pochopení zvýšeného rizika osteoporózy u námi studovaného modelu celiakie, ale i u ostatních zánětlivých chorob. S ohledem na současné znalosti jsme vytyčili následující cíle:

- Potvrdit stimulační efekt séra pacientů s celiakií na diferenciaci monocytů v osteoklasty a přispět k objasnění, do jaké míry jsou v rámci séra za tento efekt zodpovědné prozánětlivé cytokiny TNF- $\alpha$ , IL-6 a IFN- $\gamma$ .
- Ověřit obecně doposud nedořešené účinky cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-6 a IFN- $\gamma$  na diferenciaci monocytů v osteoklasty.
- Ověřit možnost, že cfDNA ovlivňuje diferenciaci monocytů v osteoklasty.

Dle informací z dostupné literatury jsme předpokládali:

- Že hladiny prozánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-6 a IFN- $\gamma$  jsou v séru pacientů s celiakií zvýšené.
- Že tyto cytokiny jsou hlavním faktorem séra zodpovědným za vyšší diferenciaci monocytů v osteoklasty.

Dále jsme formulovali tyto hypotézy:

- U pacientů s celiakií jsou zvýšené hladiny cfDNA v krvi.
- cfDNA ovlivňuje diferenciaci monocytů v osteoklasty.

## 3. Materiál a metody

### 3.1. Dárci biologického materiálu

V rámci této studie byla získávána krev pro zpracování séra a/nebo plasmy od nově diagnostikovaných pacientů s celiakií (CS/CP), pacientů s celiakií na bezlepkové dietě (GFS/GFP) a zdravých kontrol (HS/HP). Mononukleární buňky pro kultivace a diferenciaci osteoklastů byly izolovány z krve zdravých dárců (FM).

Zařazování nově diagnostikovaných pacientů s celiakií probíhalo ve spolupráci s Fakultní nemocnicí Královské Vinohrady a Všeobecnou fakultní nemocnicí v Praze (VFN). V době odběru byli pacienti diagnostikováni na základě zvýšených protilátek v séru nebo střevní biopsie. Pro jejich konečné zařazení do studie bylo vyžadováno finální potvrzení diagnózy celiakie a zároveň vyloučení přítomnosti jiných závažných chorob.

Pacienti s celiakií na bezlepkové dietě byli vybíráni ve spolupráci s VFN tak, aby odpovídali nově diagnostikovaným pacientům pohlavím a věkem. Maximální rozdíl mezi odpovídajícími si dárci byl čtyři roky, a to pouze v jednom případě. V době odběru dodržovali pacienti striktní bezlepkovou dietu po dobu nejméně jednoho roku.

Podobně probíhal i výběr zdravých kontrol, které odpovídaly skupině nově diagnostikovaných pacientů pohlavím a věkem. V jednom případě činil věkový rozdíl 3 roky, u všech ostatních 0 nebo 1 rok. Za zdravého dárce byl jedinec považován, pokud splňoval následující kritéria:

- Bez autoimunitního onemocnění
- Bez infekčního onemocnění po dobu nejméně 14 dní
- Bez obezity (dle indexu tělesné hmotnosti)

Všichni dárci (zdravé kontroly i pacienti) byli před odběrem seznámeni se studií, požádáni o podepsání informovaného souhlasu se zařazením do studie a zároveň také o vyplnění dotazníku, jehož cílem bylo vyloučit možný subklinický zánět.

Po odfiltrování pacientů a zdravých kontrol nesplňujících kritéria bylo do studie nakonec zařazeno 12 nově diagnostikovaných pacientů s celiakií, 13 odpovídajících zdravých kontrol a 7 odpovídajících pacientů s celiakií na bezlepkové dietě (tab. 1).

Některé ze vzorků byly součástí banky vzorků naší laboratoře již před započítáním této studie, ale jednalo se pouze o plazmu. Do analýzy cytokinů, která byla prováděna ze séra, tedy nebyli zahrnuti všichni nově diagnostikovaní pacienti s celiakií a zdravé kontroly. Jeden z nově diagnostikovaných pacientů s celiakií měl dvě odpovídající zdravé kontroly (druhá byla dodatečně získána kvůli séru).

**Tab. 1:** Celkové počty dárců séra/plazmy zařazených do studie

<b>Dárci</b>	<b>Počet</b>	<b>Věkový průměr (v letech)</b>	<b>Rozptyl (v letech)</b>
<b>CS/CP</b>	12	36,1	19 – 53
<b>GFS/GFP</b>	7	38	23 – 54
<b>HS/HP</b>	13	36,6	20 – 56

Do cytokinové analýzy bylo finálně zahrnuto 7 nově diagnostikovaných pacientů, 7 pacientů na bezlepkové dietě a 7 zdravých kontrol odpovídajících si pohlavím a věkem (tab. 2). Sérum těchto jedinců bylo používáno při kultivacích (studované sérum). Analýza cfDNA byla provedena z plazmy 10 nově diagnostikovaných pacientů a 10 zdravých kontrol odpovídajících si pohlavím a věkem (tab. 3). Oba soubory se částečně překrývaly.

**Tab. 2:** Soubor dárců séra pro cytokinovou analýzu a kultivace

<b>Dárci</b>	<b>Počet</b>	<b>Věkový průměr (v letech)</b>	<b>Rozptyl (v letech)</b>
<b>CS</b>	7	37,7	19 – 53
<b>GFS</b>	7	38	23 – 54
<b>HS</b>	7	38,6	20 – 56

**Tab. 3:** Soubor dárců plazmy pro analýzu cfDNA

<b>Dárci</b>	<b>Počet</b>	<b>Věkový průměr (v letech)</b>	<b>Rozptyl (v letech)</b>
<b>CP</b>	10	36,6	21 – 53
<b>HP</b>	10	36,9	21 – 56

Zdraví dárci mononukleárních buněk byli, stejně jako dárci plazmy a séra, před odběrem požádáni o vyplnění dotazníku a podepsání informovaného souhlasu. Požadavky pro výběr jedinců do skupiny FM byly rozšířeny s cílem vyloučit možné probíhající dysbalance v remodelačních procesech s ohledem na přirozené (nedosažení PBM a s tím související vyšší novotvorba kosti nebo dysbalance vlivem menopauzy) i nepřirozené změny (osteoporóza a vyšší resorpce). Kritéria tedy byla následující:

- Bez autoimunitního onemocnění
- Bez infekčního onemocnění po dobu nejméně 14 dní
- Bez obezity (dle indexu tělesné hmotnosti)
- Bez diagnózy nebo podezření na osteoporózu
- Věkové rozmezí 27 – 50 let (ženy nezařazeny v případě přítomnosti menopauzy)

Celkový počet jedinců v souboru FM byl 25 (tab. 4), přičemž proběhlo celkem 29 kultivací a diferenciací monocytů v osteoklasty. Někteří z dárců byli zařazeni opakovaně, vždy ale pro odlišný typ experimentu. Hlavní výsledky studie byly získány z 15 kultivačních experimentů, 14 experimentů mělo charakter optimalizací, z nichž některé jsou popsány dále v metodách.

**Tab. 4:** Celkový počet dárců mononukleárních buněk zařazených do studie

<b>Dárci</b>	<b>Počet</b>	<b>Věkový průměr (v letech)</b>	<b>Rozptyl (v letech)</b>
<b>FM</b>	25	32,7	27 – 47

### 3.2. Separace plazmy a séra z plné krve

Krev pro zpracování plazmy a séra byla odebírána do VACUETTE® Blood Collection Tubes: Pro odběr séra byly používány 9 ml zkumavky VACUETTE® Z Serum Sep Clot Activator Tubes a pro odběr plazmy 9 ml zkumavky VACUETTE® EDTA Tubes s protisrážlivým činidlem K3EDTA. Separační postup byl následující:

1. Zkumavky se sérem byly před stáčením ponechány odstát po dobu nejméně 30 minut. Krev z odebraných zkumavek jsme stočili na 1800 rpm při 4 °C po dobu 10 minut.
2. Sérum nebo plazmu jsme odebrali do 1,7 ml mikrozkuvek a stočili na 14000 rpm při pokojové teplotě (RT) po dobu 5 minut pro odstranění veškerých buněčných zbytků.
3. Stočené sérum nebo plasmu jsme odebrali do čistých 1,7 ml mikrozkuvek. Alikvóty odebírané po 500 µl nebo 1 ml jsme ihned zamrazili a pro další užití uchovávali při -80 °C.

### 3.3. Analýza obsahu cytokinů ve vzorcích

Obsah cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-6 a IFN- $\gamma$  v séru jsme změřili multiplexovou cytokinovou analýzou na přístroji Bio-Plex® 200 System (Bio-Rad). Použity byly reagenty Bio-Plex Pro™ Reagent Kit III with Flat Bottom Plate, Bio-Plex Pro™ Human Chemokine IL-6 Set, Bio-Plex Pro™ Human Chemokine TNF- $\alpha$  Set, Bio-Plex Pro™ Human Chemokine IFN- $\gamma$  Set a Bio-Plex Pro™ Human Chemokines Standard (vše Bio-Rad).

Analýza všech vzorků probíhala v dupletech a vzorky nebyly ředěny. Byla připravena řada 10 standardů a blank (taktéž v dupletech). U jednoho ze vzorků byly analyzovány čtyři různé alikvóty pro vyloučení možnosti, že jsou případné rozdíly mezi vzorky způsobené rozdíly mezi jednotlivými alikvótami.

Postup:

#### **Příprava standardu:**

1. Standard jsme 3 × naředili s pomocí standard diluent, jemně vortexovali a inkubovali na ledu po dobu 30 minut.
2. Připravili jsme příslušný počet zkumavek pro standardy (S1 – S10) a blank. Do S1 jsme přidali 200  $\mu$ l standardu, do S2 – S10 a blanku 150  $\mu$ l standard diluent.
3. Z S1 jsme přepipetovali 50  $\mu$ l do S2, dále z S2 do S3 a stejným postupem až do S10. Každou ze směsí jsme před odebráním 50  $\mu$ l krátce vortexovali.

#### **Příprava vzorků:**

4. Vzorky studovaného séra jsme centrifugovali na 14000 rpm při 8 °C po dobu 10 minut a přepipetovali do čistých 1,7 ml mikrozkuvek.

#### **Příprava magnetických kuliček:**

5. Magnetické kuličky jsme vortexovali na střední rychlost (Vortex-Genie 2, Scientific Industries) po dobu 30 vteřin.
6. Do 15 ml zkumavky jsme odebrali 575  $\mu$ l kuliček pro každý z cytokinů a doplnili do objemu 5750  $\mu$ l pomocí assay buffer (výsledné ředění kuliček bylo 1:10).

#### **Příprava destičky:**

7. Naředěné magnetické kuličky jsme vortexovali na střední rychlost po dobu 30 vteřin. Následně jsme do každé jamky na 96-jamkové destičce pro Bio-Plex napipetovali 50  $\mu$ l zvortexované směsi kuliček.
8. Destičku jsme položili na magnet, přidali 100  $\mu$ l wash buffer do každé jamky a po oplachu jsme jej odstranili. Tento krok jsme znova zopakovali.
9. Standardy, blank a vzorky jsme jemně vortexovali a rozpipetovali po 50  $\mu$ l do příslušných jamek na destičce.
10. Destičku jsme překryli fólií a alobalem a inkubovali na třepačce při 850 rpm po dobu 30 minut při RT.
11. Během inkubace vzorků jsme si připravili protilátky. Každou z protilátek jsme krátce vortexovali na střední rychlost. Do 15 ml zkumavky jsme odebrali 300  $\mu$ l protilátky pro každý z cytokinů a pomocí antibody diluent doplnili na objem 3000  $\mu$ l (výsledné ředění protilátky bylo 1:10).
12. Po inkubaci vzorků jsme odstranili krycí fólii a destičku 3  $\times$  promyli (podobně jako v kroku 8).
13. Naředěné protilátky jsme jemně vortexovali a do každé jamky přidali 25  $\mu$ l.
14. Destičku jsme překryli novou fólií a alobalem a inkubovali na třepačce při 850 rpm po dobu 30 minut.
15. Během inkubace jsme připravili směs Streptavidinu-fykoerytrinu (PE). V 15 ml zkumavce jsme smíchali 5940  $\mu$ l assay buffer s 60  $\mu$ l PE (výsledné ředění PE bylo 1:100).
16. Z destičky jsme po inkubaci opět odstranili fólii a 3  $\times$  promyli.
17. Naředěný PE jsme jemně vortexovali a do každé jamky přidali 50  $\mu$ l.
18. Destičku jsme překryli novou fólií a alobalem a inkubovali na třepačce při 850 rpm po dobu 10 minut.
19. Opět jsme odstranili fólii a 3  $\times$  promyli.
20. Na závěr jsme do každé jamky přidali 125  $\mu$ l assay buffer, obsah jsme resuspendovali protřepáním na 30 vteřin a připravenou destičku vložili do přístroje Bio-Plex® 200 System.

V přístroji jsme použili nastavení low PMT, které je obecně doporučováno pro očekávané nízké koncentrace. Získaná data jsme následně vyhodnotili.

### 3.4. Analýza obsahu cfDNA ve vzorcích

Izolace a analýza cfDNA z plazmy byla provedena na spolupracujícím pracovišti na Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK dle protokolu popsaného v Zinkova et al. (2017).

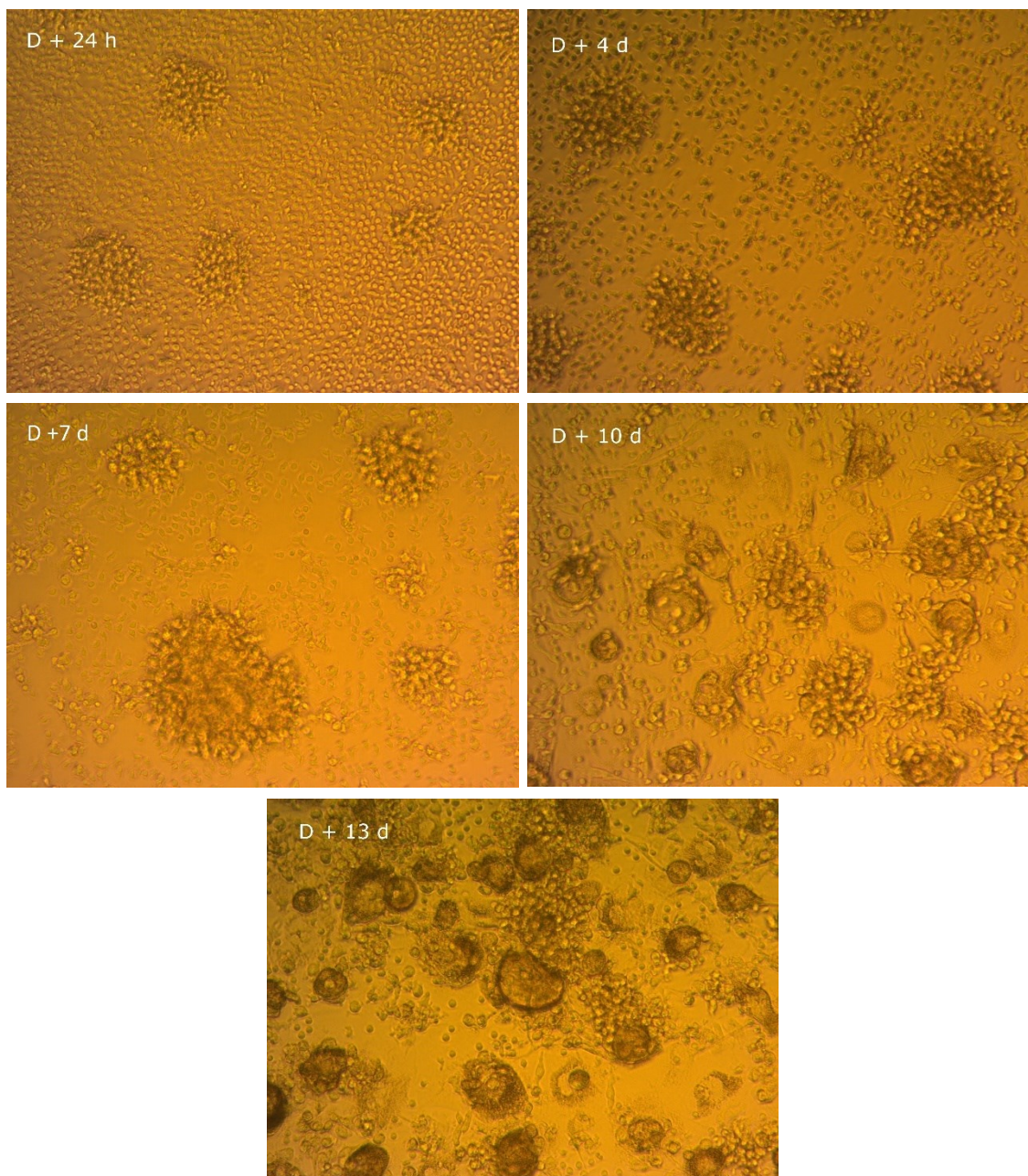
### 3.5. Separace monocytů z plné krve a diferenciaci osteoklastů

Krev pro separaci mononukleárních buněk byla odebírána do 9 ml VACUETTE® CTAD Tubes s 3,2 % protisrážlivého citrátu sodného. Separaci buněk jsme prováděli takto:

1. Krev z každé odebrané zkumavky jsme přelili do 50 ml zkumavky typu Falcon a odběrovou zkumavku ještě dvakrát vypláchli 4 ml HBSS (EuroClone) a přilili do 50 ml zkumavky, takže výsledný poměr plné krve s HBSS byl cca 1:1.
2. Směs jsme pomalu navrstvili po 4 ml do připravených 15 ml zkumavek s 3 ml Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare). Ficoll jsme před vrstvením ponechali při RT.
3. Zkumavky s Ficollem převrstveným naředěnou krví jsme centrifugovali na 360 rcf při RT po dobu 30 minut.
4. V průběhu centrifugace došlo na základě hustotního gradientu k vytvoření vrstev. Pipetou jsme opatrně odebrali mononukleární buňky do předem připravené 50 ml zkumavky s cca 5 ml HBSS a následně doplnili HBSS do celkového objemu 25 ml.
5. Zkumavku s odebranými buňkami jsme centrifugovali na 1500 rpm při RT po dobu 10 minut.
6. Po stočení jsme odlili tekutinu, usazené buňky resuspendovali jemným vortexováním a přilili 25 ml čistého HBSS. Následně jsme centrifugovali na 1250 rpm při RT po dobu 10 minut.
7. Médium jsme po stočení odlili, usazené buňky resuspendovali a přidali 700 µl PBS HyClone™ (GE Healthcare) pokojové teploty. Odebrali jsme 10 µl buněčné suspenze

pro spočítání buněk v Bürkerově komůrce, do zkumavky přilili 25 ml čistého HBSS a centrifugovali na 800 rpm při RT po dobu 10 minut.

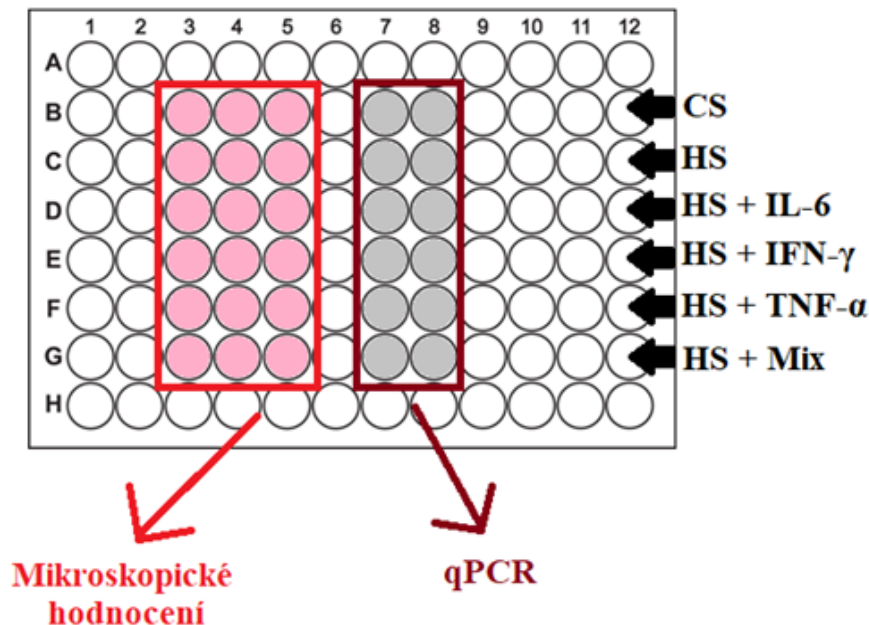
8. Na závěr jsme opět odlili médium a buňky resuspendovali.
9. K buněčné suspenzi jsme doplnili potřebné množství kompletního média DMEM (EuroClone; postup míchání popsán níže) a nasadili  $8 \times 10^5$  mononukleárních buněk ve 100  $\mu$ l média do 96-jamkových jamkových kultivačních destiček Microwell™ 96-Well Microplates (Nunc™) nebo Tissue culture multi-well plate with cover 96 Flat bottom wells (Linbro). Druhý zmíněný typ destiček byl použit pro experimenty s DNázou, první pro všechny ostatní experimenty.
10. Buňky jsme nechali usadit po 2 – 3 hodiny v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Následným oplachem byly získány adherující monocyty.
11. Do každé jamky jsme k adherentním monocytům přidali nové médium DMEM s M-CSF (Peprotech) v koncentraci 25 ng/ml a kultivovali po dobu 24 hodin.
12. Následující den jsme opět vyměnili médium, které tentokrát obsahovalo cytokiny M-CSF v koncentraci 25 ng/ml a RANKL (Peprotech) v koncentraci 30 ng/ml nebo 0,5 ng/ml (použití různých koncentrací je vysvětleno dále v optimalizacích). Od této výměny byly do zvolených jamek přidávány také další faktory, např. studované sérum pacientů a kontrol nebo rekombinantní cytokiny TNF- $\alpha$ , IL-6 a IFN- $\gamma$  (Peprotech).
13. Stejně médium bylo čerstvě připraveno před každou další výměnou, která probíhala vždy po třech dnech.
14. Celková délka kultivace byla 14 dní, po kterých byly získány mnohjaderné osteoklasty, z nichž jsme část vizualizovali barvením TRAP (pro mikroskopické vyhodnocení) a u části analyzovali genovou expresi pomocí kvantitativní real-time PCR (qPCR).



