

# Karakterizacija reakcije osteoklastnih progenitora i pojačane osteoresorpcije u mišjem modelu reumatoidnoga artritisa

---

Flegar, Darja

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:840589>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-03**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Darja Flegar**

**Karakterizacija reakcije osteoklastnih  
progenitora i pojačane osteoresorpcije  
u mišjem modelu reumatoidnoga  
artritisa**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2018.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Darja Flegar**

**Karakterizacija reakcije osteoklastnih  
progenitora i pojačane osteoresorpcije  
u mišjem modelu reumatoidnoga  
artritisa**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2018.**

Disertacija je izrađena u Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u Laboratoriju za molekularnu imunologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga.

Pokusi u sklopu ovog istraživanja omogućeni su sredstvima projekta Hrvatske zaklade za znanost (voditelj prof. dr. sc. Danka Grčević).

Voditelj rada: prof. dr. sc. Danka Grčević

Zahvaljujem prof. dr. sc. Danki Grčević na mentorstvu, poučavanju, savjetima, pomoći i strpljenju kod izrade i pisanja ovog rada. Zahvaljujem i svim članovima istraživačke grupe na pruženoj pomoći tijekom izvođenja pokusa, poučavanju radu u laboratoriju, strpljenju i podršci.

# SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Osteoimunologija.....	2
1.1.1. Osteoklasti i osteoblasti .....	3
1.1.2. Imunosne stanice.....	4
1.2. Gubitak kosti posredovan upalom .....	6
1.2.1. Sustavni gubitak kosti .....	6
1.2.2. Lokalni gubitak kosti .....	6
1.3. Reumatoidni artritis .....	9
1.3.1. Klinička slika .....	9
1.3.2. Teorije o etiopatogenezi bolesti .....	10
1.3.3. Farmakoterapija .....	12
1.3.4. Životinjski modeli reumatoidnoga artritisa.....	13
1.3.5. Artritis potaknut kolagenom .....	15
1.4. Osteoklastni progenitori .....	19
1.4.1. Hematopoetsko podrijetlo .....	19
1.4.2. Sposobnost migracije .....	20
2. Hipoteza .....	24
3. Ciljevi rada .....	25
4. Materijali i metode .....	26
4.1. Plan istraživanja.....	26
4.2. Pokusne životinje.....	28
4.3. Izazivanje artritisa potaknutog kolagenom i kliničko praćenje .....	29
4.4. Imunoenzimsko određivanje anti-kolagenskih protutijela, kemokina i kolagenskog telopeptida u serumu.....	31
4.5. Priprema jednostaničnih suspenzija iz uzoraka tkiva .....	32
4.6. <i>In vivo</i> fluorescentno oslikavanje .....	33
4.7. Mikrokompjutorizirana tomografija .....	34
4.8. Histološka i histomorfometrijska analiza .....	35

4.9. Analiza izražaja gena metodom qPCR .....	37
4.10. Protočna citometrija i razvrstavanje stanica .....	39
4.11. Mjerenje koncentracije citokina i kemokina u serumu metodom multipleks imunoeseja i protočnom citometrijom .....	41
4.12. Stanična kultura osteoklasta i kultivacija na koštanim pločicama .....	42
4.13. <i>In vitro</i> migracijski test prema citokinskom gradijentu .....	43
4.14. <i>In vitro</i> proliferacijski test .....	43
4.15. Primjena male interferirajuće RNA .....	44
4.16. <i>In vivo</i> intravaskularno označavanje i <i>in vivo</i> praćenje migracije stanica .....	45
4.17. Statistička analiza .....	46
5. Rezultati .....	47
5.1. Procjena razvoja artritisa potaknutog kolagenom i osteoresorpcije .....	47
5.1.1. Praćenje i vizualno bodovanje znakova artritisa .....	47
5.1.2. Serološki pokazatelji uspješne imunizacije i pojačane osteoresorpcije .....	48
5.1.3. Procjena osteoresorpcije mjerenjem aktivnosti osteoklasta u artritisu .....	51
5.1.4. Procjena oštećenja i gubitka kosti mikrokomputoriziranom tomografijom .....	51
5.1.5. Patohistološki nalaz u artritisu potaknutom kolagenom .....	56
5.2. Stanične populacije mijeloidne loze i subpopulacije osteoklastnih progenitora u artritisu potaknutom kolagenom .....	59
5.2.1. Povećan udio subpopulacija osteoklastnih progenitora u artritisu .....	61
5.2.2. Ekspanzija progenitorskih stanica mijeloidne loze u artritisu .....	64
5.2.3. Pojačano sazrijevanje populacije zrelih mijeloidnih loza u artritisu .....	67
5.3. Učinak kemokinskih signala na migraciju i diferencijaciju osteoklastnih progenitora u artritisu potaknutom kolagenom .....	69
5.3.1. Profil kemokinskih receptora na stanicama osteoklastnih progenitora u artritisu ..	69
5.3.2. Osteoklastogeni potencijal osteoklastnih progenitora CCR2 <sup>+</sup> i CX3CR1 <sup>+</sup> .....	73
5.4. Upalni okoliš u perifernim i lokalnim tkivima zahvaćenim artritisom .....	78
5.4.1. Promjene udjela imunskih populacija u artritisu .....	78
5.4.2. Citokinski i kemokinski okoliš u artritisu .....	80
5.5. Kemotaktični učinak kemokina CCL2 i CX3CL1 na migraciju osteoklastnih progenitora u artritisu potaknutom kolagenom .....	83
5.5.1. <i>In vivo</i> praćenje cirkulacije i migracije osteoklastnih progenitora u artritisu .....	83
5.5.2. <i>In vitro</i> učinak utišavanja gena za CCR2 i CX3CR1 na migracijsku sposobnost osteoklastnih progenitora u artritisu .....	86

6. Rasprava .....	90
6.1. Gubitak kosti izazvan kroničnom upalom .....	90
6.2. Značajke artritisa izazvanog kolagenom .....	91
6.3. Osteitis u periartikularnoj koštanoj srži .....	92
6.4. Poticanje stanica mijeloidne loze koja uključuje osteoklastne progenitore .....	93
6.5. Učinak kemokinskih signala na osteoklastne progenitore .....	97
6.6. Stanični mikrookoliš i koncentracija kemokina u artritisu .....	99
6.7. Osteoklastogeni potencijal osteoklastnih progenitora CCR2 <sup>+</sup> .....	100
6.8. Učinak utišavanja receptora CCR2 na migracijski potencijal osteoklastnih progenitora .....	101
7. Zaključci .....	103
8. Sažetak .....	105
9. Summary .....	106
10. Popis literature .....	107
11. Životopis .....	121

## POPIS KRATICA

ACPA – protutijela usmjerena na citrulinirane peptide, prema engl. *anti-citrullinated peptide antibodies*

ANOVA – analiza varijance, prema engl. *analysis of variance*

APC – alofikocijanin, prema engl. *allophycocyanine*

BMD – mineralna gustoća koštanog tkiva, prema engl. *bone mineral density*

BSA – goveđi serumski albumin, prema engl. *bovine serum albumin*

BV/TV – udio mineralizirane (kortikalne i trabekularne) kosti u ukupnom volumenu tkiva, prema engl. *Bone Volume/Total Volume; %*

CalcR – receptor za kalcitonin, prema engl. *calcitonin receptor*

CatK – katepsin K, prema engl. *cathepsin K*

CBA – citometrijska metoda za određivanje razine proteina, prema engl. *cytometric bead array*

CCL – kemokinski ligand s C-C motivom

CCR – receptor za C-C kemokin

CD – stanični biljeg, prema engl. *cluster of differentiation*

cDNA – komplementarna DNA, prema engl. *complementary DNA*

c-fms – receptor za čimbenik stimulacije kolonija makrofaga, CD115

CFSE – karboksifluorescein sukcinimidil ester, prema engl. *carboxyfluorescein succinimidyl ester*

CI – interval pouzdanosti, prema engl. *confidence interval*

CIA – artritis potaknut kolagenom, prema engl. *collagen induced arthritis*

CFA – kompletni Freundov adjuvans, prema engl. *complete Freund's adjuvant*

CMP – zajednički mijeloidni progenitor, prema engl. *common myeloid progenitor*

CPD – fluorescentna boja Cell Proliferation Dye eFluor 670



CTLA-4 – antigen citotoksičnih limfocita-4, prema engl. *cytotoxic T lymphocyte antigen-4*

ctrl – kontrola, prema engl. *control*

CTX-I – C-terminalni telopeptidi kolagena tipa I, prema engl. *carboxy-terminal collagen crosslinks*

CXCL – kemokinski ligand s C-X-C motivom

CXCR – receptor za C-X-C kemokin

Cy – cijanin, prema engl. *cyanine*

CII – pileći kolagen tip II, prema engl. *chicken collagen type II*

DAPI – 4',6-diaminidino-2-fenilindol, prema engl. *4',6-diaminidino-2-phenylindole*

DIP – distalni interfalangealni zglobovi, prema engl. *distal interphalangeal*

DMARD – antireumatski lijekovi koji modificiraju bolest, prema engl. *disease modifying antirheumatic drugs*

DNA – deoksiribunukleinska kiselina, prema engl. *deoxyribonucleic acid*

ELISA – kolorimetrijski imunoenzimski postupak, prema engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina, prema engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*

FACS – fluorescencijom aktivirano razvrstavanje stanica, prema engl. *fluorescence-activated cell sorting*

FBS – fetalni goveđi serum, prema engl. *fetal bovine serum*

FcR- $\gamma$  – Fc-receptor- $\gamma$

FITC – fluorescein izotiocijanat, prema engl. *fluorescein isothiocyanate*

FMO – kombinacija protutijela u kojima nedostaje fluorofor za koga se određuje prag pozitivnosti, prema engl. *fluorescence minus one*

FSC – prednji rasap, prema engl. *forward-scatter*

GMP – zajednički progenitor granulocita i makrofaga, prema engl. *granulocyte macrophage progenitor*

GMT – bojenje Goldner-Masson-trikrom

GWAS – studija cijelogenomske analize povezanosti, prema engl. *genome-wide association studies*

HE – bojenje hemalaun-eozin

HLA – ljudski leukocitni antigen, prema engl. *human leukocyte antigen*

HRP – hrenova peroksidaza, prema engl. *horseradish peroxidase*

HSC – hematopoetska matična stanica, prema engl. *hematopoietic stem cell*

IFA – inkompletni Freundov adjuvans, prema engl. *incomplete Freund's adjuvant*

IFN- $\gamma$  – interferon- $\gamma$

IgG – imunoglobulin G

IL – interleukin

IQR – interkvartilni raspon, prema engl. *interquartile range*

Ir.L.Th – prosječna udaljenost između 2 ocrtane linije, prema engl. *interlabel distance*;  $\mu\text{m}$

MCP – metakarpofalangealni zglob, prema engl. *metacarpophalangeal*

MCP-1 – monocitni kemotaktični protein-1, prema engl. *monocyte chemoattractant protein 1* (CCL2)

M-CSF – čimbenik stimulacije kolonija makrofaga, prema engl. *macrophage colony-stimulating factor*

MHC – glavni kompleks tkivne podudarnosti, prema engl. *major histocompatibility complex*

MIP-1- $\alpha$  – upalni protein 1- $\alpha$  makrofaga, prema engl. *macrophage inflammatory protein 1- $\alpha$*  (CCL3)

MIP-1- $\beta$  – upalni protein 1- $\beta$  makrofaga, prema engl. *macrophage inflammatory protein 1- $\beta$*  (CCL4)

MIP-1- $\gamma$  – upalni protein 1- $\gamma$  makrofaga, prema engl. *macrophage inflammatory peptide 1- $\gamma$*  (CCL9)

MMP – metaloproteinaza međustanične tvari, prema engl. *matrix metalloproteinase*

MRI – magnetska rezonancija

NF $\kappa$ B – jezgreni čimbenik  $\kappa$ B, prema engl. *nuclear factor  $\kappa$ B*

NFQ – hvatač fluorescencije, prema engl. *nonfluorescent quencher*

NSAID – nesteroidni protuupalni lijekovi, prema engl. *nonsteroid antiinflammatory drugs*

OCP – osteoklastni progenitor, prema engl. *osteoclast progenitor*

PBL – leukociti iz periferne krvi, prema engl. *peripheral blood leukocytes*

PBM – periartikularna (uz upaljeni zglob) koštana srž distalne tibije, prema engl. *periarticular bone marrow*

PBS – fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom, prema engl. *phosphate buffered saline*

PCR – lančana reakcija polimeraze, prema engl. *polymerase chain reaction*

PE – fikoeritrin, prema engl. *phycoerythrin*

PerCP – peridinin-klorofil, prema engl. *peridinin-chlorophyll*

PIP – proksimalni interfalangealni zglob, prema engl. *proximal interphalangeal*

qPCR – kvantitativni PCR, prema engl. *quantitative PCR*

RA – reumatoidni artritis

RANK – receptor aktivatora jezgrenog čimbenika  $\kappa$ B, prema engl. *receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B*

RANKL – ligand za RANK, prema engl. *receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand*

RANTES – protein reguliran aktivacijom, izražen i izlučivan iz limfocita T, prema engl. *regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted (CCL5)*

r<sub>cf</sub> – relativna centrifugalna sila (g), prema engl. *relative centrifugal force*

RF – reumatoidni faktor

rm – rekombinantni mišji, prema engl. *recombinant mouse*

RNA – ribonukleinska kiselina, prema engl. *ribonucleic acid*

ROI – regija od interesa, prema engl. *region of interest*

rpm – okretaja u minuti, prema engl. *revolutions per minute*

SBM – koštana srž femura (sustavna, udaljena od upaljenog zgloba), prema engl. *systemic bone marrow*

SD – standardna devijacija, prema engl. *standard deviation*

SDF-1 – čimbenik 1 stromalnih stanica, prema engl. *stromal cell-derived factor 1 (CXCL12)*

SSC – postranični rasap, prema engl. *side-scatter*

siRNA – mala interferirajuća RNA, prema engl. *small interfering RNA*

SPL – slezena, prema engl. *spleen*

TGF- $\beta$  – transformirajući čimbenik rasta  $\beta$ , prema engl. *transforming growth factor  $\beta$*

TMB – supstrat 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

TMT – tarzometatarsalni dio stražnje šape digestiran kolagenazom, prema engl. *tarsometatarsal tissue*

TNFR – TNF receptor

TNF- $\alpha$  – čimbenik nekroze tumora  $\alpha$ , prema engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$*

TRAF – čimbenik povezan s receptorima obitelji TNF, prema engl. *TNF receptor associated factor*

TRAP – kisela fosfataza otporna na tartarat, prema engl. *tartrate-resistant acid phosphatase*

VEGF – čimbenik rasta krvožilnog endotela, prema engl. *vascular endothelial growth factor*

$\alpha$ -MEM – minimalni esencijalni medij  $\alpha$ , prema engl.  *$\alpha$ -minimal essential medium*

$\mu$ CT – mikrokomputorizirana tomografija, prema engl. *micro-computed tomography*

# 1. Uvod

Kronične upalne bolesti zglobova kao što su reumatoidni artritis i spondiloartropatije, primjerice ankilozirajući spondilitis i psorijatični artritis, javljaju se u 1-2% opće populacije. Predstavljaju opterećenje za oboljelog, kao i za zdravstveni sustav, jer uzrokuju smanjenje kvalitete života i invalidnost, a liječenje je dugotrajno, skupo i često tek djelomično uspješno u uspoređenju napredovanja bolesti, uz stalan rizik od nuspojava primijenjene terapije te razvoja sekundarnih bolesti (1, 2).

Kronična upala, djelovanjem upalnih stanica i intenzivnim lučenjem proupalnih citokina, stvara mikrokoliš koji potiče aktivnost osteoklasta, koštanih stanica specijaliziranih za razgradnju kosti. Njihovom pojačanom aktivnošću dolazi do razaranja hrskavice i kosti, trajnog oštećenja zglobova i do razvoja sustavne osteopenije. Osteoklasti su stanice hematopoetskog podrijetla, a osteoklastni progenitori (OCP, prema engl. *osteoclast progenitor*) razvijaju se iz mijeloidne loze te su fiziološki prisutni u koštanoj srži i cirkulaciji, među krvnim monocitima.

Spoznaja da brojne autoimunosne i upalne bolesti uzrokuju poremećaj koštane građe dovela je do razvoja osteoimunologije, interdisciplinarnog istraživačkog područja koje obuhvaća koštanu biologiju i imunologiju. Danas je poznato da su koštani i imunosni sustav međusobno funkcionalno povezani i da se trebaju proučavati kao funkcionalna cjelina kako bi se razumjele bolesti koje zahvaćaju oba sustava. Mehanizmi djelovanja citokinsko-kemokinske mreže na stanice OCP i razgradnju kosti u kroničnim upalnim bolestima, koje uključuju različite oblike artritisa, ali i periodontitis, osteomijelitis i upalne bolesti crijeva još nisu u potpunosti razjašnjeni. Precizna karakterizacija fenotipa i bioloških značajki subpopulacija stanica OCP te ključnih medijatora njihove aktivacije i migracije na mjesta razaranja kosti u zglobnim lezijama u artritisu jedan je od ciljeva osteoimunologije.

Životinjski modeli artritisa od velike su važnosti za istraživanja patogeneze bolesti te testiranje novih terapijskih metoda i lijekova, s obzirom na to da jedino *in vivo* sustav objedinjuje sve čimbenike koji utječu na upalni proces i patogenezu bolesti. Među njima je mišji model artritisa potaknutog kolagenom (CIA, prema engl. *collagen-induced arthritis*) u široj upotrebi, i predstavlja eksperimentalni model reumatoidnog artritisa, zbog dobro opisanih podudarnosti sa patogeneзом bolesti u ljudi te preciznog opisa temeljenog na prethodnim višegodišnjim istraživanjima (3, 4).

## 1.1. Osteoimunologija

Osteoimunologija se bavi proučavanjem međudjelovanja hematopoetskih, koštanih i imunosnih stanica. Prvi puta je pokazano da imunosne stanice djeluju na koštane stanice još 1972. godine, u radu u kojem je opisano kako supernatant iz kulture monocita periferne krvi stimuliranih fitohemaglutininom potiče koštanu resorpciju (5). Čimbenik iz supernatanta nazvan je aktivirajući faktor osteoklasta, a desetak godina kasnije se ispostavilo da je riječ o interleukinu (IL, prema engl. *inteleukin*) 1, te su uslijedila istraživanja koja su dokazala da i čimbenik nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , prema engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) i IL-6 imaju slično poticajno djelovanje na osteoklaste kao i IL-1 (6). Postalo je očito da kost i koštane stanice te hematopoetske i imunosne stanice nisu odvojeni sustavi već međusobno ovisni sustavi u fiziološkim i patološkim stanjima.

Osim što su u neposrednom fizičkom kontaktu, koštane i imunosne stanice su i funkcionalno povezane. Ligandi i receptori iz obitelji TNF, brojni citokini i kemokini, čimbenici poticanja kolonija i signalne molekule nužni su za normalno funkcioniranje oba sustava. Te spoznaje su detaljno opisane u istraživanjima eksperimentalnih modela i ljudskih bolesti (7, 8). Osim toga, pokazano je da koštane i imunosne stanice dijele zajedničke progenitore, te da je njihova diferencijacija usmjerena zajedničkim potpornim stanicama u koštanoj srži i zajedničkim regulacijskim molekulama (6).

Koštana srž unutar koštane šupljine predstavlja složeni mikrookoliš stanica različitih razvojnih loza, međustanične tvari i brojnih čimbenika rasta. Tijekom embrionalnog razvoja hematopoetske matične stanice naseljavaju koštanu srž i cijelog života proizvode zrele krvne i imunosne stanice, uz potporu osteoblastne loze od koje dobivaju odgovarajuće signale. Iznenadujuće je bilo i otkriće da su osteoklasti zapravo hematopoetskog podrijetla (9), te se razvijaju susljednom diferencijacijom stanica monocitno/makrofagne loze. Koštana srž također je mjesto gdje obitavaju memorijski limfociti B i T, u koju se vraćaju recirkulacijom nakon antigenskog podražaja. Osteoblasti su koštane stanice mezenhimnog podrijetla koje grade kost lučenjem koštanog matriksa. Ujedno reguliraju i samu aktivnost i diferencijaciju osteoklasta, odnosno koštanu razgradnju. Mezenhimske stromalne stanice koštane srži uključuju osteoblastne progenitore, izražavaju ključne molekule potrebne za diferencijaciju osteoklasta, te ujedno pružaju mikrookoliš potreban za normalnu hematopoezu (6).

Osteoblasti i osteoklasti neprekidno održavaju proces koštane pregradnje uravnoteženim te se njihovim usklađenim djelovanjem kost svakodnevno obnavlja i održava sposobnom za podnošenje mehaničkog opterećenja, za prilagodbu metaboličkim zahtjevima te za potrebe

očuvanja hematopoetskih odjeljaka (6). U upali i brojnim drugim imunosnim bolestima dolazi do narušavanja homeostaze koštane pregradnje, čija posljedica je pojačana osteoresorpcija, smanjenje koštane gustoće i narušavanje biomehaničkih svojstava koštanog tkiva, što može dovesti do deformacija zglobova i patoloških osteoporotskih fraktura.

### 1.1.1. Osteoklasti i osteoblasti

U kosti su hematopoetske stanice, osteoblasti i osteoklasti uklopljeni u bogati mikrookoliš hormona, citokina i tkivnih čimbenika rasta. Njihov međusobni odnos vrlo je složen i obuhvaća endokrina, parakrina, autokrina i stanična međudjelovanja. Za normalnu pregradnju kosti nužno je usklađeno djelovanje osteoblasta, koji pridonose odlaganju koštane međustanične tvari i osteoklasta, koji je razgrađuju. U regulaciji aktivnosti tih stanica ključnu ulogu imaju hormonsko djelovanje i fizikalne sile, te lokalni učinci stanica, čimbenika rasta i citokina (10). Osteoklast je velika, višejezrena stanica nastala spajanjem više progenitorskih stanica koja se smješta uz endost i svojim osteoresorptivnim djelovanjem tvori resorpcijske lakune. Povezuje se s koštanom površinom posebnom staničnom membranom koja tvori nabrani rub kako bi što veća površina stanične membrane bila raspoloživa za lučenje vodikovih iona i enzima, kao što su katepsin K i metaloproteinaze međustanične tvari (MMP, prema engl. *matrix metalloproteinase*) u resorpcijski odjeljak. Zona nazubljenog ruba ograničena je posebnom, nepropusnom svijetlom zonom bogatom aktinskim filamentima čije su značajke specijalizirane adhezijske strukture, podosomi, bogati integrinskim receptorima koji vežu proteine koštanog matriksa, primjerice osteopontin. U svojim lizosomima sadrži kiselu fosfatazu pa se boji histokemijski pozitivno na kiselu fosfatazu otpornu na tartarat (TRAP, prema engl. *tartrate-resistant acid phosphatase*). Osteoklasti potječu iz monocitno/makrofagne loze hematopoetskih matičnih stanica te izražavaju receptore za dva ključna čimbenika osteoklastogeneze: receptor za čimbenik rasta makrofagnih kolonija (receptor za M-CSF, prema engl. *macrophage-colony stimulating factor*, nazvan još i c-fms/CD115 (stanični biljeg diferencijacije, CD, prema engl. *cluster of differentiation*) ili CSF1R prema engl. *colony-stimulating factor 1 receptor*), i receptor za pobudu jezgrinog čimbenika  $\kappa B$  (RANK, prema engl. *receptor activator of nuclear factor  $\kappa B$* , nazvan još i TNFRSF11a prema engl. *tumor necrosis factor receptor ligand superfamily member 11a*) (11, 12).

Kontinuirana koštana pregradnja preduvjet je normalne građe i funkcije kosti. Aktivnost osteoklasta stoga je fiziološki usklađena s djelovanjem osteoblasta. Osteoblasti su zrele, kubične stanice koje se ne dijele, smješteni su uz endost, a potječu od mezenhimskih

progenitora prisutnih u raznim tkivima, uključujući periost, koštanu srž i cirkulaciju. Ti progenitori osim osteoblasta mogu proizvesti druge mezenhimske stanice kao što su hondrociti, adipociti i stromalne stanice koštane srži (13-17). Osteoblasti sintetiziraju koštani matriks i pomažu mineralizaciju kosti te istovremeno reguliraju diferencijaciju i aktivnost osteoklasta proizvodnjom čimbenika poticanja kolonija M-CSF i liganda receptora za pobudu jezgrinog čimbenika  $\kappa$ B (RANKL, prema engl. *receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand*, nazvan još i TNFSF11 prema engl. *tumor necrosis factor ligand superfamily member 11*). Dio osteoblasta diferencira se u mirujuće osteocite, čija funkcija nije detaljno razjašnjena, no također su sposobni lučiti RANKL (13, 18). Osteoblasti također izražavaju osteoprotegerin (OPG, prema engl. *osteoprotegerin*, nazvan još i TNFRSF11b prema engl. *tumor necrosis factor receptor ligand superfamily member 11b*) koji djeluje kao topljivi, lažni receptor za RANKL, što sprječava vezanje čimbenika RANKL na aktivacijski receptor RANK i prienos osteoklastogenog signala (11, 12, 18). Osteoklastni progenitori u prisutnosti čimbenika M-CSF povišuju izražaj aktivacijskog receptora RANK, a vezanjem čimbenika RANKL stimulirana je njihova proliferacija i diferencijacija u zrele osteoklaste te aktivnost resorbirajućih osteoklasta (18). Miševi s isključenim genom za RANKL imaju normalnu populaciju monocita, no nemaju osteoklasta što dovodi do osteopetroze, a jednaki poremećaj se javlja u miševa s isključenim genom za RANK. Miševi s isključenim genom za OPG razvijaju osteoporozu (13, 19, 20). Regulacija usklađenog djelovanja osteoklasta i osteoblasta u mikrookolišu koštane srži te, posljedično, koštane pregradnje vrlo je složena, ovisi o djelovanju hormona, metaboličkim potrebama, biomehaničkoj stimulaciji te citokinskoj i kemokinskoj signalizaciji. U konačnici, za neposrednu regulaciju funkcije osteoklasta ključan je parakrini signal putem osovine RANK/RANKL/OPG. Povišen omjer RANKL/RANK uzrokuje pojačanu aktivaciju osteoklasta i prekomjernu koštanu resorpciju. Osim osteoblasta, čimbenik RANKL, izražavaju hipertofični hondrociti, sinovijalni fibroblasti te aktivirani limfociti T i B. Pro-resorptivni hormoni i upalni medijatori, uključujući paratireoidni hormon, vitamin D3, prostaglandin E2, te brojne citokine (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-7, IL-15, IL-17, IL-21, IL-22), povišuju izražaj čimbenika RANKL na stanicama mezenhimske i limfoidne loze (20, 21).

### **1.1.2. Imunosne stanice**

Imunosne stanice glavni su izvor upalnih medijatora te njihovim lučenjem privlače druge stanice na mjesto upale, a dovode i do promjena u fenotipu i funkciji okolnih (neimunskih) stanica, kao što su primjerice fibroblasti i sinovijalne stanice. U upalnom okruženju, upalni



citokini potiču imunosne i neimunosne stanice na lučenje drugih upalnih medijatora, čime i one poprimaju upalne značajke. Takav začarani krug pojačava i podržava upalnu reakciju u autoimunim bolestima, primjerice reumatoidnom artritisu, te ona ili trajno perzistira ili prolazi kroz faze remisije i relapsa.

U reumatoidnom artritisu limfociti B i T nakupljaju se u upalnim infiltratima u sinovijalnom tkivu i subhondralnoj koštanoj srži te tvore strukture slične folikulima. Limfociti B mogu izražavati čimbenik RANKL i time poticati osteoklastogenezu u upali. Poremećaj njihove funkcije i autoreaktivnost pridonose etiopatogenezi reumatoidnog artritisa, jer limfociti B proizvode auto-antitijela kao što su reumatoidni faktor (RF) i protutijela usmjerena na citrulinirane peptide (ACPA, prema engl. *anti-citrullinated peptide antibodies*). Kako se razvoj limfocita B odvija u koštanoj srži kao primarnom limfnom tkivu, pretpostavka je da upravo ovdje i dolazi do pojave autoreaktivnosti (22).

Aktivirani limfociti T mogu igrati dvojaku ulogu u osteoresorpciji uzrokovanj upalom. Mogu izražavati čimbenik RANKL i time poticati osteoklastogenezu. Nasuprot tomu, neki pomagački limfociti T stvaraju interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) i IL-4, koji koče osteoklastogenezu. Pomagački limfociti T koji luče IL-17 (Th17) također proizvode RANKL i TNF- $\alpha$ , uz slabo lučenje IFN- $\gamma$  i IL-4, te tako čine poveznicu između aktivacije limfocita T i osteoresorpcije (23). Lučenje TNF- $\alpha$  izravno potiče osteoklaste i istovremeno smanjuje osteoblastogenezu. Regulacijski limfociti T izražavaju antigen citotoksičnih limfocita-4 (CTLA-4, prema engl. *cytotoxic T lymphocyte antigen-4*) koji koči osteoklastogenezu, a tako djeluje *abatacept*, fuzijski protein CTLA-4 i imunoglobulina, koji se već primjenjuje u liječenju reumatoidnog artritisa (24).

Osim limfocita, važan doprinos upalnoj komponenti autoimunosne reakcije daju mijeloidne stanice. Neutrofili brzo infiltriraju mjesta autoimunosne upale gdje oslobađaju toksične i proupalne spojeve, čime pojačavaju upalu i dovode do oštećenja tkiva te fagocitiraju mrtve stanice i tkivo, a također mogu izražavati osteoklastogeni čimbenik RANKL. Makrofagi su prisutni u upalnom infiltratu te pridonose održavanju kronične upale. Oslobađaju niz upalnih medijatora (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1), vrše fagocitozu i imaju ulogu predočivanja antigena. Dendritične stanice glavne su stanice koje predočuju antigene limfocitima T u razvoju adaptivnog imunosnog odgovora, pomažu njihovom nakupljanju u upalnom infiltratu i održavanju kroničnog autoimunosnog odgovora (22, 24).

## **1.2. Gubitak kosti posredovan upalom**

Kao posljedica sinovitisa i osteitisa, odnosno kronične upale u kojoj dolazi do pojačanog stvaranja proupalnih citokina i tkivnih enzima, u kroničnim upalnim bolestima zglobova razvija se generalizirano i lokalno oštećenje kosti. U reumatoidnom artritisu možemo razlikovati dvije razine oštećenja kosti: lokalni gubitak kosti (lokalne koštane erozije, subhondralni i periartikularni gubitak kosti) i generaliziranu osteoporozu (22, 25).

### **1.2.1. Sustavni gubitak kosti**

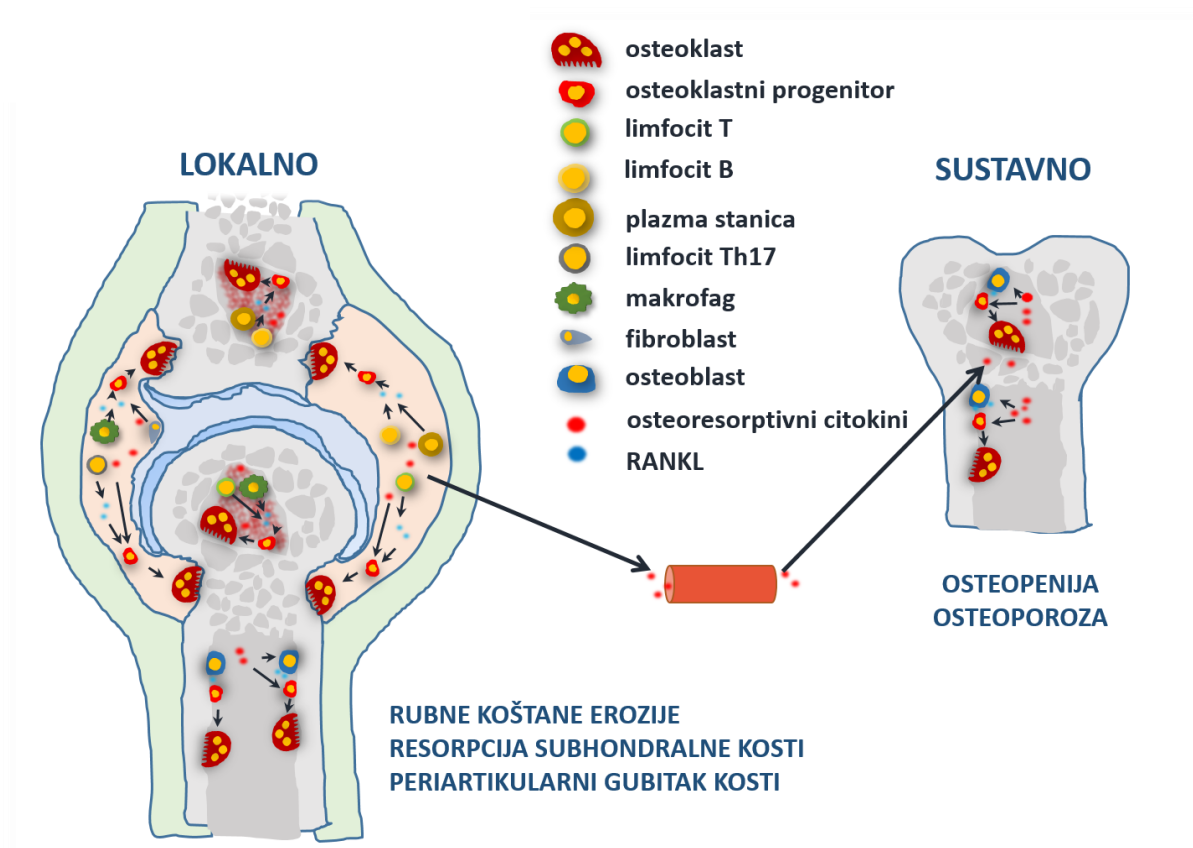
Osim osteoporoze u menopauzi i starosti, postoji i sekundarna osteoporoza koja se razvija u brojnim bolestima, uključujući upalne. U kroničnim upalnim bolestima, neovisno o zahvaćenom organskom sustavu i lokaciji upalnih žarišta, pojačano je lokalno lučenje citokina, a s pojačanjem intenziteta bolesti oni se prelijevaju u cirkulaciju (primjerice IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$ ). Međudjelovanje imunskih stanica i koštanih stanica u tim stanjima dovodi do sustavne neravnoteže u koštanoj pregradnji s pojačanim djelovanjem osteoklasta i, istovremeno, smanjenim djelovanjem osteoblasta. Rezultat je smanjena mineralna gustoća koštanog tkiva (BMD, prema engl. *bone mineral density*), odnosno razvoj osteopenije i sekundarne osteoporoze s povećanim rizikom od patoloških fraktura. Dodatni rizični čimbenici su, kao i kod primarne osteoporoze: ženski spol, starija dob te manjak vitamina D i kalcija (26). Uz trajanje i intenzitet bolesti, dodatni čimbenici koji pogoršavaju gubitak kosti su dugotrajna terapija glukokortikoidima, mirovanje zbog boli i nepokretnosti te moguća pothranjenost u nekim upalnim bolestima (primjerice kroničnim upalnim bolestima crijeva) (25, 26). U reumatoidnom artritisu već u ranim stadijima bolesti postoji gubitak koštane mase u kralješcima i kukovima (25), a bolesnici s reumatoidnim artritisom imaju veći rizik od osteoporotskih fraktura kralježaka, kuka, zdjelice, humerusa i zapešća, u odnosu na zdrave pojedince jednake dobi i spola (27, 28).

### **1.2.2. Lokalni gubitak kosti**

U različitim kliničkim formama artritisa žarišta kronične upale upravo su zglobovi. Koštano tkivo unutar i oko zgloba izloženo je najvišim koncentracijama upalnih citokina, s posljedičnom opsežnom destrukcijom hrskavice i kosti, deformacijama i ankilozom. Faktori koji pogoršavaju sustavni gubitak kosti podjednako pogoršavaju i lokalni gubitak kosti, što uključuje liječenje glukokortikoidima i nepokretnost, uz stalno prisutan rizik od patoloških fraktura (25, 28).

Lokalna oštećenja u reumatoidnom artritisu vidljiva su kao rubne koštane erozije, resorpcija subhondralne kosti i periartikularni gubitak kosti, a posljedica su napredovanja upale i lučenja osteoklastogenih citokina u sinovijalnom tkivu i subhondralnoj koštanoj srži (1) (**Slika 1**).

Uz upalni infiltrat u sinovijalnom tkivu zgloba u obliku *sinovitisa*, rano tijekom bolesti upalno se mijenja i subhondralni odjeljak koštane srži. Razvija se infiltracija upalnim stanicama i pojačana vaskularizacija te zamjena masnih stanica upalnim, što se histološki naziva *osteitisom*. Taj patohistološki nalaz može se magnetnom rezonancijom (MRI, prema engl. *magnetic resonance imaging*) prepoznati kao *edem* koštane srži. Naziv proizlazi iz nalaza povišenog vodenog signala u odnosu na mast, zbog zamjene masnih stanica upalnim i pojačanom vaskularizacijom (22). Posljedica osteitisa je stanjenje subhondralne koštane ploče rano tijekom bolesti. Sinovitis i osteitis susljedno uzrokuju lokalno širenje oslobođenih osteoklastogenih citokina u periartikularnu trabekularnu i kortikalnu kost, tipično metafize i dijafize metakarpalnih i interfalangealnih kosti u reumatoidnom artritisu, što dovodi do gubitka trabekularne kosti i kortikalnog stanjenja vidljivog na rentgenskim snimkama šake (25, 28, 29). Nakon subhondralnog i periartikularnog gubitka koštanog mineraliziranog tkiva javljaju se i rubne koštane erozije. Nastaju najčešće između zglobne hrskavice i mjesta spajanja sinovijalne ovojnice ili enteza za kost, gdje nedostaje periost, a uzrokuje ih nastanak invazivnog upalnog fibrovaskularnog tkiva, *panusa*, koje praćeno djelovanjem osteoklasta prodire na tim mjestima u koštano tkivo. Konačni rezultat je nastajanje izravne veze između sinovijalnog odjeljka zgloba i subhondralnog odjeljka koštane šupljine. Spajanje tih odjeljaka omogućuje komunikaciju stanicama, upalnim medijatorima i tkivnim enzimima, što dalje pridonosi destruktiji zgloba (1).



**Slika 1. Razine gubitka kosti izazvanog upalom u reumatoidnom artritisu.** Gubitak kosti u kroničnim upalnim bolestima zglobova uzrokovan je kompleksnim međudjelovanjem upalnih i koštanih stanica. Upalni infiltrat nastaje u sinovijalnom tkivu i subhondralnoj kosti, a sastoji se od neutrofila, makrofaga, limfocita T i B, sinovijalnih fibroblasta i drugih stanica koje intenzivno proizvode upalne medijatore, citokine, tkivne enzime, a neke mogu lučiti i RANKL (prema engl. *receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand*). Djelovanjem enzima razara se zglobna hrskavica. U sinovijalnom tkivu nastaje invazivno upalno vezivno tkivo, panus, koji stvara rubne koštane erozije. Upalni medijatori djeluju autokrino i parakrino te, prelijevanjem u cirkulaciju, endokrinno na osteoklastne progenitore, osteoklaste i osteoblaste, potičući osteoklastogenezu izravno ili poticanjem osteoblasta na izražaj RANKL-a. Rezultat je pojačana diferencijacija osteoklasta i osteoresorptivna aktivnost na mjestu upaljenog zgloba i u njegovoj neposrednoj blizini te na razini cijelog organizma. Gubitak kosti u reumatoidnom artritisu može se stoga podijeliti na dvije razine, sustavnu i lokalnu. Lokalni gubitak dijeli se na subhondralni gubitak, periartikularni gubitak i rubne koštane erozije, a posljedice sustavnog gubitka kosti su razvoj osteopenije i sekundarne osteoporoze. Modificirano prema: Flegar D, Šućur A, Markotić A, Kovačić N, Grčević D. *Osteoporosis in the View of Osteoimmunology: Common Feature Underlined by Different Pathogenic Mechanisms. Period Biol.* 2015;117(1).

### 1.3. Reumatoidni artritis

Reumatoidni artritis je sustavna autoimunosna bolest karakterizirana poliartrikularnom upalom malih zglobova šake s hiperplazijom sinovije, oštećenjima zglobne hrskavice i kosti, razaranjem zglobova i ankilozom. Kroničnog je tijeka, s razdobljima egzacerbacija i remisija. Posljedice povećanog gubitka i razaranja kosti u reumatoidnom artritisu su invaliditet, kronična bol, povećan rizik od prijeloma te druge psihofizičke posljedice koje znatno smanjuju kvalitetu života oboljelih (30). Izlječenje danas nije moguće, s obzirom na autoimunosnu podlogu, a cilj terapije je spriječiti ili usporiti napredak bolesti kako bi se izbjegla trajna oštećenja zglobova i posljedična invalidnost bolesnika. Prevalencija reumatoidnog artritisa u općoj populaciji iznosi 0,5 do 1%, uz češće javljanje u žena srednje životne dobi. Preuranjena smrt u bolesnika s reumatoidnim artritisom povezana je s razvojem kardiovaskularne bolesti zbog povišene prevalencije rizičnih faktora u bolesnika s reumatoidnim artritisom (povišen krvni tlak, pretilost, hiperlipidemija, šećerna bolest) (1).

#### 1.3.1. Klinička slika

Glavni simptom reumatoidnog artritisa jest mekana oteklina sinovije zglobova uz tipičnu jutarnju ukočenost i bolnu osjetljivost na pokret ili dodir. Jutarnja je ukočenost otežano i sporo pokretanje zgloba u trajanju najmanje pola sata, a s trajanjem bolesti se produljuje. Specifično je zahvaćanje metakarpofalangealnih zglobova i proksimalnih interfalangealnih zglobova ruku i stopala, zatim pešća i zapešća, prvog metatarzofalangealnog zgloba, gležnja, lakta, ramena, koljena i kuka (30). Može zahvatiti bilo koji zglob, ali gotovo nikad ne zahvaća distalne interfalangealne zglobove i kralježnicu osim zglobova između prvog i drugog vratnog kralješka. Najčešće simptomi počinju postupno, s izmjenom razdoblja poboljšanja i pogoršanja, a upala zglobova je simetrična. U podlozi upale nalaze se sinovitis i osteitis. Zadebljanje sinovije postaje opipljivo, uz crvenilo i toplinu, a napredovanjem bolesti dolazi do trajnog oštećenja hrskavice i kosti te se razvijaju deformacije karakterističnog izgleda, poput ulnarne devijacije prstiju, čekićastog prsta, Z-deformacije palca i prsta poput „labuđeg vrata“ (hiperekstenzija proksimalnog i fleksija distalnog interfalangealnog zgloba) (1, 30). Osim zglobnih, uz reumatoidni artritis javljaju se i sustavni izvanzglobni simptomi poput reumatoidnih čvorića i vaskulitisa, episkleritisa, mononeuritisa, fibromialgije, perikarditisa, pleuritisa, bolesti plućnog intersticija, sekundarnog *Sjögrenovog* sindroma, sekundarne amiloidoze, razvoja kardiovaskularnih bolesti i limfoma. Bolesnici s reumatoidnim artritisom zbog boli, ukočenosti

i slabosti šake, a kasnije razvoja deformacija, imaju poteškoće u obavljanju svakodnevnih aktivnosti, kao što su odijevanje, rukovanje priborom za jelo, pisanje i tipkanje. U slučaju neuspješne terapijske kontrole bolesti u razdoblju od 10 do 20 godina, zbog razvoja deformacija zglobova, bolesnici bivaju radno nesposobni, a zahvaćanje većih zglobova nogu ili kralježnice može dovesti do nepokretnosti. Klinička je slika vrlo varijabilna u dinamici i intenzitetu upale, brzini napredovanja i broju zahvaćenih zglobova te odgovoru na terapiju (30). Cilj liječenja jest rana dijagnoza i primjena standardnih lijekova sa svrhom postizanja remisije te prilagodba liječenja u slučaju lošeg odgovora kako bi se spriječio nastanak invalidnosti i očuvala radna sposobnost, uporabom terapijaka druge i treće linije (bioloških pripravaka) (2).

