

Osteocyty – centralny regulator homeostazy kości

Regulation of Bone Homeostasis by Osteocytes

Grzegorz Szczęsny^{1(A,D,E,F)}, Anieli Brodzikowska^{2(A,D,E,G)}, Ryszard Galus^{3(A,E,F)},
Paweł Włodarski^{3(A,D,E,F)}, Krzysztof H. Włodarski^{3(A,D,E,F)}

¹ Katedra i Klinika Ortopedii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Polska

² Zakład Stomatologii Zachowawczej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Polska

³ Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Polska

¹ Department of Orthopedics, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

² Department of Preventive Stomatology, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

³ Department and Division of Histology and Embryology, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

STRESZCZENIE

W oparciu o przegląd piśmiennictwa ostatniego okresu przedstawiono nowe ustalenia dotyczące funkcji osteocytów. Najważniejsze z nich jest to, że osteocyty są komórkami docelowymi dla parathormonu oraz stanowią główne źródło sklerostyny, głównego inhibitora aktywności osteoblastycznej, a także są producentem cytokiny RANKL, najważniejszego regulatora osteoklastogenezy. Wykazano, że pod wpływem zmian naprężeniowych kości, osteocyty wchodzi w szlak programowanej śmierci – apoptozy, będącej sygnałem do aktywacji osteoklastów. Osteocyty stanowią więc istotny czynnik warunkujący przebudowę kości.

Słowa kluczowe: aktywność sekrecyjna, osteocyty, PTH, RANKL

SUMMARY

New data concerning the function of osteocytes as the central regulators of bone homeostasis are briefly outlined. It is established that osteocytes are the main target cells for parathormone. They are a rich source of sclerostin, the main inhibitor of osteoblast activity, and of the RANKL cytokine, the most important regulator of osteoclastogenesis. Under shear stress causing microinjury, osteocytes enter programmed cell death (apoptosis) and osteocyte apoptosis is a signal for nearby healthy osteocytes to activate osteoclasts to resorb bone.

Key words: osteocyte, RANKL, PTH, secretory activity

WSTĘP

Najliczniejsze, stanowiące ok. 90% populacji komórek kostnych osteocyty, definiowane są na podstawie ich lokalizacji – komórki leżące w jamkach kostnych, otoczone zmineralizowaną macierzą kości. Taka lokalizacja utrudnia ich izolowanie i badanie funkcji, przez co przez długi czas uznawano je jako komórki spoczynkowe o bliżej niesprecyzowanej funkcji, choć w badaniach elektronowo-mikroskopowych udało się prześledzić drogę rozwojową osteocytów z osteoblastów, poprzez osteocyty spoczynkowe do form resorpcyjnych (osteolitycznych) i wnosić, na podstawie morfologii komórki i jej otoczenia, o udziale poszczególnych stadiów rozwojowych w organizacji macierzy kostnej [1].

Ich liczebność oraz niedostępność czyniły je jednak intrygującymi elementami kości, a znaczenie i funkcje przypisywano im raczej na drodze spekulacji niż eksperymentu. W ostatnim czasie opisano metodę izolacji osteocytów z kości sklepienia czaszki noworodków mysich lub z kości długich zwierząt dorosłych do ekstrakcji RNA i oceny w nich ekspresji genów [2]. Wprowadzenie do badań osteocytów hodowanych *in vitro*, stanowiło istotny postęp w poznaniu funkcji i mechanizmów regulujących aktywność tych komórek [3-8].

Zmuszone do życia w jamkach kostnych osteocyty tworzą sieć komórek, połączonych ze sobą oraz z komórkami leżącymi na powierzchni kości wypustkami cytoplazmatycznymi, biegnącymi w kanałkach kostnych. Kontakty pomiędzy wypustkami osteocytów zachodzą za pomocą kanałowych połączeń typu „gap junction” (nexus, połączenie jonowo-metaboliczne), zezwalającymi na przepływ cząsteczek. Białko tych kanałów, koneksyna 43 (Cx43), przemieszcza się z cytoplazmy do błony komórkowej wypustek pod wpływem ciśnienia hydrostatycznego płynu otaczającego wypustki, ułatwiając funkcje komunikacyjne tego złącza [9,10]. Brak ekspresji białka Cx43 jest sygnałem dla osteocytu do wejścia w stan samobójczej śmierci – apoptozy [11,12].

Cytoplazma osteocytów i ich wypustek leżących w świetle jamek i kanałków otoczona jest płynem okołokomórkowym, za pomocą którego przemieszczają się substancje odżywcze, produkty wydzielnicze oraz przemiany materii. Taki układ komórek, wraz z siecią wypustek łączących je ze sobą oraz z innymi komórkami wyściółki kostnej (osteoblastami), tworzą sieć połączeń, w pewnej mierze przypominającą dendryty neuronów.