**Obr. 11:** Příklad 14denní kultivace a diferenciace osteoklastů. Zeiss Primovert, zvětšení 200 ×. *Autor*

Po 24hodinové stimulaci cytokinem M-CSF docházelo k vytvoření shluků monocytů. Při následujících výměnách jsme pozorovali úbytek neshluklých buněk. Velké buňky s morfológií osteoklastů byly v kultivacích obvykle pozorovatelné kolem 10. dne kultivace (nejdříve však 7. den). Zkratky: D – den nasazení, d – dny, h – hodiny.

U monocytů od jednoho dárce bylo prováděno několik podexperimentů, v rámci každého z nich bylo vždy nasazeno nejméně 5 jamek. Mikroskopicky byly vyhodnocovány vždy 3 jamky, genová exprese byla hodnocena vždy nejméně ze 2 jamek. Modelový příklad nasazení destičky je zobrazen na obr. 12.



**Obr. 12:** Příklad nasazení destičky a vyhodnocení. *Upraveno podle URL1*

### 3.5.1. Příprava kompletního média DMEM pro kultivace

1. FBS (ultra low endotoxin; Biotech) alikvótované po 5 ml a uchovávané při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  jsme rozmrazili při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
2. Alikvóty Penicilinu-Streptomycinu (PS; Sigma-Aldrich) a L-glutaminu (LG; Sigma-Aldrich) jsme rozmrazili při RT.
3. Do 50 ml zkumavky jsme namíchali 44 ml média DMEM, 5 ml FBS, 1 ml 200 mM LG a 0,5 ml PS (výsledný obsah FBS 10 %).
4. Médium jsme přefiltrovali přes  $0,22\text{ }\mu\text{m}$  filtr (TPP) a uchovávali při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Takto namíchané kompletní médium jsme používali po dobu nejdéle 3 týdnů.

## 3.6. Barvení TRAP a obrazové vyhodnocení

Při vizualizaci osteoklastů po 14denní kultivaci jsme postupovali takto:

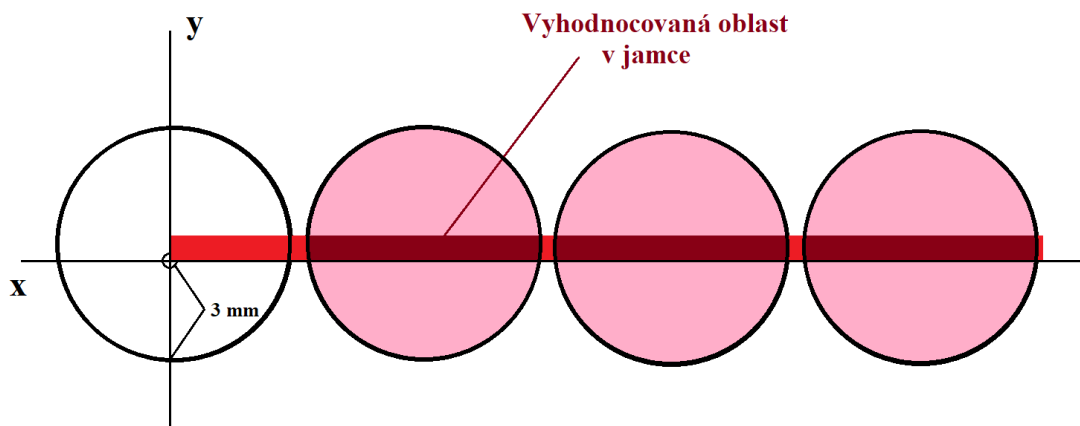
1. Odstranili jsme médium z jamek s buňkami a buňky opláchli PBS o pokojové teplotě.
2. Přidali jsme roztok 4% paraformaldehydu (PFA) v PBS na 10 minut.
3. Roztok PFA jsme odebrali a zafixované buňky opláchli čistým PBS.
4. Připravili jsme barvicí směs z Leukocyte Acid Phosphatase (TRAP) kitu (Sigma-Aldrich). Separátně jsme nejdříve připravili dvě zkumavky (v případě většího množství jamek byly připravovány násobky uvedených objemů):
  1. zkumavka: 40  $\mu$ l Fast Garnet GBC Base Solution  
40  $\mu$ l Sodium Nitrite Solution
  2. zkumavka: 40  $\mu$ l Naphtol AS-BI Phosphoric Acid Solution  
160  $\mu$ l Acetate Solution  
160  $\mu$ l Tartrate Solution  
3560  $\mu$ l Millipore vody  
(Millipore Milli-Q Gradient Water Purification System; Millipore)
5. Roztoky ze zkumavek jsme promíchali a ihned nanášeli do jamek se zafixovanými buňkami. Inkubace s barvicí směsí probíhala při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub> po dobu 1 hodiny.
6. Následně jsme směs odstranili a nabarvené buňky opláchli Millipore H<sub>2</sub>O.

Orientační pozorování vzorků, především v souvislosti s optimalizačními experimenty, jsme prováděli na světelném mikroskopu Zeiss Primovert (Zeiss). K přesnému počítání osteoklastů sloužil invertovaný fluorescenční mikroskop IX71 (Olympus) s možností přesného posuvu v osách x a y. Za osteoklasty jsme považovali TRAP pozitivní buňky se 3 a více jádry.



**Obr. 13:** Vizualizace osteoklastů barvením TRAP. IX71, zvětšení 320 ×. *Autor*

Kvůli objektivizaci mikroskopického vyhodnocování jsme zavedli metodu spočívající v porovnávání relativních počtů osteoklastů. Ve všech jamkách jsme spočítali osteoklasty ležící v celém zorném poli při posuvu skrze jamku po ose x při 320 × zvětšení. Poloha osy x vzhledem k vertikálnímu průměru jamky se odvíjela od značky vytvořené na ose y 3 mm od nejspodnějšího okraje jamky. U všech jamek byla tedy vyhodnocována stejná plocha přibližně ve střední (nejširší) části jamky (obr. 14).



**Obr. 14:** Způsob mikroskopického vyhodnocování. *Autor*

V optimalizačních experimentech jsme v jamkách nejdříve hodnotili více ploch určených více osami  $x$  v různé výšce, ale poměry mezi jednotlivými jamkami zůstaly zachovány i při započítání pouze jedné (střední) plochy. Naše metoda tedy umožňuje obrazové porovnávání míry osteoklastogeneze mezi jamkami bez nutnosti počítat absolutní počty osteoklastů ve všech jamkách.

V rámci každého podexperimentu jsme spočítali osteoklasty ve třech jamkách a vyřadili výsledek z té jamky, která byla nejvíce odchýlena od zbylých dvou.

## 3.7. Hodnocení genové exprese

### 3.7.1. Izolace RNA

Pro izolaci RNA z buněk jsme používali GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich).

1. Z jamek s buňkami po 14 dnech kultivace jsme odebrali médium a buňky opláchli PBS pokojové teploty.
2. Do každé jamky s buňkami jsme přidali 250  $\mu$ l lyzačního roztoku, který jsme nechali po dobu 1 minuty působit. Buněčný lyzát jsme odebrali do 1,7 ml mikrozkušavky,

přidali 5  $\mu$ l 2-merkaptoethanolu a vortexovali. Takto připravený lyzát jsme buď ihned zpracovávali nebo zamrazili na  $-80$  °C a později pokračovali třetím krokem.

3. Buněčný lyzát jsme napipetovali do filtrační kolonky a centrifugovali na 14 000 rpm po dobu 2 minut.
4. Kolonku jsme vyhodili a do filtrátu přidali 500  $\mu$ l 70% ethanolu zchlazeného na 4 °C. Následně jsme zvortexovali.
5. Ve dvou opakujících se krocích jsme do RNA binding kolonky v čisté sběrné zkumavce napipetovali vždy 500  $\mu$ l vzniklého roztoku, centrifugovali na 14000 rpm po dobu 15 vteřin a filtrát vylili.
6. Do kolonky jsme poté napipetovali 500  $\mu$ l promývacího roztoku 1 a centrifugovali na 14000 rpm 15 vteřin.
7. Filtrát jsme vylili a napipetovali 500  $\mu$ l promývacího roztoku 2. Centrifugovali jsme na 14000 rpm 15 vteřin
8. Po vylití filtrátu jsme opět přidali 500  $\mu$ l promývacího roztoku 2 a centrifugovali na 14000 rpm po dobu 2 minut.
9. Nakonec jsme po odstranění filtrátu ještě jednou centrifugovali na 14000 rpm po dobu 1 minuty, abychom kolonku zcela zbavili zbývajících roztoku.
10. Kolonku jsme přenesli do čisté sběrné zkumavky, přidali 40  $\mu$ l Millipore vody a inkubovali při RT po dobu 1 minuty.
11. Centrifugovali jsme na 14000 rpm po 1 minutu, ve filtrátu byla obsažena RNA, jejíž koncentraci a čistotu jsme změřili na přístroji NanoPhotometer Pearl (Implen). RNA jsme uchovávali při  $-80$  °C.

### 3.7.2. Reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce (RT PCR)

Pro reverzní transkripci jsme užívali High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). U finálních experimentů s DNázou byl použit 2 $\times$  HyperSriptRT™ master mix (Bohemia Genetics). V případě High-Capacity cDNA Reverse Transcription kitu byl postup následující:

1. Všechny komponenty kitu, kromě reverzní transkriptázy, jsme nechali roztát na ledu.

2. Podle počtu reakcí jsme si připravili požadované množství reakční směsi. Uvedené množství je na jednu reakci:

10 × RT pufr..... 2 µl  
25 × dNTP mix..... 0,8 µl  
10 × RT náhodné primery..... 2 µl  
Reverzní transkriptáza..... 1 µl  
Millipore H<sub>2</sub>O..... 4,2 µl

3. Po namíchání jsme reakční směs vortexovali a udržovali na ledu.
4. Do 200 µl mikrozkušavek jsme napipetovali po 10 µl reakční směsi.
5. Směs jsme doplnili vodou a příslušnou RNA tak, aby výsledný objem reakce byl 20 µl a obsah RNA 20 ng.
6. Mikrozkušavky jsme krátce centrifugovali a vložili do C1000™ Thermal Cycleru (BioRad), v němž jsme nastavili následující program:
  1. krok (hybridizace s primery)..... 10 minut při 25 °C
  2. krok (extenze)..... 120 minut při 37 °C
  3. krok (denaturace enzymu)..... 5 vteřin při 85 °C
7. Získané vzorky cDNA jsme uchovávali při -20 °C pro další zpracování.

Postup pro 2× HyperSriptRT™ master mix:

1. Mastermix jsme nechali roztát na ledu.
2. Do 200 µl mikrozkušavek jsme napipetovali po 10 µl mastermixu.
3. Přidali jsme 20 ng RNA a doplnili vodou do výsledného objemu 20 µl
4. Mikrozkušavky jsme krátce centrifugovali a vložili do C1000™ Thermal Cycleru (BioRad), v němž jsme nastavili následující program:
  1. krok (hybridizace s primery)..... 5 minut při 25 °C
  2. krok (extenze)..... 45 minut při 55 °C
  3. krok (denaturace enzymu)..... 5 minut při 95 °C
5. Získané vzorky cDNA jsme uchovávali při -20 °C pro další zpracování.

### 3.7.3. Kvantitativní real-time polymerázová řetězová reakce

Při qPCR analýze jsme využívali qPCRBIO Probe Mix Hi-ROX (PCR Biosystems) a směs sondy s primery TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Vlastní analýza probíhala na přístroji LightCycler® 480 Instrument II (Roche).

1. Do cDNA získané v RT PCR jsme přidali 60  $\mu$ l Millipore H<sub>2</sub>O a celkový objem tím doplnili na 80  $\mu$ l.
2. Komponenty qPCR mixu a sondy s primery pro sledované geny jsme nechali roztát při RT zakryté alobalem.
3. Podle požadovaného počtu reakcí jsme připravili reakční směs (množství na jednu reakci):

qPCRBIO Probe Mix Hi-ROX..... 7  $\mu$ l  
příslušná sonda s primery..... 0,7  $\mu$ l  
Millipore H<sub>2</sub>O..... 2,3  $\mu$ l

4. Směs jsme po 10  $\mu$ l napipetovali do jamek v 384-jamkové destičce LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 white (Roche) a do každé jamky přidali 4  $\mu$ l příslušné cDNA.
5. Destičku jsme přelepili optickou fólií, centrifugovali na 2500 rpm po dobu 2 a půl minuty a následně vložili do přístroje LightCycler 480, kde jsme nastavili protokol:
  1. krok (hot start)..... 10 minut při 95 °C
  2. krok (denaturace)..... 15 vteřin při 95 °C
  3. krok (annealing, extenze)..... 1 minuta při 60 °C
  4. krok (chlazení)..... 30 vteřin při 40 °CKroky 2 a 3 se opakovaly 50  $\times$
6. Po dokončení reakce jsme metodou Abs Quant/2nd Derivative Maximum získali hodnoty Ct (prahové hodnoty fluorescence), které jsme dále zpracovali.

Všechny vzorky byly analyzovány v tripletech. Z průměru Ct hodnot tří jamek jsme vypočítali mean Ct (průměr prahových hodnot fluorescence). Pokud byla směrodatná odchylka Ct hodnot mezi jamkami vyšší než 0,16, nebyla započítána nejvíce odchýlená jamka a mean Ct hodnota byla získána z průměru zbývajících dvou jamek.

Sledovali jsme expresi genů *ACP5*, *CTSK* a *CALCR*, jako endogenní kontroly jsme použili geny *B2M* a *HPRT1*, které patří mezi nejstabilnější kontroly pro genové exprese u osteoklastů (Stephens et al., 2011).

## 3.8. Zpracování výsledků

Při srovnání míry osteoklastogeneze z mikroskopických dat (relativním počtu osteoklastů mezi vzorky) jsme v rámci každého experimentu z buněk jednoho zdravého jedince vztáhli napočítané množství osteoklastů ve všech jamkách k průměrnému množství napočítaných osteoklastů v kontrolních jamkách (tzn. kultivaci se sérem zdravého jedince bez přídavku cytokinů nebo kultivaci se sérem neošetřeným DNázou). Procentuální (relativní) porovnávání bylo nezbytné pro souhrnné srovnání ve výsledcích, protože monocyty různých jedinců vykazovaly značně odlišný osteoklastogenní potenciál, nezávisle na přidávaných faktorech.

Například pokud v rámci buněk jednoho jedince byly po vyřazení odchýlené jamky v kontrolních jamkách (HS) počty osteoklastů  $N_1 = 100$  a  $N_2 = 150$ , tedy průměr  $N_p = 125$ , a v jamkách s přídavkem TNF- $\alpha$  (HS + TNF- $\alpha$ ) počty  $N_1 = 150$  a  $N_2 = 200$ , do souhrnných výsledků jsme pro HS započítali procentuální hodnoty  $P_1 = 80 \%$  a  $P_2 = 120 \%$  a pro HS + TNF- $\alpha$   $P_1 = 120 \%$  a  $P_2 = 160 \%$ . Ve statistickém zpracování jsme s těmito procentuálními hodnotami nakládali dále jako s nezávislými v případě nepárových testů, nebo jsme obě hodnoty zprůměrovali do jedné a srovnávali párovými testy (tzn. u kontroly byla vždy hodnota 100 %). Použití dvou druhů statistických testů je vysvětleno u příslušných výsledků.

Pro srovnání výsledků genových expresí jsme nejdříve vztáhli mean Ct hodnoty sledovaných genů ke geometrickému průměru mean Ct hodnot endogenních kontrol ( $\Delta Ct$ ). Následně jsme vyjádřili hodnoty  $2^{-\Delta Ct}$ , které jsme pro každý ze vzorků v rámci jednoho experimentu vztáhli ke kontrole a vyjádřili změnu (zvýšení či snížení) exprese vzhledem ke kontrole.

## 3.9. Statistické vyhodnocení

Ke statistickému zpracování výsledků jsme použili program GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc.). Normalitu dat jsme ověřovali D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk a

Kolmogorov-Smirnov testem. Pokud bylo nutno vyřadit extrémní hodnoty, použili jsme Grubbsův test s alfa hodnotou 0,05. Při porovnávání tří skupin souhrnných hodnot jsme v případě Gaussova rozdělení hodnot využili jednocestnou ANOVu, v případě nenormálního rozložení hodnot Kruskal-Wallis test. Při porovnávání dvou skupin nepárových hodnot jsme u normálního rozložení hodnot použili t-test s Welchovou korekcí, při nenormálním rozložení hodnot Mann-Whitney test. V případě párových dat jsme použili Wilcoxonův párový test. Hladiny statistické významnosti byly stanoveny takto: \* =  $P < 0,05$  – signifikantní výsledek, \*\* =  $P < 0,01$  – vysoce signifikantní výsledek, \*\*\* =  $P < 0,001$  nebo \*\*\*\* =  $P < 0,0001$  – velmi vysoce signifikantní výsledek.

## 3.10. Optimalizace postupů

### 3.10.1. Použití plazmy a séra v kultivacích

Pro ověřování vlivu cfDNA v cirkulaci u nově diagnostikovaných pacientů a zdravých kontrol jsme plánovali přidávání plazmy do kultivačního média.

Pilotní kultivační experimenty s plazmou ukázaly, že v její přítomnosti dochází mezi jednotlivými výměnami ke sražení média a následnému „odmytí“ buněk. K tomuto efektu docházelo i po nahrazení média DMEM kultivačními médii  $\alpha$ -MEM a RPMI 1640 odlišného složení. Ke sražení došlo při pomalém rozmražení plazmy při 4 °C i při rychlejších rozmraženích v RT nebo vodní lázni vyhřáté na 37 °C. Při výměnách jsme se také neúspěšně pokoušeli sražené médium rozředit čistým médiem doplněným do jamky před výměnou. Z těchto technických důvodů jsme tedy pro ověření vlivu cfDNA nakonec využívali sérum místo plazmy, podobně jako u cytokinů.

Studované sérum celiakálních pacientů nebo zdravých jedinců bylo do kultivací přidáváno spolu s ostatními faktory 2. den (po 24 hodinové prestimulaci s M-CSF) a bylo vždy čerstvě rozmrazeno a doplňováno do namíchaného kompletního média DMEM (s FBS, PS a LG). Výsledné médium přidávané do kultivací tedy obsahovalo 10 % FBS a 10 % lidského séra. Použití celkových 20 % séra bylo založeno na pozorování, že samotné zvýšení množství séra z 10 % na 20 % výrazně podporuje vznik osteoklastů v našich *in vitro* kultivacích.

### 3.10.2. Ošetření séra DNázou

Za účelem ověření vlivu cfDNA v podmínkách, které co nejvíce napodobují *in vivo* prostředí, jsme studované sérum přidávané do kultur ošetřili DNázou, která z něj odstranila cfDNA. Efekt takto upraveného séra jsme vztahovali k efektu neošetřeného studovaného séra obsahujícího cfDNA.

