

FUZJA PREKURSORÓW OSTEOKLASTÓW ORAZ REGULACJA AKTYWNOŚCI OSTEOKLASTÓW DOJRZAŁYCH*

OSTEOCLAST PRECURSOR CELL FUSION AND REGULATION
OF MATURE OSTEOCLASTS' ACTIVITY

Krzysztof H. WŁODARSKI, Paweł WŁODARSKI

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Centrum Biostruktury Akademii Medycznej
w Warszawie

Streszczenie: Powstawanie osteoklastów – osteoklastogeneza – jest procesem tworzenia wielojądrowych komórek zdolnych do resorbowania macierzy kostnej podlegającym precyzyjnej regulacji licznymi ścieżkami sygnałowymi. Fuzja wywodzących się ze szpiku makrofagów, kontrolowana cytokinami oraz ligandami uwalnianymi lub ekspozycją przez komórki kościotwórcze – osteoblasty – prowadzi do powstania wielojądrzastych osteoklastów. Omówiono strukturę i funkcję tych komórek oraz przedstawiono wpływ czynników osteotropowych, cytokin i niektórych stanów patologicznych na proces powstawania tych komórek i ich aktywności.

Słowa kluczowe: makrofagi, oddziaływanie osteoblast/osteoklast, osteoklastogeneza, osteoklast.

Summary: Osteoclastogenesis – formation of polynuclear cells capable to resorb bone matrix, is tightly regulated by the number of signaling pathways. Fusion of bone marrow-derived macrophages, controlled by cytokines and osteoblast-bound ligands, leads eventually to formation of osteoclast. The structure of this cell and its function are discussed. Effects of drugs, cytokines and certain clinical conditions on formation of osteoclasts are reviewed in this paper.

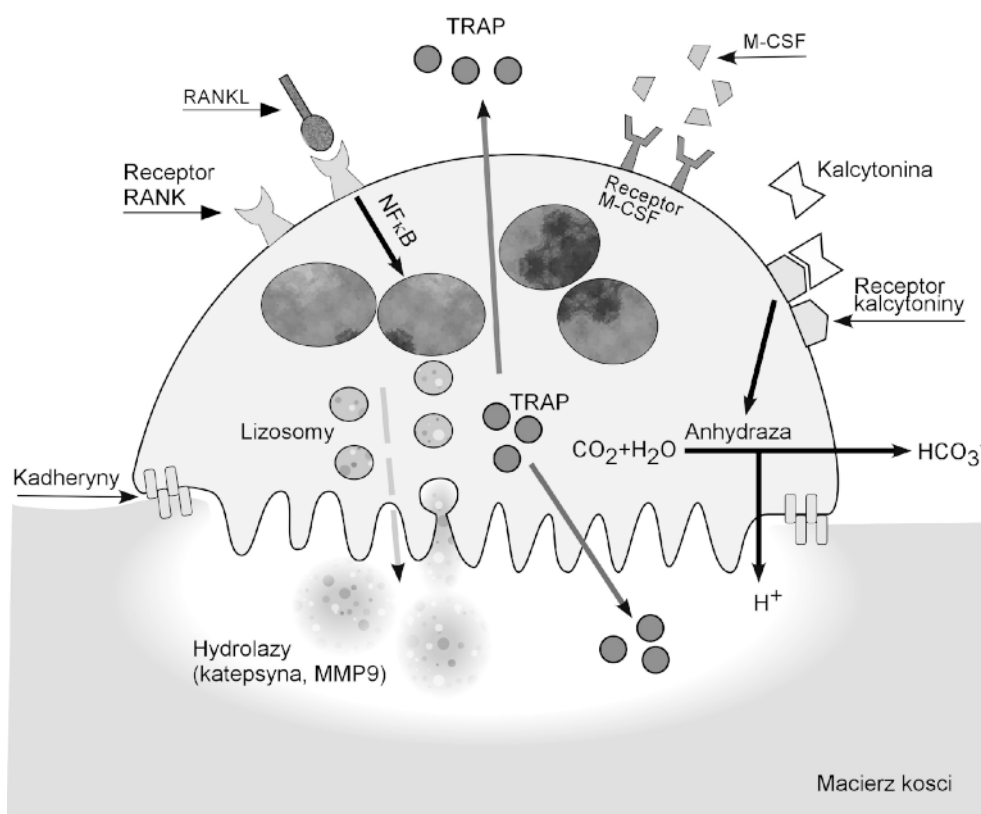
Key words: macrophages, osteoblasts/osteoclast interplay, osteoclastogenesis, osteoclast.

Dojrzałe osteoklasty, wyspecjalizowane komórki zdolne do degradacji organicznej i nieorganicznej komponenty macierzy kostnej, powstają w drodze złączania się (fuzji) jednojądrzastych komórek prekursorowych. Mechanizmy fuzji nie są w pełni wyjaśnione, a ich poznanie pozwoli na interweniowanie w proces osteoklastogenezy, a pośrednio w procesy resorpcji kości, tak ważne z uwagi na epidemiczne rozmiary osteoporozy.

*Praca wykonana w ramach grantu Akademii Medycznej 1M15/W2/06.

Dojrzałe osteoklasty są dużymi komórkami wielojądrzastymi. W odróżnieniu od komórek ciał obcych, również wielojądrzastych, które powstają w niektórych typach reakcji zapalnych, osteoklasty są zdolne do resorbowania organicznej macierzy kostnej po jej uprzedniej demineralizacji poprzez wydzielanie protonów i jonów chloru. Osteoklast wyposażony jest więc w zestaw enzymów hydrolitycznych oraz w system, pozwalający na uwalnianie jonów chlorowych i wodorowych (przegląd [48]). Po wypłukaniu części nieorganicznej, którą stanowi hydroksyapatyt maskujący macierz organiczną, enzymy hydrolityczne mogą trawić elementy organiczne kości.