Wbrew pozorom, kość jest tkanką plastyczną, zmieniającą swe kształty pod wpływem sił nacisku i naprężenia. Osteocyty reagują na mechaniczne działanie sił nacisku za pośrednictwem płynu okołokomórkowego jamek i kanałków, którego ciśnienie hydrostatyczne zmienia się proporcjonalnie do obciążenia ko-

BACKGROUND

Osteocytes are terminally differentiated cells comprising 90-95% of all bone cells. They form a highly complex communication network reminiscent of the neural network in the brain. They are identified on the basis of their location, as cells buried in mineralized bone matrix. This location impedes their isolation and examination of their function. Accordingly, osteocytes were long considered as resting or dormant cells with undefined function, although electron microscopic investigation revealed various phases of the life of osteocytes, from formative osteoblasts through osteocytic, osteolytic to degenerative, and their function was speculated about on the basis of their morphology and their surroundings [1].

Recently, mRNA was extracted and the expression of genes was identified in isolated osteocytes from skull bones of neonatal mice and from long bones of adult animals [2].

Osteocyte tissue culture was a milestone in understanding osteocyte biology and their central regulatory function in bone modeling [3-8].

Though confined to osteocytic lacunae, entombed in mineralized matrix, osteocytes form a network of cells connected with other osteocytes and with osteoblasts through cytoplasmic processes running in the bone canaliculi. The contact between osteocytic processes is provided by a gap junction or nexus, transmembrane canals which enable the transportation between the cells of ions and metabolic products. The protein which forms these canals, connexin 43 (Cx43), is transferred from cytoplasm to the cell membrane under the influence of hydrostatic pressure of the fluid surrounding osteocyte processes, thus facilitating the communicatory function of this junction [9,10]. Lack of Cx43 expression is a signal for osteocytes to enter apoptosis – the “suicide” of a cell [11,12].

The osteocytes and their processes are surrounded by tissue fluid, through which nutrients and metabolic products are transmitted. Thanks to such an arrangement of cells and their processes, a dendritic network forms.

Bone is a tissue which changes its shape and mass in response to mechanical strain and stress forces. Osteocytes respond to these forces through the pericellular fluid, whose hydrostatic pressure varies in proportion to the loading on bone. Osteocytes convert changes in hydrostatic pressure into signals transmitted to the other cells, – osteocytes and osteoblasts, leading in consequence to bone remodeling. Mechanically stimulated osteocytes secrete as yet unidentified factors which regulate mesenchymal stem cell and osteoblast recruitment, proliferation and osteo-

ści. Osteocyty, za pośrednictwem zmian ciśnienia hydrostatycznego, przekształcają zmiany w naprężeniu kości w sygnały docierające do sąsiednich osteocytów oraz osteoblastów, prowadzące w konsekwencji do przebudowy kości [13].

Przenoszenie do osteocytów informacji o zmianach naprężeń kości odbywa się prawdopodobnie również za pośrednictwem kontaktu wypustek osteocytarnych z kolagenem macierzy. Wypustki te przylegają periodycznie do ścian kanalików, które faliste wpuklają się w kierunku wypustek. W miejscach tych wpukleń macierzy, wypustki osteocytów kontaktują się z kolagenem macierzy za pośrednictwem integrzyn [14]. W ten sposób osteocyty otrzymują bezpośrednio z macierzy kostnej informacje o mechanicznych zmianach w kości.

Osteocyty wysyłają wielorakie sygnały w odpowiedzi na obciążenia mechaniczne kości. Są to sygnały aktywujące resorpcję kości za pośrednictwem osteoklastów i samych osteocytów lub aktywujących osteogenezę za pośrednictwem osteoblastów. Sygnały te są zarówno drobnocząsteczkowe (tlenek azotu NO, nukleotydy, prostaglandyny), jak i makrocząsteczkowe – insulinopodobny czynnik wzrostu IGF czy sklerostyna [5,15-21]. NO oraz IGF są regulatorami anabolizmu kości [22], natomiast sklerostyna jest silnym inhibitorem osteoblastów, hamuje w nich ścieżkę sygnałową Wnt, stanowiącą główny szlak ich aktywacji [22].

Izolowane osteocyty, niepoddane działaniu sił mechanicznych, zwiększając ekspresję genu SOST odpowiedzialnego za produkcję sklerostyny (silnego inhibitora sygnałowej ścieżki Wnt, głównego szlaku aktywacji osteoblastów), wzmagają produkcję sklerostyny oraz ligandu dla receptora RANK (Receptor aktywujący jądrowy czynnik kappa B; ang. Receptor Activator of Nuclear factor kappa B). Receptory RANK znajdują się na powierzchni komórek linii osteoklastycznej i uaktywnione po przyłączeniu liganda RANKL pobudzają osteoklastogenezę i funkcję resorpcyjną osteoklastów [8].

Istnienie związku pomiędzy gęstością osteocytów w osteopetrotycznych częściach kości pacjentów poddawanych obciążeniu a wbudowywaniem strontu – 85 wykazał Koshino [23]. Osteosklerotyczna część kości nasad zawierała pięciokrotnie więcej osteocytów niż w obszarach kości mniej sklerotycznej i wykazywała większą aktywność wbudowywania izotopu. Przemawia to za reakcją osteocytów na sygnały mechaniczne środowiska.