V pilotních experimentech jsme k ošetření použili TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen) nebo DNase I Amplification Grade kit (Sigma-Aldrich) dle následujících protokolů:

Pro TURBO DNA-free™ Kit:

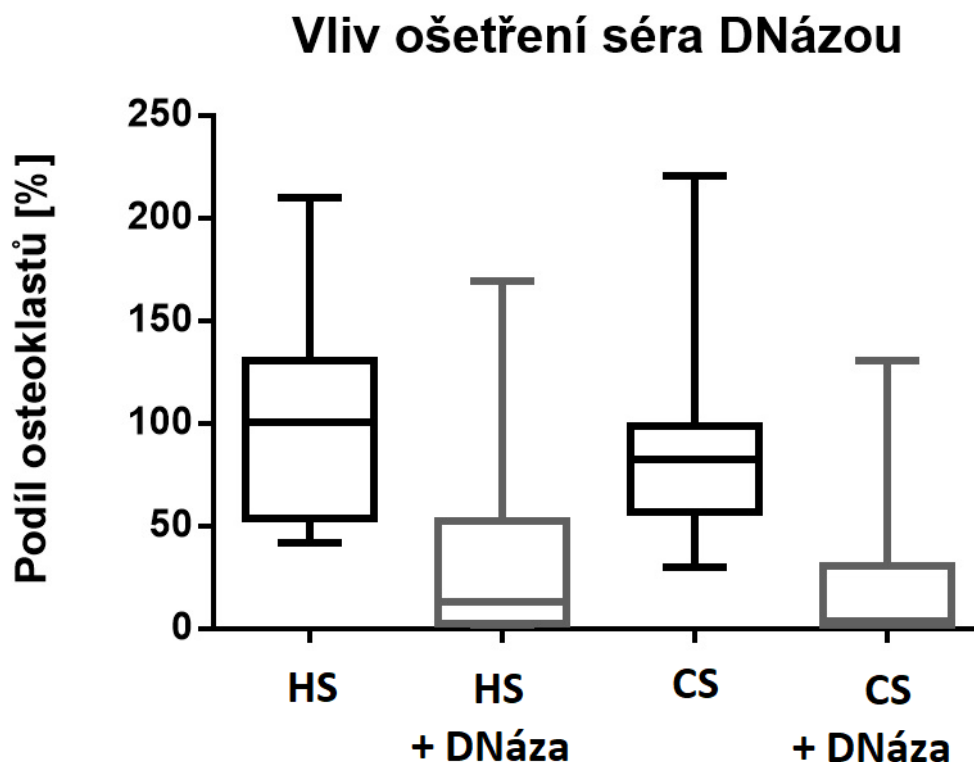
1. K 250  $\mu$ l séra jsme přidali 5  $\mu$ l Turbo DNázy, 30  $\mu$ l DNase Buffer a 15  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (PCR-grade)
2. Směs jsme zvortexovali a stočili.
3. Inkubovali jsme po dobu 20 minut v termobloku při 37 °C
4. Do směsi jsme přidali 30  $\mu$ l DNase Inactivation Reagent
5. Za občasného vortexování jsme inkubovali při RT po dobu 5 minut a poté jsme centrifugovali na 14000 rpm po dobu 2 minut.
6. Po centrifugaci jsme opatrně bez porušení pelety odebírali ošetřené sérum, které jsme aplikovali do média.

Pro DNase I Amplification Grade:

1. K 250  $\mu$ l séra jsme přidali 25  $\mu$ l DNázy I a 25  $\mu$ l Reaction Buffer.
2. Směs jsme pomalu propipetovali a inkubovali po dobu 20 minut v termobloku při 37 °C.
3. Přidali jsme 25  $\mu$ l Stop Solution, směs jsme propipetovali a ošetřené sérum přidávali do příslušného média.

Provedli jsme celkem 6 experimentů, v nichž bylo sérum ošetřováno pro každý z experimentů vždy jedním z kitů. Průběžné výsledky z těchto experimentů naznačovaly, že

přítomnost cfDNA (resp. neošetření séra DNázou) má značný pozitivní vliv na vznik osteoklastů (graf 1).

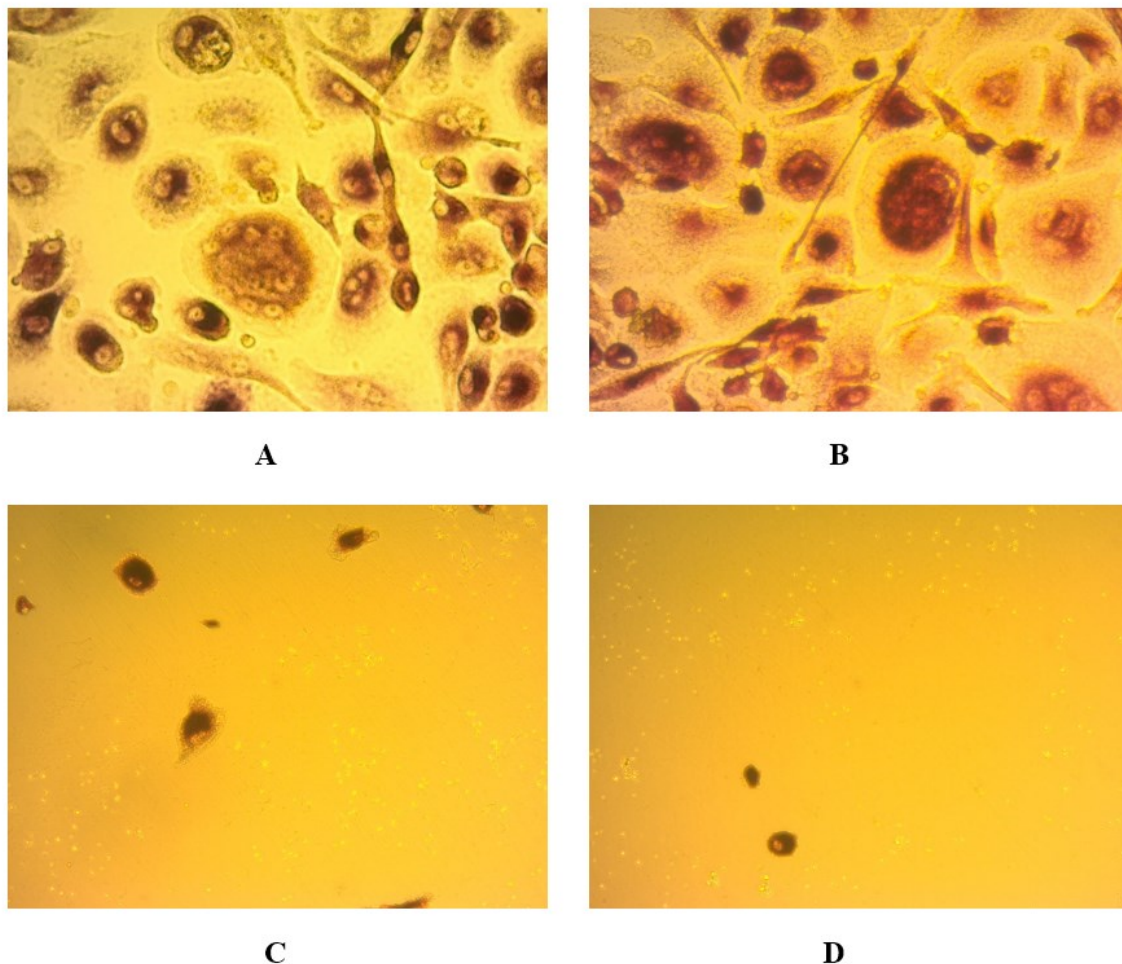


**Graf 1:** Vliv ošetření séra DNázou na osteoklastogenezi.

HS – kultivace se sérem zdravých kontrol. CS – Kultivace se sérem nově diagnostikovaných pacientů s celiakií. Znázorněny jsou medián, 25. a 75. percentil, minimum a maximum. Počty byly vztahovány k průměru kontroly HS = 100 %. Tyto kultivace probíhaly v přítomnosti 30 ng/ml RANKL.

Bylo však nutné vyloučit možný vliv samotného DNázového kitu na tvorbu osteoklastů. Toto ověření jsme provedli tak, že jsme všechny komponenty DNase I kitu namíchali dle výše popsanych protokolů, ale bez přítomnosti ošetřovaného séra. Tuto směs jsme následně při kultivaci přidali do kompletního média DMEM. Přidaný objem reakční směsi odpovídal obsahu, který byl běžně přidáván do kompletního média spolu s ošetřeným sérem (2,4 %). Z výsledků vyplynulo, že při výše popsanych způsobech ošetření séra mohl

být pozorovaný efekt do značné míry způsoben spíše samotným DNázovým kitem, než přítomností či nepřítomností cfDNA (obr. 15).



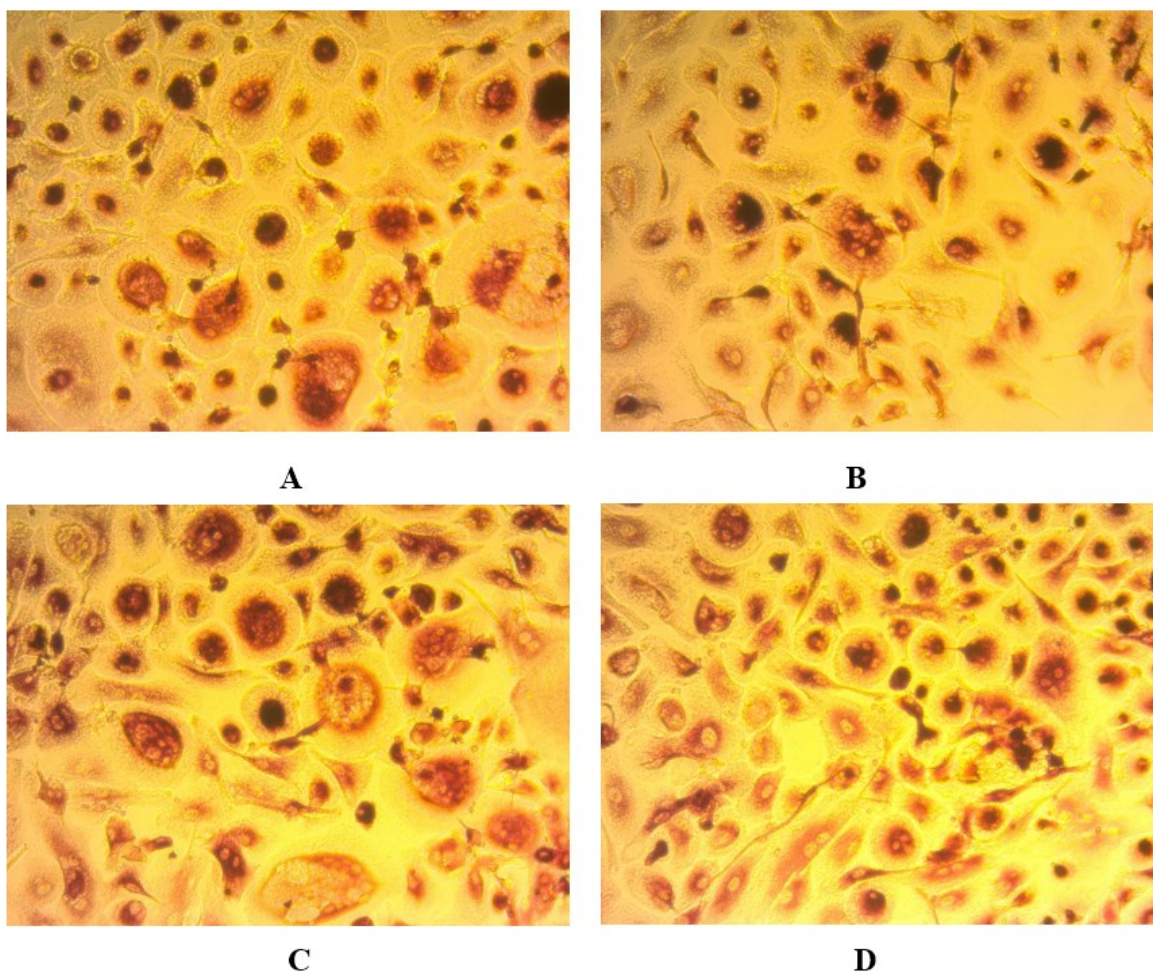
**Obr. 15:** Vliv DNázového kitu na osteoklastogenezi před úpravou protokolu. Zeiss Primovert, zvětšení 400 ×. *Autor*

Obrázky pochází ze dvou nezávislých experimentů. A, B: Kontrolní kultivace bez DNázového kitu. C, D: Kultivace s DNázovým kitem. V přítomnosti kitu nevznikly žádné osteoklasty a ve vzorku byl po nabarvení také velmi výrazně nižší počet všech buněk.

Další optimalizace ošetření séra jsme prováděli pouze na DNase I Amplification Grade kitu. V následných experimentech jsme se zaměřili nejdříve na vliv množství kitu. Přidávané objemy jsme snížili až na 2  $\mu$ l DNázy, 2  $\mu$ l Reaction Buffer a 2  $\mu$ l Stop Solution pro 1 ml média DMEM (tedy celkový obsah 0,6 % oproti původním 2,4 %). Negativní efekt na osteoklastogenezi setrval i při tomto nízkém objemu.

Zaměřili jsme se také na vliv jednotlivých komponent kitu. Negativní efekt na osteoklastogenezi se potvrdil i tehdy, pokud byla přítomna pouze DNáza I bez Reaction Buffer a Stop Solution nebo DNáza namíchaná se Stop Solution bez přítomnosti Reaction Buffer.

Z těchto výsledků jsme jako možnou příčinu vytipovali nedostatečnou inaktivaci DNázy. S ohledem na protokol od výrobce, dle kterého je DNáza z DNase I Amplification Grade kitu citlivá na mechanickou denaturaci, jsme do našeho protokolu doplnili krok, kdy je ošetřené sérum po přidání Stop Solution důkladně vortexováno. Kontrolní experimenty pouze s kitem bez přítomnosti ošetřeného séra naznačují, že se negativní účinek kitu při tomto postupu vytrácí (obr. 16).



**Obr. 16:** Vliv DNázového kitu po úpravě protokolu. Zeiss Primovert, zvětšení 200 ×. *Autor*

Obrázky ze dvou nezávislých experimentů. A, B: Kontrolní kultivace bez DNázového kitu. C, D: Kultivace s DNázovým kitem. V přítomnosti kitu vznikly velké mnohojaderné osteoklasty a jamky svým vzhledem odpovídaly kontrolním jamkám.

Výsledný námi používaný protokol ošetření séra, v němž jsme navíc snížili objem komponent kitu a prodloužili inkubaci, byl následující:

1. 14  $\mu$ l DNázy I a 14  $\mu$ l Reaction Buffer jsme smíchali s 308  $\mu$ l séra.
2. Směs jsme jemně propipetovali a inkubovali po dobu 30 minut v termobloku při 37  $^{\circ}$ C.
3. K ošetřenému séru jsme přidali 14  $\mu$ l Stop Solution a objem tím doplnili na 350  $\mu$ l.
4. Ošetřené sérum jsme důkladně vortexovali po dobu 15 sekund, poté stočili a znovu silně vortexovali po dobu 15 sekund. Následně jsme jej přidali do kultivačního média.

Ošetřené séra byl přidán vždy takový objem, aby čisté podíly lidského séra v porovnání ošetřovaného i kontrolního vzorku byly odpovídající, tj. 10 % (tab. 5).

**Tab. 5:** Porovnání výsledného složení média s ošetřeným a neošetřeným sérem

	<b>DMEM (10 % FBS, PS, LG)</b>	<b>Studované sérum</b>	<b>Komponenty DNáz. kitu</b>	<b>M-CSF</b>	<b>RANKL</b>
<b>Médium s ošetřeným sérem (S + DNase)</b>	88,7 %	10 %	1,3 %	25 ng/ml	0,5 ng/ml
<b>Médium s neošetřeným sérem (S)</b>	90 %	10 %	–	25 ng/ml	0,5 ng/ml

### 3.10.3. Koncentrace cytokinů

Použití objemů 25 ng/ml M-CSF a 30 ng/ml RANKL bylo v naší laboratoři zavedeno na základě předchozí spolupráce s Bone Biopathology Laboratory, Department of Biotechnological and Applied Clinical Sciences, University of L'Aquila v Itálii. Ideální koncentrace do 25 ng/ml u M-CSF je navíc experimentálně podložena (Hodge et al., 2007).

Zavedení koncentrace RANKLu 0,5 ng/ml vychází z práce Taranty et al. (2004), kde se pozorované efekty studovaného séra projeví pouze při této nízké koncentraci, která však více odpovídá fyziologickým podmínkám.

Ve srovnání efektů kultivace se sérem nově diagnostikovaných pacientů s celiakií a zdravých kontrol při koncentraci 30 ng/ml RANKLu jsme, podobně jako Taranta et al., (2004), nepozorovali významný rozdíl v počtu osteoklastů (graf 1). Optimalizační experiment s TNF- $\alpha$  v přítomnosti 30 ng/ml RANKL a 0,5 ng/ml RANKL navíc naznačil vyšší vliv tohoto cytokinu při nižší koncentraci RANKLu. Na základě těchto pozorování a známých informací jsme všechny kultivace, z nichž vychází výsledky práce, prováděli v přítomnosti 0,5 ng/ml RANKL.

Rekombinantní cytokiny TNF- $\alpha$ , IL-6 a IFN- $\gamma$  jsme přidávali do média ve výsledné koncentraci 20 ng/ml. Koncentrace 20 ng/ml TNF- $\alpha$  je běžně používána dle odborné literatury (např. Kobayashi et al., 2000; Kim et al., 2005; Kyung et al., 2008). Ve dvou nezávislých experimentech jsme také vyzkoušeli koncentrace IL-6 4 ng/ml, 20 ng/ml a 80 ng/ml, z nichž koncentrace 20 ng/ml vedla k nejstabilnějším výtěžkům osteoklastů. Přehled přidávaných faktorů při ověřování vlivu cytokinů a studovaného séra je zobrazen v tab. 6.

**Tab. 6:** Složení média pro ověření vlivu séra a cytokinů

KULTIVACE	DMEM (10 % FBS, PS, LG)	Studované sérum pacienta s celiakií (CS)	Studované sérum zdravé kontroly (HS)	M- CSF	R A N K L	TNF- $\alpha$	IL-6	IFN- $\gamma$
<b>CS</b>	90 %	10 %	–	25 ng/ml	0,5 ng/ml	–	–	–
<b>HS</b>	90 %	–	10 %	25 ng/ml	0,5 ng/ml	–	–	–
<b>HS + TNF-<math>\alpha</math></b>	90 %	–	10 %	25 ng/ml	0,5 ng/ml	20 ng/ml	–	–
<b>HS + IL-6</b>	90 %	–	10 %	25 ng/ml	0,5 ng/ml	–	20 ng/ml	–
<b>HS + IFN-<math>\gamma</math></b>	90 %	–	10 %	25 ng/ml	0,5 ng/ml	–	–	20 ng/ml
<b>HS + Mix (TNF-<math>\alpha</math>, IL-6, IFN-<math>\gamma</math>)</b>	90 %	–	10 %	25 ng/ml	0,5 ng/ml	20 ng/ml	20 ng/ml	20 ng/ml

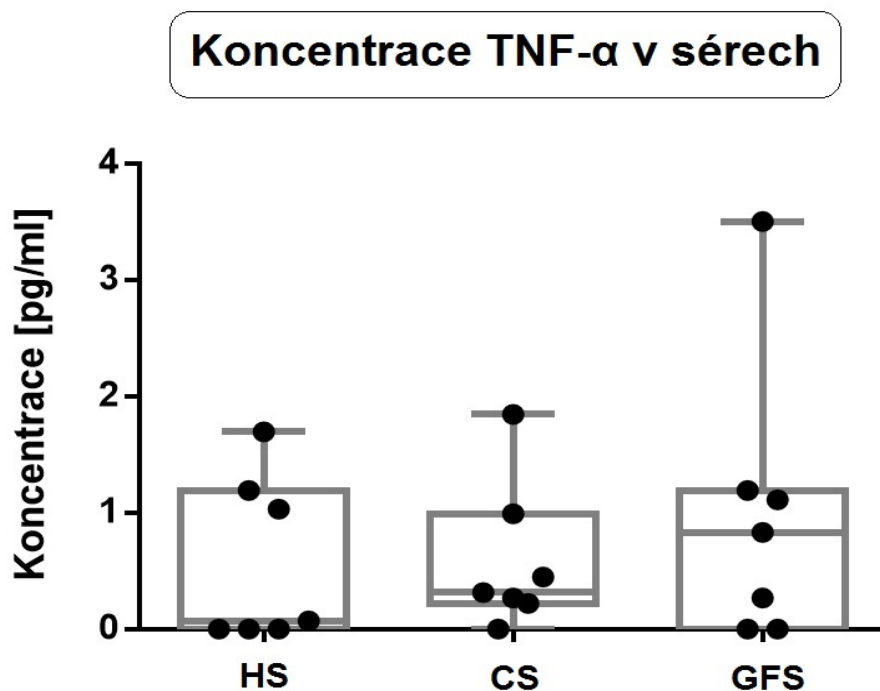
## 4. Výsledky

### 4.1. Srovnání koncentrací cytokinů mezi pacienty s celiakií a kontrolami

Pro potvrzení předpokladu, že u nově diagnostikovaných pacientů s celiakií i pacientů s celiakií na dietě dochází k významnému zvýšení hladin zánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-6 a IFN- $\gamma$  oproti zdravým kontrolám, jsme porovnali naměřené hodnoty u těchto cytokinů mezi všemi třemi skupinami.

#### 4.1.1. Koncentrace TNF- $\alpha$

Koncentrace TNF- $\alpha$  v sérech jsme srovnali Kruskal-Wallis testem. Mezi jednotlivými skupinami nebyl statisticky významný rozdíl v hladinách TNF- $\alpha$ .