Uwalnianie jonów wodorowych oraz enzymów hydrolitycznych przez osteoklasty odbywa się w biegunie komórki przylegającym do resorbowanej kości, z którą łączy się na obrzeżu za pomocą receptorów dla witronektyny [25]. Na tym biegunie występuje system uwypukień błony komórkowej, zwany rąbkami koronkowymi. Białka adhezyjne łączące się z sekwencjami RGD witronektyny macierzy kości uszczelniają styk osteoklastu z podłożem, umożliwiając miejscowe działanie uwalnianych drogą egzocytozy

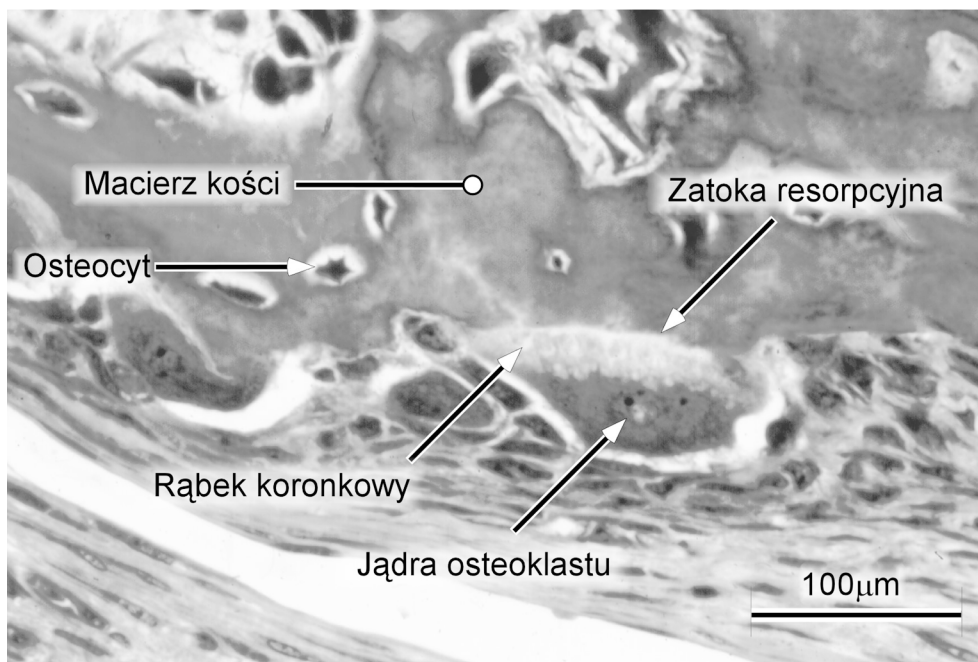


RYCINA 1. Schemat dojrzałego osteoklastu resorbującego macierz kostną. Opis mechanizmów oddziaływania wymienionych czynników zamieszczony jest w tekście

pęcherzyków lizosomalnych, zawierających enzymy proteolityczne (ryc. 1) [2, 47]. W polaryzację dojrzałych osteoklastów zaangażowanych jest szereg cząsteczek sygnałowych (przegląd [47]). Morfologicznym wyrazem aktywności osteoklastycznej jest powstawanie od strony rąbka koronkowego ubytków macierzy kostnej, zwanych zatokami resorpcyjnymi (ryc. 2).

Oprócz obecności receptorów dla witronektyny, dojrzałe osteoklasty mają receptory dla czynnika wzrostu monocytów – M-CSF, dla kalcytoniny [25] oraz receptor RANK dla cytokiny RANK-L (ligand dla receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B – NFκB). Oprócz ekspresji receptora RANK dojrzałe osteoklasty charakteryzuje wysoka ekspresja transbłonowego białka DC-STAMP (ang. *dendritic cell specific transmembrane protein*), proteiny specyficznej dla komórek dendrytycznych – jednej z postaci makrofagów. Osteoklasty charakteryzuje ponadto wysoka aktywność fosfatazy zasadowej winiano-opornej (ang. *tartrate resistant alkaline phosphatase*, TRAP), katepsyny K oraz metaloproteinazy MMP-9 [31]. Istnieje wiele godnych polecenia prac przeglądowych, poświęconych biologii osteoklastów omawiających te procesy szerzej [2, 15, 47].

Prekursorowymi komórkami osteoklastów są wywodzące się ze szpiku komórek monocytarne. Dzięki pracom nad generowaniem osteoklastów *in vitro* ustalono, że występują one wśród populacji GM-CFU [9], nie ma ich jednak w koloniach M-CFU. Czysta postać komórek prekursorowych ma fenotyp CD-14 [35]. W warunkach hodowli osteoklastów *in vitro* komórki prekursorowe występują w populacji mononuklearnych



RYCINA 2. Dojrzały osteoklast resorbujący heterotopową beleczkę kostną indukowaną u myszy przeszczepem ludzkich nabłonkowych komórek ustalonej linii WISH

