

Wpływ alfa-ketoglutaranu na osteogenezę **w modelach osteoblastów *in vitro***

STRESZCZENIE:

Tkanka kostna, najtwardsza tkanka w organizmie człowieka, swoje właściwości mechaniczne zawdzięcza obecności zmineralizowanej macierzy kostnej, wytwarzanej przez komórki kościotwórcze podczas ich dojrzewania i różnicowania. Pomimo ich pozornie stałej budowy, w kościach nieustannie zachodzą intensywne procesy metaboliczne, mające na celu utrzymanie prawidłowej masy i struktury tkanki kostnej. Remodelacja to proces wymiany starej, bądź uszkodzonej kości na nową, opierający się na zrównoważonej aktywności resorpcyjnej komórek kościogubnych – osteoklastów i aktywności osteogennej komórek kościotwórczych - osteoblastów. Wraz ze starzeniem się organizmu równowaga metaboliczna kości ulega zaburzeniu i resorpcja zaczyna dominować nad osteogenezą, co prowadzi do zmniejszenia masy tkanki kostnej i często skutkuje rozwojem chorób kości, takich jak osteoporoza. W leczeniu chorób przebiegających z utratą masy kostnej stosuje się głównie leki antyresorpcyjne, hamujące aktywność osteoklastów. W takich schorzeniach ważna jest również stymulacja aktywności osteogennej osteoblastów, w celu odbudowania osłabionej nadmierną resorpcją kości. Jednak leków wykazujących działanie proosteogenne jest na rynku zdecydowanie mniej niż antyresorpcyjnych, zaś dostępne preparaty z obu grup często wykazują działania uboczne. Dlatego niezbędne jest poszukiwanie nowych substancji stymulujących osteogenezę i bezpiecznych dla pacjenta.

Związkiem o potencjale do zastosowania w terapii chorób metabolicznych tkanki kostnej wydaje się być alfa-ketoglutaran (AKG). Ten metabolit cyklu Krebsa charakteryzuje się szeroko opisaną w literaturze plejotropową aktywnością. Jako donor energii w procesie oddychania komórkowego, AKG pełni istotną rolę w metabolizmie energetycznym komórek zwierzęcych, a jako prekursor aminokwasów przyczynia się do zachowania równowagi białkowej. Metabolit ten jest również ko-substratem dioksygenaz zależnych od AKG (2-OGDDs) – enzymów, które uczestniczą m.in. w destabilizacji czynnika transkrypcyjnego HIF-

I (biorącego udział w rozwoju i progresji nowotworów), a także pełnią rolę w biosyntezie kolagenu typu I – głównego białka macierzy kostnej. AKG jako ligand receptora GPR80/99 może dodatkowo funkcjonować jako cząstka sygnałowa i regulować w komórkach procesy związane z ich wzrostem i różnicowaniem. Egzogeny AKG, w postaci różnych soli, może być podawany jako suplement diety, ponieważ jest dobrze tolerowany przez organizm. Wykazano, że suplementacja AKG przyczyniała się do uzupełnienia niedoborów białkowych w stanach przebiegających z nasiloną proteolizą, metabolit ten wykazywał również działanie ochronne na komórki poddawane stresowi oksydacyjnemu, a także działanie immunomodulacyjne i przeciwnowotworowe.

W licznych badaniach *in vivo* wykazano pozytywny wpływ suplementacji AKG na tkankę kostną, który objawiał się zwiększeniem gęstości mineralnej oraz wytrzymałości kości. Mimo tych doniesień nadal nie jest znany mechanizm działania tego związku na tkankę kostną. Nie stwierdzono również jednoznacznie, że anaboliczny wpływ AKG na kości wiąże się z bezpośrednią stymulacją osteogenezy, ponieważ brak jest badań określających wpływ egzogenego AKG na osteoblasty.

Celem niniejszej pracy było określenie bezpośredniego wpływu alfa-ketoglutaranu (w postaci dwuwodnej soli disodowej kwasu alfa-ketoglutarowego, NaAKG) na dojrzewanie i różnicowanie trzech linii komórkowych osteoblastów, stanowiących modele do badań nad osteogenezą *in vitro*, oraz na mineralizację wytwarzanej przez nie macierzy kostnej.