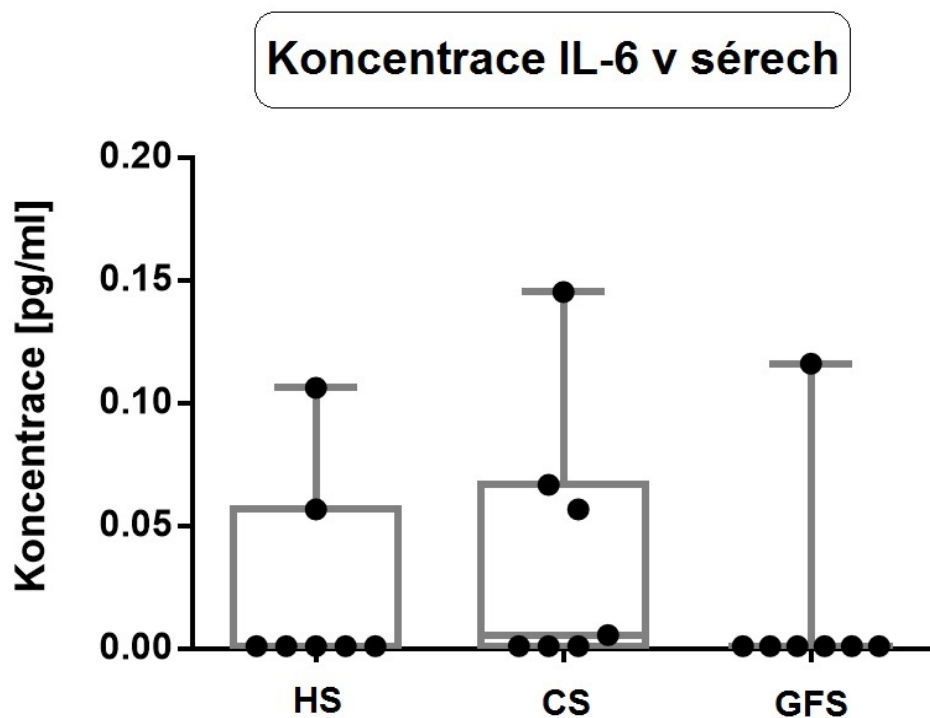
## Graf 2: Koncentrace TNF- $\alpha$ v sérech.

Vertikální čára uvnitř boxu představuje medián, hranice boxu znázorňují 25. a 75. percentil, vousy maximální a minimální hodnotu. Každý z bodů značí jeden měřený vzorek séra. Zkratky: HS – sérum zdravých kontrol, CS – sérum nově diagnostikovaných pacientů s celiakií, GFS – sérum pacientů s celiakií na dietě.

Hodnoty sloupců: **HS**: medián 0,07, rozptyl 0 – 1,69; **CS**: medián 0,32, rozptyl 0 – 1,84; **GFS**: medián 0,83, rozptyl 0 – 3,5. Všechny hodnoty jsou v pg/ml.

### 4.1.2. Koncentrace IL-6

Koncentrace IL-6 v sérech jsme srovnali Kruskal-Wallis testem. Mezi jednotlivými skupinami nebyl statisticky významný rozdíl v hladinách IL-6. Většina z naměřených hodnot u skupiny zdravých kontrol a pacientů s celiakií na dietě byla pod detekčním limitem.



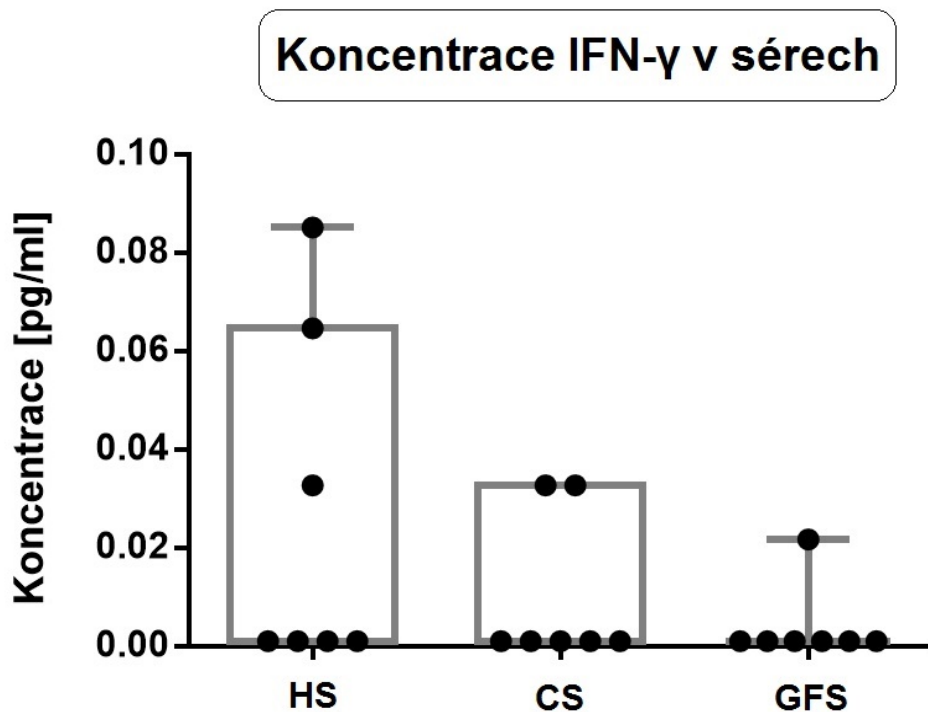
## Graf 3: Koncentrace IL-6 v sérech.

Vertikální čára uvnitř boxu představuje medián, hranice boxu znázorňují 25. a 75. percentil, vousy maximální a minimální hodnotu. Každý z bodů značí jeden měřený vzorek séra. Zkratky: HS – sérum zdravých kontrol, CS – sérum nově diagnostikovaných pacientů s celiakií, GFS – sérum pacientů s celiakií na dietě.

Hodnoty sloupců: **HS**: medián 0, rozptyl 0 – 0,11; **CS**: medián 0,01, rozptyl 0 – 0,15; **GFS**: medián 0, rozptyl 0 – 0,12. Všechny hodnoty jsou v pg/ml.

### 4.1.3. Koncentrace IFN- $\gamma$

Koncentrace IFN- $\gamma$  v sérech jsme srovnali Kruskal-Wallis testem. Mezi jednotlivými skupinami nebyl statisticky významný rozdíl v hladinách IFN- $\gamma$ . Většina z naměřených hodnot u všech skupin byla pod detekčním limitem.



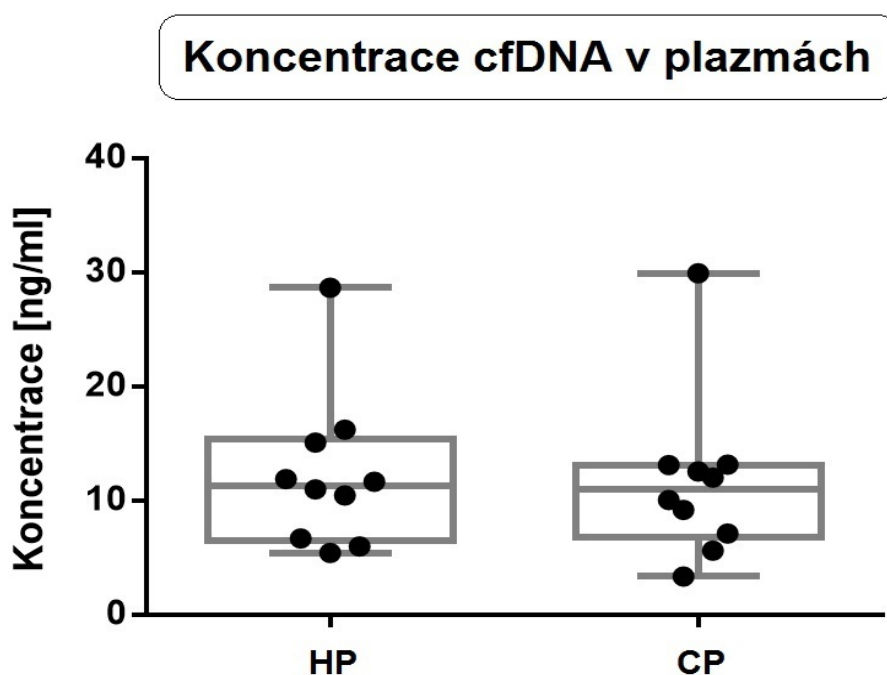
**Graf 4:** Koncentrace IFN- $\gamma$  v sérech.

Vertikální čára uvnitř boxu představuje medián, hranice boxu znázorňují 25. a 75. percentil, vousy maximální a minimální hodnotu. Každý z bodu značí jeden měřený vzorek séra. Zkratky: HS – sérum zdravých kontrol, CS – sérum nově diagnostikovaných pacientů s celiakií, GFS – sérum pacientů s celiakií na dietě.

Hodnoty sloupců: **HS**: medián 0, rozptyl 0 – 0,09; **CS**: medián 0, rozptyl 0 – 0,03; **GFS**: medián 0, rozptyl 0 – 0,02. Všechny hodnoty jsou v pg/ml.

## 4.2. Srovnání koncentrací cfDNA mezi pacienty s celiakií a kontrolami

Pro ověření hypotézy, že u nově diagnostikovaných pacientů s celiakií dochází v souvislosti s rozpadem střevní sliznice ke zvýšení hladin cfDNA, jsme porovnali naměřené hodnoty cfDNA v plazmě nově diagnostikovaných pacientů a zdravých kontrol. Mann-Whitney test neodhalil statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami.



**Graf 5:** Koncentrace cfDNA v plazmách.

Vertikální čára uvnitř boxu představuje medián, hranice boxu znázorňují 25. a 75. percentil, vousy maximální a minimální hodnotu. Každý z bodu značí jeden měřený vzorek plazmy. Zkratky: HP – plazma zdravých kontrol, CP – plazma nově diagnostikovaných pacientů s celiakií.

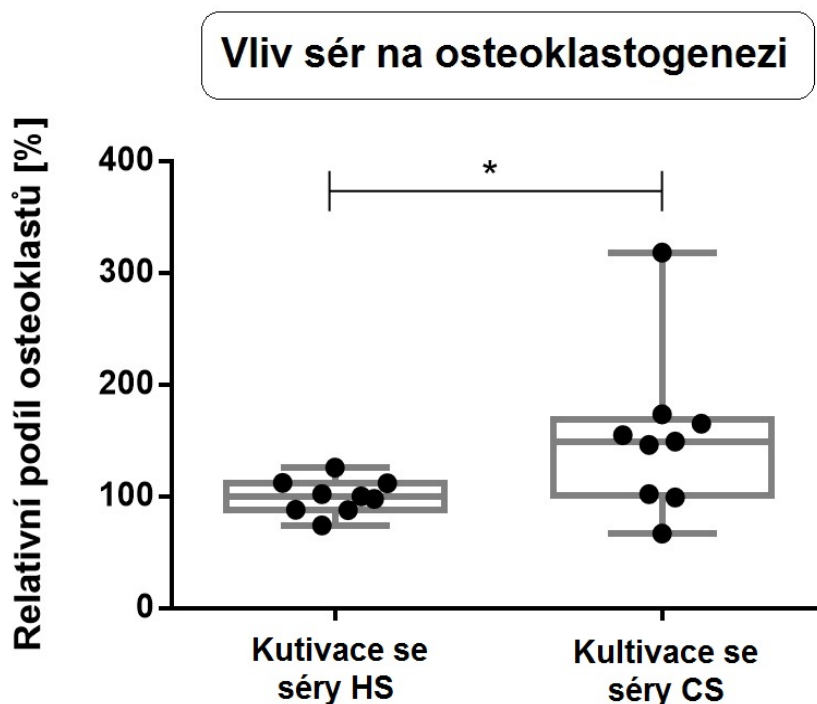
Hodnoty sloupců: **HP:** medián 11,32, rozptyl 5,4 – 28,64; **CP:** medián 11,02, rozptyl 3,35 – 29,91. Všechny hodnoty jsou v ng/ml.

### 4.3. Analýza vlivu sér pacientů s celiakií a zdravých kontrol na osteoklastogenezi

Séra nově diagnostikovaných pacientů a zdravých kontrol, u nichž byla analyzována koncentrace TNF- $\alpha$ , IL-6 a IFN- $\gamma$ , jsme dále využili pro kultivace a diferenciaci monocytů v osteoklasty, abychom ověřili, zda v přítomnosti séra pacientů dochází ke změně v počtu vznikajících osteoklastů.

Monocyty od každého jednotlivého zdravého dárce (skupina FM) jsme kultivovali v přítomnosti séra nově diagnostikovaných pacientů (CS) i zdravých kontrol (HS). Konečný výsledek byl získán tak, že ze tří mikroskopicky vyhodnocených jamek byla vyřazena jamka s nejvíce odchylenou hodnotou počtu osteoklastů a ze zbylých dvou jamek byl vypočten průměr hodnot. Tento průměr při kultivaci s CS byl následně srovnán s průměrným počtem při kultivaci s HS a vyjádřen jako procentuální (relativní) zvýšení či snížení.

Při kultivacích se séry CS vzniklo v průměru přibližně o 53 % více osteoklastů než při kultivaci s HS. Tento výsledek byl dle Wilcoxonova párového testu statisticky významný ( $P < 0,05$ ).



### **Graf 6:** Vliv sér na osteoklastogenezi.

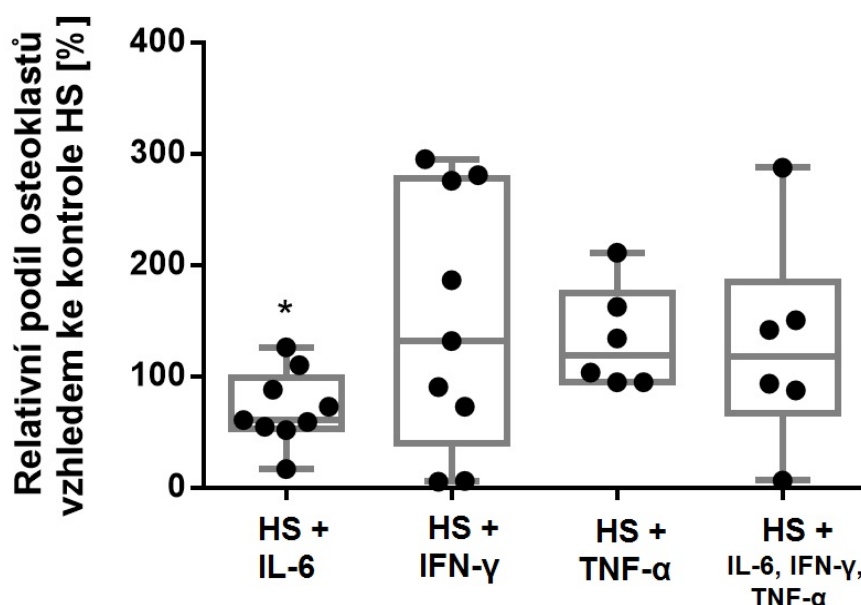
Vertikální čára uvnitř boxu představuje medián, hranice boxu znázorňují 25. a 75. percentil, vousy maximální a minimální hodnotu. Každý z bodů u kultivace s CS značí výsledný průměr z jamek jedné kultivace vztažený k odpovídající kultivaci s HS. Pro názornost grafu jsou vyznačeny také rozptyly v rámci samotné kontroly, ačkoliv pro výpočet rozdílu CS a HS byl použit u kontroly vždy průměr 100 %. Hvězdička a linka nad grafy značí statistickou signifikanci. Zkratky: HS – sérum zdravých kontrol, CS – sérum nově diagnostikovaných pacientů s celiakií.

Hodnoty sloupců: **Kultivace se séry HS:** medián 100, rozptyl 74,07 – 125,93, průměr 100; **Kultivace se séry CS:** medián 149, rozptyl 66,67 – 318,3, průměr 152,8. Všechny hodnoty jsou v %.

## 4.4. Vliv cytokinů na osteoklastogenezi

Jako další část práce jsme ověřili vliv samotných cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-6 a IFN- $\gamma$  a jejich kombinace na osteoklastogenezi. Rekombinantní cytokiny jsme přidávali k séru zdravých kontrol souběžně při ověřování vlivu séra CS. Statisticky významného výsledku ( $P < 0,05$ ) jsme na základě Wilcoxonova párového testu dosáhli pouze u kultivace s přidaným IL-6, v jehož přítomnosti vzniklo v průměru o 27 % méně osteoklastů oproti kontrolní kultivaci se samotným sérem HS. U cytokinů TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  a kombinace všech tří testovaných cytokinů jsme pozorovali trend ke zvýšení průměrného počtu osteoklastů (34 %, 49 % a 28 %, dle pořadí), tento výsledek však nebyl signifikantní.

## Vliv cytokinů na osteoklastogenezi



**Graf 7:** Vliv cytokinů na osteoklastogenezi.

Vertikální čára uvnitř boxu představuje medián, hranice boxu znázorňují 25. a 75. percentil, vousy maximální a minimální hodnotu. Hvězdička značí signifikanci. Každý z bodů u kultivace s cytokiny značí výsledný průměr z jamek jedné kultivace vztažený k odpovídající kultivaci s HS. Zkratky: HS – sérum zdravých kontrol.

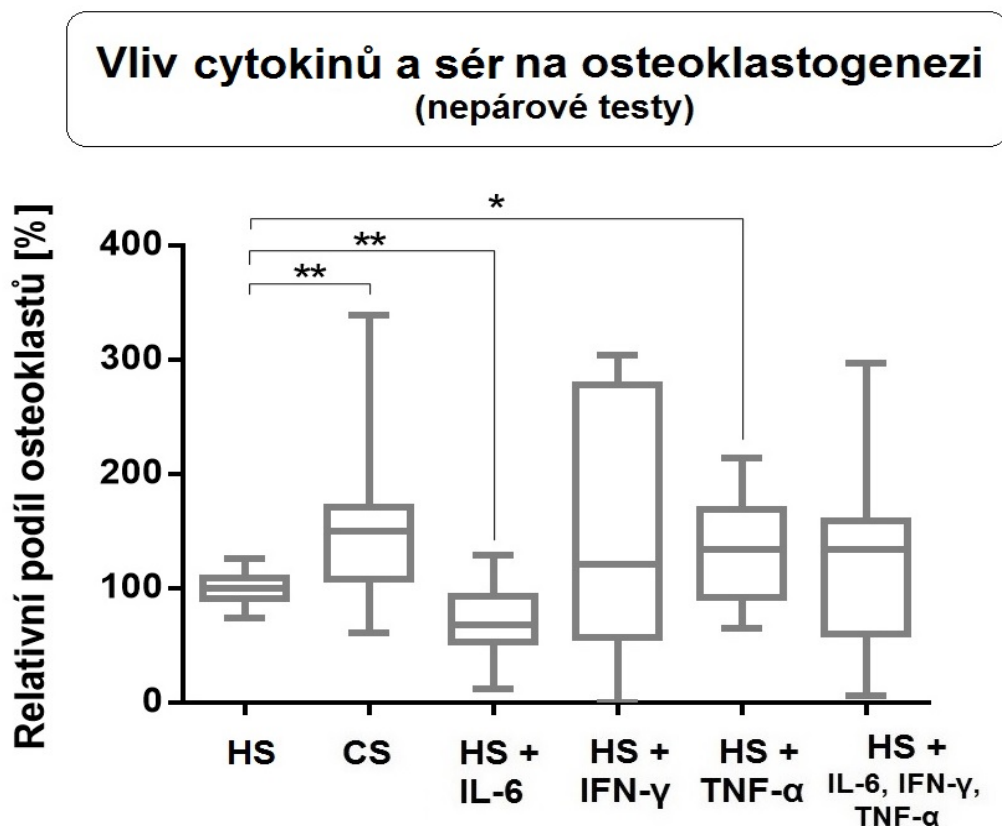
Hodnoty sloupců: **HS + IL-6**: medián 60,89, rozptyl 16,67 – 126, průměr 71,18; **HS + IFN- $\gamma$** : medián 131,7, rozptyl 5,45 – 295, průměr 149,4; **HS + TNF- $\alpha$** : medián 118,8, rozptyl 94,79 – 211,2, průměr 133,5; **HS + IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$** : medián 117,6, rozptyl 6,44 – 287,6, průměr 127,9. Všechny hodnoty jsou v %.

## 4.5. Vliv cytokinů a sér na osteoklastogenezi při zohlednění nepárovosti dat

Wilcoxonův test jsme pro vyjádření vlivu cytokinů a séra pacientů zvolili na základě toho, že v rámci jednoho experimentu byly použity na všechny jamky totožné buňky od jednoho jedince a předpokládáme tedy vzájemnou závislost získaných dat. V buněčných a tkáňových kultivacích je ale také relativně běžnou praxí, že se výsledek z každé jednotlivé

jamky (resp. odděleného kultivačního prostředí) považuje za samostatný nezávislý výsledek, a to i v případě, že jsou buňky stejného původu.

Data z mikroskopického hodnocení jsme tedy porovnali i s ohledem na možnost nepovažovat výsledky za párové. Zbylé dvě jamky po vyřazení třetí odchýlené nebyly v tomto případě průměrovány. Po ověření normality jsme výsledky porovnali t-testem s Welchovou korekcí nebo Mann-Whitney testem. Procentuální zvýšení či snížení bylo stejné jako u přechozích dvou grafů (stejná vstupní data, ale neprůměrovaná). Zvýšení relativních počtů osteoklastů v případě kultivace s CS a snížení při kultivaci s IL-6 bylo při použití nepárových testů statisticky významnější ( $P < 0,01$ ) a zvýšení při kultivaci s TNF- $\alpha$  bylo signifikantní ( $P < 0,05$ ). Body představující výsledky jednotlivých jamek nejsou pro přehlednost grafu vyznačeny.