### 1.3.2. Teorije o etiopatogenezi bolesti

Razvoju reumatoidnog artritisa pridonose brojni rizični čimbenici i najvjerojatnije je potrebno djelovanje više njih kako bi se bolest razvila. Napredovanje bolesti uključuje postupni razvoj autoimunosti na post-translacijski promijenjene vlastite proteine, što može godinama prethoditi samom nastupu simptomatske upale zglobova (1).

Dosad istraženi rizični čimbenici mogu se podijeliti na genske (pojedini aleli sustava glavnog kompleksa tkivne podudarnosti, polimorfizam gena za citokine i njihove receptore i dr.) i negenske (pušenje, ženski spol, promjene u mikrobioti crijeva i dr.). Genska komponenta izražena je u reumatoidnom artritisu, što su pokazale i blizanačke studije (12-15% jednojajčanih blizanaca razvija bolest). Specifični aleli gena lokusa skupine II ljudskih leukocitnih antigena DR (HLA-DR, prema engl. *human leukocyte antigen D related*, nazvan i sustav gena i antigena glavnog kompleksa tkivne podudarnosti skupine II, MHC-II, prema engl. *major histocompatibility complex*) povezani s razvojem reumatoidnog artritisa kodiraju specifičan slijed aminokiselina nazvan zajedničkim epitopom, najčešće su to aleli HLA DRB1\*01 i HLA DRB1\*04 (31). Metaanalize studija cijelogenomske analize povezanosti (GWAS, prema engl. *genome-wide association studies*) u više od 100.000 bolesnika detektirale su još stotinjak lokusa genoma koji imaju rizične alele te blagi kumulativni učinak povećanja rizika od obolijevanja kada je u osobe prisutno više rizičnih alela. Otkrivena je i genska podloga u razlikama između artritisa pozitivnog na protutijela ACPA (ACPA-pozitivan artritis), koja postoje u oko 70% bolesnika, i ACPA-negativnog artritisa, te razlikama u intenzitetu i brzini napredovanja bolesti (1). Epigenetske studije metilacije DNA otkrile su različitosti u metilaciji HLA-antigena u bolesnika s reumatoidnim artritisom u odnosu na kontrolne ispitanike, sugerirajući da rizični aleli HLA dobivaju značaj ovisno o metiliranosti te da okolišni čimbenici također mogu

djelovati modificiranjem metilacije. Zanimljiva je i spoznaja da pušenje i postojanje najmanje jednog alela HLA-DR koji kodira zajednički epitop može udvostručiti rizik u odnosu na nepušače (1).

Tijekom pretpostavljene pretkliničke faze bolesti razvija se autoimunost, čiji je početak u citrulinaciji proteina (post-translacijska promjena arginina u citrulin), primjerice kolagena, fibrinogena i histona, koju mogu posredovati čimbenici poput pušenja ili enzimi mikrobiote (*Porphyromonas gingivalis*) (32). Modificirani peptidi potom se vežu s HLA-molekulama koje nose zajedničke epitope. Nastali kompleksi peptida i HLA-molekula predočeni su limfocitima T, koji potom potiču limfocite B na stvaranje protutijela ACPA, reumatoidnog faktora (RF, protutijela na imunoglobuline) ili protutijela usmjerenih na neke druge modificirane proteine. Postojanje autoantitijela nije dovoljno za razvoj upale zgloba, potreban je okidač koji će dovesti do stvaranja imunokompleksa ili aktivacije komplementa i privlačenja upalnih stanica u sinovijalno tkivo. Upalne stanice potom, lučenjem upalnih medijatora, aktiviraju sinovijalne fibroblaste i makrofage što pojačava upalu, nadalje mobilizira upalne stanice i postupno dovodi do oštećenja zgloba. Sinovijalni fibroblasti poprimaju agresivan „upalni fenotip“ i luče enzime poput kolagenaze i melatoproteinaza, koji oštećuju hrskavicu. Osteoklasti potaknuti proupalnim medijatorima i čimbenikom RANKL, aktiviraju se i pojačano resorbiraju kost (1).

Uvriježenoj teoriji da je ključno zbivanje u nastanku reumatoidnog artritisa autoimunosna upala sinovijalnog tkiva suprotstavljena je teorija o usporednom, a možda i prethodećem subhondralnom osteitisu, odnosno upalno promijenjenoj koštanoj srži (22). Dugo se smatralo da se koštana srž uključuje u upalna zbivanja tek nakon stvaranja rubnih koštanih erozija i uspostavljanja izravne komunikacije sa zglobnim prostorom, što se javlja u uznapređovalom stadiju bolesti. Napretkom u primjeni tehnike MRI te optimizacijom MRI-snimanja u dijagnostici i praćenju reumatoidnog artritisa primjećen je edem koštane srži u ranim stadijima bolesti. Edem koštane srži znak je upale u koštanoj srži neovisno o etiologiji. Koštana srž je odjeljak ograničen koštanim tkivom pa se u njemu ne razvija edem u smislu povećanja obujma tkiva, ali postoji promjena odnosa masnog i vodenog sadržaja. Omjer sadržaja tih tkiva mijenja se u upali zbog prisutnog infiltrata imunskih stanica i pojačane vaskularizacije. Histološki se infiltrat vidi kao osteitis, a postupak MRI može tu promjenu neinvazivno detektirati kao edem koštane srži. Novija istraživanja pokazala su da se osteitis odvija usporedo sa zbivanjima u sinoviji te perzistira unatoč primjeni terapije (33, 34). Štoviše, edem koštane srži detektiran pomoću MRI može poslužiti i kao pouzdan pretkazatelj budućeg oštećenja (33, 35, 36). Koštana srž u reumatoidnom artritisu mjesto je odvijanja upalnog procesa ekvivalentnog onom u

sinovijalnoj membrani, s infiltracijom upalnih i imunskih stanica, nalazom aktivnih osteoklasta uz trabekularnu kost te povećanim koncentracijama upalnih medijatora (37). Međutim, podrijetlo umnoženih osteoklasta i njihov doprinos zbivanjima unutar zgloba, koji vode razaranju kosti i hrskavice, još nije potpuno razjašnjen.

### 1.3.3. Farmakoterapija

Cilj liječenja reumatoidnog artritisa jest postizanje remisije bolesti, a ako to nije moguće, održavanje niske razine aktivnosti bolesti kako bi se smanjila bol i maksimalno usporilo napredovanje bolesti, te spriječio razvoj deformacija zglobova i pojava izvanzglobnih oštećenja (1). Kako bi se to postiglo, najvažnije je rano započeti terapiju lijekom iz skupine anti-reumatskih lijekova koji modificiraju bolest (DMARD, prema engl. *disease modifying antirheumatic drugs*). Uz njihovu primjenu dokazano je smanjenje upalnih simptoma i oštećenja zglobova. Njima se može dodati lijek iz skupine nesteroidnih protu-upalnih lijekova (NSAID, prema engl. *nonsteroid antiinflammatory drugs*) za kontrolu boli. Sustavna primjena glukokortikoida preporučuje se također kao početna terapija u ranoj fazi bolesti uz skupinu DMARD, kratkotrajno (najdulje 4 mjeseca), za smirivanje pogoršanja i kao bi se premostilo razdoblje do početka djelovanja lijekova DMARD (1, 2).

Skupina DMARD dijeli se na nebiološke ili sintetske i biološke lijekove. Podskupina sintetskih lijekova može se podijeliti na konvencionalne, kao što su metotreksat, sulfasalazin, klorokin, hidrosiklorokin, soli zlata i leflunomid, čiji točan mehanizam djelovanja nije potpuno razjašnjen, te na ciljajuće sintetske lijekove DMARD, u koju pripadaju inhibitor Janus-kinaze 1 (JAK1) i JAK2 *baricitinib* te inhibitor kinaza JAK1, JAK2 i JAK3 *tofacitinib*. Ti pripravci oslabljuju signalizaciju upalnim citokinima, a mogu se uzimati peroralno kao i konvencionalni. Najčešće korišteni lijek prvog izbora jest metotreksat. Kombinirana početna terapija metotretksatom uz kratkotrajnu primjenu glukokortikoida dovodi do remisije u 25% bolesnika unutar prvih 6 mjeseci od početka liječenja, a u još većem postotku bolesnika uspostavlja se nizak stupanj aktivnosti bolesti (1). Uz primjenu metotretksata potrebno je uvesti i nadomjestak folne kiseline, kako bi se spriječio razvoj nuspojava (premda se inhibicija folata ne događa kod primjene protu-upalnih doza, nego kod primjene mnogo viših doza koje djeluju citostatski).

Skupina bioloških lijekova DMARD uvodi se ako primjena metotretksata, a potom i drugog konvencionalnog sintetskog pripravka iz skupine DMARD (s ili bez metotretksata), uz kratkotrajnu primjenu glukokortikoida, nije rezultirala kontrolom bolesti. U skupini bioloških lijekova DMARD nalaze se inhibicijska monoklonalna protutijela i blokirajući receptori za



proupalne citokine. Ti lijekovi blokiraju proupalne citokine, primjerice TNF- $\alpha$  (*adalimumab*, *etanercept*, *golimumab*, *infliximab*, *certolizumab*) ili receptore, primjerice receptor za IL-6 (*tocilizumab*, *sarilumab*), kostimulaciju limfocita T preko kostimulacijskih molekula CD80 i CD86 (*abatacept*) ili biljeg CD20 limfocita B (*rituksimab*). Njihova primjena je parenteralna, a preporuča se u kombinaciji s metotreksatom zbog boljeg učinka u odnosu na monoterapiju biološkim lijekovima DMARD. Moguće ozbiljne nuspojave su životno-ugrožavajuće infekcije zbog imunosupresije (2).

### 1.3.4. Životinjski modeli reumatoidnoga artritisa

Životinjski modeli neizbježni su u istraživanju etiopatogeneze ljudskih bolesti, kao i u otkrićima i evaluaciji učinka novih lijekova. Jedino *in vivo* sustav može objediniti sve uključene patogenetske mehanizme te stanične i molekularne čimbenike aktivne u složenim procesima, kao što su upala i autoimunosna reakcija. Također, moguća je relativna kontrola nekih čimbenika, poput trajanja bolesti i primjenjene intervencije, kako bi se dobio uvid u patološke procese u razvoju bolesti i prije pojave kliničke slike. Takva bi analiza u kliničkom okruženju bila ili neprovediva, ili nepraktična, ili neetična.

Nije za očekivati da jedan eksperimentalni model omogući testiranje svih postavljenih hipoteza o mehanizmu bolesti, stoga je validirano više različitih modela artritisa kojima se zasebno mogu analizirati, primjerice pojedini rizični čimbenici, mehanizmi pojave autoimunosti, vremenski tijek te uključenost imunskih stanica i upalnih medijatora u patogenezu bolesti. Kao modeli, najčešće se upotrebljavaju glodavci, a među njima je najzastupljeniji miš (4).

Ugrubo, modeli se mogu podijeliti na genske i inducirane. U slučaju genskih, miš je ili slučajnom mutacijom stekao svojstvo poput spontanog razvoja artritisa, koje ga čini pogodnim za istraživanje, ili se radi o ciljanoj genskoj intervenciji kreiranjem transgenične životinje. Prvi primjer su *Sakaguchi* (SKG)-miševi u podlozi BALB/c soja sa spontanom mutacijom podjedinice receptora limfocita T (TCR, prema engl. *T-cell receptor*), proteinske kinaze povezane sa  $\zeta$ -lancem-70 (ZAP-70, prema engl. *zeta-chain-associated protein kinase 70*), čija je posljedica oslabljena sposobnost prenošenja signala u stanicu (38). Zbog toga autoreaktivni limfociti T preživljavaju negativnu selekciju u timusu pa dolazi do razvoja autoimunskog artritisa ako se miševi uzgajaju u konvencionalnim uvjetima. Uzgojem u uvjetima bez specifičnih patogena (SPF, prema engl. *specific-pathogen-free*) ne dolazi do spontanog razvoja bolesti te je potrebna aktivacija urođene imunosti (npr. primjenom  $\beta$ -glukana ili uvođenjem specifične mikrobiote kao što je *Porphyromonas gingivalis*). Zaključno, u razvoju SKG-

artritisu postoji genska predispozicija, u patogenezu su uključeni limfociti T, ali postoji i utjecaj okolišnih čimbenika. Dodatne sličnosti s reumatoidnim artritisom su titar antiimunoglobulinskih protutijela (RF) i protutijela usmjerena na kolagen tipa II (3).

Primjer transgeničnog modela reumatoidnog artritisu humanizirani su miševi s povećanim izražajem ljudskog proupalnog citokina TNF- $\alpha$ , koji spontano razvijaju artritis sa sinovitisom i destrukcijom zglobne hrskavice i kosti. Služe za proučavanje pojačane aktivnosti tog citokina u upali te učinka lijekova, no pritom izostaje doprinos adaptivne imunosti u razvoju bolesti. Nadalje, često je upotrebljavan transgenični soj K/BxN, koji izražava receptor TCR specifičan za peptid ribonukleaze govede gušterače. Javljaju se autoreaktivni limfociti T i B, usmjereni na izomerazu glukoza-6-fosfata, uz proizvodnju specifičnih protutijela. Razvoj artritisu vezan je za molekulu MHC, te ovisi o alelu I-A<sub>g7</sub> MHC-II, koja predočuje antigene autoreaktivnim limfocitima T, koji potom stimuliraju limfocite B na lučenje protutijela. Razvija se intenzivan simetrični artritis distalnih zglobova sa sinovijalnom infiltracijom, panusom i oštećenjima zglobova. Autoantitijela RF i ACPA nisu prisutna, a bolest se razvija i bez doprinosa citokina TNF- $\alpha$  i IL-6. Razvoj artritisu može se spriječiti primjenom protutijela usmjerenog na CD4-koreceptorski biljeg limfocita T. Prijenosom seruma K/BxN miševa s artritisom u druge sojeve (BALB/c, C57BL/6, DBA/1) nastaje artritis karakteriziran akutnim samoograničavajućim tijekom, posredovan je stvaranjem imunokompleksa, aktivacijom komplementa i mobilizacijom neutrofila i monocita. Te značajke model čine pogodnim za istraživanje puteva urođene imunosti i njihovog doprinosa upali i oštećenju zglobova, jer prijenosom seruma ne dolazi do aktivacije limfocita T i B (4, 39).

Inducirani modeli koriste složenije protokole i različite metode poticanja autoimunosne upale zglobova, primjerice imunizacija ksenogeničnim kolagenom tipa II u adjuvansu u modelu artritisu potaknutog kolagenom. Cilj imunizacije je razvoj križne reakcije na kolagen u zglobovima, a dovodi do polisinovitisa sličnog reumatoidnom artritisu u podložnim sojevima miševa i štakora. Artritis potaknut protutijelima protiv kolagena izaziva se primjenom gotovog koktela monoklonalnih protutijela usmjerenih na kolagen tipa II uz primjenu lipopolisaharida nakon trodnevnog razmaka. Prednosti su mu brz i ujednačen razvoj jake upale zglobova svih šapa (unutar četiri dana od primjene), gotovo stopostotna incidencija i trajanje simptoma nekoliko tjedana, no slično kao i kod serumskog transfera miševa K/BxN, ne dolazi do aktivacije limfocita T i B. U artritisu potaknutom antigenom primjenjuje se kombinacija adjuvansa i ksenogeničnog antigena, poput kravljeg serumskog albumina. Pripravak se primjenjuje izravnom intra-artikularnom injekcijom nakon koje slijedi sustavna primjena

antigena, što dovodi do upalnog odgovora i artritisa samo u prethodno senzibiliziranom zglobu. Na taj način artritis se može izazvati u različitim životinjskim vrstama i različitim sojevima miševa (3, 4, 39).

### 1.3.5. Artritis potaknut kolagenom

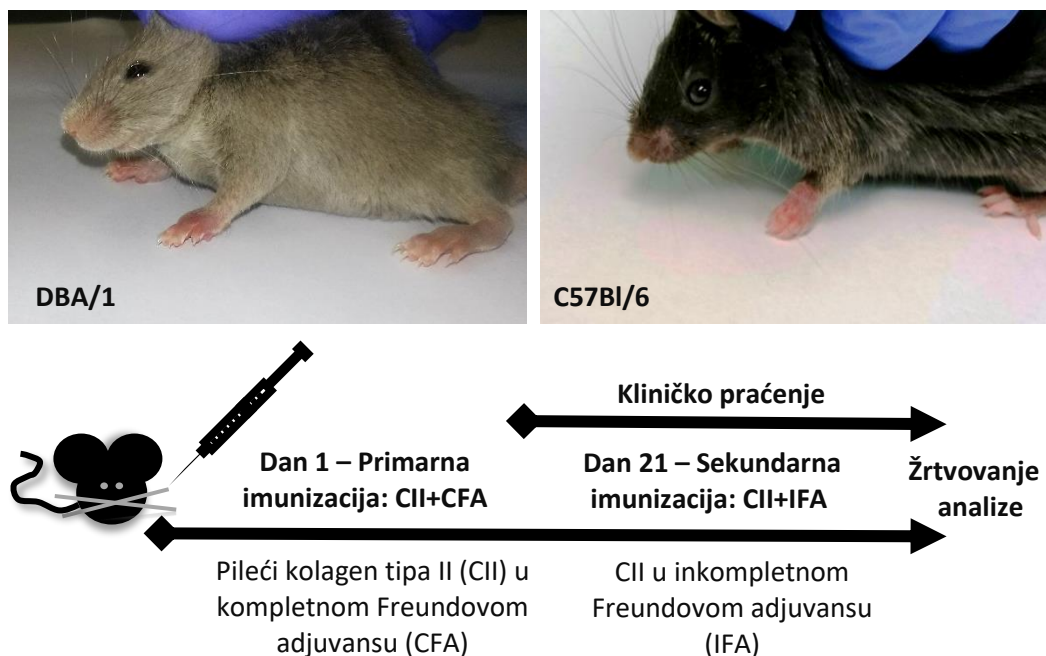
Artritis potaknut kolagenom (CIA, prema engl. *collagen-induced arthritis*) je najšire korišten životinjski model autoimunskih artritisa, koristan u istraživanjima patogeneze bolesti, uključujući mehanizme autoimunosti i uloge pojedinih vrsta upalnih stanica. Također služi istraživanju razvoja i napredovanja bolesti te u dizajnu i evaluaciji novih terapijskih pristupa i lijekova (40-42).

Izaziva se imunizacijom miševa intradermalnom injekcijom ksenogeničnog kolagena tipa II u emulziji s kompletnim Freundovim adjuvansom (CFA, prema engl. *complete Freund adjuvans*). Nakon 14-21 dana ponavlja se intradermalna injekcija kolagena tipa II uz zamjenu CFA inkompletnim Freundovom adjuvansom (IFA, prema engl. *incomplete Freund adjuvans*). Razvoj artritisa je ovisan o postojanju specifičnih alela MHC-II molekula, te su mišji sojevi koji izražavaju haplotip H-2<sup>a</sup>, poput DBA/1 soja, izrazito podložni razvoju artritisa nakon imunizacije. Miševi soja C57Bl/6 izražavaju haplotip H-2<sup>b</sup> i nešto su manje podložni razvoju artritisa, a sojevi koji izražavaju ostale alele H-2 su rezistentni (39, 43).

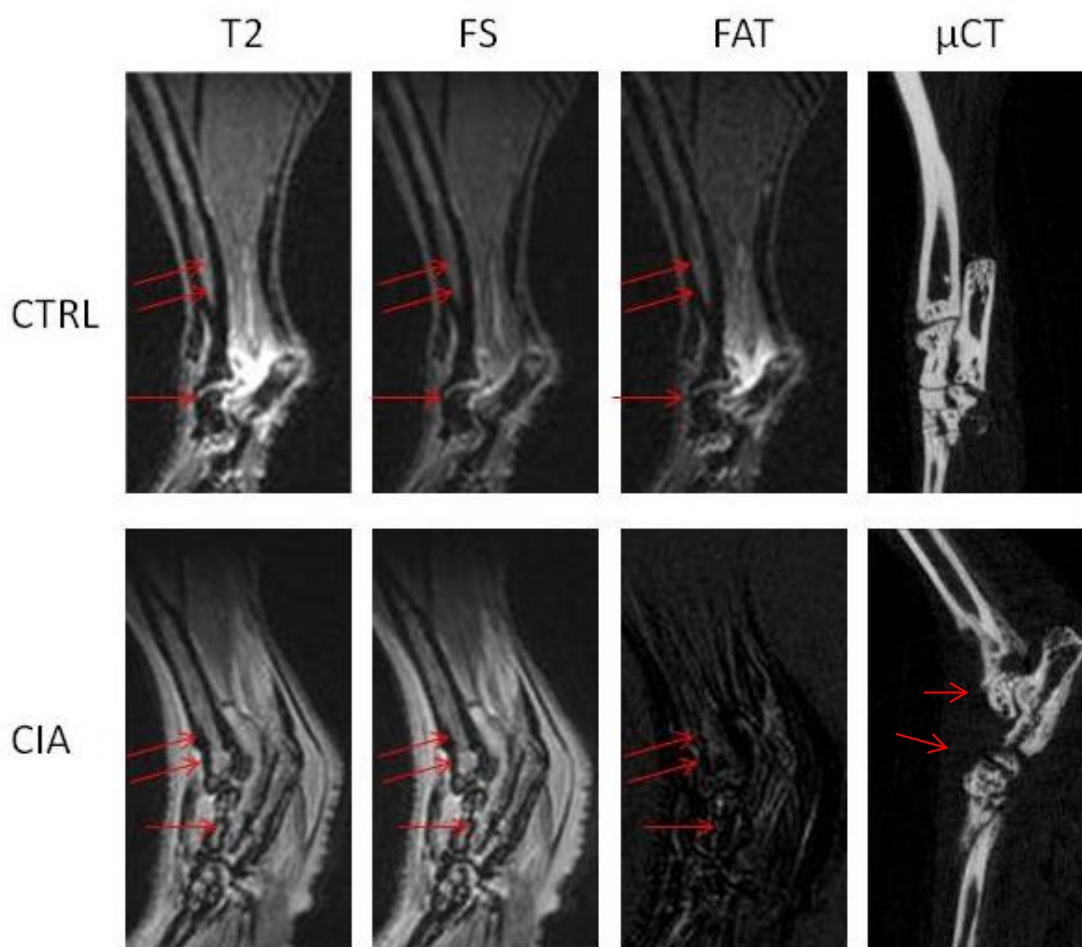
Za soj DBA/1 kod imunizacije moguće je upotrijebiti pileći ili kravlji kolagen tipa II, dok je za miševе C57BL/6 potreban isključivo pileći kolagen tipa II (CII, prema engl. *chicken collagen type II*) u većoj koncentraciji, uz CFA s većom koncentracijom inaktivirane *Mycobacterium tuberculosis*. Miševi soja C57BL/6 dugo su smatrani otpornima na artritis u modelu CIA, no zbog transgeničnih životinja koje su većinom dostupne na C57BL/6 soju, razvijeni su prilagođeni protokoli za izazivanje CIA (44, 45). Incidencija CIA u soju C57BL/6 je niža, najviše 60%, u odnosu na gotovo 90% incidenciju u soju DBA/1. Osim toga, vrhunac incidencije se javlja kasnije (oko 35 dana od primarne imunizacije) u odnosu na soj DBA/1 (artritis doseže maksimum između 25. i 30. dana od primarne imunizacije). Pojava otekline zglobova u DBA/1 miševa vremenski je ujednačenija u odnosu na veliku varijabilnost u C57BL/6 soju, u kojem su simptomi ujedno blaži i perzistiraju dulje (46). Klinički se očituje kao poliartritis prednjih i stražnjih šapa s ukočenošću, crvenilom i boli, te s postupnim razvojem deformacija i ankiloze (Slika 2).

Model CIA kliničkom slikom i patohistološkim promjenama nalikuje reumatoidnom artritisu u ljudi. Dolazi do razvoja sinovitisa i osteitisa, s progresivnim razaranjem hrskavice i gubitkom

kosti (43, 46) (**Slika 3**). Uloga primjene adjuvansa u imunizaciji jest produljenje prisutnosti antigena na injekcijskom mjestu te pospješeno predočivanje antigena stanicama imunskog sustava. Pripravci adjuvansa IFA i CFA jaki su aktivatori urođene imunosti, a CFA sadrži inaktivirani oblik bakterije *Mycobacterium tuberculosis*. Uljna komponenta, a posebice mikobakterijska komponenta, aktiviraju makrofage koji počinju lučiti upalne citokine, vršiti fagocitozu i predočivanje antigena. Upalnom odgovoru pridružuju se i dendritične stanice, što u konačnici dovodi do poliklonalne aktivacije i proliferacije limfocita T, koji potom potiču aktivaciju limfocita B i migriraju u tkiva gdje dolazi do križne reakcije s tkivnim kolagenom (42). U artritisu postoji specifičan odgovor limfocita T i B na tkivni kolagen uz stvaranje anti-CII protutijela. Istaknuta je dominantna uloga pomagačkih limfocita Th17 u regulaciji djelovanja autoreaktivnih protutijela. Suprimiranjem sialil-transferaze limfocita B, dolazi do promjena u glikozilaciji njihovih ulomaka Fc, te susljedno stvaranja imunokompleksa koji mogu pokrenuti upalnu kaskadu čime završava asimptomatska faza artritisa (47). Nakon toga razvijaju se klinički znakovi bolesti, u obliku crvenila, otekline i ankiloze prednjih i stražnjih šapa.



**Slika 2. Izazivanje artritisa potaknutog kolagenom.** Protokol uključuje primarnu imunizaciju miševa intradermalnom injekcijom kolagena tipa II (CII) u kompletnom Freundovom adjuvansu (CFA). Nakon 14-21 dana ponavlja se intradermalna injekcija CII uz zamjenu CFA inkompletnim Freundovom adjuvansom (IFA). Za soj DBA/1 kod imunizacije moguće je upotrijebiti pileći ili kravljji kolagen tipa II, dok je za miševu soju C57BL/6 potreban isključivo pileći CII u većoj koncentraciji i CFA s većom koncentracijom inaktivirane *Mycobacterium tuberculosis*. Nakon dva do četiri tjedna poslije primarne imunizacije (ovisno o soju) razvijaju se klinički znakovi bolesti u obliku crvenila, otekline i ankiloze prednjih i stražnjih šapa.



**Slika 3. Magnetska rezonancija i mikrokomputorizirana tomografija tibiotalarnog zgloba.**

Miševima soja DBA/1 izazvan je artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. U vremenskoj točki pd 30 dana nakon primarne imunizacije provedeno je *in vivo* snimanje magnetskom rezonancijom i mikrokomputoriziranom tomografijom ( $\mu$ CT) stražnjih štapa u miševa s artritism (CIA) i kontrolne skupine (CTRL). Na T2-snimkama (zajednički signal masti i vode) vidi se postojanje zglobnih izljeva i jakog edema mekih tkiva stražnje šape u miša s artritism. Koštana srž distalne tibije i talusa (strelice) vidljiva je u obje skupine. Nakon supresije signala masti (FS – prema engl. *fat suppression*), signal ostaje jednakog intenziteta kod miša s artritism, što govori u prilog nakupljanju tekućine, dok je kod kontrolnih miševa signal oslabljen, što govori u prilog postojanju masti. Oduzimanjem signala FS od T2 izdvojen je signal dobiven od masnih stanica (FAT). Koštana srž distalne tibije i talusa dobro je vidljiva u kontrolnog (strelice), ali ne i u artritičnog miša, pa se može pretpostaviti da je masno tkivo koštane srži zamijenjeno upalnim infiltratom, što je poznato kao edem koštane srži. Snimka dobivena  $\mu$ CT-om pruža bolji uvid u koštano morfoloiju (koštano razaranje u CIA, strelice), a snimka magnetskom rezonancom daje dodatni uvid u stanje mekih tkiva (prikazane su vlastite snimke).

## 1.4. Osteoklastni progenitori

Gubitak kosti u kroničnim upalnim bolestima posljedica je pojačane diferencijacije i aktivacije osteoklasta, stanica specijaliziranih za koštanu razgradnju (48). Stoga osteoklast predstavlja poveznicu između upale zgloba i koštanih oštećenja u reumatoidnom artritisu (49, 50). Proizvodnjom osteoresorptivnih medijatora (IL-1, IL-6, IL-11, IL-17, TNF- $\alpha$ , RANKL, CCL2, CXCL12) upalne stanice stvaraju uvjete koji potiču diferencijaciju osteoklasta iz stanica OCP (51-56). Stanice OCP mijeloidnog su podrijetla i fiziološki su prisutne u koštanoj srži te među populacijom monocita u perifernoj krvi, a različiti ih kemotaktični signali privlače iz cirkulacije i koštane srži na mjesta zahvaćena upalom.

### 1.4.1. Hematopoetsko podrijetlo

Osteoklasti se razvijaju iz mijeloidne loze hematopoetskih matičnih stanica i imaju zajedničke progenitore kao dendritične stanice i makrofagi te prolaze kroz više diferencijacijskih stadija tijekom dozrijevanja u TRAP<sup>+</sup> stanice koje razgrađuju kost (57-60). Stanice OCP fiziološki su prisutne u koštanoj srži, slezeni i među monocitima periferne krvi. Osteoklasti se iz stanica OCP mogu uzgojiti *in vitro* u prisutnosti čimbenika rasta M-CSF i RANKL, te izražavaju odgovarajuće receptore za te čimbenike: c-fms/CD115 i RANK (61, 62).

Glavni čimbenik osteoklastne diferencijacije RANKL je normalno izražen na osteoblastima, a mogu ga izražavati hipertrofični hondrociti i aktivirani limfociti T. Proresorptivni hormoni, citokini i upalni medijatori povisuju njegov izražaj, primjerice vitamin D<sub>3</sub>, paratireoidni hormon, prostaglandin E<sub>2</sub> te citokini TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-7, IL-11, IL-17 i IL-23. Iako je poznat niz sustavnih i lokalnih signala koji promiču diferencijaciju i aktivaciju osteoklasta, još uvijek je potrebno razjasniti fenotip i funkciju prethodničkih subpopulacija OCP preko kojih ti signali djeluju (63-66).

Istraživanja mišjih OCP koštane srži izdvojila su tri subpopulacije stanica s osteoklastogenim potencijalom, koje imaju fenotip B220<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>CD11b<sup>-/lo</sup>CD115<sup>+</sup> te su CD117<sup>hi</sup>, CD117<sup>lo</sup> ili CD117<sup>-</sup> (67, 68). Populacija OCP koštane srži u humaniziranom TNF- $\alpha$  transgeničnom mišjem modelu, karakteriziranom pojačanim izražajem humanog TNF- $\alpha$ , identificirana je među mijeloidnim stanicama CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup> (54). U SKG-modelu artritisa stanice OCP fenotipa CD11b<sup>-/lo</sup>Ly6G<sup>hi</sup> ekspandiraju u koštanoj srži i imaju potencijal diferencijacije u osteoklaste *in vitro* i *in vivo* (69).

Stanice s osteoklastogenim potencijalom također postoje u krvi i perifernim hematopoetskim tkivima (70). Subpopulacije OCP krvi i slezene dijele fenotip B220<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>hi</sup>CD115<sup>+</sup>CCR2<sup>hi</sup>CX3CR1<sup>+</sup> (71, 72). Model u kojem je utišan izražaj gena za IFN- $\gamma$  pokazao je ekspanziju CD11b<sup>+</sup> splenocita u CIA. Ta populacija može generirati osteoklaste koji posreduju osteodestrukciju u artritisu (73). Sustavno povišenje razine citokina TNF- $\alpha$  potiče ekspanziju cirkulirajuće progenitorske populacije CD11b<sup>hi</sup> u humaniziranom TNF- $\alpha$  transgeničnom mišjem modelu (74). Cirkulirajući mirujući usmjereni OCP u perifernoj krvi definirani su kao populacija CD11b<sup>+</sup>RANK<sup>hi</sup>, a prisutni su u malom broju i u koštanoj srži (75). Molekula CX3CR1, receptor za kemokin i adhezijsku molekulu fraktalkin, biljeg je dijela stanica mijeloidne loze, a izražavaju je i stanice OCP (76). Cirkulirajući OCP izražavaju receptor CXCR4 i pokazuju migracijsku sposobnost prema kemokinu CXCL12 matičnih stanica koštane srži (63). Kemokini koji se mogu vezati na receptor CCR1 (CCL3, CCL5, CCL7) povisuju mobilizaciju OCP *in vitro* (63). Unatoč brojnim istraživanjima koja su utvrdila fenotipski izražaj staničnih biljega perifernih i koštanih subpopulacija OCP, funkcionalna povezanost tih subpopulacija i obrazac njihove migracije u artritisu nisu jasno definirani.

Ljudska pluripotentna monocitno/makrofagna populacija podrijetla od matičnih hematopoetskih stanica s izražajem biljega CD14/CD18/CD11b/CD115 uspješno je diferencirana u funkcionalne osteoklaste (77). Povišen udio stanica CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> pronađen je u uzorcima periferne krvi bolesnika s psorijatičnim artritisom (78). Tretman pročišćenih perifernih mononukleara CD14<sup>+</sup> sinovijalnim fibroblastima bolesnika s reumatoidnim artritisom (79) ili citoknima IL-17 i IL-32 $\gamma$  (80), te tretman perifernih mononukleara CD11b<sup>+</sup> citokinom IL-17 (81), pojačava diferencijaciju osteoklasta *in vitro*. Slično, populacija stanica OCP periferne krvi, fenotipa CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>, nakon obrade sa sinovijalnom tekućinom bolesnika koji boluju od artritisa, zadobiva visok osteoklastogeni potencijal *in vitro* (82). Daljnja istraživanja ljudskih populacija osteoklastnih progenitora potrebna su kako bi se preciznije definirao njihov fenotip te mehanizmi citokinskog i kemokinskog privlačenja u zglobove zahvaćene upalom.

#### 1.4.2. Sposobnost migracije

Stanice imunskog sustava potaknute upalom i aktivirane sinovijalne stanice u artritisu stvaraju niz posrednika koji utječu na koštanu pregradnju, djelujući na pojačanje aktivnosti osteoklasta i smanjenje aktivnosti osteoblasta (13, 83, 84). U reumatoidnom artritisu pojačano se stvaraju proupalni citokini (IL-1, IL-6, IL-17, IL-18, TNF- $\alpha$ ) i kemokini (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5,



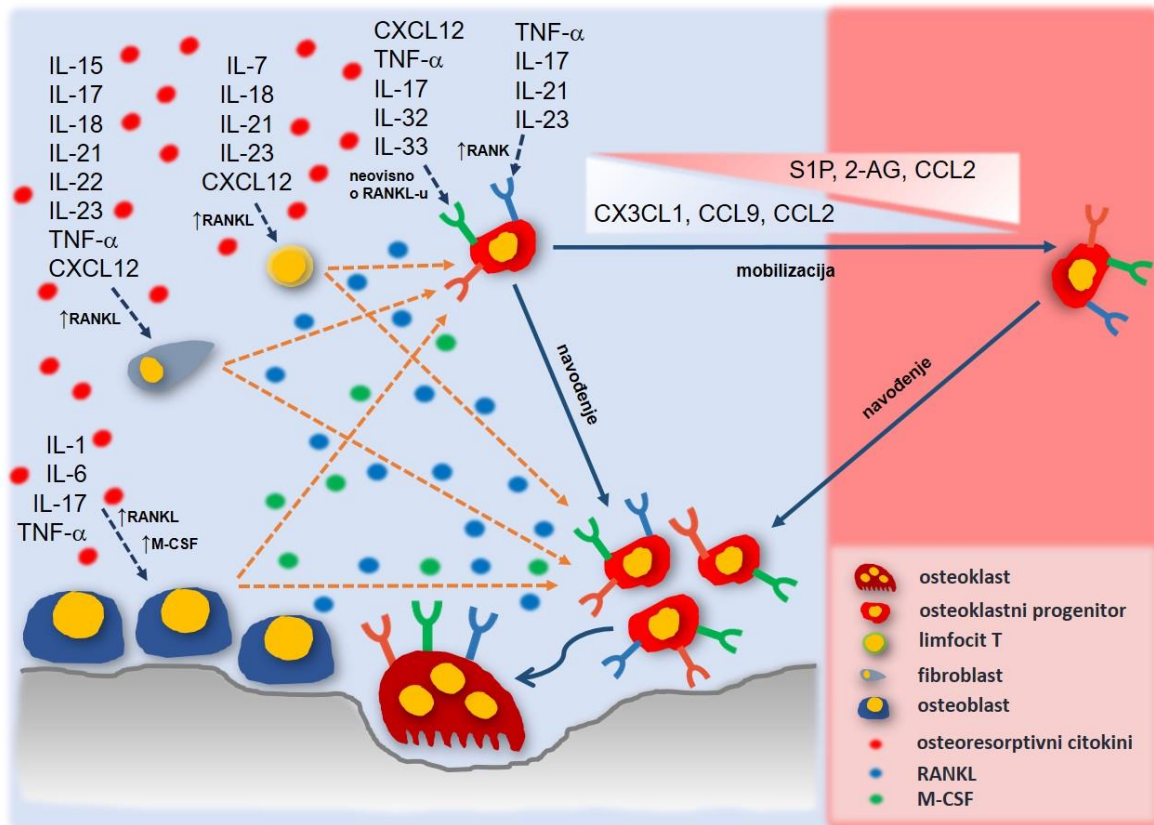
CXCL12), čimbenici rasta (vaskularni endotelni faktor rasta, VEGF, prema engl. *vascular endothelial growth factor*, transformirajući faktor rasta- $\beta$ , TGF- $\beta$ , prema engl. *transforming growth factor- $\beta$* ) i medijatori apoptoze (Fas-ligand, TNF-vezani ligand koji inducira apoptozu, TRAIL, prema engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) koji izravno ili neizravno, preko RANK/RANKL/OPG sustava, potiču osteoklastogenezu (84-87). Dokazano je da i malo povišenje razine sustavne upale može poticati diferencijaciju osteoklasta i koštanu resorpciju u kroničnim upalnim bolestima (64). Razvijeni su mnogi biološki lijekovi koji ciljaju upravo na sprječavanje djelovanja upalnih citokina (primjerice TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1), no njihov učinak nije u potpunosti zadovoljavajuć u kočenju aktivacije osteoklastnih stanica i koštane razgradnje u upali, što otvara prostor novim istraživanjima (88, 89).

Dosadašnjim istraživanjima nedvojbeno je dokazano postojanje više subpopulacija stanica OCP - cirkulirajuće populacije OCP i stanica OCP koštane srži (**Slika 4**). Uz to, nameće se činjenica da postoji utvrđena osteoklastna aktivnost na mjestima udaljenim od hematopoetski aktivne koštane srži. Iz toga proizlazi potreba za razjašnjavanjem sustava regulacije migracije stanica OCP, privlačenja na ciljna mjesta i koštane površine, te diferencijacije u zrele osteoklaste (90). Stanice OCP mogu se kretati ameboidno unutar parenhima koštane srži (91) te napustiti parenhim prateći kemotaktični gradijent sfingolipida S1P kojim obiluje cirkulirajuća krv (92), signaliziranjem pomoću S1P-receptora: S1PR1 i S1PR2 (76). Zreli osteoklasti kreću se sporije, poput mezenhimskih stanica, pa možemo reći da se u životnom vijeku osteoklastne loze izmjenjuje njihova mobilna, neresorptivna faza sa statičnom, resorptivnom, što je regulirano djelovanjem čimbenika RANKL (93).

Poznato je da stanice monocitne loze izražavaju brojne kemokinske receptore o kojima ovisi njihova uloga i migracijski potencijal u homeostatskim i upalnim uvjetima. S obzirom na mijeloidno podrijetlo, stanice OCP izražavaju kompleksan profil kemokinskih receptora, te podliježu djelovanju kemokinskih signala. U kontekstu mikrookoliša kosti i koštane srži postoji nekoliko parova kemokinskih receptora i liganada ključnih za specifičnu kemotaksiju stanica OCP na koštane površine (**Slika 4**). Receptori CCR1 i CCR5 promiču migraciju stanica OCP i zrelih osteoklasta te diferencijaciju progenitora *in vitro* i *in vivo*, a mogućnost vezanja na te receptore imaju i zajednički ligandi (CCL3, CCL5, CCL7) zbog redundantnosti kemokinskog sustava (63, 64, 94-97). Receptor CCR2 je izražen na ljudskim i mišjim stanicama OCP, a njegov ligand monocitni kemotaktični protein-1 (MCP-1, prema engl. *monocyte chemoattractant protein*, prema nomenklaturi nazvan CCL2) izražavaju osteoblasti, a izražaj se povisuje djelovanjem paratireoidnog hormona ili upale *in vitro* (98, 99). Receptor CX3CR1

i njegov ligand CX3CL1 izražen na osteoblastima imaju ulogu u diferencijaciji osteoklasta (72, 97, 100, 101), a miševi s isključenim genom za CX3CR1 pokazuju smanjen broj osteoklasta i blago povećanje koštane mase (101). Kanabinoidni receptor 2 (CB2, prema engl. *cannabinoid receptor-2*) čiji je ligand 2-arahidonoilglicerol (2AG, prema engl. *2-arachidonyl glycerol*) izražen je na osteoklastima. Njegovi antagonisti *in vitro* inhibiraju diferencijaciju osteoklasta, a miševi s isključenim genom za CB2 imaju smanjenu trabekularnu koštanu masu (102-104). Moguća njegova uloga je izdvajanje populacije OCP u zasebnu nišu unutar koštane srži koja je udaljena od mjesta aktivne osteoklastogeneze, uz moguće sudjelovanje signala putem receptora CXCR4 (90). Receptor CXCR4 je izražen na stanicama OCP u ljudi, njegov ligand je kemokin CXCL12 (ili SDF-1, prema engl. *stromal-cell derived factor 1*), kojeg izražavaju mezenhimske stromalne stanice te, u mnogo manjem obimu, zreli osteoblasti, a njihova interakcija značajna je u regulaciji ranih stadija osteoklastogeneze, brojnosti i lokalizaciji stanica OCP unutar koštane srži (14, 105).

Tijekom razvoja reumatoidnoga artritisa, u sklopu upalnog procesa unutar sinovijalnog tkiva i subhondralnog odjeljka koštane srži, pojačano se oslobađaju brojni kemokini koji potiču migraciju upalnih stanica, uključujući stanice OCP, prema zahvaćenim zglobovima. Postojeće terapijske strategije s ciljem blokiranja kemokinskih receptora ili liganada, testirane na eksperimentalnim modelima *in vivo*, kulturama ljudskih sinovijalnih stanica, te u malobrojnim kliničkim studijama, zasada ne pokazuju zadovoljavajuću učinkovitost u smanjenju intenziteta upale i upalne osteoresorpcije (56, 59, 90).