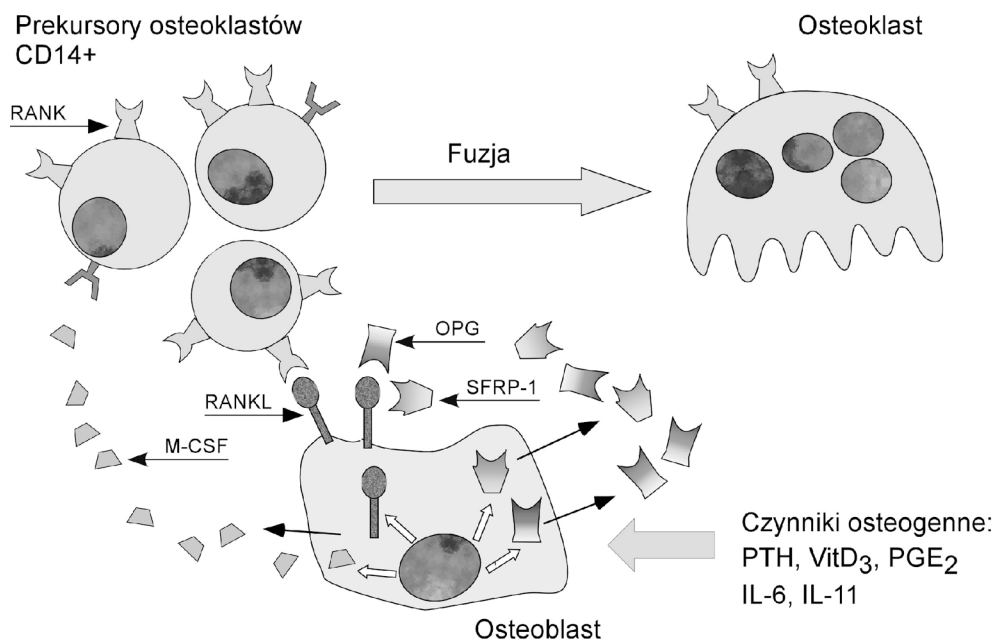
komórek krwi obwodowej [21] lub pępowinowej [39], we krwi pacjentów z ostrą postacią szpiczaka [17], w makrofagach uzyskiwanych z tkanek patologicznych [40], objętych procesem nowotworowym lub zapalnym [4], z błony maziowej pacjentów z osteoarthritis, z guzów osteoklastoma [25, 56]. Najczęściej stosowanymi w badaniach *in vitro* źródłami komórek prekursorowych są komórki uzyskane ze szpiku lub śledziony [12]. Także ustalona mysia linia monocytarna, RAW 264.7 jest zdolna do różnicowania się w komórki osteoklastyczne [20, 57, 62]. Interesujące jest, że proliferacja komórek prekursorowych nie jest warunkiem koniecznym dla powstawania dojrzałych osteoklastów [9].

AKTYWACJA DOJRZAŁYCH OSTEOKLASTÓW ORAZ POBUDZANIE OSTEOKLASTOGENEZY

Pomiędzy linią komórek osteoklastycznych a linią komórek kościotwórczych istnieje ścisłe powiązanie funkcjonalne (ryc. 3). Komórki osteoblastyczne, w tym komórki zrębowe szpiku, regulują aktywność osteoklastyczną za pomocą dwóch czynników. Po pierwsze, produkują ligand dla receptora RANK, który znajduje się na powierzchni osteoklastów. Jego pobudzenie poprzez związanie ligandu (RANK-L) uaktywnia NFκB, który transaktywuje szereg genów osteoklastu [1]. Drugim czynnikiem produkowanym przez osteoblasty jest osteoprotegereyna (OPG) – rozpuszczalny receptor-łapka, mający powinowactwo do RANK-L (przegląd [7, 43]). OPG współzawodniczy z receptorem RANK o RANK-L, antagonizując działanie RANK. OPG okazała się być opisanym wcześniej czynnikiem hamującym osteoklastogenezę – OCIF [60]. Związanie OPG z RANK-L uniemożliwia interakcję RANK/RANK-L, a więc nie dochodzi do aktywacji NFκB, a tym samym do aktywacji osteoklastu. Osteoprotegereyna jest więc czynnikiem przeciwdziałającym aktywacji osteoklastów. Podobne działanie wywiera też inny produkt aktywowanych osteoblastów – białko sFRP-1 (*secreted Frizzled-related protein*), także blokujące RANK-L [20]. Znanych jest wiele czynników, aktywujących osteoklasty i osteoklastogenezę. Są to deksametazon, który powoduje zahamowanie syntezy OPG, a wzrost ekspresji RANK-L w osteoblastach i komórkach zrębowych szpiku [44], witamina D3 [37, 53], czynnik martwicy nowotworów alfa (TNFα), którego działanie manifestuje się wzrostem ekspresji receptorów dla kalcytoniny, wzrostem ekspresji RANK oraz katepsyny K [28,38]. Ta ostatnia cytokina zwiększa również pulę komórek prekursorowych w organizmie [30]. TNF-alfa produkowany jest w znacznych ilościach w przebiegu reakcji zapalnych i to tłumaczy, dlaczego wielu procesom zapalnym towarzyszy resorpcja kości.

Inna cytokina – transformujący czynnik wzrostu beta (TGF-β) może również pobudzać osteoklasty przy braku dostępności RANK-L, ale jej wpływ na osteoklastogenezę zależy od czasu i długości trwania działania (patrz dalej).

Czynnik aktywujący kolonie granulocyтарно-monocyтарne (GM-CSF), produkowany m.in. przez komórki prekursorowe osteoklastów – monocyty, podany jednocześnie z



RYCINA 3. Udział osteoblastów w fuzji prekursorów osteoklastów (opis w tekście)

białkiem chemotaktycznym dla monocytów – MCP-1 prowadzi do powstawania wielojądrzastych osteoklastów bez udziału RANK-L. W obecności RANK-L krótkotrwała (2–48 godz.) ekspozycja GM-CSF aktywuje osteoklastogenezę, natomiast stała ekspozycja na GM-CSF prowadzi do generowania z prekursorów komórek dendrytycznych, zamiast osteoklastów [23].