**Graf 8:** Vliv cytokinů a sér na osteoklastogenezi při zohlednění nepárovosti dat.

Vertikální čára uvnitř boxu představuje medián, hranice boxu znázorňují 25. a 75. percentil, vousy maximální a minimální hodnotu. Linky nad grafy a hvězdičky znázorňují signifikance. Zkratky: HS – sérum zdravých kontrol, CS – sérum nově diagnostikovaných pacientů s celiakií.

Hodnoty sloupců: **HS**: medián 100, rozptyl 74,07 – 125,93, průměr 100; **CS**: medián 150,3, rozptyl 60,61 – 338,6, průměr 152,8; **HS + IL-6**: medián 67,46, rozptyl 12,12 – 129,2, průměr 71,18; **HS + IFN- $\gamma$** : medián 121,2, rozptyl 0 – 303,8, průměr 149,4; **HS + TNF- $\alpha$** : medián 133,8, rozptyl 64,36 – 213,7, průměr 133,5; **HS + IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$** : medián 134,2, rozptyl 5,94 – 296,9, průměr 127,9. Všechny hodnoty jsou v %.

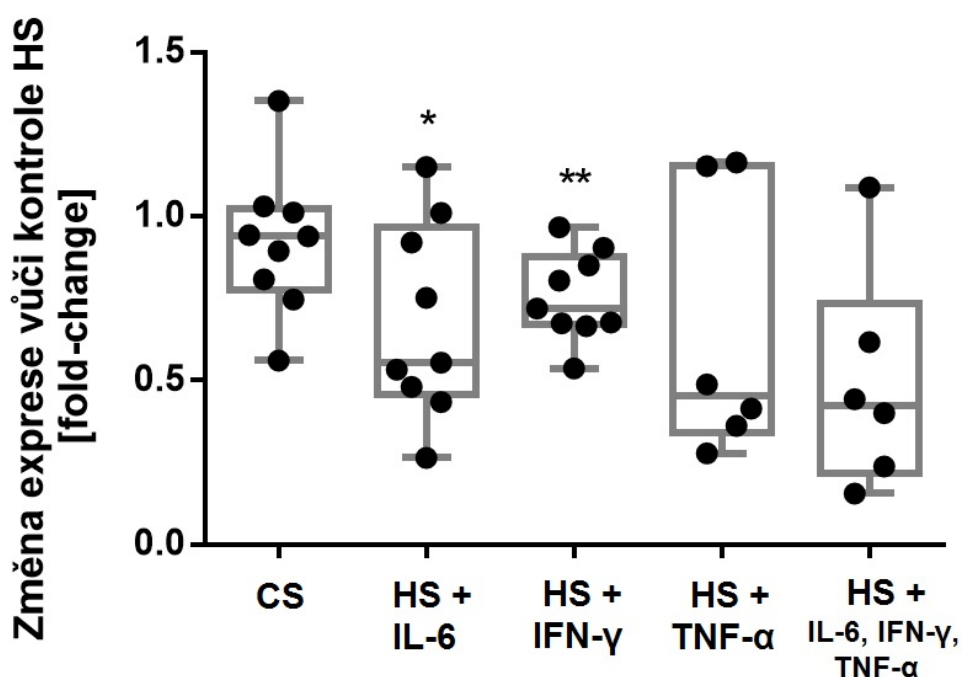
## 4.6. Vliv cytokinů a sér na genové exprese markerů osteoklastů

U kultivací v přítomnosti cytokinů a sér jsme souběžně analyzovali expresi charakteristických osteoklastových markerů *ACP5*, *CTSK* a *CALCR*. Předpokládali jsme, že míra exprese těchto markerů ukáže na celkovou aktivitu buněk. Hodnoty  $2^{-\Delta Ct}$  jsme porovnali v rámci každého experimentu a vyjádřili procentuální (relativní) zvýšení či snížení oproti kontrolní kultivaci s průměrem 100 %. Expresi jsme porovnávali pouze na základě párových testů, protože k průměrování jamek docházelo již na základě metodiky (smíchání buněčných lyzátů ze dvou jamek).

### 4.6.1. Exprese *ACP5*

Na základě Wilcoxonova párového testu jsme srovnali rozdíly exprese *ACP5* u kultivací s CS a cytokiny oproti kontrolním kultivacím s HS. Pozorovali jsme signifikantní ( $P < 0,05$ ) snížení exprese u kultivací s IL-6, kde byla exprese *ACP5* snížena v průměru o 32 % vůči kontrole, a vysoce signifikantní ( $P < 0,01$ ) snížení u kultivací s IFN- $\gamma$ , při nichž se exprese *ACP5* snížila vůči kontrole v průměru o 24 %. Celkovým trendem však bylo snížení exprese *ACP5* v přítomnosti všech testovaných faktorů.

## Vliv cytokinů a sér na expresi *ACP5*



**Graf 9:** Vliv cytokinů a sér na expresi *ACP5*.

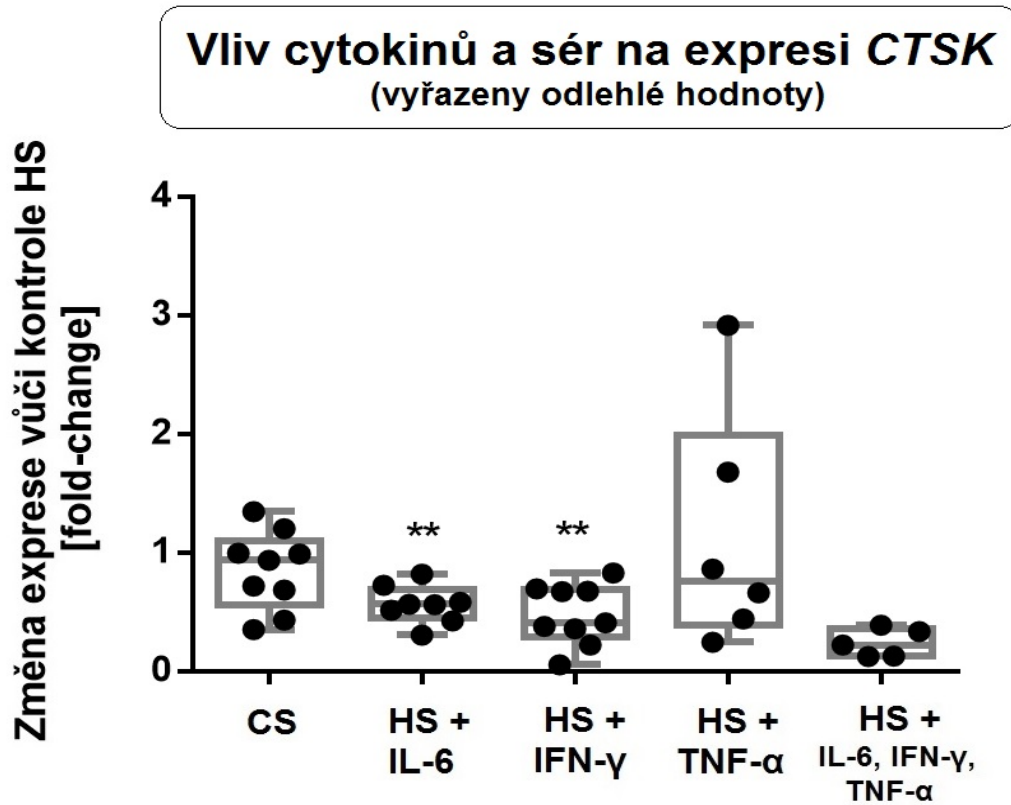
Vertikální čára uvnitř boxu představuje medián, hranice boxu znázorňují 25. a 75. percentil, vousy maximální a minimální hodnotu. Každý z bodů značí relativní zvýšení či snížení exprese vůči kontrole v rámci jednoho experimentu. Hvězdičky nad grafy znázorňují signifikance. Zkratky: HS – sérum zdravých kontrol, CS – sérum nově diagnostikovaných pacientů s celiakií.

Hodnoty sloupců: CS: medián 0,94, rozptyl 0,56 – 1,35, průměr 0,92; HS + IL-6: medián 0,56, rozptyl 0,26 – 1,15, průměr 0,68; HS + IFN- $\gamma$ : medián 0,72, rozptyl 0,54 – 0,97, průměr 0,76; HS + TNF- $\alpha$ : medián 0,45, rozptyl 0,28 – 1,16, průměr 0,64; HS + IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ : medián 0,42, rozptyl 0,16 – 1,09, průměr 0,49. Všechny hodnoty vyjadřují fold-change.

### 4.6.2. Exprese *CTSK*

Pro porovnání exprese *CTSK* jsme nejdříve Grubbsovým testem ( $\alpha = 0,05$ ) odstranili extrémní hodnoty. Wilcoxonovým párovým testem jsme následně srovnali rozdíly exprese *CTSK* u kultivací s CS a cytokiny oproti kontrolním kultivacím s HS. Pozorovali jsme vysoce signifikantní snížení exprese ( $P < 0,01$ ) u kultivací s IL-6, kde byla exprese *CTSK* snižena

v průměru o 44 % vůči kontrole, a u kultivací s IFN- $\gamma$ , při nichž se exprese *CTSK* snížila v průměru o 52 % vůči kontrole. Celkovým trendem bylo opět snížení exprese *CTSK* v přítomnosti všech testovaných faktorů.



**Graf 10:** Vliv cytokinů a sér na expresi *CTSK*.

Vertikální čára uvnitř boxu představuje medián, hranice boxu znázorňují 25. a 75. percentil, vousy maximální a minimální hodnotu. Každý z bodů značí relativní zvýšení či snížení exprese vůči kontrole v rámci jednoho experimentu. Hvězdičky nad grafy znázorňují signifikance. Zkratky: HS – sérum zdravých kontrol, CS – sérum nově diagnostikovaných pacientů s celiakií.

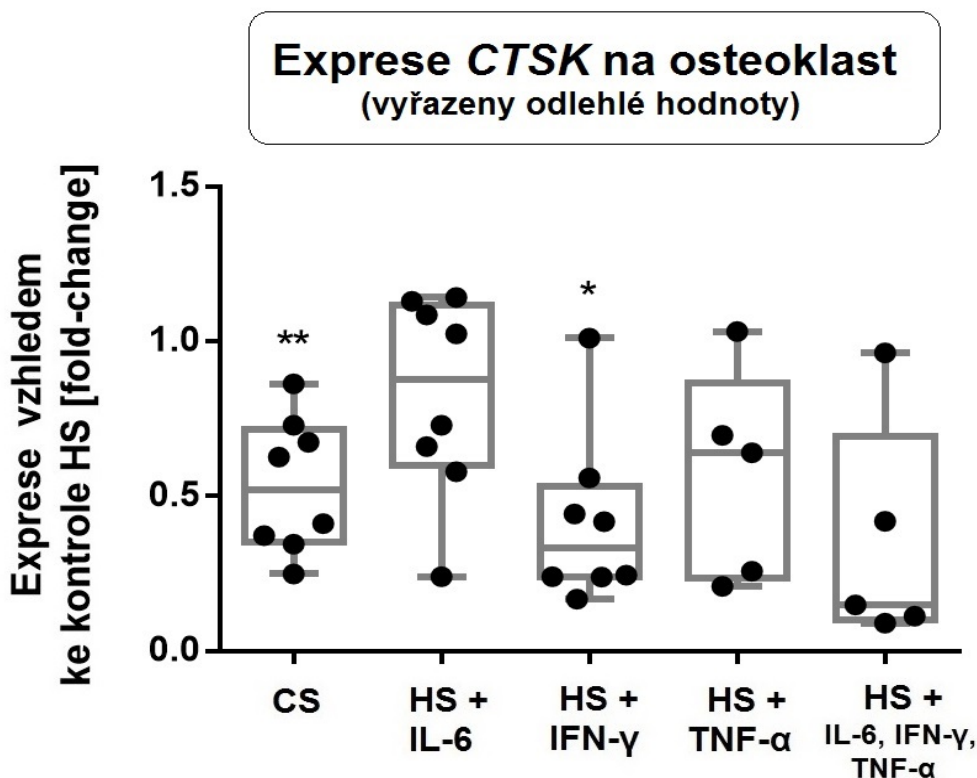
Hodnoty sloupců: CS: medián 0,93, rozptyl 0,35 – 1,35, průměr 0,85; HS + IL-6: medián 0,56, rozptyl 0,30 – 0,82, průměr 0,56; HS + IFN- $\gamma$ : medián 0,41, rozptyl 0,05 – 0,83, průměr 0,48; HS + TNF- $\alpha$ : medián 0,76, rozptyl 0,24 – 2,91, průměr 1,13; HS + IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ : medián 0,22, rozptyl 0,13 – 0,39, průměr 0,24. Všechny hodnoty vyjadřují fold-change.

#### 4.6.2.1. Exprese *CTSK* přepočtená na osteoklast

*CTSK* je v literatuře většinou považován za charakteristický i specifický protein vznikajících mnohjaderných polykaryonů (resp. osteoklastů). Srovnání míry exprese genu *CTSK* na počet osteoklastů by tedy mohlo přímo poukázat na aktivitu připadající na jeden osteoklast.

Pro toto porovnání jsme v rámci každého experimentu spojili data z mikroskopického hodnocení a analýzy expresí tak, že jsme nejprve vyjádřili expresi na osteoklast u kontrolní kultivace s HS jako hodnotu  $2^{-\Delta Ct}$ /průměrný počet osteoklastů a následně stejným způsobem i pro kultivace s cytokiny a CS. Vypočtené hodnoty pro kultivace s cytokiny a CS jsme v rámci každého experimentu vztáhli k vypočteným hodnotám u kontroly a vyjádřili procentuální (relativní) zvýšení či snížení oproti kontrolní kultivaci.

Stejně jako u celkové exprese *CTSK* jsme nejprve odstranili extrémní hodnoty Grubbsovým testem ( $\alpha = 0,05$ ) a souhrnné výsledky srovnali Wilcoxonovým párovým testem. Snížení průměrné exprese na osteoklast bylo vysoce signifikantní ( $P < 0,01$ ) u kultivací s CS, kde byla průměrná exprese *CTSK* na osteoklast snížena o 47 % a signifikantní ( $P < 0,05$ ) u kultivací s IFN- $\gamma$ , při nichž se průměrná exprese *CTSK* na osteoklast snížila o 58 % vůči kontrole. Kultivace se všemi ostatními cytokiny a jejich kombinací také vykazovaly trend snížení průměrné exprese na osteoklast.



**Graf 11:** Expresa *CTSK* přepočtená na osteoklast.

Vertikální čára uvnitř boxu představuje medián, hranice boxu znázorňují 25. a 75. percentil, vousy maximální a minimální hodnotu. Každý z bodů značí relativní zvýšení či snížení exprese na osteoklast vůči kontrole v rámci jednoho experimentu. Hvězdičky nad grafy znázorňují signifikance. Zkratky: HS – sérum zdravých kontrol, CS – sérum nově diagnostikovaných pacientů s celiakií.

Hodnoty sloupců: CS: medián 0,52, rozptyl 0,25 – 0,86, průměr 0,53; HS + IL-6: medián 0,88, rozptyl 0,24 – 1,14, průměr 0,82; HS + IFN- $\gamma$ : medián 0,33, rozptyl 0,17 – 1,01, průměr 0,42; HS + TNF- $\alpha$ : medián 0,64, rozptyl 0,21 – 1,03, průměr 0,57; HS + IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ : medián 0,15, rozptyl 0,09 – 0,96, průměr 0,35. Všechny hodnoty vyjadřují fold-change.

#### 4.6.3. Expresa *CALCR*

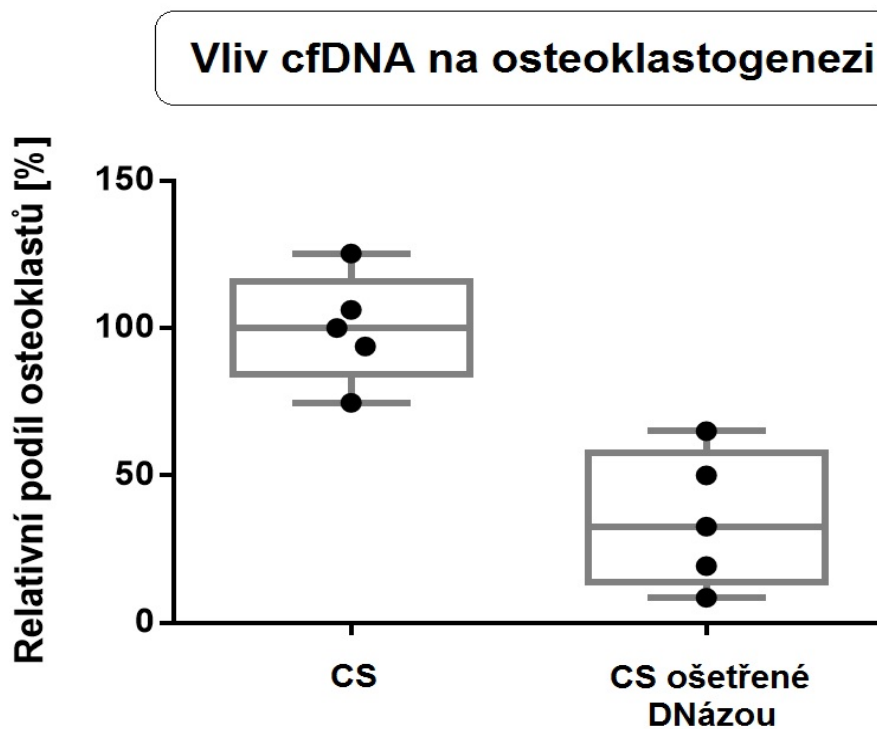
Průměrná prahová hodnota fluorescence mean Ct naměřená pro *CALCR* byla ve všech měřeních vyšší než 35. Zachycené signály nad Ct > 35 nejsou obecně považovány za věrohodné z důvodů nespecifických reakcí při qPCR analýze. U většiny vzorků byla

směrodatná odchylka vyšší než 0,16 a u některých vzorků nebyl signál vůbec zachycen. Z tohoto důvodu jsme expresi *CALCR* dále statisticky nezpracovávali.

## 4.7. Vliv cfDNA na osteoklastogenezi

Pro zjištění, zda cfDNA ovlivňuje proces osteoklastogeneze, jsme po provedení příslušných optimalizací (viz kap. 3.10.2.) přistoupili ke kultivacím se séry CS, ve kterých jsme ošetřením DNázou zničili cfDNA. Pro kontrolní kultivaci byla použita stejná neošetřená séra.

Bylo provedeno 5 nezávislých experimentů, při nichž v nepřítomnosti cfDNA (po ošetření séra DNázou) vzniklo v průměru o 65 % méně osteoklastů, jinak řečeno přítomnost cfDNA z použitých vzorků séra vedla v kultivacích ke vzniku přibližně trojnásobku osteoklastů oproti tomu, kdy cfDNA nebyla přítomna. Tento výsledek byl na základě Wilcoxonova párového testu těsně nad hranicí statistické signifikance ( $P = 0,0625$ ), což je dáno charakterem tohoto testu, který k označení rozdílů za statisticky významné požaduje nejméně 6 nezávislých hodnot.



**Graf 12:** Vliv cfDNA na osteoklastogenezi.

Vertikální čára uvnitř boxu představuje medián, hranice boxu znázorňují 25. a 75. percentil, vousy maximální a minimální hodnotu. Každý z bodů u kultivace s cfDNA značí výsledný průměr z jamek jedné kultivace vztažený k odpovídající kultivaci s HS. Pro názornost grafu jsou vyznačeny také rozptyly v rámci samotné kontroly (CS), ačkoliv pro výpočet rozdílu CS a ošetřené CS byl použit u kontroly vždy průměr 100 %. Zkratky: CS – sérum nově diagnostikovaných pacientů s celiakií.