**Slika 4. Parakrina regulacija pojačane osteoklastogeneze u artritisu.** Bogati mikrookoliš citokina i kemokina koji se stvara u artritisu djeluje na različite stadije razvoja osteoklastne loze. Upalni medijatori pojačano stimuliraju osteoklastne progenitore te potiču njihovu maturaciju u zrele osteoklaste. Ti medijatori potiču osteoklastogenezu bilo izravnim djelovanjem (na osteoklastne progenitore) ili neizravnim djelovanjem (na stromalne stanice, osteoblaste, limfocite T i sinovijalne fibroblaste) poticanjem izražaja ključnog osteoklastogenog signala koji se ostvaruje djelovanjem čimbenika RANKL na aktivacijski receptor RANK. Tako aktivirani osteoklastni progenitori migriraju do lokalnih mjesta osteoresorpcije unutar zahvaćenog zgloba. Nasuprot tome osteoklastni progenitori mogu se i otpuštati u sustavnu cirkulaciju, uslijed kemokinskog gradijenta koji se ostvaruje djelovanjem liganada S1P, 2-AG i CCL2. Cirkulirajući, mirujući osteoklastni progenitori podložni su kemotaktičnim signalima koji ih privlače u zglobove zahvaćene artritisom, putem kemokinskih signala liganadima CX3CL1, CCL9 i CCL2. IL, interleukin; TNF- $\alpha$ , čimbenik nekroze tumora  $\alpha$  (prema engl. tumor necrosis factor  $\alpha$ ); RANK, receptor aktivatora jezgrenog čimbenika  $\kappa$ B (prema engl. *receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B*); RANKL, RANK ligand; M-CSF, čimbenik stimulacije kolonija makrofaga (prema engl. *macrophage colony-stimulating factor*); c-fms, receptor za M-CSF; S1P, sphingosine 1-phosphate; 2-AG, 2-arachidonyl glycerol; CCR, receptor za C-C kemokin; CXCR, receptor za C-X-C kemokin; CCL, kemokinski ligand s C-C motivom; CXCL, kemokinski ligand s C-X-C motivom.

## 2. Hipoteza

Osteoklastni progenitori, prisutni među monocitima periferne krvi, pod utjecajem proupalnih čimbenika u mišjem modelu reumatoidnog artritisa postaju brojniji, aktivniji i izražavaju karakterističan profil kemokinskih receptora, što omogućuje njihovo privlačenje kemokinskim signalima i nakupljanje na mjestima zglobnih upalnih lezija te diferencijaciju u aktivne osteoklaste i susljednu pojačanu koštanu razgradnju.

### 3. Ciljevi rada

Opći cilj rada jest razumijevanje promjena u subpopulacijama osteoklastnih progenitora i njihovog migracijskog potencijala u artritisu, posebice identificiranje subpopulacija osteoklastnih progenitora u lokalnim zglobnim lezijama i među perifernim hematopoetskim stanicama, njihovog migracijskog uzorka naseljavanja ciljnih zglobnih tkiva i njihove funkcionalne veze s gubitkom koštanog tkiva.

Specifični ciljevi istraživanja su:

1. Definirati subpopulacije osteoklastnih progenitora u perifernoj krvi, zahvaćenim zglobovima i periartikularnoj koštanoj srži u mišjem modelu artritisa.
2. Definirati osteoklastogenetski potencijal i fenotip subpopulacija osteoklastnih progenitora, posebice izražaj monocitnih biljega i kemokinskih receptora.
3. Definirati upalni mikrokoliš i ulogu specifičnih posrednika (kemokina) sustavno i u zahvaćenim zglobovima, koji potiču naseljavanje osteoklastnih progenitora u zglobne lezije.
4. Modulirati izražaj kemokinskih receptora i upalni/imunوسي odgovor u osteoklastnim progenitorima s ciljem sprječavanja migracije prema kemokinskom gradijentu i aktivacije osteoklasta u zglobnim lezijama.

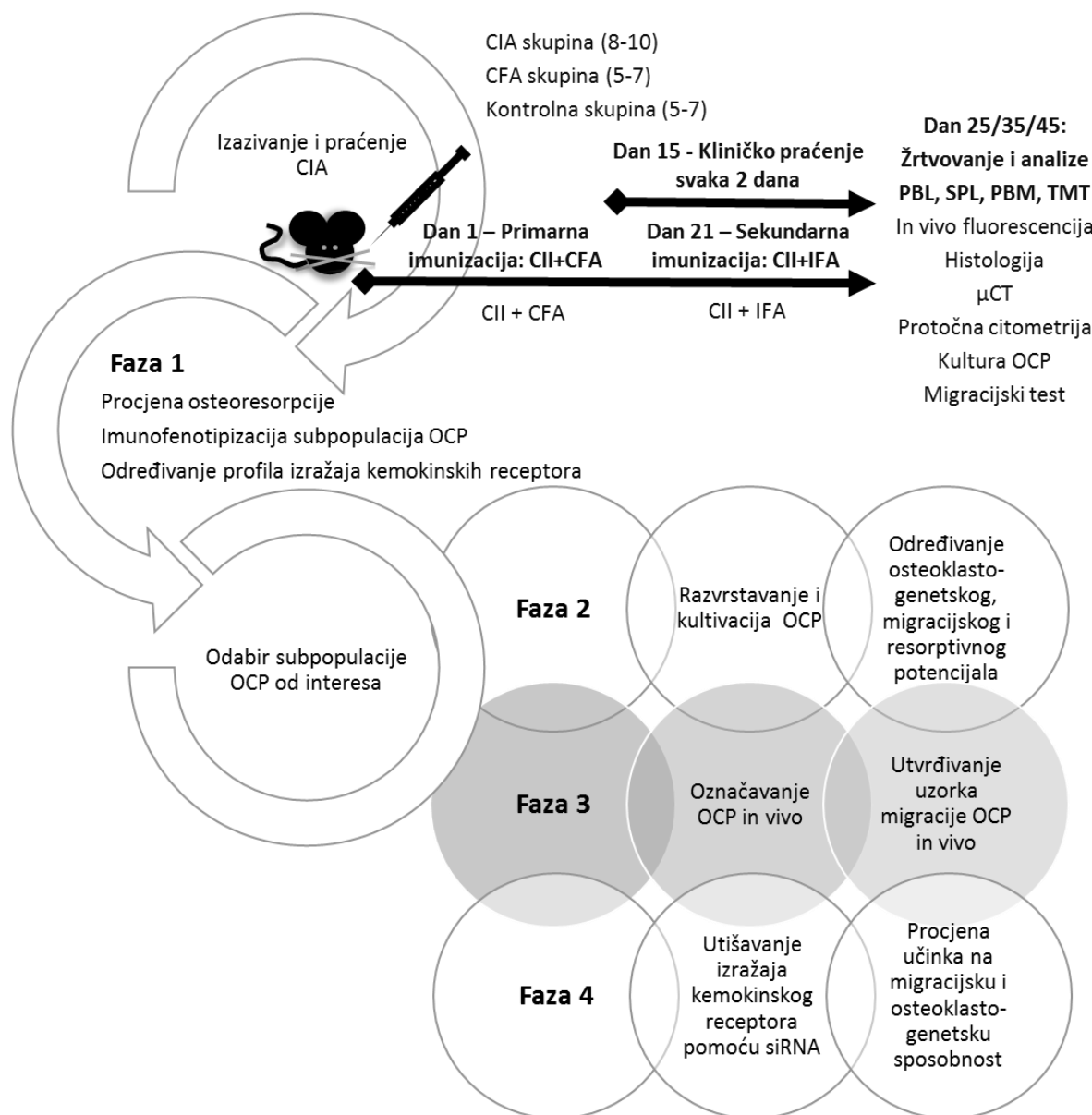
## 4. Materijali i metode

Pokusi su napravljeni u Laboratoriju za molekularnu imunologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga. Snimanje kostiju mikrokomputoriziranom tomografijom napravljeno je u Laboratoriju za mineralizirana tkiva Centra za translacijska i klinička istraživanja, a snimanje *in vivo* fluorescencijskog signala u Laboratoriju za regenerativnu neuroznanost „GlowLab“ Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

### 4.1. Plan istraživanja

Model CIA u visokosrođenom soju C57BL/6 miševa izazvan je primarnom imunizacijom intradermalnom injekcijom emulzije CII (Collagen from chicken sternal cartilage C9301, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, SAD) i CFA (BD Biosciences, San Jose, CA, SAD) sa 4 mg/mL inaktivirane *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (BD Biosciences) te sekundarnom imunizacijom 21 dan nakon primarne pri čemu je CFA zamijenjen IFA (BD Biosciences). Razvoj znakova artritisa klinički je praćen svaka 2 dana nakon 15. dana od primarne imunizacije. Kontrolna skupina uključivala je miševe u kojih nije izazvan artritis (kontrolna skupina ctrl, prema engl. *control*), a druga je kontrolna skupina imunizirana samo s CFA bez CII (CFA skupina) (**Slika 5**).

Niz provedenih pokusa podijeljen je u 4 faze sažeto prikazane dijagramom (**Slika 5**). U prvoj je fazi (Faza 1) praćena dinamika razvoja bolesti kliničkim pregledom, potvrđen je razvoj artritisa i pojačana osteoresorpcija *in vivo* fluorescentnim oslikavanjem i *ex vivo* mikrokomputoriziranom tomografijom ( $\mu$ CT, prema engl. *micro-computed tomography*). Uz to je histološki i histomorfometrijski potvrđena prisutnost osteitisa uz veći broj zrelih i aktivnih osteoklasta i koštanu resorpciju. Miševi su žrtvovani u tri vremenske točke (25, 35 i 45 dana nakon primarne imunizacije). Za obradu su prikupljeni uzorci krvi (za izdvajanje seruma i leukocita periferne krvi - PBL, prema engl. *peripheral blood leukocytes*), slezene (SPL, prema engl. *spleen*), koštane srži distalne tibije (PBM, prema engl. *periarticular bone marrow*, koštana srž uz upaljeni zglob) i femura (SBM, prema engl. *systemic bone marrow*, koštana srž udaljena od upaljenog zgloba) i tarzometatarzalni dio stražnje šape digestiran kolagenazom (TMT, prema engl. *tarsometatarsal tissue*). Protočnometrijski je analiziran fenotip i izražaj kemokinskih receptora na populacijama stanica OCP kao i promjene u udjelima populacija imunskih stanica (limfocitne, monocitne, granulocitne).



**Slika 5. Dijagram postupaka na miševima i faze istraživanja.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritis (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*) primarnom imunizacijom pilećim kolagenom tipa II (CII) u kompletnom Freundovom adjuvansu (CFA) te sekundarnom imunizacijom uz zamjenu kompletnog Freundovog adjuvansa inkompletnim (IFA). Razvoj znakova artritisa klinički je praćen svaki drugi dan nakon 15. dana od primarne imunizacije. Kontrolna skupina bila je bez tretmana, a druga je kontrolna skupina imunizirana samo s CFA bez CII (CFA skupina). Žrtvovanje je provedeno u tri vremenske točke (25, 35 i 45 dana nakon primarne imunizacije) u prvoj fazi studije, a kasnije su životinje žrtvovane između 35. i 40. dana. Uzeti su uzorci krvi (serum i stanice PBL, prema engl. *peripheral blood leukocytes*), slezene (SPL prema engl. *spleen*), koštane srži distalne tibije (PBM, prema engl. *periarticular bone marrow*) i tarzometatarzalni dio (mali zglobovi) stražnje šape digestirani kolagenazom (TMT, prema engl. *tarsometatarsal tissue*) te su provedene analize osteoklastnih progenitora (OCP) prema fazama istraživanja.

Fenotipski profil subpopulacija OCP od interesa, u odnosu na udio i izražaj kemokinskih receptora, pokazuje da u skupini CFA nema povećanja udjela stanica OCP u analiziranim tkivima, ni povećanja broj zrelih osteoklasta u zahvaćenim zglobovima, a, također, niti pojačane koštane resorpcije u odnosu na kontrolnu skupinu bez tretmana. Time je pokazano da umnažanje, zglobno naseljavanje i aktivacija stanica OCP nisu uzrokovane samim adjuvansom već specifično ovise o imunizaciji na kolagen i posljedičnoj zglobnoj upali. Sukladno glavnom cilju karakterizacije stanica OCP u artritisu, u nastavku istraživanja izostavljena je skupina CFA u skladu s pravilima „3R“ u radu s laboratorijskim životinjama, napose prilagodbom protokola istraživanja u svrhu smanjenja broja uporabljenih životinja (*refinement, reduction*).

U sljedećoj fazi (Faza 2), ranije definirane subpopulacije OCP razvrstane su pomoću staničnog razvrstavača BD FACSAria I (BD Biosciences) i uzgajane u osteoklastogenoj staničnoj kulturi te kulturi na koštanim pločicama kako bi se odredio njihov osteoklastogeni i resorptivni potencijal. Proliferacijski potencijal određen je kultivacijom stanica obilježenih fluorescentnom bojom karboksifluorescein sukcinimidil ester (CFSE, prema engl. *carboxyfluorescein succinimidyl ester*, eBiosciences, San Diego, CA, SAD) i analizom diobe pomoću protočne citometrije. Migracijski potencijal prema kemokinskom gradijentu određen je korištenjem komercijalno dostupnog sustava zdenaca odvojenih poriranom membranom (Transwell, Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, SAD).

U trećoj fazi (Faza 3) praćen je obrazac *in vivo* migracije OCP. U tu svrhu korišten je postupak *in vivo* intravaskularnog bojenja fluorescentno obilježenim protutijelima te transplantacija sortiranih OCP obilježenih bojom Cell Proliferation Dye eFluor® 670 (CPD, eBiosciences) i analiza protočnom citometrijom.

U posljednjoj fazi (Faza 4) ispitan je učinak utišavanja izražaja kemokinskog receptora *in vitro* pomoću unosa malih interferirajućih molekula RNA (siRNA, prema engl. *small interfering RNA*) u prethodno sortiranoj populaciji OCP na sposobnost migracije prema kemokinskom gradijentu.

## 4.2. Pokusne životinje

U radu su korišteni mužjaci visokosrođenog mišjeg soja C57BL/6 (H-2b) iz istog legla, u dobi između 10 i 12 tjedana, podijeljeni u pokusnu i dvije kontrolne skupine. Soj C57BL/6 odabran je zbog specifičnosti artritisa potaknutog kolagenom s dominantnim osteitisom te slabije izraženom sinovijalnom upalom i posljedičnom fibrozacijom zglobova u odnosi na češće



korišteni DBA soj. Kako je opisano u prethodnim istraživanjima (46), artritis u soju C57BL/6 ima kroničan tijek uz dominantnu resorpciju kosti koja omogućuje istraživanje uloge populacije OCP. Miševi su uzgojeni i tijekom pokusa držani u standardnim uvjetima nastambi za laboratorijske životinje Hrvatskog instituta za istraživanje mozga uz dnevnu regulaciju ciklusa svjetla (10 sati svjetla i 14 sati tame), temperaturu prostorije od 23 °C i vlažnost zraka od 50-60%, sterilizaciju kaveza i stelje te standardnu prehranu (4RF25 i 4RF21; Mucedola srl, Settimo Milanese, Italija) i slobodan pristup vodi. Broj u pojedinom pokusu varirao je ovisno o njihovoj dostupnosti (promjenljiv broj okota i veličine legla). Postupci na životinjama planirani su i provedeni u skladu s načelima dobre prakse u postupanju s pokusnim životinjama te slijedeći pravila „3R“ (prema engl. *replacement, reduction, refinement* - zamjena modela, smanjenje broja životinja, prilagodba modela), a izveli su ih za to osposobljeni istraživači. Svi su postupci odobreni od Ministarstva poljoprivrede i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Karakterizacija reakcije osteoklastnih progenitora na artritis“, voditeljice prof. dr. sc. D. Grčević. Za anesteziju i analgeziju kod bolnih postupaka (intradermalna injekcija prilikom imunizacije te uzimanje krvi iz orbitalnog sinusa) upotrijebljen je 2,5% tribromoetanol (2,2,2-Tribromoethanol, Sigma-Aldrich) u dozi od 0,25 mg/g intraperitonealno. Prilikom *in vivo* snimanja fluorescentnog signala korištena je inhalacijska anestezija 2% izofluranom (Forane, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, SAD). Žrtvovanje je izvršeno cervikalnom dislokacijom nakon anestezije tribromoetanolom. Upotrijebljeno je između 350 i 400 miševa. Svaki set pokusa ponovljen je tri puta.

### **4.3. Izazivanje artritisa potaknutog kolagenom i kliničko praćenje**

Artritis je izazvan prema modificiranim protokolima opisanim u istraživanjima Brand i sur. i Inglis i sur. (43, 45). Za primarnu imunizaciju korištena je emulzija otopine CII (Sigma-Aldrich) koncentracije 4 mg/mL u 10 mM octenoj kiselini i CFA (BD Biosciences) sa 4 mg/mL termički inaktivirane *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (BD Biosciences). Emulzija konačnih koncentracija 2 mg/mL CII i *Mycobacterium tuberculosis*, pripremljena je ponavljanim proštrecavanjem kroz iglu veličine 18G uz stalno držanje na ledu. Za sekundarnu imunizaciju na jednak je način pripremljena emulzija CII i IFA (BD Biosciences). Miševi u dobi 10-12 tjedana su podvrgnuti anesteziji i analgeziji 2,5% tribromoetanolom, izvagani i obrijani u području korijena repa s dorzalne strane. Nakon dezinfekcije ubodnog mjesta 70% etanolom, pomoću igle veličine 30G intradermalno je injicirano ukupno 100 µL emulzije CII i

CFA podijeljeno u tri uboda obostrano uz korijen repa. Sekundarna imunizacija provedena je 21 dan nakon primarne, injekcijom emulzije ukupno 100 µL CII i IFA te distalnijim ubodnim mjestom od prethodnog. Kontrolna skupina CFA tretirana je na jednak način, uz injekciju emulzije bez CII (emulzija CFA i 10 mM octene kiseline 1:1 kod primarne imunizacije te IFA i 10 mM octene kiseline 1:1 kod sekundarne imunizacije), a druga kontrolna skupina ctrl nije tretirana.

Pojava kliničkih znakova artritisa vizualno je ocijenjena u dvodnevnom razmaku prema ranije opisanoj ljestvici bodovanja (46, 106), počevši od 15. dana nakon primarne imunizacije do trenutka žrtvovanja. Znaci upale (oteklina, crvenilo, ukočenost zgloba) ocjenjuju se zasebno za svaku šapu te mogu iznositi 0 (bez promjena), 1 (oteklina i/ili crvenilo 1 prsta), 2 (oteklina i/ili crvenilo više od 1 prsta ili blaga oteklina šape), 3 (srednja oteklina i crvenilo šape) i najviše 4 (jaka oteklina i crvenilo šape s ankilozom) za svaku šapu uz konačan zbroj od najviše 16 bodova po mišu (jaka oteklina i crvenilo svih šapa uz ukočenost i nemogućnost hvatanja za rešetku kaveza) (Slika 6).



**Ctrl (0)**

**CIA (4)**

**Klinička ocjena razvoja artritisa**  
**(najviše 4 po šapi):**

**0 = bez znakova upale**

**1 = oteklina i/ili crvenilo 1 prsta**

**2 = oteklina i/ili crvenilo >1 prsta ili blaga oteklina šape**

**3 = srednja oteklina i crvenilo šape**

**4 = jaka oteklina i crvenilo šape s ankilozom**

**Slika 6. Klinička ocjena razvoja artritisa.** Miševima soja C57Bl/6 je izazvan artritis primarnom imunizacijom pilećim kolagenom tipa II u kompletnom Freundovom adjuvansu te sekundarnom imunizacijom uz zamjenu kompletnog Freundovog adjuvansa inkompletnim. Od 15. dana nakon primarne imunizacije do žrtvovanja klinički je praćen razvoj znakova artritisa uz bodovanje stanja svake šape zasebno te izražavanje konačnog zbroja intenziteta bolesti. Prikazane su prednja i stražnja šapa kontrolne skupine (Ctrl) bez znakova upale (0) te prednja i stražnja šapa miša s artritismom potaknutim kolagenom (CIA) s najvišom kliničkom ocjenom intenziteta artritisa (4).

#### 4.4. Imunoenzimsko određivanje anti-kolagenskih protutijela, kemokina i kolagenskog telopeptida u serumu

Uzorci krvi dobiveni su krvarenjem iz orbitalnog sinusa nakon analgezije i anestezije 2,5% tribromoetanolom, nakon čega su životinje žrtvovane cervikalnom dislokacijom. Uzorci su stajali 2 sata na sobnoj temperaturi kako bi se stvorio krvni ugrušak, a potom je serum iz krvi izdvojen centrifugiranjem 10 minuta na 7000 okretaja u minuti (rpm, prema engl. *revolutions per minute*) i pohranjen zamrzavanjem na -20 °C do analize.

Uzorci su analizirani u duplikatu pomoću imunoenzimske metode (ELISA, prema engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) za detekciju anti-kolagenskih protutijela izotipova IgG1 i IgG2a prema postojećem protokolu (44, 46). Svi postupci izvedeni su na sobnoj temperaturi. Serijska razrjeđenja mješavine seruma miševa s visokim intenzitetom bolesti upotrebljena su kao standard za konstrukciju relativne krivulje. Ukratko, pločice s 96 zdenaca obložene su preko noći sa 100 µL CII koncentracije 5 µg/mL. Isprane su 4 puta sa 0,05% otopinom Tween20 u fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatnim puferom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*), blokirane 1 sat sa 2% otopinom goveđeg serumskog albumina (BSA, prema engl. *bovine serum albumin*) u PBS-u, ponovno isprane pa inkubirane 2 sata s uzorcima seruma razrjeđenim 1:2000 u PBS-u. Nakon ponovnog ispiranja s 0,05% otopinom Tween20 u PBS-u (4 puta), u zdence je dodano 100 µl štakorskih protutijela anti-IgG1 i anti-IgG2a vezanih sa peroksidazom hrena (HRP, prema engl. *horseradish peroxidase*) (BD Biosciences), razrijeđenih 1:1000 u PBS-u. Nakon 1 sata inkubacije i ponovnog ispiranja dodano je 100 µL otopine supstrata 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, Sigma-Aldrich) i inkubirano 15-30 minuta uz praćenje razvoja boje. Za zaustavljanje reakcije dodano je 50 µL 10 mM otopine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Apsorpcija svjetlosti valne duljine 450 nm u zdencima izmjerena je pomoću spektrofotometra (Model 680 XR Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD). Titar protutijela izražen je u relativnim jedinicama prema krivulji standarda.

Serumske koncentracije C-terminalnog telopeptida kolagena tipa I (CTX-I, prema engl. *carboxy-terminal collagen crosslinks*), kemokinskog (C-C motiv) liganda 2 (CCL2, prema engl. *chemokine (C-C motif) ligand 2* ili MCP-1, prema engl. *monocyte chemoattractant protein 1*) te kemokinskog (C-X3-C motiv) liganda 1 (CX3CL1, prema engl. *chemokine (C-X3-C motif) ligand 1* ili fraktalkina) izmjerene su pomoću komercijalno dostupnih setova kemikalija za ELISA-u, prema uputama proizvođača: Mouse CTX-I ELISA kit (Cusabio Biotech Co., Wuhan, Kina) osjetljivosti 0,04 ng/mL, Mouse CCL2 SimpleStep ELISA Kit (Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo) osjetljivosti 0,487 pg/mL, Mouse CX3CL1 SimpleStep

ELISA Kit (Abcam), osjetljivosti 276 pg/mL. Ukratko, za mjerenje koncentracije CTX-I, mikrotitarska pločica iz seta prethodno je obložena kozjim anti-zečjim protutijelima. U zdence je dodano 40  $\mu$ L uzorka ili standardnog uzorka poznate koncentracije CTX-I. Potom je dodano 40  $\mu$ L mješavine zečjih protutijela anti-CTX-I te CTX-I vezanog sa HRP. Pločica je inkubirana 1 sat na 37 °C pri čemu dolazi do kompetitivne inhibicijske reakcije između CTX-I prisutnog u uzorcima i dodanog CTX-I vezanog sa HRP te dodanih protutijela. U zdence je nakon ispiranja dodan supstrat te se razvija obojenje obrnuto proporcionalno količini CTX-I prisutnog u uzorcima.

Za mjerenje serumske koncentracije kemokina CCL2 i CX3CL1, mikrotitarske pločice iz seta prethodno su obložene protutijelima na detekcijsku oznaku. U zdence je dodano 50  $\mu$ L razrijeđenog uzorka ili standardnog uzorka poznate koncentracije CCL2, odnosno CX3CL1. Potom je dodano 50  $\mu$ L mješavine anti-CCL2 protutijela vezanih s detekcijskom oznakom i anti-CCL2 protutijela vezanih s enzimom za razgradnju supstrata, odnosno anti-CX3CL1 protutijela vezanih s detekcijskom oznakom i anti-CX3CL1 protutijela vezanih s enzimom za razgradnju supstrata. Tijekom inkubacije 1 sat na sobnoj temperaturi dolazi do reakcije kemokina u uzorcima s dodanim protutijelima. U zdence se nakon ispiranja dodaje TMB supstrat te se razvija obojenje proporcionalno količini kemokina prisutnih u uzorcima.

Reakcija stvaranja boje se zaustavlja i odmah se izmjeri apsorpcija svjetlosti valne duljine 450 nm u zdencima pomoću spektrofotometra (Model 680 XR Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories). Koncentracija CTX-I i kemokina određena je prema konstruiranoj krivulji standarda dobivenoj očitanjem serijskih razrjeđenja standardnog uzorka poznate koncentracije iz pripadajućeg seta.

#### **4.5. Priprema jednostaničnih suspenzija iz uzoraka tkiva**

Uzorci krvi dobiveni su krvarenjem iz orbitalnog sinusa nakon analgezije i anestezije 2,5% tribromoetanolom, nakon čega su životinje žrtvovane cervikalnom dislokacijom. Krv se skupljala u epruvete s 800  $\mu$ L 8mM otopine antikoagulansa etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA, prema engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*) u PBS-u. Eritrociti su od leukocita razdvojeni sedimentacijom eritrocita na dekstranu. Krvi je dodano 800  $\mu$ L 2% otopine dekstrana u PBS-u i promješano te inkubirano 45 minuta na 37 °C. Pažljivo je otpipetiran bistri nadtalog do granice sedimentiranih eritrocita i ispran centrifugiranjem 5 minuta na 240 rcf (prema engl. *relative centrifugal force*). Dobiveni talog je resuspendiran u 1 mL PBS-a te se

propuštanjem suspenzije kroz sterilnu mrežicu s porama promjera 40  $\mu\text{m}$  (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) dobila jednostanična suspenzija PBL.

Koštana srž iz lijeve distalne tibije ili femura ištrcana je iz koštanog cilindra očišćenog od mišića pomoću plastične štrcaljke s 1 mL PBS-a i igle provrta 27G za distalnu tibiju i 23G za femur. Koštana srž iz femura po potrebi je lizirana da se uklone eritrociti u hipotonočnom amonijskom puferu (0,15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 mM  $\text{KHCO}_3$ , 0,1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ /PBS). Uzorci su isprani centrifugiranjem u PBS-u i propušteni kroz mrežicu s porama promjera 40  $\mu\text{m}$  kako bi se uklonile veće nečistoće i dobila jednostanična suspenzija PBM ili SBM.

Slezene su izvađene disekcijom uzdužnim peritonealnim rezom, izvagane, nasjeckane i usitnjene pritiskom klipa plastične štrcaljke u petrijevoj zdjelici s 1 mL PBS-a te proštrcane kroz iglu provrta 23G. Dio suspenzije tkiva je odijeljen za analizu, lizirani su eritrociti te je nakon ispiranja centrifugiranjem u PBS-u uzorak propušten kroz mrežicu s porama promjera 40  $\mu\text{m}$  kako bi se uklonile veće nečistoće i dobila jednostanična suspenzija SPL.

Mali zglobovi stražnje lijeve šape digestirani su u kolagenazi (Collagenase From Clostridium Histolyticum, Type IV, Sigma-Aldrich) kako bi se iz sinovijalnog tkiva, zglobne čahure i kosti oslobodile stanice. Koža, mišići, kandže i distalne falange prstiju su uklonjeni, kosti i zglobovi su sitno nasjeckani škaricama u epruvete s 300  $\mu\text{L}$  DPBS-a (Dulbecco modificirani PBS u koji su dodani  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  zbog bolje aktivnosti kolagenaze) završno s tibiotalarnim zglobom i držani na ledu. Dodana je otopina kolagenaze u DPBS-u do konačnog volumena 500  $\mu\text{L}$  i konačne koncentracije kolagenaze 1 mg/mL. Uzorci su inkubirani uz stalno protresanje 60 min na 37 °C. Potom je dodan hladni PBS sa 2% fetalnog goveđeg seruma (FBS, prema engl. *fetal bovine serum*) i uzorci su stavljeni na led. Digestat je propušten kroz mrežicu s porama promjera 40  $\mu\text{m}$  kako bi se uklonile veće nečistoće i dobila jednostanična suspenzija. Uzorci su isprani 2 puta sa PBS-om s 2% FBS-a centrifugiranjem 5 minuta na 240 rcf.

#### **4.6. *In vivo* fluorescentno oslikavanje**

Za analizu osteoresorpcije *in vivo* upotrebljena je fluorescentna proba (Cat K 680 FAST, PerkinElmer, Waltham, MA, SAD) koja se primjenjuje intravenski i proizvodi fluorescentni signal nakon cijepanja katepsinom K, enzimom oslobođenim iz osteoklasta. Oslobođeni fluorescentni signal snimljen je *in vivo* 18 sati nakon intravenske primjene 0,08 nmol/g fluorescentne probe koncentracije 0,02 nmol/ $\mu\text{L}$  u PBS-u uređajem IVIS Spectrum Imaging (PerkinElmer) uz anesteziju 2% izofluranom. Nakon 24 sata od primjene Cat K probe miševi

su žrtvovani i uzeti uzorci (lijeva i desna stražnja šapa i bedrena kost) snimljeni su *ex vivo*. Korištena je mogućnost snimanja epi-iluminacijom (izvor ekscitacije je iznad objekta) uz ekscitaciju valnom duljinom 605 nm i emisijske filtere 660, 680, 700, 720 i 740 nm te ekscitaciju valnom duljinom 675 nm (valna duljina 675 nm aktivira Cat K probu) i korištenje emisijskih filtera 720, 740, 760 i 780 nm (emisija Cat K probe najjača je na 720 nm). Pomoću pripadajućeg kompjutorskog programa Living Image v. 4.4.17106 (PerkinElmer) analizirana je 2D epifluorescencija uz korištenje postupka za razdvajanje signala probe od signala tkivne autofluorescencije („*Spectral Unmixing*“ - signali snimljeni kombinacijama ekscitacije i emisije koje ne odgovaraju Cat K probi). Fluorescentni signal kvantificiran je pomoću vizualne višebojne skale koja zorno prikazuje intenzitet signala mjeren u efikasnosti fluorescencije („*Radiant efficiency*“ - omjer emisije (photons/s/cm<sup>2</sup>/sr) i snage ekscitacije (μW/cm<sup>2</sup>)) koji se digitalno preklapa s fotografijom miša u uređaju.

Uređaj IVIS Spectrum Imaging također je korišten za praćenje naseljavanja fluorescentno obilježenih transplantiranih OCP u zahvaćene zglobove u vremenskim točkama 24h, 48h i 72h nakon transplantacije. Stanice za transplantaciju dobivene su uzimanjem slezene i perartikularne koštane srži miševa-donora nakon žrtvovanja. Potom je razvrstana definirana populacija OCP i obilježena fluorescentnom bojom CPD (eBiosciences) te transplantirana u miševe-primatelje intravenski (zbog singeničnosti soja riječ je o izotransplantaciji bez razvoja imunosne reakcije). Fluorescentni signal kvantificiran je kako je opisano u prethodnom odjeljku, no metoda se nije pokazala dovoljno pouzdanom i osjetljivom za mjerenje signala iz manjeg broja stanica.

#### **4.7. Mikrokompjutorizirana tomografija**

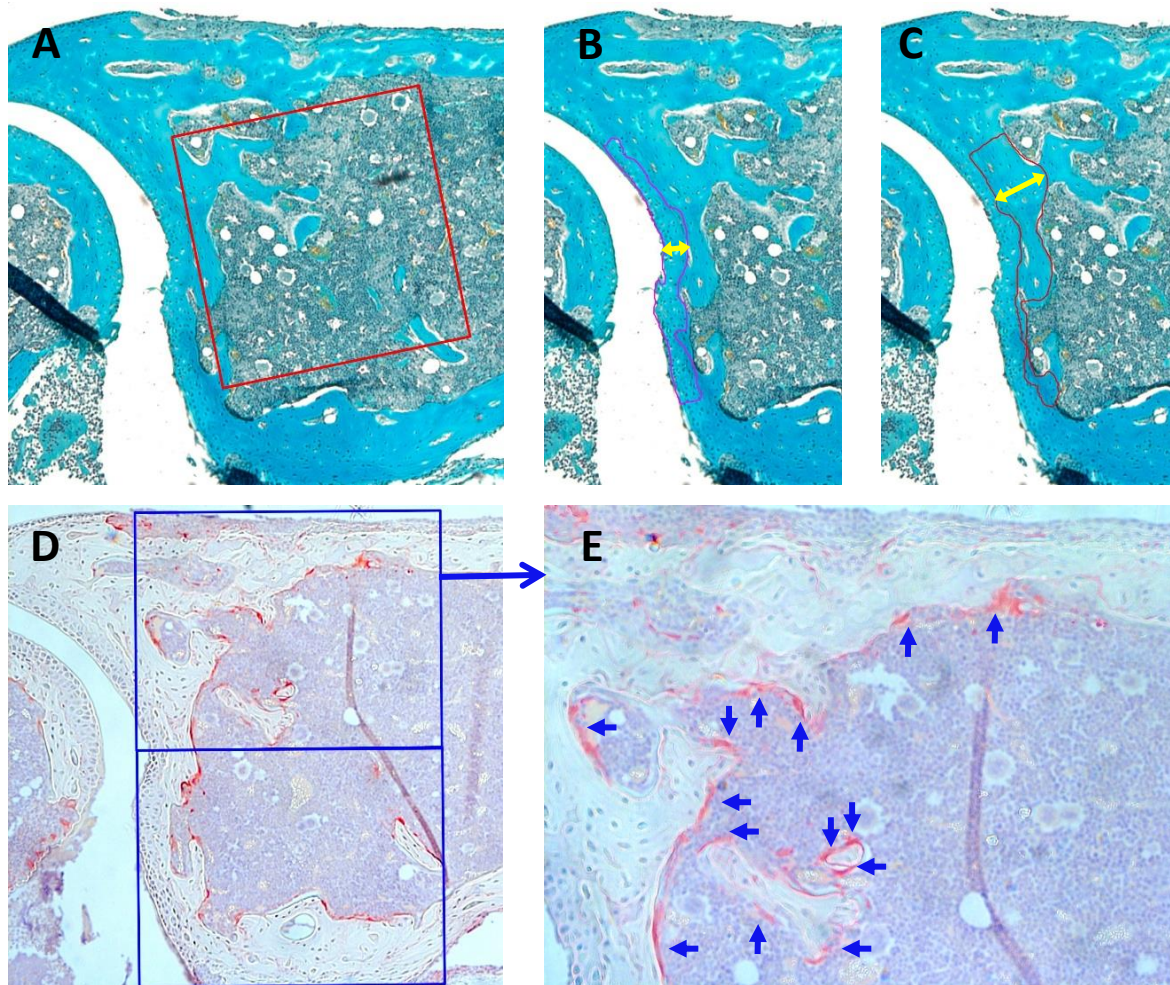
Nakon žrtvovanja uzeta je desna prednja noga u ramenu te desna stražnja noga u koljenu, uklonjena je koža te su uzorci fiksirani 24 sata na 4 °C u puferiranom 4% paraformaldehidu. Uzorci su zatim preseljeni u 70% etanol do snimanja kosti μCT-om pomoću sustava 1076 SkyScan In-vivo Micro-CT (SkyScan, Kontich, Belgija). Kostu su snimljene svakih 0,3° rotacije do 180°, uz faktor „*Averaging*“ 3, korištena je rezolucija od 9 μm i aluminijski filter debljine 0,5 mm. Rekonstrukcija slika napravljena je pomoću programa NRecon (SkyScan), a analiza promjena koštanog metabolizma i koštane destrukcije u artritisu uz 3D vizualizaciju napravljena je pomoću programa CTAn v.1.13 i CTVol (SkyScan). Analizom fragmenta talusa

debljine 0,3-0,4 mm određen je udio mineralizirane (kortikalne i trabekularne) kosti u ukupnom volumenu (BV/TV; %, prema engl. *Bone Volume/Total Volume*) (107, 108).

#### 4.8. Histološka i histomorfometrijska analiza

Patohistološke promjene u artritisu analizirane su na histološkim rezovima zglobova stražnjih šapa. Desna je stražnja šapa nakon snimljene mikrokompjutorizirane tomografije demineralizirana u otopini 14% EDTA u 3% paraformaldehidu 10 do 14 dana, isprana destiliranom vodom 30 minuta uz protresanje, preseljena u 70% etanol preko noći, zatim u 96% etanol preko noći pa u 100% etanol 2 sata. Potom su uzorci preseljeni u benzen 15 do 20 minuta i uklopljeni u parafinske blokove tijekom 6 sati. Serijski rezovi tibiotalarnog zgloba u sagitalnoj ravnini debljine 6  $\mu\text{m}$  izrezani su pomoću rotacijskog mikrotoma (Lieca SM 2000 R, Leica Biosystems, Nussloch, Germany), deparafinirani i obojeni hemalaun-eozinom (HE), Goldner-Masson-trikromom (GMT) i bojenjem na TRAP. Preparati obojeni HE i TRAP bojenjem analizirani su pomoću mikroskopa Axiovert 200 (Carl Zeiss, AG, Oberkochen, Njemačka), a histomorfometrijska analiza preparata obojenih po GMT provedena je pomoću mikroskopa Axio Imager (Carl Zeiss) priključenog na računalo sa programom za analizu kosti OsteoMeasure (Osteo-Metrics, Decatur, SAD) (46, 109). Značajke postupka po GMT su bojenje jezgri plavo do crno, eritrocita crvenkasto, mišića i fibroznog tkiva cigleno te kolagena zeleno (kost, hrskavica). Korištenjem objektiva 10x mjereni su parametri statičke histomorfometrije: udio trabekularne kosti (BV/TV; %) u regiji interesa (ROI, prema engl. *region of interest*); u distalni kraj tibije koji se uzglobljuje sa talusom postavljen je ROI kvadratić veličine 500x500  $\mu\text{m}$  (**Slika 7A**) tako da stranicom dodiruje hrskavicu, a obuhvaća subhondralnu i trabekularnu kost koja je označena ručnim ocrtavanjem; zatim debljina hrskavice (**Slika 7B**) i debljina subhondralne koštane ploče bez trabekula (**Slika 7C**) kao prosječna udaljenost između 2 ocrtane linije (Ir.L.Th., prema engl. *interlabel distance*;  $\mu\text{m}$ ). Korištena je srednja vrijednost dobivenih mjerenja na tri serijska reza.

Bojenje TRAP služi prvenstveno za identifikaciju TRAP<sup>+</sup> osteoklasta obojenih žarko crveno i smještenih uz koštane površine u resorpcijskim lakunama. Broj TRAP<sup>+</sup> osteoklasta izbrojen je na endostealnim površinama i trabekulama distalne tibije korištenjem objektiva 20x tako da su odabrana 2 susjedna vidna polja (**Slika 7D i 7E**). Korištena je srednja vrijednost dobivenih zbrojeva na 2 serijska reza.



**Slika 7. Princip histomorfometrijske analize i brojanja osteoklasta.** Tibiotalarni zglob serijski je izrezan u sagitalnoj ravnini. Na preparatima obojenim Goldner-Masson-trikromom (GMT) provedena je histomorfometrijska analiza koštanog tkiva (obojeno zeleno) distalne tibije i zglobne hrskavice. Korištenjem objektiva 10x mjereno je udio trabekularne kosti (BV/TV; %) u regiji interesa (ROI, prema engl. *region of interest*); u distalni kraj tibije koji se uzgobljuje sa talusom postavljen je ROI kvadratić (crveno) veličine 500x500  $\mu\text{m}$  (A) tako da stranicom dodiruje hrskavicu, a obuhvaća subhondralnu i trabekularnu kost; zatim su mjerene debljina hrskavice (B) i debljina subhondralne koštane ploče bez trabekula (C) kao prosječna udaljenost između 2 ocrtane linije (Ir.L.Th., engl. *interlabel distance*;  $\mu\text{m}$ ) označene žutom strelicom. Broj TRAP<sup>+</sup> osteoklasta kvantificiran je na endostealnim površinama i trabekulama distalne tibije korištenjem objektiva 20x, označeni plavim strelicama (E) tako da su odabrana 2 susjedna vidna polja, označena plavim pravokutnicima (D i E).



Značajke bojenja HE su plavo-ljubičasto obojenje jezgri, crvena citoplazma, izrazito crveni eritrociti, tamnocrveni mišići i ružičasto obojenje kolagena (kost, vezivno tkivo) dok hidrofobne strukture, primjerice masno tkivo, ostaje neobojeno. Bojenjem HE evaluirana je pojava sinovitisa (upalni infiltrat u sinovijalnom tkivu), osteitisa (zamjena masnog tkiva upalnim stanicama i pojačana prokrvljenost koštane srži), eksudata unutar zgloba te postojanje panusa i erozija zglobne hrskavice i subhondralne kosti.

#### **4.9. Analiza izražaja gena metodom qPCR**

Za mjerenje izražaja gena za osteoklastne gene (CD115/c-fms, c-Fos i RANK) u uzorcima sortiranih osteoklastnih progenitora, upalnih citokina (TNF-a, IL-6, IL-1 $\beta$ ) i kemokina (CCL2, CX3CL1) u tkivu slezene, koštane srži distalne tibije i digestiranih malih zglobova stražnje šape te za potvrdu utišavanja izražaja gena za kemokinske receptore (CCR2 i CX3CR1) primjenom siRNA korištena je metoda kvantitativne lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (real-time qPCR, prema engl. *real time quantitative polymerase chain reaction*).

Uzorci sortiranih OCP uzeti su odmah nakon završetka razvrstavanja (50 do 300 000 stanica ovisno o populaciji). Uzorci jednostaničnih suspenzija SPL, PBM i TMT uzeti su i pripremljeni odmah nakon žrtvovanja. Uzorci sortiranih OCP tretiranih sa siRNA skupljeni su iz zdenaca stanične kulture 24 sata nakon transfekcije pomoću otopine enzima TrypLE Express (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Uzorci su isprani PBS-om i centrifugirani na 250 rcf tijekom 5 minuta, zatim je na stanični talog dodano 0,5 mL otopine za izolaciju RNA (TRIzol, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), nakon čega su žustro promiješani, inkubirani na sobnoj temperaturi 2 minute i smrznuti na -20 °C do izolacije stanične RNA. Nakon odmrzavanja u uzorke je dodano 200  $\mu$ L kloroforma, promiješano i inkubirano 2 minute na sobnoj temperaturi te centrifugirano 15 minuta na 12000 g, na temperaturi +4 °C. Centrifugiranjem se sadržaj uzorka razdijelio u 3 sloja. Gornji sloj (koji sadrži RNA) je pažljivo odpipetiran u novu epruvetu (bez RNA onečišćenja). Potom je dodan 70%-tni izopropanol u omjeru 1:1. Uzorci su potom smrznuti preko noći na -80 °C. Nakon odmrzavanja centrifugirani su ponovo tijekom 15 minuta na 12000 g, na temperaturi +4 °C. Odliven je supernatant, a na talog je dodan 1 mL 75%-tnog etanola te su uzorci ponovno centrifugirani 5 minuta na 7500 g i temperaturi od +4 °C. Nakon uklanjanja nadtaloga uzorci RNA su otvorenih epruveta stavljeni na ledeni blok -20 °C i ostavljeni nekoliko minuta da preostali etanol ishlapi i potom otopljeni u 10  $\mu$ L destilirane vode. Pomoću UV-VIS

spektrofotometra za mjerenje malih uzoraka (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, SAD) izmjerene su vrijednosti koncentracije i čistoće izolirane RNA.