Wpływ prostaglandyny PGE₂ na osteoklastogenezę u ludzi i u zwierząt bywa odmienny. Mysie makrofagi w obecności PGE₂ i RANK-L różnicują się w osteoklasty, natomiast wobec komórek ludzkich PGE₂ hamuje osteoklastogenezę.

Ostatnio dyskutowana jest rola receptorów purynergiczných w osteoklastogenezie [3, 5, 6]. Nukleotyd ATP jest czynnikiem proresorpcyjnym i stwierdzono, że wolne nukleotydy aktywują w osteoblastach RANK-L [8, 13, 14, 22]. Jednym z lepiej poznanych receptorów purynergiczných jest receptor P2X₇, stanowiący błonowy kanał jonowy. Aktywacja tego receptora przez ATP prowadzi do wytworzenia porów w błonie komórkowej prekursorów osteoklastów. Aktywacja tych porów ma związek z fuzją komórek, gdyż blokada receptorów P2X₇ zapobiega osteoklastogenezie właśnie przez zapobieżenie fuzji [16].

W niniejszym przeglądzie nie dyskutujemy szczegółowo roli parathormonu (PTH) w aktywacji osteoklastów, gdyż temat ten jest zbyt szeroki, wykraczający poza ramy tego opracowania. PTH aktywuje osteoklasty poprzez zwiększanie ekspresji RANK-L na osteoblastach, które, w przeciwieństwie do osteoklastów, mają receptory dla PTH. Wpływ PTH na przebudowę kości nie jest jednak jednoznaczny; niskie dawki PTH działają pobudzająco na osteogenezę, wyższe – są czynnikiem proresorpcyjnym.

CZYNNIKI WYWIERAJĄCE HAMUJĄCY EFEKT NA GENEROWANIE OSTEOKLASTÓW

Spośród czynników negatywnie regulujących fuzję komórek CD14⁺ w osteoklasty należy przede wszystkim wymienić wspomnianą uprzednio osteoprotegerynę (OPG) oraz, w odniesieniu do ludzi, prostaglandynę E2 [52]. Inhibitorem osteoklastogenezy jest także stała ekspozycja komórek prekursorowych na działanie GM-CSF oraz interferon gamma – produkty m.in. aktywowanych limfocytów T [42]. Jednak w przypadku pacjentów z osteopetrozą interferon gamma wzmacnia osteoklastogenezę *in vitro* [32].

Leptyna, hormon sytości, wywiera hamujący efekt na osteoklastogenezę poprzez zwiększanie ekspresji OPG w komórkach osteoblastycznych i zrębowych szpiku [18]. Również inhibitory proteasomów hamują osteoklastogenezę poprzez negatywny wpływ na aktywację NFκB [61]. Flawonoid kwercetyna również działa hamująco na proces powstawania osteoklastów w drodze hamowania przez RANK-L aktywacji NFκB oraz białka aktywującego AP-1 [57]. Białko sFRP-1, produkt osteoblastów pobudzanych PGE2 lub interleukiną 11 hamuje osteoklastogenezę poprzez hamowanie w komórkach prekursorowych sygnalizacji RANK-L [20].

UDZIAŁ TGF-β W PROCESACH OSTEOKLASTOGENEZY

Ta cytokina jest bardzo silnym modulatorem osteoklastogenezy, wywierającym różne, przeciwstawne efekty, w zależności od sposobu jej podania [26]. Ekspozycja prekursorów CD14⁺ na TGF-β przez krótki czas hodowli *in vitro* (1–7 dni) prowadzi do aktywacji osteoklastogenezy, mierzonej aktywnością enzymu TRAP⁺ i stopniem resorpcji matrycy kostnej. Jednakże ta sama cytokina, podawana przez cały czas hodowli (1–21 dni), wywiera efekt odwrotny – spadek liczby komórek TRAP⁺, spadek aktywności resorpcyjnej, spadek ekspresji enzymów hydrolitycznych – katepsyny K i metaloproteinazy MMP-9. Ta stała ekspozycja TGF-β powoduje zahamowanie ekspresji receptora RANK. Stwierdzono również, że enzym MMP-9 może aktywować latentną formę TGF-β obecną w macierzy kostnej. Sugeruje się, że TGF-β ulega aktywacji przez MMP-9 pochodzącą z osteoklastów. TGF-β aktywuje w monocytach kinazę p38 MAPK, odpowiedzialną za chemotaksję i proliferację monocytów. Uwzględniając te dane postuluje się, że TGF-β pobudza osteoklastogenezę ludzkich monocytów w drodze stymulacji szlaku p38 MAPK, odpowiedzialnego za chemotaksję monocytów, dostarczając „materiału” dla przyszłych osteoklastów. Natomiast ciągła ekspozycja na TGF-β, hamując ekspresję RANK, wpływa negatywnie na osteoklastogenezę poprzez osłabienie sygnalizacji RANK/RANK-L.

TGF-β, przy braku RANK-L, a w obecności M-CSF pobudza monocyty do różnicowania się w kierunku komórek zdolnych do resorbowania macierzy kostnej, ale pozbawionych cech morfologicznych osteoklastów [24].

FUZJA KOMÓREK PREKURSOROWYCH

Dojrzałe osteoklasty powstają w drodze fuzji komórek jednojądrzastych. Dokładny mechanizm fuzji komórek wielojądrzastych – osteoklastów i komórek olbrzymich ciał obcych nie zostały w pełni wyjaśnione, choć znanych jest wiele czynników, promujących lub hamujących ten proces. Cytokiny, transformujący czynnik wzrostu alfa ($TGF-\alpha$) oraz naskórkowy czynnik wzrostu EGF pobudzają proliferację komórek prekursorowych osteoklastów [50]. Na powierzchni makrofagów występują molekuly odpowiedzialne za fuzję: E-kadheryna [33] oraz antygen CD44 [55]. Udział w fuzji mają chemokiny: RANTES (ang. *regulated on activation normal T cell expressed and secreted* – wydzielane przez aktywowane limfocyty T) oraz chemotaktyczne białko monocytów MCP-1 [27]. Dodanie tych chemokin do hodowli komórek prekursorowych pozwala na powstanie, przy braku w systemie RANK-L, wielojądrzastych komórek TRAP+, które jednak nie wykazują zdolności do resorbowania kości. Zdolność tę nabywają dopiero w obecności chemokiny MCP-1 oraz ligandu RANK-L.