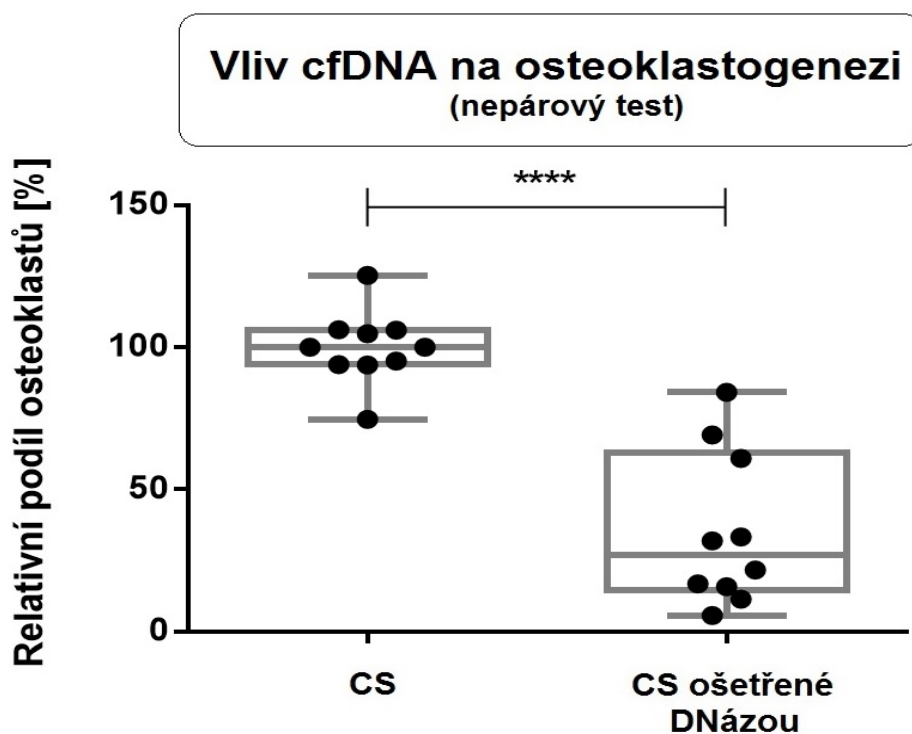
Hodnoty sloupců: CS: medián 100, rozptyl 74,74 – 125,26, průměr 100; CS ošetřené DNázou: medián 32,64, rozptyl 8,57 – 65,02, průměr 35,1. Všechny hodnoty jsou v %.

#### 4.7.1. Vliv cfDNA na osteoklastogenezi při zohlednění nepárovosti dat

Stejně jako při srovnání vlivu cytokinů a sér na osteoklastogenezi jsme i výsledky z cfDNA porovnali s ohledem na možnost, že je lze srovnávat jako nepárová data. Podobně jako v prvním popsaném případě nebyly zbylé dvě jamky po vyřazení třetí odchýlené v tomto

případě průměrovány a po vztažení ke kontrole v rámci experimentu s nimi bylo v souhrnném grafu dále nakládáno jako s nezávislými výsledky.

Pro celkové srovnání jsme nejprve ověřili normalitu dat a na jejím základě jsme souhrnná data porovnali t-testem s Welchovou korekcí. Tímto testem byl průměrně trojnásobný počet osteoklastů v přítomnosti cfDNA vyhodnocen jako velmi vysoce signifikantní ( $P < 0,0001$ ).



**Graf 13:** Vliv cfDNA na osteoklastogenezi při zohlednění nepárovosti dat.

Vertikální čára uvnitř boxu představuje medián, hranice boxu znázorňují 25. a 75. percentil, vousy maximální a minimální hodnotu. Linky nad grafy a hvězdičky znázorňují signifikance. Body v tomto případě značí jednotlivé neprůměrované jamky. Zkratky: CS – sérum nově diagnostikovaných pacientů s celiakií.

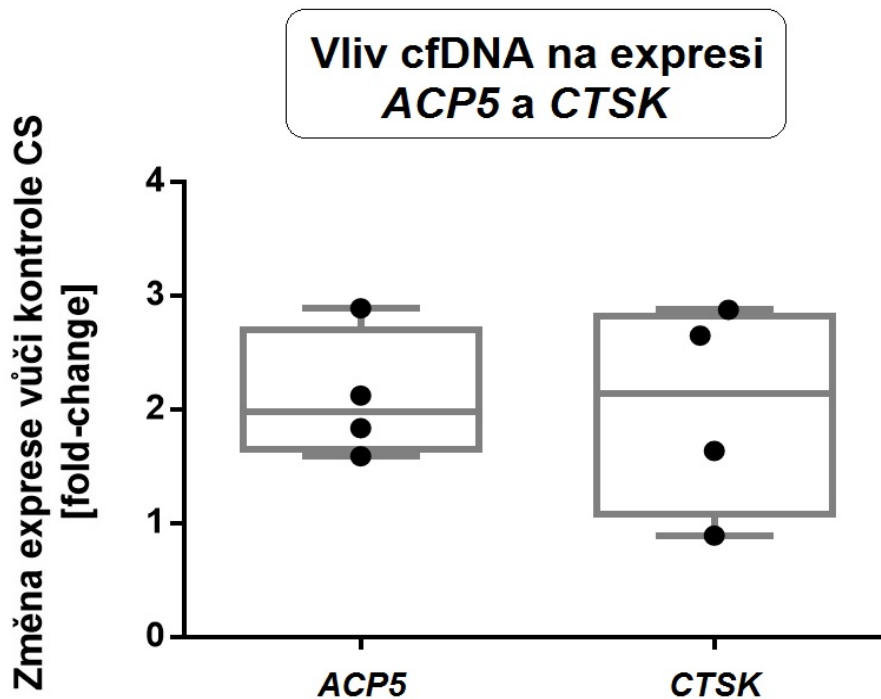
Hodnoty sloupců: CS: medián 100, rozptyl 74,74 – 125,26, průměr 100; CS ošetřené DNázou: medián 26,82, rozptyl 5,71 – 84,21, průměr 35,1. Všechny hodnoty jsou v %.

## 4.8. Vliv cfDNA na genové exprese markerů osteoklastů

U kultivací v přítomnosti či nepřítomnosti cfDNA (resp. ošetřeného a neošetřeného séra) jsme také souběžně analyzovali expresi charakteristických osteoklastových markerů *ACP5*, *CTSK* a *CALCR*. Předpokládali jsme, že míra exprese těchto markerů ukáže na celkovou aktivitu buněk. Hodnoty  $2^{-\Delta Ct}$  jsme porovnali v rámci každého experimentu a vyjádřili procentuální (relativní) zvýšení či snížení oproti kontrolní kultivaci s průměrem 100 %.

Při qPCR analýze nebyla u jednoho ze vzorků detekována exprese endogenní kontroly *HPRT1* a velmi špatně detekována exprese ostatních sledovaných genů. Z tohoto důvodu byly daný vzorek i jemu odpovídající kontrola vyřazeny. Vzhledem k malému počtu konečných výsledků pro srovnání nebyla provedena statistická analýza a následující graf tedy slouží pouze pro ilustraci trendů.

U *ACP5* i *CTSK* jsme pozorovali výrazný trend zvýšení celkové exprese v kultivacích bez cfDNA (se séry ošetřenými DNázou). Expresi *CTSK* na osteoklast jsme z důvodu nízkého počtu dat nevyjadřovali.



#### **Graf 14:** Vliv cfDNA na expresi *ACP5* a *CTSK*.

Vertikální čára uvnitř boxu představuje medián, hranice boxu znázorňují 25. a 75. percentil, vousy maximální a minimální hodnotu. Každý z bodů značí relativní zvýšení či snížení exprese vůči kontrole v rámci jednoho experimentu.

Hodnoty sloupců: *ACP5*: medián 1,98, rozptyl 1,59 – 2,89, průměr 2,11; *CTSK*: medián 2,14, rozptyl 0,89 – 2,88, průměr 2,01. Všechny hodnoty vyjadřují fold-change.

### 4.8.1. Exprese *CALCR*

Stejně jako v případě studia efektu cytokinů byla u většiny vzorků detekována nízká exprese *CALCR* a z tohoto důvodu jsme výsledky exprese *CALCR* dále nezpracovávali.

## 5. Diskuze

V naší práci jsme se zaměřili na zánětlivé prostředí jakožto možnou příčinu zvýšené osteoklastogeneze a s ní souvisejícího vyššího rizika rozvoje osteoporózy u zánětlivých chorob. Tento mechanismus jsme ověřovali na modelu celiakie, a dále obecně v souvislosti se zánětlivými faktory (TNF- $\alpha$ , IL-6 a IFN- $\gamma$ , cfDNA) charakteristickými pro mnohá zánětlivá onemocnění.

Séra námi získaných skupin nově diagnostikovaných pacientů s celiakií a věkově a pohlavím odpovídajících pacientů na dietě a zdravých kontrol se významně nelišila v koncentraci žádného ze sledovaných zánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-6 a IFN- $\gamma$ , jejichž zvýšené hladiny jsme předpokládali u obou skupin pacientů, zejména pak u skupiny nově diagnostikovaných pacientů s probíhajícím střevním zánětem. Toto zjištění je v rozporu s naším předpokladem i s dosavadním výzkumem, v němž byly popsány významně zvýšené hladiny těchto cytokinů u pacientů s celiakií (Cataldo et al., 2003; Taranta et al., 2004; Manavalan et al., 2010)

V případě IL-6 a IFN- $\gamma$  byla většina námi naměřených koncentrací pod detekčním limitem. Z práce Manavalan et al. (2010) však vyplývá, že nízké koncentrace cytokinů v séru, včetně TNF- $\alpha$ , nejsou u jednotlivých skupin výjimečné a velká část výsledků se často nachází pod hladinou detekce. Skupiny pacientů se pak ve srovnání se zdravými kontrolami zdají být charakterizované větším počtem jedinců s detekovatelnými hladinami, z nichž některé jsou zároveň velmi výrazně zvýšené. Medián koncentrací pod hladinou detekce je pro některé cytokiny charakteristický také při užití námi zvolené Bio-Plexové analýzy (Chapman et al., 2010).

Nejpravděpodobnější příčinou nenalezení rozdílu mezi skupinami je v našem případě malý počet srovnávaných vzorků. Pokud uvažujeme, že jsou rozdíly spíše než celkovým zvýšením koncentrací cytokinů u většiny pacientů způsobeny zvýšením počtu jedinců s detekovatelnou koncentrací příslušných cytokinů v séru a výrazným zvýšením koncentrací u několika málo jedinců, pak by záchyt tohoto rozdílu dost možná vyžadoval skupiny tvořené nejméně několika desítkami jedinců.

Fakt, že se u některých pacientů projeví zvýšené hladiny zánětlivých cytokinů, zatímco jiní se od vzorku zdravých jedinců v tomto ohledu neodlišují, je třeba zvážit i

v souvislosti s osteoklastogenezí a zvýšeným rizikem rozvoje osteoporózy. Znamenalo by to totiž, že pokud lze hlavní roli zvýšené diferenciaci monocytů v osteoklasty při zánětu přisoudit právě zánětlivým cytokinům, pak by se toto riziko týkalo jen určité vyhraněné skupiny pacientů s celiakií, u nichž z dosud neznámého důvodu oproti ostatním dojde k zánětlivým projevům na periferii. Otázka, zda se zánět ve střevě běžně projevívá v periferní krvi, je ostatně jednou z největších kontroverzí obestírajících celiakii. Na jednu stranu se zdá, že u lymfocytů v periferní krvi pacientů s celiakií dochází ke zvýšené aktivaci (Millimaggi et al., 2001). Z jiné studie ale plyne, že Th lymfocytární odpověď v periferní krvi pacientů téměř nereflktuje tu nalézanou ve střevě (Lahdenperä et al., 2011).

Podobně jako u cytokinů jsme ani v koncentracích cfDNA nezjistili rozdíl mezi skupinou nově diagnostikovaných pacientů a jim odpovídajících kontrol. Je možné, že při apoptóze střevní sliznice nedochází k uvolnění DNA do extracelulárního prostoru v takové formě, aby se následně mohla dostávat do krve jako cfDNA. Jinou možností je, že se tato DNA do krve dostává, ale její přítomnost by se mohla projevit kvalitativními změnami cfDNA, například zastoupením GC párů. V této studii jsme potenciální kvalitativní změny cfDNA u pacientů oproti kontrolám nezjišťovali, a proto nemůžeme možnost takových odlišností vyloučit.

I přesto, že jsme mezi skupinami nepozorovali zvýšení koncentrace žádného z předpokládaných ani hypotetizovaných hlavních zánětlivých faktorů v osteoklastogenezi, při kultivacích se séry nově diagnostikovaných pacientů vzniklo v průměru o 53 % více osteoklastů, než v kontrolních kultivacích se séry zdravých kontrol. Tento efekt je sice mnohonásobně nižší než ten, který pozorovali Taranta et al. (2004), ale při zohlednění toho, že dysbalance v osteoklastogenezi mohou probíhat v řádu let až několika desítek let, se rozhodně stále jedná o potenciální efekt biologicky velmi významný.

Je také možné, že rozdíl v efektech mezi studiemi je způsoben rozdíly metodiky, a to jak samotného kultivačního postupu, tak především použitím různého množství séra. V naší práci jsme zvolili použití 20 % séra (10 % FBS a 10 % studované lidské sérum) na základě pozorování, že samotné zvýšení objemu séra z 10 % na 20 % vede k výrazné podpoře diferenciaci monocytů v osteoklasty. Je však možné, že se při tomto experimentálním postupu zároveň proporčně sníží velikost pozorovatelných efektů. Otázkou zůstává, který z modelů je schopen lépe napodobit *in vivo* podmínky. Použití různých objemů séra bude třeba s ohledem na tuto otázku revidovat.

Přes diskutovaný nesoulad v proporcionalitě efektů je 53% zvýšení osteoklastogeneze při kultivaci se sérem pacientů velmi významné například i po zohlednění efektů rekombinantních cytokinů na osteoklastogenezi, které v průměru podporovaly či inhibovaly osteoklastogenezi v řádech desítek procent zvýšení či snížení. To by ukazovalo na možnost, že v séru nově diagnostikovaných pacientů existuje další faktor či faktory, které přímo podporují diferenciaci monocytů v osteoklasty a že jejich vliv by mohl být podobně významný, jako vliv sledovaných cytokinů. K jeho či jejich projevu by zároveň mohlo docházet i u pacientů bez nálezu charakteristického zánětu v periferní krvi, což by do rizika osteoporózy potenciálně stavělo širší skupinu pacientů s celiakií. Co konkrétně tento faktor či faktory jsou, nedokážeme v tuto chvíli říci, ale pravděpodobně nebude či nebudou přímo souviset s aktivací periferních lymfocytů (např. produkce jiných prozánětlivých cytokinů či posun poměru RANKL/OPG), ke které, soudě podle koncentrací charakteristických zánětlivých cytokinů, v našich skupinách nedošlo. Paradoxně by se zde mohly projevat například efekty malabsorpce přímo na *in vitro* diferenciaci osteoklastů, což by mohlo v budoucnu potvrdit ověření vlivu séra pacientů na dietě.

Proti pozorovanému výsledku z mikroskopického hodnocení osteoklastogeneze v přítomnosti séra pacientů s celiakií částečně stojí výsledek z měření genových expresí, z něhož vyplývá, že při této kultivaci dochází ke snížení exprese *CTSK* na osteoklast o 47 %. Celková změna exprese *ACP5* a *CTSK* nebyla oproti kontrolní kultivaci významná. Z tohoto výsledku by mohlo vyplynout, že při kultivaci se sérem pacientů s celiakií vzniklo o 53 % více osteoklastů, které byly ale zároveň méně aktivní. Možnost, že byly v tomto případě vznikající osteoklasty skutečně méně aktivní než u kontroly, nelze vyloučit. Na výsledky měření genových expresí je však z několika důvodů třeba nahlížet s velkou obezřetností.

Trend snížení celkové exprese *ACP5* i *CTSK* jsme pozorovali téměř u všech kultivací se všemi druhy faktorů. Zároveň změření RNA v určitém bodu kultivace nemusí vypovídat o tom, jak velká část z této RNA je skutečně translatována, kolik proteinu je následně sekretováno z buňky, nebo jak velkou aktivitu již buňka vyvinula po dobu před měřením. Toto platí obzvláště u složitějších kultivací, za kterou 14denní diferenciaci osteoklastů nepochybně lze považovat. Do třetice bylo v našem případě u všech faktorů velmi patrné snížení celkové exprese i exprese na osteoklast v souvislosti s množstvím osteoklastů, zejména pak při ošetřování séra DNázou, kde byl pozorovatelný trend až dvojnásobného snížení expresí *ACP5* a *CTSK* při současném trojnásobně větším počtu osteoklastů. I z tohoto důvodu usuzujeme na to, že mohou být pozorované rozdíly v expresích do značné míry

způsobeny aktuálními kultivačními podmínkami v době izolace RNA z buněk. Tuto tezi nepřímo podporuje například výzkum Bernhardta et al. (2017), kteří zjistili odlišnou aktivitu a expresi ACP5 a CTSK v závislosti na pH kultivačního prostředí.

U všech kultur jsme navíc velmi špatně nebo vůbec nedetekovali expresi *CACLR*, což mohlo být způsobeno specifitou reakcí, kdy daná mRNA byla v buňkách přítomna, ale naší metodikou jsme nebyli schopni její expresi zachytit, nebo naopak mohlo být přítomno velmi malé nebo žádné množství *CACLR* mRNA. Druhé možnosti do určité míry nahrává použití dvou různých kitů pro qPCR, kdy v obou případech byla detekována nízká exprese tohoto genu.

Charakteristická exprese *CACLR* je tradičně přiřítána osteoklastům vznikajícím z HSC v kostní dřeni. Dle našeho vědomí není známo, zda se osteoklasty vznikající z prekurzorů v periferní krvi mohou v expresi tohoto markeru nějakým způsobem lišit. Tato odlišnost, pokud existuje, by mohla mít zásadní důsledky pro chápání osteoklastogeneze při zánětlivých stavech, protože by mohla znamenat, že jsou osteoklasty vznikající z periferních prekurzorů méně přístupné systémové hormonální regulaci. Na druhou stranu by změněná exprese mohla být dána také *in vitro* kultivačními podmínkami. Ukazuje se totiž, že osteoklasty kultivované *ex vivo* na kostním podkladu se od osteoklastů na polystyrenovém povrchu liší mimo jiné v míře maturace, kdy u osteoklastů na kostním podkladu na rozdíl od plastu dochází k výrazné tvorbě těsnicí zóny (Kleinhans et al., 2015), což by mohlo souviset právě i s expresí *CACLR*.

Co se týká vlivu cytokinů na osteoklastogenezi, v případě TNF- $\alpha$  naše výsledky podporují přímou stimulační roli na diferenciaci monocytů, která je ve výzkumu již relativně dlouho a dobře rozpoznána. Zhruba 34% zvýšení počtu osteoklastů však není dle párových testů statisticky dobře podloženo a potvrzení tohoto efektu by žádalo rozšíření počtu experimentů.

Při kulturách s IL-6 naopak došlo k významnému snížení průměrného počtu osteoklastů o 27 %, což ukazuje na to, že v našem modelu měl IL-6 přímý inhibiční efekt na osteoklastogenezi. Z genových expresí osteoklastových markerů při stimulaci IL-6 je patrné, že při současném výrazném snížení celkové exprese *ACP5* i *CTSK* došlo pouze k mírnému a ze všech faktorů nejméně výraznému snížení exprese *CTSK* na osteoklast. I když je nutné i v tomto případě zaujmout k výsledkům expresí rezervovaný postoj, tento nesoulad

v expresích unikátní pouze pro IL-6 by mohl naznačovat efekt, kdy IL-6 brání fúzi prekurzorů v mnohojaderné osteoklasty, ale neovlivňuje expresi funkčních genů.

Ať už je výklad tohoto pozorovaného efektu jakýkoliv, zjištěná inhibiční role IL-6 v osteoklastogenezi stojí proti všeobecně přijímanému stimulačnímu vlivu zánětlivého prostředí na diferenciaci osteoklastů. Znamenalo by to totiž, že na prekurzory osteoklastů působí v tomto prostředí IL-6 protichůdně oproti ostatním faktorům. Klíčem pro vysvětlení tohoto nesouladu by mohly být nepřímé efekty, z nichž některé byly zmíněny již v teoretickém úvodu. Mimo tyto zmíněné efekty, mezi něž patří například aktivace lymfocytů a produkce dalších zánětlivých faktorů, stimulace produkce RANKLu u osteoblastů nebo zabránění maturace osteoblastů a následná snížená novotvorba, byl nově zjištěn také další potenciálně velmi významný efekt v souvislosti s osteocyty, které po stimulaci IL-6 výrazně podporují osteoklastogenezi (Wu et al., 2017). Zdá se tedy, že přímý inhibiční vliv IL-6 na osteoklastogenezi může být v *in vivo* systému více než vynahrazen jeho nepřímou podporou osteoklastogeneze.

Velmi zajímavé výsledky plynou z kultivací s IFN- $\gamma$ , a to jak samostatně, tak v kombinaci s ostatními cytokiny. Výzkum posledních dvou desetiletí je silně zaměřen na zjištění rolí jednotlivých zánětlivých faktorů v osteoklastogenezi, jejichž role byly nejdříve ověřovány *in vitro* a následně v knock-out myších modelech a klinických testech látek působících antagonisticky vůči těmto faktorům. Velmi malá pozornost se však doposud soustředí na to, jak tyto faktory působí, pokud jsou přítomny všechny společně a jakou roli tato komplexita zánětlivého prostředí tedy skutečně hraje v *in vivo* systému.

