

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA BANOVEC

**MAGISTRSKA NALOGA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA BANOVEC

**DIFERENCIACIJA ČLOVEŠKIH MONOCITOV IZ PERIFERNE  
KRVI V OSTEOKLASTE IN VZPOSTAVITEV MODELA *IN VITRO*  
ZA PRESKUŠANJE NJIHOVE FUNKCIJSKE AKTIVNOSTI**

**DIFFERENTIATION OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD  
MONOCYTES INTO OSTEOCLASTS AND ESTABLISHMENT OF  
*IN VITRO* MODEL FOR TESTING THEIR FUNCTIONAL ACTIVITY**

UNIFORM MASTER'S STUDY PROGRAMME PHARMACY

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za klinično biokemijo, pod mentorstvomizr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm.

### **Zahvala**

*Zahvaljujem se mentorju,izr. prof. dr. Matjažu Jerasu, za usmerjanje pri izdelavi magistrske naloge, vso posredovano znanje in nasvete ter spodbudne besede.*

*Najlepša hvala moji družini, ki mi je omogočila študij in mi vedno stoji ob strani.*

*Hvala tudi prijateljem, še posebej pa sošolkam Diani, Kaji, Lei, Sari in Urški za vsa ta lepa in nepozabna študijska leta, ki smo jih skupaj preživele, si med seboj pomagale in druga drugo bodrile.*

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod mentorstvomizr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm.

Urška Banovec

Predsednica magistrske komisije:izr. prof. dr. Anamarija Zega, mag. farm.

Članica magistrske komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

# KAZALO

## KAZALO VSEBINE

KAZALO .....	II
Kazalo vsebine .....	II
Kazalo slik.....	III
Kazalo tabel .....	IV
SEZNAM OKRAJŠAV .....	VI
POVZETEK .....	VII
ABSTRACT .....	VIII
1    UVOD .....	1
1.1    SESTAVA KOSTI.....	1
1.1.1    Kostnina .....	1
1.1.2    Mineralni del kosti .....	1
1.1.3    Kostne celice .....	2
1.2    RASTNA DEJAVNIKA M-CSF IN RANKL.....	3
1.3    PROCES RESORPCIJE KOSTNINE .....	4
1.4    KOSTNA REMODELACIJA.....	5
1.5    VIRI ČLOVEŠKIH OSTEOKLASTOV ZA TESTIRANJE <i>IN VITRO</i> .....	7
2    NAMEN DELA .....	9
3    MATERIALI IN METODE.....	10
3.1    IZOLACIJA IN PRIPRAVA MONOCITOV IZ LEVKOCITNIH KONCENTRATOV.....	10
3.1.1    Izolacija mononuklearnih celic iz levkocitnih koncentratov.....	11
3.1.2    Izolacija monocitov z magnetno separacijo .....	12
3.1.3    Zamrzovanje izoliranih monocitov .....	12
3.1.4    Odmrzovanje izoliranih monocitov .....	13
3.2    PRIPRAVA ČLOVEŠKIH REKOMBINANTNIH RASTNIH DEJAVNIKOV M-CSF IN sRANKL.....	13
3.3    PREOBRAZBA MONOCITOV V OSTEOKLASTE .....	14
3.3.1    Diferenciacija monocitov v osteoklaste na neadherentni gojitveni površini	14

3.3.2	Diferenciacija monocitov v osteoklaste na adherentni gojitveni površini ....	17
3.4	PRESKUŠANJE FUNKCIJSKE AKTIVNOSTI OSTEOKLASTOV <i>IN VITRO</i> .....	18
3.4.1	Živost celic .....	18
3.4.2	Kostna resorpcija .....	19
3.4.3	Barvanje TRAP .....	20
3.4.4	Barvanje z Mayerjevim hematoksilinom .....	21
3.4.5	Določanje količine razpadnih produktov kolagena tipa I s testom ELISA .....	21
3.5	ZAJEM IN OBDELAVA SLIK .....	23
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	24
4.1	DIFERENCIACIJA ČLOVEŠKIH MONOCITOV IZ PERIFERNE KRVI V OSTEOKLASTE .	24
4.1.1	Količine monocitov, izoliranih iz levkocitnih koncentratov.....	24
4.1.2	Postopek diferenciacije monocitov na hidrofobni površini Lumox® .....	24
4.1.3	Postopek diferenciacije monocitov na adherentni plastični površini .....	27
4.2	OVREDNOTENJE FUNKCIJSKE AKTIVNOSTI OSTEOKLASTOV .....	29
4.2.1	Dokaz živosti .....	29
4.2.2	Barvanje TRAP .....	30
4.2.1	Določanje količine razpadnih produktov kolagena tipa I s testom ELISA.....	33
5	SKLEP.....	37
6	VIRI IN LITERATURA .....	39
7	PRILOGE .....	41
7.1	Test ELISA s celicami, diferenciranimi na hidrofobni površini Lumox® .....	41
7.2	Test ELISA s celicami, diferenciranimi na adherentni plastični površini.....	44

## KAZALO SLIK

Slika 1:	Zgradba kosti.....	1
Slika 2:	Shematski prikaz diferenciacije in funkcije osteoklastov.....	4
Slika 3:	Fentonova reakcija.....	5
Slika 4:	Proces kostne remodelacije.....	7
Slika 5:	Primerjava gojenja celic v Lumox® in konvencionalnih petrijevkah .....	15

Slika 6: Z vložkom flexiPERM® disc opremljena petrijevka Lumox® .....	15
Slika 7: Primerjava mikrofotografij celičnih kultur Mo1 in MoMIX med 19-dnevno inkubacijo na hidrofobni površini Lumox® .....	26
Slika 8: Primerjava mikrofotografij celičnih kultur Mo1 in MoMIX med 7-dnevno inkubacijo na adherentni plastični površini.....	28
Slika 9: Živost celičnih kultur, diferenciranih na hidrofobni površini Lumox®. ....	29
Slika 10: Barvanje TRAP celic, adheriranih na plastično površino.....	30
Slika 11: Barvanje TRAP celic na kostnih diskih po 48urni inkubaciji .....	31
Slika 12: Barvanje kostnih diskov z Mayerjevim hematoksilinom.....	32
Slika 13: Barvanje TRAP celic na kostnih diskih po 48 urni inkubaciji. ....	32
Slika 14: Barvanje TRAP celic na kostnem matriksu OsteoAssay™ po 48 urni inkubaciji.....	33
Slika 15: Resorptivna aktivnost celic, predhodno diferenciranih na hidrofobni površini Lumox®, po 48-urni inkubaciji na govejem kostnem disku.....	34
Slika 16: Resorptivna aktivnost celic, predhodno diferenciranih na plastični adherentni površini, po njihovi 48-urni inkubaciji na govejem kostnem disku in kostnem matriksu OsteoAssay™ .....	35
Slika 17: Primerjava resorptivne aktivnosti mešanice MoMIX na kostnem disku in OsteoAssay™ .....	36
Slika 18: Umeritvena krivulja povprečnih absorbanč osmih standardov s pripadajočimi koncentracijami razgradnih produktov kolagena tipa I. ....	41
Slika 19: Umeritvena krivulja povprečnih absorbanč osmih standardov s pripadajočimi koncentracijami razgradnih produktov kolagena tipa I. ....	44

## KAZALO TABEL

Tabela I: Identifikacijske oznake in osnovne značilnosti darovalcev BC. ....	10
Tabela II: Vsebina v vdolbinicah mikrotitrne plošče. ....	19
Tabela III: Vzorci in kontrole, ki jih potrebujemo za izvedbo testa CrossLaps® for Culture (CTX-I) ELISA.....	22
Tabela IV: Prikaz števila MNC, izoliranih iz levkocitnih koncentratov in števila monocitov, pridobljenih z negativno imunomagnetno selekcijo. ....	24
Tabela V: Število celic v posamezni kulturi po 19-dnevnem gojenju na hidrofobni površini Lumox®. ....	24

Tabela VI: Število celic v posamezni kulturi po 7-dnevnem gojenju na adherentni plastični površini. ....	27
Tabela VII: Absorbance ter interpolirane vrednosti fragmentov kolagena tipa I (CTX-I) za kontrole in vzorce. ....	42
Tabela VIII: Izračun vrednosti kontrol. ....	43
Tabela IX: Izračun končnih koncentracij fragmentov kolagena tipa I (CTX-I) v posameznih vzorcih.....	43
Tabela X: Absorbance ter interpolirane vrednosti fragmentov kolagena tipa I (CTX-I) za kontrole in vzorce. ....	45
Tabela XI: Izračun vrednosti kontrol.....	46
Tabela XII: Izračun končnih koncentracij fragmentov kolagena tipa I (CTX-I) v posameznih vzorcih.....	47

## SEZNAM OKRAJŠAV

BC	Levkocitni koncentrat (ang. buffy coat)
BSA	Goveji serumski albumin (ang. bovine serum albumin)
c-Fms	Receptor kolonije stimulirajočega dejavnika 1 (ang. colony-stimulating factor-1 receptor)
DMEM	Dulbeccova različica minimalnega osnovnega Eaglovega medija
D-PBS	Dulbeccova, s fosfatom puferirana fiziološka raztopina (ang. Dulbecco's phosphate-buffered saline)
ELISA	Encimskoimunski test (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)
FBS	Serum govejega zarodka (ang. fetal bovine serum)
M-CSF	Makrofagne kolonije vzpodbujajoči dejavnik (ang. macrophage colony-stimulating factor)
MNC	Mononuklearne celice
OPG	Osteoprotegerin
RANK	Receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika $\kappa$ B (ang. receptor activator of nuclear factor $\kappa$ B)
RANKL	Ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika $\kappa$ B (ang. receptor activator of nuclear factor $\kappa$ B ligand)
RPMI 1640	Medij Roswell Park Memorial Institute 1640.
sRANKL	Topna oblika liganda receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika $\kappa$ B
TRAP	Na tartrat odporna kislina fosfataza (ang. tartrate-resistant acid phosphatase)
$\alpha$ -MEM	Alfa različica minimalnega osnovnega Eaglovega medija (ang. Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modifications)



## POVZETEK

Osteoklasti so večjedrne celice, ki nastanejo z zlitjem hematopoetičnih predhodnikov iz krvi in kostnega mozga. Ključno vlogo imajo v procesu razgradnje kostnine. Njihov razvoj in delovanje, s tvorbo in izločanjem rastnih dejavnikov, uravnavajo osteoblasti in kostne tkivne celice. Odkritje dveh ključnih citokinov, RANKL in M-CSF, je prineslo revolucijo v pridobivanju osteoklastov brez potrebe po prisotnosti ostalih vrst kostnih celic. V magistrski nalogi smo skušali vzpostaviti ponovljiv in preprost sistem diferenciacije človeških monocitov v osteoklaste *in vitro*, ob uporabi rekombinantnih človeških rastnih dejavnikov sRANKL in M-CSF. Najprej smo z magnetno separacijo izolirali monocite iz levkocitnega koncentrata, nato pa jih tako v posameznih kot medsebojno pomešanih kulturah diferencirali v dveh različnih pogojih gojenja, in sicer na neadherentni in adherentni podlagi. Pri tem so se neadherentni pogoji gojenja, kjer celice rastejo v suspenziji, izkazali za primernejše, saj je v primeru adherentne kulture za odstranitev celic od rastne podlage potrebna tripsinizacija, ki je agresiven postopek in povzroča izgubo celic. Funkcijsko aktivnost diferenciranih osteoklastov smo vizualizirali z barvanjem encima na tartrat odporne kisle fosfataze (TRAP) in z Mayerjevim hematoksilinom, kvantitativno pa ovrednotili s prenosom diferenciranih celic na goveje kostne diske in človeški kostni matriks OsteoAssay™ Human Bone Plate ter z merjenjem količine nastalih razpadnih produktov kolagena tipa I s testom ELISA. Medsebojno pomešani monociti različnih oseb so diferencirali v osteoklaste enako učinkovito kot kulture celic posameznih oseb in izkazovali ustrezne morfološke in funkcijske lastnosti, vključno s sposobnostjo resorpcije kostnine. Koncentracije fragmentov kolagena tipa I so bile pri uporabi pomešanih alogenskih osteoklastov celo največje. Zato menimo, da je mešanica monocitov različnih oseb ustrezen vir za pripravo osteoklastov *in vitro*, ki jih lahko uporabimo za testiranje njihovih funkcijskih aktivnosti v različnih eksperimentalnih pogojih. Poleg tega tovrstne mešanice izražajo tudi skupne interindividualne razlike posameznikov, kar zagotavlja bolj reprezentativno izvedbo večjega števila eksperimentov z uporabo enake mešanice celic.

## KLJUČNE BESEDE

Mešanica alogenskih monocitov, osteoklast, RANKL, M-CSF, neadherentna rastna podlaga, kostna resorpcija

## **ABSTRACT**

Osteoclasts are multinucleated cells developed by the fusion of hematopoietic precursors from blood and bone marrow. Their key role is the degradation of bone matrix in the process of bone remodelling. Osteoblasts and bone marrow stromal cells form and secrete growth factors and cytokines that regulate the formation and activation of osteoclasts. Knowing that RANKL and M-CSF are the two main cytokines in this process, it is possible to generate human osteoclasts without the presence of other bone cell types. In this study we attempted to establish a repeatable and simplified system of differentiating human blood monocytes into osteoclasts *in vitro* by using recombinant human growth factors sRANKL and M-CSF. We first isolated human monocytes from the buffy coat with immunomagnetic separation and then differentiated them as individual and mixed cultures using two different growing conditions (non-adherent and adherent grounding). Non-adherent growing conditions, where cells grow in a suspension, turned out to be more appropriate. In an adherent culture system we have to remove cells from the grounding by trypsinization, which is aggressive and causes the loss of cells. The functional activity of differentiated cells was visualised by TRAP staining and staining with Mayer hematoxylin. For the quantitative evaluation of functional activity we seeded differentiated cells on bovine bone slices and human bone matrix OsteoAssay™ Human Bone Plate for two days, and then measured the quantity of collagen type I degradation products with the CrossLaps test for Culture ELISA (CTX-I). Mixed monocytes differentiated into osteoclasts with the same efficacy as individual cell cultures and expressed all the morphological and functional properties of osteoclasts including their ability to resorb bone. Surprisingly, the concentration of collagen type I degradation products was highest in mixed cultures. We conclude that the mixture of human blood monocytes represents an appropriate source for generating human osteoclasts *in vitro* and can be used for further testing their functional activity in different experimental conditions. Furthermore, the culture of mixed cells expresses common interindividual differences and provides a more representative performance of a large number of experiments using the same cell mixture.

## **KEYWORDS**

Mixture of allogenic monocytes, osteoclast, RANKL, M-CSF, non-adherent growing conditions, bone resorption

# 1 UVOD

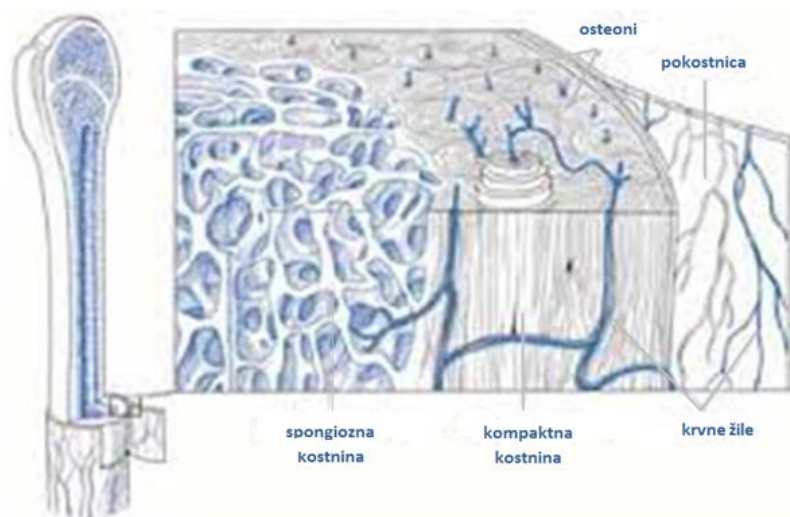
Kost je kompleksen in dinamičen organ, ki se nenehno prenavlja, oblikuje in popravlja. Sposobna se je zoperstavljati mehanskim silam pri gibanju in prenašanju bremen. Sestavljena je iz kostnega tkiva (kostnine), ki ga odeva pokostnica (periost), sklepne površine pa prekriva hrustanec. V notranjosti kosti se nahaja kostni mozeg (1).

## 1.1 SESTAVA KOSTI

Kostno tkivo je trdno in prožno obenem. Trdnost mu dajejo anorganske snovi, prožnost pa celice in organske snovi v medceličnini.

### 1.1.1 KOSTNINA

Kostno tkivo je sestavljeno iz dveh tipov kostnine; 80 % je kompaktne (kortikalne), 20 % pa spongiozne (trabekularne). Čeprav sta makroskopsko in mikroskopsko različni, pa je njuna kemična sestava identična. Spongiozna kostnina je prisotna v sredici kosti, in sicer v obliki ploščic in letvic, ki tvorijo nekakšno satovje. Ima majhno gostoto. Zaradi svoje večje površine je metabolično bolj aktivna. Drugi tip, to je kompaktna kostnina, pa je tesno razporejena v koncentričnih lamelah in obdaja notranjost kot skorja (2).



Slika 1: Zgradba kosti (spongiozna in kompaktna kostnina) (3).