Cyklosporyna A powodując w monocytach spadek ekspresji chemokiny MCP-1 hamuje sygnalizację RANK/RANK-L, ale dodanie do hodowli chemokin RANTES i MCP-1 prowadzi do różnicowania się osteoklastów TRAP+, zdolnych do resorbowania kości [36].

CZYNNIKI PROMUJĄCE FUZJĘ PREKURSOROWYCH KOMÓREK OSTEOKLASTÓW

Celem uzyskania osteoklastogenezy w warunkach *in vitro* do środowiska hodowlanego musi być dodany czynnik wzrostu M-CSF oraz ligand (RANK-L) dla receptora RANK [23, 45, 47, 49, 51]. Ich niedostatek lub brak hamuje lub uniemożliwia fuzję i osteoklastogenezę *in vitro*.

Ostatnio stwierdzono, że fuzja prekursorów zachodzi przy udziale transbłonowego białka DC-STAMP [59]. Jest to, siedmiokrotnie przechodząca przez błonę komórkową pętla łańcucha białkowego, występującego w komórkach dendrytycznych – jednej z postaci makrofagów. Okazuje się, że bardzo wysoką ekspresję tego białka wykazują dojrzałe osteoklasty oraz komórki olbrzymie ciał obcych. Mutanty zwierząt, niezdolnych do syntezy tego białka, nie wytwarzają ani osteoklastów, ani komórek olbrzymich ciał obcych.

Na makrofagach, ulegających fuzji, opisano specyficzny, niezdefiniowany antygen 150 kD, nieobecny na makrofagach nieulegających fuzji, a przeciwciała monoklonalne wobec tego antygeny zapobiegają fuzji komórek [41]. Białko CD44 wiąże się z receptorem dla tych przeciwciał, tak więc cząsteczka CD44, a także CD47 biorą udział w fuzji komórek prekursorowych [54]. Także wewnątrzkomórkowa domena antygeny CD44 (CD44-ICD), odcinana w makrofagach, aktywuje w jądrze czynnik transkrypcyjny NF κ B, niezbędny dla aktywacji osteoklastów [10]. Za homotypową fuzję makrofagów odpowiedzialny jest receptor MRF (ang. *macrophage fusion receptor*),

dla którego ligandem jest cząsteczka CD47. Dzięki temu receptorowi makrofagi „rozpoznają” się przed fuzją. Rolę receptora purynergicznego P2X7 w fuzji prekursorów omówiono wyżej. Do czynników promujących fuzję zalicza się także zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów FGF- β [62] oraz czynniki aktywujące fosfolipazę A2. Aktywacja tej niezależnej od jonów wapnia fosfolipazy powoduje w komórkach wzrost ekspresji markerów siateczki endoplazmatycznej (ER). Powstawanie komórek wielojądrzastych w drodze fuzji prekursorów ma wiele cech wspólnych z fagocytozą [34]. Fuzja makrofagów związana jest ze „stapianiem się” błony komórkowej jednego makrofaga z błoną drugiego. Występuje tu analogia do fagocytozy cząsteczek opsoninowanych (okrytych przeciwciałem). Polimeryzacja włókien aktynowych wokół twożącego się fagosomu jest cechą nie tylko endocytozy, ale wszystkich rodzajów fagocytozy, a zahamowanie tej polimeryzacji, np. za pomocą cytochalazyny, całkowicie zapobiega fuzji makrofagów i wytwarzaniu wielojądrzastych komórek ciał obcych.

Fuzja makrofagów pod wpływem IL-4 odbywa się przy udziale receptorów mannozy, które są jednocześnie receptorami występującymi w procesach fagocytozy i endocytozy. Markery fagocytozy zachodzącej przy udziale retikulum endoplazmatycznego – calurexyna i calregulina – obecne są w makrofagach, ulegających fuzji i występują w większym stężeniu w miejscach zachodzącej fuzji błon. Markery te kolokalizują z miejscem wiązania Konkanawaliny A – lektyny wykazującej powinowactwo do mannozy. Może to sugerować, że podczas fuzji makrofagów siateczka endoplazmatyczna wykazuje ekspresję receptorów dla ligandu mannozy [34].

CZYNNIKI HAMUJĄCE FUZJĘ KOMÓREK PREKURSOROWYCH OSTEOKLASTÓW

Oprócz osteoprotegeryny (OPG) oraz białka sFRP-1, czynnikami znacząco hamującymi wczesne etapy osteoklastogenezy są statyny – inhibitory reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A (HMG-CoA) [46]. Geranylogeranylacja białek G (Rho, Rac) potrzebna jest we wczesnych etapach osteoklastogenezy [11]. Podanie statyn, np. Mevastatyny, zapobiega powstawaniu osteoklastów, ale ten hamujący efekt statyn znosi podanie związków szlaku cholesterolowego – mevalonianu, farnesylu i geranylogeranylu [58]. Zmniejszona synteza cholesterolu, będąca następstwem podania statyn, znacząco upośledza fuzję błon [29]. Także obniżony poziom LDL jest czynnikiem upośledzającym fuzję komórek.