Osteocyty nie są jedynie komórkami mechanoreceptorowymi, ale pełnią istotne funkcje w procesie przebudowy kości i regulacji gospodarki fosforanowej [24].

Osteocyty posiadają receptory dla parahormonu (PTH) [25]. Hormon ten hamuje w osteocytach eks-

genesis [13].

The transmission of information from bone strain and shear stress forces could be also triggered through direct contact of osteocytes processes with the bone matrix collagen. Osteocyte cell processes are attached to their canalicular boundaries which periodically protrude into the pericellular space. The pericellular space is periodically interrupted by underlying collagen fibers to which cell process membranes are attached via integrin molecules [14]. In this way, osteocyte receives mechanical information directly from the osteocyte matrix.

In response to the strain and stress forces, osteocytes dispatch several messages to osteoclasts for bone resorption, or to osteoblasts for bone formation. These signals are varied; small molecules as nitric oxide (NO), nucleotides, prostaglandins or macromolecules, such as insulin-like growth factor IGF and sclerostin [5,15-21]. NO and IGF are signals for bone anabolism, whereas sclerostin is a powerful inhibitor of osteoblast activity [22].

Sclerostin inhibits Wnt signaling, the main pathway of osteoblast activation. In mechanical unloading of osteocytes, the expression of SOST gene and its product – sclerostin, likewise ligand for receptor RANK (Receptor Activator of Nuclear factor kappa B) are increased. As sclerostin is a potent Wnt inhibitor, thus the unloaded, disused bone osteocytes release the signal to quiet osteoblast activity [8].

The correlation between osteocyte density and strontium-85 turn-over in rheumatoid arthritis, reported by Koshino [23], is also a manifestation of an osteocyte response to a mechanical change in its environment. The population density of the osteosclerotic portion of condyles with a high loading of weight-bearing force was up to five times that of the less osteosclerotic one; thus the population of osteocytes was higher in osteosclerotic bone.

Osteocytes are not merely mechanoreceptors cells. They transmit messages to bone forming and bone resorbing cells, as well as being regulators of bone homeostasis and phosphate metabolism [24].

Osteocytes have receptors for parathyroid hormone (PTH) [25]. In osteocytes, parathyroid hormone blocks the expression of sclerostin; thus these cells are now considered as the main regulator of bone homeostasis and osteocytes are the target for PTH. Parathyroid hormone, by inhibition of sclerostin expression, indirectly activates osteoclastic bone resorption.

presję sklerostyny, inhibitora aktywności osteoblastów, stanowiąc główny regulator homeostazy kości. Obecnie przyjmuje się, że to osteocyty są głównym celem działania parahormonu. Tak więc główny regulator homeostazy kości – PTH, hamując wydzielenie przez osteocyty sklerostyny, zezwala osteoblastom na podejmowanie anabolizmu kości i przeciwdziałania uwalnianiu z macierzy kości jonów wapnia.

REGULACJA OSTEOKLASTYCZNEJ RESORPCJI KOŚCI PRZEZ OSTEOCYTY

Sygnalem dla resorpcji kości przez osteoklasty jest apoptoza osteocytów [26]. Związek apoptozy tych komórek z rekrutacją osteoklastów po raz pierwszy opisał Aquire i wsp. [27]. Ten proces samobójczej śmierci osteocytów poprzedza lokalną aktywację osteoklastów [28].

Obciążenia mechaniczne kości powodują mikrourazy, a te prowadzą do apoptozy osteocytów. W osteocytach sąsiadujących z osteocytami apoptotycznymi dochodzi do rozregulowania produkcji sygnałów proosteoklastycznych, np. ligandu dla receptora RANK (RANKL).

Najnowsze badania wskazują, że osteocyty stanowią podstawowe źródło ligandu dla receptora RANK, głównej cytokiny regulującej osteoklastogenezę [29], a tym samym regulującej za pośrednictwem osteoklastów resorpcję kości [30]. Degradacja RANKL prowadzi do osteopetrozy, a działanie sił naprężeniowych hamuje produkcję przez osteocyty sklerostyny, inhibitora aktywności osteoblastów [31]. Śmierć osteocytów, będąca następstwem zaburzeń dyfuzji i procesów metabolicznych prowadzi do mikropetrozy, tj. mineralizacji w obrębie jamek osteocytarnych i kanałków kostnych [32,33].

Zdrowe osteocyty, pobudzane sygnałami wysyłanymi z osteocytów apoptotycznych, wzmagają ekspresję RANKL. Prowadzi to do rekrutacji osteoklastów, resorbujących zarówno apoptotyczne osteocyty, jak i macierz kostną. Osteocyty leżące z dala od miejsca mikrourazu, sygnałów proosteoklastycznych (aktywujących osteoklastogenezę lub aktywujących osteoklasty) nie wysyłają. Mechanizmy przekazywania sygnałów z osteocytów apoptotycznych do osteocytów zdrowych nie są poznane.