Po 1 µg izolirane RNA iz svakog uzorka obrnuto je prepisan u komplementarnu DNA (cDNA, prema engl. *complementary DNA*) reakcijom reverzne transkripcije pomoću komercijalno dostupnog seta reagensa High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), slijedeći upute proizvođača. Postupak uključuje dodavanje deoksiribonukleotida, početnica, RT-pufera, mješavine enzima reverzne transkriptaze i inhibitora RNaza u svaki od uzoraka te inkubaciju na 37 °C u trajanju od 60 minuta nakon čega se reakcija zaustavlja grijanjem na 95 °C tijekom 5 minuta. Dobivena cDNA je pohranjena na -20 °C do daljnje upotrebe.

Umnažanje dobivene cDNA, koja odgovara 20 ng obrnuto prepisane RNA, qPCR metodom u stvarnom vremenu, provedeno je uređajem ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) u duplikatu. Izmjeren je izražaj gena pomoću komercijalno dostupnih setova za detekciju TaqMan Assay (Applied Biosystems) koji sadrži specifične početnice za mjereni gen te probe specifične za mjereni gen obilježene fluorescentnom bojom 6-FAM na 5' kraju i prigušivačem fluorescencije (NFQ, prema engl. *nonfluorescent quencher*) na 3' kraju i TaqMan Gene Expression Master mix (Applied Biosystems) koji sadrži DNA polimerazu (AmpliTaq Gold DNA polymerase, Applied Biosystems) i deoksiribonukleotide u odgovarajućoj puferskoj otopini. Postupak je proveden prema uputama proizvođača. Princip reakcije je oslobađanje fluorescentne boje djelovanjem DNA polimeraze kod umnažanja lanaca te tako fluorescencija raste s brojem umnoženih fragmenata DNA. Proba se veže za cDNA mjenog gena između početnica pa DNA polimeraza, produljujući početnice, cijepa probu čime se fluorescentna boja odvaja od prigušivača NFQ. Uzorci u reakcijskoj smjesi ispipetirani su u pločicu s 96 zdenaca (ABI Prism Optical 96-Well Plate, Applied Biosystems), inkubirani 2 minute na +50 °C kako bi se aktivirao enzim uracil N-glikozilaza (AmpErase; Applied Biosystems) za uklanjanje vezanog uracila, a potom 10 minuta na +95 °C da bi se uracil N-glikozilaza inaktivirala, a aktivirala DNA polimeraza i započela sinteza DNA. Slijedi 40 naizmjeničnih ciklusa inkubacije na +95 °C 15 sekundi i +60 °C 60 sekundi (izmjena denaturacije cDNA na temperaturi 95°C i vezanja početnica i ponovne sinteze DNA na temperaturi 60 °C). Količina umnoženih fragmenata DNA izmjerena je mjerenjem intenziteta fluorescencije, čija su očitavanja prikazana grafički (broj ciklusa na apscisi, intenzitet fluorescencije na ordinati, prikazan logaritamski kao razlika izmjerene fluorescencije reakcije

i „temeljne“ fluorescencije). Sredinom eksponencijalnog rasta krivulje umnažanja izabran je arbitrarni prag intenziteta fluorescencije za određivanje kritičnog broja ciklusa ( $C_T$ , prema engl. *cycle threshold*) koji služi za interpretaciju relativne količine RNA za ciljni gen. Relativna količina cDNA je dobivena upotrebom standardne krivulje serijskih razrjeđenja kalibracijskog (kontrolnog) uzorka, a relativna količina mRNA za mjereni gen je izražena u odnosu na količinu mRNA  $\beta$ -aktina izabranog za endogenu kontrolu.

#### 4.10. Protočna citometrija i razvrstavanje stanica

Pripremljene su jednostanične suspenzije uzoraka koštane srži distalne tibije i femura, slezene, periferne krvi te digestiranog tarzometatarzalnog dijela šape. Po 10  $\mu$ L suspenzije obojeno je u 90  $\mu$ L 0,05%-tnog tripanskog modrila kako bi se obojile mrtve stanice, a neobojene stanice su izbrojene u komorici po Bürker-Türku te je izračunata njihova koncentracija u suspenziji. Za obilježavanje monoklonalnim protutjelima uzeto je do  $2-5 \times 10^6$  stanica iz suspenzije. Stanice su obilježene mješavinom komercijalno dostupnih monoklonalnih protutjela specifičnih za mišje biljege, direktno vezanih s jednom od fluorescentnih boja: fluorescein izotiocijanat (FITC, prema engl. *fluorescein isothiocyanate*), fikoeritrin (PE, prema engl. *phycoerythrin*), peridin-klorofil-cijanin5.5 (PerCP-Cy5.5, prema engl. *peridinin-chlorophyll-cyanine5.5*), fikoeritrin-cijanin7 (PE-Cy7, prema engl. *phycoerythrin-cyanine7*), alofikocijanin (APC, prema engl. *allophycocyanine*), alofikocijanin-cijanin7 (APC-Cy7, prema engl. *allophycocyanine-cyanine7*), APC-eFluor780, PerCP-eFluor710 i Alexa Fluor 488, ili vezanih sa biotinom, u kojem slučaju je postojao drugi korak bojenja sa streptavidinom vezanim s nekom od ranije nabrojanih fluorescentnih boja te PE-CF594, proizvođača eBioscience (San Diego, CA, SAD), BD Biosciences (San Jose, CA, SAD) ili BioLegend (San Diego, CA, USA). Za označavanje mrtvih stanica korištene su boje 7-amino-actinomycin D (7AAD, eBioscience) ili 4',6'-diamidin-2'-fenilindol dihidroklorid (DAPI, prema engl. 4',6'-diaminidine-2'-phenylindole dihydrochloride, Sigma-Aldrich) koje prolaze kroz propusniju membranu mrtvih stanica i vežu se za nukleinske kiseline. Kako bi se spriječilo nespecifično vezanje, stanični receptori za ulomak Fc blokirani su pomoću Fc-bloka (anti-CD16/32, eBioscience).

Korištena su protutjela na limfoidne biljege (anti-CD3 FITC klon 145-2C11, anti-B220 FITC klon RA3-6B2, anti-NK1.1 FITC klon PK136), mijeloidne biljege (anti-Gr1 PE klon RB6-8C5, anti-CD11b PE-Cy7 klon M1/70, anti-CD115/c-fms PE-Cy7 ili vezan za biotin klon AFS98, anti-Ly6C PE klon HK1.4, anti-CD16/32 PE-Cy7 klon 93, anti-Ly6G PerCP-Cy5.5 klon 1A8,

anti-F4/80 APC-eFluor780 klon BM8), biljege matičnih stanica (anti-CD34 APC klon HM34, anti-Sca1 FITC klon D7, anti-CD127 PE klon A7R34, anti-CD117/cKit APC-eFluor780 klon 2B8), panhematopoetski biljeg (anti-CD45 APC ili PerCP-Cy5.5 klon 30-F11) i kemokinske receptore (anti-CX3CR1 PE ili APC klon SA011F11, anti-CCR2/CD192 PE klon SA203G11, anti-CCR5/CD195 PE klon HM-CCR5, anti-CXCR4/CD184 PerCP-eFluor710 klon L276F12, anti-CCR9/CD199 PerCP-eFluor710 klon 9B1, anti-CCR3/CD193 APC klon J073E5, anti-CCR1/CD191 APC klon S15040E).

Suspenzije stanica i protutijela su inkubirane 40 minuta u tami, na ledu, nakon čega je suvišak nevezanih protutijela ispran PBS-om s 2% FBS-a. U drugom koraku za protutijela označena biotinom, stanice su bojene streptavidinom vezanim s fluoroforom 30 min u tami, na ledu, nakon čega su ponovno isprane u PBS-u s 2% FBS-a. Stanice su u konačnici resuspendirane u 200-300  $\mu$ L PBS-a s 2% FBS-a te je dodana boja za označavanje mrtvih stanica.

Fenotipizacija je provedena na protočnom citometru Attune (Life Technologies, ABI, Carlsbad, CA, SAD), opremljenom s 2 lasera i mogućnosti istovremene detekcije do 6 različitih fluorofora te BD FACS Aria I (BD Biosciences, San Jose, CA, SAD) opremljenom s 3 lasera i mogućnosti istovremene detekcije do 9 različitih fluorofora. Za analizu je skupljeno do najviše  $10^6$  događaja (signal zabilježen detektorom uređaja). Podatci su analizirani pomoću programa FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, SAD). Negativnost na biljeg bilježena je znakom -, niži broj receptora na staničnoj površini, odnosno nizak intenzitet fluorescencije kraticom „lo“ (prema engl. *low*), pozitivnost znakom +, a vrlo visok broj receptora na staničnoj površini, odnosno visok intenzitet fluorescencije kraticom „hi“ (prema engl. *high*). OCP su definirani kao monocitna subpopulacija fenotipa CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup> u krvi i slezeni te CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>lo/-</sup>CD115<sup>+</sup> u koštanoj srži (18, 46, 72). Na toj je populaciji nadalje analiziran izražaj različitih kemokinskih receptora (CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CCR9, CX3CR1, CXCR4). Analiza je provedena uz korištenje nebojenih stanica te kontrolnih uzoraka obojenih kombinacijom protutijela u kojoj nedostaje fluorescentna boja za koju se usporedbom s uzorkom želi odrediti nivo intenziteta fluorescencije (FMO, prema engl. *fluorescence minus one*).

Specifične populacije OCP (CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>lo/-</sup>CD115<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup> i CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>lo/-</sup>CD115<sup>+</sup>CCR2<sup>-</sup>) iz koštane srži PBM razvrstane su pomoću instrumenta BD FACS Aria I i korištene za staničnu kulturu osteoklasta, migracijski test, qPCR, siRNA utišavanje i transplantaciju. Stanice su razvrstavane brzinom 5000 stanica u sekundi uz korištenje ranije opisane strategije Jacquin i sur. (67) i Jacome-Galarza i sur. (72). Ukratko, na

FSC vs. SSC prikazu odabrana je populacija stanica iz koje su potom isključene mrtve stanice na temelju DAPI signala. Sljedeće je prikazan signal anti-limfoidnih markera vs CD11b te je odabrana populacija OCP ovisno o uzorku i dalje rasčlanjena ovisno o izražaju CD115 i kemokinskih biljega. Stanice su sortirane u epruvete zapremnine 2 mL sa dodanim medijem za staničnu kulturu  $\alpha$ -minimalni esencijalni medij ( $\alpha$ -MEM, prema engl.  *$\alpha$ -minimal essential medium*) s 10% FBS-a. Preciznost razvrstavanja stanica utvrđena je reanalizom razvrstanih populacija te je utvrđena čistoća razvrstanih populacija 95-99%.

#### **4.11. Mjerenje koncentracije citokina i kemokina u serumu metodom multipleks imunoeseja i protočnom citometrijom**

Protočnociometrijska metoda kvantifikacije proteina u serumu omogućuje da se u maloj količini pojedinog uzorka može odrediti mnogo analita istovremeno (više od 10) i dobra je metoda za profiliranje proupalnih molekula u serumu. Temelji se na mikročesticama obloženim protutijelima koja specifično vežu analit, a uz svaki je analit uparena posebna mikročestica čija je svojstva moguće razlikovati protočnociometrijskim parametrima. Multipleks imunoesej izveden je pomoću komercijalno dostupnog seta i prema uputama proizvođača: Mouse Multiplex Immunoassay Core Kit (Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo), Mouse Multiplex Immunoassay Protein Standard Mix A (Abcam) te setova posebnih mikročestica na koje su vezana protutijela specifična za svaki od analiziranih citokina – TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-1 $\beta$ , GM-CSF, IL-5, IL-2, CCL2/MCP1, IL-10, IL-6, IL-12p70 Multiplex Immunoassay Kit (Abcam).

Uzorci seruma dobiveni su kako je prethodno opisano. Zatim je u pločicu s 96 zdenaca dodana mješavina mikročestica obloženih protutijelima, potom su dodani uzorci i standardni uzorci, nakon inkubacije od 1 sat i ispiranja dodana su biotinilirana detektorska protutijela, nakon inkubacije od 1 sat dodana je otopina koja sadrži fluorokrom, nakon ponovnog ispiranja dodan je pufer za protočnociometrijsku analizu te su uzorci propušteni na protočnom citometru Attune (Life Technologies) uz korištenje pripadajućeg komercijalno dostupnog seta postavki. Za analizu rezultata korišten je program Firefly Analysis Workbench (Abcam).

#### 4.12. Stanična kultura osteoklasta i kultivacija na koštanim pločicama

Stanice OCP koštane srži PBM su nakon razvrstavanja ( $CD3^+B220^-NK1.1^-Ly6G^-CD45^+CD11b^{lo/-}CD115^+CCR2^+$  i  $CD3^+B220^-NK1.1^-Ly6G^-CD45^+CD11b^{lo/-}CD115^+CCR2^-$ ) zasađene u pločicu za staničnu kulturu s 96 zdenaca u gustoći 6000, 7000, 10 000 ili 30 000 stanica po zdencu, ovisno o pokusu. Uzgajane su u 200  $\mu$ L osteoklastnog diferencijacijskog medija  $\alpha$ -MEM obogaćenog sa 10% FBS-a, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina, te 30 ng/mL rekombinantnog mišjeg (rm, prema engl. *recombinant mouse*) M-CSF-a (R&D Systems, NE Minneapolis, MN, SAD) i rmRANKL-a (R&D Systems). Kultura je inkubirana u standardnim uvjetima na temperaturi od 37 °C u ovlaženom zraku s 5% CO<sub>2</sub>, uz promjenu 50% hranjivog medija svakih 48 sati.

Praćen je razvoj velikih stanica s više jezgara kako bi se odredio pogodan trenutak za analizu te se uzgoj osteoklasta prekidao 3. do 5. dana. Stanice u zdencima fiksirane su 4%-tnim paraformaldehidom kroz 10 minuta i obojene pomoću komercijalno dostupnog seta za histokemijsko bojenje (Leukocyte acid phosphatase kit, Sigma-Aldrich) prema uputama proizvođača. Ljubičasto obojene TRAP<sup>+</sup> stanice s tri ili više jezgara prebrojane su pomoću invertnog svjetlosnog mikroskopa Axiovert 200 (Carl Zeiss), objektivom povećanja 100x.

Resorptivni potencijal osteoklasta diferenciranih *in vitro* ispitan je kultivacijom na koštanim pločicama modifikacijom prethodno opisanih sličnih protokola (110, 111), uz medij i uvjete kako je opisano ranije. Nakon razvrstavanja, populacije OCP zasađene su u pločicu za staničnu kulturu s 96 zdenaca na čije je dno umetnut komadić sonicirane i sterilizirane (UV zrakama) goveđe kortikalne kosti dimenzija 4.4x4.4x0.2 mm. Stanice su u malom volumenu (10-15  $\mu$ L) diferencijacijskog medija nasađene na koštanu pločicu u gustoći 15 000 stanica po zdencu te inkubirane 1 sat kako bi se omogućila adherencija na samu kost. Potom je dodan preostali medij i nastavljen uzgoj 15-25 dana uz promjenu 50% medija svakih 48 sati. Stanice su uklonjene s kosti sonikacijom 5 minuta u 0,25 M otopini NH<sub>4</sub>OH. Komadići kosti su obojeni 1%-tnim toluidinskim modrilom s puferom 1% boraksa 2 minute. Time se pojačava kontrast između udubljenja resorpcijskih lakuna nastalih djelovanjem osteoklasta i netaknute površine kosti te omogućuje analiza svjetlosnim mikroskopom (Axiovert 200, Carl Zeiss), objektivom povećanja 200x.

#### **4.13. *In vitro* migracijski test prema citokinskom gradijentu**

Migracijski potencijal prema citokinskom gradijentu prethodno razvrstanih OCP (CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>lo/-</sup>CD115<sup>+</sup>) iz PBM te OCP tretiranih sa siRNA izveden je pomoću komercijalno dostupnog sustava zdenaca odvojenih poriranom membranom (Transwell, Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, SAD). Riječ je o pločici za staničnu kulturu s 24 zdenca u koje je umetnut manji zdenac na čijem je dnu membrana s porama veličine 8 μm. U gornji zdenac stavljeno je 20 000 stanica u volumenu od 100 μL α-MEM medija sa 10% FBS, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina. U dnu donjeg zdenca prethodno je stavljeno 500 μL α-MEM medija sa 10% FBS, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina i 10 ng/mL kemokina CCL2 (PeproTech, Rocky Hill, NJ, SAD) ili 1 μg/mL kemokina CX3CL1 (Novus Biologicals, Abingdon, Ujedinjeno Kraljevstvo). Nakon 3 sata inkubacije na temperaturi od 37 °C u ovlaženom zraku s 5% CO<sub>2</sub>, gornji zdenci su izvađeni te im je gornja površina membrane isprana PBS-om, a preostale stanice oprezno su uklonjene pamučnim štapićem. Stanice koje su migrirale na donju stranu membrane fiksirane su 4%-tnim paraformaldehidom 5 minuta, isprane PBS-om te obojene fluorescentnom bojom DAPI (Sigma-Aldrich) 2 μg/mL, koja boji DNA stanične jezgre. Stanice su prebrojane pomoću invertnog fluorescentnog mikroskopa (Axiovert 200, Carl Zeiss) spojenog sa CCD kamerom (Carl Zeiss) u 7 središnjih vidnih polja kamere po membrani, uz objektiv povećanja 200x.

Stanice koje su prošle kroz membranu u donji zdenac pločice kultivirane su u diferencijacijskom mediju α-MEM sa 10% FBS-a, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina, uz 30 ng/mL rmRANKL-a i 30 ng/mL rmM-CSF-a i promjenu 50% medija svaka 72 sata do pojave velikih višejezgrenih stanica (5-6 dana). Potom su pločice fiksirane i obojene histokemijskim bojenjem na TRAP zbog kvantifikacije osteoklasta, kako je prethodno opisano.

#### **4.14. *In vitro* proliferacijski test**

Razvrstane populacije OCP iz PBM (CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>lo/-</sup>CD115<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup> i CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>lo/-</sup>CD115<sup>+</sup>CCR2<sup>-</sup>) obilježene su fluorescentnom bojom CFSE (eBiosciences) koja se veže za stanične proteine te se diobom stanice jednako raspodjeljuje u stanice kćeri. Intenzitet fluorescencije tako se progresivno smanjuje u svakoj diobi te je protočnom citometrijom prema intenzitetu fluorescencije moguće razlikovati generacije podijeljenih stanica.

Obojene i neobojene (kontrolne) stanice zasađene su u pločicu za staničnu kulturu s 48 zdenaca u gustoći 30 000 stanica po zdencu. Uzgajane su u 400  $\mu$ L diferencijacijskog medija  $\alpha$ -MEM obogaćenog sa 10% FBS-a, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina, uz 30 ng/mL rmM-CSF-a (R&D Systems) i rmRANKL-a (R&D Systems). Kultura je inkubirana u standardnim uvjetima na temperaturi od 37 °C u ovlaženom zraku s 5% CO<sub>2</sub>. Nakon 48 sati uzorci su skupljeni iz zdenaca pomoću otopine enzima TrypLE Express (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Uzorci su isprani PBS-om i centrifugirani na 250 g tijekom 5 minuta pa resuspendirani u PBS-u sa 2% FBS-a te 2,5  $\mu$ L 7AAD po uzorku kako bi se iz analize isključile mrtve stanice. Potom je fluorescentni signal snimljen pomoću protočnog citometra Attune (Life Technologies) i analiziran pomoću programa FlowJo (TreeStar) uz korištenje sučelja „FlowJo Proliferation function“ za analizu stanične diobe. Određen je broj dioba te broj podijeljenih stanica po generacijama, indeks proliferacije i indeks diobe za svaki uzorak (112, 113).

#### **4.15. Primjena male interferirajuće RNA**

Razvrstana populacija OCP iz PBM (CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>-/lo</sup>CD115<sup>+</sup>) elektroporirana je pomoću sustava za transfekciju Neon (Neon Transfection System, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) prema uputama proizvođača, korištenjem sljedećih parametara elektroporacije: napon pulsa 1700 V, trajanje pulsa 20 milisekundi, uz jedan puls. Upotrebljen je komercijalno dostupan set pripadajućih kemikalija i pribora (Neon Transfection System 10  $\mu$ L Kit, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Korišteni su nastavci za elektroporacijsku pipetu zapremnine 10  $\mu$ L, a u reakcijskoj smjesi nalazilo se 200 000 stanica uz dodanu komercijalno dostupnu mješavinu aktivne siRNA (ON-TARGET plus Mouse Ccr2 ili Cx3cr1 siRNA- SMART pool, Dharmacon, Horizon Discovery, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo) ili kontrolne siRNA (ON-TARGET plus Non-targeting Pool, Dharmacon), u odgovarajućem puferu, s ciljem utišavanja translacije i sinteze kemokinskog receptora odgovornog za migraciju i aktivaciju osteoklastnih progenitora. Reakcijska smjesa je odmah po elektroporaciji stavljena u medij u pločicama za staničnu kulturu sa 96 zdenaca, u konačnoj koncentraciji 50 000 stanica po zdencu i 200 nM siRNA u 125  $\mu$ L medija  $\alpha$ -MEM obogaćenog sa 10% FBS-a. Antibiotici (100 U/mL penicilina, 100 U/mL streptomicina) su dodani u zdence nakon 3 sata. Nakon 24 sata uzorci su skupljeni iz zdenaca pomoću otopine enzima TrypLE Express (Gibco). Uzorci su isprani PBS-om i centrifugirani na 250 rpm tijekom 5 minuta pa



resuspendirani u PBS-u. Žive stanice su izbrojene u komorici po Bürker-Türku uz prethodno bojenje 0,05%-tnim tripanskim modrilom kako bi se isključile mrtve stanice. Učinkovitost utišavanja provjerena je na razini proteina protočno-citometrijskom analizom pomoću bojenja stanica s anti-CCR2 PE ili anti-CX3CR1 APC i 7AAD te na razini gena postupkom reverzne transkripcije i qPCR, a *in vitro* migracijskim testom prema citokinskom gradijentu provjeren je funkcionalni učinak utišavanja. Po 10.000 stanica u 100  $\mu$ L  $\alpha$ -MEM medija s 10% FBS-a stavljeno je u gornji zdenac sustava *Transwell*, a u dno donjeg zdenca 500  $\mu$ L  $\alpha$ -MEM medija s 10% FBS-a i 10 ng/mL kemokina CCL2 ili 1  $\mu$ g/mL kemokina CX3CL1. Stanice koje su migrirale kroz membranu gornjeg zdenca kvantificirane su kako je prethodno opisano. Stanice koje su prošle kroz membranu u donji zdenac pločice kultivirane su u osteoklastogenom mediju kako je prije opisano. Diferencirani osteoklasti detektirani su kao višejezgrene TRAP<sup>+</sup> stanice.

#### **4.16. *In vivo* intravaskularno označavanje i *in vivo* praćenje migracije stanica**

Kako bismo pratili kretanje populacija OCP u miševa s artritidom *in vivo* korišten je model intravaskularnog označavanja staničnih populacija fluorescentno označenim monoklonalnim protutijelima *in vivo* (114). Protutijela su injicirana intravaskularno i vezala se na receptore prisutne na stanicama krvi, miševi su potom žrtvovani i uzeti uzorci tkiva obojeni su protutijelima na isti receptor ali vezanima uz drugu fluorescentnu boju, što omogućuje detekciju recirkulacije stanica za svako pojedino tkivo, te odijeljeno analiziranje intravaskularne i rezidentne ciljane stanične populacije. Korištena su protutijela na monocitne biljege anti-CD11b PE i anti-CX3CR1 PE količine 3  $\mu$ g po mišu. Nakon 3 minute od primjene, miševi su žrtvovani i uzeti su uzorci za daljnju analizu (PBL, SPL, PBM, TMT i limfni čvor) koja je uključivala bojenje za protočnocitometrijsku analizu (Attune, Life Technologies) uključujući anti-CD11b APC i anti-CX3CR1 APC. Analizom u programu FlowJo (TreeStar) utvrđeno je da u krvi preko 90% stanica biva dvostruko pozitivno na *in vivo* i *ex vivo* primijenjeno protutijelo anti-CD11b odnosno anti-CX3CR1 (pozitivna kontrola) dok u limfnom čvoru zbog spore recirkulacije nije zabilježen signal *in vivo* primijenjenog protutijela (negativna kontrola). U drugim tkivima na taj je način utvrđen udio intravaskularnih dvostruko-pozitivnih stanica te tkivnih rezidentnih stanica koje su se obojile samo *ex vivo* primijenjenim protutijelom te je napravljena usporedba s kontrolnom skupinom.

Za praćenje migracije *in vivo* ciljane populacije stanica razvrstane populacije stanica OCP iz PBM i SPL, obilježene su fluorescentnom bojom CPD (eBiosciences) i transplantirane

intravaskularno miševima s artritismom. Nakon 48 i 36 sati protočnocitometrijskom analizom perifernih hematopoetskih tkiva (PBL, SPL) i periartikularnih hematopoetskih tkiva (PBM, TMT) utvrdili smo udjele transplantiranih stanica te njihov fenotip, korištenjem uređaja Attune (Life Technologies) i programa FlowJo (TreeStar).

#### 4.17. Statistička analiza

Broj ponovljenih pokusa i broj neovisnih uzoraka u pojedinom pokusu naveden je u legendama slika. Provedeno je testiranje normalnosti raspodjele podataka D'Agostino-Pearsonovim testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost uz standardnu devijaciju (SD, prema engl. *standard deviation*) za normalno raspodijeljene podatke ili kao medijani s interkvartilnim rasponom (IQR, prema engl. *interquartile range*) za podatke koji odstupaju od normalne raspodjele. Za normalno raspodijeljene podatke (kliničko bodovanje artritisa, udjeli pojedinih populacija zrelih staničnih loza, izražaj gena, udio volumena kosti), statističko testiranje razlika između skupina provedeno je Studentovim t-testom (za usporedbe između dvije skupine), odnosno jednosmjernom analizom varijance (ANOVA, prema engl. *analysis of variance*) uz Tukey-Kramer *post hoc* test (za višestruke usporedbe). Za podatke koji su odstupali od normalne raspodjele (koncentracije citokina i kemokina, udjeli osteoklastnih progenitora, broj stanica koje su migrirale kroz membranu, broj osteoklasta), statistička analiza razlike između skupina provedena je koristeći neparametrijski test Mann-Whitney (za usporedbe između dvije skupine), odnosno prvo test Kruskal-Wallis nakon kojeg slijedi test Mann-Whitney (za višestruke usporedbe). Statističke analize su učinjene pomoću programa MedCalc, verzije 9.4.2.0 (MedCalc Software, Ostend, Belgium). U svim testovima za razinu statističke značajnosti (vrijednost  $\alpha$ ) postavljena je vrijednost  $p < 0,05$ .

## 5. Rezultati

Model artritisa korišten u ovom istraživanju (CIA) prikladan je mišji model reumatoidnog artritisa koji omogućuje proučavanje patogeneze bolesti i ispitivanje potencijalnih terapijskih strategija. Kako bismo istražili fenotip, brojnost, migracijski potencijal te aktivnost subpopulacija OCP u CIA, analizirali smo razinu osteoresorpcije, upalni okoliš, promjene u brojnosti i fenotipu stanica OCP uzrokovane artritismom, njihov osteoklastogeni, migracijski i resorptivni potencijal u modelu CIA te mogućnost utjecaja na navedene značajke primjenom siRNA.

### 5.1. Procjena razvoja artritisa potaknutog kolagenom i osteoresorpcije

Razvoj artritisa u miševa s CIA praćen je kliničkim vizualnim bodovanjem te stvaranjem antikolagenskih protutijela, a prisutnost upale i pojačane osteoresorpcije potvrđena je *in vivo* fluorescentnim oslikavanjem uz korištenje odgovarajuće probe te *ex vivo* snimanjem postupkom  $\mu$ CT, patohistološkom i histomorfometrijskom analizom te mjerenjem serumskih pokazatelja imunizacije i osteoresorpcije.

#### 5.1.1. Praćenje i vizualno bodovanje znakova artritisa

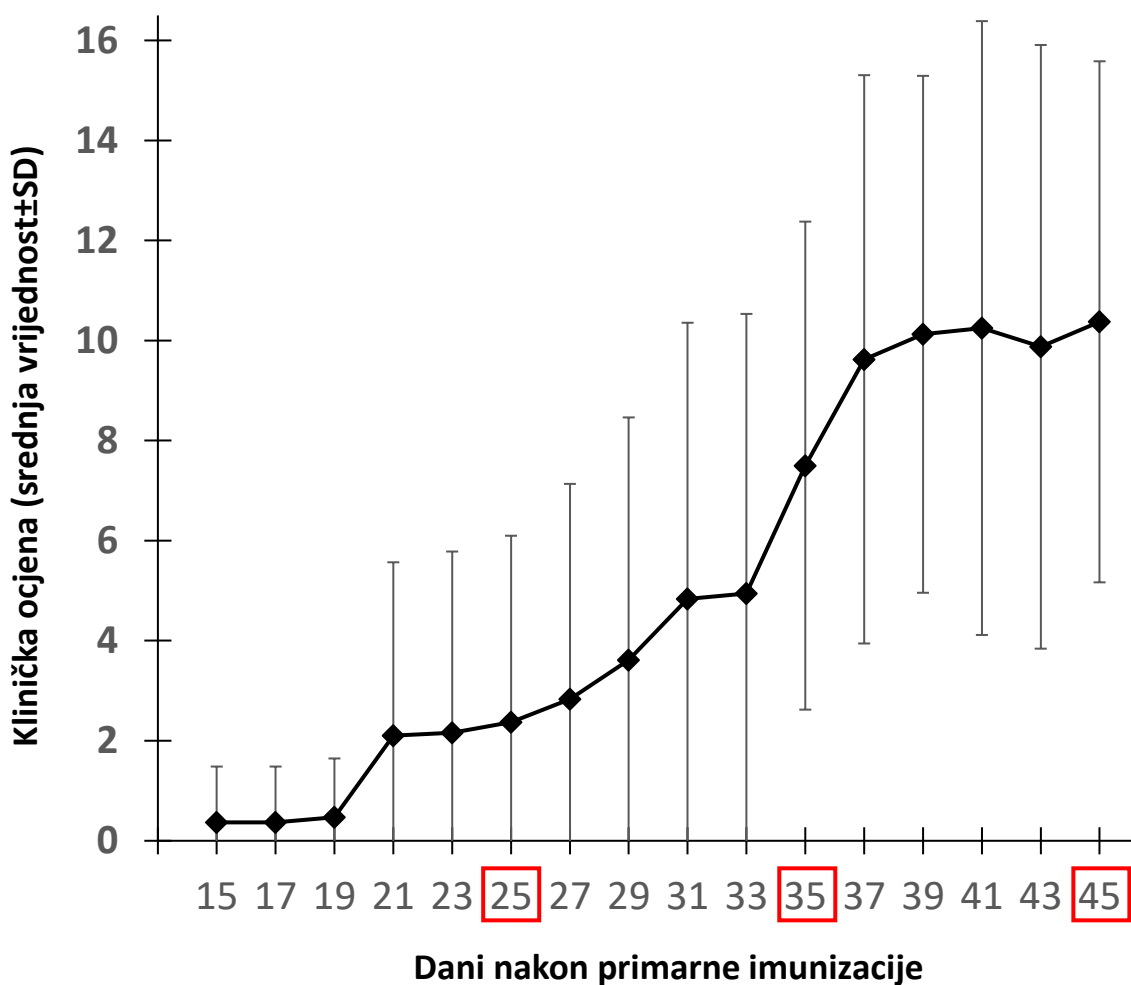
Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritis primarnom imunizacijom pomoću CII i CFA te sekundarnom imunizacijom pomoću CII i IFA 21. dan nakon primarne imunizacije. Od 15. dana nakon primarne imunizacije do žrtvovanja u dvodnevnom je razmaku klinički praćen razvoj znakova upale (oteklina, crvenilo, ukočenost zgloba) uz bodovanje stanja svake šape zasebno ljestvicom od 1 do 4 te zbrajanje konačne ocjene intenziteta bolesti (najviše 16 po životinji). Incidencija artritisa u imuniziranoj skupini kretala se od 50 do 60% ovisno o pokusu, u skladu s incidencijom opisanom u literaturi (43, 45). Dinamika razvoja i težine bolesti određena je zajedničkom analizom provedenih pokusa za miševe koji su razvili artritis do točke žrtvovanja u 25., 35. i 45. danu (**Slika 8**). Vrhunac incidencije nastupa oko 35. dana nakon primarne imunizacije, s početnim, blažim znakovima upale (prosječna vrijednost kliničke ocjene 35. dana za miševe koji su razvili artritis ( $n=18$ ) iznosi  $7,9 \pm 4,6$ ). Daljnjim razvojem težina bolesti se intenzivira (prosječna vrijednost kliničke ocjene 45. dana za miševe koji su razvili artritis ( $n=8$ ) iznosi  $10,4 \pm 5,2$ ). Velike su varijacije u težini bolesti u pojedinim životinja,

uz najveću zabilježenu kliničku ocjenu 16/16 (jaka oteklina i crvenilo svih šapa uz ukočenost i nemogućnost hvatanja za rešetku kaveza). U nekih životinja nakon 40 dana dolazi do smanjenja kliničke ocjene, no najčešće artritis perzistira jednakim intenzitetom od 40. do 45. dana. Učestao je simetričan razvoj bolesti na stražnjim šapama s višim kliničkim ocjenama nego na prednjim, ali ne postoji jasno pravilo. U miševa kontrolne skupine bez tretmana te kontrolne skupine tretirane adjuvansom (CFA kod primarne imunizacije i IFA kod sekundarne imunizacije) za vrijeme praćenja nije postojalo znakova upale zglobova te je njihova ukupna klinička ocjena u svim vremenskim točkama 0/16.

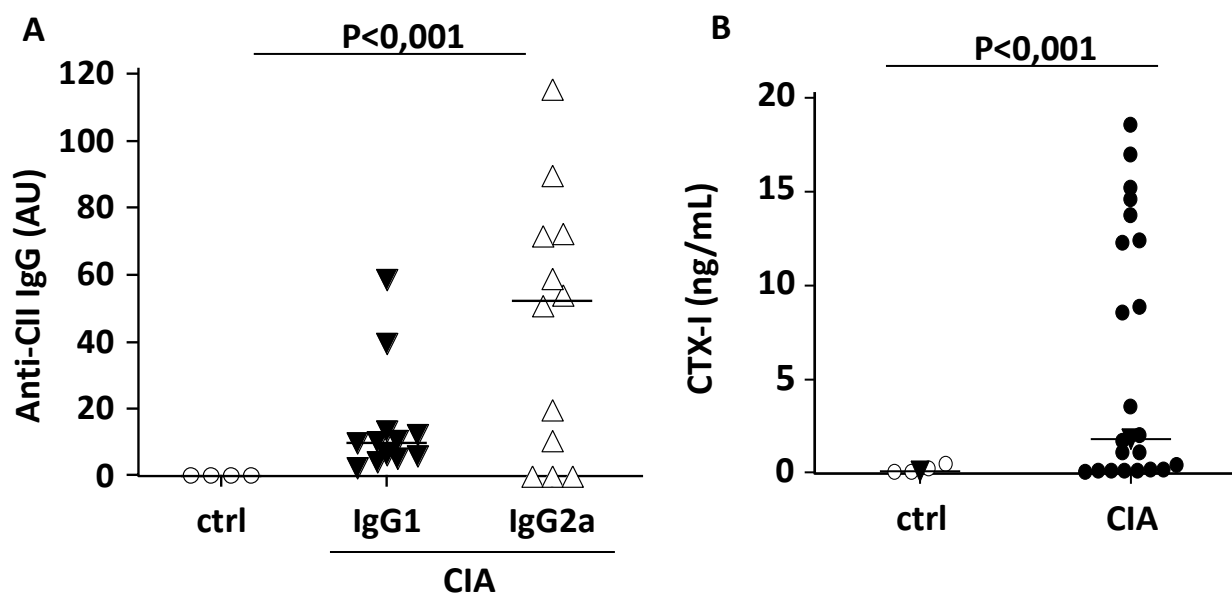
### **5.1.2. Serološki pokazatelji uspješne imunizacije i pojačane osteoresorpcije**

Uz kliničko bodovanje, za potvrdu imunizacije određen je titar antikolagenskih protutijela u serumu postupkom ELISA. Mjerenjem relativnog titra protutijela protiv pilećeg kolagena tipa II (anti-CII) podtipova IgG1 i IgG2a potvrđuje se uspješna imunizacija CIA skupine miševa s artritisom, a razina titra anti-CII IgG2a pozitivno korelira i s kliničkom ocjenom bolesti kako je opisano ranije (46). U serumima miševa s CIA izmjeren je visok relativni titar anti-CII protutijela u odnosu na netretiranu kontrolnu skupinu u kojoj ona nisu detektirana (**Slika 9A**).

Nadalje, kao potvrda povećane resorpcije kosti određene su koncentracije kolagenskog peptida u serumu postupkom ELISA. Postupak se uobičajeno rabi kao dobar metabolički pokazatelj degradacije koštanog kolagenskog matriksa (46). Serumske koncentracije CTX-I značajno su povišene u miševa s CIA (**Slika 9B**), dok su vrijednosti u kontrolnih miševa odraz normalne fiziološke pregradnje kosti.



**Slika 8. Klinička ocjena i dinamika razvoja artritisa bodovanjem kliničkih znakova upale na ljestvici od 0 do 16.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritis primarnom imunizacijom pilećim kolagenom tipa II u kompletnom Freundovom adjuvansu te sekundarnom imunizacijom nakon 21. dana uz zamjenu kompletnog Freundovog adjuvansa inkompletnim. Od 15. dana nakon primarne imunizacije do žrtvovanja klinički je praćen razvoj znakova artritisa uz bodovanje za svaku šapu prema ljestvici: 0 (bez promjena), 1 (oteklina i/ili crvenilo 1 prsta), 2 (oteklina i/ili crvenilo više od 1 prsta ili blaga oteklina šape), 3 (srednja oteklina i crvenilo šape) i najviše 4 (jaka oteklina i crvenilo šape s ankilozom). Konačan zbroj može iznositi od 0-16. Prikazana je srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) kliničke ocjene u miševa koji su u 4 različita pokusa do točke žrtvovanja razvili artritis (podatci do 25. dana za 19 praćenih miševa, do 35. dana za 18 te do 45. dana za 8 miševa).



**Slika 9. Serološki pokazatelji uspješne imunizacije i pojačane osteoresorpcije.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II (CII). Imunoenzimskom metodom (ELISA, prema engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) izmjeren je relativni titar protutijela protiv pilećeg kolagena tipa II (anti-CII) podtipova IgG1 i IgG2a (**A**) izražen relativnim jedinicama (AU, prema engl. *arbitrary unit*) i koncentracija C-terminalnog telopeptida kolagena tipa I (CTX-I, prema engl. *carboxy-terminal collagen crosslinks*) (**B**) u serumima miševa kontrolne skupine bez tretmana (ctrl) i miševa s artritismom potaknutim kolagenom (CIA). Uzorci su analizirani u duplikatu, postupak je ponovljen za 3 neovisna pokusa, a prikazani su reprezentativni rezultati jednog pokusa (za anti-kolagenska protutijela, te dva seta miševa s artritismom za mjerenje CTX-I). Svaki simbol (trokutić i kružić) označava rezultat pojedinog uzorka, a vodoravne linije predstavljaju medijan skupine. Usporedba između skupina učinjena je neparametrijskim testovima Kruskal-Wallis (A) i Mann-Whitney (B).

### 5.1.3. Procjena osteoresorpcije mjerenjem aktivnosti osteoklasta u artritisu

Zreli osteoklasti oslobađaju brojne enzime koji ragrađuju koštani matriks, uključujući katepsin K (18). Stoga smo za procjenu aktivnosti osteoklasta i intenziteta koštane razgradnje koristili probu koja se primjenjuje intravenski i supstrat je katepsina K. Snimanje i analiza epifluorescencije provedeni su pomoću uređaja IVIS Spectrum *in vivo* imaging system (PerkinElmer) i pripadajućeg programa Living Image v. 4.4.17106 (PerkinElmer) 18 i 24 sata nakon intravenske primjene probe koja oslobađa fluorescentni signal nakon cijepanja katepsinom K oslobođenim iz osteoklasta (CatK 680 FAST, PerkinElmer).

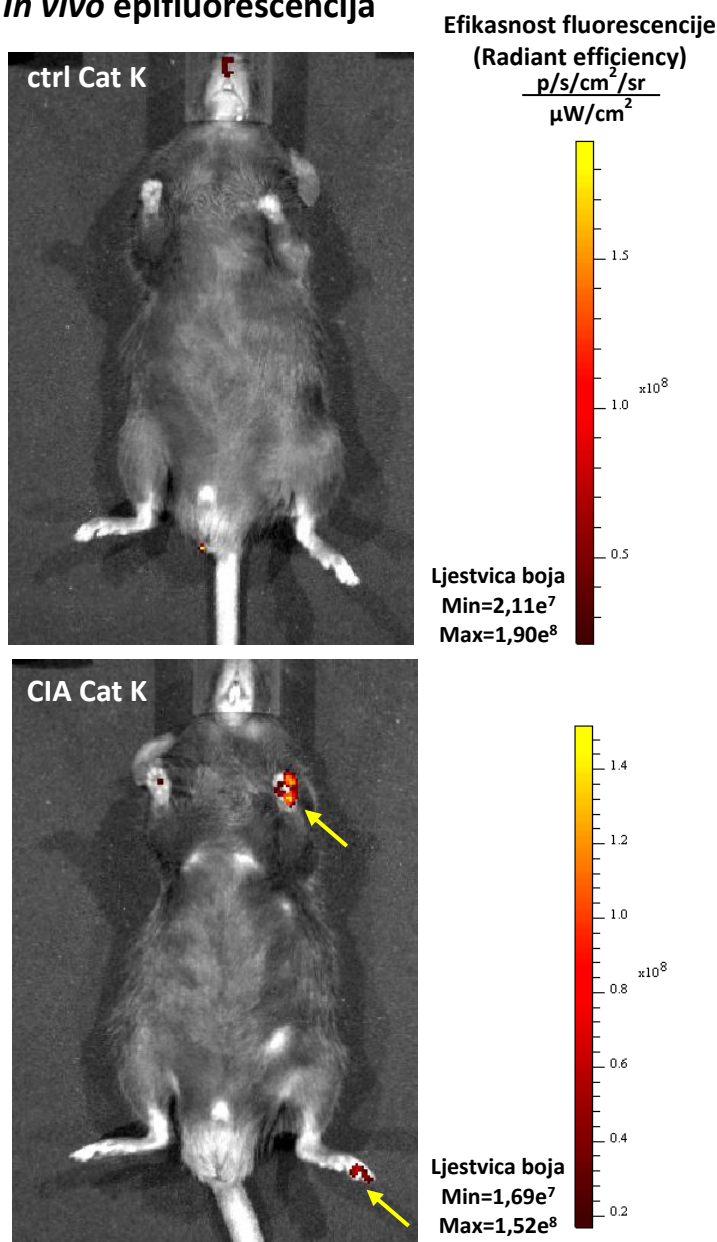
Utvrđen je porast CatK FAST signala izmjenog pomoću uparene ekscitacije valnom duljinom 675 nm i emisijskog filtera 720 nm u miševa s artritisom *in vivo* (Slika 10) i *ex vivo* (Slika 11) u odnosu na miševe bez artritisa. Signal mjeren *in vivo* lokaliziran je u području aktivne upale malih zglobova prednjih i stražnjih šapa i prati vizualnu ocjenu upale (Slika 10). Signal mjeren *ex vivo* intenzivniji je zbog uklonjenih izvora autofluorescencije (koža, dlaka) te je korišten i za procjenu razine sustavne osteoresorpcije u bedrenim kostima.