Znajomość czynników regulujących fuzję komórek prekursorowych w osteoklasty, ich receptorów oraz czynników modulujących transdukcję wywołanego tymi ligandami sygnału, umożliwi ingerencję w mechanizmy prowadzące do patologicznej resorpcji kości. Poznane do tej pory i potencjalne, nowe cząsteczki, wpływające na ten proces, pozwolą w przyszłości na skuteczną terapię schorzeń związanych z zaburzoną funkcją osteoklastów.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ABU-AMER Y, TONDRAVI MM. NF- κ B and bone: the breaking point. *Nature Medicine* 1997; **3**: 1189–1190.
- [2] AMLING M, DELLING G. Zellbiologie des osteoklasten und molekulare Mechanismen der Knochenresorption. *Pathologie* 1996; **17**: 358–367.
- [3] ATHANASOU NA. Cellular biology of bone-resorbing cells. *J Bone Jt Surg* 1996; **78-A**:1096–1111.
- [4] ATHANASOU NA, SABOKBAR A. Human osteoclast ontogeny and pathological bone resorption. *Histol Histopathol* 1999; **14**: 635–647.
- [5] BOWLER WB, BIRCH MA, GALLAGHER JA, BILBE G. Identification and cloning of human P2U purinoreceptor present in osteoclastoma, bone, and osteoblasts. *J Bone Miner Res* 1995; **10**: 1137–1145.
- [6] BOWLER WB, BUCKLEY KA, GARTLAND A, HIPSKIND RA, BILBE G, GALLAGHER JA. Extracellular nucleotide signaling: a mechanism for interacting local and systemic responses in the activation of bone remodeling. *Bone* 2001; **28**: 507–512.
- [7] BUCKLEY KA, FRASER WD. Receptor activator for nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin: regulators of bone physiology and immune responses/potential therapeutic agents and biochemical markers. *Ann Clin Biochem* 2002; **39**: 551–556.
- [8] BUCKLEY KA, HIPSKIND RA, GARTLAND A, BOWLER WB, GALLAGHER JA. Adenosine triphosphate stimulates human osteoclast activity via upregulation of osteoblast-expressed receptor activator of nuclear factor- κ B ligand. *Bone* 2002; **31**: 582–590.
- [9] CLOHISY DR, RAMNARAIN MLR. Osteoclast formation during tumor osteolysis does not require proliferating osteoclast precursor cells. *J Orthop Res* 1997; **15**: 301–306.
- [10] CUI W, KE JZ, ZHANG Q, CHALOUNI C, VINGERY A. The intracellular domain CD44 promotes the fusion of macrophages. *Blood* 2006; **107**: 796–805.
- [11] FISHER JE, ROGERS MJ, LUCKMAN SP, HUGHES DE, MASARACHIA PJ, WESOŁOWSKI G, RUSSELL RG, RODAN GA, RESZKA AA. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 133–138.
- [12] FULLER K, CHAMBERS TJ. Generation of osteoclasts in cultures of rabbit bone marrow and spleen cells. *J Cell Physiol* 1987; **132**: 441–452.
- [13] GALLAGHER JA, BUCKLEY KA. Expression and function of P2 receptors in bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2002; **2**: 432–439.
- [14] GALLAGHER JA. ATP P2 receptors and regulation of bone effector cells. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2004; **4**: 125–127.
- [15] GARTLAND A, BUCKLEY KA, HIPSKIND RA, BOWLER WB, GALLAGHER JA. P2 receptors in bone – modulation of osteoclast formation and activity via P2X7 activation. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 2003; **13**: 237–242.
- [16] GARTLAND A, BUCKLEY KA, BOWLER WB, GALLAGHER JA. Blockade of the pore-forming P2X7 receptor inhibits formation of multinucleated human osteoclasts *in vitro*. *Calcif Tissue Int* 2003; **73**: 361–369.
- [17] GREGORETTI MG, BERGUIL, ARAGNO M, CREMONA O, MARCHISIO PC, CALIGARIS-CAPPIO F. Osteoclast precursors circulate in the peripheral blood of patients with aggressive multiple myeloma. *Leukemia* 1995; **9**: 1392–1397.
- [18] HALLOWAY WR, COLLIER FM, AITKEN CJ, MYERS DE, HODGE JM, MALAKELLIS M, GOUGH TJ, COLLIER GR, NICHOLSON GC. Leptin inhibits osteoclast generation. *J Bone Miner Res* 2002; **17**: 200–209.
- [19] HATTERSLEY G, CHAMBERS TJ. Calcitonin receptors as markers for osteoclastic differentiation: correlation between generation of bone-resorptive cells and cells that express calcitonin receptors in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology* 1989; **125**: 1606–1612.
- [20] HAUSLER KD, HORWOOD NJ, CHUMAN Y, FISHER JL, ELLIS J, MARTIN TJ, RUBIN JS, GILLESPIE MT. Secreted frizzled-related protein-1 inhibits RANKL-dependent osteoclast formation. *J Bone Miner Res* 2004; **19**: 1873–1881.