Při kultivacích s IFN- $\gamma$  a kombinací cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-6 a IFN- $\gamma$  jsme pozorovali trend zvýšení průměrného počtu osteoklastů. Ten však nebyl ani v jednom případě statisticky významný, což je způsobeno zejména vysokým rozptylem výsledných hodnot, dobře pozorovatelným především u IFN- $\gamma$ . Při kultivaci s tímto cytokinem došlo u monocytů od dvou jedinců k téměř úplné inhibici osteoklastogeneze, u tří jedinců k výrazné téměř trojnásobné stimulaci osteoklastogeneze, u monocytů od čtyř jedinců byly pozorovány mírnější stimulační či inhibiční efekty. Tyto výsledky nasvědčují tomu, že IFN- $\gamma$  má různé přímé vlivy na osteoklastogenezi, v našem případě v závislosti na konkrétním jedinci (resp. buňkách tohoto jedince). Takové zjištění se zdá být i v souladu se známým prozánětlivým i protizánětlivým charakterem IFN- $\gamma$  v imunitních reakcích (Mühl & Pfeilschifter, 2003) a také

s rozdílnými výsledky studií na vliv IFN- $\gamma$  na osteoklastogenezi (Yang et al., 2002; Kohara et al., 2011; Kim et al., 2012).

V jednom ze dvou experimentů, při němž došlo v přítomnosti samotného IFN- $\gamma$  k téměř úplné inhibici osteoklastogeneze, jsme současně prováděli i kultivaci se všemi ostatními cytokiny, včetně jejich kombinace. V tomto experimentu došlo současně k téměř kompletní inhibici osteoklastogeneze v přítomnosti kombinace cytokinů, a to přesto, že TNF- $\alpha$  a IL-6 samostatně každý vykazovaly svůj běžný efekt. U druhého z experimentů, kde došlo k inhibici cytokinem IFN- $\gamma$ , bohužel současně nebyla z důvodu nedostatku buněk provedena paralelní kultivace s kombinací cytokinů. Toto pozorování bude tedy do budoucna vhodné zopakovat.

S ohledem na podobné rozptyly v počtu osteoklastů u stimulací se samotným IFN- $\gamma$  i jeho kombinací s ostatními cytokiny, celkově velmi odlišné efekty IFN- $\gamma$  v závislosti na buňkách od konkrétních jedinců a výše popsaný případ inhibičního efektu, se nabízí k prozkoumání možnost, že by IFN- $\gamma$  mohl fungovat jako hlavní regulátor osteoklastogeneze v komplexním zánětlivém prostředí a že jeho efekt na osteoklastogenezi by mohl být u každého člověka specifický.

Zásadní role IFN- $\gamma$  a jeho dominantní efekt v „cytokinové hierarchii“ byly popsány například u diferenciaci odontoblastů z MSC, kde inhibiční efekt IFN- $\gamma$  bránil spuštění diferenciaci i v přítomnosti jejích silných aktivátorů (Zha et al., 2017). U pacientů s RA dochází ke změnám v expresích *IFNGR1* a *IFNGR2* u buněk v periferní krvi, přičemž zvýšená exprese druhého zmíněného genu je současně spjata se závažností choroby (Tang et al., 2015). V případě SLE jsou popsány polymorfismy *IFNGR1* a *IFNGR2*, které se mohou podílet na riziku rozvoje patologie a souvisí nejspíše se snížením funkčnosti receptoru IFN- $\gamma$  (Nakashima et al., 1999). Zjištění z těchto výzkumů tedy také poukazují na významné role IFN- $\gamma$ , které by měly být v souvislosti s osteoklastogenezí dále zkoumány.

Poslední ze zánětlivých agens, na které jsme se v naší studii zaměřili, byla cfDNA. Pro ověření jejího účinku jsme využívali DNázu, s jejíž pomocí jsme v příslušných vzorcích zničili přítomnou cfDNA. Tento postup nám současně umožnil zachovat všechny zbylé faktory séra. Použití DNázy si vyžádalo časově náročné optimalizace, a proto byla provedena pouze pilotní studie na pěti nezávislých experimentech. Pro tuto studii jsme použili sérum nově diagnostikovaných pacientů, u kterých jsme i přes nezjištění kvantitativní odlišnosti oproti zdravým kontrolám očekávali nejvyšší pravděpodobnost pozorování efektu cfDNA

(např. kvůli jejím možným kvalitativním odlišnostem, které byly již popsány u RA (Veiko et al., 2006)).

Experimenty s touto cfDNA skutečně naznačují její úlohu v diferenciaci monocytů v osteoklasty, protože v její přítomnosti byl pozorovatelný trend až trojnásobně vyšší tvorby osteoklastů oproti tomu, kdy byla ze séra odstraněna. Do budoucna bude však nutné tento efekt potvrdit či vyvrátit na větší skupině jedinců a zároveň revidovat použití DNázy, jejíž samotný vliv jsme sice po optimalizacích a úpravě protokolu nepotvrdili, ale pro jistotu tohoto tvrzení bude třeba provést více nezávislých kontrolních experimentů. Pokud by se potvrdilo, že je pozorovaný efekt skutečně způsoben cfDNA, pak by bylo vhodné účinky cfDNA otestovat také u zdravých kontrol a výsledky porovnat pro případné odlišnosti. Zároveň je pro tento případ nutné zvážit i použití materiálu od pacientů, kde jsou kvalitativní i kvantitativní změny na rozdíl od celiakie dobře popsány, např. u RA nebo SLE.

## 6. Závěr

V rámci této práce jsme se na modelu celiakie zaměřili na potenciální význam osteoklastogeneze při rozvoji osteoporózy u zánětlivých onemocnění. Srovnali jsme koncentrace cfDNA a zánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-6 a IFN- $\gamma$  u pacientů s celiakií a zdravých kontrol. Séra těchto pacientů a kontrol jsme využili v kultivacích pro zjištění efektu předpokládaného zánětlivého prostředí na schopnost monocytů diferencovat v osteoklasty. V rámci kultivací jsme dále sledovali vlivy přidaných rekombinantních cytokinů a naše zjištění konfrontovali se současnými znalostmi i s aplikovaným modelem. Provedli jsme také pilotní experimenty pro ověření námi hypotetizovaného vlivu cfDNA na osteoklastogenezi. Na základě zpracovaných výsledků jsme dospěli k těmto hlavním závěrům:

- Skupiny nově diagnostikovaných pacientů s celiakií, pacientů s celiakií na dietě a zdravých kontrol se významně neodlišovaly v koncentraci TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  a cfDNA v plazmě nebo séru.
- Sérum nově diagnostikovaných pacientů s celiakií i přes neodlišnost hladin charakteristických zánětlivých faktorů v krvi výrazně podporovalo osteoklastogenezi, když v jeho přítomnosti vzniklo v průměru o 53 % více osteoklastů než u séra zdravých kontrol.
- Efekty cytokinů na osteoklastogenezi nepřesáhly nebo byly nižší než pozorovaný efekt séra, což by naznačovalo, že faktor či faktory v séru pacientů zodpovědné za zvýšenou osteoklastogenezi mohou být v rámci celiakie velmi významné. Tento význam by se však nemusel týkat jiných zánětlivých chorob.
- V případě IL-6 jsme pozorovali přímý inhibiční efekt na osteoklastogenezi. Trendem u TNF- $\alpha$  byla stimulace osteoklastogeneze, jejíž potvrzení by však vyžadovalo rozšíření souboru experimentů.
- U IFN- $\gamma$  jsme pozorovali výrazné stimulační i inhibiční efekty na osteoklastogenezi, které se zdají být závislé na buňkách konkrétních dárců. Zdá se také, že by IFN- $\gamma$  mohl hrát významnou roli v modulaci efektu ostatních cytokinů na osteoklastogenezi.
- V pilotních experimentech měla cfDNA výrazné pozitivní účinky na osteoklastogenezi. Tento efekt je třeba dále prověřit na větším vzorku a zároveň revidovat správnost námi užitými metodami.

Z naší práce zároveň plynou tato zjištění ohledně metodiky:

- Je třeba důkladně zvážit a prověřit použití různých objemů séra při *in vitro* kultivacích osteoklastů.
- Zdá se, že měření expresí mRNA po 14denní kultivaci osteoklastů nevypovídá přesně o jejich celkové aktivitě a do budoucna by se jako vhodnější mohly ukázat jiné metody, jako například kvantitativní měření proteinů sekretovaných do média, či sledování resorpční aktivity osteoklastů.

Možné budoucí směry výzkumu při ověřování role zánětu v osteoklastogenezi, plynoucí z našich zjištění, jsou následující:

- Při hledání faktoru či faktorů zodpovědných za zvýšenou osteoklastogenezi v séru nově diagnostikovaných pacientů s celiakií ověřit také schopnost séra pacientů na dietě modulovat osteoklastogenezi, což by mohlo být vodítkem k nalezení těchto faktorů.
- Detailněji prozkoumat roli IFN- $\gamma$  v osteoklastogenezi jak samostatně, tak v komplexním zánětlivém prostředí s přítomností dalších zánětlivých cytokinů se známým vlivem na diferenciaci osteoklastů.
- Zaměřit se na roli IFN- $\gamma$  při diferenciaci v souvislosti s polymorfismy genů kódujících jeho receptor a dále expresí těchto genů v prekurzorech osteoklastů.
- Roli cfDNA prozkoumat na modelech, kde jsou potvrzeny její kvantitativní a kvalitativní změny, a pro ověření eventuálně použít i jinou přímější metodu, nezakládající se na použití DNázy.

# Seznam zkratek

1. LF UK	1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy
$\alpha$ -MEM	Minimum essential medium Eagle – alpha modification
<i>ACP5</i>	Gen kódující tartrát rezistentní kyselou fosfatázu
AP1	Aktivační protein 1
APC	Antigen prezentující buňky
aPKC	Atypická protein kináza C
<i>B2M</i>	Gen kódující beta 2 mikroglobulin
BLC	Bone-lining cells
BMD	Hustota kostní tkáň
<i>CALCR</i>	Gen kódující receptor pro calcitonin
CALCR	Receptor pro calcitonin
CD (např. CD16)	Marker diferenciační skupiny
cDNA	Komplementární DNA
cfDNA	Volná cirkulující DNA
c-Fos	c-Fos protein
CS/CP	Sérum/plazma nově diagnostikovaných pacientů s celiakii
CSF1R	Receptor kolonie stimulujícího faktoru
Ct	Prahová hodnota fluorescence
<i>CTLA4</i>	Gen kódující s T-lymfocyty asociovaný antigen
CTSK	Kathepsin K
<i>CTSK</i>	Gen kódující kathepsin K
DAMP	Molekuly asociované s neinfekčním zánětem

<i>DCSTAMP</i>	Gen kódující Dendrocyte expressed seven transmembrane protein
DC-STAMP	Dendrocyte expressed seven transmembrane protein
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ESPGHAN	Evropská společnost pro dětskou gastroenterologii, hepatologii a výživu
Fas	Fas receptor
FasL	Fas ligand
FBS	Fetal bovine serum
FM	Fyziologický materiál
Gab2	GRB2-associated-binding protein 2
GC	Guanino-cytosinové páry
GFS/GFP	Sérum/plazma pacientů s celiakií na dietě
gp130	Glykoprotein 130
HBSS	Hank's balanced salt solution
HLA-DQ (např. HLA-DQ2)	Receptory hlavního histokompatibilního systému
<i>HLA-DQ</i> (např. <i>HLA-DQ2</i> )	Geny kódující receptory hlavního histokompatibilního systému
HMGB1	High-mobility group box 1 protein
<i>HPRT1</i>	Gen kódující hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázu
HS/HP	Sérum/plazma zdravých kontrol
HSC	Hematopoetické kmenové buňky
IFNGR (např. IFNGR1)	Receptor interferonu gama
<i>IFNGR</i> (např. <i>IFNGR1</i> )	Gen kódující receptor interferonu gama

IFN- $\gamma$	Interferon gama
Ig (např. IgA)	Imunoglobulin
IKK	I kappa B kináza
IL (např. IL-6)	Interleukin
IL6R	Receptor interleukinu 6
IRAK1	S interleukinovým receptorem asociovaná kináza 1
JAK	Janusova kináza
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LG	L-glutamin
LPS	Lipopolysacharidy
MAP	Mitogen activated protein kinase
M-CSF	Makrofágový kolonie stimulující faktor
MKK6	Mitogen activated protein kinase
mRNA	Messenger ribonukleová kyselina
MSC	Mezenchymální kmenové buňky
MyD88	MyD88 protein
<i>MYO9B</i>	Gen kódující nekonvenční myosin 9B
NASPGHAN	Severoamerická společnost pro dětskou gastroenterologii, hepatologii a výživu
NFAT (např. NFATc1)	Jaderný faktor aktivovaných T-buněk
NF- $\kappa$ B	Jaderný faktor kappa B
NK	Natural killer buňky
OPG	Osteoprotegerin
p38	Proteinová kináza p38
p62	Protein 62
PAMP	Molekuly asociované s infekčním zánětem

PBM	Vrchol kostní hmoty
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Streptavidin-fykoeritrin
PFA	Paraformaldehyd
pH	Vodíkový exponent
PLCy2	Fosfolipáza Cy2
PMT (např. low PMT)	Photomultiplier tube
PS	Penicilin-Streptomycin
qPCR	Kvantitativní real-time polymerázová řetězová reakce
RA	Revmatoidní artritida
RACK1	Receptor aktivované kinázy C 1
RANK	Receptor-aktivátor jaderného faktoru kappa B
RANKL	Ligand receptor-aktivátoru jaderného faktoru kappa B
RNA	Ribonukleová kyselina
rpm	Otáčky za minutu
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute medium
RT	Pokožová teplota
RT PCR	Reverzně transkriptázová polymerázová řetězová
SLE	Systémový lupus erythematoses
sRANKL	Sekreční RANKL
STAT (např. STAT3)	Signal transducers and activators of transcription
TAB1	TAK1 binding protein 1
TAB2	TAK1 binding protein 2
TAK1	TGF- $\beta$ aktivovaná kináza 1

TLR (např. TLR9)	Toll-like receptory
TNF	Rodina faktorů nádorové nekrózy
TNFR (např. TNFR1)	Receptor faktoru nádorové nekrózy
<i>TNFSF11</i>	Gen kódující RANKL
TNF- $\alpha$	Faktor nádorové nekrózy alfa
TRAF6	S TNF receptorem asociovaný faktor 6
TRAP	Tartrát rezistentní kyselá fosfatáza
tTG	Tkáňová transglutamináza
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice
Wnt5A	Wnt5A protein

## Seznam citované literatury

- Abu-Amer, Y., Abbas, S., & Hirayama, T. (2004). TNF receptor type 1 regulates RANK ligand expression by stromal cells and modulates osteoclastogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 93(5), 980–989.
- Amarasekara, D. S., Yu, J., & Rho, J. (2015). Bone loss triggered by the cytokine network in inflammatory autoimmune diseases. *Journal of Immunology Research*, 832127.
- Arai, B. F., Miyamoto, T., Ohneda, O., Inada, T., Sudo, T., Brasel, K., ... Suda, T. (1999). Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B (RANK) receptors. *Journal of Experimental Medicine*, 190(12), 1741–1754.
- Aucamp, J., Bronkhorst, A. J., Badenhorst, C. P. S., & Pretorius, P. J. (2018). The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. *Biological Reviews*.
- Auffray, C., Sieweke, M. H., & Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 27.
- Azuma, Y., Kaji, K., Katogi, R., Takeshita, S., & Kudo, A. (2000). Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry*, 275(7), 4858–4864.
- Barrat, F. J., Meeker, T., Chan, J. H., Guiducci, C., & Coffman, R. L. (2007). Treatment of lupus-prone mice with a dual inhibitor of TLR7 and TLR9 leads to reduction of autoantibody production and amelioration of disease symptoms. *European Journal of Immunology*, 37(12), 3582–3586.
- Baxter-Jones, A. D. G., Faulkner, R. A., Forwood, M. R., Mirwald, R. L., & Bailey, D. A. (2011). Bone mineral accrual from 8 to 30 years of age: an estimation of peak bone mass. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(8), 1729–1739.
- Berger, C., Goltzman, D., Langsetmo, L., Joseph, L., Jackson, S., Kreiger, N., ... Josse, R. G. (2010). Peak bone mass from longitudinal data: implications for the prevalence, pathophysiology, and diagnosis of osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(9), 1948–1957.
- Bernhardt, A., Koperski, K., Schumacher, M., Gelinsky, M., & Bernhardt, A. (2017). Relevance of osteoclast-specific enzyme activities in cell-based in vitro resorption assays. *Eur Cell Mater*, 33, 28–42.
- Bethel, M., Bruzzaniti, A., & Kacena, M. A. (2012). Osteoclast formation and function and its role in skeletal bone disease. In *Osteoclasts: Morphology, Functions and Clinical Implications* (pp. 31–52).
- Boissy, P., Saltel, F., Bouniol, C., Jurdic, P., Machuca-gayet, I., & Mole, L. D. B. (2002). Transcriptional activity of nuclei in multinucleated osteoclasts and its modulation by calcitonin. *Endocrinology*, 143(5), 1913–1921.
- Bonewald, L. F. (2011). The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research*,

26(2), 229–238.

- Boskey, A. L. (2013). Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *BoneKEy Reports*, 2.
- Bostanci, N., İlgenli, T., Emingil, G., Afacan, B., Han, B., Töz, H., & Belibasakis, G. N. (2007). Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(5), 370–376.
- Boyce, B. F., & Xing, L. (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 473(2), 139–146.
- Boyle, W. J., Simonet, W. S., & Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), 337–342.
- Briani, C., Samaroo, D., & Alaedini, A. (2008). Celiac disease: from gluten to autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 7(8), 644–650.
- Cataldo, F., Lio, D., Marino, V., Scola, L., Crivello, A., & Plasma, C. G. R. (2003). Plasma cytokine profiles in patients with celiac disease and selective IgA deficiency. *Pediatric Allergy and Immunology*, 14(4), 320–324.
- Ciccocioppo, R., Sabatino, A. Di, Corazza, G. R., & Matteo, P. S. (2005). The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clinical & Experimental Immunology*, 140(3), 408–416.
- Cohick, C. B., Furst, D. E., Quagliata, S., Corcoran, K. A., Steere, K. J., Yager, J. G., & Lindsley, H. B. (1994). Analysis of elevated serum interleukin-6 levels in rheumatoid arthritis: correlation with erythrocyte sedimentation rate or C-reactive protein. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 123(5), 721–727.
- Cochran, D. L. (2008). Inflammation and bone loss in periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 79(8S), 1569–1576.
- Demontiero, O., Vidal, C., & Duque, G. (2012). Aging and bone loss: new insights for the clinician. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 4(2), 61–76.
- Dodds, R. A., James, I. A. N. E., Rieman, D., Ahern, R., Hwang, S. M. E. I., Connor, J. R., ... Gowen, M. (2001). Human osteoclast cathepsin K is processed intracellularly prior to attachment and bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Research*, 16(3), 478–486.
- Duplomb, L., Baud, M., Berreur, M., & Heymann, D. (2008). Interleukin-6 inhibits receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand-induced osteoclastogenesis by diverting cells into the macrophage lineage: key role of serine727 phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3. *Endocrinology*, 149(7), 3688–3697.
- Fallarino, F., Volpi, C., Zelante, T., Calvitti, M., Fioretti, M. C., Puccetti, P., ... Grohmann, U. (2009). IDO mediates TLR9-driven protection from experimental autoimmune diabetes. *The Journal of Immunology*, jimmunol-0.
- Fouda, M. A., Khan, A. A., Sultan, M., Rios, L. P., McAssey, K., & Armstrong, D. (2012). Evaluation and management of skeletal health in celiac disease: position statement. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26(11), 819–829.
- Gao, Y., Grassi, F., Ryan, M. R., Terauchi, M., Page, K., Yang, X., ... Pacifici, R. (2007). IFN- $\gamma$  stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell

- activation. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(1), 122–132.
- Gillespie, M. T. (2007). Impact of cytokines and T lymphocytes upon osteoclast differentiation and function. *Arthritis Research & Therapy*, 9(2), 103.
- Grimaud, E., Soubigou, L., Coipeau, P., Moreau, A., Passuti, N., & Heymann, D. (2003). Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *The American Journal of Pathology*, 163(5), 2021–2031.
- Hadjidakis, D. J., & Androulakis, I. I. (2006). Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1092(1), 385–396.
- Harris, S. E., Macdougall, M., Horn, D., Woodruff, K., Zimmer, S. N., Rebel, V. I., ... Abboud, S. (2012). Meox2Cre-mediated disruption of CSF-1 leads to osteopetrosis and osteocyte defects. *Bone*, 50(1), 42–53.
- Heikkilä, K., Pearce, J., Mäki, M., & Kaukinen, K. (2015). Celiac disease and bone fractures: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100(1), 25–34.
- Henriksen, K., Tanko, L. B., Qvist, P., & Delmas, P. D. (2007). Assessment of osteoclast number and function: application in the development of new and improved treatment modalities for bone diseases. *Osteoporosis International*, 18(5), 681–685.
- Herman, S., Fischer, A., Pfatschbacher, J., & Hoffmann, M. (2011). A TLR 9 antagonist diminishes arthritis severity in a rat model of rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70(Suppl 2), A39–A39.
- Hernandez, C. J., Beaupre, G. S., & Carter, D. R. (2003). A theoretical analysis of the relative influences of peak BMD, age-related bone loss and menopause on the development of osteoporosis. *Osteoporosis International*, 14(10), 843–847.
- Hodge, J. M., Kirkland, M. A., & Nicholson, G. C. (2007). Multiple roles of M-CSF in human osteoclastogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 102(3), 759–768.
- Hofbauer, L. C., Khosla, S., Dunstan, C. R., Lacey, D. L., Spelsberg, T. C., & Riggs, B. L. (1999). Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology*, 140(9), 4367–4370.
- Horwood, N. J., Elliott, J., Martin, T. J., & Gillespie, M. T. (1998). Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology*, 139(11), 4743–4746.
- Horwood, N. J., Kartsogiannis, V., Quinn, J. M. W., Romas, E., Martin, T. J., & Gillespie, M. T. (1999). Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 265(1), 144–150.
- Hou, G., Guo, C., Song, G., Fang, N. A., Fan, W., Chen, X., ... Wang, Z. (2013). Lipopolysaccharide (LPS) promotes osteoclast differentiation and activation by enhancing the MAPK pathway and COX-2 expression in RAW264.7 cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 32(2), 503–510.
- Chapman, P., Reyes, C., & Gupta, V. (2010). Normal physiological levels of human cytokines using Bio-Plex Pro™ cytokine assays. *Bio-Rad Bulletin: Technical Note*, (6029).
- Choung, R. S., Larson, S. A., Khaleghi, S., Rubio-tapia, A., Ovsyannikova, I. G., King, K. S.,