RESORPCJA KOŚCI PRZEZ OSTEOCYTY (OSTEOLIZA OSTEOCYTARNA)

Osteocyty mogą regulować bezpośrednio homeostazę wapnia, bez udziału osteoklastów. Powierzchnia

OSTEOCYTE REGULATION OF OSTEOCLASTIC BONE RESORPTION

Signals for osteoclastic bone resorption are generated by apoptotic osteocytes [26]. A connection of apoptotic osteocytes with the osteoclasts recruitment was postulated by Aquire et al. [27]. Local activation of osteoclasts is preceded by apoptosis of adjacent resident osteocytes [28]. Microcracks generated in regions of shear and stress forces are the signal for local osteocytes to enter apoptosis. The neighboring healthy osteocytes start to generate proosteoclastic signals, such as RANKL. According to recent data, osteocytes are the main source of the RANKL, the main cytokine which regulates osteoclastogenesis [29]. Thus osteocytes should be considered as a major regulator of bone resorption [30]. Degradation of RANKL is reported in osteopetrosis, and stress and shear forces inhibit production of sclerostin by osteoblasts [31]. Death of osteocytes, as a consequence of metabolism and/or diffusion disturbance leads to micropetrosis, a mineralization inside osteocyte lacunae and canaliculi [32,33].

Healthy osteocytes, activated by signals derived from apoptotic osteocytes, increase the expression of RANKL, which is followed by osteoclast recruitment. Osteoclasts resorb both apoptotic osteocytes and bone matrix. Osteocytes distant from the microinjury site send either proosteoclastogenic or osteoblast activating signals. The mechanism of signal transmission from apoptotic to healthy osteocytes is unknown.

OSTEOCYTE BONE RESORPTION (OSTEOCYTIC OSTEOLYSIS)

Osteocytes can directly regulate calcium homeostasis without osteoclastic involvement. Cell mem-

osteocytów i ich wypustek stanowi wielki teren wymiany jonów pomiędzy macierzą kostną a płynem otaczającym osteocyty i ich wypustki. Osteocyty posiadają takie same enzymy hydrolizujące, jak osteoklasty i wykazują ekspresję winianoopornej fosfatazy kwaśnej (TRAP, ang. Tartrate-resistant acid phosphatase), enzymu uznawanego za specyficzny dla osteoklastów [34, 35]. Inni autorzy jednak nie wykazali ekspresji genów dla winianoopornej kwaśnej fosfatazy w osteocytach kości szczurów poddanej obciążeniu [36].

Pod wpływem parathormonu (PTH), dla którego osteocyty posiadają receptory, osteocyty usuwają zmineralizowaną macierz kostną według mechanizmu stosowanego przez osteoklasty [34]. Osteocyty, choć niezdolne do syntezy kolagenu, mogą syntetyzować inne, niekolagenowe składniki macierzy organicznej kości, związane z procesami mineralizacji osteoidu – osteopontynę i osteokalcynę, glikoproteiny wiążące wapń oraz białka hamujące mineralizację [37]. Takie białka wydzielane są do płynu okołokomórkowego i za ich pośrednictwem osteocyty mogą regulować zawartość jonów wapnia, łatwo dostępnych w płynie okołokomórkowym.

Regulacja aktywności osteoklastów przez osteocyty może mieć także inny niż pobudzenie, aspekt. Z osteocytów kurcząt wyizolowano bowiem białko, które hamowało resorpcję osteoklastyczną, a wprowadzone do cytoplazmy osteoklastów powodowało u nich zanik podosomów, morfologicznego wyrazu aktywności resorpcyjnej tych komórek [38].

UDZIAŁ OSTEOCYTÓW W REGULOWANIU GOSPODARKI FOSFOREM

Osteocyty produkują endopeptydazę, enzym regulujący poziom fosforu za pośrednictwem cytokiny FGF23 (Czynnik wzrostu fibroblastów), hamującej reabsorpcję fosforu w kanalikach nerkowych, co powoduje ucieczkę tych jonów i prowadzi do hypofosfatemii. W hypofosfatemicznej postaci krzywicy poziom FGF23 surowicy jest podwyższony [39].

Różne postaci krzywicy hypofosfatemicznej są wynikiem mutacji lub deregulacji genu FGF23, głównego czynnika osteocytów odpowiedzialnego za utratę fosforanu przez nerki [40]. Natomiast dieta bogato-fosforanowa powoduje spadek poziomu FGF23 w surowicy i spadek masy kostnej, skorelowane ze wzrostem ekspresji genu dla sklerostyny, która jest inhibitorem aktywności osteoblastów [41].

HODOWLE OSTEOCYTÓW *IN VITRO*

Do niedawna jedyną dostępną ustaloną linią mysich komórek o cechach osteocytów była mysia linia

branes of osteocytes and their processes provide a large surface for ion exchange between bone matrix and the fluid which fills lacunae and canaliculi. Osteocytes are armed with the same hydrolytic enzymes as are osteoclasts, and express tartrate-resistant acid phosphatase, an enzyme considered specific for osteoclasts [34,35]. Some authors, however, were unable to detect this enzyme in osteocytes from bone subjected to mechanical loading [36].