### 1.1.2 MINERALNI DEL KOSTI

Mineralni del kosti je iz kalcijevega fosfata v obliki hidroksiapatita. Pokriva organski matriks in kostem daje strukturno trdnost, prav tako pa je rezervoar za okrog 99 %

celokupnega kalcija v telesu. Kar 90 % organskega matriksa kosti sestavlja kolagen, ostalih 10 % pa različni kostni proteini, kot so osteokalcin, sialoprotein, osteonektin in proteoglikani (4).

### **1.1.3 KOSTNE CELICE**

Kljub sorazmerno majhnemu številu znotraj obsežne kostne strukture kostne celice narekujejo njeno celotno zgradbo. Mednje sodijo trije glavni tipi celic: osteoblasti, osteociti in osteoklasti (2).

#### **1.1.3.1 Osteoblasti**

Osteoblasti so specializirane celice, odgovorne za tvorbo kostnine. Izvirajo iz multipotentnih mezenhimskih matičnih celic. Pomembno vlogo imajo v procesu kostne remodelacije, saj izražajo osteoklastogene dejavnike, proizvajajo proteine kostnega matriksa in sodelujejo pri mineralizaciji kosti (5).

Približno 15 % zrelih osteoblastov se med procesom remodelacije ujame v nastajajoči kostni matriks, kjer diferencirajo v osteocite. Nekateri med njimi pa ostanejo na kostni površini in se preoblikujejo v sploščene neaktivne celice (ang. flat lining cells). Osteoblasti pod vplivom različnih dražljajev proizvajajo vrsto rastnih dejavnikov. Na površini izražajo receptorje za te dejavnike, ki avtokrino in parakrino uravnavajo njihovo delovanje (6).

#### **1.1.3.2 Osteociti**

Osteociti nastanejo iz osteoblastov, ki se med procesom remodelacije ujamejo v novonastali kostni matriks (osteoid). Osteociti ohranijo večino strukturnih značilnosti osteoblastov, zmanjša pa se volumen celice, pa tudi metabolna aktivnost, čeprav še vedno proizvajajo matriksne proteine. Oblikujejo mrežo tankih kanalčkov, ki pronicajo v celoten kostni matriks, s čimer ostanejo v stiku med seboj in z osteoblasti na kostni površini. Med osteoklastno resorpcijo jih uničijo fagociti. Glavna vloga osteocitov je verjetno privabljanje osteoklastov na področja, kjer je kostna remodelacija nujno potrebna (5, 6).

#### **1.1.3.3 Osteoklasti**

Osteoklasti so visoko specializirane velike večjedrne celice, ki izvirajo iz hematopoetičnih matičnih celic, saj nastanejo z zlitjem monocitnih oz. makrofagnih predhodnikov. Za preživetje, proliferacijo in diferenciacijo omenjenih predhodniških celic v funkcionalne osteoklaste sta ključna dva citokina, in sicer makrofagne kolonije vzpodbujajoči dejavnik

(M-CSF) in ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika  $\kappa$ B (RANKL) (6, 7). To med drugim potrjujejo raziskave *in vivo* na miših, pri katerih je njuna odsotnost povzročila osteopetrozo (5). Odgovorna sta za indukcijo izražanja genov, ki so značilni za osteoklastno celično linijo.

Osrednji nalogi osteoklastov sta raztapljanje hidroksiapatita in razgradnja organskega matriksa. Prav tako uravnavajo delovanje ostalih kostnih celic in drugih celičnih vrst v kostnem mozgu. Osteoklasti imajo tudi pomembno vlogo pri različnih kostnih boleznih, zato je postala specifična inhibicija njihove funkcije glavna strategija za zdravljenje osteoporoze in drugih metabolnih kostnih bolezni (8). Osteoklasti imajo specifične morfološke in fenotipske značilnosti, ki omogočajo njihovo identifikacijo. Zrele celice izražajo 5 do 8 jeder, receptor za kalcitonin, številne Golgijeve komplekse, mitohondrije ter transportne mešičke, ki vsebujejo lizosomske encime, kot sta TRAP in katepsin K (6, 9, 10).

## 1.2 RASTNA DEJAVNIKA M-CSF IN RANKL

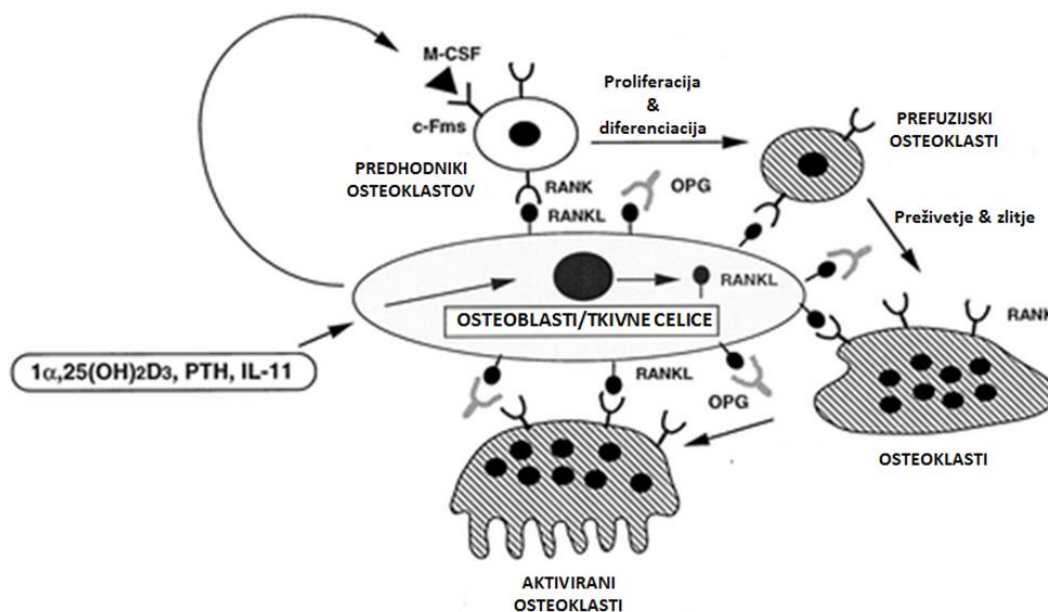
M-CSF je pomemben hematopoetični dejavnik, ki ga proizvajajo številne celice, vključno z limfociti, monociti, fibroblasti, endotelijskimi celicami, mioblasti in osteoblasti. Je ključen pri regulaciji celične proliferacije, diferenciacije in preživetja krvnih monocitov, makrofagov in njihovih predhodnikov. Pomembno vlogo igra tudi pri modulaciji številnih drugih fizioloških procesov, kot so metabolizem, plodnost, nosečnost, imunost (11).

V prisotnosti majhnih količin M-CSF je RANKL nujen in zadosten dejavnik za diferenciacijo osteoklastnih predhodniških celic v zrele osteoklaste (12). Sam M-CSF pa ni niti zadosten niti bistven za tvorbo osteoklastov in njihovo aktivnost *in vivo*. Njegova vloga je spodbujanje celične proliferacije ter preživetja predhodnikov in zrelih osteoklastov (13). M-CSF, ki ga izločajo osteoblasti, se veže na membranske receptorje c-Fms na zgodnjih predhodnikih osteoklastov, kar inducira izražanje receptorja RANK.

Citokin RANKL najdemo v topni ali membransko vezani obliki na osteoklastih, osteocitih, fibroblastih, dendritičnih celicah, zrelih T limfocitih in hematopoetskih predhodnikih. Vezava RANKL na receptorje RANK na osteoklastnih predhodnikih sproži njihovo diferenciacijo in zlitje v večjedrne osteoklaste ter spodbuja njihovo preživetje in funkcijsko aktivnost (12).

Obstaja tudi topna oblika receptorja za RANKL, osteoprotegerin (OPG), ki ga proizvajajo osteoblasti. Ta z membransko izraženim RANK tekmuje za vezavo RANKL in tako inhibira njegovo delovanje (13). Danes se zato uporablja pri razvoju učinkovin za zdravljenje osteoporoze in ostalih bolezni s pretirano kostno resorpcijo (12).

Rekombinantna rastna dejavnika M-CSF in RANKL sta danes široko dostopna in omogočata preprosto pridobivanje velikega števila osteoklastov *in vitro* ter proučevanje njihove aktivnosti brez potrebe po sočasni prisotnosti drugih vrst kostnih celic (14).

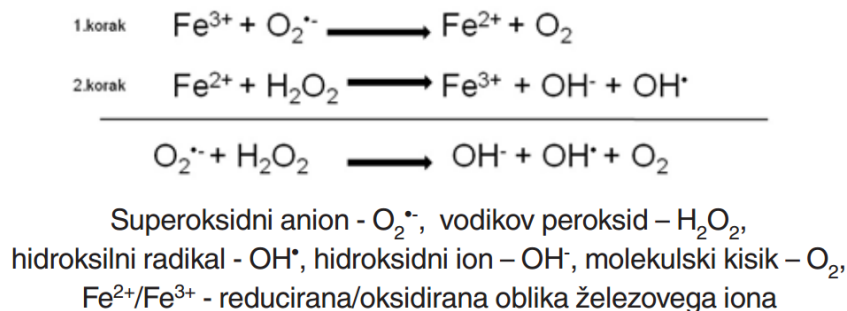


**Slika 2:** Shematski prikaz diferenciacije in funkcije osteoklastov, kjer se v osrednjo vlogo regulatorjev postavlja osteoblasti, saj preko sistema RANKL/RANK/OPG nadzirajo delovanje osteoklastov (3, 15).

### 1.3 PROCES RESORPCIJE KOSTNINE

Med procesom resorpcije pride v osteoklastih do obsežne reorganizacije citoskeleta in polarizacije citoplazemske membrane. S pomočjo membranske domene, imenovane »zapečateni področje« (ang. sealing zone), ki jo sestavljajo podosomi, bogati z aktinskimi obroči, se osteoklasti pritrdijo na mineralizirani ekstracelularni matriks in z dveh strani zaprejo in osamijo drugo specifično membransko domeno, imenovano »nagubana meja« (ang. ruffled border). Kostnino, ki je v stiku z njo, imenujemo resorpcijska lakuna. Tu poteka proces resorpcije. Osteoklasti vanjo izločajo protone, saj je za raztapljanje bazičnih soli hidroksiapatita potrebno kislo okolje, poleg tega pa še specifične encime za razgradnjo organskega matriksa. Kjer osteoklast ni v stiku z razgrajujočo se kostnino, se nahaja

bazolateralna membrana, ki v svojem osrednjem delu vsebuje funkcionalno sekretorno domeno (FSD). Ioni ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  in  $\text{HCO}_3^-$ ), ki se sprostijo med raztapljanjem, ter razgradni produkti matriksa se iz resorpcijske lakune prenesejo s transcitoznim vezikularnim transportom preko nagubane meje do FSD, kjer se izločijo v zunajcelični prostor. Po doslej znanih podatkih obstajata dve skupini encimov, ki imata glavno vlogo v razgradnji kostnega matriksa. To so matriksne metaloproteinaze (MMP) in lizosomski katepsini, med katerimi je najpomembnejši katepsin K. MMP naj bi začele proces razgradnje organskega matriksa, čeprav njihove točne vloge še niso pojasnili. Katepsin K izločajo osteoklasti v velikem obsegu in je ključna proteaza, ki cepi kolagen. S to proteolitično cepitvijo aktivira encim TRAP v transcitotičnih mešičkih osteoklastov. TRAP ima dve različni encimski aktivnosti, saj deluje kot fosfataza, zaradi vsebnosti železa v aktivnem mestu pa preko Fentonove reakcije generira tudi reaktivne kisikove zvrsti (ROS). S tvorbo ROS tako TRAP še olajša razgradnjo kolagena in nastalih produktov resorpcije (8, 16). Barvanje TRAP je zaradi svoje enostavnosti široko uporabna metoda za identifikacijo osteoklastov tako *in vitro* kot *in vivo* (17).



**Slika 3: Fentonova reakcija (18).**

## 1.4 KOSTNA REMODELACIJA

Razgradnja in tvorba kostnine sta uravnotežena pojava, ki omogočata, da staro kostnino vedno zamenja nova, ki je sposobna ustrezno prenašati mehanske obremenitve. Prav tako pa omogočata vzdrževanje homeostaze kalcija. V procesu remodelacije znotraj kostne remodelacijske enote tesno sodelujejo tako osteoklasti kot osteoblasti. Pri nekaterih boleznih (npr. maligna hiperkalcemija, postmenopavzalna osteoporoza) je pretirana kostna remodelacija glavni patofiziološki proces, nasprotno pa je za nekatere redke dedne bolezni (ostepetroza) odgovoren zmanjšan obseg remodelacije (16).

Kostna remodelacija traja nekaj tednov in je sestavljena iz več zaporednih faz:

## 1. FAZA AKTIVACIJE

Za začetek kostne remodelacije je potreben aktivacijski signal, bodisi mehanska strukturna poškodba kosti, delovanje določenih hormonov (parathormon PTH, ščitnični hormoni, rastni hormoni, kortikosteroidi, spolni hormoni in kalcitriol) kot odziv na sistemske spremembe v homeostazi ali lokalno delovanje citokinov, kot sta OPG in RANKL (3). Zaznajo ga osteociti in ga prevedejo v biološke signale, ki spodbujajo diferenciacijo in aktivacijo osteoklastov.

## 2. FAZA RAZGRADNJE (RESORPCIJE)

Osteoblasti začnejo v odzivu na signale proizvajati in izločati kemokine, ki na mesto remodelacije privabljajo osteoklastne predhodnike ter citokine, pomembne za osteoklastogenezo. Nastali osteoklasti se prilepijo na površino kosti in začnejo razgrajevati kostnino na način, ki smo ga že opisali.

## 3. FAZA PREOBRATA

Osteoklasti se umaknejo iz resorpcijske lakune, nato fagocitne mononuklearne celice odstranijo ostanke nerazgrajenega kolagena in pripravijo osteoblastom površino za izgradnjo nove kostnine.

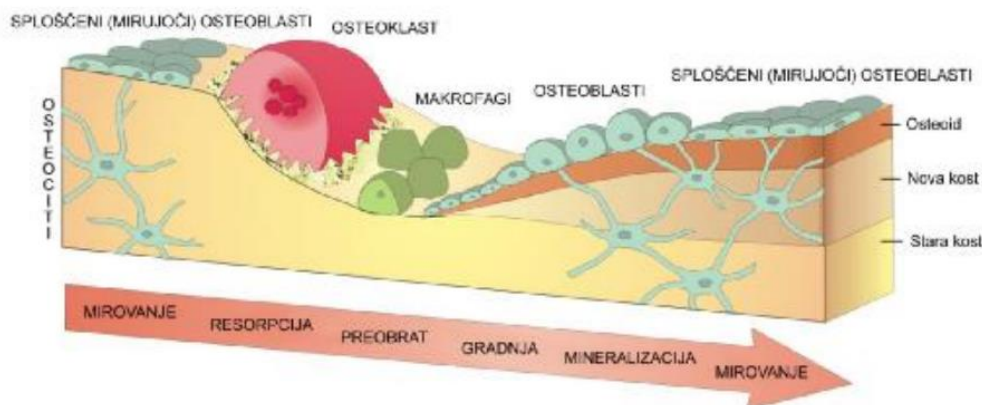
## 4. FAZA IZGRADNJE

Osteoblastni predhodniki se pospešeno pomikajo na območje resorpcijske lakune, kjer diferencirajo ter začnejo proizvajati in izločati molekule, ki oblikujejo novonastalo kostnino. Glavni gradnik organskega matriksa je kolagen tipa I, sestavljajo pa ga še nekolagenski proteini in lipidi. Novonastali osteoid se nato še mineralizira s kristali hidroksiapatita.

## 5. ZAKLJUČNA FAZA

Ko razgrajeno kostnino zamenja enaka količina nove, terminacijski signali sporočajo, da je cikel remodelacije končan. Osteoblasti vstopijo v apoptozo, lahko pa se tudi preoblikujejo v sploščene neaktivne celice ali ostanejo ujeti v mineraliziranem matriksu in diferencirajo v osteocite. Novonastala kostnina se vzdržuje do naslednjega cikla remodelacije (4-6).





Slika 4: Proces kostne remodelacije (19).

## 1.5 VIRI ČLOVEŠKIH OSTEOKLASTOV ZA TESTIRANJE *IN VITRO*

Primarne človeške osteoklaste lahko pridobimo iz različnih virov: z direktno izolacijo iz kosti, tumorjev GCTB (ang. giant cell tumor of bone), sočasnim gojenjem osteoblastov in kostnih tkivnih celic in mononuklearnih celic periferne krvi (PBMC). Vendar so vsi naštetih postopki problematični.

Celice, ki jih izoliramo iz kostnih tumorjev GCTB, izražajo številne citokemične in funkcionalne značilnosti normalnih osteoklastov, vendar pa tumorji v fizioloških pogojih niso prisotni. So tudi večji in imajo več jeder kot običajni osteoklasti, prav tako pa niso reden in zanesljiv vir človeških osteoklastov.

Človeške primarne osteoklaste je iz kosti težko izolirati, saj so v skeletu odraslega prisotni v majhni gostoti, poleg tega pa so močno pritrjeni na kostni matriks. Zato so se včasih pri študijah večinoma zatekali k analizi citokemičnih in funkcionalnih značilnosti osteoklastov, pridobljenih iz mladih ptičjih/sesalskih kosti. Pri tem so uporabljali mehansko ali encimsko deagregacijo. Povsem nepraktično in seveda etično sporno pa je, da bi na ta način pridobivali tudi človeške osteoklaste.