- [21] HAYNES DR, ATKINS GJ, LORIC M, CROTTI TN, GEARY SM, FINDLAY DM. Bidirectional signaling between stromal and hemopoietic cells regulates interleukin-1 expression during human osteoclast formation. *Bone* 1999; **25**: 269–278.
- [22] HAYTON MJ, DILLON JP, GLYNN D, CURRAN JM, GALLAGHER JA, BUCKLEY KA. Involvement of adenosine 5'-triphosphate in ultrasound-induced fracture repair. *Ultrasound in Med & Biol* 2005; **31**: 1131–1138.
- [23] HODGE JM, KIRKLAND MA, ATIKEN CJ, WAUGH CM, MYERS DE, LOPEZ CM, ADAMS BE, NICHOLSON GC. Osteoclastic potential of human CFU-GM: biphasic effect of GM-CSF. *J Bone Miner Res* 2004; **19**: 190–199.
- [24] ITONAGA I, SABOKBAR A, SUN SG, KUDO O, DANKS L, FERGUSON D, FUJIKAWA Y, ATHANASOU NA. Transforming growth factor-beta induces osteoclast formation in the absence of RANKL. *Bone* 2004; **34**: 57–64.
- [25] JAMES IE, DODDS RA, LEE-RYKACZEWSKI E, EICHMAN CHF, CONNOR RD, HART TK, MALE-EFF BE, LACKMAN RD, GOWEN M. Purification and characterization of fully functional human osteoclast precursors. *J Bone Miner Res* 1996; **11**: 1608–1618.
- [26] KARSDAL MA, HJORTH P, HENRIKSEN K, KIRKEGAARD T, NIELSEN KL, LOU H, DELAISSE J-M, FOGED NT. Transforming growth factor-beta controls human osteoclastogenesis through the p38MAPK and regulation of RANK expression. *J Biol Chem* 2003; **278**: 44975–44987.
- [27] KIM MS, DAY CJ, MORRISON NA. MCP-1 is induced by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, promotes human osteoclast fusion, and rescues granulocyte-macrophage colony-stimulating factor suppression of osteoclast formation. *J Biol Chem* 2005; **280**: 16163–16169.
- [28] KOMINE K, KUKITA A, KUKITA T, OGATA Y, HOTOKEBUCHI T, KOHASHI O. Tumor necrosis factor-alpha cooperates with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in generation of osteoclasts in stromal cell-depleted rat bone marrow cell culture. *Bone* 2001; **28**: 474–483.
- [29] LEUGMAYR E, GLANTSCHNIG H, WESOŁOWSKI GA, GENTILE MA, FISHER JE, RODAN GA, RESZKA AA. Osteoclast formation, survival and morphology are highly dependent on exogenous cholesterol/lipoproteins. *Cell Death Differ* 2004; **11** Suppl 1: S5–7.
- [30] LI P, SCHWARZ EM, O'KEEFE RJ, MA L, LOONEY RJ, RITCHLIN CT, BOYCE BF, XING L. Systemic tumor necrosis factor alpha mediates an increase in peripheral CD11b high osteoclast precursors in tumor necrosis factor alpha-transgenic mice. *Arthritis Rheum* 2004; **50**: 265–276.
- [31] LITTLEWOOD-EVANS A, KOKUBO T, ISHIBASHI O, INAOKA T, WŁODARSKI B, GALLAGHER JA, BILBE G. Localization of cathepsin K in human osteoclasts by *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *Bone* 1997; **20**: 81–86.
- [32] MADYASTHA PR, YANG S, RIES WL, KEY LL Jr. INF-gamma enhances osteoclast generation in cultures of peripheral blood from osteopetrotic patients and normalizes superoxide production. *J Interferon Cytokine Res* 2000; **20**: 645–652.
- [33] MBALAVIELE G, CHEN H, BOYCE BF, MUNDY GR, YONEDA T. The role of cadherin in the generation of multinucleated osteoclasts from mononuclear precursors in murine marrow. *J Clin Invest* 1995; **95**: 2757–2765.
- [34] McNALL AK, ANDERSON JM. Multinucleated giant cell formation exhibits feature of phagocytosis with participation of the endoplasmic reticulum. *Exp Mol Pathol* 2005; **79**: 126–135.
- [35] NICHOLSON GC, MALAKELLIS M, COLLIER FM, CAMERON PU, HOLLOWAY WR, GOUGH TJ, GREGORIO-KING C, KIRKLAND MA, MYERS DE. 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**: 133–140.
- [36] PASSERI G, CARBONARE LD, GIANNINI S, MUSACCHIO E, CREPALDI G, SATORI L. Effects of cyclosporin A on osteoclasts and osteoblast progenitors from murine bone marrow. W: Papapoulos SE i wsp. [red.], Osteoporosis. 1996, Elsevier Science B.V. 1996: 61–66.
- [37] PHAROAH MJ, HEERSCHE JN. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 causes an increase in the number of osteoclastlike cells in cat bone marrow cultures. *Calcif Tissue Int* 1985; **37**: 276–281.
- [38] QUINN JM, WHITTY GA, BYRNE RJ, GILLESPIE TM, HAMILTON JA. The generation of highly enriched osteoclast-lineage cell populations. *Bone* 2000; **30**: 164–170.
- [39] QUINN JM, FUJIKAWA Y, MCGEE JO, ATHANASOU NA. Rodent osteoblast-like cells support osteoclastic differentiation of human cord blood monocytes in the presence of M-CSF and 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; **29**: 173–179.
- [40] SABOKBAR A, FUJIKAWA Y, NEALE S, MURRAY D, ATHANASOU N. Human arthroplasty derived macrophages differentiate into osteoclastic bone resorbing cells. *Ann Rheum Dis* 1997; **56**: 414–420.