Under the influence of parathormone, osteocytes remove the mineralized bone matrix by the same mechanism as used by osteoclasts [34]. Although unable to synthesize collagen type I, osteocytes can synthesize other macromolecular components of osteoid, which are involved in the mineralization process – osteopontin and osteocalcin, glycoproteins engaged in calcium binding as well as mineralization inhibiting proteins [37]. These proteins are secreted into the pericellular fluid and through its mediation can regulate ion concentrations.

Osteocytes, as well as having the ability to activate osteoclasts, appear to have the potential for the exact opposite, namely osteoclast inhibition. Thus, Maejima-Ikeda et al. [38] reported that a chicken osteocyte-derived protein inhibits osteoclastic bone resorption and the activity of isolated osteoclasts. This protein, when injected into the cytoplasm of osteoclasts, caused a disruption of podosomes, the future ruffled border.

INVOLVEMENT OF OSTEOCYTES IN PHOSPHATE METABOLISM

Osteocytes produce endopeptidase, an enzyme which regulates phosphate level through the action of cytokine FGF23 (Fibroblast growth factor 23). This cytokine inhibits reabsorption of phosphate in kidney tubules, which leads to the loss of this ion and to hypophosphatemia. Degradation of the FGF23 by endopeptidase facilitates reabsorption of phosphate. In the hypophosphatemic form of rickets, the level of FGF23 in the serum is elevated [39]. Various forms of heritable hypophosphatemic rickets and osteomalacia resulted from mutation of FGF23 gene [40]. Phosphate-rich diet results in depletion of FGF23 serum level, associated with loss of bone and an increase of sclerostin gene expression [41]. Sclerostin, as was said, strongly inhibits osteoblast activity.

OSTEOCYTE CELL CULTURES

Until recently the only available established cell line with characteristics of the osteocyte was murine

MLO-Y4 [3]. Podejmowano liczne próby otrzymania pierwotnych linii osteocytarnych z hodowli osteoblastów. Z unieśmiertelnionych przez wprowadzenie genomu adenowirusa do ludzkich komórek osteoblastycznych, Bodine i wsp. uzyskali linię komórkową o fenotypie i morfologicznych cechach preosteoblastów – HOB-01-C1 [42]. Komórki te odpowiadały zarówno na hormony kalcitropowe (PTH, witamina D), jak i na cytokiny aktywujące resorpcję kości – IL-1 β i TNF- α .

Ostatnio opisano nowy, prosty sposób generowania *in vitro* komórek o cechach morfologicznych i biologicznych osteocytów z pierwotnie izolowanych osteoblastów lub z ustalonej mysiej linii osteoblastycznej MC3T3-E1 po poddaniu ich działaniu kwasu retinowego. W ciągu ok. 10 dni hodowli osteoblasty stawały się komórkami dendrytycznymi, traciły zdolność syntezy elementów macierzy kostnej, ekspresję markerów osteoblastycznych, a nabywały ekspresji markerów osteocytarnych, zwłaszcza sklerostyny [4].

Hodowle komórek MC3T3 w żelu kolagenowym skutkowały stopniowym różnicowaniem się osteoblastów w osteocyty, mineralizacją i wytwarzaniem struktur przypominających jamki i kanaliki kostne [43].

Różnicowanie ludzkich komórek osteoblastycznych ustalonej linii wyprowadzonej z mięsaka kości (SaOS2) w osteocyty, w warunkach hodowli sprzyjającej mineralizacji, opisali ostatnio Prideaux i wsp. [44]. Tak otrzymane osteocyty stanowią łatwo dostępne źródło do badań odpowiedzi osteocytów na czynniki osteotropowe, jednak należy mieć na uwadze, że ich prekursorami są komórki nowotworowe.

PRAKTYCZNE ZASTOSOWANIE WIEDZY O BIOLOGII OSTEOCYTÓW

Poznanie sekrecyjnej roli osteocytów w regulowaniu metabolizmu kości za pośrednictwem RANKL i sklerostyny, otworzyło nowe perspektywy leczenia osteoporozy oraz osteopenii z długotrwałego unieruchomienia. Uzyskano monoklonalne przeciwciała przeciwko ligandowi dla receptora RANK – Denosumab oraz dla sklerostyny – Scl-Ab i Romosozumab. Wprowadzone do organizmu przeciwciała te hamują resorpcję kości i pobudzają osteogenezę. Przeciwciała monoklonalne przeciw sklerostynie zapobiegają utracie masy kostnej w wyniku uszkodzenia neuronów ruchowych rdzenia kręgowego u szczurów [45].

Denosumab blokuje łączenie ligandu RANKL z receptorem RANK obecnym na osteoklastach i ich prekursorowych formach, co skutkuje zahamowaniem ich liczebności i aktywności, hamując w konsekwencji resorpcję kości.

line MLO-Y4, obtained by Kato et al. [3]. Several authors failed in attempts to obtain primary osteocyte cultures from osteoblasts cell cultures.