Dodatna težava pri vseh omenjenih virih je, da kulture tako pridobljenih osteoklastov vsebujejo tudi ostale celice, kot so osteoblasti, hematopoetske celice in kostne tkivne celice. Te pa v celični kulturi s tvorbo in izločanjem citokinov lahko vplivajo na aktivnost osteoklastov.

Pravo revolucijo v pridobivanju osteoklastov je prineslo spoznanje, da sta RANKL in M-CSF bistvena citokina za diferenciacijo mieloidne hematopoetične celične linije v zrele in funkcionalne osteoklaste. S pomočjo sodobnih biotehnoloških pristopov lahko danes enostavno pridobimo rekombinantna dejavnika in ju dodamo neposredno v kulturo

osteoklastnih predhodnikov, ki jih pridobimo z izolacijo monocitov iz mononuklearnih celic periferne krvi (PBMC). V takem eksperimentalnem sistemu ne potrebujemo prisotnosti drugih celičnih vrst. Večjedrne celice, ki nastanejo v teh pogojih *in vitro*, izražajo vse citokemične in funkcijske značilnosti zrelih človeških osteoklastov, vključno z njihovo sposobnostjo obsežne lakunarne resorpcije. Vendar pa se obseg lakunarne resorpcije v takem eksperimentalnem sistemu pogosto spreminja, predvsem zaradi dejstva, da ta ni le funkcija števila osteoklastov, ki nastanejo v takih pogojih, ampak tudi njihove dejanske resorptivne aktivnosti (7, 20, 21).

Z rekombinantnima rastnima dejavnikoma lahko vzpostavimo ponovljiv sistem *in vitro*, v katerem razvijemo veliko število osteoklastov in nato analiziramo njihovo resorptivno aktivnost. Le na ta način lahko neodvisno od vpliva ostalih vrst kostnih celic specifično ovrednotimo vpliv zdravilnih učinkovin in ostalih molekularnih faktorjev na kostno resorpcijo.

## 2 NAMEN DELA

Namen našega dela je vzpostavitev preprostega in učinkovitega modela *in vitro* za diferenciacijo človeških monocitov iz periferne krvi v osteoklaste in za preskušanje njihove funkcijske aktivnosti.

Najprej bomo ob uporabi človeških rekombinantnih rastnih dejavnikov M-CSF in sRANKL preskusili dva različna načina gojenja in diferenciacije monocitov, in sicer na adherentni in neadherentni podlagi, pri čemer bomo generirali osteoklaste. Monocite bomo izolirali iz levkocitnih koncentratov štirih krvodajalcev, nato pa jih bomo gojili tako v posameznih kot tudi medsebojno pomešanih celičnih kulturah. Morfološke spremembe celic med gojenjem *in vitro* bomo periodično opazovali z invertnim mikroskopom, funkcijsko pa bomo nastale osteoklaste vrednotili z uporabo komercialno dostopnih diskov iz govejih kosti in človeškega kostnega substrata. Njihovo funkcijsko aktivnost bomo vizualizirali z barvanjem TRAP in z Mayerjevim hematoksilinom, kvantitativno pa ovrednotili s testom ELISA za določanje specifičnih razgradnih produktov kolagena tipa I (CTX-I).

Predvidevamo, da:

- bodo za diferenciacijo monocitov v osteoklaste primernejši neadherentni pogoji, saj pri postopku z adhezijo potrebujemo tripsin za odstranitev celic od nastale podlage, kar je dokaj agresiven postopek;
- bo diferenciacija predhodno medsebojno pomešanih monocitov različnih oseb uspešna in da bo predstavljala primeren način za pridobivanje večjih količin osteoklastov, namenjenih za testiranje njihovih funkcijskih aktivnosti v različnih pogojih *in vitro*;
- bo uporaba pomešanih monocitov različnih oseb zanimiva in koristna predvsem s stališča priprave osteoklastov, ki bodo izražali povprečne interindividualne razlike posameznikov in omogočali zanesljivejšo izvedbo eksperimentov z uporabo enakih celic.

### 3 MATERIALI IN METODE

Vse opisane postopke smo izvajali v aseptičnih pogojih, v komori z laminarnim pretokom zraka MC 15-2 (Iskra PIO, Slovenija), in če ni bilo drugače zahtevano, pri sobni T, ob uporabi sterilnega laboratorijskega materiala in reagentov ter skladno s predpisi zaščite pri delu v laboratoriju.

Ob prvem odprtju vsebnikov z mediji RPMI 1640 (Sigma Aldrich®, ZDA),  $\alpha$ -MEM (Sigma-Aldrich®, ZDA) in DMEM z L-glutaminom (Gibco® Life Technologies, VB) smo vanje dodali po 5ml/500ml raztopine antibiotikov in antimikotikov (100x) (Gibco® Life Technologies, ZDA), v medija RPMI 1640 in  $\alpha$ -MEM pa še po 5ml/500ml raztopine L-glutamina v stabilizirani obliki GlutaMAX™-I (100x) (Gibco® Life Technologies, Japonska).

#### 3.1 IZOLACIJA IN PRIPRAVA MONOCITOV IZ LEVKOCITNIH KONCENTRATOV (BUFFY COAT)

Levkocitne koncentrate »buffy coat« (BC) štirih krvodajalcev smo dobili na Zavodu RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani, ki ima dovoljenje etične komisije za uporabo krvnih vzorcev v raziskovalne namene.

Tabela I: Identifikacijske oznake in osnovne značilnosti darovalcev BC.

Oznaka darovalca	Spol	Starost	Krvna skupina	Faktor RhD
Mo1	Ženska	26 let	A	RhD +
Mo2	Ženska	58 let	B	RhD +
Mo3	Moški	33 let	AB	RhD +
Mo4	Moški	62 let	A	RhD +

Izolacijo mononuklearnih celic iz BC, njihovo zamrzovanje, odmrzovanje ter štetje smo izvedli skladno s standardnimi laboratorijskimi operativnimi postopki. Na vse vsebnike, ki smo jih med delom uporabljali, smo obvezno zapisovali identifikacijske oznake darovalcev (Mo1-Mo4) in ustrezne datume.

### 3.1.1 Izolacija mononuklearnih celic (MNC) iz levkocitnih koncentratov (BC)

Po 15 ml BC vsakega darovalca smo odpipetirali v 50 ml plastično centrifugirko, dolili D-PBS s  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Mg}^{2+}$  (Gibco® Life Technologies, Velika Britanija) do oznake 50 ml in dobro premešali. Nato smo po 25 ml razredčenega BC počasi in previdno, da se plasti med seboj nista pomešali, s pipeto nanесли na 12,5 ml predhodno natočene raztopine Lympholite®-H (Cedarlane®, Kanada) v 50 ml plastični centrifugirki. To smo nato dobro zaprli in 15 minut centrifugirali (Multifuge 3S/3S-R, Heraeus, Nemčija ali Centric 322 PLC, Tehnica, Slovenija) pri 2300 obratih  $\text{min}^{-1}$ , brez zavore. S sterilno plastično Pasteurjevo pipeto za enkratno uporabo smo prenesli nastali sloj MNC med zgornjo plazemsko plastjo in spodnjim slojem Lympholite®-H iz po dveh v novo 50 ml plastično centrifugirko. Nato smo vanjo dolili D-PBS s  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Mg}^{2+}$  do oznake 45 ml, jo dobro zaprli in centrifugirali 12 minut na 200 x g, brez zavore. Supernatant smo odlili, celično usedlino pa resuspendirali s pomočjo električnega stresalnika (Lab dancer, IKA®, Nemčija) in vsebine v centrifugirkah, kjer so bile MNC iste osebe, združili v eni izmed njih ter na koncu dolili medij RPMI 1640 do oznake 45 ml. Dobro zaprto centrifugirko smo centrifugirali 10 minut na 200 x g, brez zavore. Supernatant smo ponovno odlili in celice resuspendirali na stresalniku. Glede na predhodno ocenjeno količino končne celične usedline smo dolili primeren volumen medija RPMI 1640 z 10 % FBS (Gibco®, Life Technologies, VB). Nato smo določili število izoliranih MNC v suspenziji. V vdolbinici mikrotitrne plošče smo med seboj pomešali 80  $\mu\text{l}$  0,4 % raztopine modrila Triptan blue solution (Sigma-Aldrich®, ZDA) in 20  $\mu\text{l}$  celične suspenzije. Vzorec te mešanice smo nato iztisnili pod krovno stekelce, položeno čez števno mrežo Neubauerjeve komore in pod svetlobnim mikroskopom (Olympus CX21FS1, Olympus, Japonska) prešteli celice v 5 kvadratkih števne mreže. Pri štetju smo upoštevali tudi celice v levem in zgornjem robu kvadratka, ne pa tudi tistih, ki so ležale na spodnji in desni stranici.

Število MNC v suspenziji smo izračunali po naslednjem postopku:

$$N = n \times f \times R_x \times F_v = n \times 5 \times 5 \times 10^4$$
$$\sum (\text{celokupno število izoliranih MNC}) = N \times V$$

**Enačba 1: Izračun celotnega števila celic po štetju na števni mreži Neubauerjeve komore.**

*N* – število MNC v 1 ml celične suspenzije

*n* – število MNC v 5 kvadratkih števne komore

*f* – 5 (faktor za volumen 0,1  $\mu\text{l}$ )

*R* = 5 (razredčitev: 20/100)

*F<sub>v</sub>* =  $10^4$  (volumski faktor za 1 ml)

*V* – volumen izhodiščne celične suspenzije v ml

### 3.1.2 Izolacija monocitov z magnetno separacijo

Pri delu smo uporabljali opremo in reagente proizvajalca Miltenyi Biotec (Nemčija), in sicer: kolono LS, separator MidiMACS, ter reagente iz kompleta Monocyte Isolation Kit II human. Izolacijo monocitov iz suspenzije MNC z magnetno separacijo smo izvedli skladno s protokolom proizvajalca.

#### *Princip*

Gre za negativno selekcijo (izločanje) celic, ki niso monociti. Te najprej označimo z mešanico z biotinom konjugiranih monoklonskih protiteles (anti-CD3, -CD7, -CD16, -CD19, -CD56, -CD123, -glikoforin A), nato pa še z antibiotinskimi monomagnetnimi mikrokroglicami. Magnetno označene nemonocitne celice zadržimo na koloni, ki jo postavimo v separator z magnetnim poljem, prosti, neoznačeni monociti pa stečejo skozi kolono in jih zberemo v centrifugirko.

#### *Postopek*

Uporabili smo po  $2 \times 10^8$  celic vsakega darovalca. Glede na to število celic smo preračunali tudi količine vseh potrebnih reagentov.

Vzorcu s celicami smo dodali približno 30 ml puфра MACS in ga v zaprti plastični centrifugirki centrifugirali 12 minut pri 300 x g, brez zavore. Supernatant smo odlili in postopek spiranja še enkrat ponovili.

Nato smo izvedli magnetno separacijo monocitov in zbrano čisto monocitno frakcijo v 50 ml plastični centrifugirki dopolnili do oznake 30 ml z medijem RPMI 1640 ter celično suspenzijo centrifugirali 10 minut na 1700 obratih  $\text{min}^{-1}$ , brez zavore. Supernatant smo odlili in celice resuspendirali v primernem volumnu RPMI 1640 z 10 % FBS. Nato smo monocite prešteli in z medijem RPMI 1640 z 10 % FBS uravnali celično koncentracijo na želeno vrednost ( $\sim 15 \times 10^6$  celic/ml).

### 3.1.3 Zamrzovanje izoliranih monocitov

Za vsako od suspenzij Mo1-Mo4 smo v 50 ml plastični centrifugirki pripravili tak volumen zamrzovalnega medija, ki je bil enak volumnu celične suspenzije. Sestavljen je bil iz 40 % RPMI 1640, 40 % FBS in 20 % DMSO HYBRI-MAX® (Sigma-Aldrich®, ZDA). Vsebinsi obeh centrifugirk smo ohlajali na ledeni kopeli približno 15 minut. Med tem časom smo pripravili ustrezno število krioepruвет (2 ml) in jih ustrezno označili z identifikacijsko oznako celic in datumom zamrzovanja ter jih postavili zamrzovalno omaro na  $-75\text{ }^\circ\text{C}$

(Forma™ 88000 Series, Thermo Fisher Scientific, ZDA). Ko sta se celična suspenzija in zamrzovalni medij dovolj ohladila, smo s pomočjo Pasteurjeve pipete na ledeni kopeli po kapljicah in med stalnim stresanjem celične suspenzije vanjo dodajali zamrzovalni medij. Nato smo s Pasteurjevo pipeto mešanico dobro premešali in jo hitro raztočili v ohlajene krioeprove, od katerih smo vsako napolnili do oznake 1 ml. Dobro zaprte smo jih nemudoma prenesli v zamrzovalno omaro na  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po 48 urah smo jih ob predpisani uporabi zaščitnih sredstev prenesli v vsebnik za shranjevanje celic v tekočem  $\text{N}_2$  Locator JR Plus (Thermo Scientific, ZDA).

### 3.1.4 Odmrzovanje izoliranih monocitov

Za vsako suspenzijo celic Mo1-Mo4 smo v 50 ml plastični centrifugirki pripravili takšno količino odmrzovalnega medija, sestavljenega iz medija  $\alpha$ -MEM s 30 % FBS, ki je bila enaka dvakratnemu volumnu celične suspenzije, ki smo jo odmrzovali. Odmrzovalni medij smo segreli na vodni kopeli, ogreti na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Iz vsebnika za shranjevanje celic v tekočem  $\text{N}_2$  smo vzeli ustrezno število krioeprevet z izoliranimi monociti in jih prenesli v vodno kopel na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Da se je vsebina hitreje odtajala, smo krioepreveto stresali. Tik preden so se celične suspenzije popolnoma odtalile (prisotni čisto majhni koščki ledu), smo jih prenesli v sterilno komoro. V vsako krioepreveto smo nato s Pasteurjevo pipeto prenesli del odmrzovalnega medija, dobro premešali ter del mešanice prenesli nazaj v centrifugirko z odmrzovalnim medijem. Postopek smo ponovili še dvakrat, dokler nismo vse celične suspenzije prenesli v odmrzovalni medij. Centrifugirko z odmrznjenimi celicami smo do oznake 40 ml napolnili z medijem  $\alpha$ -MEM in dobro zaprto centrifugirali 10 minut na  $1700\text{ obratih min}^{-1}$ , brez zavore. Supernatant smo odlili, celice pa resuspendirali na električnem stresalniku in jim dodali po 1 ml medija  $\alpha$ -MEM z 10 % FBS (v nadaljevanju: popolni medij). Nato smo jih prešteli in z enakim medijem uravnali njihovo koncentracijo na  $1,2 \times 10^6$  celic/ml.

## 3.2 PRIPRAVA ČLOVEŠKIH REKOMBINANTNIH RASTNIH DEJAVNIKOV M-CSF IN sRANKL

Uporabili smo človeška rekombinantna rastna dejavnika sRANKL in M-CSF (PREPROTECH®, Velika Britanija). Skladno s postopkom, ki so ga razvili Hemingway in sod. (20), smo pripravili osnovne in delovne raztopine in jih zamrznili do uporabe.

## **1. PRIPRAVA DELOVNIH RAZTOPIN RASTNIH DEJAVNIKOV**

Po 1 stekleničko z rastnim dejavnikom smo pred odprtjem centrifugirali in nato razredčili s 100  $\mu\text{l}$  destilirane vode, da smo dobili koncentracijo 100 ng/ $\mu\text{l}$  oz. 0,1 mg/ml (*osnovna raztopina*).

Za pripravo delovne raztopine smo pripravili naslednji medij: 5 ml 0,1 % BSA (Sigma Aldrich®, ZDA) v PBS, in ga sterilno filtrirali skozi 0,22  $\mu\text{m}$  filter.

Osnovno raztopino smo nato s tem medijem redčili do 1000  $\mu\text{l}$  (100  $\mu\text{l}$  osnovne r. + 900  $\mu\text{l}$  medija): 10 ng/ $\mu\text{l}$  (*osnovna delovna raztopina*).

*Delovne raztopine:*

M-CSF: Vsakih 37,5  $\mu\text{l}$  osnovne delovne raztopine (375 ng) smo redčili z medijem na 1000  $\mu\text{l}$  (0,375 ng/ $\mu\text{l}$ ) in zamrznili vzorčke po 100  $\mu\text{l}$  (37,5 ng) na  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

sRANKL: Vsakih 75  $\mu\text{l}$  osnovne delovne raztopine (750 ng) smo redčili z medijem na 1000  $\mu\text{l}$  (0,75 ng/ $\mu\text{l}$ ) in zamrznili vzorčke po 100  $\mu\text{l}$  (75 ng) na  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## **2. PRIPRAVA 1 ml MEDIJA ZA DIFERENCIACIJO MONOCITOV**

Zmešali smo 100  $\mu\text{l}$  delovne raztopine M-CSF (37,5 ng), 100  $\mu\text{l}$  delovne raztopine sRANKL (75 ng) in 800  $\mu\text{l}$  DMEM.