W eksperymentach wykorzystywano następujące linie komórkowe: hFOB 1.19 (ludzkie, prawidłowe preosteoblasty), MC3T3-E1 (mysie, prawidłowe preosteoblasty) i Saos-2 (ludzkie, nowotworowe osteoblasty). W pierwszym etapie badań określono wpływ szerokiego zakresu stężeń NaAKG na proliferację osteoblastów metodami MTT i BrdU, a następnie zbadano wpływ tego związku na żywotność komórek za pomocą testów NR i LDH. W oparciu o wyniki testów żywotności komórek wybrano nietoksyczne dla badanych linii osteoblastów stężenia NaAKG i określono ich wpływ na różnicowanie komórek oraz mineralizację wytwarzanej przez nie macierzy kostnej. Metodą qRT-PCR określono wpływ NaAKG na ekspresję genów kodujących białkowe markery wczesnego (*ALPL*, *COL1A1*, *IBSP*) i późnego (*SPPI*, *BGLAP*) etapu różnicowania osteoblastów. Następnie zbadano wpływ NaAKG na wytwarzanie tych markerów w komórkach na poziomie białka (oznaczono aktywność ALP metodą kolorymetryczną i barwieniem *in situ*, określono ilość kolagenu typu I metodą Western blotting, oznaczono poziom białek BSP II, OPN i OCN metodą ELISA). Poziom mineralizacji macierzy kostnej oznaczono za pomocą barwienia czerwienią alizarynową. Dodatkowo określono zdolność NaAKG do indukcji procesu apoptozy i nekrozy

w komórkach linii Saos-2 (barwieniem Hoechst 33342 i jodkiem propidyny), a także na migrację tych komórek (testem rasy). W końcowym etapie pracy zbadano obecność w osteoblastach receptora GPR80/99 (dla którego ligandem jest AKG) na poziomie mRNA (qRT-PCR) i białka (metodą Western blotting i barwieniem immunofluorescencyjnym), a także określono funkcjonalność tego receptora za pomocą jego stymulacji kwasem alfa-ketoglutarynowym lub NaAKG (w teście IP-One ELISA).

Po przeprowadzeniu powyższych eksperymentów otrzymano następujące wyniki:

- NaAKG w stężeniach do 10 mM nie wpływał na proliferację komórek linii hFOB 1.19, MC3T3-E1 i Saos-2, natomiast w zakresie stężeń 25 - 200 mM hamował ich proliferację.
- NaAKG w stężeniach poniżej 50 mM nie był toksyczny dla komórek badanych linii osteoblastów, toteż do badań nad ich różnicowaniem wybrano stężenia 5, 10 i 25 mM.
- NaAKG zwiększał ekspresję genów i wytwarzanie białkowych markerów wczesnego i późnego etapu różnicowania oraz mineralizację macierzy kostnej w komórkach prawidłowych linii osteoblastów: hFOB 1.19 i MC3T3-E1.
- NaAKG zwiększał ekspresję genów wczesnych i późnych markerów różnicowania, natomiast obniżał ilość tych markerów na poziomie białka oraz hamował mineralizację macierzy kostnej wytwarzanej przez komórki nowotworowej linii Saos-2.
- NaAKG indukował proces apoptozy w komórkach linii Saos-2.
- NaAKG znacznie hamował migrację komórek linii Saos-2.
- Wykryto obecność receptora GPR80/99, dla którego ligandem jest AKG, w komórkach linii hFOB 1.19, MC3T3-E1 i Saos-2. Obecność tego białka w osteoblastach nie została dotychczas opisana.
- Wykazano, że receptor GPR80/99 jest funkcjonalny w komórkach badanych linii osteoblastów i ulega aktywacji pod wpływem kwasu alfa-ketoglutarynowego, natomiast nie jest aktywowany przez NaAKG w zakresie badanych stężeń.

Ocena oddziaływania alfa-ketoglutarynu na proces osteogenezy *in vitro* przyczyniła się do poszerzenia wiedzy na temat działania tego związku na tkankę kostną, jest także uzupełnieniem wyników otrzymanych w licznych, niezależnych badaniach *in vivo*. Na podstawie wyników badań przeprowadzonych w niniejszej pracy można stwierdzić, że alfa-ketoglutaryn wykazuje potencjał do wdrożenia i stosowania w profilaktyce lub/i terapii chorób

tkanki kostnej, takich jak osteoporoza oraz w chemoprewencji lub/i leczeniu nowotworu kości – osteosarkomy.