

Abstrakt

Úvod: Extracelulárna DNA (ecDNA) je bežnou súčasťou krvnej plazmy. Zvýšená hladina ecDNA sa v krvi vyskytuje u pacientov s niektorými autoimunitnými ochoreniami spojenými so zápalom, ako sú napríklad systematický lupus erythematosus, reumatoidná artritída alebo celiakia. Tieto choroby sú tiež spojené s vyšším rizikom vzniku osteoporózy. Kosť je dynamická štruktúra, ktorá prechádza neustálymi remodeláciami, za ktoré sú zodpovedné osteoblasty, osteocyty a osteoklasty. Vychýlenie ich rovnováhy môže viesť k patológiám, ako je napríklad osteoporóza. V tejto diplomovej práci sme sa zamerali na skúmanie ecDNA (zápalový faktor s preukázanými imunoregulačnými účinkami) a jej schopnosť meniť diferenciačný potenciál monocytov na osteoklasty a alternatívne tak spúšťať osteoklastogézu.

Materiál and metódy: Monocyty sme izolovali z periférnej krvi zdravých darcov a kultivovali v prítomnosti štyroch typov ODN, kontrolné (CO), stimulačné (ST), inhibičné (INH), telomerické (TLM), s fosfodiesterovými (-pO) alebo fosforotioátovými (-pS) kostrami počas dvoch týždňov, aby sme overili ich efekt na ľudské monocyty. Osteoklastogézu sme vyhodnotili počtom osteoklastov spočítaných na svetelnom mikroskope, a ich aktivitu pomocou qPCR analýzy, kde sme analyzovali gény *ACP5*, *CTSK*, *TLR9* a *NFATc1*.

Výsledky: Pri testovaní -pO ODN a ich porovnaní so vzorkou bez pridaných ODN sme nenašli žiadne významné rozdiely. Z troch kontrolných ODN sa ako neutrálne potvrdilo len CO-ODN-2395, ktoré je ako kontrola vhodné pre ďalšiu aplikáciu. ST-ODN-2006 (0.1 nM) významne stimulovalo osteoklastogézu. INH-ODN-4347 ani TLM-ODN (TTAGGG)₄ neinhibovali osteoklastogézu, keď boli k bunkám pridané samostatne. INH-ODN (100 nM) + ST-ODN (0.1 nM) signifikantne inhibovali vznik osteoklastov v porovnaní s ST-ODN (0,1 nM). TLM-ODN (10 nM) + ST-ODN (0.1 nM) vznik osteoklastov významne neinhibovali. Nepreukázali sme významné zmeny v expresii pri žiadnom z testovaných génov, ich kombinácií ani pri analýze, kde boli vzorky odobraté v rôznych časoch počas kultivácie.

Záver: Naše výsledky naznačujú, že -pS ODN sú vhodné na použitie v dlhodobých kultiváciách. Taktiež naznačujú, že CO-ODN-2395 (10 nM) je vhodná kontrola pre kultivácie s monocytmi. ST-ODN-2006 (0,1 nM) významne stimuluje osteoklastogenézu. Samotné INH-ODN a TLM-ODN neinhibujú osteoclastogenézu. Signifikatná inhibícia osteoklastogenézy nastane až pri kombinácii ST-ODN (0,1 nM) a INH-ODN (100 nM). Pri spoločnej kultivácii TLM-ODN (10 nM) a ST-ODN (0,1 nM) nedochádza k signifikatnej inhibícii osteoklastogenézy. Na overenie tohto efektu je však potrebné vykonať ďalšie experimenty. Napriek tomu, že ST-ODN vedie k zvýšenej produkcii osteoklastov, ich aktivita sa nezvyšuje. Podľa našich doterajších výsledkov sa javí, že TLR9 nie je zapojené do aktivácie osteoklastogenézy pomocou ODN. Ďalšie experimenty sú ale potrebné na ozrejmienie výsledkov pochádzajúcich z qPCR.

Kľúčové slová: oligodeoxynucleotidy, ODN, extracelulárna DNA, ecDNA, zápal, osteoklastogenéza, monocyt, osteoklast, TLR9, NF- κ B