## **3. PRIPRAVA 1 ml MEDIJA ZA FUNKCIJSKE TESTE OSTEOKLASTOV**

M-CSF: 40  $\mu\text{l}$  osnovne delovne raztopine smo razredčili z 960  $\mu\text{l}$  0,1 % raztopine BSA v PBS (0,4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

sRANKL: 100  $\mu\text{l}$  osnovne delovne raztopine smo razredčili z 900  $\mu\text{l}$  0,1 % raztopine BSA v PBS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

Zmešali smo po 100  $\mu\text{l}$  delovnih raztopin M-CSF in sRANKL ter 800  $\mu\text{l}$  popolnega medija, da smo dobili koncentracijo 40 ng/ml M-CSF in 100 ng/ml sRANKL.

## **3.3 PREOBRAZBA MONOCITOV V OSTEOKLASTE**

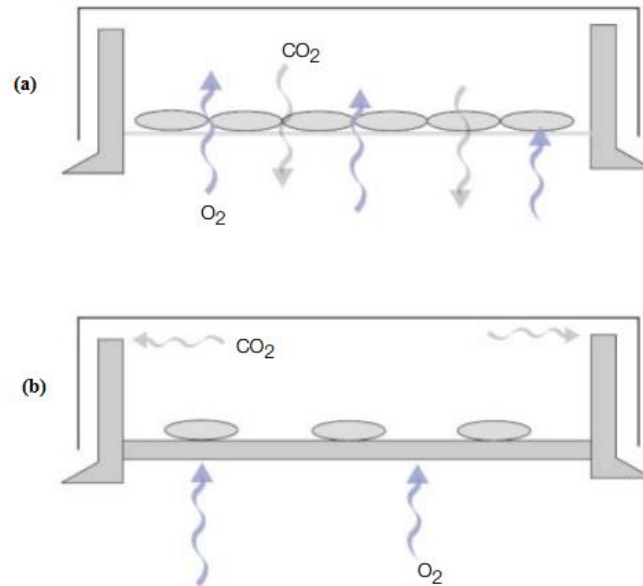
Vse celične kulture smo inkubirali v inkubacijski komori (Cytoperm 2, Heraeus, Nemčija) na temperaturi  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pri 5 %  $\text{CO}_2$  in 95 % vlagi v zraku (standardni pogoji).

### **3.3.1 Diferenciacija monocitov v osteoklaste na neadherentni gojitveni površini**

Za diferenciacijo monocitov v osteoklaste smo uporabili petrijevke Lumox<sup>®</sup> (Sarstedt, Nemčija), katerih dno je iz 25  $\mu\text{m}$  debelega hidrofobnega filma, ki omogoča izmenjavo



plinov. Celice zaradi hidrofobne površine ostanejo v suspenziji na meji med tekočo in plinsko fazo, kar pomeni, da so vedno optimalno preskrbljene z  $O_2$ , presežek  $CO_2$  pa se učinkovito odstranjuje iz sistema.



**Slika 5: Primerjava gojenja celic v Lumox® in konvencionalnih petrijevkah; (a) – Lumox®, (b) – običajna petrijevka s plastičnim dnom.**

Skupaj s petrijevkami Lumox® smo uporabili tudi silikonske vložke flexiPERM® disc (Sarstedt, Nemčija), s katerimi smo razdelili gojitveno površino na štiri ločene predelke ter tako omogočili sočasno gojenje med seboj povsem ločenih kultur. Vložki so odporni na svetlobo in temperaturo, so hidrofobni in netoksični za celice.



**Slika 6: Z vložkom flexiPERM® disc opremljena petrijevka Lumox® s štirimi ločenimi celičnimi kulturami.**

### ***3.3.1.1 Priprava vložkov flexiPERM® disc***

Dan pred pripravo celičnih kultur za gojenje smo 2 vložka flexiPERM® disc za 20 minut pomočili v sterilni 70 % etanol, nato pa še za 20 minut v sterilno destilirano vodo in ju v sterilni komori na laminarnem toku zraka posušili do naslednjega dne.

### ***3.3.1.2 Priprava posameznih suspenzij in mešanice alogenskih monocitov***

Suspenzije čistih frakcij monocitov Mo1, Mo2, Mo3 in Mo4 smo razredčili s popolnim medijem tako, da so vsebovale po  $1,2 \times 10^6$  celic/ml. Nato smo pripravili še mešanico vseh monocitov in sicer tako, da smo med seboj pomešali po  $3 \times 10^5$  celic Mo1, Mo2, Mo3 in Mo4 (skupno število  $1,2 \times 10^6$  celic/ml).

### ***3.3.1.3 Priprava celičnih kultur in gojenje***

Sterilizirana in osušena vložka flexiPERM® disc smo vstavili v 2 petrijevki Lumox® in v posamezne predelke z merilno pipeto prenesli po 1 ml vsake od suspenzij celic (Mo1, Mo2, Mo3, Mo4, MoMIX), nato pa v vsak predelek dodali še po 0,5 ml popolnega medija. Petrijevki smo za 2 uri postavili v inkubator, nato pa celice pogledali pod invertnim mikroskopom (Nikon Eclipse TE300, Japonska) in fotografirali (Nikon Digital Sight DS-FM, Japonska).

Iz vsakega predelka smo odpipetirali po 1 ml medija, ga zamenjali z 1 ml popolnega medija z rastnima dejavnikoma sRANKL in M-CSF in celične kulture inkubirali pri standardnih pogojih. Vsake 3 dni smo celice najprej pregledali pod invertnim mikroskopom in fotografirali, nato pa zamenjali po 1 ml medija z 1 ml svežega medija z dodanima rastnima dejavnikoma in nadaljevali z inkubacijo vse do 19. dne.

### ***3.3.1.4 Zbiranje osteoklastov iz kultur v petrijevkah Lumox®***

Po 19 dneh gojenja smo kulture transformiranih monocitov najprej pogledali pod invertnim mikroskopom in fotografirali, nato pa s pipeto iz njih pobrali ves medij in jih dvakrat previdno sprali s po 1 ml popolnega medija. Nato smo v vsako kulturo dodali po 1 ml popolnega medija in petrijevko nežno stresali, da smo celice spravili v suspenzijo, ki smo jo s Pasteurjevo pipeto prenesli v ustrezno označeno 50 ml plastično centrifugirko. Pri štetju celic smo naleteli na težavo, saj so bile celice prevelike, da bi se enakomerno porazdelile v števno mrežo. Postopek smo priredili tako, da smo prešteli vse celice na objektnem stekelcu, nato pa njihovo celotno število preračunali glede na volumen suspenzije, ki smo jo prenesli v števno komoro (~ 2 µl).

Za nadaljnje poskuse smo volumne posameznih celičnih suspenzij uravnali tako, da so vsebovale po  $3 \times 10^4$  celic/100 $\mu$ l. Pri suspenzijah Mo3 in Mo4, kjer takšne koncentracije zaradi majhnega števila celic nismo mogli doseči, smo pripravili naslednje koncentracije:

Mo3:  $1,5 \times 10^4$  celic/100  $\mu$ l

Mo4:  $7,5 \times 10^3$  celic/100  $\mu$ l

### **3.3.2 Diferenciacija monocitov v osteoklaste na adherentni gojitveni površini**

#### **3.3.2.1 Priprava in gojenje celičnih kultur**

Po odmrznitvi monocitov Mo1, Mo2, Mo3 in MoMIX smo celice prešteli po ustaljenem postopku in uravnali njihovo koncentracijo s popolnim medijem na  $1,2 \times 10^6$  celic/ml. Nato smo iz suspenzij odvzeli volumne, v katerih je bilo po  $5 \times 10^5$  celic, za pripravo mešanice MoMIX pa smo v enakih razmerjih pomešali volumne posameznih suspenzij Mo1, Mo2 in Mo3 tako, da smo skupno dobili  $5 \times 10^5$  celic. Vsako od celičnih suspenzij smo odpipetirali v ustrezne 4 vdolbinice mikrotitrne plošče z ravnim dnom in jih, če je bilo to potrebno, dopolnili s popolnim medijem do 1,5 ml. Mikrotitrsko ploščo smo za 2 uri postavili v inkubator, da so se celice pritrdile, nato pa pogledali pod invertnim mikroskopom in fotografirali. Pred nadaljevanjem gojenja smo iz vsake kulture odstranili po 1 ml medija in ga zamenjali z enakim volumnom popolnega medija z rastnima dejavnikoma sRANKL in M-CSF. Mikrotitrsko ploščo s kulturami smo nato postavili v inkubator in vsake 2 dni zamenjali po 1 ml medija z enako količino popolnega medija z dodanima rastnima dejavnikoma. Po 7 dneh gojenja smo izvedli tripsinizacijo pritrjenih celic.

#### **3.3.2.2 Tripsinizacija celic**

Najprej smo iz vdolbinic s celičnimi kulturami odpipetirali ves medij in pritrjene celice dvakrat sprali s po 2 ml D-PBS s  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Mg}^{2+}$ , da smo odstranili ves serum, ki blokira delovanje tripsina. Tripsin in sojin tripsinski inhibitor (oba Gibco® Life Technologies, VB) smo odmrznili v vodni kopeli pri 37 °C. V vsako vdolbino smo dodali po 0,5 ml tripsina, nato pa s pomočjo invertnega mikroskopa opazovali, kdaj so se celice odlepile od podlage. Takrat smo v vsako vdolbinico dodali po 0,5 ml inhibitorja in po 1,5 ml popolnega medija. Suspenzije s celicami smo prenesli v 50 ml centrifugirke, vsako od vdolbinic še dvakrat sprali s po 2 ml  $\alpha$ -MEM in spirke dodali v ustrezne centrifugirke. Nato smo vsaki celični suspenziji dodali D-PBS s  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Mg}^{2+}$  do oznake 40 ml in jih centrifugirali 10 minut na 1600 obratih  $\text{min}^{-1}$ , brez zavore. Supernatante smo zavrgli, celice

pa resuspendirali v po 30 ml medija  $\alpha$ -MEM in jih ponovno centrifugirali 10 minut na 1600 obratih  $\text{min}^{-1}$ , brez zavore. Supernatante smo odlili in celice resuspendirali v po 1 ml popolnega medija. Ker se celice pri štetju zaradi velikosti niso pravilno postavile v števno mrežo Neubauerjeve komore, smo postopek štetja priredili tako, kot smo že opisali v poglavju 3.3.1.4.

Za nadaljnje poskuse smo uporabljali koncentracijo  $2 \times 10^4$  celic/50  $\mu\text{l}$ . Zato smo vse suspenzije prešteti celic ponovno centrifugirali 10 minut na 1600 obratih  $\text{min}^{-1}$ , brez zavore, in jih v preračunanem volumnu popolnega medija resuspendirali, da smo dobili omenjeno delovno koncentracijo.

### 3.4 PRESKUŠANJE FUNKCIJSKE AKTIVNOSTI OSTEOKLASTOV *IN VITRO*

#### 3.4.1 Živost celic

Test živosti celic smo izvedli po gojenju oz. diferenciaciji z uporabo reagenta CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega, ZDA). Rastopina vsebuje tetrazolijevo sol MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H tetrazolijeva sol), ki jo metabolno aktivne celice reducirajo do topnega formazana. Količina produkta je neposredno sorazmerna številu živih celic v kulturi in jo izmerimo z absorbanco pri 490 nm.

Iz vsake od celičnih suspenzij smo odvzeli volumen, v katerem je bilo po  $3 \times 10^4$ \* celic, gojenih na hidrofobni površini oz. po  $2 \times 10^4$  celic, gojenih na plastični površini, v po 1 vdolbinico z ravnim dnom mikrotitrne plošče 96 in ga po potrebi dopolnili do 100  $\mu\text{l}$  z ustrežno količino popolnega medija, nato pa v vsako vdolbinico dodali še po 100  $\mu\text{l}$  popolnega medija z 40 ng/ml M-CSF in 100 ng/ml sRANKL. Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali 48 ur, da so se celice pritrdile, nato pa iz kultur s pipeto previdno odstranili po 100  $\mu\text{l}$  medija. V vsako vdolbino smo nato dodali po 20  $\mu\text{l}$  reagenta CellTiter 96® AQueousOne Solution ter ploščo postavili v inkubator za 4 ure. Nato smo jo slikali in samo informativno spektrofotometrično izmerili absorbance s čitalnikom Synergy H4 Hybrid Reader (BioTek, ZDA). Za negativno kontrolo smo uporabili samo popolni medij z dodanima rastnima dejavnikoma.

### 3.4.2 Kostna resorpcija

Za merjenje obsega kostne resorpcije smo najprej pripravili kostne diske oziroma mikrotitrsko ploščo OsteoAssay™ Human Bone Plate (Lonza, ZDA) skladno z navodili proizvajalca.

#### *Kostni diski*

Kostne diske iz kortikalnega dela govejih stegnenic (IDS, VB) smo s sterilno pinceto previdno vzeli iz 70 % etanola, v katerem so bili shranjeni, jih osušili in 3x sprali s po 5 ml 10 % FBS. Položili smo jih v ustrezno število vdolbinic z ravnim dnom mikrotitrsko plošče 96.

#### *OsteoAssay™ Human Bone Plate*

OsteoAssay™ Human Bone Plate vsebuje v vdolbinicah mikrotitrsko plošče 96 tanko plast adheriranih delcev človeške kosti, ki je primerna za vrednotenje funkcijske aktivnosti osteoklastnih predhodnikov ali zrelih osteoklastov.

Ploščo OsteoAssay™ Human Bone Plate smo do uporabe hranili na suhem v zamrzovalni omari pri – 20 °C (Kirsch, Nemčija). V sterilni komori smo jo 60 minut pred začetkom dela vzeli iz ovitka in počakali, da se je segrela na sobno T. Vložke s po 8 vdolbinicami, ki jih pri delu nismo uporabljali, smo previdno odstranili iz nastavka, shranili v priloženo folijo, ki dobro tesni, in jih vrnil v zamrzovalnik na – 20 °C.

Po  $3 \times 10^4$ \* celic, gojenih na neadherentni površini oz.  $2 \times 10^2$  celic, gojenih na plastični površini, smo naselili v vdolbinice s kostnimi diski oz. vdolbinice plošče OsteoAssay™ Human Bone Plate. Kjer je bilo potrebno, smo dodali popolni medij do 100 µl, nato pa v vsako vdolbinico še po 100 µl popolnega medija z 40 ng/ml M-CSF in 100 ng/ml sRANKL in mikroplošče za 48 ur postavili v inkubator.

**Tabela II: Vsebina v vdolbinicah mikrotitrsko plošče.**

<b>Način diferenciacije</b>	<b>Kostni disk</b>	<b>OsteoAssay™ Human Bone Plate</b>
<b>Diferenciacija monocitov na hidrofobni neadherentni površini</b>	Mo1, Mo2, Mo3, Mo4, MoMIX+ MoMIX-, KD	/
<b>Diferenciacija monocitov na plastični adherentni površini</b>	Mo1, Mo2, Mo3, MoMIX, KD	Mo1+, Mo1-, Mo2, Mo3, MoMIX, OA

Legenda k Tabeli II: Mo1+/MoMIX+: popolni medij z rastnima dejavnikoma; Mo1-/MoMIX-: popolni medij brez rastnih dejavnikov, KD – kostni disk brez celic v popolnem mediju z rastnima dejavnikoma (negativna kontrola KD), OA – substrat človeške kosti brez celic v popolnem mediju z rastnima dejavnikoma (negativna kontrola OA). V vdolbinice na mikrotitrski plošči, ki so ostale prazne, smo nalili po 200  $\mu$ l D-PBS s  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Mg}^{2+}$ , s čimer smo preprečili izhlapevanje medija iz kultur.

### **3.4.3 Barvanje TRAP**

#### **3.4.3.1 Barvanje celic, gojenih na hidrofobni podlagi Lumox®**

Iz vsake od celičnih suspenzij (Mo1, Mo2, Mo3, Mo4 in MoMIX) smo prenesli volumen, v katerem je bilo  $3 \times 10^4$ \* celic, v po 1 vdolbinico z ravnim dnom na mikrotitrski plošči 96. Po potrebi smo dodali ustrezno količino popolnega medija do 100  $\mu$ l, nato pa k vsaki mikrokulturi še 100  $\mu$ l popolnega medija z 40 ng/ml M-CSF in 100 ng/ml sRANKL. Ploščo smo postavili v inkubator za 48 ur, da so se celice pritrdile, nato pa izvedli barvanje TRAP s kompletom reagentov TRAP Staining Kit (COSMO BIO, Ltd, Japonska) skladno z navodili proizvajalca.

Najprej smo iz kultur odstranili vse supernatante in jih prenesli v ustrezno označene mikroeprevete, ki smo jih shranili v hladilniku (do izvedbe testa ELISA CTX-I – negativne kontrole celic Mo1-Mo4, MoMIX). Vdolbinice smo dobro sprali z D-PBS s  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Mg}^{2+}$ , nato pa vanje za 5 minut dodali 10 % puferirano raztopino formalina (Sigma-Aldrich®, ZDA). Celice smo sprali z destilirano vodo, jim dodali kromogeni substrat in jih inkubirali ~ 30 minut pri standardnih pogojih, dokler pod invertnim mikroskopom nismo opazili primerne obarvanja. Reakcijo smo ustavili s spiranjem z deionizirano vodo. Rdečkasto obarvane sledi encima TRAP smo opazovali pod invertnim mikroskopom in posneli slike.