Najintenzivniji signal mjeri se *ex vivo* lokalno, u području tarzometatarzalnih zglobova šapa zahvaćenih artritisom (Slika 11). Sustavno je u bedrenim kostima (distalno) miševa s artritisom intenzivnija osteoresorpcija u odnosu na kontrolnu skupinu, no slabija nego u kostima uz zahvaćene zglobove (periartikularna osteoresorpcija).

### 5.1.4. Procjena oštećenja i gubitka kosti mikrokomputoriziranom tomografijom

Analiza  $\mu$ CT-om pokazala je značajnu koštanu destrukciju u upalom zahvaćenim zglobovima prednjih i stražnjih šapa miševa s artritisom. Na slikama 3D rekonstrukcije snimaka stražnjih šapa vidljivo je smanjenje koštanog volumena kortikalne i trabekularne kosti uz postojanje brojnih erozija i osteofita u tibiotalarnom zglobu, tarzometatarzalnim i metatarzofalangealnim zglobovima te interfalangealnim zglobovima. U kontrolnoj skupini bez tretmana te u skupini tretiranoj adjuvansom ne postoje takve promjene (Slika 12). Određivanjem morfometrijskih parametara, izmjeren je značajan gubitak koštanog volumena talusa (BV/TV; %) u miševa s CIA u odnosu na obje skupine kontrolnih miševa (Slika 13).

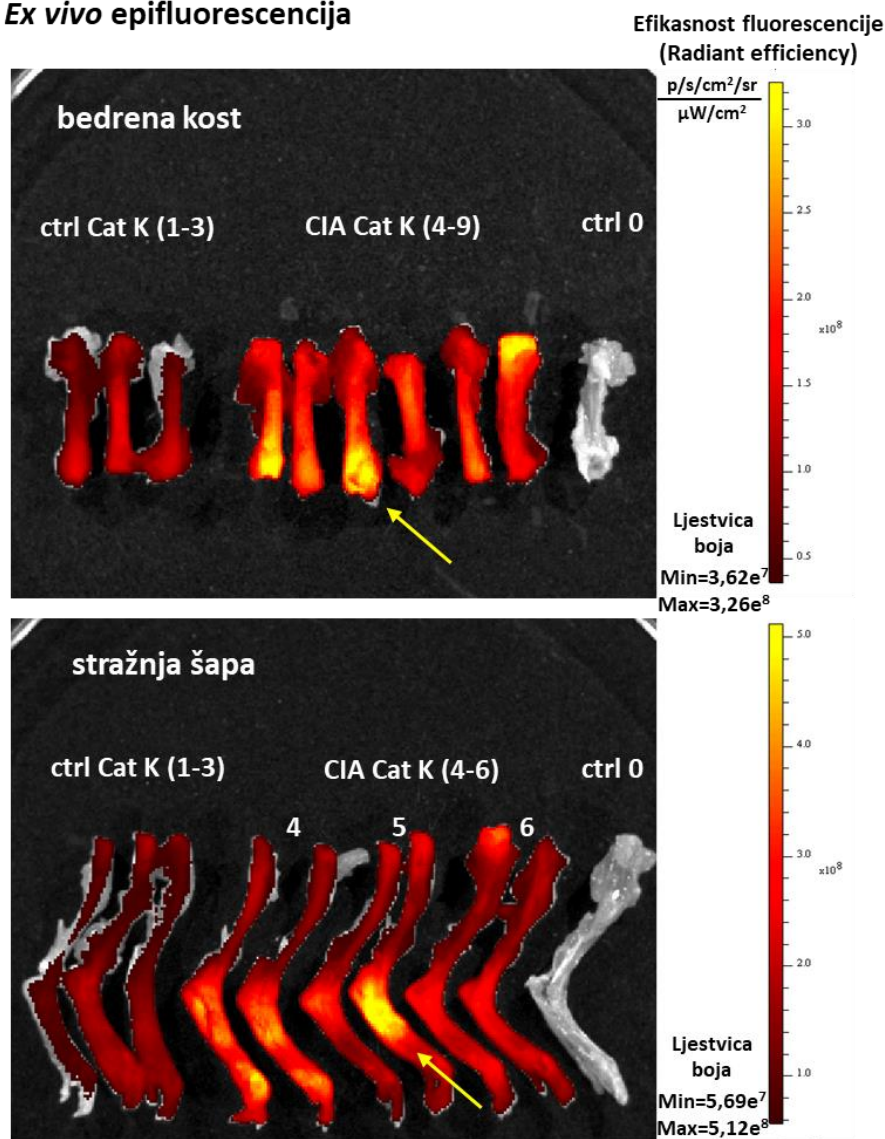
## *In vivo* epifluorescencija



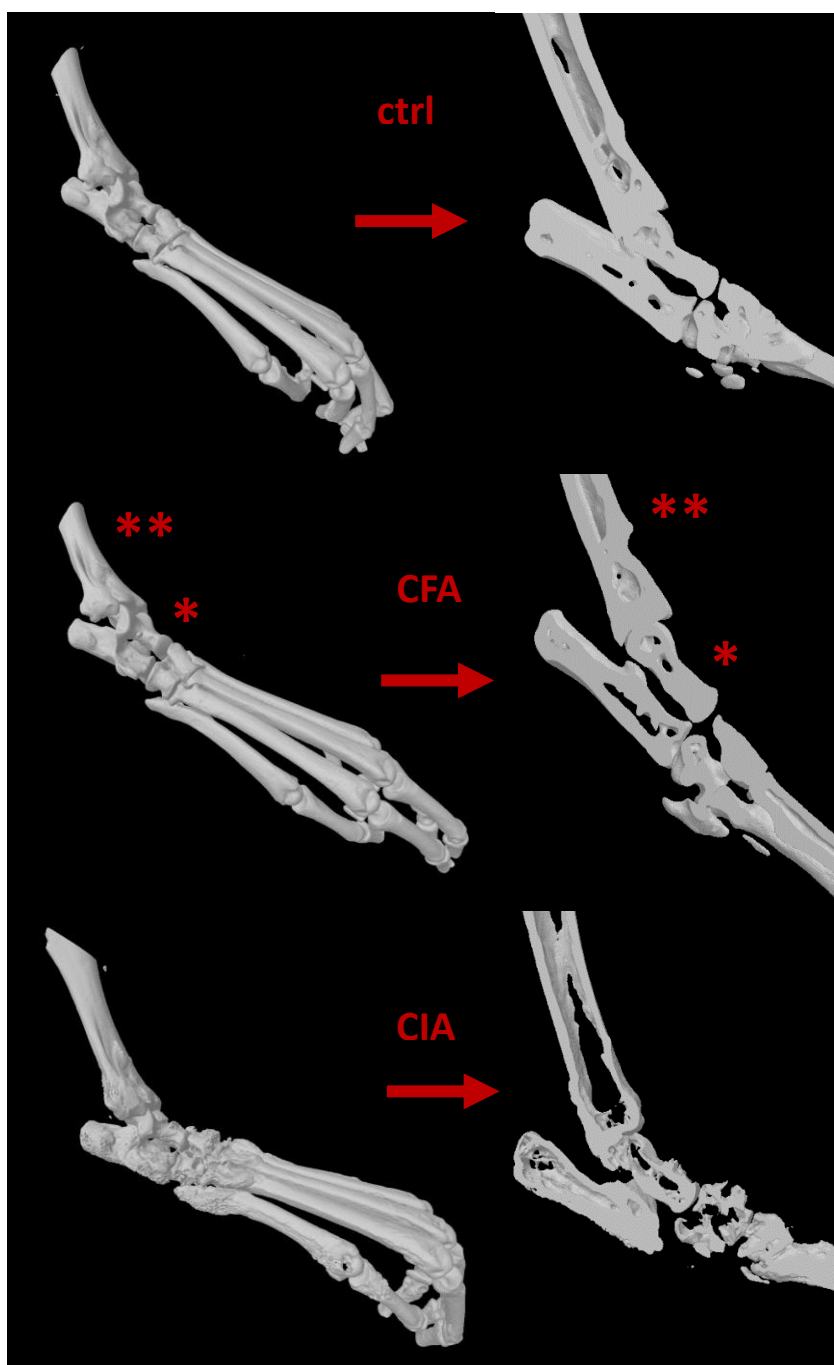
**Slika 10. *In vivo* mjerenje epifluorescencije.** Kontrolnoj skupini bez tretmana (ctrl) i pokusnoj skupini s artritismom (CIA) 35 dana nakon primarne imunizacije pilećim kolagenom tipa II intravenski je dano 0,08 nmol/g molekularne probe koja oslobađa fluorescentni signal nakon cijepanja katepsinom K oslobođenim iz osteoklasta (CatK 680 FAST, PerkinElmer). Uz anesteziju 2% izofluranom, 18 sati nakon primjene probe, provedeno je mjerenje pomoću uređaja IVIS Spectrum in vivo imaging system (PerkinElmer) korištenjem uparene ekscitacije valnom duljinom 675 nm i detekcije emisijskim filterom 720 nm. Analiza signala u miševa iz ctrl skupine i miševa iz CIA skupine provedena je programom Living Image (PerkinElmer), analizom 2D epifluorescencije. Fluorescentni signal prikazan je pomoću vizualne višebojne skale koja predstavlja intenzitet signala mjeren u efikasnosti fluorescencije (Radiant efficiency, omjer emisije (photons/s/cm<sup>2</sup>/sr) i snage ekscitacije (μW/cm<sup>2</sup>)). Žute strelice pokazuju signal CatK FAST izmjeren u prednjim i stražnjim šapama miševa s artritismom.



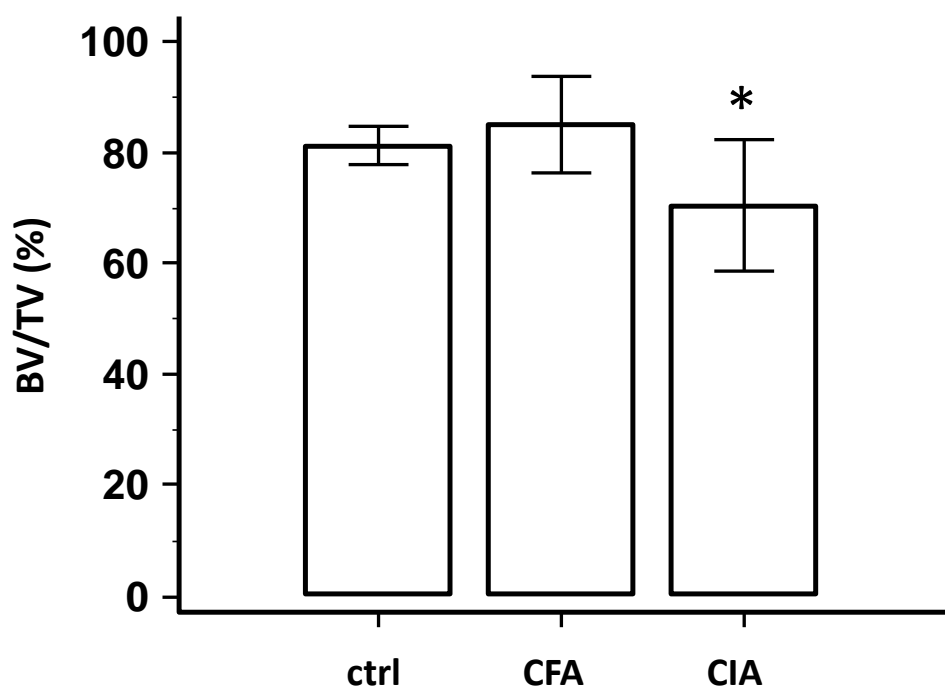
## Ex vivo epifluorescencija



**Slika 11. Ex vivo mjerenje epifluorescencije.** Kontrolnoj skupini bez tretmana (ctrl) i pokusnoj skupini s artritisom (CIA) 35 dana nakon primarne imunizacije intravenski je dano 0,08 nmol/g molekularne probe koja oslobađa fluorescentni signal nakon cijepanja katepsinom K oslobođenim iz osteoklasta (CatK 680 FAST, PerkinElmer). Nakon 24 sata od primjene Cat K probe miševi su žrtvovani i uzeti uzorci (lijeva i desna stražnja šapa i bedrena kost) su smješteni u polistirensku Petrijevu zdjelicu i snimljeni pomoću uređaja IVIS Spectrum in vivo imaging system (PerkinElmer) korištenjem uparene ekscitacije valnom duljinom 675 nm i detekcije emisijskim filterom 720 nm. Analiza signala u miševa iz kontrolne skupine i miševa s CIA provedena je programom Living Image (PerkinElmer), analizom 2D epifluorescencije. Fluorescentni signal prikazan je pomoću vizualne višebojne skale koja predstavlja intenzitet signala mjereno u efikasnosti fluorescencije (Radiant efficiency, omjer emisije ( $\text{photons/s/cm}^2/\text{sr}$ ) i snage ekscitacije ( $\mu\text{W/cm}^2$ )). ctrl CatK - miševi bez artritisa koji su primili fluorescentnu probu, CIA CatK - miševi s CIA koji su primili fluorescentnu probu, ctrl 0 - miš bez artritisa koji nije primio fluorescentnu probu.



**Slika 12. 3D rekonstrukcija snimaka stražnjih šapa mikrokompjuteriziranom tomografijom.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritis (CIA) imunizacijom pilećim kolagenom tipa II (CII). Nakon žrtvovanja kosti su snimljene  $\mu$ CT-om pomoću sustava 1076 SkyScan In-vivo Micro-CT (SkyScan). Slika prikazuje reprezentativne rezultate u vremenskoj točki žrtvovanja 35. dana nakon primarne imunizacije s 3D prikazom distalne tibije i zglobova stražnje šape s lateralne strane (lijevo) te sagitalnog presjeka u razini tibiotalarnog zgloba (desno). U skupini s kolagenom potaknutim artritisom (CIA) vidljiv je gubitak kortikalne i trabekularne kosti uz postojanje brojnih erozija i osteofita i deformacija. ctrl - kontrolna skupina bez tretmana, CFA - kontrolna skupina tretirana kompletnim i inkompletnim Freundovim adjuvansom, \*-talus, \*\*-tibija.

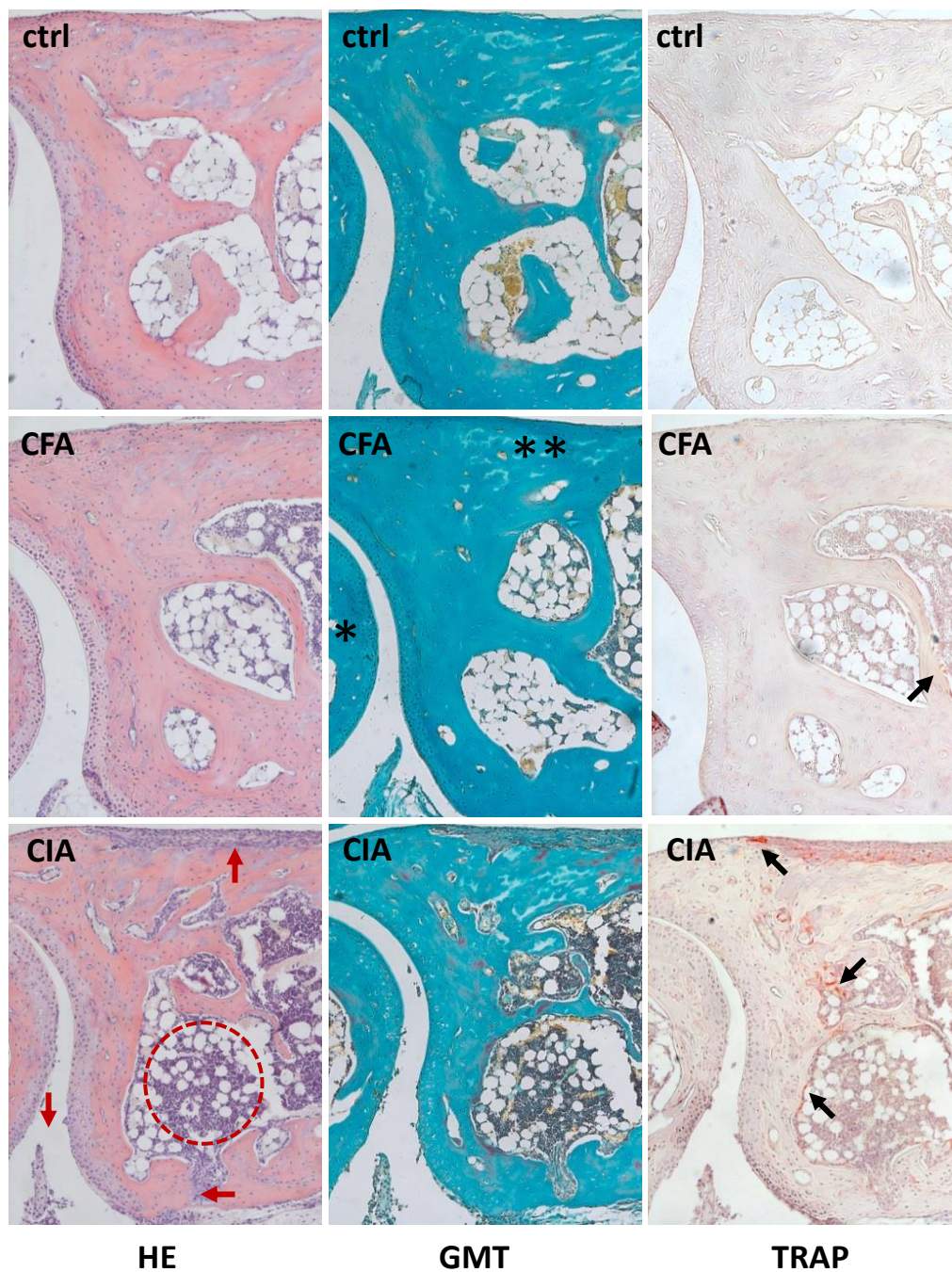


**Slika 13. Gubitak koštanog volumena talusa u miševa s artritismom.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritis (CIA) imunizacijom pilećim kolagenom tipa II (CII). Analiza promjena koštanog metabolizma i koštane destrukcije u artritisu napravljena je snimanjem mikrokompjutoriziranom tomografijom i analizom pomoću programa CTAn (SkyScan). Određen je udio mineralizirane (kortikalne i trabekularne) kosti u ukupnom volumenu (BV/TV; %) fragmenta talusa debljine 0,3-0,4 mm u kontrolnoj skupini bez tretmana (ctrl), kontrolnoj skupini tretiranoj kompletnim i inkompletnim Freundovim adjuvansom (CFA) i skupini s artritismom (CIA). Prikazani su reprezentativni rezultati jednog pokusa u vremenskoj točki žrtvovanja 35. dana nakon primarne imunizacije (n=5-7 miševa po skupini). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija za svaku skupinu. \*p <0,05 u odnosu na ctrl i CFA skupinu (jednosmjerna analiza varijance, ANOVA, prema engl. *analysis of variance*, uz Tukey-Kramer *post hoc* test).

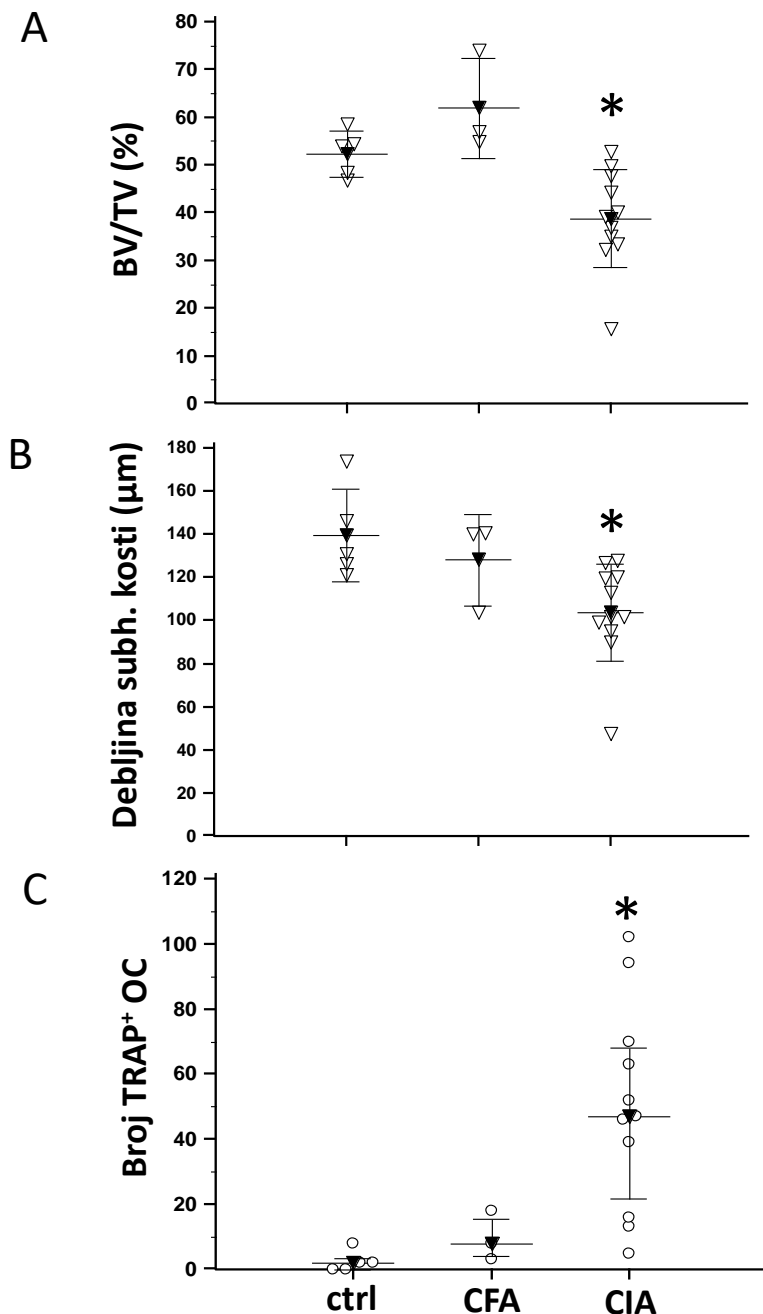
### 5.1.5. Patohistološki nalaz u artritisu potaknutom kolagenom

Patohistološke promjene u artritisu analizirane su na histološkim rezovima tibiotalarnog zgloba u sagitalnoj ravnini. Na preparatima obojenim HE uočava se značajna hipercelularnost koštane srži distalne tibije u miševa s artritisom (crvena kružnica, **Slika 14**). Koštana srž distalne tibije miševa kontrolne skupine bez tretmana (ctrl) prostor je ispunjen pretežito masnim stanicama sa pokojom kapilaram ispunjenom eritrocitima. U kontrolnoj skupini imuniziranoj kompletnim Freundovim adjuvansom (CFA) dolazi do porasta celularnosti koštane srži, dok je u skupini s artritisom (CIA) izrazita zamjena masnih stanica upalnim infiltratom i hipervaskularizacija, što odgovara nalazu osteitisa. Također je vidljiv edem i upalni infiltrat u sinoviji (sinovitis) i invazivno prodiranje fibrovaskularnog tkiva u kost (panus) uz erozije zglobne hrskavice i subhondralne i periartikularne kosti (crvene strelice, **Slika 14**).

Preparati obojeni po GMT analizirani su histomorfometrijski te je u miševa s artritisom utvrđeno značajno smanjenje udjela trabekularne kosti (BV/TV;  $38,8 \pm 10,3\%$  srednja vrijednost u skupini CIA u odnosu na  $52,4 \pm 4,8\%$  u kontrolnoj skupini i  $62,0 \pm 10,5\%$  u skupini CFA,  $p=0,002$  za jednosmjernu analizu ANOVA) i stanjenje subhondralne koštane ploče bez trabekula (srednja vrijednost  $103,9 \pm 22,7 \mu\text{m}$  u skupini CIA u odnosu na  $139,7 \pm 21,4 \mu\text{m}$  u ctrl i  $128,2 \pm 21,3 \mu\text{m}$  u CFA,  $p=0,022$  za jednosmjernu analizu ANOVA) (**Slika 15**) te smanjenje debljine zglobne hrskavice (srednja vrijednost  $44,4 \pm 3,8 \mu\text{m}$  u CIA u odnosu na  $50,6 \pm 7,1 \mu\text{m}$  u kontrolnoj skupini i  $44,5 \pm 3,0 \mu\text{m}$  u skupini CFA, razlika nije statistički značajna). TRAP bojenje služi prvenstveno za identifikaciju zrelih i aktivnih TRAP<sup>+</sup> osteoklasta obojenih žarko crveno i smještenih uz koštane površine u resorpcijskim lakunama. Bojenjem na TRAP i kvantifikacijom TRAP<sup>+</sup> osteoklasta uz koštane površine utvrđen je značajan broj zrelih, aktivnih osteoklasta u distalnoj tibiji miševa s artritisom (crne strelice, **Slika 15**), dok osteoklasta gotovo ne nalazimo na rezovima distalne tibije kontrolnih skupina (medijan broja TRAP<sup>+</sup> osteoklasta 47 [21,8-68,3] u CIA u odnosu na 2 [0,0-3,5] u ctrl i 8 [4,3-15,5] u CFA,  $p=0,003$  za Kruskal-Wallisov test). Na temelju analize histoloških preparata obojenih HE i GMT, zaključili smo da distalna tibija u artritisu postaje područje intenzivne koštane destrukcije posredovane osteoklastima uz obilatu infiltraciju upalnim stanicama (**Slike 14 i 15**).



**Slika 14. Patohistološki nalaz upale zgloba u miševa s kolagenom potaknutim artritisom.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritis (CIA) imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Patohistološke promjene u artritisu evaluirane su na histološkim rezovima tibiotalarnog zgloba u sagitalnoj ravnini u vremenskoj točki žrtvovanja 35 dana nakon primarne imunizacije, obojenim hemalaun-eozinom (HE), Goldner-Masson-trikromom (GMT) i bojenjem na kiselu fosfatazu otpornu na tartarat (TRAP, prema engl. *tartrate-resistant acid phosphatase*), uz povećanje 100x, u odnosu na kontrolnu netretiranu skupinu (ctrl) i skupinu tretiranu adjuvansom (CFA). Crvena kružnica - područje osteitisa, crvene strelice - panus i sinovitis, crne strelice - TRAP<sup>+</sup> osteoklasti uz koštane površine, \*-talus, \*\*-tibia.

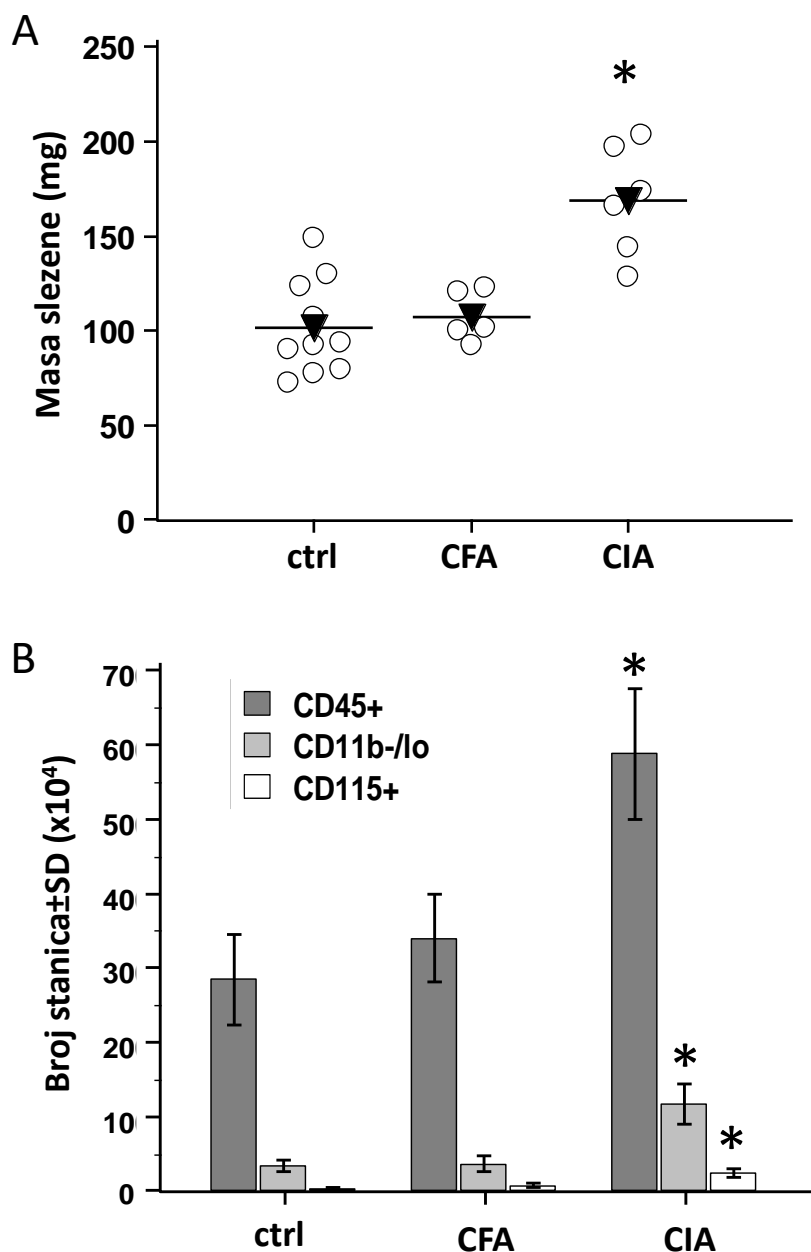


**Slika 15. Nalaz statičke histomorfometrije i broja osteoklasta (OC).** Prikazani su rezultati dva neovisna pokusa, 35. dana nakon izazivanja artritisa (CIA). Preparati su obojeni Goldner-Masson-trikromom (GMT) analizirani histomorfometrijski uz povećanje 100x. **(A)** Udio trabekularne kosti u ukupnom volumenu (BV/TV; %) i **(B)** debljina subhondralne koštane ploče bez trabekula ( $\mu\text{m}$ ); kontrolna skupina bez tretmana (ctrl), kontrolna skupina tretirana adjuvansom (CFA) i miševi s artritismom (CIA). Prikazana je srednja vrijednost triju serijskih rezova (bijeli trokutić) te srednja vrijednost skupine (crni trokutić i linija) uz SD (vanjske linije). \* $p < 0,05$  u odnosu na ctrl i CFA skupinu (ANOVA). **(C)** Broj TRAP<sup>+</sup> osteoklasta (OC) na endostealnim površinama i trabekulama distalne tibije. Prikazane su srednje vrijednosti izbrojane na povećanju 200x u 2 susjedna vidna polja u 2 serijska reza (bijeli kružić) te medijani (crni trokutić i središnja linija) s interkvartilnim rasponom (vanjske linije) za svaku skupinu, \* $p < 0,05$  u odnosu na ctrl i CFA skupinu (Kruskal-Wallisov test).

## 5.2. Stanične populacije mijeloidne loze i subpopulacije osteoklastnih progenitora u artritisu potaknutom kolagenom

Nakon utvrđivanja pojačane koštane resorpcije u artritisu, cilj istraživanja bio je analizirati udio i fenotip stanica mijeloidne loze (koja uključuje populaciju OCP). Za analizu protočnom citometrijom pripremljene su jednostanične suspenzije stanica PBM (koštana srž uz upalom zahvaćeni zglob), SBM (koštana srž udaljena od upaljenog zgloba), SPL (slezena), PBL (leukociti periferne krvi) i TMT (tarzometatarzalno tkivo). Stanice su obilježene monoklonalnim protutijelima konjugiranim s fluorescentnim bojama na panhematopoetski biljeg CD45, nadalje staničnim biljezima za limfocitnu lozu (CD3, B220, NK1.1), mijeloidnu lozu (CD11b, CD115, Ly6C, F4/80, CD16/32, Ly6G), matične i progenitorske stanice (CD127, CD117, Sca-1, CD34) te koktel protutijela na biljege zrelih hematopoetskih stanica (Lin, sadrži protutijela na biljege CD3, B220, CD11b, Gr-1 i TER-119).

Nakon izazivanja artritisa, sustavno na razini cijelog organizma u artritisu dolazi do promjena unutar krvnih loza što se očituje povećanjem mase slezenu u miševa s artritisom u odnosu na kontrolne skupine (**Slika 16A**), te povećanjem udjela mijeloidne loze  $CD3^+B220^-NK1.1^-CD11b^+$  unutar populacije hematopoetskih stanica ( $3,1 \pm 0,7\%$  u kontrolnoj skupini u odnosu na  $13,2 \pm 3,1\%$  u miševa s artritisom,  $p=0,008$ , t-test). Slično se povećava udio stanica mijeloidne loze  $CD3^+B220^-NK1.1^-CD11b^+$  u koštanoj srži zahvaćenoj artritisom ( $46,9 \pm 5,4\%$  u kontrolnoj skupini u odnosu na  $76,8 \pm 3,4\%$  u miševa s artritisom,  $p=0,001$ , t-test). Upalni infiltrat vidljiv je i u obliku osteitisa PBM miševa s artritisom te sadrži i populaciju OCP, koja se pojačano diferencira u zrele osteoklaste koji potom razaraju kost. U uzorcima stanica koštane srži miševa s artritisom, u neposrednoj blizini zglobova zahvaćenih artritisom (PBM) vidljiva je povećana celularnost. U kontrolnih miševa se u tom odjeljku koštane srži nalazi oskudan broj stanica, dok je u miševa s artritisom ukupan broj hematopoetskih ( $CD45^+$ ) stanica udvostručen u odnosu na kontrolnu skupinu bez tretmana (**Slika 16B**). Osim toga značajno je povećan apsolutni broj stanica OCP koje posjeduju osteoklastogeni potencijal ( $CD3^+B220^-NK1.1^-CD11b^{-/lo}$  i  $CD3^+B220^-NK1.1^-CD11b^{-/lo}CD115^+$ ) (**Slika 16B**). Promjene udjela stanica mijeloidne loze različitog stupnja zrelosti te subpopulacije OCP analizirane su stoga na lokalnoj razini (uzorci iz zahvaćenih zglobova: PBM i TMT) i sustavnoj razini (SBM, SPL, PBL).



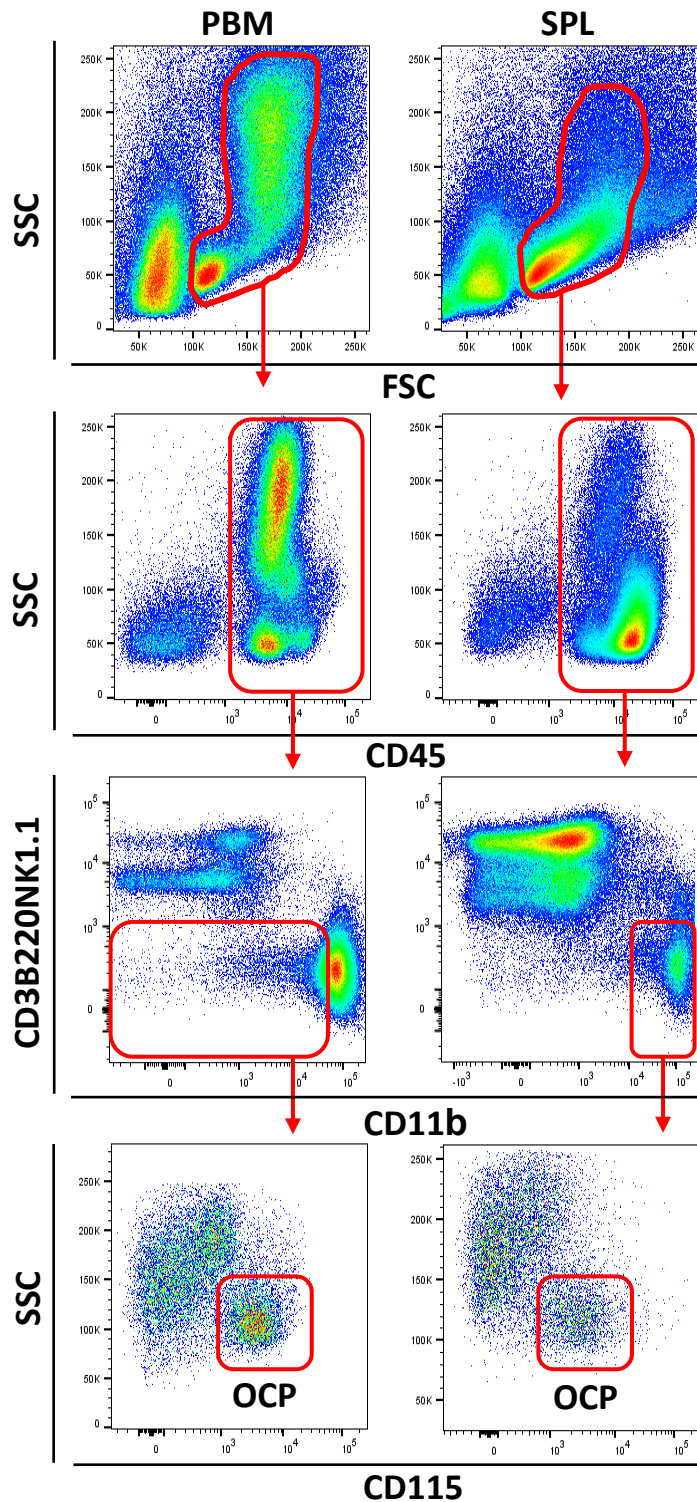
**Slika 16. Ekspanzija hematopoetskih stanica mijeloidne loze u slezeni i periartikularnoj srži miševa s artritismom.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritis (CIA) imunizacijom pilećim kolagenom tipa II (CII). **(A)** Nakon žrtvovanja uklonjena je slezena i izvagana. **(B)** Iz periartikularnog dijela tibije (distano) izvađena je koštana srž i analizirana protočnom citometrijom. Prikazane su srednje vrijednosti mase slezena po skupini (uz pojedine vrijednosti) te srednji broj hematopoetskih stanica (CD45<sup>+</sup>) i stanica s osteoklastogenim potencijalom CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>-/lo</sup> (CD11b-/lo) i CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>-/lo</sup>CD115<sup>+</sup> (CD115+) sa standardnom devijacijom. Prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa u vremenskoj točki žrtvovanja 35. dana **(B)** i 45. dana **(A)** nakon primarne imunizacije (n=6-10 miševa po skupini). CIA - skupina s artritismom potaknutim kolagenom, ctrl - kontrolna skupina bez tretmana, CFA - kontrolna skupina tretirana kompletnim i inkompletnim Freundovim adjuvansom. \*p < 0,05 u odnosu na ctrl i CFA skupinu (ANOVA).



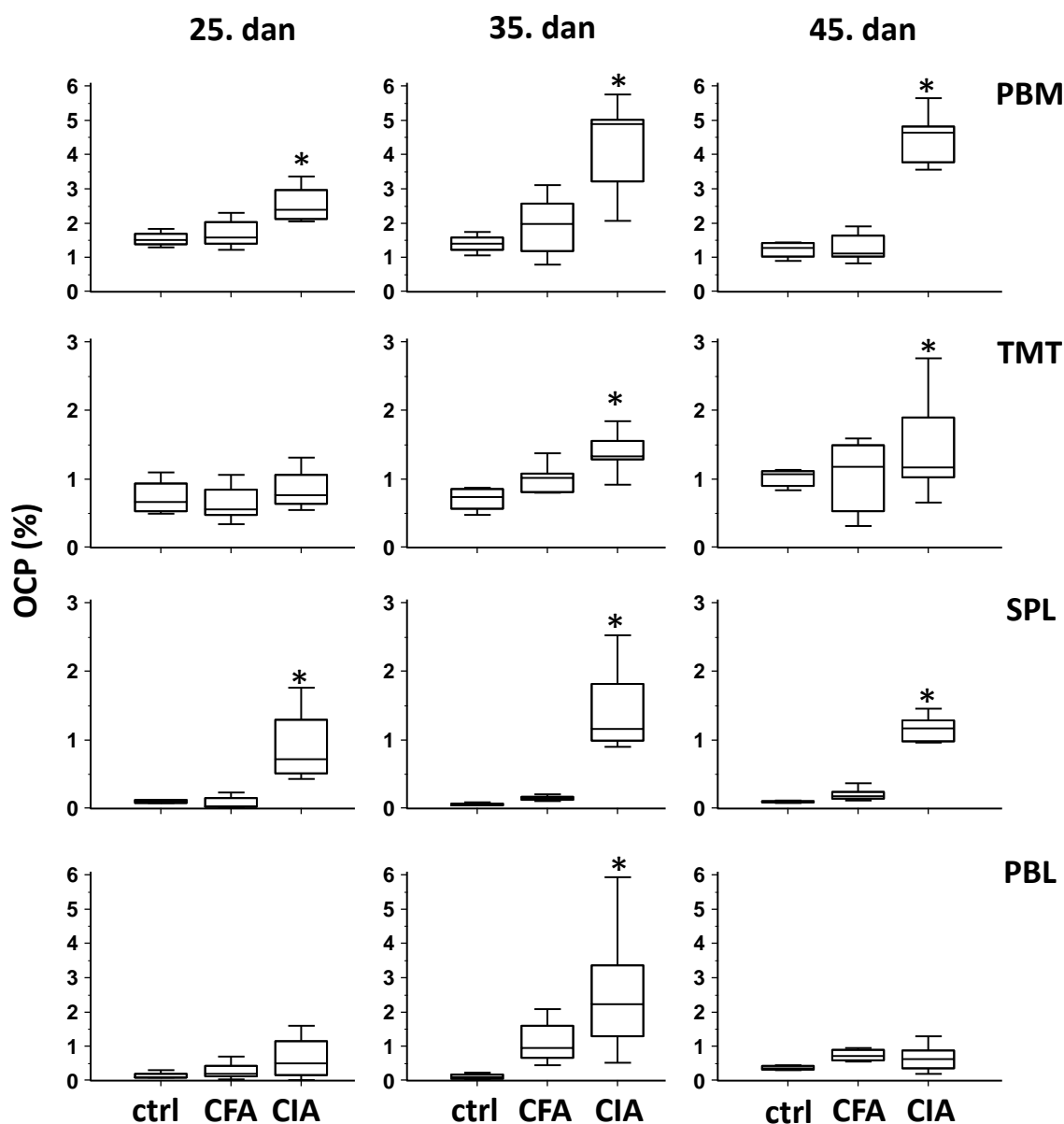
### 5.2.1. Povećan udio subpopulacija osteoklastnih progenitora u artritisu

Kako bismo ustanovili prate li promjene u subpopulacijama OCP povećanje osteoresorpcije u artritisu, analizirali smo dinamiku promjena frekvencije populacija OCP definiranih fenotipom  $CD45^+CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^{-/lo}CD115^+$  u koštanoj srži te  $CD3^-B220^-NK1.1^-CD45^+CD11b^+CD115^+$  u slezeni i krvi (18, 72) u tri vremenske točke nakon primarne imunizacije. Analiza protočnom citometrijom provedena je postavljanjem okvira kako prikazuje **Slika 17**. Odabrana je ukupna populacija stanica prema karakterističnom grupiranju na prikazu točkastim grafikonom uz parametar veličine (FSC, prema engl. *forward scatter*) nasuprot granularnosti (SSC, prema engl. *side scatter*), nadalje, iz te su populacije isključeni stanični agregati (tzv. „doublets“) i mrtve stanice pozitivne na vitalnu boju 7AAD. Potom je odabrana populacija hematopoetskih  $CD45^+$  stanica. U sljedećem točkastom grafikonu odabrana je populacija negativna na limfoidne biljege ( $CD3^-B220^-NK1.1^-$ ) čime su iz analize isključeni limfociti pa je odabrana populacija sa slabim izražajem biljega  $CD11b$  ( $CD11b^{-/lo}$ ) kod analize uzoraka koštane srži i zgloba, odnosno populacija pozitivna na biljeg  $CD11b$  ( $CD11b^+$ ) kod analize uzoraka slezene i krvi. Na toj je populaciji određen izražaj biljega  $CD115$ .