Bodine et al. described the establishment of human preosteocytic cell line HOB-01-C1 from adult bone cells immortalized by an adenovirus vector [42]. This cell line has a phenotype consistent with the preosteocyte, such as finger-like cellular processes that formed gap junctions, a low expression of alkaline phosphatase and a response to vitamin D and bone-resorbing cytokines – IL - 1 β i TNF- α .

A new, simple procedure to generate cells with the osteocyte phenotype from primary isolated osteoblasts or from the established murine osteoblastic cell line 3T3-E1 by the addition of retinoic acid to the culture medium was reported by Mattizoli et al. [4]. Within ten days of culture osteoblasts became dendritic cells, lost the ability to synthesize bone matrix molecules and acquired the expression of osteocyte-specific markers, especially of sclerostin.

Uchihashi et al. established a culture model generating osteocytes from an MC3T3-E1 murine osteoblastic cell line using collagen type I gel [43]. MC2T3-E1 cells differentiated to osteocytic cells with lacunae and canaliculi-like structures in osteoid mineralization front.

The differentiation of established human osteoblastic cells SaOS2 of osteosarcoma origin into cells with the osteocyte phenotype was also recently reported by Prideaux et al [44]. Such cells could be an easy source of cells for examination of osteocyte response to osteotropic agents; however, it should be kept in mind that their precursors are neoplastic cells.

PRACTICAL APPLICATION OF OSTEOCYTE BIOLOGY KNOWLEDGE

Elucidation of secretory function of osteocytes in regulation of bone metabolism mediated by RANKL opened a new approach in therapy of menopausal osteoporosis and of immobilization osteopenia.

Monoclonal antibodies against the RANKL (Denosumab) and against sclerostin (Scl-Ab or Romosozumab) were recently generated. These antibodies are effective as inhibitors of bone resorption and activators of bone formation. Sclerostin antibodies were effective in prevention of bone loss developed following spinal motor neuron damage in rats [45]. Denosumab blocks the binding of RANKL to the RANK receptor. This receptor is expressed on the surface of osteoclasts and their precursor cells. This blocks osteoclastogenesis and the activity of osteoclasts, impairing bone resorption.

Denosumab jest lekiem z wyboru u pacjentek z osteoporozą postmenopauzalną o wysokim ryzyku złamań [46- 48].

PODSUMOWANIE

Najliczniejsze komórki kości – osteocyty, powszechnie dotychczas uznawane za metabolicznie nieaktywne i pełniące funkcje receptorów zmian naprężeniowych kości, okazują się w świetle najnowszych badań istotnymi elementami regulacji przebudowy kości za pośrednictwem wydzielania czynników regulujących aktywność osteoblastów i osteoklastów. Wykazano, że osteocyty są komórkami docelowymi dla parathormonu oraz stanowią główne źródło dla cytokiny RANKL, regulującej osteoklastogenezę, a ponadto są głównym producentem sklerostyny – białka hamującego w osteoblastach szlak Wnt. Szlak ten odpowiedzialny jest za aktywację osteoblastów, a jego hamowanie osłabia zdolności kościotwórcze osteoblastów. Zmiany naprężeniowe kości prowadzą do samobójczej śmierci – apoptozy osteocytów, a apoptotyczne osteocyty stanowią sygnał dla aktywizacji komórek kościogubnych – osteoklastów.

Zrozumienie roli osteocytów w przebudowywaniu kości pozwala na leczenie osteoporozy przez stosowanie przeciwciał skierowanych przeciwko RANKL, co skutkuje obniżeniem aktywności osteoklastów, lub skierowanych przeciwko sklerostynie, co znosi jej hamujący wpływ na osteoblasty.

Denosumab is a drug of choice in the treatment of patients at high risk of fracture in postmenopausal osteoporosis [46-48].

CONCLUSION

The most numerous bone cells – osteocytes – previously recognized as metabolically dormant and considered mainly as mechanoreceptor cells, turn out, in the light of recent data, to be active secretory cells engaged in regulation of bone modeling through secretion of molecules regulating the activity of bone resorbing and bone forming cells – osteoclasts and osteoblasts, respectively. Recent data indicate osteocytes as a target for parathormone (PTH) and the main source of the RANK ligand cytokine – the main regulator of osteoclastogenesis. Another important function of osteocytes is secretion of sclerostin, the inhibitor of WNT-signaling in osteoblasts. Wnt signaling is the main pathway in activation of bone-forming cells; thus inactivation of Wnt reduces osteoblast activity. In response to stress and shear forces, leading to microdamage to the canalicular system, osteocytes enter apoptosis – the process of self-destruction – and become a signal for the activation of osteoclasts. An understanding of the role of osteocytes in bone modeling through production of agents mediating osteoclast and osteoblast activity (RANKL, sclerostin) has enabled medicinal use of monoclonal antibodies targeting these molecules and, in consequence, modulation of the activity of these cells.