Prav tako smo barvanje diferenciranih celic na TRAP izvedli tudi na govejih kostnih diskih, kjer smo jih predhodno gojili 48 ur, kot je opisano v poglavju 3.4.2. Nato smo pobrali supernatante iz vseh kultur, jih prenesli v ustrezno označene mikroeprevete in shranili v hladilniku do izvedbe testa ELISA: testni vzorci Mo1-Mo4, MoMIX+, MoMIX-. Kostne diske smo nežno popivnali z bombažno gazo, jih sprali z destilirano vodo in izvedli barvanje TRAP.

#### **3.4.3.2 Barvanje celic, gojenih na plastični površini**

Barvanje TRAP smo izvedli tako na kostnih diskih kot na matriksu OsteoAssay™ Human Bone Plate po 48-urni inkubaciji celic, ki smo jih predhodno diferencirali na adherentni plastični površini, z uporabo enakega postopka in reagentov, kot je opisano v poglavju

3.4.3.1. Tudi tokrat smo supernatante (testni vzorci Mo1+/-, Mo2, Mo3, MoMIX) shranili v hladilniku do izvedbe testa ELISA CTX-I.

*Opomba:*

\*Zaradi majhnega števila celic v suspenzijah Mo3 in Mo4 smo vzeli po 100  $\mu$ l teh suspenzij, v katerih je bilo po:

Mo3 -  $15 \times 10^4$  celic oz.

Mo4 -  $7,5 \times 10^3$  celic.

#### **3.4.4 Barvanje z Mayerjevim hematoksilinom**

Uporabili smo raztopino Mayerjevega hematoksilina, ki so nam jo podarili na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Sestava:

- hematoksilin H9627 SIGMA (Sigma-Aldrich®, ZDA),
- galun  $KAl(SO_4)_2 \times 12H_2O$ ,
- $NaJO_3$ ,
- citronska kislina,
- kloralhidrat (Merck, Nemčija),
- demineralizirana voda.

Na ta način smo obarvali kostne diske, na katerih smo gojili celice po predhodni diferenciaciji na hidrofobni podlagi Lumox®, in sicer takoj po barvanju TRAP, skladno s postopkom, ki so ga razvili Takahashi in sodelavci (22). Kostne diske smo po barvanju TRAP in slikanju pod invertnim mikroskopom dobro podrgnili z bombažno gazo, pomočeno v destilirano vodo, da smo odstranili vse celice. Nato smo jih premestili v ustrezno število vdolbinic plošče z 12 vdolbinicami in s pomočjo pipete nanje nanесли po 10  $\mu$ l barvila Mayerjevega hematoksilina. Pustili smo ga delovati 40 s, ga nato sprali z destilirano vodo in diske dobro podrgnili s palčko, ovito v bombažno gazo, da smo odstranili vso odvečno barvilo. Nato smo pod mikroskopom vizualizirali resorbirano površino in posneli slike.

#### **3.4.5 Določanje količine razpadnih produktov kolagena tipa I s testom ELISA CTX-I**

Poskus smo izvedli s testnim sestavom CrossLaps® for Culture (CTX-I) ELISA (IDS, Velika Britanija).

Postopali smo skladno z navodili proizvajalca. Priporočljivo je sicer, da test izvedemo na dan, ko pobereмо supernatante, vendar pa lahko po do sedaj znanih podatkih uporabimo vzorce, ki smo jih hranili pri 4 °C največ 2 tedna. Mi smo test izvedli z vzorci supernatantov, ki smo jih v hladilniku hranili 6 dni (v primeru diferenciacije monocitov v

osteoklaste na petrijevkah Lumox®) oz. 2 dni (v primeru diferenciacije monocitov v osteoklaste na adherentni gojitveni površini).

### *Princip testa*

Test je namenjen kvantitativnemu vrednotenju količine razpadnih produktov kolagena tipa I (C-terminalnih telopeptidov), ki se med procesom kostne resorpcije sprostijo v supernatant celične kulture. Temelji na sočasni vezavi kolagenskih fragmentov z dvema monoklonskima protitelesoma, eno od njiju pa nato posreduje vezavo kompleksa na trdno površino mikrotitrne ploščice.

Standarde, vzorce in kontrole odpipetiramo v duplikatu v vdolbinice mikrotitrne plošče s pritrjenim streptavidinom in nato dodamo mešanico biotiniziranih in s peroksidazo konjugiranih protiteles. Vzpostavi se kompleks med kolagenskim fragmentom in dvema protitelesoma, ki se preko biotiniziranega protitelesa veže na površino streptavidina. Sledi inkubacija med stalnim stresanjem na električnem stresalniku za mikrotitrne plošče pri 300 rpm in sobni T, nato pa vdolbinice speremo in vanje dodamo kromogeni substrat. Po predpisani inkubaciji na sobni T barvno reakcijo prekinemo z dodatkom žveplove kisline.

### *Postopek*

Najprej smo pripravili 8 standardov z znanimi koncentracijami, nato pa še vzorce in kontrole, in sicer skladno z načrtom, predstavljenim v tabeli III. Vzorce in kontrole, razen standarda in kontrole testa ELISA CTX-I (CTRL), smo redčili v razmerju 1+4 z raztopino Standard Diluent, vzorce supernatantov Mo3 in Mo4 iz kultur celic, diferenciranih na hidrofobni površini Lumox® in prenesenih na kostne diske, ter vzorce supernatantov Mo2 in Mo3 iz kultur celic, diferenciranih na adherentni plastični površini in prenesenih na OsteoAssay™ Human Bone Plate pa smo zaradi zelo majhnega števila celic redčili v razmerju 1+3.

**Tabela III: Vzorci in kontrole, ki jih potrebujemo za izvedbo testa CrossLaps® for Culture (CTX-I) ELISA.**

	Vzorci <sup>1</sup>	Kontrola celic <sup>2</sup>	Kontrola KD/OA <sup>3</sup>	Kontrola medija <sup>4</sup>	Kontrola testa ELISA
<b>KD – prvi test ELISA</b>	Mo1, Mo2, Mo3, Mo4, MoMIX+, MoMIX-	Mo1, Mo2, Mo3, Mo4, MoMIX	KD	KM	CTRL
<b>KD – drugi test ELISA</b>	Mo1, Mo2, Mo3, MoMIX	Mo1, Mo2, Mo3, MoMIX	KD	KM	CTRL



<b>OA – drugi test ELISA</b>	Mo1+, Mo1-, Mo2, Mo3, MoMIX	Mo1-, Mo1+, Mo2, Mo3, MoMIX	OA	KM	CTRL
----------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------	----	----	------

CTRL – kontrola testa ELISA; KD – kostni disk; KM – kontrola medija; OA – OsteoAssay™ Human Bone Plate; Mo1+/MoMIX+: celice v popolnem mediju z rastnima dejavnikoma; Mo1-/MoMIX-: celice v popolnem mediju brez rastnih dejavnikov; <sup>1</sup>supernatanti, ki jih pobere po 48-urni inkubaciji celic na vdolbinicah s KD/OA; <sup>2</sup>supernatanti celic, ki jih pobere po 48-urni inkubaciji na plastični površini; <sup>3</sup>supernatanti iz vdolbinic s KD/OA, po 48-urni inkubaciji brez celic v popolnem mediju z rastnima dejavnikoma; <sup>4</sup>popolni medij z rastnima dejavnikoma po 48-urni inkubaciji na plastični površini.

#### *Vrednotenje rezultatov*

- Za vsak vzorec smo izračunali povprečno absorbanco dveh meritev.
- Izdelali smo standardno krivuljo z nanašanjem povprečnih absorbancc osmih standardov pri pripadajočih koncentracijah.
- Z interpolacijo standardne krivulje smo določili koncentracijo (CTX-I) vzorcev kontrole CTRL, medija, celic in rezin ter vsakega izmed testnih vzorcev. (Da so rezultati testa ELISA relevantni, mora biti koncentracija kontrole CTRL znotraj območja, ki je navedeno v priloženem QC poročilu.)
- Zaradi začetnega razredčevanja medija, kontrole celic in rezin ter testnih vzorcev, smo rezultate koncentracij CTX-I pomnožili z ustreznim faktorjem.
- Za grafične predstavitve in statistično analizo rezultatov smo uporabili program GraphPad Prism®, verzija 6.05.

### **3.5 ZAJEM IN OBDELAVA SLIK**

Za zajem in obdelavo slik na invertnem mikroskopu Nikon Eclipse TE 300, opremljenim s kamero Nikon Digital Sight DS-FM, Japonska, smo uporabljali program NIS Elements F 3.2, na navadnem svetlobnem mikroskopu MOTIC BA210LED, opremljenim s kamero MOTICAM 3 (3.0 MP), pa program MOTIC Images Plus 2.0.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 DIFERENCIACIJA ČLOVEŠKIH MONOCITOV IZ PERIFERNE KRVI V OSTEOKLASTE

#### 4.1.1 Količine monocitov, izoliranih iz levkocitnih koncentratov (»buffy coat«)

Za izolacijo mononuklearnih celic (MNC) iz levkocitnih koncentratov (»buffy coat«) in osamitev monocitov z nadaljnjo negativno imunomagnetno selekcijo, ki smo jo izvedli s po  $2 \times 10^8$  mononuklearnimi celicami vsakega darovalca, smo naključno izbrali štiri zdrave osebe (krvodajalce), dva moška in dve ženski. Izplene izolacije mononuklearnih celic in monocitov smo zbrali v Tabeli IV.

**Tabela IV: Prikaz števila MNC, izoliranih iz levkocitnih koncentratov in števila monocitov, pridobljenih z negativno imunomagnetno selekcijo.**

Oznaka darovalca	Število izoliranih MNC	Število monocitov po imunomagnetni selekciji	% monocitov glede na $2 \times 10^8$ MNC, ki smo jih uporabili za magnetno selekcijo
Mo1	$2,4 \times 10^9$	$23,5 \times 10^6$	12
Mo2	$1,6 \times 10^9$	$14 \times 10^6$	7
Mo3	$1,2 \times 10^9$	$30,5 \times 10^6$	15
Mo4	$1 \times 10^9$	$28,3 \times 10^6$	14

#### 4.1.2 Postopek diferenciacije monocitov na hidrofobni površini Lumox®

Začetna količina monocitov, ki smo jih naselili v posamezno kulturo, je bila  $1,2 \times 10^6$ . Ko smo po 19 dneh diferenciacije celice prešteli, smo dobili vrednosti, prikazane v Tabeli V:

**Tabela V: Število celic v posamezni kulturi po 19-dnevem gojenju na hidrofobni površini Lumox®.**

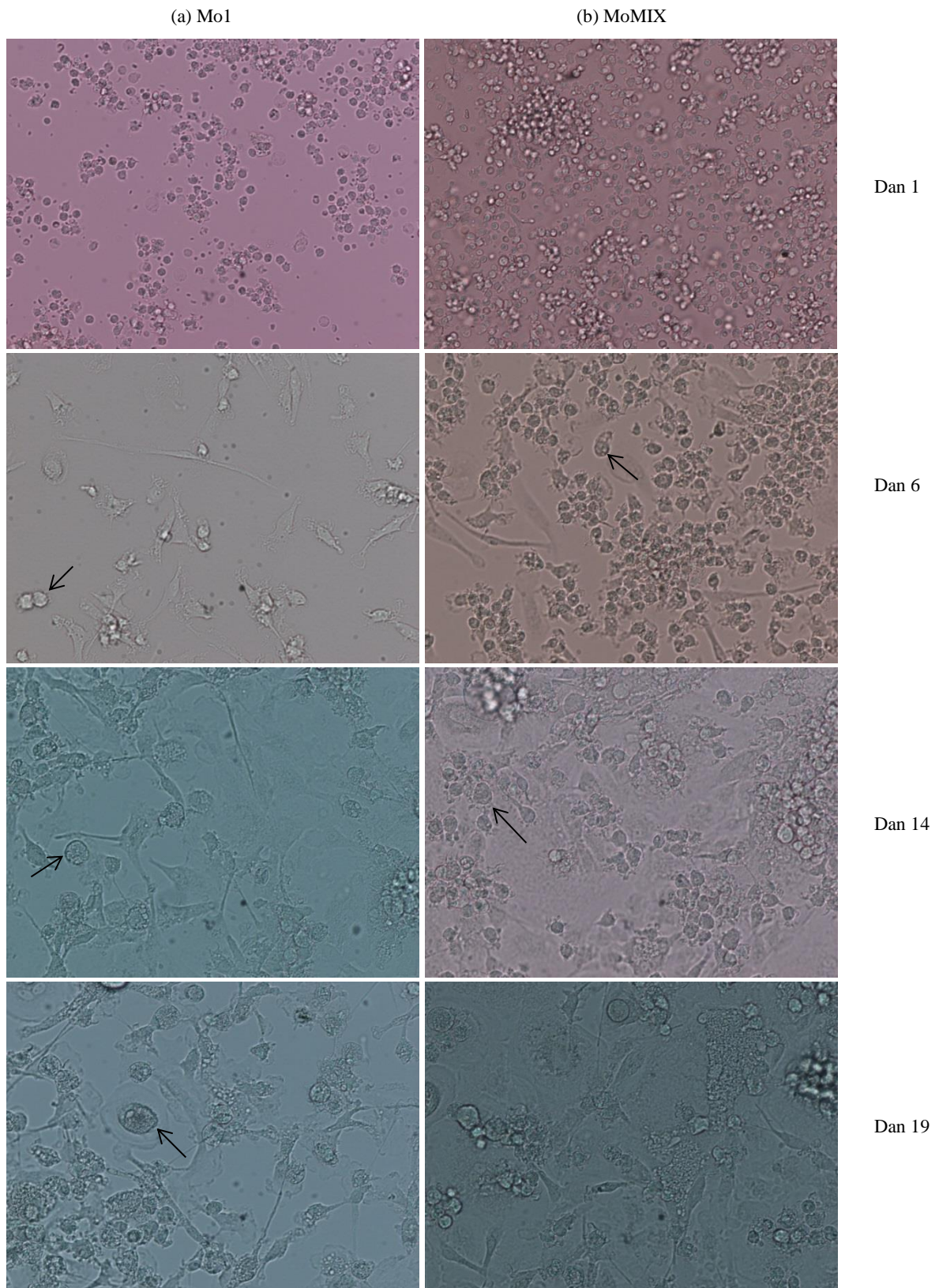
Suspenzija monocitov	Število celic
Mo1	$3,5 \times 10^5$
Mo2	$3,2 \times 10^5$
Mo3	$1,5 \times 10^5$
Mo4	$3,8 \times 10^4$
MoMIX	$2,1 \times 10^5$

Štejte po diferenciaciji se je izkazalo za zelo zahtevno, saj se celice zaradi svoje velikosti niso enakomerno oziroma popolno porazdelile v številni mreži Neubauerjeve komore. Zato smo jih lahko prešteli le približno.

Celične kulture smo med inkubacijo in diferenciacijo redno opazovali in fotografirali s pomočjo invertnega mikroskopa, opremljenega z digitalno kamero. Vidna je bila postopna diferenciacija celic (Slika 7). Po 6 dneh gojenja smo že ugotovili povečanje njihovega volumna in števila jeder, ta proces pa se je nadaljeval vse do konca inkubacijske dobe, to je 19 dni. Opazili smo tudi pojav številnih izrastkov in vakuol. Zadnji dan diferenciacije so bile celice žive, velike, vsebovale pa so več jeder in vakuol ter obilno citoplazmo.

Mešanica celic z oznako MoMIX se je med celotno inkubacijsko dobo diferencirala enako kot celice v posameznih kulturah (Slika 7).

V splošnem velja, da se v osteoklaste ne pretvorijo vsi monociti. Poleg tega pa so pri tem seveda prisotne tudi interindividualne razlike.