Stanice OCP u PBM značajno su brojnije u miševa s artritisom u odnosu na kontrolne skupine u svim vremenskim točkama, podjednako za kontrolne netretirane miševe i miševe tretirane adjuvansom. Udio stanica  $CD3^-B220^-NK1.1^-CD45^+CD11b^{-/lo}CD115^+$  u ukupnom broju hematopoetskih  $CD45^+$  stanica, koje predstavljaju OCP, povećava se u miševa s artritisom od 25. dana nakon primarne imunizacije do 35. dana nakon primarne imunizacije te ostaje podjednak do 45. dana nakon primarne imunizacije (**Slika 18**). Slična dinamika promjena opažena je i u stanicama izdvojenim iz malih zglobova (TMT), premda je tu udio stanica OCP nešto manji (oko 1,5% 35. dan od primarne imunizacije) u odnosu na koštanu srž (PBM, oko 4% 35. dana od primarne imunizacije). Slično se udio perifernih OCP ( $CD3^-B220^-NK1.1^-CD45^+CD11b^+CD115^+$ ) povećava u slezeni (SPL) i perifernoj krvi (PBL) od 25. do 35. dana nakon primarne imunizacije, s tim da se u perifernoj krvi udio smanjuje prema 45. danu nakon primarne imunizacije (**Slika 18**). S obzirom na to da je cilj istraživanja praćenje migracije OCP, za daljnje pokuse odabran je vremenski raspon od 35. do 45. dana nakon primarne imunizacije kao optimalan vremenski okvir za daljnje analize, s obzirom na to da udio OCP tada doseže najveću vrijednost u hematopoetskim tkivima.



**Slika 17. Analiza udjela populacije osteoklastnih progenitora u koštanoj srži i slezeni.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritis (CIA) imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani u 3 vremenske točke nakon primarne imunizacije (25., 35. i 45. dan) te je provedena analiza hematopoetskih tkiva protočnom citometrijom. Prikazani su reprezentativni točkasti grafikoni sa strategijom protočnocitometrijske analize osteoklastnih progenitora (OCP) u vremenskoj točki 45. dan nakon primarne imunizacije za stanice koštane srži distalne tibije (PBM) i slezene (SPL). FSC - prema engl. *forward scatter*, SSC - prema engl. *side scatter*.



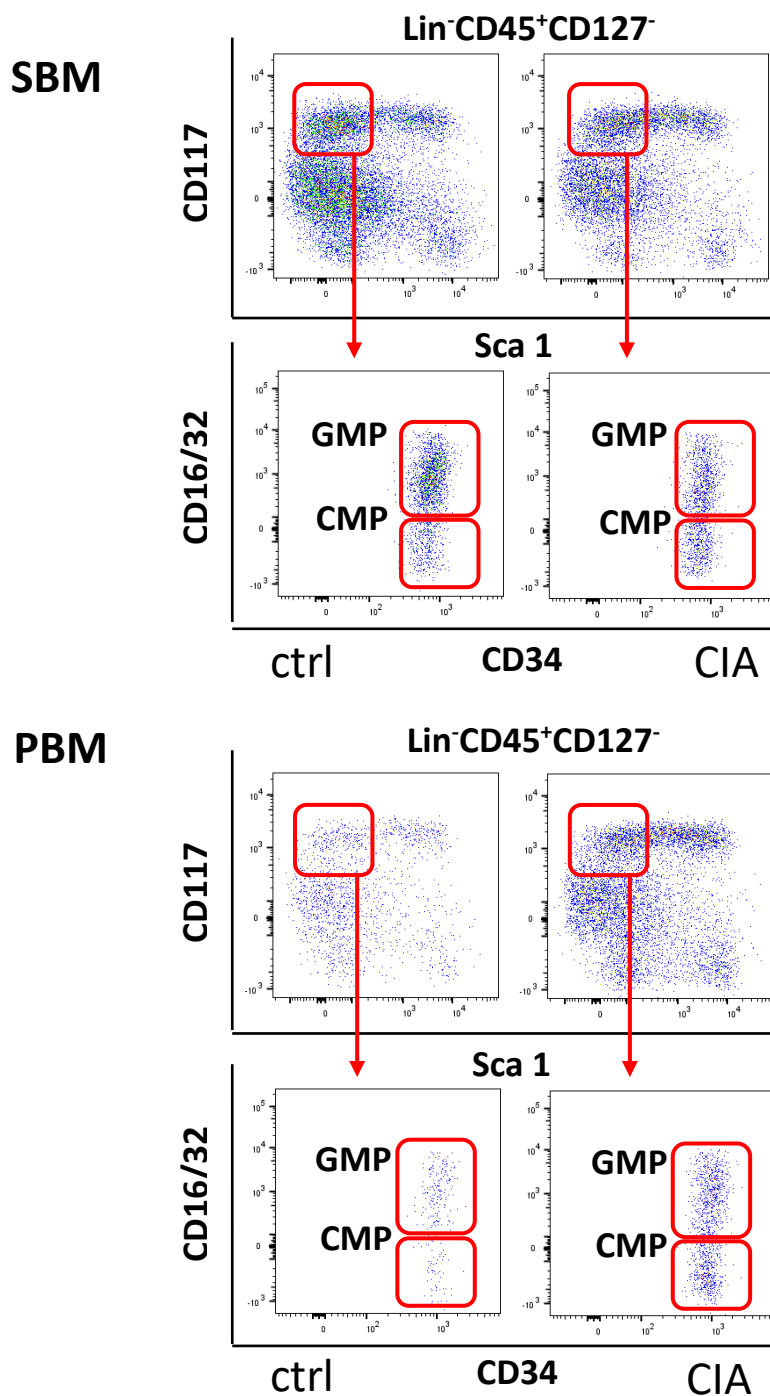
**Slika 18. Udjeli populacije osteoklastnih progenitora u hematopoetskim tkivima.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritis (CIA) imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani u 3 vremenske točke nakon primarne imunizacije (25., 35. i 45. dan) te je provedena analiza hematopoetskih tkiva i upaljenih zglobova protočnom citometrijom. Analiziran je udio  $CD3^+B220^+NK1.1^-CD45^+CD11b^+CD115^+$  stanica osteoklastnih progenitora (OCP) od svih  $CD45^+$  stanica u uzorku za koštanu srž distalne tibije (PBM) i stanica tarzometarzalnog dijela šape (TMT) te udio  $CD3^+B220^+NK1.1^-CD45^+CD11b^+CD115^+$  stanica za slezenu (SPL) i perifernu krv (PBL). Rezultati su prikazani grafovima kao medijan (%) i interkvartilni raspon. \* $p < 0,05$  u odnosu na ctrl i CFA skupinu (Kruskal-Wallisov test). CIA - skupina s kolagenom potaknutim artritismom, ctrl - kontrolna skupinu bez tretmana, CFA - kontrolna skupina tretirana Freundovim adjuvansom.

### 5.2.2. Ekspanzija progenitorskih stanica mijeloidne loze u artritisu

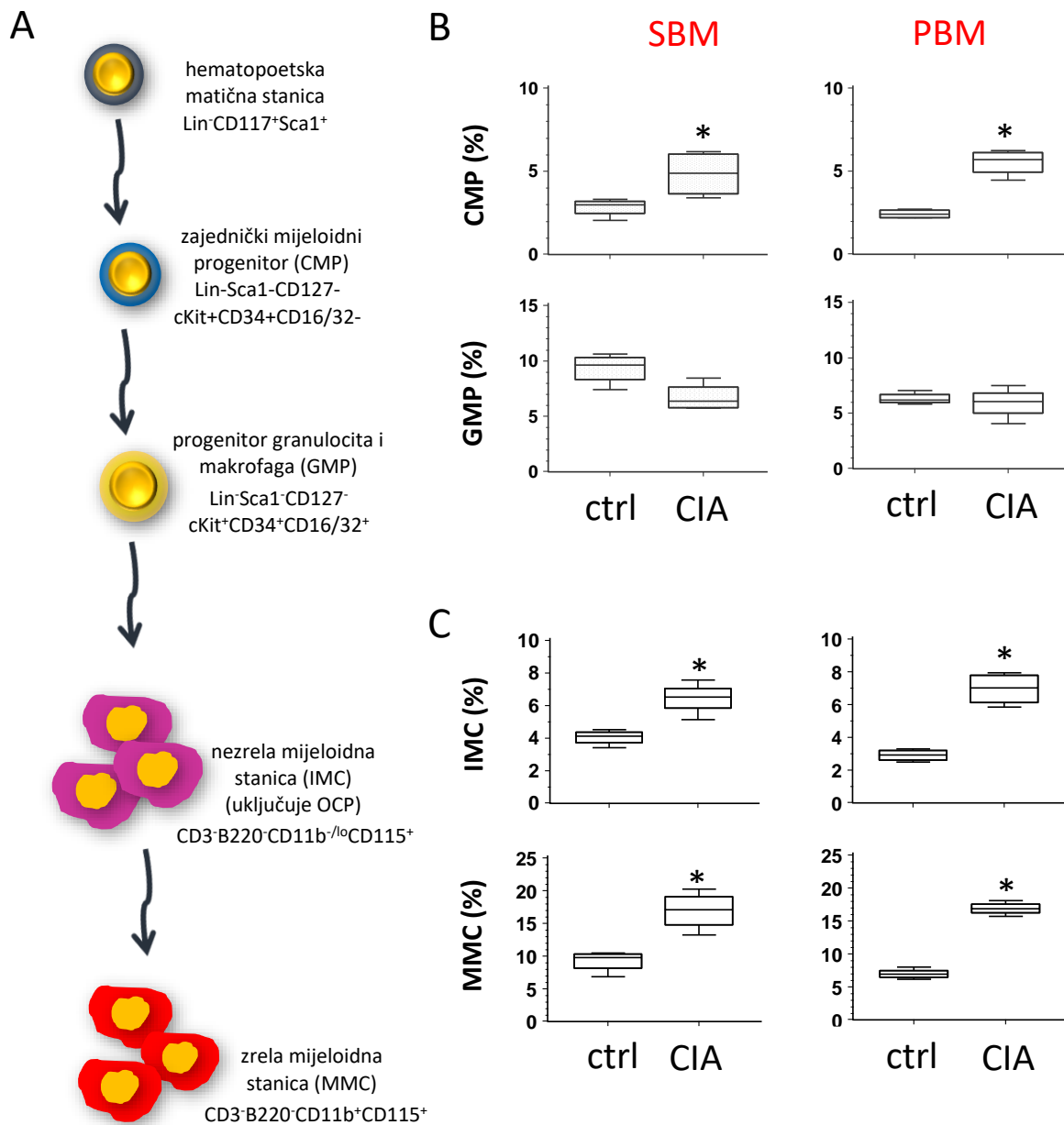
U prethodnim smo pokusima utvrdili da je populacija OCP umnožena u artritisu, stoga smo dalje analizirali brojnost nezrelih stadija mijeloidne loze, uzvodno od OCP, kako bismo utvrdili na kojem stupnju diferencijacije mijeloidne loze dolazi do promjena povezanih s artritisom (**Slika 19**). Mijeloidna loza sazrijeva od matične hematopoetske stanice u koštanoj srži, preko nekoliko stadija progenitorskih stanica koje su fenotipski jasno definirane (115). Ukratko, u miša mijelopoeza teče preko stupnja zajedničkog mijeloidnog progenitora (CMP, prema engl. *common myeloid progenitor*), preko zajedničkog progenitora granulocita i makrofaga (GMP, prema engl. *granulocyte macrophage progenitor*) do nezrelih i zrelih mijeloidnih stanica (**Slika 20A**).

U miševa s artritisom potvrdili smo promjene u populacijama mijeloidnih progenitora iz kojih potječu OCP u odnosu na kontrolnu skupinu. Analizirane su promjene u koštanoj srži sustavno (SBM) i lokalno (PBM) pomoću protočne citometrije. Strategija za analizu matičnih i linijski usmjerenih multipotentnih progenitorskih stanica uključuje prvo uklanjanje zrelih stanica iz analize, koje su pozitivne na diferencijacijske biljege za što se koristi mješavina monoklonalnih protutijela direktno vezanih s istom fluoroforom, tzv. "linijski koktel" (Lin). Kako bismo definirali utjecaj artritisa na homeostazu progenitorskih stanica mijeloidne loze iz koje potječu i OCP, analizirali smo udjele populacija mijeloidnih progenitora definiranih kao  $\text{Lin}^- \text{Sca1}^- \text{CD127}^- \text{cKit}^+$  koje nadalje prema izražaju biljega CD34 i CD16/32 možemo podijeliti na CMP,  $\text{CD34}^+ \text{CD16/32}^-$  i GMP,  $\text{CD34}^+ \text{CD16/32}^+$  (**Slika 19**).

U miševa s artritisom dolazi do promjena u populacijama mijeloidne loze koje su osobito izražene lokalno u PBM, koja u miševa kontrolne skupine sadrži značajno manji udio mijeloidnih progenitora u odnosu na SBM (medijan 14,24 [12,21-14,97] % od svih  $\text{Lin}^-$  stanica u SBM u odnosu na 8,98 [8,66-9,24] % u PBM,  $p=0,02$ , Mann-Whitney), dok je u PBM miševa s artritisom ta populacija ekspanzirana (medijan 12,25 [10,34-13,25] % od svih  $\text{Lin}^-$  stanica). Posebice je kod miševa s artritisom, u SBM i PBM umnožena populacija CMP ( $\text{CD45}^+ \text{Lin}^- \text{Sca1}^- \text{CD127}^- \text{cKit}^+ \text{CD34}^+ \text{CD16/32}^-$ ) (**Slika 20B**). Nadalje, susljedni stadiji nezrelih ( $\text{CD45}^+ \text{CD3}^- \text{B220}^- \text{CD11b}^{-/\text{lo}} \text{CD115}^+$ ) i zrelih ( $\text{CD45}^+ \text{CD3}^- \text{B220}^- \text{CD11b}^+ \text{CD115}^+$ ) mijeloidnih stanica također su višebrojniji u koštanoj srži (SBM i PBM) miševa s artritisom (**Slika 20C**). Ujedno, populacija nezrelih mijeloidnih stanica posjeduje izraziti osteoklastogeni potencijal.



**Slika 19. Analiza udjela populacija nezrelih progenitora mijeloidne loze.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritis (CIA) imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35. dana nakon primarne imunizacije te je provedena analiza hematopoetskih stanica sustavne (SBM) i periartikularne (PBM) koštane srži. Stanice negativne na biljege zrelih hematopoetskih loza ( $Lin^-CD3^-B220^-Gr1^-Ter119^-CD11b^-$ ), a pozitivne na panhematopoetski biljeg CD45 dalje su analizirane prema izražaju biljega progenitorskih stanica (CD127, Sca1, CD117, CD34 i CD16/32). Prikazani su reprezentativni točkasti grafikoni sa strategijom protočnociometrijske analize mijeloidnih progenitora u kontrolnih miševa (ctrl) i miševa s artritsom (CIA). FSC - prema engl. *forward scatter*, SSC - prema engl. *side scatter*, GMP - zajednički progenitor granulocita i makrofaga, CMP - zajednički mijeloidni progenitor.



**Slika 20. Udjeli populacija nezrelih mijeloidnih loza u koštanoj srži miševa s artritismom.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritis (CIA) imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35. dan nakon primarne imunizacije te je provedena analiza hematopoetskih stanica sustavne (SBM) i periartikularne (PBM) koštane srži protočnom citometrijom. **(A)** Shematski prikaz fenotipskih biljega glavnih stadija sazrijevanja mijeloidne loze. **(B)** Udjeli nezrelih mijeloidnih progenitora: zajedničkog mijeloidnog progenitora (CMP) i progenitora granulocita i makrofaga (GMP) u SBM i PBM. **(C)** Udjeli mijeloidnih stanica: nezrelih mijeloidnih stanica (IMC) i zrelih mijeloidnih stanica (MMC) u SBM i PBM. Grafovima su prikazani rezultati 2 neovisna pokusa (n=4 po skupini) kao medijan (%) i interkvartilni raspon. \*p < 0,05 u odnosu na kontrolnu (ctrl) skupinu (Mann-Whitneyev test).

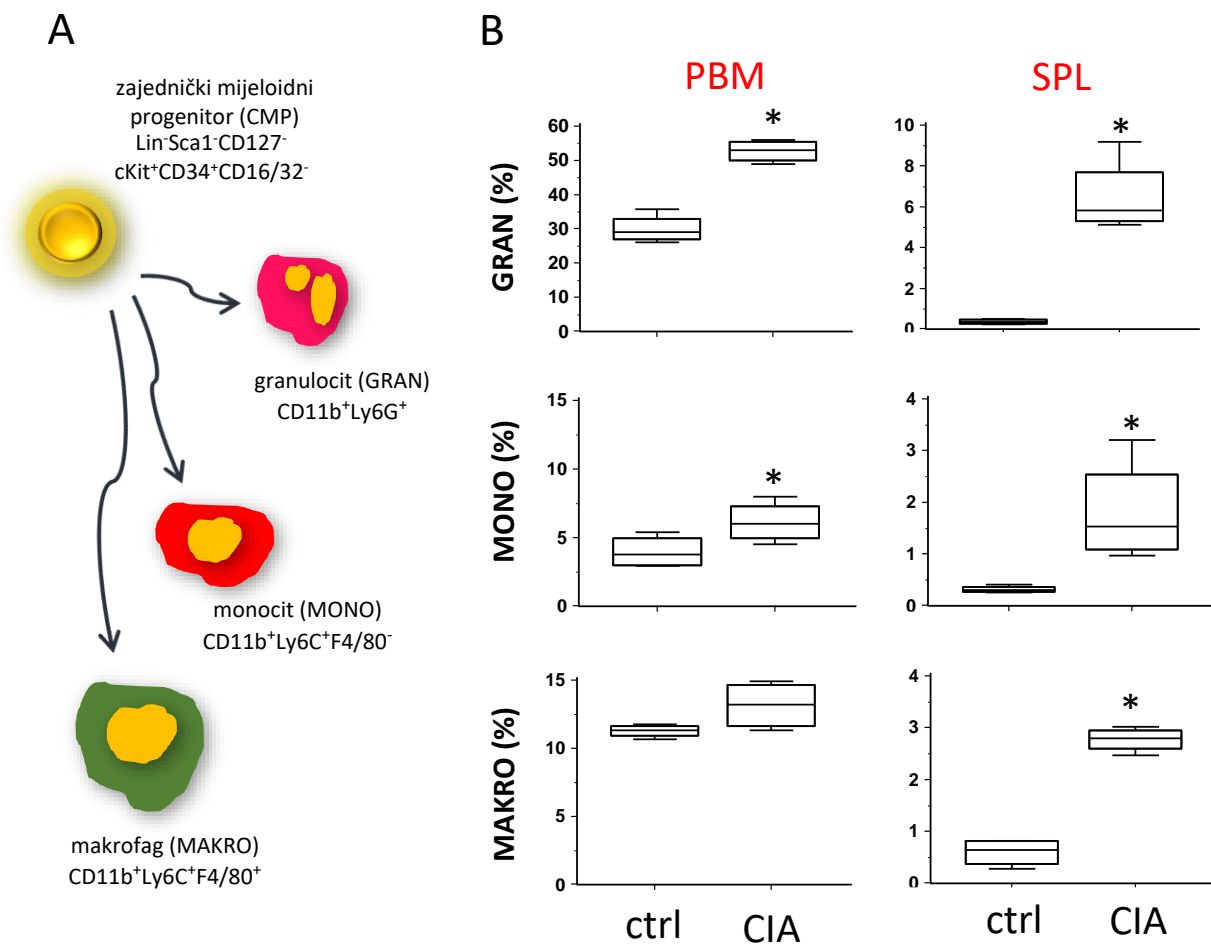
### 5.2.3. Pojačano sazrijevanje populacije zrelih mijeloidnih loza u artritisu

Mijeloidne stanice, nakon sazrijevanja preko opisanih stadija mijeloidne loze, poprimaju fenotipske i funkcionalne značajke zrelih loza, koje uključuju populacije granulocita ( $CD45^+CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^+Ly6G^+$ ), monocita ( $CD45^+CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^+Ly6C^+F4/80^-$ ) i makrofaga ( $CD45^+CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^+Ly6C^+F4/80^+$ ). Zrele mijeloidne stanice napuštaju koštanu srž te recirkuliraju, a uz odgovarajuće kemotaktične signale naseljavaju periferna hematopoetska tkiva i organe (115).

U skladu s prethodno pokazanim sustavnim i lokalnim umnažanjem mijeloidne loze, lokalno smo u PBM i sustavno u SPL uočili povećane udjele svih zrelih mijeloidnih populacija u miševa s artritisom, uključujući granulocite, monocite i makrofage (**Slika 21**). Nadalje, sličan obrazac ekspanzije mijeloidnih loza uočen je i među stanicama SBM, PBL i TMT miševa s artritisom (nije prikazano).

Navedeni rezultati dovode do zaključka da promjene u koštanoj srži, koje su vjerojatno potaknute citokinskim i kemokinskim okolišem uzorkovanim artritisom, potiču sazrijevanje mijeloidnih stanica te njihovo naseljavanje u periferna tkiva (69). Na to ukazuje i infiltrat mijeloidnih stanica u odjeljku koštane srži distalne tibije, neposredno uz upaljeni zglob, koji se po ukupnom broju i sastavu mijeloidnih progenitora i zrelih mijeloidnih populacija značajno razlikuje od kontrolnog uzorka. Unutar te umnožene populacije nezrelih mijeloidnih stanica nalazi se subpopulacija OCP visokog osteoklastogenog potencijala, koja uzrokuje razaranje kosti i oštećenja u artritisu.

Budući da su pokusi analize koštanih promjena i udjela osteoklastnih progenitora pokazali da se kontrolna skupina tretirana adjuvansom (CFA skupina) ne razlikuje značajno od netretirane kontrolne skupine (ctrl), u nastavku istraživanja uglavnom smo prikazivali i uspoređivali rezultate razlika samo za kontrolnu netretiranu skupinu (ctrl) i skupinu s artritisom (CIA). Ranije prikazani rezultati histomorfometrijske analize te broja TRAP<sup>+</sup> osteoklasta u subhondralnom odjeljku u skupini CFA također nisu pokazali značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu bez tretmana, stoga se može zaključiti da umnažanje, zglobno naseljavanje i aktivacija stanica OCP nisu uzrokovane samim adjuvansom već specifično ovise o imunizaciji na kolagen i posljedičnoj autoimunosnoj zglobnoj upali.



**Slika 21. Udjeli populacija zrelih mijeloidnih loza u slezeni i periartikularnoj koštanoj srži miševa s artritismom.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritis (CIA) imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35. dan nakon primarne imunizacije te je provedena analiza hematopoetskih stanica periartikularne koštane srži (PBM) i slezene (SPL) protočnom citometrijom. (A) Shematski prikaz fenotipskih biljega glavnih zrelih mijeloidnih loza. (B) Udjeli zrelih stanica mijeloidne loze: granulocita (GRAN), monocita (MONO) i makrofaga (MAKRO) u PBM i SPL. Prikazani su rezultati 2 neovisna pokusa (n=4 po skupini), grafovima kao medijan (%) i interkvartilni raspon. \*p <0,05 u odnosu na kontrolnu (ctrl) skupinu (Mann-Whitneyev test).



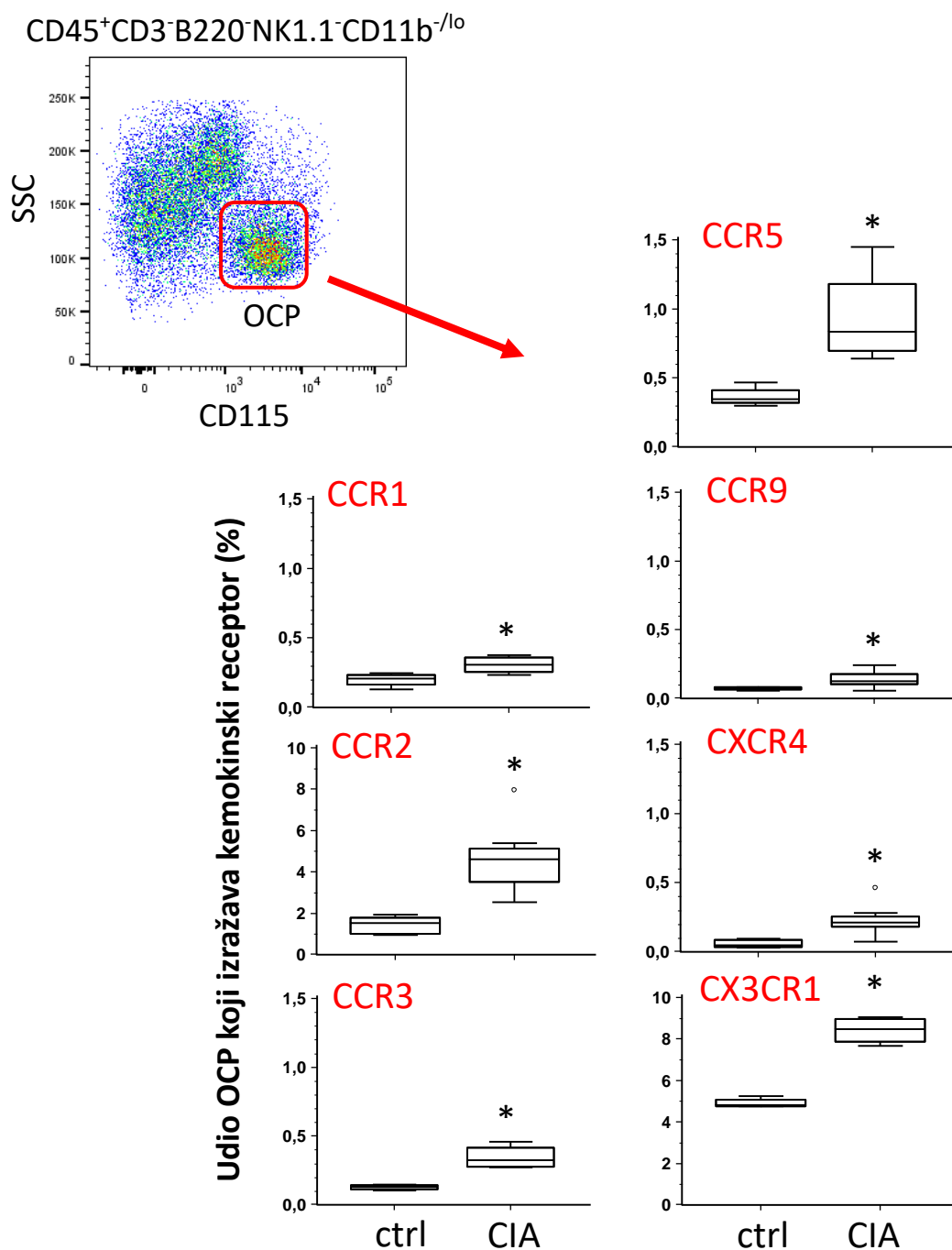
### **5.3. Učinak kemokinskih signala na migraciju i diferencijaciju osteoklastnih progenitora u artritisu potaknutom kolagenom**

Bez obzira na to što je u brojnim studijama pokazana pojačana aktivnost osteoklasta u artritisu, još uvijek nije potpuno razjašnjeno koji signali najviše doprinose specifičnom tkivnom naseljavanju OCP te njihovoj pojačanoj proliferaciji i diferencijaciji u zrele osteoklaste. Stoga smo se u nastavku istraživanja usmjerili na određivanje profila kemokinskih receptora unutar populacije OCP, te određivanju osteoklastogenog potencijala pojedinih subpopulacija OCP definiranih izražajem različitih kemokinskih receptora.

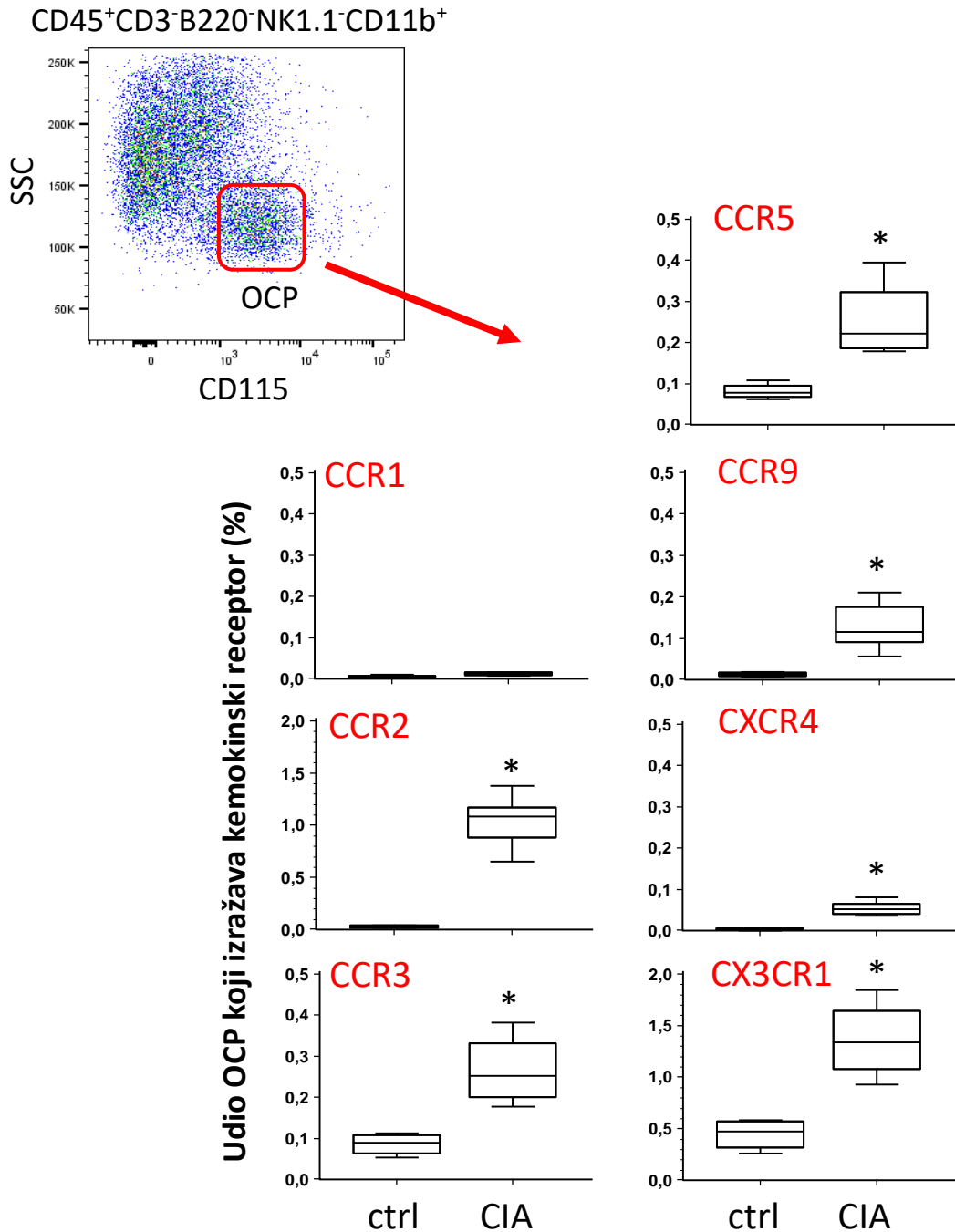
#### **5.3.1. Profil kemokinskih receptora na stanicama osteoklastnih progenitora u artritisu**

Kemokini koji se luče u tkivu zahvaćenom upalnim i autoimunskim odgovorom stvaraju kemokinski gradijent koji daje kemotaktične signale stanicama koje izražavaju odgovarajuće kemokinske receptore (90). Osim toga sustavno pojačano lučenje proupalnih citokina i kemokina potiče sazrijevanje, cirkulaciju i migraciju limfoidnih i mijeloidnih stanica. Stoga smo u našem istraživanju najprije odredili profil izražaja kemokinskih receptora na populaciji OCP različitih tkiva.

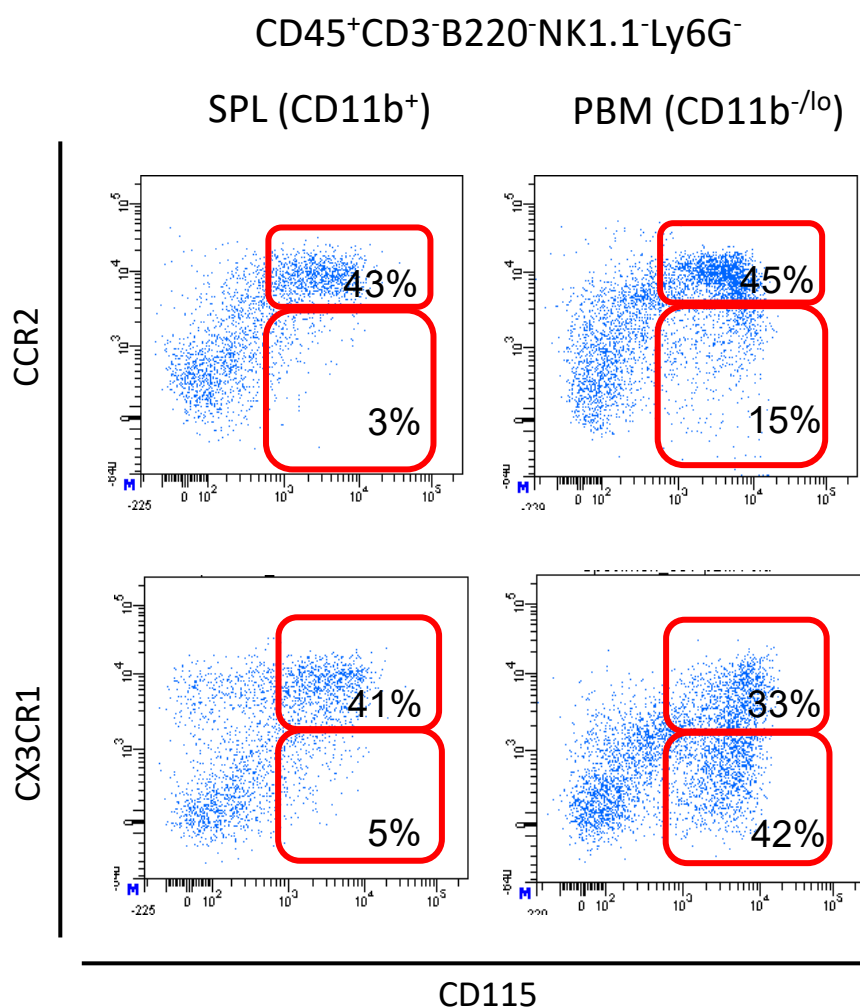
Kao što je prije navedeno, OCP predstavljaju oko 4-5% svih hematopoetskih stanica u sustavnoj koštanoj srži, dok je u PBM odjeljku koštane srži taj udio manji (**Slika 20**). U artritisu dolazi do ekspanzije populacije OCP u PBM, koja također pojačano izražava brojne kemokinske receptore u odnosu na kontrolne miševe, uključujući CCR2 i CX3CR1 (**Slika 22**). Ostali analizirani kemokinski receptori (CCR1, CCR3, CCR5, CCR9, CXCR4) također su pojačano izraženi u artritisu, ali na vrlo malom udjelu populacije OCP. U slezeni, udio stanica OCP među mononuklearnim hematopoetskim stanicama čini u fiziološkim uvjetima manje od 0,3%, a doseže oko 1% u miševa s artritisom (**Slika 18**). Udio OCP koji izražavaju kemokinske receptore u slezeni povećan je u artritisu, ali u usporedbi s koštanom srži njihova je frekvencija manja za sve analizirane receptore (**Slika 23**). Na temelju profila izražaja kemokinskih receptora zaključili smo da su receptori CCR2 i CX3CR1 izraženi na znatnom dijelu populacije OCP fenotipa CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>-/lo</sup>CD115<sup>+</sup>, oko 50% za CCR2 i CX3CR1 u PBM miševa s artritisom, zato smo u daljnjim pokusima analize migracijskog i osteoklastogenog potencijala uključili subpopulacije OCP CCR2<sup>+</sup> i CX3CR1<sup>+</sup> u PBM (**Slika 24**).



**Slika 22. Udjeli populacije osteoklastnih progenitora koji izražavaju kemokinske receptore u periartikularnoj koštanoj srži.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritis (CIA) imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35. dan nakon primarne imunizacije te je provedena analiza periartikularne koštane srži protočnom citometrijom. Analiziran je udio osteoklastnih progenitora (OCP) CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>-/lo</sup>CD115<sup>+</sup> koji izražava pojedini kemokinski receptor (CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CCR9, CXCR4 ili CX3CR1) u ukupnom broju hematopoetskih CD45<sup>+</sup> stanica u odnosu na kontrolne (netretirane) miševe (ctrl). Rezultati su prikazani grafovima kao medijan (%) i interkvartilni raspon. Prikazani su rezultati 2 neovisna pokusa (n=4 po skupini). \*p < 0,05 u odnosu na kontrolnu (ctrl) skupinu (Mann-Whitneyev test).



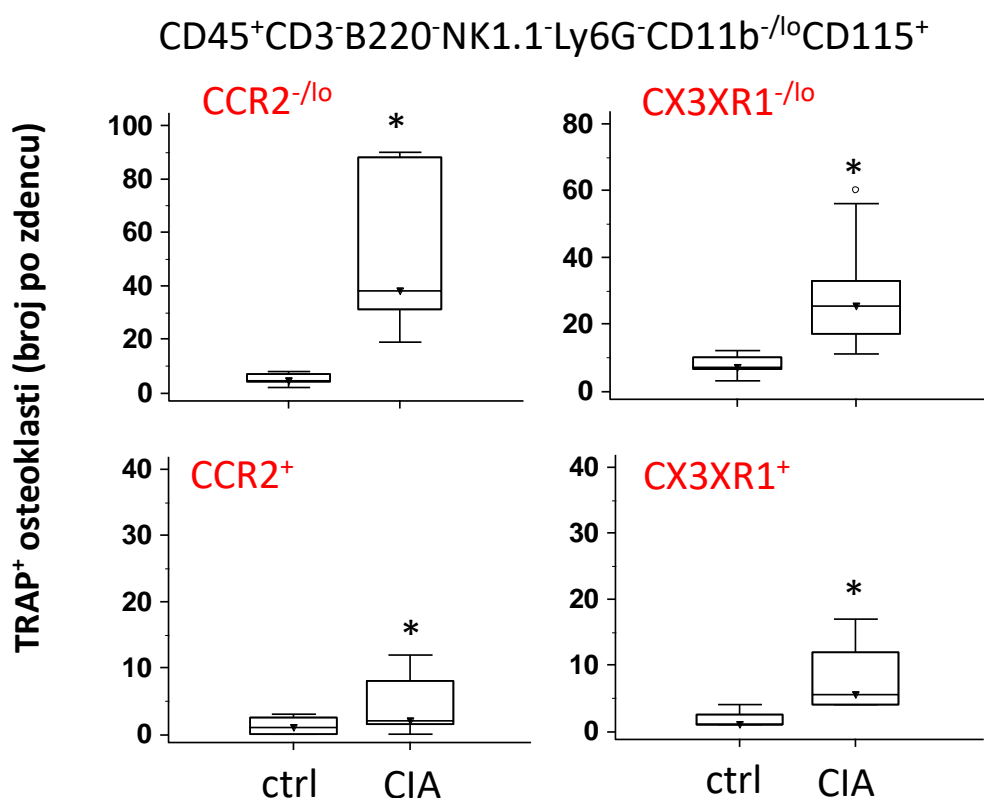
**Slika 23. Udjeli populacija osteoklastnih progenitora koji izražavaju kemokinske receptore u slezeni.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritis (CIA) imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35. dan nakon primarne imunizacije te je provedena analiza stanica slezene protočnom citometrijom. Analiziran je udio osteoklastnih progenitora (OCP) CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup> koji izražava pojedini kemokinski receptor (CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CCR9, CXCR4 ili CX3CR1) u ukupnom broju hematopoetskih CD45<sup>+</sup> stanica u odnosu na kontrolne (netretirane) miševe (ctrl). Rezultati su prikazani grafovima kao medijan (%) i interkvartilni raspon. Prikazani su rezultati 2 neovisna pokusa (n=4 po skupini). \*p < 0,05 u odnosu na kontrolnu (ctrl) skupinu (Mann-Whitneyev test).



**Slika 24. Reprezentativni prikaz udjela populacije osteoklastnih progenitora koji izražavaju kemokinske receptore CCR2 i CX3CR1 u slezeni i periartikularnoj koštanoj srži.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritis (CIA) imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35. dan nakon primarne imunizacije te je provedena analiza stanica slezene (SPL) i periartikularne koštane srži (PBM) protočnom citometrijom. Analiziran je udio osteoklastnih progenitora (OCP)  $CD45^+CD3^-B220^-NK1.1^-Ly6G^-CD11b^+CD115^+$  za SPL i  $CD45^+CD3^-B220^-NK1.1^-Ly6G^-CD11b^{-/lo}CD115^+$  za PBM koji izražavaju kemokinske receptore CCR2 ili CX3CR1 te subpopulacija OCP sa slabim ili negativnim izražajem CCR2 ili CX3CR1. Prikazani su reprezentativni točkasti grafikoni za SPL i PBM miševa s artritsom te udio (%) stanica OCP prema izražaju kemokinskog receptora u populaciji  $CD11b^{-/lo}$  za PBM i  $CD11b^+$  za SPL.

### 5.3.2. Osteoklastogeni potencijal osteoklastnih progenitora CCR2<sup>+</sup> i CX3CR1<sup>+</sup>

Kako bi ispitali osteoklastogeni potencijal specifične subpopulacije OCP koja izražava odgovarajući kemokinski receptor koristili smo postupak razvrstavanja stanica pomoću protočnog citometra. Stanice PBM kontrolnih miševa i miševa s artritisa označene su monoklonalnim protutijelima na panhematopoetski biljeg CD45, limfocitne biljege CD3, B220 i NK1.1 te mijelodine biljege Ly6G, CD11b i CD115, uz kemokinske receptore CCR2 i CX3CR1.