PIŚMIENNICTWO/ REFERENCES

1. Bonucci E. The ultrastructure of osteocyte. In: Bonucci E, Motta PM, editors. Ultrastructure of skeletal tissues. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1990. p. 223-37.
2. Halleux C, Kramer I, Allard C, Kneissel M. Isolation of mouse osteocytes using cell fractionation for gene expression analysis. *Methods Mol Biol* 2012; 816: 55-66.
3. Kato Y, Windle JJ, Koop BA, Mundy GR, Bonewald LE. Establishment of an osteocyte-like cell line MLO-Y4. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 2014-23.
4. Mattizoli D, et al. A novel model of in vitro osteocytogenesis induced by retinoic acid treatment. *Eur Cell Mater* 2012; 24: 403-25.
5. Ajubi NE, Klein-Nulend J, Nijweide T, Vryheid-Lammes T, Alblas MJ, Burger EH. Pulsating fluid flow increases prostaglandin production by cultured chicken osteocytes – a cytoskeleton-dependent process. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 225: 62-8.
6. Schaffler MB, Kennedy OD. Osteocytes signaling in bone. *Current Osteoporos Rep* 2012; 10: 118-25.
7. Schaffler MB, Cheung WY, Majeska R, Kennedy O. Osteocytes – master orchestrators of bone. *Calcif Tissue Int* 2014; 94: 5-24.
8. Spatz JM, Wein MN, Gooi JH, et al. The Wnt Inhibitor Sclerostin Is Up-regulated by Mechanical Unloading in Osteocytes in Vitro. *J Biol Chem* 2015; 290: 16744-58.
9. Yellowley CE, Li Z, Zhou Z, Jacobs CR, Donahue HJ. Functional gap junctions between osteocytic and osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 209-17.
10. Cheng B, Zhao S, Luo J, Sprague E, Bonewald LF, Jiang JX. Expression of functional gap junctions and regulation by fluid flow in osteocyte-like MLO-Y4 cells. *J Bone Mine Res* 2001; 16: 249-59.
11. Bivi N, et al. Cell autonomous requirement of Connexin 43 for osteocyte survival: consequences for endocortical resorption and periosteal bone formation. *J Bone Miner Res* 2012; 27: 374-89.
12. Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Transduction of cell survival signals by connexin 43 hemichannels. *J Biol Chem* 2002; 277: 8648-57.
13. Turner CH, Forwood MR, Otter MK. Mechanotransduction in bone: do bone cells act as sensors of fluid flow? *FASEB J* 1994; 8: 875-8.