**Slika 7: Primerjava mikrofotografij celičnih kultur Mo1 in MoMIX med 19-dnevno inkubacijo na hidrofobni površini Lumox®; invertni mikroskop, 200x povečava. Puščice kažejo prisotnost posameznih večjedrnih celic.**

### 4.1.3 Postopek diferenciacije monocitov na adherentni plastični površini

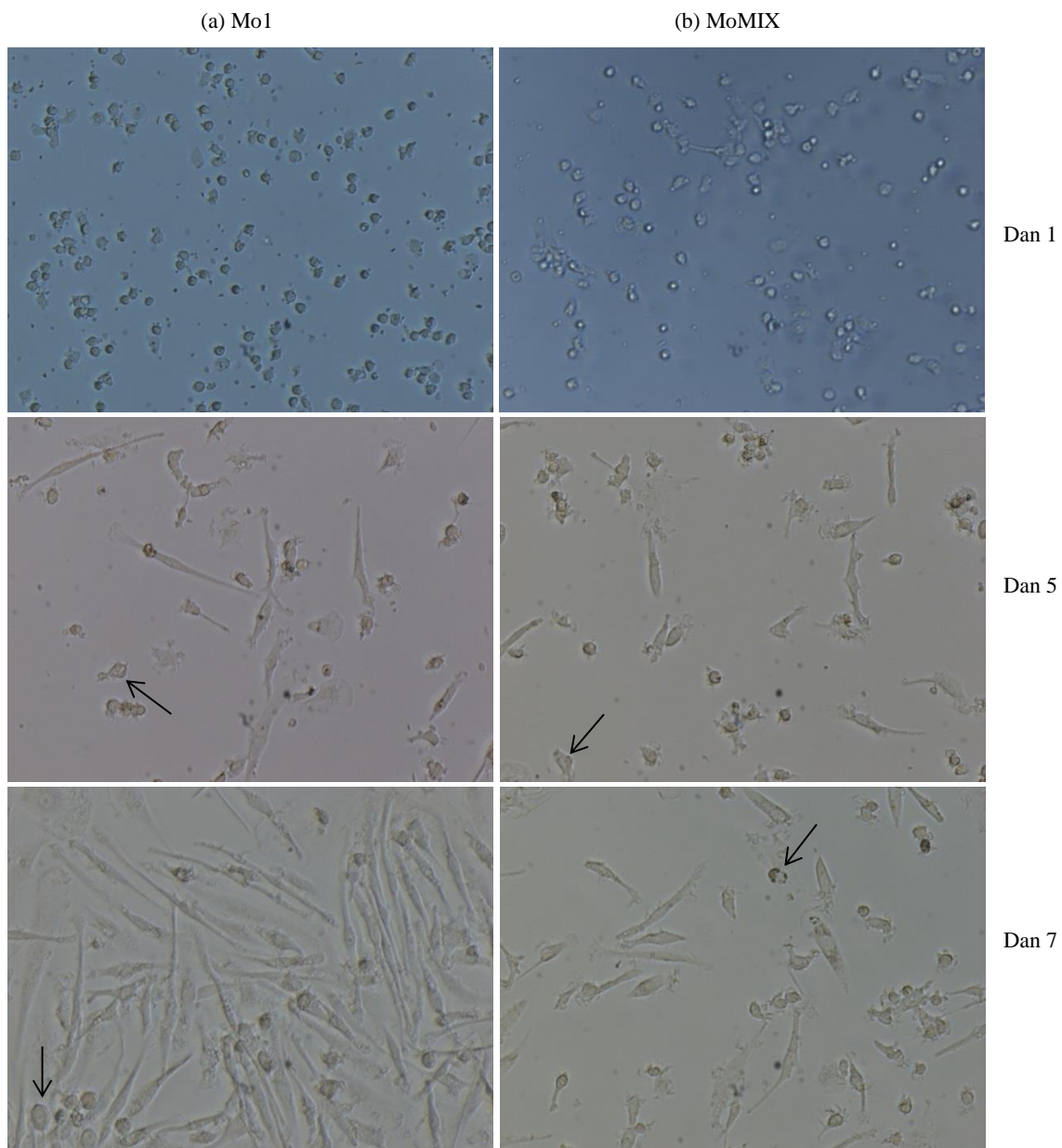
Začetna količina monocitov, ki smo jih po odmrznitvi naselili v posamezno vdolbino gojitvenih plošč, je bila  $5 \times 10^5$ . Celice smo gojili na adherentni podlagi 7 dni, jih tripsinizirali in prešteli ter dobili naslednje vrednosti, prikazane v Tabeli VI:

**Tabela VI: Število celic v posamezni kulturi po 7-dnevnem gojenju na adherentni plastični površini.**

Suspenzija monocitov	Štetje celic
Mo1	$1,8 \times 10^5$
Mo2	$8,3 \times 10^4$
Mo3	$5,3 \times 10^4$
MoMIX	$6,8 \times 10^4$

Tudi pod temi pogoji smo opazovali postopno preoblikovanje monocitov s povečevanjem njihovega volumna ter pojavom številnih celičnih organelov in izrastkov, tako v kulturah posameznih celic kot tudi v kulturi njihove mešanice MoMIX (Slika 8). Predvidevamo, da se po 7 dneh inkubacije celice niso dokončno diferencirale v tako velikem številu kot med gojenjem v neadherentnih kulturah, ampak le do določene stopnje preosteoklastov. To predpostavko potrjujejo tudi primerjave s celičnimi morfologijami v neadherentnih kulturah, gojenih 19 dni (Slika 7).

Tako kot v prejšnjem primeru smo imeli tudi v tem enake težave s štetjem celic, zato so vrednosti, ki smo jih dobili, le okvirne.



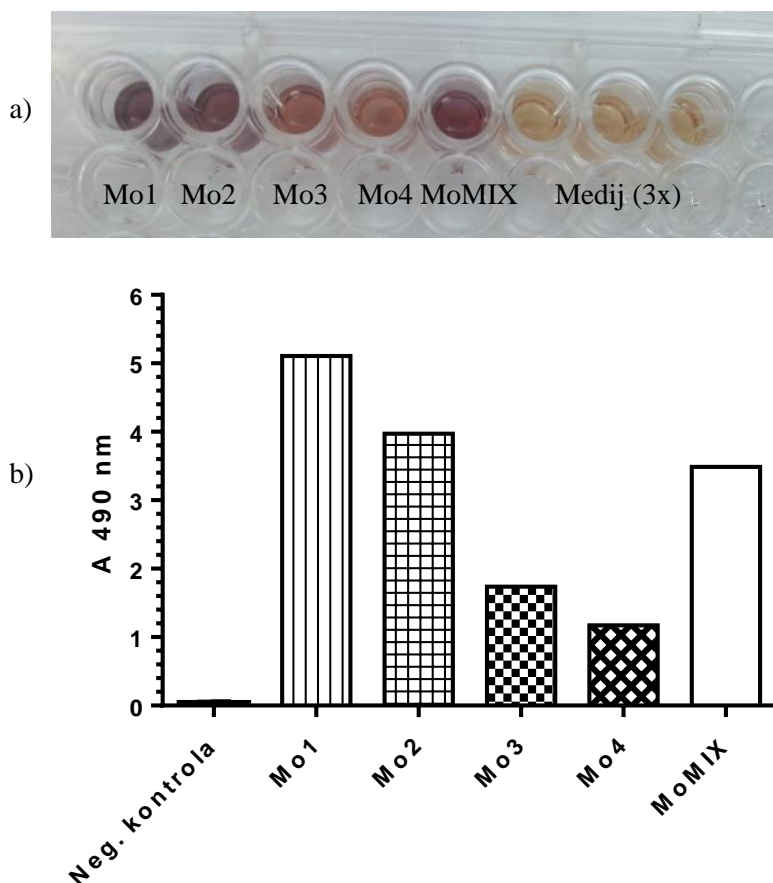
**Slika 8: Primerjava mikrofotografij celičnih kultur Mo1 in MoMIX med 7-dnevno inkubacijo na adherentni plastični površini; invertni mikroskop, 200x povečava. Puščice kažejo prisotnost posameznih večjedrnih celic.**

## 4.2 OVREDNOTENJE FUNKCIJSKE AKTIVNOSTI OSTEOKLASTOV

### 4.2.1 Dokaz živosti

Po inkubaciji z raztopino CellTiter 96® AQueous One Solution so se obarvale vse kulture s celicami, s čimer smo potrdili njihovo živost. Kot smo že omenili, je obarvanje proporcionalno številu živih celic. Manj intenzivno barvo opazimo v kulturah Mo3 in Mo4, ki sta v primerjavi z ostalimi očitno vsebovali manj metabolno aktivnih celic (Slika 9a). Kot negativno kontrolo smo uporabili popolni medij z dodanima rastnima dejavnikoma M-CSF in sRANKL.

Intenzivno obarvanje in proporcionalni obseg živih celic v posameznih kulturah smo ovrednotili s spektrofotometrijo pri valovni dolžini 490 nm (Slika 9b).

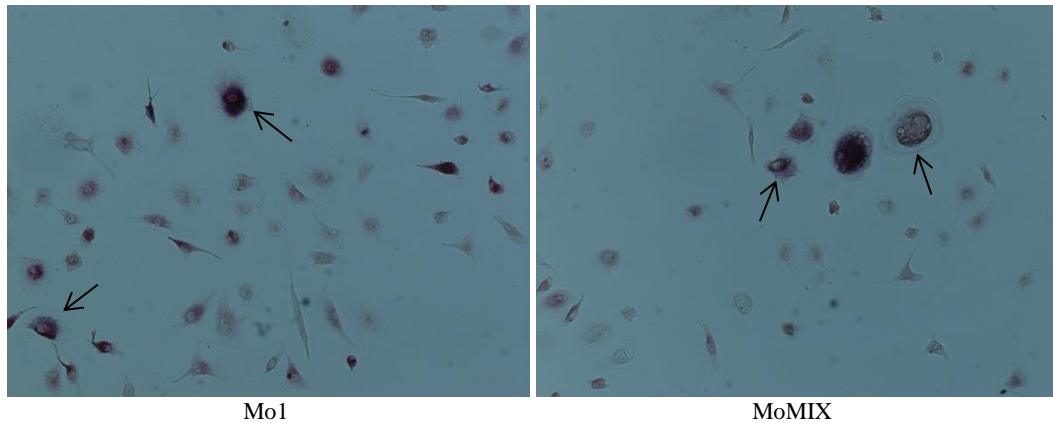


Slika 9: a) Živost celičnih kultur, diferenciranih na hidrofobni podvršini Lumox®.  
b) Spektrofotometrična določitev intenzitete obarvanja posameznih celičnih kultur po dodanem reagentu CellTiter 96® AQueous One Solution in 4-urni inkubaciji pri standardnih pogojih.

## 4.2.2 Barvanje TRAP

### 4.2.2.1 Barvanje celic, diferenciranih na hidrofojni površini Lumox®

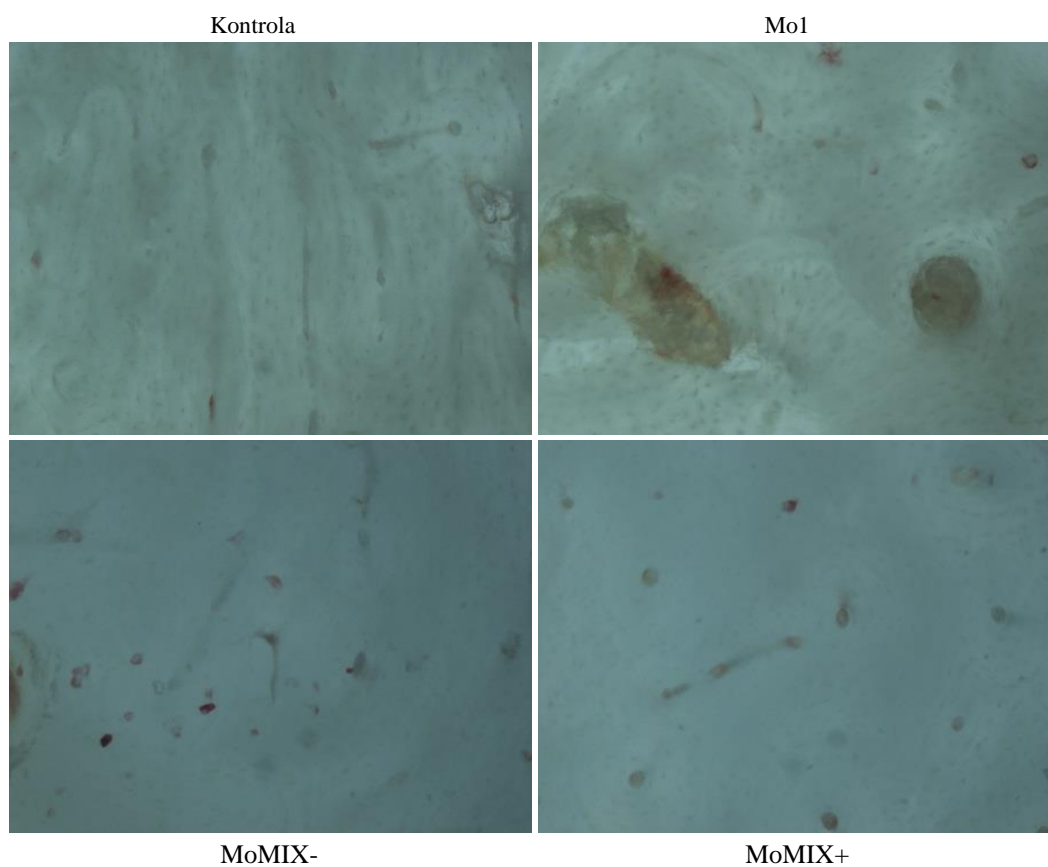
Diferencirane celice smo 48 ur inkubirali na adherentni površini, da so se pritrdile na podlago, nato pa izvedli histokemično barvanje TRAP, pri čemer je bila večina celic TRAP pozitivnih.



**Slika 10: Barvanje TRAP celic, adheriranih na plastično površino; invertni mikroskop, 100x povečava. S puščico je označena večjedrna oblika celic, značilna za osteoklaste.**

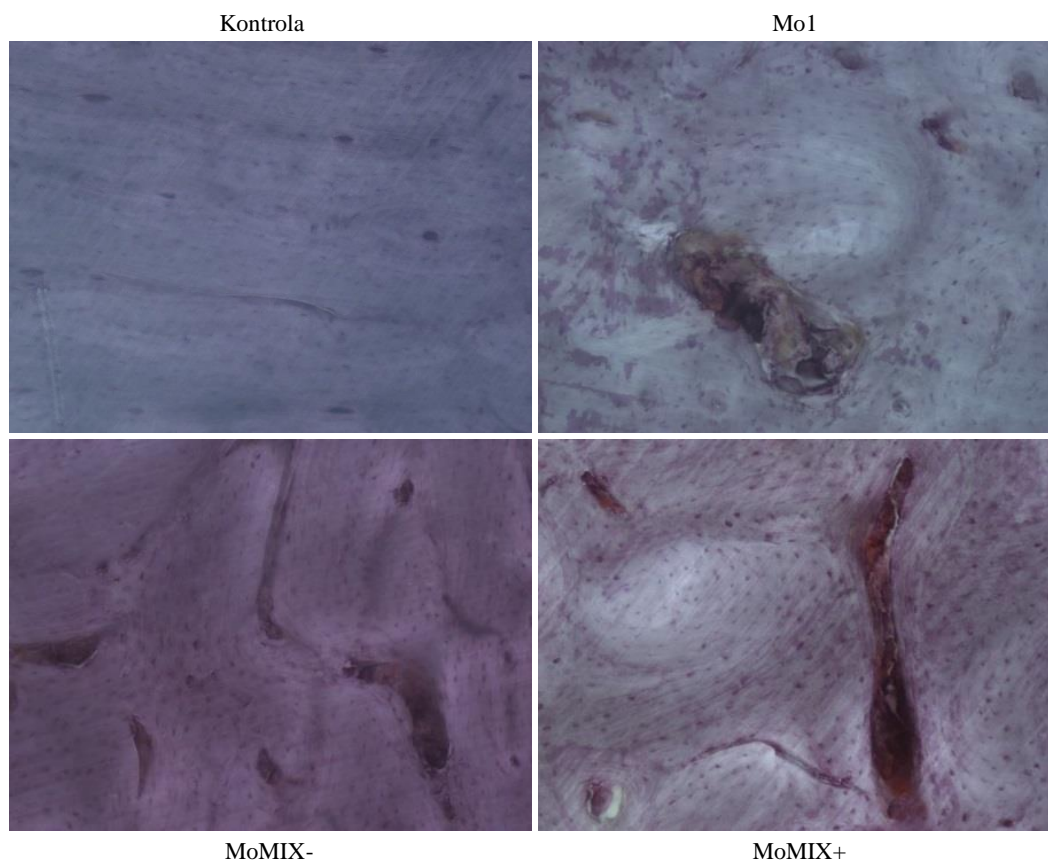


Barvanje diferenciranih celic na TRAP smo izvedli tudi na kostnih diskih, na katerih smo jih predhodno inkubirali 48 ur. Rdeče obarvana področja kažejo na prisotnost celic, ki izražajo encim TRAP.



**Slika 11: Barvanje TRAP celic na kostnih diskih po 48 urni inkubaciji celic; invertni mikroskop, 100x povečava. Področja, obarvana rdeče so tista, v katerih je prisotna na tartrat odporna kislja fosfataza (TRAP).**

Po barvanju TRAP smo odstranili celice in iste diske obarvali še z Mayerjevim hematoksilinom, s katerim smo še dodatno vizualizirali resorbirane površine kosti.