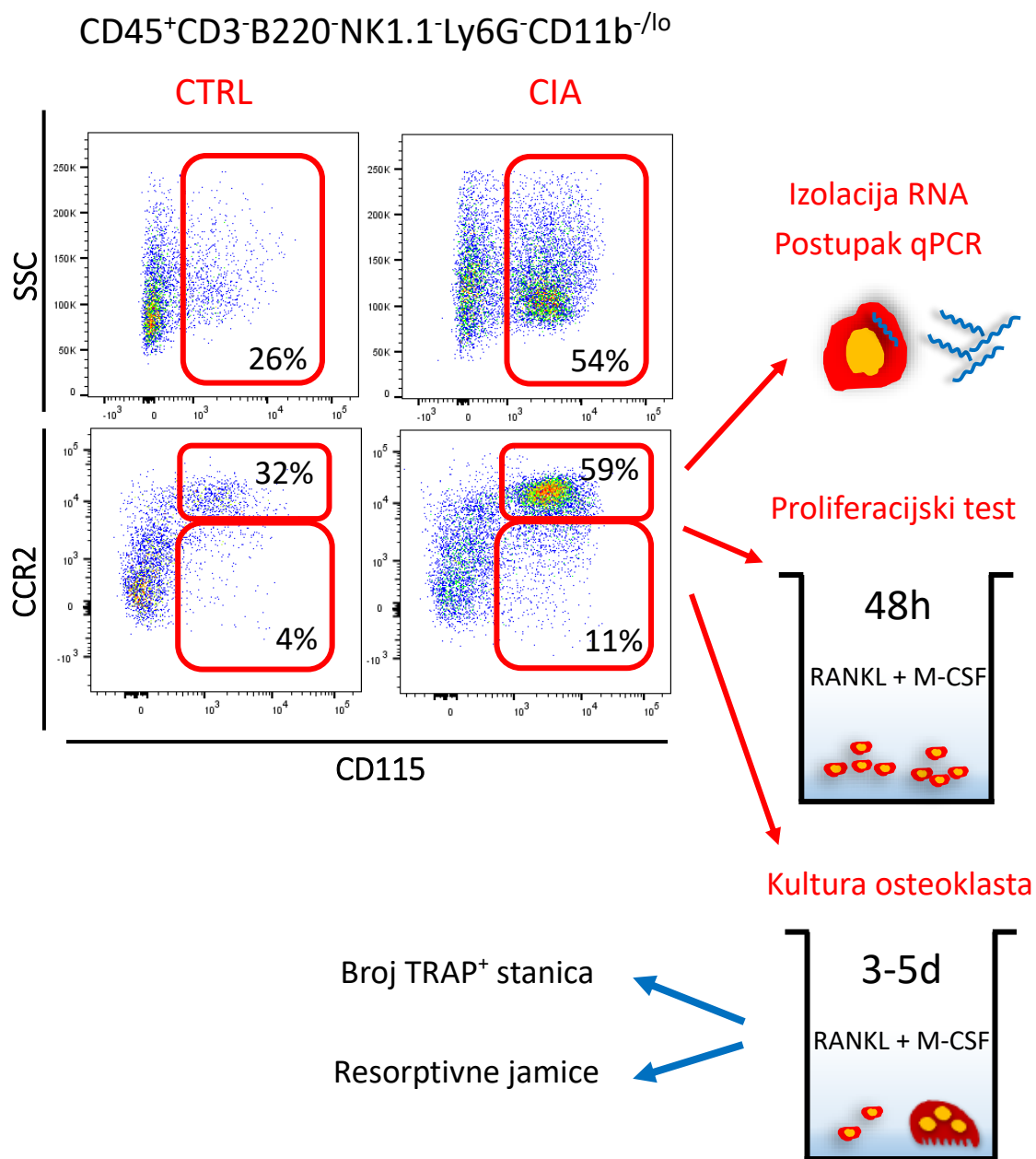


**Slika 25. Osteoklastogeni potencijal razvrstanih subpopulacija osteoklastnih progenitora perartikularne koštane srži koje izražavaju kemokinske receptore CCR2 ili CX3CR1 u miševa s artritisa.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritis (CIA) imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35. dan nakon primarne imunizacije te je provedena analiza i razvrstavanje stanica periartikularne koštane srži protočnom citometrijom. U kultivacijske pločice sa 96 zdenaca zasađeno je 5000 razvrstanih stanica po zdencu, a diferencijacija osteoklasta potaknuta je čimbenicima RANKL i M-CSF (30 ng/mL). Diferencirani osteoklasti kvantificirani su brojanjem TRAP<sup>+</sup> višezrgrenih stanica nakon 5 dana kultivacije. Rezultati su prikazani grafovima kao medijan (%) i interkvartilni raspon. \*p < 0,05 u odnosu na kontrolnu (ctrl) skupinu (Mann-Whitneyev test).

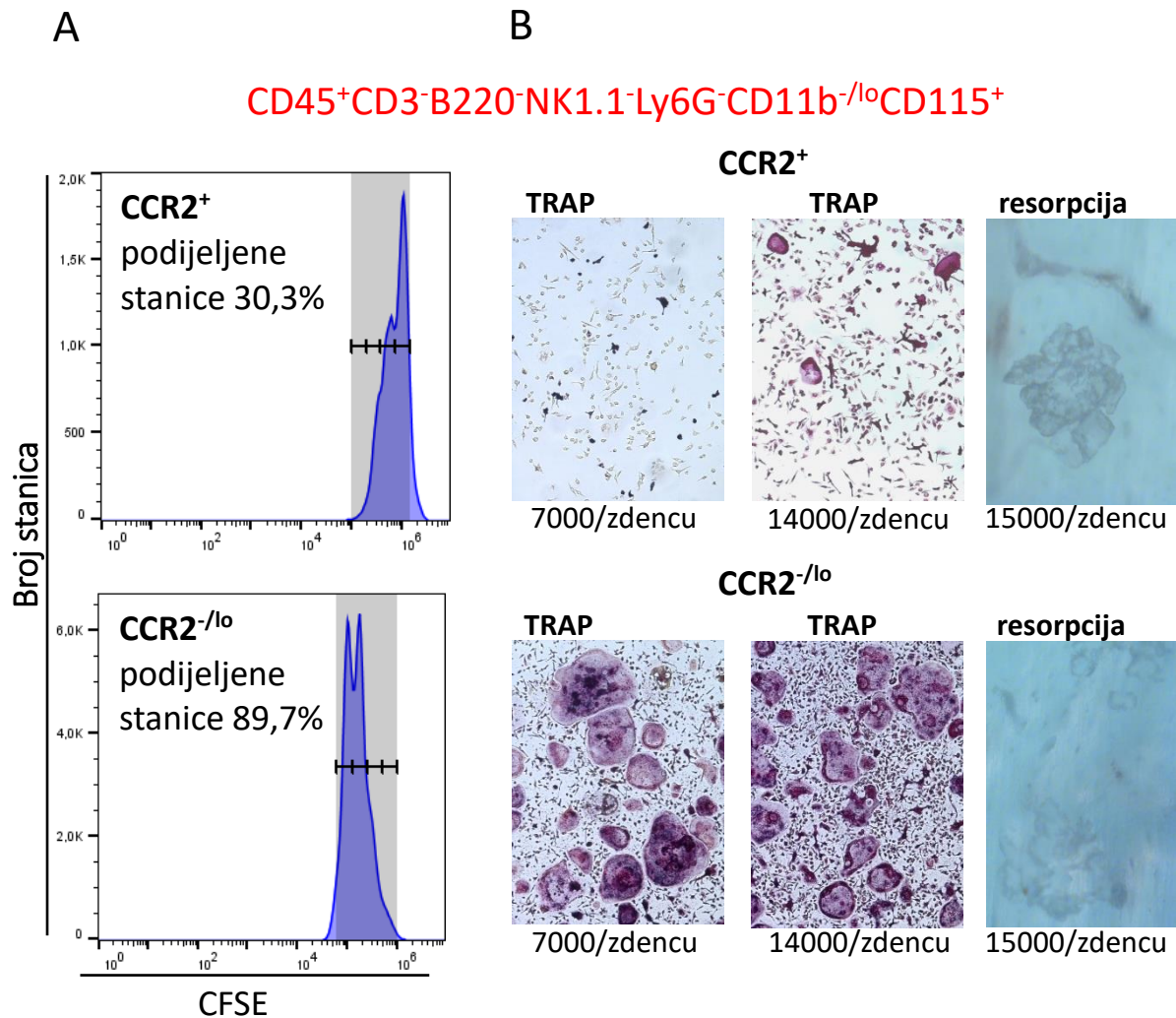
Ciljne populacije OCP ( $CD45^+CD3^-B220^-NK1.1^-Ly6G^-CD11b^{-/lo}CD115^+$ ) razvrstane su na temelju izražaja kemokinskih receptora i zasađene u osteoklastogene kulture. Osteoklastogeni potencijal procijenjen je na temelju kvantifikacije TRAP<sup>+</sup> multinuklearnih osteoklasta (**Slika 25**).

Rezultate diferencijacije analizirali smo za odgovarajuće subpopulacije OCP u odnosu na izražaj kemokinskog receptora. Za obje subpopulacije s visokim izražajem kemokinskog receptora (CCR2<sup>+</sup> i CX3CR1<sup>+</sup>), vrijedi da je broj diferenciranih osteoklasta manji u odnosu na subpopulacije koje karakterizira slab izražaj kemokinskog receptora (CCR2<sup>-/lo</sup> i CX3CR1<sup>-/lo</sup>). Također, važno je uočiti da se u artritisu specifično umnožava subpopulacija sa slabim izražajem kemokinskog receptora (CCR2<sup>lo</sup> i CX3CR1<sup>lo</sup>), koja je u kontrolnih miševa malobrojna (**Slika 24**). Upravo ta subpopulacija pokazuje najveći osteoklastogeni potencijal *in vitro*. Nadalje fenotipizacija i diferencijacija razvrstanih populacija pokazala je da izražaj kemokinskog receptora CCR2 definira subpopulaciju OCP najvećeg osteoklastogenog potencijala, jer je broj diferenciranih osteoklasta najveći u kulturama stanica fenotipa  $CD45^+CD3^-B220^-NK1.1^-Ly6G^-CD11b^{-/lo}CD115^-CCR2^{lo}$  u odnosu na druge populacije. Stoga smo u nastavku istraživanja detaljno analizirali i uspoređivali osteoklastogeni potencijal subpopulacija OCP na temelju izražaja receptora CCR2, te smo osim broja diferenciranih TRAP<sup>+</sup> osteoklasta, analizirali proliferativnu sposobnost, izražaj specifičnih osteoklastnih gena i osteoresorptivnu sposobnost tih stanica *in vitro*, u artritisu u odnosu na kontrolnu skupinu (**Slika 26**).

Premda i CCR2<sup>+</sup> i CCR2<sup>lo</sup> subpopulacije mogu generirati TRAP<sup>+</sup> osteoklaste koji resorbiraju koštani matriks *in vitro*, subpopulacija CCR2<sup>+</sup> zahtjeva veću gustoću zasađenih stanica i duže vrijeme kultivacije (**Slika 27B**). Nadalje, subpopulacija CCR2<sup>lo</sup> pokazuje znatno veći proliferacijski indeks jer se većina stanica podijeli unutar prvih 48 sati kultivacije s čimbenicima RANKL i M-CSF, za razliku od CCR2<sup>+</sup> subpopulacije (**Slika 27A**). Navedeni rezultati dovode do zaključka da CCR2<sup>lo</sup> subpopulaciju čine nezrelije stanice OCP s većim potencijalom proliferacije. U isto vrijeme ta populacija stanica miševa s artritisom jače izražava gen za RANK, što može objasniti najveći osteoklastogeni potencijal te subpopulacije *in vitro*, nakon poticanja ključnim čimbenikom osteoklastogeneze RANKL-om (**Slika 28**). Nasuprot tome, CCR2<sup>+</sup> subpopulacija vjerojatno predstavlja usmjerenije progenitore, koji su predodređeni prema osteoklastnoj/makrofagnoj lozi, čemu u prilog govori jači izražaj gena za transkripcijski čimbenik c-Fos te subpopulacije u miševa s artritisom (116).



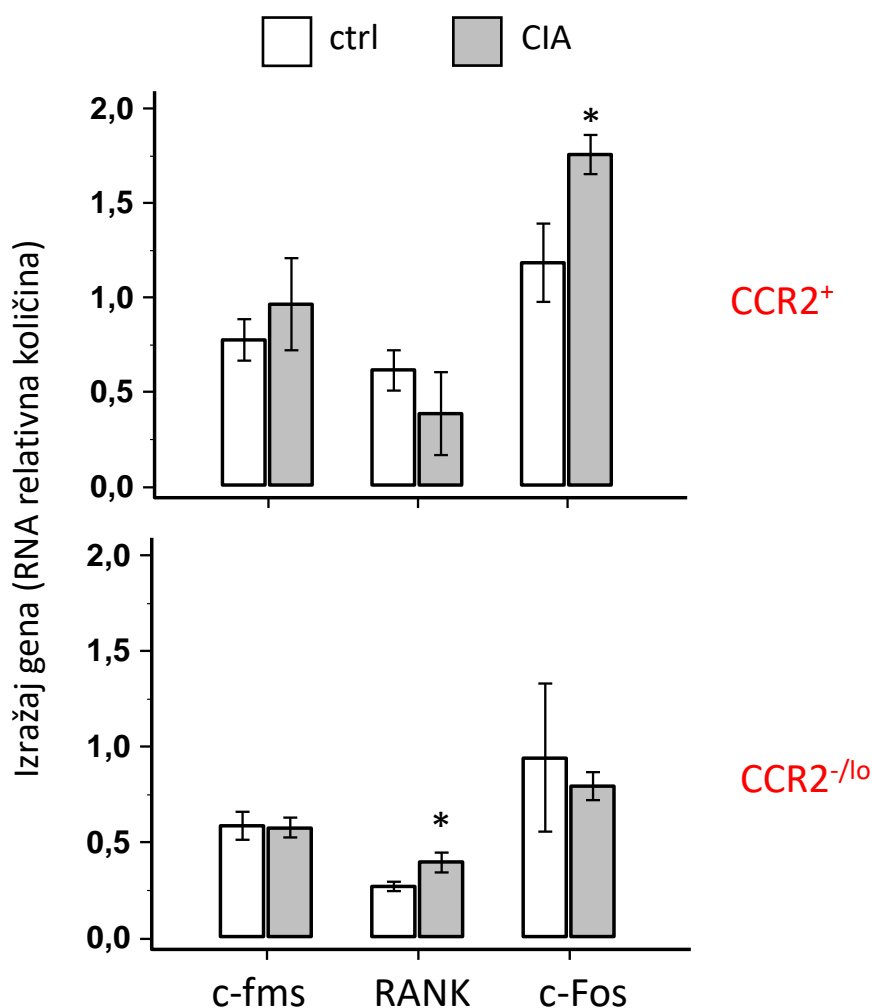
**Slika 26. Karakterizacija subpopulacija osteoklastnih progenitora periartikularne koštane srži u odnosu na izražaj kemokinskog receptora CCR2 u miševa s artritisom.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritis (CIA) imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35. dan nakon primarne imunizacije te je provedena analiza i razvrstavanje stanica periartikularne koštane srži protočnom citometrijom. Prikazani su reprezentativni točkasti grafikoni za kontrolne miševe i miševe s artritisom. Stanice OCP ( $CD45^+CD3^-B220^-NK1.1^-Ly6G^-CD11b^{-/lo}CD115^+$ ) rasvrstane su u subpopulacije CCR2<sup>+</sup> i CCR2<sup>-/lo</sup> te su dalje analizirane u odnosu na izražaj osteoklastnih specifičnih gena, proliferacijsku sposobnost, broj TRAP<sup>+</sup> osteoklasta i stvaranje resorptivnih jamica na koštanim pločicama.



**Slika 27. Proliferacijski i diferencijacijski potencijal osteoklastnih progenitora periartikularne koštane srži s obzirom na izražaj kemokinskog receptora CCR2 u miševa s artritismom.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritis (CIA) imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35. dan nakon primarne imunizacije te je provedena analiza i razvrstavanje stanica periartikularne koštane srži protočnom citometrijom. Stanice OCP (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD11b<sup>-/lo</sup>CD115<sup>+</sup>) razvrstane su u subpopulacije CCR2<sup>+</sup> i CCR2<sup>-/lo</sup>. **(A)** Proliferacijski indeks subpopulacija OCP na temelju izražaja CCR2. Stanice su razvrstane, označene bojom CFSE te zasađene u osteoklastogene kulture potaknute čimbenicima RANKL i M-CSF (30 ng/mL). Udio stanica koje su proliferirale određen je na temelju smanjenja intenziteta boje, koja se uslijed diobe stanica razdjeljuje u stanice kćeri. **(B)** Osteoklastogeni potencijal subpopulacija OCP na temelju izražaja CCR2. Broj TRAP<sup>+</sup> višezvezganih osteoklasta utvrđen je nakon kultivacije 72 sata u kulturama potaknutim čimbenicima RANKL i M-CSF (30 ng/mL). Osteoresorptivna sposobnost testirana je u osteoklastogenim kulturama zasađenim na pločice kortikalne goveđe kosti tijekom 15 dana. Resorptivne jamice prikazane su nakon odstranjivanja stanica soniciranjem i bojenja pločica toluidinom.



CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD11b<sup>-/lo</sup>CD115<sup>+</sup>



**Slika 28. Izražaj osteoklastnih specifičnih gena u osteoklastnim progenitorima periartikularne koštane srži s obzirom na izražaj kemokinskog receptora CCR2 u miševa s artritismom.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritis (CIA) imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35. dan nakon primarne imunizacije te je provedena analiza i razvrstavanje stanica periartikularne koštane srži protočnom citometrijom. Stanice OCP (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD11b<sup>-/lo</sup>CD115<sup>+</sup>) razvrstane su u subpopulacije CCR2<sup>+</sup> i CCR2<sup>-/lo</sup> u kontrolnih miševa i miševa s artritismom (30000 do 60000 stanica po skupini). Iz stanica je izolirana RNA, obrnuto prepisana u komplementarnu cDNA i analizirana postupkom qPCR korištenjem komercijalno dostupnih proba (TaqMan, Thermofisher Scientific) za osteoklastne specifične gene: RANKL, CD115/c-fms i c-Fos. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija za relativnu količinu RNA, dobivenu normalizacijom na ubikvitarno izraženi gen za β-aktin. \*p < 0,05 u odnosu na odgovarajuću kontrolnu (ctrl) skupinu (t test).

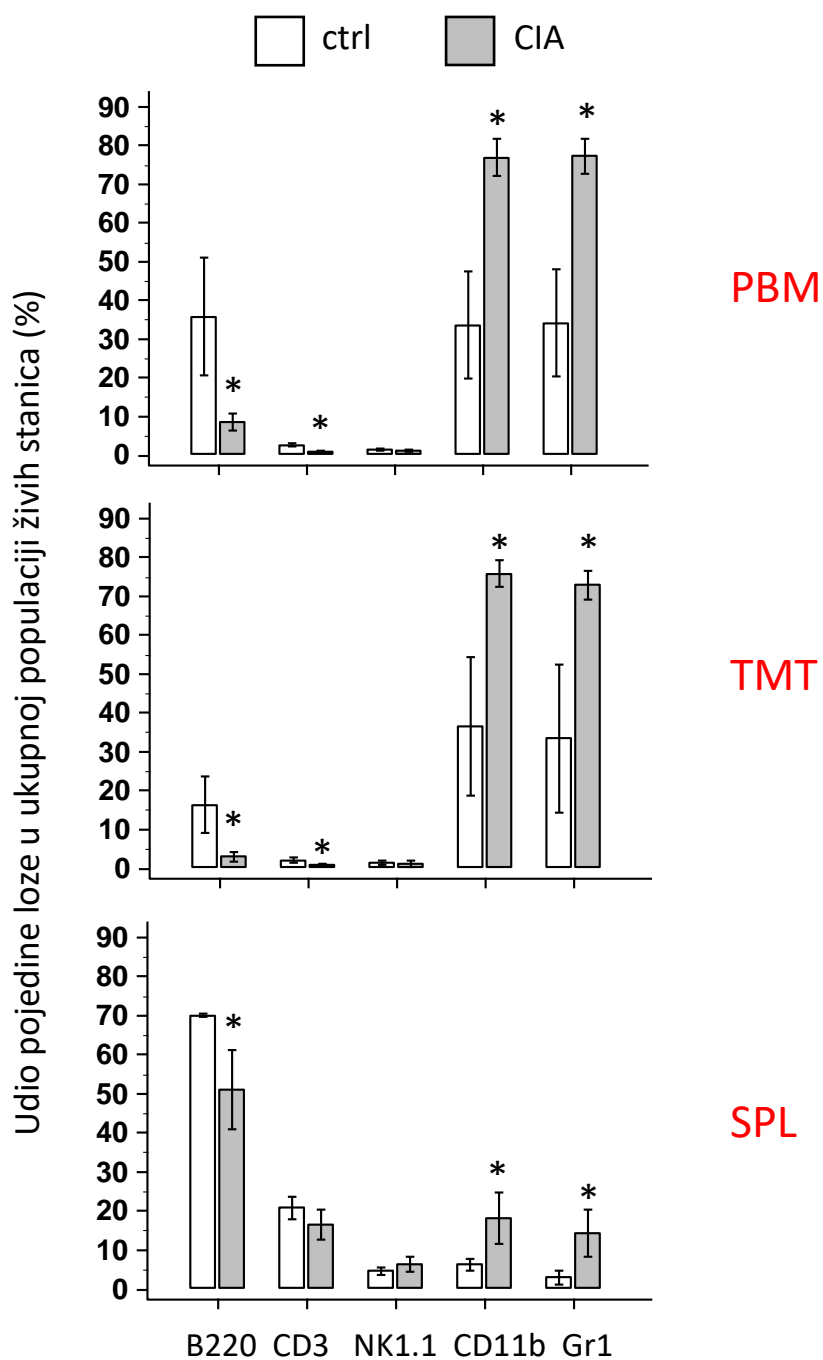
## 5.4. Upalni okoliš u perifernim i lokalnim tkivima zahvaćenim artritismom

Osteoklasti su stanice hematopoetskog podrijetla koje tijekom sazrijevanja izražavaju brojne receptore za medijatore upalnog i autoimunskog odgovora, uključujući citokinske i kemokinske receptore. Nadalje citokini i kemokini djeluju i na druge stanice koštane srži i zglobova zahvaćene artritismom, primjerice stromalne stanice, osteoblaste i sinovijalne fibroblaste, koji potom luče osteoklastogene čimbenike (26, 117). Stoga smo u nastavku istraživanja okarakterizirali promjene u populacijama imunskih stanica, prije svega limfocita, s obzirom na to da smo u prethodnim pokusima već pokazali da u artritisu dolazi do umnažanja mijeloidne loze. Nadalje, u serumu, perifernim i lokalnim hematopoetskim tkivima analizirali smo izražaj kemokina i citokina koji mogu pospješiti aktivaciju mijeloidne loze i diferencijaciju osteoklasta.

### 5.4.1. Promjene udjela imunskih populacija u artritisu

Uzimajući u obzir upalnu i autoimunsku etiopatogenezu, tijekom razvoja artritisa dolazi do značajnih promjena u ukupnom broju i međusobnim udjelima mijeloidnih i limfoidnih stanica (10, 46). U našem smo istraživanju, stoga, analizirali glavne loze zrelih hematopoetskih stanica: limfocita B (B220<sup>+</sup>), limfocita T (CD3<sup>+</sup>), stanica NK (NK1.1<sup>+</sup>), mijeloidnih stanica (CD11b<sup>+</sup>) i granulocita (Gr1<sup>+</sup>) sustavno u slezeni (SPL) i lokalno u tkivima zahvaćenim artritismom (PBM i TMT) (**Slika 29**). Uz pretpostavku da do promjena u lozama imunskih stanica dolazi neposredno nakon imunizacije kolagenom, prije aktivacije osteoklasta i razaranja kosti, analizu tkiva prikazali smo u vremenskoj točki 25 dana nakon primarne imunizacije (**Slika 29**). Sličan obrazac promjena imunskih populacija zapažen je i u kasnijim vremenskim točkama razvoja artritisa (nije prikazano).

Kao što je očekivano na temelju prethodnih rezultata, u svim analiziranim tkivima (SPL, PBM i TMT) dolazi do relativnog smanjenja limfoidnih populacija (posebice B220<sup>+</sup>) i umnažanja mijeloidnih populacija (CD11b<sup>+</sup> i Gr1<sup>+</sup>) u artritisu. Treba istaknuti da je smanjenje limfoidnih populacija samo relativno, jer u svim navedenim tkivima dolazi do znatnog povećanja celularnosti (**Slika 16**) pa se apsolutni broj limfoidnih stanica zapravo ne smanjuje, a apsolutni broj mijeloidnih stanica višestruko se povećava (**Slika 29**).



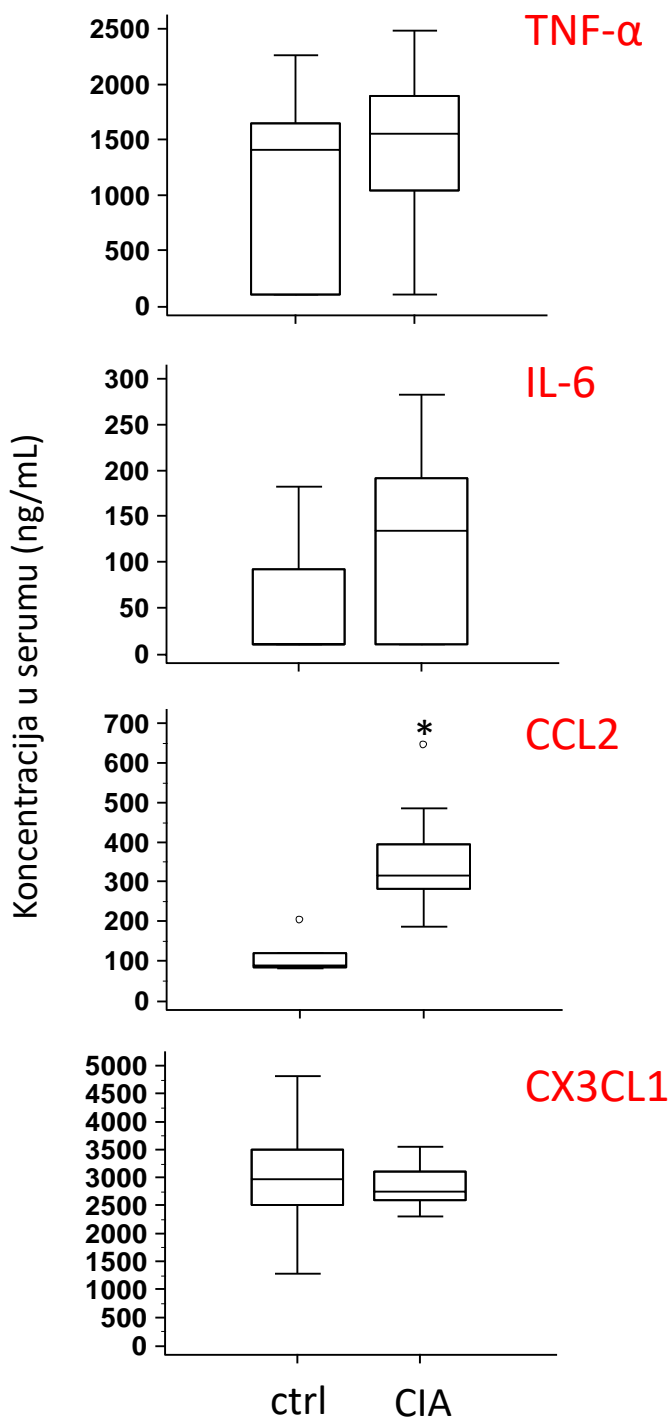
**Slika 29. Udjeli populacija zrelih limfoidnih i mijeloidnih loza u slezeni i periartikularnoj koštanoj srži miševa s artritismom.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritis (CIA) imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 25. dana nakon primarne imunizacije te je provedena analiza hematopoetskih stanica periartikularne koštane srži (PBM), stanica izdvojenih iz tarzometatarzalnog tkiva šape (TMT) i slezene (SPL) protočnom citometrijom u kontrolnih miševa (ctrl) i miševa s artritismom (CIA). Prikazani su udjeli stanica (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija) prema biljezima B220, CD3, NK1.1, CD11b i Gr1, u ukupnom broju živih stanica. Prikazani su rezultati iz 2 neovisna pokusa (n=4 po skupini). \*p < 0,05 u odnosu na odgovarajuću kontrolnu (ctrl) skupinu (t test).

## 5.4.2. Citokinski i kemokinski okoliš u artritisu

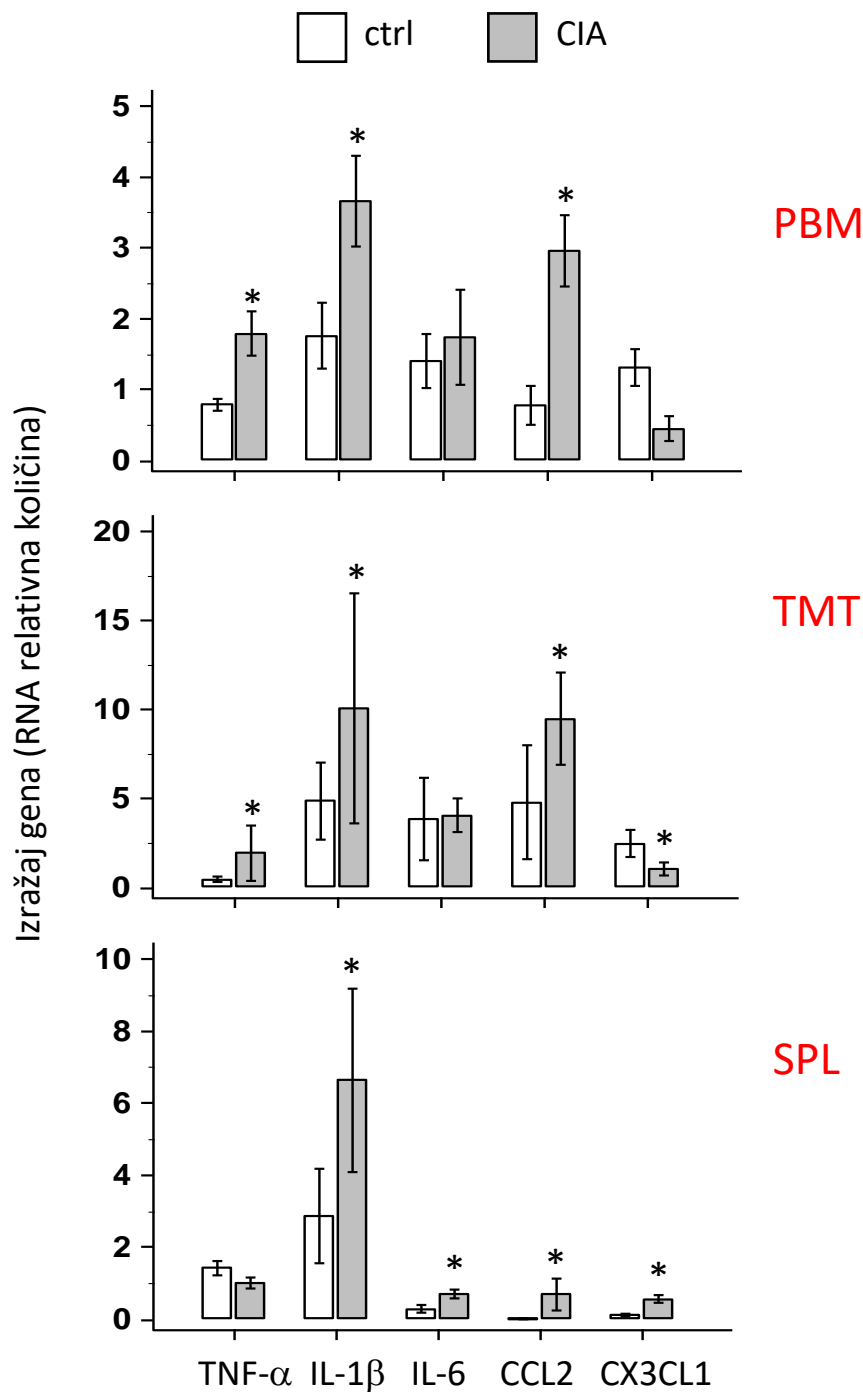
Očekivali smo da ekspanziju mijeloidnih populacija na sustavnoj i lokalnoj razini prati povećanje lučenja proupalnih citokina i kemokina. U serumu miševa s artritisom analizirali smo koncentraciju kemokina CCL2 i CX3CL1 postupkom ELISA, a koncentracije više proupalnih citokina postupkom imunoeseja pomoću protočne citometrije (posebice smo analizirali koncentracije TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17). U vremenskoj točki 35. dan nakon primarne imunizacije, samo je koncentracija kemokina CCL2 značajno viša u serumu miševa s artritisom u odnosu na kontrolnu skupinu, dok su koncentracije ostalih medijatora bile podjednake u obje skupine. Koncentracije IL-1 $\beta$  i IL-17 u većini su uzoraka seruma obje skupine bile ispod granice osjetljivosti eseja (**Slika 30**).

Izražaj upalnih medijatora analizirali smo i na razini izražaja gena, u uzorcima SPL, PBM i TMT. U više naših prethodnih studija pokazali smo da za upalne citokine i kemokine, proteinska razina prati razinu izražaja gena u ciljnim tkivima (46). Od dobivenih rezultata ističemo pojačan izražaj gena za proupalne citokine TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  u PBM i TMT miševa s artritisom u odnosu na kontrolu (**Slika 31**). To upućuje na važnost tih medijatora u lokalnim tkivima zahvaćenim artritisom, čime pridonose patogenezi zglobnog razaranja. Izražaj gena za proupalne citokine IL-1 $\beta$  i IL-6 viši je u stanicama slezene u miševa s artritisom, što ukazuje na sustavnu stimulaciju lučenja proupalnih citokina, u skladu sa prirodom artritisa kao kronične upalne bolesti.

Treba istaknuti da je izražaj gena za CCL2 viši u svim analiziranim tkivima miševa s artritisom u odnosu na kontrolu (**Slika 31**), te odgovara povišenim koncentracijama toga kemokina u serumu (**Slika 30**). Nadalje, relativni izražaj jači je u perifernim tkivima u odnosu na slezenu, što upućuje na važnost CCL2 u patogenezi artritisa te postojanju kemokinskog gradijenta koji pogoduje privlačenju upalnih stanica CCR2<sup>+</sup>, među njima i stanica OCP, u zglobove i periartikularno tkivo zahvaćeno artritisom. Nasuprot tome, izražaj gena za CX3CL1 viši je samo u slezeni u miševa s artritisom u odnosu na kontrolnu skupinu, što upućuje na njegovu važnost u poticanje migracije perifernih monocita (koji u velikom postotku izražavaju receptor CX3CR1). Premda je uloga CCL2 već poznata u artritisu, dosadašnje studije uglavnom su istraživale učinak toga kemokina na razvoj upale i aktivaciju imunskih stanica (118, 119). Nastavak istraživanja fokusirali smo na ulogu CCL2/CCR2 kemotaktičnog signala u migraciji stanica OCP prema upaljenih zglobovima.



**Slika 30. Serumske razine citokina i kemokina u miševa s artritismom.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritis (CIA) imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35. dana nakon primarne imunizacije te je provedena analiza koncentracija odabranih kemokina i citokina u serumu postupcima ELISA (CCL2, CX3CL1) i protočnom citometrijom (imunoeseji za TNF- $\alpha$  i IL-6). Prikazani su rezultati 2 neovisna pokusa; medijan uz interkvartilni raspon (n=8 po skupini). \*p <0,05 u odnosu na kontrolnu (ctrl) skupinu (Mann-Whitneyev test).



**Slika 31. Izražaj gena za citokine i kemokine u različitim tkivima miševa s artritismom.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritismom (CIA) imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35. dana nakon primarne imunizacije te je provedena analiza hematopoetskih stanica periartikularne (PBM) koštane srži, stanica izdvojenih iz tarzometatarzalnog dijela šape (TMT) i slezene (SPL) postupkom qPCR. Iz stanica je izolirana RNA, obrnuto prepisana u komplementarnu cDNA i analizirana postupkom qPCR korištenjem komercijalno dostupnih proba (TaqMan, Thermofisher Scientific) za citokine i kemokine: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CCL2 i CX3CL1. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija za relativnu količinu RNA, dobivenu normalizacijom na ubikvitarno izraženi gen za  $\beta$ -aktin. \*p < 0,05 u odnosu na odgovarajuću kontrolnu (ctrl) skupinu (t test).

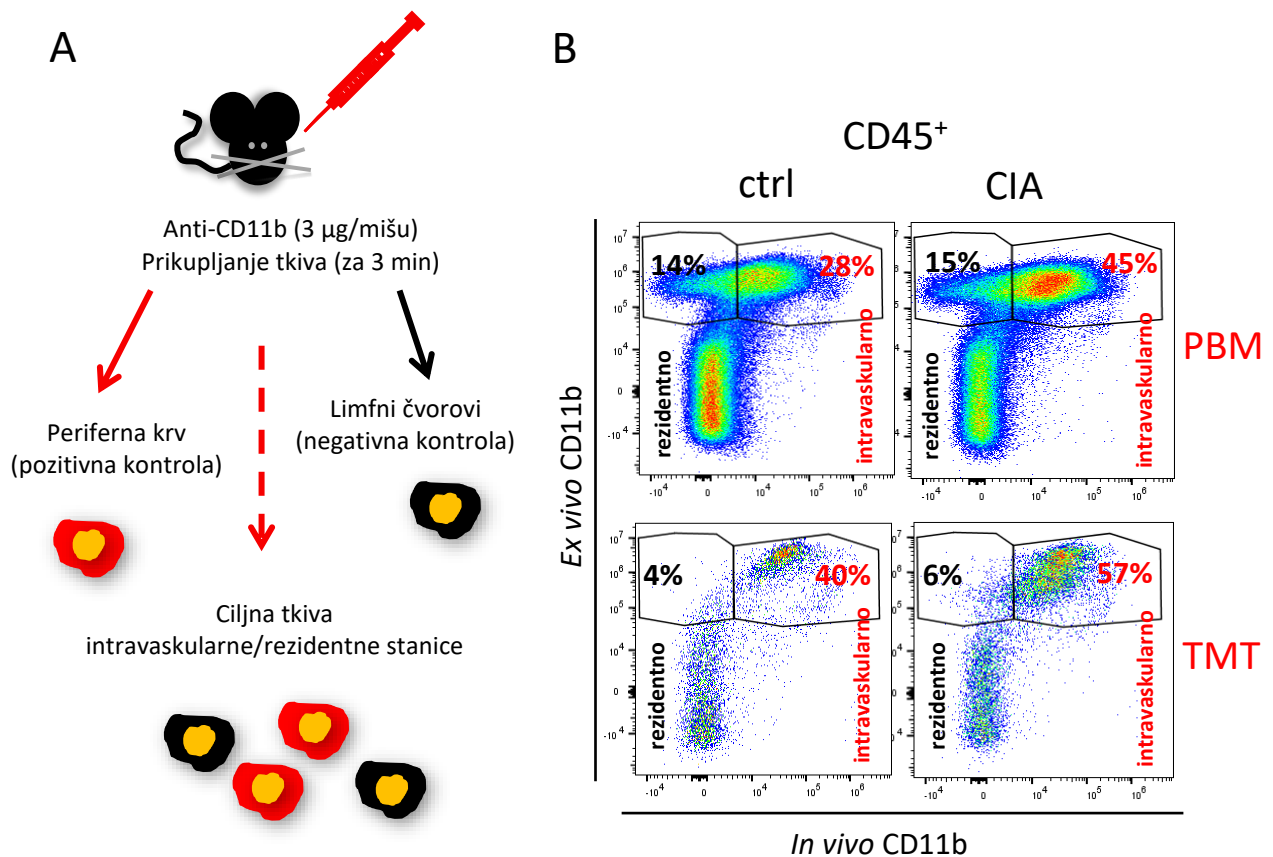
## 5.5. Kemotaktični učinak kemokina CCL2 i CX3CL1 na migraciju osteoklastnih progenitora u artritisu potaknutom kolagenom

S obzirom na to da smo pokazali da znatan udio stanica OCP izražava kemokinske receptore i posjeduje osteoklastogeni potencijal, u posljednjem dijelu istraživanja testirali smo učinak kemokina CCL2 i CX3CR1 na migraciju stanica OCP u miševa s artritisom. Pretpostavili smo da stanice OCP koje izražavaju kemokinske receptore mogu odgovoriti na kemotaktični signal odgovarajućeg kemokina izlučenog u zglobovima zahvaćenim artritisom. Na taj način bi se stanice OCP pojačano nakupljale u ciljnom tkivu i uzrokovale koštano razaranje u zahvaćenim zglobovima.

### 5.5.1. *In vivo* praćenje cirkulacije i migracije osteoklastnih progenitora u artritisu

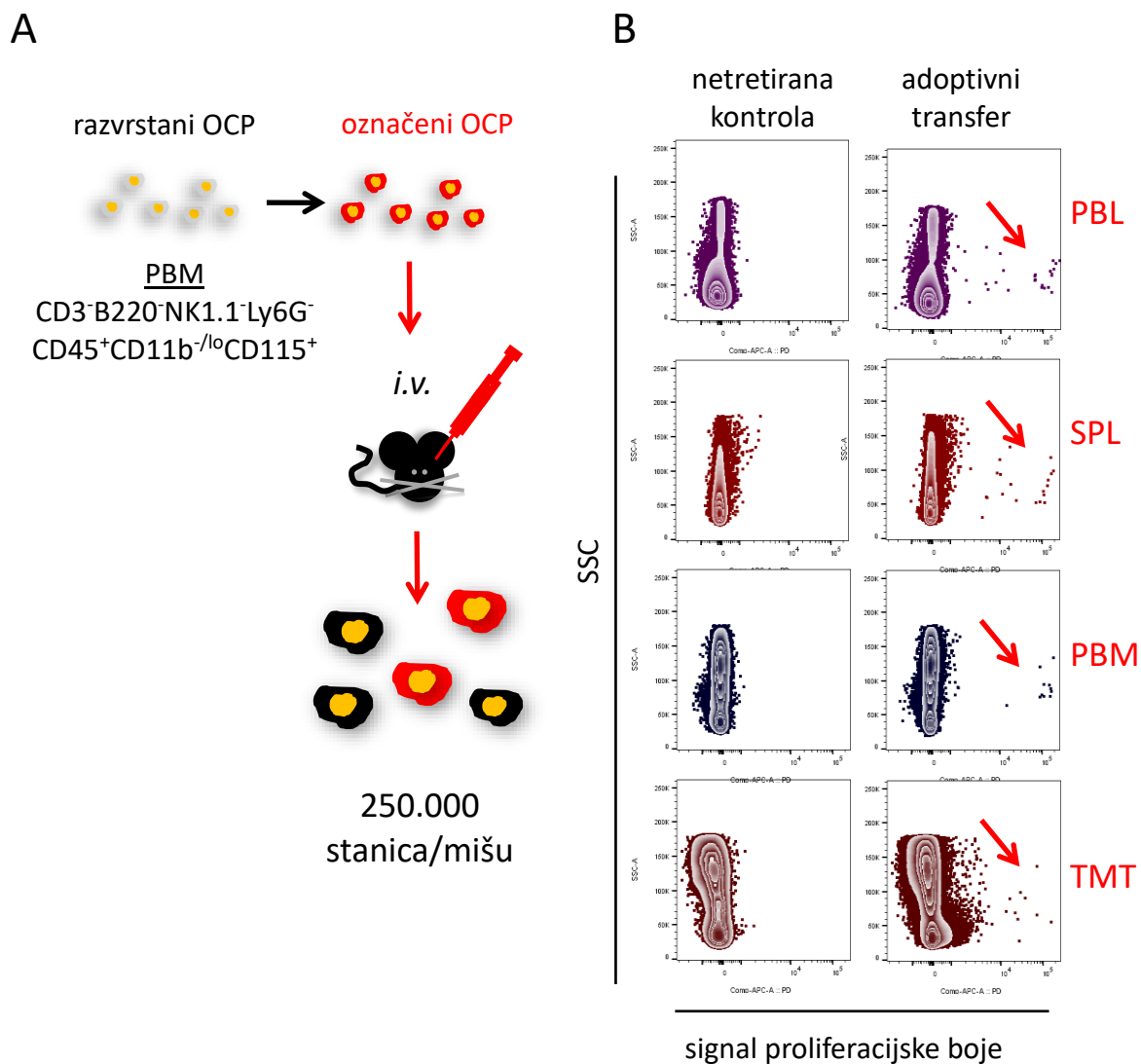
Pretpostavka našeg istraživanja jest da se stanice OCP osim u koštanoj srži nalaze i u cirkulaciji te da su podložne kemotaktičnim signalima koji uzrokuju njihovo nakupljanje u tkivu. Stoga smo u prvom djelu ove faze istraživanja najprije utvrdili cirkulacijski (intravaskularni) u odnosu na tkivni (rezidentni) udio stanica OCP u pojedinim tkivima miševa s artritisom u odnosu na kontrolne miševe. U tu svrhu koristili smo postupak intravaskularnog označavanja ciljne populacije mijeloidnih stanica, injiciranjem fluorescentno označenih specifičnih monoklonalnih protutijela usmjerenih na pan-mijeloidni stanični biljeg CD11b (114).