- [41] SAGINARIO C, QIAN HY, VIGNERY A. Identification of an inducible surface molecule specific to fusing macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 1210–1214.
- [42] SHINODA K, SUGIYAMA E, TAKI H, HARADA S, MINO T, MARUYAMA M, KOBAYASHI M. Resting T cells negatively regulate osteoclast generation from peripheral blood monocytes. *Bone* 2003; **33**: 711–720.
- [43] SIMONET WS, LACEY DL, DUNSTAN CR, KELLY M, CHANG M-S, LUTHY R, NGUYEN HQ, WOODEN S, BENNETT L, BOONE T, SHIMAMOTO G, DEROSE M, ELLIOTT R, COLOMBERO A, TAN H-L, TRAIL G, SULLIVAN J, DAVY E, BUCAY N, RENSHAW-GEGG L, HUGHES TM, HILL D, PATTISON W, CAMPBELL P, SANDER S, VAN G, TARPLEY J, DERBY P, LEE R, AMGEN EST PROGRAM, BOYLE WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; **89**: 309–319.
- [44] SIVAGURUNATHAN S, MUIR MM, BRENNAN TC, SEALE JP, MASON RS. Influence of glucocorticoids on human osteoclast generation and activity. *J Bone Miner Res* 2003; **20**: 390–398.
- [45] SCHEVEN BAA, MILNE JS, ROBINS SP. A novel culture system to generate osteoclasts and bone resorption using porcine bone marrow cells: role of M-CSF. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; **231**: 231–235.
- [46] STAAL A, FRITH JC, FRENCH MH, SWARTZ J, GUNGOR T, HARRITY TW, TAMASI J, ROGERS MJ, FEYEN JH. The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. *J Bone Miner Res* 2003; **18**: 88–96.
- [47] SUDA T, NAKAMURA I, JIMI E, TAKAHASHI N. Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res* 1997; **12**: 869–879.
- [48] SUDA T, TAKAHASHI N, MATRIN TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocrine Rev* 1992; **13**: 66–80.
- [49] SUSA M, LOUNG-NGUYEN N-H, CAPPELLEN D, ZAMUROVIC N, GAMSE R. Human primary osteoclasts: *in vitro* generation and applications as pharmacological and clinical assay. *J Transitional Med* 2004; **2**: 6.
- [50] TAKAHASHI N, MACDONALD BR, HON J, WINKLER ME, DERYNCK R, MUNDY GR, ROODMAN GD. Recombinant human transforming factor- α stimulates the formation of osteoclast-like cells in long-term human marrow cultures. *J Clin Invest* 1986; **78**: 894–898.
- [51] TAKAMI M, WOO JT, NAGAI K. Osteoblastic cells induce fusion and activation of osteoclasts through a mechanism independent of macrophage-colony-stimulating factor production. *Cell Tissue Res* 1999; **298**: 327–334.
- [52] TAKE I, KOBAYASHI Y, YAMAMOTO Y, TSUBOI H, OCHI T, UEMATSU S, OKAFUJI N, KURIHARA S, UDAGAWA N, TAKAHASHI N. Prostaglandin E2 strongly inhibits human osteoclast formation. *Endocrinology* 2005; **146**: 5204–5214.
- [53] Van't HOF RJ, TUINENBURG-BOLL RAAP AC, NIJWEIDE PJ. Induction of osteoclast characteristics in cultured avian blood monocytes; modulation by osteoblasts and 1,25-(OH) $_2$ vitamin D $_3$. *Int J Exp Pathol* 1995; **76**: 205–214.
- [54] VIGNERY A. Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism. *Int J Exp Pathol* 2000; **81**: 291–304.
- [55] deVRIES TJ, SCHOENMAKER T, BEERSTEN W, van der NEUT R, EVERTS V. Effect of CD44 deficiency on *in vitro* and *in vivo* osteoclast formation. *J Cell Biochem* 2005; **94**: 954–966.
- [56] WALSH CA, CARRON JA, GALLAGHER JA. The isolation of osteoclasts from human giant cell tumors and long-term marrow cultures. W: GE Jones [red.] *Methods in molecular medicine: human cell culture protocols*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1996: 263–274.
- [57] WATTEL A, KAMEL S, PROUILLET C, PETIT JP, LORGET F, OFFORD E, BRAZIER M. Flavonoid quercetin decreases osteoclastic differentiation induced by RANKL via mechanism involving NF kappa B and AP-1. *J Cell Biochem* 2004; **92**: 285–295.
- [58] WOO JT, NAKAGAWA H, KRECIC AM, NAGAI K, HAMILTON AD, SEBTI SM, STERN PH. Inhibitory effects of mevastatin and a geranylgeranyl transferase I inhibitor (GGTI-2166) on mononuclear osteoclast formation induced by receptor activator of NF kappa B ligand (RANKL) or tumor necrosis factor- α (TNF- α). *Biochem Pharmacol* 2005; **69**: 87–95.
- [59] YAGI M., MIYAMOTO T, SAWATAMI Y, IWAMOTO K, HOSOGANE N, FUJITA N, MORITA K, NINOMIYA K, SUZUKI T, MIYAMOTO K, OIKE Y, TAKEYA M, TOYAMA Y, SUDA T. DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med* 2005; **202**: 345–351.

- [60] YASUDA H, SHIMA N, NAKAGAWA N, MOCHIZUKI S-I, YANO K, FUJISE N, SATO Y, GOTO M, YAMAGUCHI K, KURIYAMA M, KANNO T, MURAKAMI A, TSUDA E, MORINAGA T, HIGASHIO K. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis *in vitro*. *Endocrinology* 1998; **139**: 1329–1337.
- [61] ZAVARSKI I, KREBBEL H, WILDEMANN B, HEIDER U, KAISER M, POSSINGER K, SEZER O. Proteasome inhibitors abrogate osteoclast differentiation and osteoclast function. *Biochem Biophys Res Comm* 2005; **333**: 200–205.
- [62] ZUO J, JIANG J, DOLCE C, HOLLIDAY LS. Effects of basic fibroblast growth factor on osteoclasts and osteoclasts-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **318**: 162–167.

Redaktor prowadzący – Janusz Kubrakiewicz

Otrzymano: 21.02. 2006 r.

Przyjęto: 14.04.2006 r.

02-004 Warszawa, Chałubińskiego 5