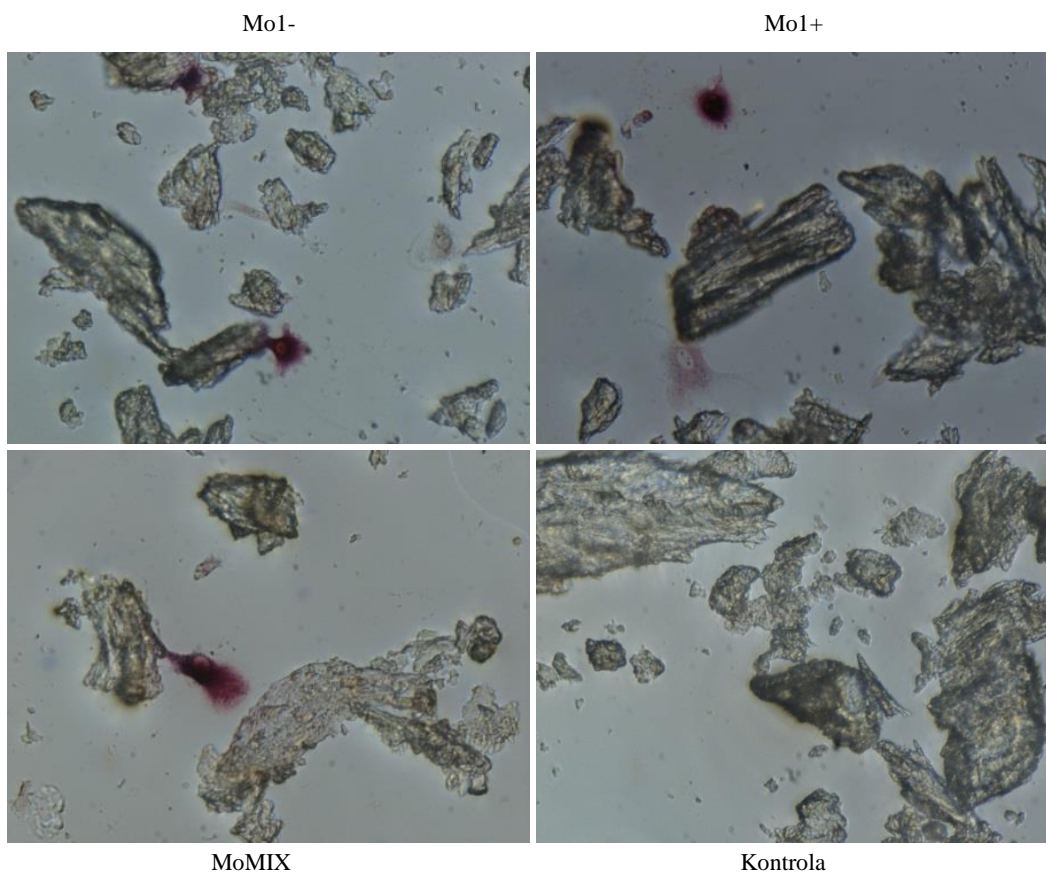
**Slika 12: Dodatno barvanje kostnih diskov z Mayerjevim hematoksilinom po barvanju TRAP; invertni mikroskop, 100x povečava. Puščice nakazujejo najbolj intenzivne sledi kostne resorpcije.**

#### **4.2.2.2 Barvanje celic, diferenciranih na adherentni plastični površini**

Barvanje encima TRAP smo izvedli po 48-urni inkubaciji celic na govejih kostnih diskih oziroma na matriksu OsteoAssay™, ki smo jih predhodno diferencirali v osteoklaste 7 dni. Rdeče obarvane sledi kažejo na prisotnost encima TRAP.



**Slika 13: Barvanje TRAP celic na kostnih diskih po 48-urni inkubaciji; navadni svetlobni mikroskop, 100x povečava. Rdečkasto obarvana področja prikazujejo prisotnost na tartrat odporne kisle fosfataze (TRAP).**



**Slika 14: Barvanje TRAP celic na kostnem matriksu OsteoAssay™ po 48-urni inkubaciji; invertni mikroskop, 200x povečava. Rdeče obarvane celice so osteoklasti, pozitivni na tartrat odporno kisló fosfatazo (TRAP).**

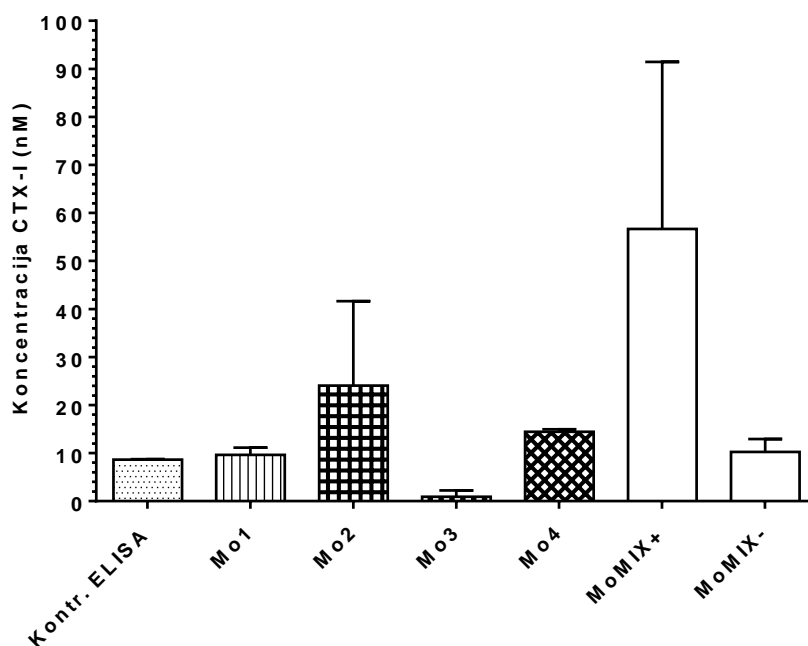
#### **4.2.1 Določanje količine razpadnih produktov kolagena tipa I s testom ELISA CTX-I**

Umeritveni krivulji absorbanc standardnih vzorcev pri pripadajočih koncentracijah fragmentov kolagena tipa I ter vmesni in končni izračuni koncentracij razpadnih fragmentov kolagena tipa I (CTX-I) za vse testne vzorce in kontrole so prikazani v obliki grafov in tabel v prilogah.

Koncentracija fragmentov CTX-I v kontrolah CTRL je bila v prvi izvedbi testa ELISA (celice, diferencirane v neadherentni kulturi) le malo zunaj, v drugi pa znotraj meje, predpisane s strani proizvajalca (9,33-14,00 nM). Zaradi visoke cene smo imeli na voljo le en sestav ELISA, zato nismo mogli izvesti ponovitev. Poleg tega smo test ELISA izvajali prvič, brez predhodnih izkušenj. Vsa spiranja smo izvajali ročno. Ne glede na to pa menimo, da so naši rezultati dovolj zanesljivi.

Ena od težav pri kvantitativnem vrednotenju resorpcije kostnine na govejem kostnem disku in matriksu OsteoAssay™ je bila, da se diferencirane celice zaradi velikosti pri štetju niso ustrezno razporedile v števno mrežo, kar smo že omenili, zato smo morali postopek štetja prirediti, pri čemer smo njihovo število lahko ocenili le približno.

Resorptivno so na kostnem disku in matriksu OsteoAssay™ v določenem obsegu delovale vse testirane celice, pri čemer na proces vpliva ne le število, ampak tudi intrinzična resorptivna aktivnost osteoklastov (20). V vseh poskusih so z visokimi vrednostmi CTX-I izstopale kulture pomešanih monocitov MoMIX (Sliki 15 in 16). Na podlagi teh rezultatov bi lahko sklepali, da se pomešani alogenski monociti med fazo diferenciacije v osteoklaste *in vitro* še dodatno spodbujajo, zato se jih morda več pretvori v omenjene kostne celice kot v individualnih kulturah. Zanimivo bi bilo tudi primerjati omenjene mešane kulture in pa mešanice, ki bi jih pripravili s kombiniranjem enakega števila celic iz diferenciranih celičnih kultur monocitov posameznih oseb. Tako bi lahko ocenili vplive morebitne medsebojne stimulacije mešanice monocitov med procesom njihove osteoklastne diferenciacije.

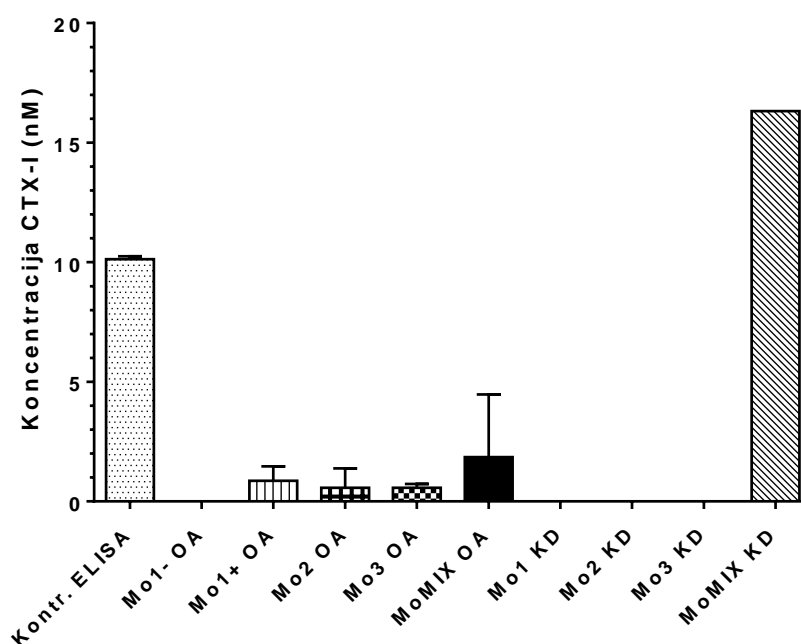


**Slika 15: Resorptivna aktivnost celic, predhodno diferenciranih na hidrofobni površini Lumox®, po 48-urni inkubaciji na govejem kostnem disku. Prikazane so koncentracije razgradnih produktov kolagena tipa I (CTX-I) n nM.**

Na aktivnost osteoklastov prav tako bistveno vpliva tudi prisotnost rastnih dejavnikov, M-CSF in RANKL. V prvem poskusu smo funkcijsko ovrednotili mešanico MoMIX (Slika

15), v drugem pa kulturo Mo1 (Slika 16), in sicer po inkubaciji celic na kostnih diskih in matriksu OsteoAssay™, v prisotnosti in odsotnosti obeh rastnih dejavnikov. Ko v mediju ni bilo rastnih dejavnikov, je bila količina razpadnih produktov CTX-I bistveno manjša. To potrjuje že znano dejstvo, da predvsem RANKL pomembno spodbuja ne le diferenciacijo in proliferacijo celic, ampak tudi resorptivno aktivnost zrelih osteoklastov (12).

Na goveje kostne diske in matriks človeške kosti OsteoAssay™ smo pri funkcijskem vrednotenju monocitov, diferenciranih na adherentni plastični podlagi, za 48 ur naselili bistveno manjše število celic ( $2 \times 10^4$ ) kot v prvem poskusu, kjer smo na kostne diske naselili celice, diferencirane na rastni površini Lumox® ( $3 \times 10^4$ ). Vzorce in kontrole za test ELISA smo preveč razredčili, zato so bile izračunane koncentracije fragmentov CTX-I zelo nizke, bodisi na spodnji meji detekcije ali pod njo, še posebej pri uporabi kostnih diskov, kjer smo uporabili zadnje ostanke posameznih celičnih suspenzij (Slika 16).

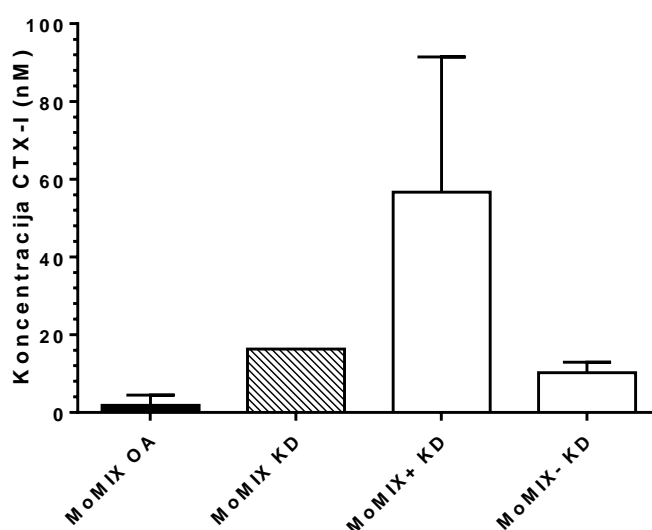


**Slika 16: Resorptivna aktivnost celic, predhodno diferenciranih na plastični adherentni površini, po njihovi 48-urni inkubaciji na govejem kostnem disku (KD) in kostnem matriksu OsteoAssay™ (OA). Prikazane so koncentracije razgradnih produktov kolagena tipa I (CTX-I) v nM.**

Diferencirana mešanica monocitov MoMIX je na govejem kostnem disku delovala močnejše kot na matriksu OsteoAssay™, zato menimo, da je bil pri nizkih koncentracijah mešanice osteoklastov goveji kostni disk primernejši za preskušanje njihove resorptivne funkcije. Za vrednotenje delovanja individualnih celičnih kultur pa bi v tem primeru potrebovali večje koncentracije celic oziroma manjše redčenje supernatantov, v katerih

smo merili količino CTX-I, kot pa smo jih uporabili v našem poskusu. Zanimivo je, da so celice iz kulture MoMIX pokazale zelo učinkovito resorpcijsko funkcijo na kostnih diskih ob sicer nezaznavni tvorbi CTX-I pri uporabi celic iz individualnih kultur monocitov. Kaže torej, da diferenciacija celic v mešanici alogenskih celic dodatno vzpodbudi njihovo pretvorbo v osteoklaste. Da pa bi to predpostavko preverili, bi morali funkcijsko preizkusiti tudi mešanice celic, pripravljene iz diferenciranih kultur posameznih oseb.

Na sliki 17 prikazujemo resorpcijsko sposobnost monocitov, diferenciranih na oba načina (adhrentno in neadherentno), ki smo jih 48 ur gojili v prisotnosti ali odsotnosti M-CSF in sRANKL na govejih kostnih diskih in matriksu človeške kosti OsteoAssay™.



**Slika 17: Primerjava resorptivne aktivnosti mešanice MoMIX na kostnem disku (KD) in OsteoAssay™ (OA), določenih v dveh ločenih testih ELISA.**

Legenda:

MoMIX OA, MoMIX KD: mešanica MoMIX po 48-urni inkubaciji na kostnem disku (KD) in OsteoAssay™ (OA), predhodno diferencirana na plastični adherentni površini;

MoMIX+/- KD: mešanica MoMIX z/brez rastnih dejavnikov po 48-urni inkubaciji na kostnem disku (KD), predhodno diferencirana na hidrofobni površini Lumox®.

## 5 SKLEP

Menimo, da je bil namen naše naloge dosežen. Iz monocitov, izoliranih iz periferne krvi, nam je uspelo vzgojiti človeške osteoklaste, pri čemer smo uporabili dva ključna rekombinantna rastna in diferenciacijska dejavnika, M-CSF in sRANKL. Celice smo gojili *in vitro* v adherentnih in neadherentnih pogojih, pri čemer so se slednji (petrijevke Lumox®) izkazali kot primernejši. Celice so bile v teh pogojih v suspenziji, zato je bilo rokovanje z njimi bolj enostavno, najpomembnejše pa je bilo to, da jih ni bilo treba tripsinizirati. Pri gojenju na adherentni plastični površini so se celice pritrdirile na podlago, zato smo jih morali pred nadaljnjo uporabo obdelati s tripsinom, kar povzroči določeno izgubo celic, saj jih moramo po tem postopku tudi večkrat spirati s centrifugiranjem.

Tudi funkcijski testi, kot sta dokaz živosti ter barvanje TRAP, so dali pozitivne rezultate s celicami, gojenimi na oba načina. Barvanje celic na TRAP potrjuje prisotnost diferenciranih osteoklastov, ki vsebujejo encim na tartrat odporno kisló fosfatazo.

V okviru naše naloge smo prvi pokazali, da mešanica monocitov različnih oseb, ki torej odraža skupne interindividualne razlike posameznikov, predstavlja zelo primeren način za pridobivanje večjih količin osteoklastov *in vitro*, namenjenih izdelavi modela za preizkušanje njihove aktivnosti v prisotnosti različnih snovi. Na ta način lahko izvedemo celo vrsto različnih eksperimentov ob uporabi vedno enake mešanice celic, kar je velika vrednost s stališča primerljivosti in zanesljivosti rezultatov. Diferenciacija pomešanih monocitov je potekala normalno in primerljivo s tisto v kulturah celic posameznih oseb, in sicer tako na nivoju morfologije kot tudi resorptivne funkcije. Posebej zanimivo in učinkovito je mešanica diferenciranih celic delovala na govejem kostnem disku in človeškem kostnem matriksu OsteoAssay™ Human Bone Plate. Supernatanti teh kultur so v testu CrossLaps for Culture ELISA CTX-I, s katerim smo merili koncentracije razpadnih produktov kolagena tipa I (CTX-I), v primerjavi s tistimi, odvzetimi iz kultur posameznih vrst celic, vsebovali največje količine CTX-I. Predvidevamo, da se pomešani alogenski monociti pri procesu diferenciacije medsebojno spodbujajo in zato v večji meri pretvorijo v osteoklaste.

Med delom smo naleteli tudi na nekaj težav. Pri štetju celic po diferenciaciji se te zaradi svoje velikosti niso porazdelile v števno mrežo, zato smo morali štetje prirediti, pri tem pa smo zagotovo naredili precejšnje napake pri ocenjenem številu celic. Posledično smo tudi

preveč redčili supernatante, v katerih smo določali koncentracijo CTX-I, predvsem v drugem poskusu, v katerem smo kot substrat za resorpcijo uporabili tako goveji kostni disk kot matriks človeške kosti OsteoAssay™.

Za nadaljnje poskuse vsekakor priporočamo gojenje prečiščenih monocitov na neadherentni podlagi Lumox®, pri čemer bi čas gojenja lahko skrajšali na 14 dni.

Uspelo nam je postaviti le osnovni model, za dodatno optimizacijo postopkov in metod pa bo potrebnih še več poskusov.