14. McNamara LM, Majeska RJ, Weinbaum S, Friedrich V, Schaffler MB. Attachment of osteocyte cell processes to the bone matrix. *Anat Rec (Hoboken)* 2009; 292: 355-63.
15. Klein-Nulend J, Semeins CM, Ajubi NE, Nijweide PJ, Burger EM. Pulsating fluid flow increases nitric oxide (NO) synthesis by osteocytes but not periosteal fibroblasts – correlation with prostaglandin upregulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 217: 640-8.
16. Zaman G et al. Mechanical strain stimulates nitric oxide production by rapid activation of endothelial nitric oxide synthase in osteocytes. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1123-31.
17. Rodan GA, Bourret LA, Harvey A, Mensi T. Cyclic AMP and cyclic GMP: mediators of the mechanical effects on bone remodeling. *Science* 1975; 189: 467-9.
18. Ajubi NE, Klein-Nulend J, Alblas MJ, Burger EH, Nijweide PJ. Signal transduction pathways involved in fluid flow-induced PGE2 production by cultured osteocytes. *Am J Physiol* 1999; 276: E171-8.
19. Lean JM, Jagger CJ, Chambers TJ, Chow JU. Increased insulin-like growth factor I mRNA expression in rat osteocytes in response to mechanical stimulation. *Am J Physiol* 1995; 268: E318-27.
20. Lean JM, Mackay AG, Chow JW, Chambers TJ. Osteocytic expression of mRNA for c-fos and IGF I – an immediate early gene response to an osteogenic stimulus. *Am J Physiol* 1996; 270: E937-45.
21. Włodarski K, Galus R, Brodzikowska A, Włodarski P. Sclerostin, an osteocytes-derived bone forming inhibitor. *Pol Orthop Traumatol* 2013; 78: 151-4.
22. Yakar S, et al. Circulation levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J. Clin. Invest.* 2002; 110: 771-81.
23. Koshino T. The significance of osteocytes in high mineral turn-over of subchondral bone in the scintigraphy of rheumatoid arthritis. *Yokohama Med Bull* 1981; 32: 129-40.
24. Rochefort GY, Benhamou CL. Osteocytes are not only mechanoreceptive cells. *Int J Numer Method Biomed Eng* 2013; 29: 1082-8.
25. Bellido T, Saini V, Pajevic PD. Effect of PTH on osteocyte function. *Bone* 2013; 54: 250-7.
26. Bellido T. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif Tissue Int* 2014; 94: 25-34.
27. Aguirre JJ, et al. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J. Bone Miner. Res.* 2006; 21: 605-615.
28. Cabahug PC, et al. Inhibition of osteocyte apoptosis prevents trabecular bone loss after unloading of mouse long bone. *Orthop Res Soc* 2013. San Antonio.
29. Włodarski K, Włodarski P. Fuzja prekursorów osteoklastów oraz regulacja aktywności osteoklastów dojrzałych [The fusion of osteoclast precursors and mature osteoclast activity regulation]. *Post Biol Kom* 2006; 33: 273-84.
30. O'Brien CA, Nakashima T, Takayanagi H. Osteocytes control of osteoclastogenesis. *Bone* 2013; 54: 258-63.
31. Sakai A. Space flight/bedrest immobilization and bone. Osteocytes as a sensor for mechanical stress and Wnt signal. *Clin Calcium* 2012; 22: 1829-35.
32. Usui Y, Kawai K, Hirohata K. An electron microscopic study of the changes observed in osteocytes under ischemic conditions. *J Orthop Res* 1989; 7: 12-21.
33. Frost HM. In vivo osteocyte death. *J Bone Joint Surg* 1960; 42-A: 138-43.
34. Qing H, et al. Demonstration of osteocytic perilacunar/canalicular remodeling in mice during lactation. *J Bone Miner Res* 2012; 27: 1018-29.
35. Solberg LB, Brorson SH, Stordalen GA, Bækkevold ES, Andersson G, Reinholt FP. Increased tartrate-resistant acid phosphatase expression in osteoblasts and osteocytes in experimental osteoporosis in rats. *Calcif Tissue Int* 2014; 94: 510-21.
36. Mason DJ, Hillam RA, Skerry TM. Constitutive in vivo mRNA expression by osteocytes of beta-actin, osteocalcin, connexin-43, IGF-1, c-fos and c-jun, but not TNF-alpha nor tartrate-resistant acid phosphatase. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 350-7.
37. Aarden EM, Wassenaar AM, Alblas MJ, Nijweide PJ. Immunocytochemical demonstration of extracellular matrix proteins in isolated osteocytes. *Histochem Cell Biol* 1996; 106: 495-501.
38. Maejima-Ikeda A, et al. Chick osteocyte-derived protein inhibits osteoclastic bone resorption. *Biochem J* 1997; 322: 245-50.
39. Liu S, Zhou J, Tang W, Jiang X, Row DW, Quarles LD. Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291: E38-49.
40. Feng JQ, Clinkenbeard EL, Yuan B, White KE, Drezner MK. Osteocyte regulation of phosphate homeostasis and bone mineralization underlies the pathophysiology of the heritable disorders of rickets and osteomalacia. *Bone* 2013; 54: 213-21.
41. Ferreira JC, Ferrari GO, Neves KR, et al. Effects of dietary phosphate on adynamic bone disease in rats with chronic kidney disease—role of sclerostin? *PLoS One* 2013; 8: e79721.
42. Bodine PV, Vernon SK, Komm BS. Establishment of hormonal regulation of conditionally transformed preosteoblastic cell line from adult human bone. *Endocrinology* 1996; 137: 4592-604.
43. Uchihashi K, Aoki S, Matsunobu A, Toda S. Osteoblast migration into type I collagen gel and differentiation to osteocyte-like cells within a self-produced mineralized matrix: A novel system for analyzing differentiation from osteoblast to osteocyte. *Bone* 2013; 52: 102-10.
44. Prideaux M, et al. SaOS2 osteosarcoma cells as an in vitro model for studying the transition of human osteoblasts to osteocytes. *Calcif Tissue Int* 2014; 95: 183-93.
45. Qin W, Li X, Peng Y, et al. Sclerostin antibody preserves the morphology and structure of osteocytes and blocks the severe skeletal deterioration after motor-complete spinal cord injury in rats. *J Bone Miner Res* 2015 May 12. doi: 10.1002/jbmr.2549. [Epub ahead of print]
46. Min YK. Update on denosumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis. *Endocrinol Metab (Seoul)* 2015; 30: 19-26.

47. Scott LJ. Denosumab: a review of its use in postmenopausal women with osteoporosis. *Drugs Aging* 2014; 31: 555-76.
48. Makras P, Delaroudis S, Anastasilakis AD. Novel therapies for osteoporosis. *Metabolism* 2015 Jul 21. pii: S0026-0495(15)00191-2.

Podziękowania: Dziękujemy dr Wyn Parry z Uniwersytetu w Liverpool za konstruktywną korektę i stylistyczne poprawki mansukryptu

Acknowledgements: We thank Dr. Wyn Parry from Liverpool University for critical reading of the manuscript and stylistic amendments to the text.

Liczba słów/Word count: 4959

Tabele/Tables: 0

Ryciny/Figures: 0

Piśmiennictwo/References: 48

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Krzysztof H. Włodarski

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii WUM, ul. Chalubińskiego 5

02-004 Warszawa, Poland, tel./fax: 22 629-52-82; e-mail: krzysztof.wlodarski@wum.edu.pl

Otrzymano / Received

13.06.2015 r.

Zaakceptowano / Accepted

16.11.2015 r.