- ... Murray, J. A. (2017). Prevalence and morbidity of undiagnosed celiac disease from a community-based study. *Gastroenterology*, *152*(4), 830–839.
- Kagnoff, M. F. (2007). Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *The Journal of Clinical Investigation*, *117*(1), 41–49.
- Kavak, U. S., Yüce, A., Koçak, N., Demir, H., Saltik, I. N., Gürakan, F., & Özen, H. (2003). Bone mineral density in children with untreated and treated celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *37*(4), 434–436.
- Kawai, T., Matsuyama, T., Goncalves, R. B., Valverde, P., Dibart, S., Li, Y., ... Taubman, M. A. (2006). B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *The American Journal of Pathology*, *169*(3), 987–998.
- Kim, J. W., Lee, M. S., Lee, C. H., Kim, H. Y., Chae, S. U., Kwak, H. B., & Oh, J. (2012). Effect of interferon- $\gamma$  on the fusion of mononuclear osteoclasts into bone-resorbing osteoclasts. *BMB Reports*, *45*(5), 281–286.
- Kim, N., Kadono, Y., Takami, M., Lee, J., Lee, S., Okada, F., ... Choi, Y. (2005). Osteoclast differentiation independent of the TRANCE–RANK–TRAF6 axis. *Journal of Experimental Medicine*, *202*(5), 589–595.
- Kindlund, B., Henning, P., Lindholm, C., & Lerner, U. H. (2012). From monocytes to osteoclasts: Through down-regulation of CD14 and CD16. *Bone*, *50*, S87.
- Kini, U., & Nandeesh, B. N. (2012). Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging, Springer B*, 29–57.
- Kleinhans, C., Schmid, F. F., Schmid, F. V., & Kluger, P. J. (2015). Comparison of osteoclastogenesis and resorption activity of human osteoclasts on tissue culture polystyrene and on natural extracellular bone matrix in 2D and 3D. *Journal of Biotechnology*, *205*, 101–110.
- Kobayashi, B. K., Takahashi, N., Jimi, E., Udagawa, N., Takami, M., Kotake, S., ... Suda, T. (2000). Tumor necrosis factor  $\alpha$  stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL–RANK interaction. *Journal of Experimental Medicine*, *191*(2), 275–286.
- Kohara, H., Kitaura, H., Fujimura, Y., Yoshimatsu, M., & Morita, Y. (2011). IFN- $\gamma$  directly inhibits TNF- $\alpha$ -induced osteoclastogenesis in vitro and in vivo and induces apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interactions. *Immunology Letters*, *137*(1-2), 53–61.
- Komano, Y., Nanki, T., Hayashida, K., Taniguchi, K., & Miyasaka, N. (2006). Identification of a human peripheral blood monocyte subset that differentiates into osteoclasts. *Arthritis Research & Therapy*, *8*(5), R152.
- Kostjuk, S., Loseva, P., Chvartatskaya, O., Ershova, E., Smirnova, T., Malinovskaya, E., ... Ershova, E. (2012). Extracellular GC-rich DNA activates TLR9-and NF-kB-dependent signaling pathways in human adipose-derived mesenchymal stem cells (haMSCs). *Expert Opinion on Biological Therapy*, *12*(sup1), 99–111.
- Kramer, I., Halleux, C., Keller, H., Pegurri, M., Gooi, J. H., Weber, P. B., & Kneissel, M. (2010). Osteocyte Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is required for normal bone homeostasis. *Molecular and Cellular Biology*, *30*(12), 3071–3085.

- Kudo, O., Sabokbar, A., Pocock, A., Itonaga, I., Fujikawa, Y., & Athanasou, N. A. (2003). Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone*, *32*(1), 1–7.
- Kumagai, Y., Takeuchi, O., & Akira, S. (2008). TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *60*(7), 795–804.
- Kyung, T., Lee, J., & Shin, H. (2008). Rutin inhibits osteoclast formation by decreasing reactive oxygen species and TNF- $\alpha$  by inhibiting activation of NF- $\kappa$ B. *Experimental & Molecular Medicine*, *40*(1), 52–58.
- Lacativa, P. G. S., & Farias, M. L. F. D. (2010). Osteoporosis and inflammation. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, *54*(2), 123–132.
- Lahdenperä, A., Ludvigsson, J., Fälth-magnusson, K., Högberg, L., & Vaarala, O. (2011). The effect of gluten-free diet on Th1–Th2–Th3-associated intestinal immune responses in celiac disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *46*(5), 538–549.
- Li, Q., Valerio, M. S., & Kirkwood, K. L. (2012). MAPK usage in periodontal disease progression. *Journal of Signal Transduction*.
- Li, Y., Toraldo, G., Li, A., Yang, X., Zhang, H., Qian, W., & Weitzmann, M. N. (2007). B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood*, *109*(9), 3839–3849.
- Lum, L., Wong, B. R., Josien, R., Becherer, J. D., Erdjument-Bromage, H., Schlöndorff, J., & Blobel, C. P. (1999). Evidence for a role of a tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(19), 13613–13618.
- Luxenburg, C., Geblinger, D., Klein, E., Anderson, K., Hanein, D., Geiger, B., & Addadi, L. (2007). The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly. *PLoS One*, *2*(1), e179.
- Manavalan, J. S., Hernandez, L., Girish, J., Konikkara, J., Jamal, A., Roland, A., ... Bhagat, G. (2010). Serum cytokine elevations in celiac disease: association with disease presentation. *Human Immunology*, *71*(1), 50–57.
- Manolagas, S. C. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews*, *21*(2), 115–137.
- Marsh, M. N. (1992). Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine: a molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity (“celiac sprue”). *Gastroenterology*, *102*(1), 330–354.
- Meyer, D., Stavropolous, S., Diamond, B., Shane, E., & Green, P. H. R. (2001). Osteoporosis in a North American adult population with celiac disease<sup>1</sup>. *The American Journal of Gastroenterology*, *96*(1), 112–119.
- Middleton, K., Al-dujaili, S., Mei, X., Günther, A., & You, L. (2017). Microfluidic co-culture platform for investigating osteocyte-osteoclast signalling during fluid shear stress mechanostimulation. *Journal of Biomechanics*, *59*, 35–42.

- Millimaggi, D., Ciccocioppo, R., Sabatino, A. D. I., Alo, S. D., Parroni, R., Sciarra, G., ... Sabatino, A. Di. (2001). Apoptosis and peripheral blood lymphocyte depletion in coeliac disease. *Immunology*, *103*(4), 435–440.
- Miranda- Carús, M. E., Benito- Miguel, M., Balsa, A., Cobo- Ibáñez, T., Pérez De Ayala, C., Pascual- Salcedo, D., & Martín- Mola, E. (2006). Peripheral blood T lymphocytes from patients with early rheumatoid arthritis express RANKL and interleukin- 15 on the cell surface and promote osteoclastogenesis in autologous monocytes. *Arthritis & Rheumatism*, *54*(4), 1151–1164.
- Mitsuyama, K., Toyonaga, A., Sasaki, E., Ikeda, H., Tateishi, H., Nishiyama, T., ... Elisa, S. (1995). Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6. *Gut*, *36*(1), 45–49.
- Mörmann, M., Thederan, M., Nackchbandi, I., Giese, T., Wagner, C., & Hänsch, G. M. (2008). Lipopolysaccharides (LPS) induce the differentiation of human monocytes to osteoclasts in a tumour necrosis factor (TNF)  $\alpha$ -dependent manner: a link between infection and pathological bone resorption. *Molecular Immunology*, *45*(12), 3330–3337.
- Mühl, H., & Pfeilschifter, J. (2003). Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon- $\gamma$ . *International Immunopharmacology*, *3*(9), 1247–1255.
- Mulari, M. T. K., Zhao, H., Lakkakorpi, P. T., & Väänänen, H. K. (2003). Osteoclast ruffled border has distinct subdomains for secretion and degraded matrix uptake. *Traffic*, *4*(2), 113–125.
- Mustalahti, K., Catassi, C., Reunanen, A., Fabiani, E., Mcmillan, S., Murray, L., ... Ki, M. M. Ä. (2010). The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Annals of Medicine*, *42*(8), 587–595.
- Nakamura, T., Imai, Y., Matsumoto, T., Sato, S., Takeuchi, K., Igarashi, K., ... Kato, S. (2007). Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor  $\alpha$  and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell*, *130*(5), 811–823.
- Nakashima, H., Inoue, H., Akahoshi, M., Tanaka, Y., Yamaoka, K., Ogami, E., ... Niho, Y. (1999). The combination of polymorphisms within interferon-  $\gamma$  receptor 1 and receptor 2 associated with the risk of systemic lupus erythematosus. *FEBS Letters*, *453*(1-2), 187–190.
- Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kurata, K., Oh-hora, M., Feng, J. Q., ... Wutz, A. (2011). Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nature Medicine*, *17*(10), 1231.
- Norris, J. M., Barriga, K., Hoffenberg, E. J., Miao, D., Haas, J. E., Emery, L. M., ... Eisenbarth, G. S. (2005). Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease. *Jama*, *293*(19), 2343–2352.
- O'Brien, C. A. O., Gubrij, I., Lin, S., Saylor, R. L., & Manolagas, S. C. (1999). STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF- $\kappa$ 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*(27), 19301–19308.
- Park, J. H., Lee, N. K., & Lee, S. Y. (2017). Current understanding of RANK signaling in

- osteoclast differentiation and maturation. *Molecules and Cells*, 40(10), 706–713.
- Peruzzi, B., Cappariello, A., Fattore, A. Del, Rucci, N., Benedetti, F. De, & Teti, A. (2012). c- Src and IL-6 inhibit osteoblast differentiation and integrate IGFBP5 signalling. *Nature Communications*, 3, 630.
- Piccinini, A. M., & Midwood, K. S. (2010). DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators of Inflammation*.
- Pilichou, A., Papassotiriou, I., Michalakakou, K., Fessatou, S., Fandridis, E., Papachristou, G., & Terpos, E. (2008). High levels of synovial fluid osteoprotegerin (OPG) and increased serum ratio of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) to OPG correlate with disease severity in patients with primary knee osteoarthritis. *Clinical Biochemistry*, 41(9), 746–749.
- Plotkin, L. I. (2014). Apoptotic osteocytes and the control of targeted bone resorption. *Current Osteoporosis Reports*, 21(1), 121–126.
- Prinz, M., Garbe, F., Schmidt, H., Mildner, A., Gutcher, I., Wolter, K., ... Becher, B. (2006). Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(2), 456–464.
- Quinn, J. M. W., Neale, S., Fujikawa, Y., Mcgee, J. O. D., & Athanasou, N. A. (1998). Human osteoclast formation from blood monocytes, peritoneal macrophages, and bone marrow cells. *Calcified Tissue International*, 62(6), 527–531.
- Recker, R. R., Davies, K. M., Hinders, S. M., Heaney, R. P., Stegman, M. R., & Kimmel, D. B. (1992). Bone gain in young adult women. *Jama*, 268(17), 2403–2408.
- Redlich, K., Görtz, B., Hayer, S., Zwerina, J., Doerr, N., Kostenuik, P., ... Kollias, G. (2004). Repair of local bone erosions and reversal of systemic bone loss upon therapy with anti-tumor necrosis factor in combination with osteoprotegerin or parathyroid hormone in tumor necrosis factor-mediated arthritis. *The American Journal of Pathology*, 164(2), 543–555.
- Redlich, K., Hayer, S., Ricci, R., David, J., Tohidast-akrad, M., Kollias, G., ... Schett, G. (2002). Osteoclasts are essential for TNF- $\alpha$ -mediated joint destruction. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(10), 1419–1427.
- Riggs, B. L., Melton, L. J., Robb, R. A., Camp, J. J., Atkinson, E. J., McDaniel, L., & Khosla, S. (2008). A population- based assessment of rates of bone loss at multiple skeletal sites: evidence for substantial trabecular bone loss in young adult women and men. *Journal of Bone and Mineral Research*, 23(2), 205–214.
- Ripley, B. J. M., Goncalves, B., Isenberg, D. A., Latchman, D. S., & Rahman, A. (2005). Raised levels of interleukin 6 in systemic lupus erythematosus correlate with anaemia. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(6), 849–853.
- Robling, A. G., Castillo, A. B., & Turner, C. H. (2006). Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 8, 455–498.
- Roggia, C., Gao, Y., Cenci, S., Weitzmann, M. N., Toraldo, G., Isaia, G., & Pacifici, R. (2001). Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), 13960–13965.

- Rykova, E., Sizikov, A., Roggenbuck, D., Antonenko, O., Bryzgalov, L., Morozkin, E., ... Kozlov, V. (2017). Circulating DNA in rheumatoid arthritis: pathological changes and association with clinically used serological markers. *Arthritis Research & Therapy*, *19*(1), 85.
- Sasal, M., Rouhi, G., & Vahdati, A. (2017). Sensitivity to the Polarity of External Loads in Bone Remodeling Process. *CMBES Proceedings*, *31*(1).
- Scott, E. M., Gaywood, I., & Scott, B. B. (2000). Guidelines for osteoporosis in coeliac disease and inflammatory bowel disease. *Gut*, *46*(Suppl I), 1–8.
- Sedger, L. M., & Mcdermott, M. F. (2014). TNF and TNF-receptors: from mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants—past, present and future. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *25*(4), 453–472.
- Schindeler, A., McDonald, M. M., Bokko, P., & Little, D. G. (2008). Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *19*(5 Academic Press), 459–466.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, *75*(2), 163–189.
- Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M., Lu, R., ... Boyle, W. J. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, *89*(2), 309–319.
- Singh, P. P., Kraan, A. G. J. Van Der, Xu, J., Gillespie, M. T., & Quinn, J. M. W. (2012). Membrane-bound receptor activator of NF $\kappa$ B ligand (RANKL) activity displayed by osteoblasts is differentially regulated by osteolytic factors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *422*(1), 48–53. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.103>
- Stanley, E. R., Berg, K. L., Einstein, D. B., Lee, P. S. W., Pixley, F. J., Wang, Y. U. N., & Yeung, Y. (1997). Biology and action of colony-stimulating factor-1. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, *46*(1), 4–10.
- Stene, L. C., Ph, D., Honeyman, M. C., Ph, D., Hoffenberg, E. J., Haas, J. E., ... Ph, D. (2006). Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *The American Journal of Gastroenterology*, *101*(10), 2333–2341.
- Stenson, W. F., Newberry, R., Lorenz, R., Baldus, C., & Civitelli, R. (2005). Increased prevalence of celiac disease and need for routine screening among patients with osteoporosis. *Archives of Internal Medicine*, *165*(4), 393–399.
- Stephens, A. S., Stephens, S. R., & Morrison, N. A. (2011). Internal control genes for quantitative RT-PCR expression analysis in mouse osteoblasts, osteoclasts and macrophages. *BMC Research Notes*, *4*(1), 410.
- Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M. T., & Martin, T. J. (1999). Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine Reviews*, *20*(3), 345–357.
- Takayanagi, H., Ogasawara, K., & Hida, S. (2000). T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- $\gamma$ . *Nature*, *408*(6812), 600.

- Takemura, S., Klimiuk, P. A., Braun, A., Jörg, J., Weyand, C. M., Takemura, S., ... Goronzy, J. (2001). T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *The Journal of Immunology*, 167(8), 4710–4718.
- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, a016295.
- Tang, Q., Danila, M. I., Cui, X., Parks, L., & Baker, B. (2015). Expression of Interferon-gamma Receptor Genes in PBMCs is Associated with Rheumatoid Arthritis and Its Radiographic Severity in African Americans. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ)*, 67(5), 1165–1170.
- Taranta, A., Fortunati, D., Longo, M., Rucci, N., Iacomino, E., Aliberti, F., ... Bianchi, M. L. (2004). Imbalance of osteoclastogenesis- regulating factors in patients with celiac disease. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(7), 1112–1121.
- Teitelbaum, S. L. (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science*, 289(5484), 1504–1508.
- Thudium, C. S., Moscatelli, I., Flores, C., Thomsen, J. S., Bru, A., Karsdal, M. A., ... Henriksen, K. (2014). A comparison of osteoclast-rich and osteoclast-poor osteopetrosis in adult mice sheds light on the role of the osteoclast in coupling bone resorption and bone formation. *Calcified Tissue International*, 95(1), 83–93.
- Troncone, R., Maurano, F., Rossi, M., Micillo, M., Greco, L., Auricchio, R., ... Sacchetti, L. (1999). IgA antibodies to tissue transglutaminase: an effective diagnostic test for celiac disease. *The Journal of Pediatrics*, 134(2), 166–171.
- Tug, S., Helmig, S., Menke, J., Zahn, D., Kubiak, T., Schwarting, A., & Simon, P. (2014). Correlation between cell free DNA levels and medical evaluation of disease progression in systemic lupus erythematosus patients. *Cellular Immunology*, 292(1-2), 32–39.
- Udagawa, N., Takahashi, N., Jimi, E., Matsuzaki, K., Tsurukai, T., Itoh, K., ... Suda, T. (1999). Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor. *Bone*, 25(5), 517–523.
- Veiko, N. N., Shubaeva, N. O., Ivanova, S. M., Speranskii, A. I., Lyapunova, N. A., & Spitkovskii, D. M. (2006). Blood serum DNA in patients with rheumatoid arthritis is considerably enriched with fragments of ribosomal repeats containing immunostimulatory CpG-motifs. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 142(3), 313–316.
- Wade, S. W., Strader, C., Fitzpatrick, L. A., Anthony, M. S., & O'Malley, C. D. (2014). Estimating prevalence of osteoporosis: examples from industrialized countries. *Archives of Osteoporosis*, 9(1:182).
- Wein, M. N. (2017). Bone Lining Cells: Normal Physiology and Role in Response to Anabolic Osteoporosis Treatments. *Current Molecular Biology Reports*, 3(2), 79–84.
- WHO. (1994). *Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: report of a WHO study group [meeting held in Rome from 22 to 25 June 1992]*.
- Wolters, V. M., & Wijmenga, C. (2008). Genetic background of celiac disease and its clinical implications. *American Journal of Gastroenterology*, 103(1), 190.

- Wu, Q., Zhou, X., Huang, D., Ji, Y., & Kang, F. (2017). IL-6 enhances osteocyte-mediated osteoclastogenesis by promoting JAK2 and RANKL activity in vitro. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 41(4), 1360–1369.
- Yamashita, T., Takahashi, N., & Udagawa, N. (2012). New roles of osteoblasts involved in osteoclast differentiation. *World Journal of Orthopedics*, 3(11), 175–181.
- Yang, S., Madyastha, P., Ries, W., Key, L. L., Endocrinology, P., Avenue, A., & Carolina, S. (2002). Characterization of interferon gamma receptors on osteoclasts: effect of interferon gamma on osteoclastic superoxide generation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 84(3), 645–654.
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S. I., & Tsuda, E. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(7), 3597–3602.
- Yoshitake, F., Itoh, S., Narita, H., Ishihara, K., & Ebisu, S. (2008). Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 283(17), 11535–11540.
- Youn, M., Takada, I., Imai, Y., Yasuda, H., & Kato, S. (2010). Transcriptionally active nuclei are selective in mature multinucleated osteoclasts. *Genes to Cells*, 15(10), 1025–1035.
- Zha, Z., Bucher, F., Nejatfard, A., Zheng, T., Zhang, H., & Yea, K. (2017). Interferon- $\gamma$  is a master checkpoint regulator of cytokine-induced differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(33), E6867–E6874.
- Zhang, Y., Heulsmann, A., Tondravi, M. M., Mukherjee, A., & Abu-amer, Y. (2001). Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 276(1), 563–568.
- Zinkova, A., Brynychova, I., Svacina, A., Jirkovska, M., & Korabecna, M. (2017). Cell-free DNA from human plasma and serum differs in content of telomeric sequences and its ability to promote immune response. *Scientific Reports*, 7(1), 2591.

## Seznam internetových zdrojů

URL1 <http://www.cellsignet.com/media/templ.html> [cit. 2018-07-20]