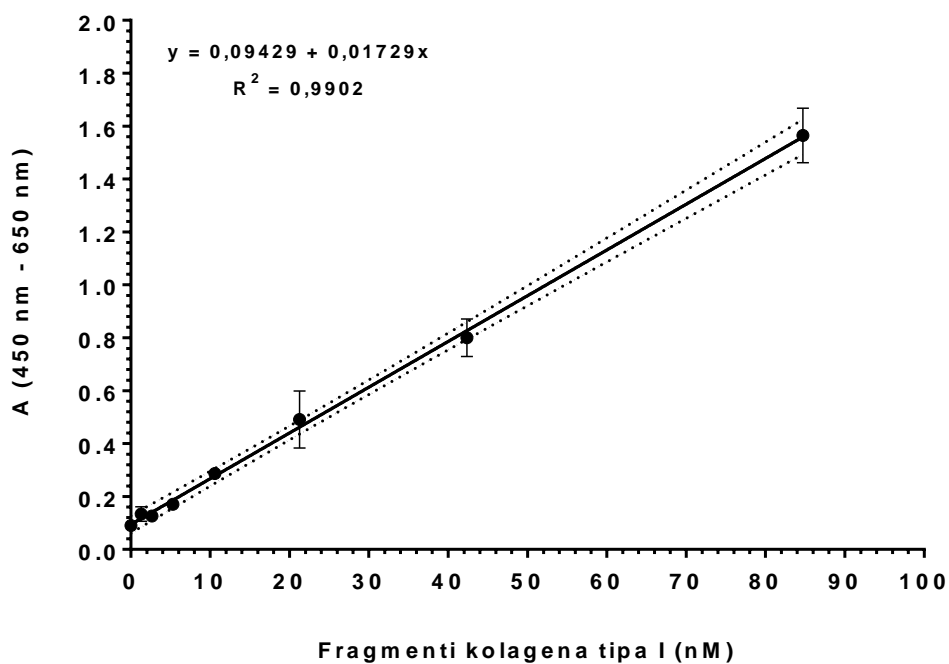
## 6 VIRI IN LITERATURA

1. Pocajt M, Širca A: *Anatomija in fiziologija za medicinske šole*, popravljena in dopolnjena izdaja, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1990.
2. R.M.Francis: *Osteoporosis pathogenesis & management*, Kluwer Academic Publishers, Lancaster, 1990.
3. Mencej Bedrač S, Ostanek B, Mlakar V, Zupan J, Kocjan T, Preželj J, Marc J: "Sodobni pogled na nastanek osteoporoze". *Farm vest* 2012; 63:269-78.
4. Kanis J: *Osteoporosis*, Blackwell Healthcare Communications, London, 1997.
5. Raggatt LJ, Partridge NC: "Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling". *J Biol Chem* 2010; 285(33):25103-8.
6. Hadjidakis DJ, Androulakis II: "Bone remodeling". *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1092:385-96.
7. Kudo O, Sabokbar A, Pocock A, Itonaga I, Athanasou NA: "Isolation of human osteoclasts formed in vitro: hormonal effects on the bone-resorbing activity of human osteoclasts". *Calcif Tissue Int* 2002; 71(6):539-46.
8. Väänänen HK, Laitala-Leinonen T: "Osteoclast lineage and function". *Arch Biochem Biophys* 2008; 473(2):132-8.
9. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL: "Osteoclast differentiation and activation". *Nature* 2003; 423(6937):337-42.
10. Susa M, Luong-Nguyen NH, Cappellen D, Zamurovic N, Gamse R: "Human primary osteoclasts: in vitro generation and applications as pharmacological and clinical assay". *J Transl Med* 2004; 2(1):6.
11. Stanley ER, Berg KL, Einstein DB, Lee PS, Pixley FJ, Wang Y, et al.: "Biology and action of colony-stimulating factor-1". *Mol Reprod Dev* 1997; 46(1):4-10.
12. Khosla S.: "Minireview: the OPG/RANKL/RANK system". *Endocrinology* 2001; 142(12):5050-5.
13. Bilezikian J, Raisz L, Rodan G: *Principles of bone biology*, 2. izdaja, Academic Press, San Diego, 2002: 109-14
14. Marino S, Logan JG, Mellis D, Capulli M: "Generation and culture of osteoclasts". *Bonekey Rep* 2014; 3:570.
15. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ: "Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families". *Endocr Rev* 1999; 20(3):345-57.
16. Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM: "The cell biology of osteoclast function". *J Cell Sci* 2000; 113.
17. Nakayama T, Mizoguchi T, Uehara S, Yamashita T, Kawahara I, Kobayashi Y, et al.: "Polarized osteoclasts put marks of tartrate-resistant acid phosphatase on dentin slices--a simple method for identifying polarized osteoclasts". *Bone* 2011; 49(6):1331-9.

18. Rejc B, Osredkar J, Geršak K: "Oksidacijski stres in nosečnost". *Farm vest* 2012; 63:153-61.
19. <http://www.precisionnutrition.com/all-about-bone-health> (21. 2. 2016)
20. Hemingway F, Cheng X, Knowles HJ, Estrada FM, Gordon S, Athanasou NA: "In vitro generation of mature human osteoclasts". *Calcif Tissue Int* 2011; 89(5):389-95.
21. Nicholson GC, Malakellis M, Collier FM, Cameron PU, Holloway WR, Gough TJ, et al.: "Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)". *Clin Sci (Lond)* 2000; 99(2):133-40.
22. Takahashi N, Udagawa N, Kobayashi Y, Suda T: "Generation of osteoclasts in vitro, and assay of osteoclast activity". *Methods Mol Med* 2007; 135:285-301.
23. Kohli SS, Kohli VS: "Role of RANKL-RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications". *Indian J Endocrinol Metab* 2011; 15(3):175-81.

## 7 PRILOGE

### 7.1 TEST ELISA S CELICAMI, DIFERENCIRANIMI NA HIDROFOBNI POVRŠINI LUMOX®



Slika 18: Umeritvena krivulja povprečnih absorbanc osmih standardov s pripadajočimi koncentracijami razgradnih produktov kolagena tipa I (CTX-I) z enačbo premice in koeficientom determinacije  $R^2$ . Prikazani so tudi 95 % intervali zaupanja (črtkane črte).

**Tabela VII: Absorbance ter interpolirane vrednosti fragmentov kolagena tipa I (CTX-I) za kontrole in vzorce.**

	A (450 nm - 650 nm) 1. meritev	A (450 nm - 650 nm) 2. meritev	CTX-I (nM) 1. meritev	CTX-I (nM) 2. meritev	CTX-I x 5 (nM) 1. meritev	CTX-I x 5 (nM) 2. meritev	CTX-I x 4 (nM) 1. meritev	CTX-I x 4 (nM) 2. meritev	Povprečne vrednosti kontrol (5x)	Povprečne vrednosti kontrol (4x)
<b>Kontrola CTRL</b>	0,245	0,242	8,715	8,542						
<b>Kontrola medija</b>	0,112	0,063	1,024	0,000	5,120	0,000	4,096	0,000	5,120	4,096
<b>Kontrola Mo1</b>	0,068	0,105	0,000	0,619	0,000	3,095			3,095	
<b>Kontrola Mo2</b>	0,135	0,005	2,354	0,000	11,770	0,000			11,770	
<b>Kontrola Mo3</b>	0,068	0,097	0,000	0,156			0,000	0,624		0,624
<b>Kontrola Mo4</b>	0,101	0,103	0,388	0,503			1,552	2,012		1,782
<b>Kontrola MoMIX</b>	0,115	0,121	1,197	1,544	5,985	7,720			6,853	
<b>Kontrola KD</b>	0,108	0,115	0,793	1,197	3,965	5,985	3,172	4,788	4,975	3,980
<b>Vzorec Mo1</b>	0,149	0,140	3,164	2,643	15,820	13,170				
<b>Vzorec Mo2</b>	0,175	0,261	4,667	9,641	23,335	48,205				
<b>Vzorec Mo3</b>	0,093	0,120	0,000	1,487			0,000	5,948		
<b>Vzorec Mo4</b>	0,176	0,173	4,725	4,552			18,900	18,208		
<b>Vzorec MoMIX+</b>	0,229	0,399	7,790	17,621	38,950	88,130				
<b>Vzorec MoMIX-</b>	0,160	0,147	3,800	3,048	19,000	15,240				

Vzorci Mo1, Mo2, MoMIX- in MoMIX+ so bili redčeni 5x, vzorca Mo3 in Mo4 pa 4x, zato so vrednosti CTX-I pomnožene z ustreznim faktorjem (4 ali 5).

**Tabela VIII: Izračun vrednosti kontrol.**

	Kontrola - kontrola medij 5x (nM)	Kontrola - kontrola medij 4x (nM)	Vsota kontrol 5x (nM)	Vsota kontrol 4x (nM)
Kontrola medij	5,12	4,096		
Kontrola Mo1	0,000		5,120	
Kontrola Mo2	6,650		11,7	
Kontrola Mo3		0,000		4,096
Kontrola Mo4		0,000		4,096
Kontrola MoMIX	1,733		6,853	
Kontrola KD	0,000	0,000		

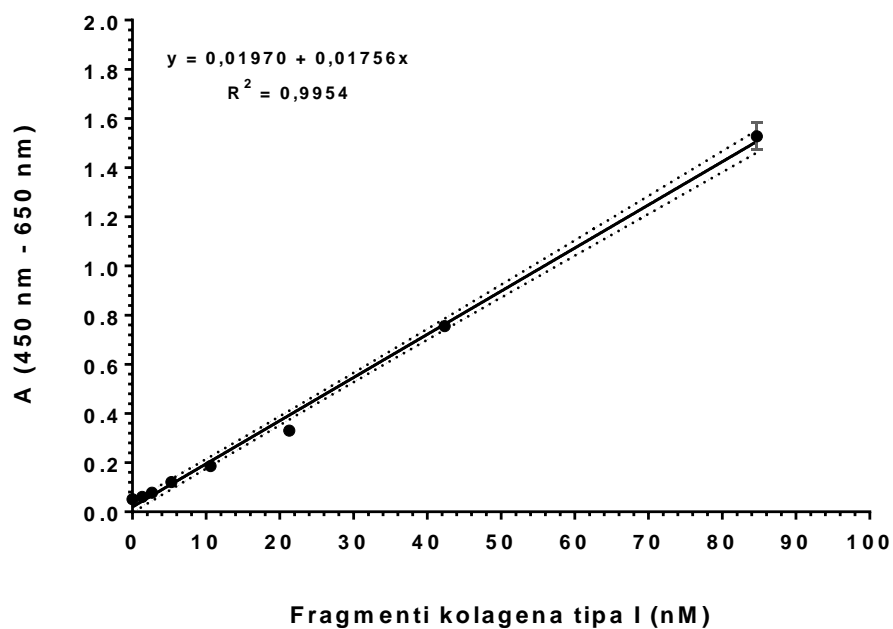
**Kontrola - kontrola medija:** Od vsake povprečne vrednosti kontrole odštejemo ustrezno povprečno vrednost medija; **Vsota kontrol:** povprečna vrednost kontrole medija + povprečna vrednost kontrole celic (zmanjšana za povprečno vrednost kontrole medija) + povprečna vrednost kontrole KD (zmanjšana za povprečno vrednost kontrole medija).

**Tabela IX: Izračun končnih koncentracij fragmentov kolagena tipa I (CTX-I) v posameznih vzorcih.**

	CTX-I (nM) 1. meritev	CTX-I (nM) 2. meritev	Koncentracija - vsota kontrol (nM) 1. meritev	Koncentracija - vsota kontrol (nM) 2. meritev	Povprečna vrednost CTX-I 1. in 2. meritve (nM)
Vzorec Mo1	15,820	13,170	10,700	8,580	9,640
Vzorec Mo2	23,335	48,205	11,635	36,505	18,933
Vzorec Mo3	0,000	5,948	0,000	1,852	0,926
Vzorec Mo4	18,900	18,208	14,804	14,112	14,458
Vzorec MoMIX+	38,950	88,130	32,097	81,277	56,687
Vzorec MoMIX-	19,000	15,240	12,147	8,387	10,267

**Koncentracija - vsota kontrol:** Od vsake vrednosti koncentracije CTX-I vzorcev odštejemo ustrezno vrednost kontrol.

## 7.2 TEST ELISA S CELICAMI, DIFERENCIRANIMI NA ADHERENTNI PLASTIČNI POVRŠINI



Slika 19: Umeritvena krivulja povprečnih absorbanca osmih standardov s pripadajočimi koncentracijami razgradnih produktov kolagena tipa I (CTX-I) z enačbo premice in koeficientom determinacije  $R^2$ . Prikazani so tudi 95 % intervali zaupanja (črtkane črte).

**Tabela X: Absorbance ter interpolirane vrednosti fragmentov kolagena tipa I (CTX-I) za kontrole in vzorce.**

	A (450 nm - 650 nm) 1. meritev	A (450 nm - 650 nm) 2. meritev	CTX-I (nM) 1. Meritev	CTX-I (nM) 2. Meritev	CTX-I x 5 (nM) 1. meritev	CTX-I x 5 (nM) 2. meritev	CTX-I x 4 (nM) 1. meritev	CTX-I x 4 (nM) 2. meritev	Povprečne vrednosti kontrol (5x)	Povprečne vrednosti kontrol (4x)
<b>Kontrola CTRL</b>	0,196	0,199	10,043	10,214						
<b>Kontrola medija</b>	0,037	0,040	0,986	1,157	4,930	5,785	3,944	4,628	5,358	4,286
<b>Kontrola Mo1-</b>	0,039	0,038	1,100	1,043	5,500	5,215			5,358	
<b>Kontrola Mo1+</b>	0,052	0,050	1,840	1,726	9,200	8,630			8,915	
<b>Kontrola Mo2</b>	0,037	0,036	0,986	0,929			3,944	3,716		3,830
<b>Kontrola Mo3</b>	0,037	0,035	0,986	0,872			3,944	3,488		3,716
<b>Kontrola MoMIX</b>	0,032	0,033	0,701	0,758	3,505	3,790			3,648	
<b>Kontrola OA</b>	0,075	0,075	3,150	3,150	15,750	15,750	12,600	12,600	15,750	12,600
<b>Kontrola KD</b>	0,073	0,068	3,036	2,752	15,180	13,760	12,144	11,008	14,470	11,576
<b>Vzorec Mo1- OA</b>	0,072	0,069	2,979	2,808	14,895	14,040				
<b>Vzorec Mo1+ OA</b>	0,089	0,092	3,948	4,119	19,740	20,595				
<b>Vzorec Mo2 OA</b>	0,075	0,080	3,150	3,435			12,600	13,740		
<b>Vzorec Mo3 OA</b>	0,078	0,077	3,321	3,264			13,284	13,056		
<b>Vzorec MoMIX OA</b>	0,088	0,073	3,891	3,036	19,455	15,180				
<b>Vzorec Mo1 KD</b>	0,060		2,296		11,480					
<b>Vzorec Mo2 KD</b>	0,075		3,150		15,750					
<b>Vzorec Mo3 KD</b>	0,059		2,239		11,195					
<b>Vzorec MoMIX KD</b>	0,109		5,087		25,435					

Legenda k tabeli X: Vzorci Mo1- OA, Mo1+ OA, MoMIX OA, Mo1 KD, Mo2 KD, Mo3 KD in MoMIX KD so bili rečeni 5x, vzorca Mo2 OA in Mo3 OA pa 4x, zato so vrednosti CTX-I pomnožene z ustreznim faktorjem (4 ali 5).

**Tabela XI: Izračun vrednosti kontrol.**

	Kontrola - kontrola medija 5x (nM)	Kontrola - kontrola medija 4x (nM)	Vsota kontrol 5x (nM)	Vsota kontrol 4x (nM)
<b>Kontrola Mo1-</b>	0,000		15,750	
<b>Kontrola Mo1+</b>	3,557		19,307	
<b>Kontrola Mo2</b>		0,000		12,600
<b>Kontrola Mo3</b>		0,000		12,600
<b>Kontrola MoMIX</b>	0,000		15,750	
<b>Kontrola OA</b>	10,392	8,314		
<b>Kontrola KD</b>	9,112			

**Kontrola - kontrola medija:** Od vsake povprečne vrednosti kontrole odštejemo ustrezno povprečno vrednost medija; **Vsota kontrol:** povprečna vrednost kontrole medija + povprečna vrednost kontrole celic (zmanjšana za povprečno vrednost kontrole medija) + povprečna vrednost kontrole KD (zmanjšana za povprečno vrednost kontrole medija).



**Tabela XII: Izračun končnih koncentracij fragmentov kolagena tipa I (CTX-I) v posameznih vzorcih.**

	CTX-I (nM) 1. meritev	CTX-I (nM) 2. meritev	Koncentracija - vsota kontrol (nM) 1. meritev	Koncentracija - vsota kontrol (nM) 2. meritev	Povprečna vrednost 1. in 2. meritve (nM)
Vzorec Mo1- OA	14,895	14,040	0,000	0,000	0,000
Vzorec Mo1+ OA	19,740	20,595	0,433	1,288	0,861
Vzorec Mo2 OA	12,600	13,740	0,000	1,140	0,570
Vzorec Mo3 OA	13,284	13,056	0,684	0,456	0,570
Vzorec MoMIX OA	19,455	15,180	3,705	0,000	1,853
Vzorec Mo1 KD	11,480		0,000		0,000
Vzorec Mo2 KD	15,750		0,000		0,000
Vzorec Mo3 KD	11,195		0,000		0,000
Vzorec MoMIX KD	25,435		16,323		16,323

**Koncentracija - vsota kontrol:** Od vsake vrednosti koncentracije CTX-I vzorcev odštejemo ustrezno vrednost kontrol.