Analizom stanica PBM i TMT uočili smo da je rezidentna populacija mijeloidnih stanica razmjerno malobrojna (oko 15% u koštanoj srži i oko 5% u zglobovima), podjednako u kontrolnih miševa i miševa s CIA. Većinu mijeloidnih stanica čini intravaskularna populacija (30-40%), koja je umnožena u artritisu (**Slika 32**). Stoga smo pretpostavili da stanice OCP u zahvaćene zglobove tijekom razvoja artritisa dolaze iz cirkulacije, navođene kemokinskim signalima, te zajedno s rezidentnim progenitorima pridonose pojačanoj resorpciji kosti. Tome u prilog govore rezultati sljedećeg seta pokusa, u kojima smo stanice OCP razvrstali i označili proliferacijskom bojom, kako bi mogli pratiti njihovo kretanje *in vivo* u miševa s artritisom. Tkiva miševa analizirana su 36 sati nakon adoptivnog prijenosa, a označene stanice detektirane su u uzorcima PBL, SPL, PBM i TMT, što potvrđuje njihovu sposobnost tkivnog naseljavanja (**Slika 33**, crvene strelice).



**Slika 32. Karakterizacija intravaskularnih i rezidentnih populacija mijeloidnih stanica u miševa s artritisom.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritis (CIA) imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. (A) Model intravaskularnog označavanja odabrane stanične populacije. Pokus je izveden u vremenskoj točki 35. dan nakon primarne imunizacije, kada im je intravaskularno dano fluorescentno označeno protutijelo na biljeg mijeloidne loze CD11b (3 µg/mišu). Nakon tri minute, životinje su žrtvovane i prikupljeni su uzorci. Gotovo sve CD11b<sup>+</sup> stanice u perifernoj krvi označene su ovim postupkom. Limfni čvor zbog slabe recirkulacije služi kao negativna kontrola. U ciljnom tkivu periartikularne koštane srži (PBM) i tarzometatarzalnih malih zlobova (TMT) nalaze se različiti udjeli intravaskularnih i rezidentnih CD11b<sup>+</sup> stanica, čiji je omjer mjera recirkulacije kroz odabrano tkivo. (B) Odnos rezidentnih i intravaskularnih stanica CD11b<sup>+</sup> za periartikularnu koštanu srž (PBM) i tarzometatarzalno tkivo (TMT) u kontrolnih miševa (ctrl) i miševa s artritisom (CIA) prema udjelima *in vivo* i *ex vivo* označenih stanica u ukupnoj populaciji hematopoetskih stanica (CD45<sup>+</sup>). Prikazani su reprezentativni točkasti grafikoni za pojedinog miša (od provedena 2 neovisna pokusa, n=3 po skupini).





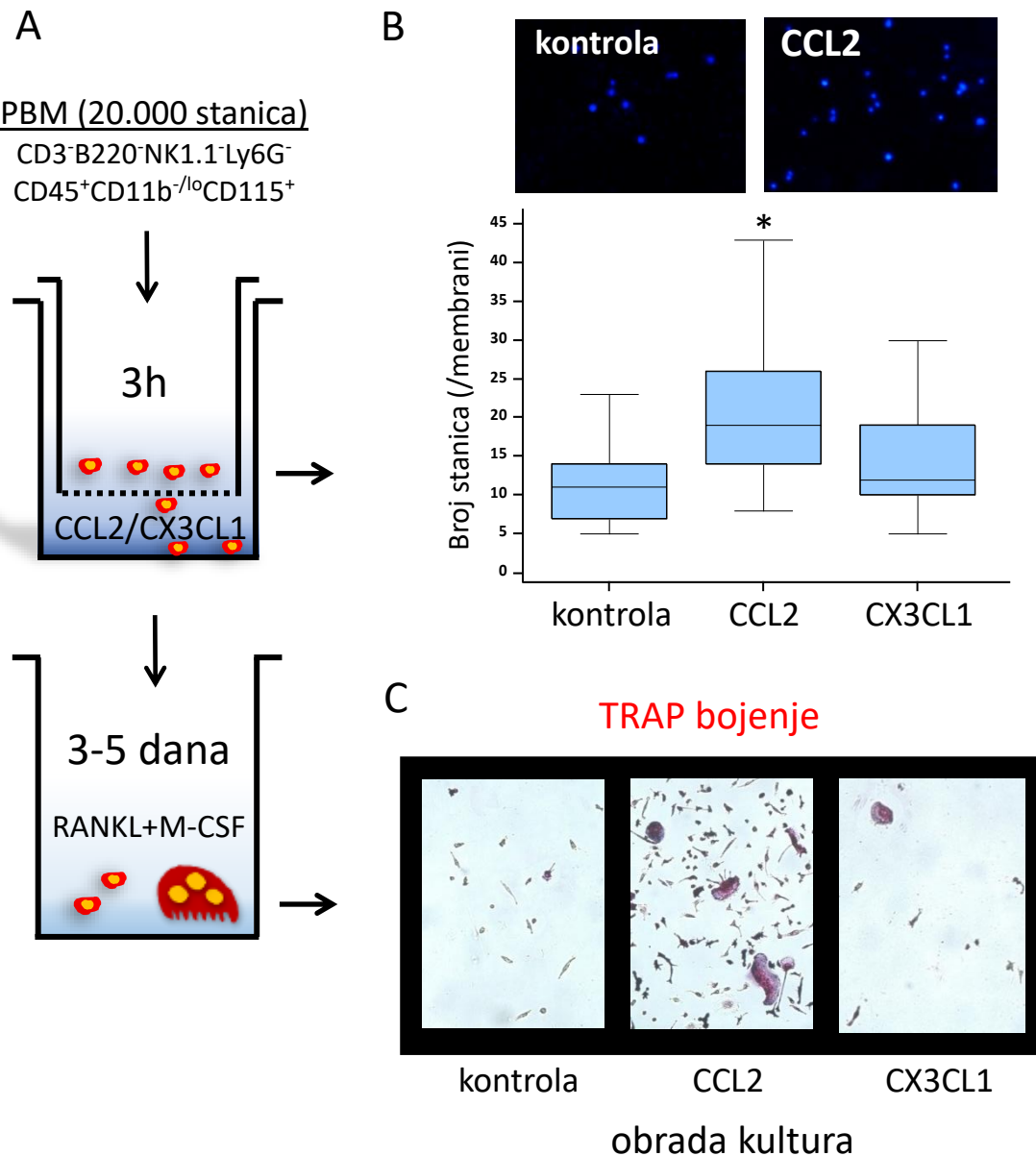
**Slika 33. Detekcija fluorescentno označenih osteoklastnih progenitora nakon adoptivnog transfera u miševa s artritismom.** Miševima soja C57Bl/6 izazvan je artritismom (CIA) imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. (A) Pokus je izveden u vremenskoj točki 35. dan nakon primarne imunizacije. Sortirani osteoklastni progenitori (OCP) iz periartikularne koštane srži ( $CD3^- B220^- NK1.1^- Ly6G^- CD45^+ CD11b^{-/lo} CD115^+$ ) označeni su proliferacijskom bojom (Cell Proliferation Dye eFluor670) i adoptivno preneseni u miševima s artritismom intravenskom injekcijom (250.000 stanica OCP/mišu). (B) Nakon 36 sati miševi su žrtvovani i u perifernoj krvi (PBL), slezeni (SPL), periartikularnoj koštanoj srži (PBM) i tkivu tarzometatarzalnih malih zglobova (TMT) detektiran je signal proliferacijske boje označenih stanica (crvene strelice). Prikazani su reprezentativni točkasti grafikonci za pojedinog miša (od provedena 2 neovisna pokusa,  $n=3$  po skupini). Miševi su prije žrtvovanja snimljeni uređajem IVIS Spectrum *in vivo* imaging system (PerkinElmer), ali se navedenom metodom zbog malog broja tkivno distribuiranih stanica signal nije mogao detektirati.

### **5.5.2. *In vitro* učinak utišavanja gena za CCR2 i CX3CR1 na migracijsku sposobnost osteoklastnih progenitora u artritisu**

Nakon što smo pokazali da stanice OCP cirkuliraju i izražavaju brojne kemokinske receptore, posebice CCR2 i CX3CR1, proveli smo funkcionalni *in vitro* test migracijske sposobnosti stanica prema kemokinskom gradijentu. U tu svrhu koristili smo sustav zdenaca odijeljen poriranom membranom u te smo u gornji zdenac nasadili razvrstane stanice OCP iz PBM miševa s artritisom, a u medij donjeg zdenca dodali kemokin, CCL2 ili CX3CL1 (**Slika 34A**). Stanice OCP pokazale su značajno veću sposobnost kemotaksije prema kemokinskom gradijentu putem receptora CCR2 nego CX3CR1, jer je broj stanica koje su migrirale kroz poriranu membranu bio značajno veći uz dodavanje kemokina CCL2 u odnosu na zdence bez dodanog kemokina ili zdence u koje smo dodali kemokin CX3CL1 (**Slika 34B**). Stanice koje su prošle kroz poriranu membranu na dno zdenaca, dalje su uzgajane uz čimbenike M-CSF i RANKL, kako bi se utvrdila njihova osteoklastogena sposobnost. Najviše TRAP<sup>+</sup> osteoklasta detektirano je u zdencima u kojima je medij obogaćen kemokinom CCL2 (**Slika 34C**), što je vjerojatno posljedica snažnijeg kemotaktičnog učinka toga kemokina.

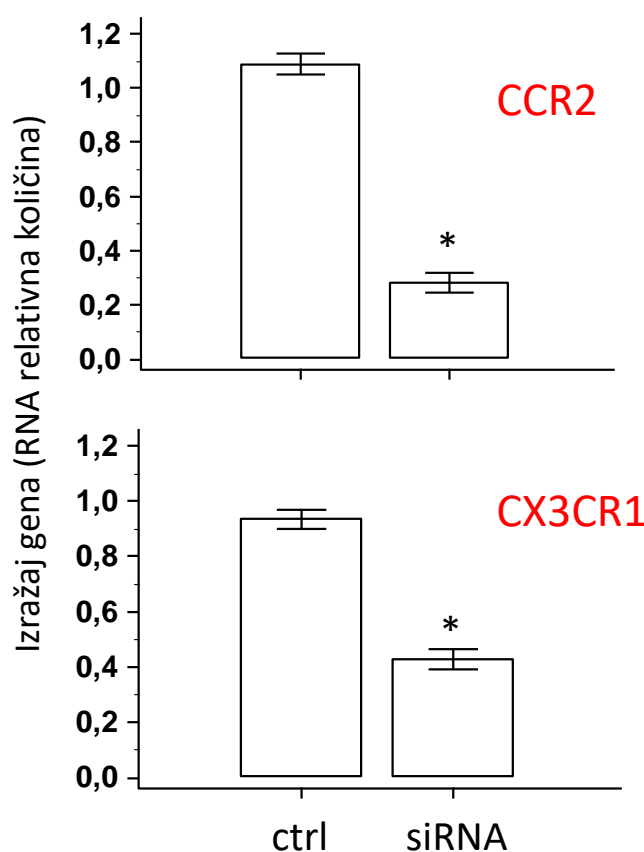
U zadnjem setu pokusa, u razvrstanoj populaciji OCP iz PBM utišali smo gene za kemokinske receptore CCR2 i CX3CR1. Efikasnost utišavanja provjerili smo na razini izražaja gena, 24 sata nakon primjene siRNA. Velik udio stanica OCP izražava receptor CX3CR1, međutim efikasnost utišavanja u toj subpopulaciji bila je slabija (smanjenje relativne količine RNA oko 50%) u odnosu na subpopulaciju koja izražava receptor CCR2 (smanjenje relativne količine RNA više od 70%) (**Slika 35**). Osim toga kemotaktični signal između CCR2 receptora i CCL2 liganda pokazao se važnijim u funkcionalnom migracijskom testu stanica OCP. Stoga smo u nastavku istraživanja testirali učinak utišavanja gena na migracijsku sposobnost stanica OCP korištenjem istog sustava zdenaca odvojenih poriranom membranom kako je već opisano (**Slika 36A**).

Pokus smo proveli tako da su nakon elektroporacije stanice zasijane u kulturu te je nakon 24 sata najprije testiran učinak utišavanja na razini proteinskog izražaja receptora CCR2 protočnom citometrijom, a nakon toga stanice smo zasijali na poriranu membranu kako je prethodno opisano (**Slika 36A**). Utvrđeno je smanjenje izražaja receptora CCR2 za oko 50% na stanicama tretiranim siRNA (**Slika 36B**). Proteinska razina analizirana je i nakon utišavanja gena za CX3CR1, no efikasnost utišavanja bila je manja nego za CCR2 (oko 30%, nije prikazano), slično kao i za razinu izražaja gena.

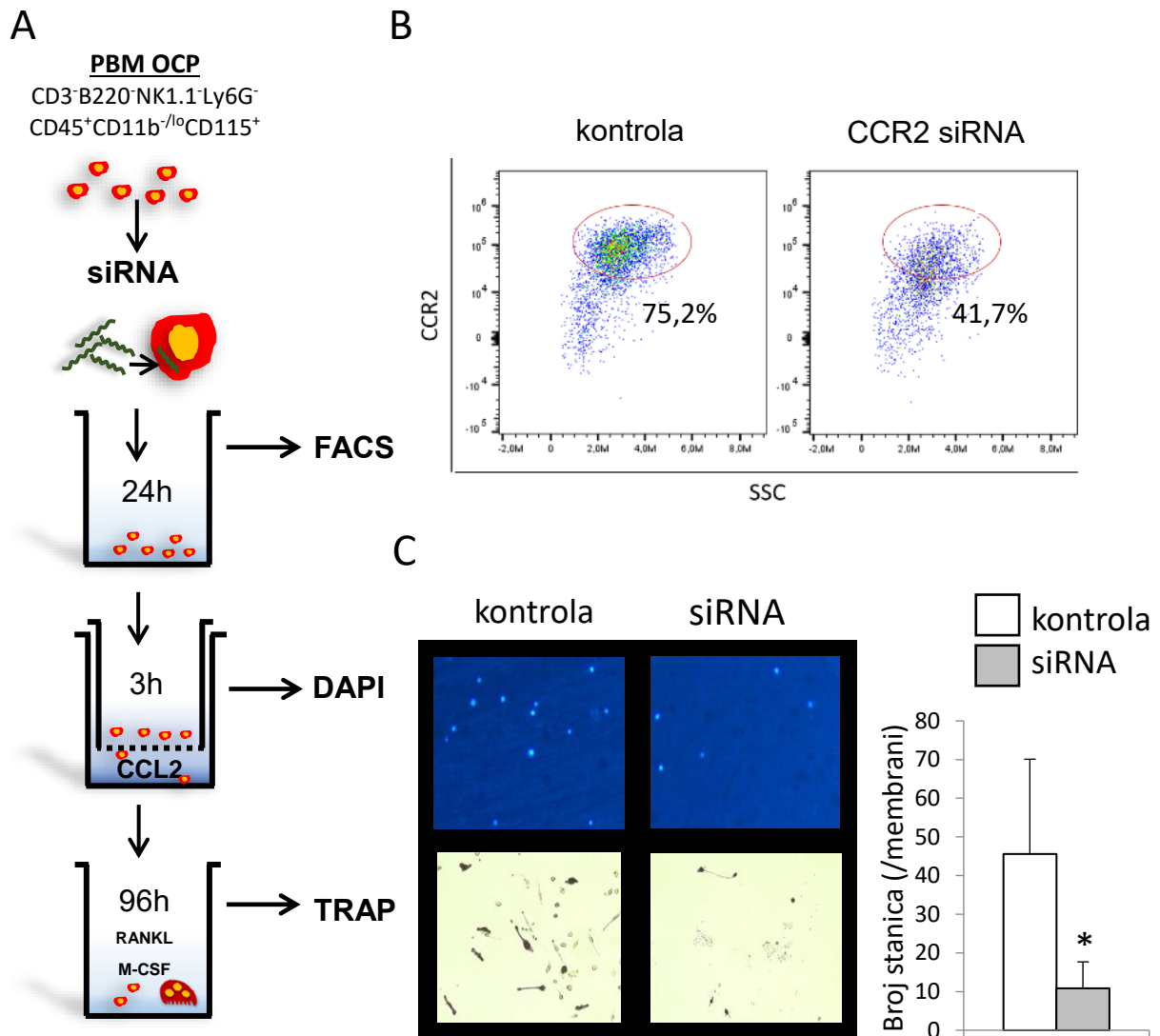


**Slika 34. Migracijski potencijal osteoklastnih progenitora u sustavu zdenaca odvojenih poriranom membranom.** (A) Sortirani osteoklastni progenitori (OCP) iz periartikularne koštane srži ( $CD3^-B220^-NK1.1^-Ly6G^-CD45^+CD11b^{-/lo}CD115^+$ ) miševa s artritismom (20.000 stanica) stavljeni su u gornji zdenac sustava zdenaca razdvojenih poriranom ( $8\ \mu m$ ) membranom (*Transwell*) za praćenje migracije prema kemokinskom gradijentu u donjem zdenacu (uz  $10\ ng/mL$  CCL2 ili  $1\ \mu g/mL$  CX3CL1). (B) Nakon inkubacije u staničnoj kulturi (3h), membrana gornjeg zdenca fiksirana je i obojena fluorescentnom bojom DAPI te su stanice koje su migrirale na dno membrane izbrojene pomoću fluorescentnog mikroskopa. Rezultati su prikazani grafovima kao medijan i interkvartilni raspon,  $*p < 0,05$  u odnosu na kontrolu bez kemokina (Kruskal-Wallisov test). (C) Stanice koje su migrirale na dno zdenca potom su uzgajane u osteoklastogenoj kulturi (uz RANKL i M-CSF), nakon čega su fiksirane i obojene TRAP-bojom specifičnom za osteoklaste.

Stanice OCP koje su obrađene pomoću siRNA nasadili smo u gornji zdenac sustava i izložili ih kemokinskom gradijentu CCL2. Rezultati pokazuju da je kroz poriranu membranu migriralo značajno manje stanica OCP s utišanim CCR2 receptorom u odnosu na stanice OCP tretirane kontrolnom (*scramble*) siRNA (**Slika 36C**). Daljnjim uzgajanjem u kulturi, uz čimbenike M-CSF i RANKL, broj nastalih TRAP<sup>+</sup> stanica manji je za stanice s utišanim CCR2 receptorom. Na temelju tih rezultata zaključili smo da CCL2 ostvaruje kemotaktični učinak putem receptora CCR2 te da je taj kemokinski signal djelotvoran u privlačenju stanica OCP.



**Slika 35. Izražaj gena za CCR2 i CX3CR1 u osteoklastnim progenitorima nakon utišavanja gena primjenom siRNA.** Sortirani osteoklastni progenitori (OCP) iz periartikularne koštane srži (CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>-/lo</sup>CD115<sup>+</sup>) miševa s artritism elektroporirani su i zasijani u medij s 200 nM siRNA (ON-TARGETplus Ccr2 siRNA ili ON-TARGETplus Non-targeting Control Pool, Dharmacon) te uzgajani u staničnoj kulturi 24 sata. Iz stanica je izolirana RNA, obrnuto prepisana u komplementarnu cDNA i analizirana postupkom qPCR korištenjem komercijalno dostupnih proba (TaqMan, Thermofisher Scientific) za CCR2 i CX3CR1. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija za relativnu količinu RNA, dobivenu normalizacijom na ubikvitarno izraženi gen za β-aktin. \*p <0,05 u odnosu na kontrolnu siRNA (t-test).



**Slika 36. Učinak utišavanja gena za CCR2 na migracijski potencijal osteoklastnih progenitora u sustavu zdenaca odvojenih poriranom membranom.** (A) Sortirani osteoklastni progenitori (OCP) iz periartikularne koštane srži ( $CD3^+B220^-NK1.1^-Ly6G^-CD45^+CD11b^{-/lo}CD115^+$ ) miševa s artritism elektroporirani su i zasijani u medij s 200 nM siRNA (ON-TARGETplus Ccr2 siRNA ili ON-TARGETplus Non-targeting Control Pool, Dharmacon) te uzgajani u staničnoj kulturi 24 sata. (B) Protočno-citometrijski utvrđeno je utišavanje izražaja receptora CCR2 u tretiranim stanicama. Po 10.000 stanica s utišanim CCR2 i kontrolne skupine stavljeno je u gornji zdenac sustava zdenaca razdvojenih poriranom (8  $\mu$ m) membranom (*Transwell*) za praćenje migracije prema kemokinskom gradijentu CCL2 (10 ng/mL) u donjem zdencu. (C) Nakon inkubacije u staničnoj kulturi, membrana gornjeg zdenca fiksirana je i obojena fluorescentnom bojom DAPI te su stanice koje su migrirale na dno membrane izbrojane pomoću fluorescentnog mikroskopa (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija). \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolnu siRNA (t test). Stanice koje su migrirale na dno zdenca potom su uzgajane u osteoklastogenoj kulturi (uz RANKL i M-CSF), nakon čega su fiksirane i obojene TRAP-bojom specifičnom za osteoklaste.

## 6. Rasprava

Tijekom artritisa dolazi do aktivacije osteoklasta i posljedičnog razaranja kosti i zglobova. Stoga je cilj ovog rada bio okarakterizirati subpopulacije stanica OCP koje su fenotipski i funkcionalno promijenjene u artritisu. Nakon identifikacije navedenih subpopulacija OCP, određen je profil kemokinskih receptora i obrazac njihove migracije. Djelovanjem na migracijski i osteoklastogeni potencijal stanica OCP, mogao bi se modificirati njihov odgovor u upali i spriječiti njihova aktivacija te posljedično razaranje kosti. Za istraživanje smo uporabili mišji model artritisa CIA, koji se izaziva opetovanom imunizacijom ksenogeničnim kolagenom te predstavlja eksperimentalni model reumatoidnog artritisa u ljudi. Mišji modeli artritisa još uvijek predstavljaju neizostavan korak u istraživanju mehanizama patogeneze artritisa, posebice u kontekstu novootkrivenih regulacijskih molekula i razvoju suvremenih terapijskih strategija.

### 6.1. Gubitak kosti izazvan kroničnom upalom

Gubitak kosti značajka je kroničnih upalnih bolesti koja se očituje razvojem osteopenije i osteoporoze zbog sustavnog učinka upalnih citokina uz doprinos liječenja kortikosteroidima, mirovanja i pothranjenosti, različitom mjerom u različitim bolestima. U reumatoidnom artritisu, gdje je upravo upala zglobova žarište kronične bolesti, gubitak kosti može se podijeliti na dvije razine. Pojačana koštana resorpcija događa se generalizirano u obliku smanjenja koštane gustoće, te lokalno, u samom zahvaćenom zglobu, što nazivamo gubitak kosti povezan s upalom (25). Lokalni gubitak dijeli se na subhondralni i periartikularni, intenzivniji je od sustavnog i u konačnici dovodi do razaranja zgloba i deformiteta (22). Točni mehanizmi djelovanja upalnih i imunskih stanica te citokina i kemokina koje luče, na osteoklaste, jedine stanice u organizmu specijalizirane za razgradnju mineralizirane kosti, nisu još potpuno razjašnjeni.

Imunosni sustav tijekom artritisa ostvaruje mnogobrojne učinke na zrele osteoklaste koji susljedno razaraju kost, ali i stanice OCP, koje se razvijaju iz hematopoetskih progenitora. Više je istraživanja ukazalo na patološku aktivnost osteoklasta, koja uzrokuje koštano razaranje tijekom upalnih bolesti u životinjskim modelima (46, 120, 121) i u ljudi (18, 110, 122). Imunosne stanice potaknute upalom luče brojne medijatore, koji izravno ili neizravno djeluju tako da potiču osteoresorpciju (123, 124). Posebice, proupalni citokini (IL-1, IL-6, IL-17, IL-18, TNF- $\alpha$ ) i kemokini (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL12) pojačano se luče u artritisu, te

djeluju autokrino, parakrino i endokrino tako da povećavaju broj i potiču diferencijaciju stanica OCP (18, 125). Razumijevanje molekularnih signala koji uzrokuju aktivaciju i migraciju stanica OCP ključno je za razumijevanje mehanizama gubitka kosti u artritisu.

## 6.2. Značajke artritisa izazvanog kolagenom

Model CIA predstavlja vrlo pogodan model autoimunskog artritisa kojeg karakterizira simetrična upala prednjih i stražnjih šapa, koja uključuje ukočenost, crvenilo, otok i bol, te klinički, patogenetski i histološki nalikuje reumatoidnom artritisu u ljudi (41). Zahvaćeni su periferni zglobovi, u kojima se razvija sinovitis i infiltracija panusa, uz erozije kosti i hrskavice. Bez obzira na podudarnosti, za razliku od reumatoidnog artritisa u ljudi, model CIA karakteriziran je stvaranjem anti-kolagenskih protutijela, kontinuiranim tijekom bez remisija i egzacerbacija, slabim odgovorom na nesteroidne protuupalne lijekove, većom incidencijom u muškog spola te razvojem periostealne reakcije sa stvaranjem nove kosti. Različiti mišji sojevi pokazuju različitu podložnost razvoju artritisa, ovisno o genotipu glavnog kompleksa gena tkivne podudarnosti: sojevi miševa haplotipa H-2<sup>q</sup> i H-2<sup>r</sup> najpodložniji su razvoju artritisa (126). Najčešće korišten soj je DBA/1 (H-2<sup>q</sup>), u kojega se CIA razvija s incidencijom od gotovo 100%, dok je soj C57Bl/6 slabije podložan razvoju artritisa, s incidencijom od oko 50-60% (127). Soj DBA/1 pokazao se korisnim u istraživanju terapijskih pristupa liječenju artritisa te je uspješno korišten za testiranje učinka anti-TNF- $\alpha$  terapije (128), no negativna je značajka njegov vrlo akutan tijek te ubrzan razvoj destrukcije i fibroze zglobova (44). Osim toga obilježen je prolaznom aktivacijom limfocita T pa se ne može koristiti za istraživanja dugotrajne autoimunosne reakcije i kroničnog tijeka bolesti. Također, upotreba miševa soja DBA/1 ograničena je i u istraživanjima u kojima se rabe transgenični miševi, s obzirom na to da su uglavnom dostupni na podlozi soja C57Bl/6 (H-2<sup>b</sup>) (127).

Prema našim rezultatima, značajka modela CIA u mišjem soju C57Bl/6 u odnosu na češće korišteni DBA/1 soj jest kasniji nastup kliničkih znakova, slabiji intenzitet te kroničan tijek. U histološkom nalazu zgloba oskudniji je upalni infiltrat sinovije, uz manje izražene koštane erozije i slabiju invaziju panusa, ali uz razvoj izrazitog osteitisa koji u C57Bl/6 soju ostaje kronično prisutan dok se u DBA/1 soju gubi 6 do 8 tjedana nakon nastupa bolesti (44, 46). I naša prethodna istraživanja potvrdila su slabiji intenzitet bolesti s kroničnim tijekom u C57Bl/6 soju te postojanje lokalne i sustavne osteoresorpcije (46). Unatoč artritisu, ne nastaje potpuna destrukcija zgloba, ni panusna invazija subhondralnog odjeljka. Fibrozna obliteracija

međuzglobnog prostora i ankiloza vide se tijekom bolesti u DBA/1 soju, a gotovo nikada ne nastaju u soju C57Bl/6. Stoga je model CIA u soju C57Bl/6 prikladan za istraživanje patogeneze osteitisa, kroničnog tijeka i umjerenog intenziteta bolesti.

Cilj je našeg istraživanja upravo bio analizirati sastav stanica unutar područja osteitisa i mehanizam koštanog razaranja koji započinje pojačanom diferencijacijom stanica OCP koje se nalaze unutar tog upalnog procesa. Odabrane vremenske točke analize (25., 35. i 45. dan nakon primarne imunizacije) prate razvoj bolesti od početka pojave kliničkih znakova (25. dan), vrhunca incidencije (35. dan) te vrhunca intenziteta ranog artritisa mjerenog najvišim kliničkim zbrojem ocjena (40. – 45. dan). Potvrđena je pojačana osteoresorpcija na lokalnoj i sustavnoj razini *in vivo* fluorescentnim oslikavanjem pomoću probe koja otpušta fluorescentni signal nakon cijepanja katepsinom K, enzimom specifičnim za osteoklaste. Usporedo, serumski biljeg osteoresorpcije CTX-I povišen je u miševa s artritismom. Sustavni gubitak kosti pokazan je i u nekim drugim modelima artritisa, osim CIA, primjerice u artritisu izazvanom anti-kolagenskim protutijelima i modelu SKG (129, 130). Generalizirana osteoporoza, uz gubitak trabekularne kosti, očituje se i smanjenom kvalitetom koštanog matriksa koja uzrokuje slabljenje biomehaničkih koštanih svojstava i sklonost patološkim frakturama (46, 129, 130). Lokalni gubitak kosti potvrđen je postupkom  $\mu$ CT; na snimkama se vide lokalne koštane erozije i gubitak mineralizirane kosti. Histomorfometrijska analiza potvrdila je gubitak subhondralne kosti u miševa s artritismom, uz prisutnu blažu sinovijalnu infiltraciju, osteitis, očuvana zglobna tijela i rijetko prisutnu panusnu invaziju (samo u miševa s kliničkom ocjenom blizu maksimalne). Gubitak kosti uzrokovan upalom u zahvaćenim zglobovima uglavnom se objašnjava pojačanom funkcijom osteoklasta unutar sinovijalnog prostora zglobova (18, 44, 46, 131), a u našem istraživanju fokusirali smo se na pojačanu diferencijaciju osteoklasta u subhondralnom području i periartikularnom odjeljku koštane srži, obilježenom osteitisom.

### **6.3. Osteitis u periartikularnoj koštanoj srži**

Klasična teorija patogeneze reumatoidnog artritisa jest razvoj autoimunosne upale sinovijalnog tkiva čijim napredovanjem dolazi do formiranja invazivnog upalnog vezivnog tkiva, panusa, koje potom urasta u kost i prodire do koštane srži te je tako spaja sa zglobnom šupljinom. Novija istraživanja pokazala su da upala same koštane srži subhondralnog odjeljka, osteitis, u nekim slučajevima prethodi ili se odvija usporedo sa zbivanjima u sinoviji te perzistira unatoč primjeni terapije (33, 34). Štoviše, osteitis može biti prisutan znatno prije invazije panusa i razaranja



kosti i hrskavice, te može poslužiti i kao pouzdan pokazatelj budućeg oštećenja zgloba (33, 35, 36). U našem istraživanju analizirali smo fenotip i funkciju stanica OCP upravo u sklopu tih ranih imunskih zbivanja u toku bolesti u koštanoj srži, a taj pristup do sada nije primijenjen. Prepostavili smo da su upalna infiltracija sinovije u obliku panusa, i osteitis, obilježen zamjenom masnih stanica upalnim, donekle odvojena zbivanja, koja neovisno pridonose intenzitetu artritisa. Većina studija usmjerena je na sastav panusa i zbivanja unutar sinovijalnog odjeljka, dok su istraživanja subhondralnog i periartikularnog odjeljka razmjeno maloborjna. U miševa s artritismom patohistološki smo dokazali postojanje osteitisa u upaljenim zglobovima, vidljivog kao zamjenu masnog tkiva upalnim stanicama i pojačanom vaskularizacijom, što je u skladu s našim ranijim nalazima (46). Na analiziranim endostealnim površinama distalne tibije također smo dokazali povećan broj aktivnih TRAP<sup>+</sup> osteoklasta u odnosu na kontrolnu skupinu miševa u kojih nije izazvan artritis, gdje zbog fiziološki slabe koštane pregradnje na tim mjestima gotovo uopće nisu prisutni. Navedene promjene najizrazitije su u subhondralnom odjeljku distalne tibije, u neposrednoj blizini unutarzglobne upale, te periartikularnom odjeljku distalne tibije, u blizini upalnog žarišta. Stoga smo odabrali koštanu srž distalne tibije za daljnju analizu lokalnih zbivanja protočnom citometrijom. Osim umnoženih stanica OCP, među ukupnom populacijom stanica periartikularne koštane srži, relativno je smanjen udio limfnih stanica (posebice B220<sup>+</sup> limfocita B), a umnožene su stanice mijeloidne loze (F4/80<sup>+</sup> makrofagi i Ly6G<sup>+</sup> granulociti). No, kako se ukupna celularnost navedenog područja povećava uslijed upale, smanjenje udjela limfocita samo je relativno, te su oni prisutni unutar koštane srži u jednakom broju kao i u kontrolnih miševa. Osteitis je opisan i u razvoju reumatoidnog artritisa u ljudi, te ga karakterizira pojačana vaskularizacija i upalna infiltracija (koja uključuje limfocite T i B, plazma-stanice i makrofage), uz aktivne osteoklaste smještene uz trabekularnu kost. Pretpostavlja se da se osteitis razvija zbog pojačanog lokalnog lučenja proupalnih medijatora koji difundiraju kroz Haversove kanale, te potiču funkciju osteoklasta (22, 26, 46, 132). Naši rezultati pokazali su značajno veći izražaj upalnih medijatora TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i CCL2 u periartikularnom odjeljku distalne tibije, potvrđujući navedenu pretpostavku.

#### **6.4. Poticanje stanica mijeloidne loze koja uključuje osteoklastne progenitore**

Analiza protočnom citometrijom stanica koštane srži, slezene, leukocita periferne krvi i stanica tarzometatarzalnih zglobova šape pokazala je značajno veći udio zrelih i nezrelih populacija mijeloidne loze u artritisu, uključujući stanice OCP. Stanice OCP, makrofagi i dendritične

stanice imaju zajedničko podrijetlo, te se sve tri stanične loze mogu diferencirati *in vitro*, uz odgovarajuće faktore rasta, kultivacijom razvrstanih stanica fenotipa CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup><sup>lo</sup>CD115<sup>+</sup> iz koštane srži te CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup> iz slezene i krvi (67, 68, 72). Udio CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup><sup>lo</sup>CD115<sup>+</sup> stanica u koštanoj srži distalne tibije i zglobovima veći je u miševa s artritismom u odnosu na kontrolne, a valja naglasiti i veliku razliku u celularnosti uzoraka zahvaćenog zgloba i koštane srži gdje je zbog upalnog infiltrata (sinovitis i osteitis) prisutan višestruko veći apsolutni broj stanica OCP.

Prethodne studije fenotipa OCP pokazale su da najveći osteoklastogeni potencijal unutar koštane srži pokazuje subpopulacija CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup><sup>lo</sup>CD117<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup>, koja čini 2-3% ukupne populacije hematopoetskih stranica (67, 68, 72). U modelu CIA, naša istraživanja pokazala su da je izražaj biljega CD115 ključan za osteoklastogeni potencijal, te da se osteoklasti ne mogu diferencirati *in vitro* iz CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>-</sup> subpopulacije (46). Molekula CD115 (nazvana i c-fms i CSF1R) predstavlja receptor za M-CSF. Signal putem receptora CD115 i transkripcijskog čimbenika PU.1 ključan je za usmjeravanje hematopoetske stanice prema zajedničkom progenitoru makrofaga, dendritičnih stanica i osteoklasta. Tako M-CSF potiče preživljenje i proliferaciju stanica OCP, te izražaj receptora RANK, preko kojeg RANKL dalje pospješuje diferencijaciju u zrele osteoklaste (11, 18). Među stanicama periartikularne koštane srži, stanice s visokim izražajem biljega CD115<sup>+</sup> umnožene su u artritisu te omogućuju jasno definiranje i razvrstavanje stanica OCP. Međutim, biljeg CD115 pokazao se slabije pouzdanim za identifikaciju populacije OCP u digestiranim zglobovima, s obzirom na to da je razina njegova izražaja niža nego u koštanoj srži. Jedan od uzorka toga nalaza može biti mehanizam negativne povratne sprege u upalnom okolišu, kojim se biljeg CD115 uklanja sa stanične membrane, čime se nastoji ograničiti upala i diferencijacija mijeloidnih stanica (133). Drugi mogući uzrok smanjenja izražaja biljega CD115 je dugotrajno procesiranje malih zglobova tazometatarzalnog dijela šape u svrhu oslobađanja hematopoetskih stanica, koje uključuje pripremu uzorka enzimatskom digestijom kolagenazom. Premda smo prethodno testirali učinak enzimske digestije na izražaj brojnih membranskih biljega, te utvrdili da je kolagenaza za razliku od tripsina razmjerno poštena za fenotipski profil hematopoetskih stanica (134), oslobađanje stanica iz fibroznog i koštanog tkiva malih zglobova uvijek predstavlja zahtjevan zadatak pri pripremi stanica za protočno-citometrijsku analizu (135). S obzirom na ta ograničenja, te na činjenicu da je ukupan broj stanica izdvojen iz malih zglobova tarzometatarzalnog dijela šape ograničen, u istraživanju smo za određivanje profila OCP poglavito koristili stanice izdvojene iz distalne tibije, dok smo tkiva stražnje šape analizirali

morfometrijskim parametrima kako bi utvrdili gubitak kosti te smo u tom tkivu određivali izražaj upalnih medijatora.

Osim u koštanoj srži, udio OCP povećan je i u perifernim hematopoetskim tkivima miševa s artritismom. U cirkulaciji i slezeni udio  $CD3^+B220^-NK1.1^-CD11b^+CD115^+$  stanica manji je od 0,5% u fiziološkim uvjetima, a povećava se s razvojem artritisa te doseže frekvenciju od 1-2% među svim hematopoetskim stanicama. Jacome-Galarza i sur. pokazali su da u slezeni i perifernoj krvi stanice OCP izražavaju fenotip  $B220^-CD3^-NK1.1^-CD11b^+Ly6C^{hi}CD115^+CX3CR1^+$ , s potencijalom diferencijacije u makrofage, dendritične stanice i osteoklaste (68, 72). Ta populacija OCP ujedno je negativna na granulocitni marker Ly6G, uz slab izražaj biljega CD117/cKit. Cirkulirajući, dugoživući, mirujući i vrlo malobrojni OCP identificirani su drugom studijom u perifernoj krvi kao stanice fenotipa  $CD115^{lo}RANK^{hi}$ , uz vrlo slab izražaj biljega CD11b, F4/80 i Gr-1 (75). Uz odgovarajući osteoklastogeni poticaj, ta populacija stanica diferencirala se u zrele osteoklaste *in vivo* i *in vitro*. Premda smo u našem istraživanju koristili anti-RANK protutijelo, izražaj toga biljega bio je vrlo nizak ili negativan za većinu tkiva, a rezultati nekonzistentni, što je opisano u literaturi i uglavnom se pripisuje neadekvatnoj kvaliteti protutijela (68, 72), stoga te rezultate nismo prikazivali.

Linijski odnos stanica OCP koje izražavaju biljeg CD11b ( $CD11b^+$ ) na periferiji i populacije OCP koja slabo izražava biljeg CD11b ( $CD11b^{-/lo}$ ) u koštanoj srži nije u potpunosti razjašnjen. Premda se osteoklasti mogu generirati iz perifernih OCP, koji izražavaju biljege CD11b i CD115, populacija  $CD11b^+CD115^+$  u koštanoj srži nema osteoklastogeni potencijal (46, 72). Biljeg CD11b dio je integrinskog kompleksa CD11b/CD18 (nazvanog i Mac-1), koji na mijeloidnim stanicama predstavlja komplementarni receptor. U najširem smislu, integrini su adhezijske molekule koje omogućuju međustanični kontakt, te su, između ostalog, važni za staničnu migraciju, prijenos kostimulacijskog signala, stvaranje imunodneke sinapse i proces fagocitoze (136). U kontekstu diferencijacije osteoklasta, pokazano je da integrin CD11b/CD18 djeluje kao negativni regulator ranih stadija osteoklastogeneze (137). Miševi s izbačenim genom za CD11b imaju smanjenu koštanu gustoću i povećan broj osteoklasta. Signalizacija putem molekule CD11b koči osteoklastogenezu na način da suprimira RANK-signal koji ima za ulogu aktivaciju transkripcijskog čimbenika NFATc1 i nizvodnih osteoklastogenetskih gena. To ostvaruje smanjenjem izražaja receptora RANK i poticanjem transkripcijskog represora BCL6 koji se veže za NFATc1 i koči njegovu funkciju (137). Stoga pretpostavljamo da su nezreli OCP u koštanoj srži fenotipa  $CD11b^{-/lo}$  što omogućuje rane stadije usmjeravanja i

diferencijacije, a zreliji periferni OCP izražavaju biljeg CD11b, kada su već usmjereni prema mijeloidnoj lozi.

Stanice OCP diferenciraju se iz zajedničkih mijeloidnih progenitora ( $\text{Lin}^- \text{Sca1}^- \text{CD127}^- \text{CD117}^+ \text{CD34}^+ \text{CD16/32}^-$ ), čiji udio u osteitisu u distalnoj tibiji miševa s artritismom značajno raste u odnosu na kontrolnu skupinu. Dosadašnja istraživanja pokazala su povezanost između umnažanja mijeloidnih progenitora te osteoklastogeneze i upalne osteoresorpcije (138). Charles i sur. istraživali su populaciju  $\text{CD11b}^{-/\text{lo}} \text{Ly6C}^{\text{hi}}$  stanica negativnih na limfoidne biljege (koja je podudarna populaciji OCP fenotipa  $\text{CD3}^- \text{B220}^- \text{NK1.1}^- \text{Ly6G}^- \text{CD11b}^{-/\text{lo}} \text{CD115}^+$  u našem modelu). Ta populacija ekspanzirana je u artritisu, *in vitro* se može diferencirati u makrofage, dendritične stanice i osteoklaste, a nakon transplantacije u miševa s nedostatkom osteoklasta rezultira razvojem osteoklasta *in vivo*. Definirana populacija također pokazuje imunosupresijske značajke *in vitro* i *in vivo*, slične monocitnim supresorskim stanicama mijeloidnog podrijetla (M-MDSC, prema engl. *monocytic myeloid-derived suppressor cell*) (69). Daljnja istraživanja s ciljem linijske specifikacije progenitorskih stanica izdvojila su unutar tripotentne populacije  $\text{CD3}^- \text{B220}^- \text{NK1.1}^- \text{CD11b}^+ \text{CD115}^+$ , bipotentnu subpopulaciju fenotipa  $\text{CD27}^{\text{lo}} \text{Flt3}^-$  iz koje mogu nastati monociti/makrofagi i osteoklasti, no ne i dendritične stanice (139). Ta i slična istraživanja (18, 26, 69, 139) upućuju na zaključak da je populacija OCP definirana fenotipom  $\text{CD3}^- \text{B220}^- \text{NK1.1}^- \text{Ly6G}^- \text{CD11b}^{-/\text{lo}} \text{CD115}^+$  još uvijek heterogena, te da uključuje funkcionalno različite subpopulacije koje je moguće terapijski modulirati kako bi se inhibirala osteoklastogeneza, a potaknulo njihovo protuupalno djelovanje.

Uz ekspanziju mijeloidnih progenitora i stanica OCP, dokazali smo i povećanje udjela zrelih populacija mijeloidne loze, monocita ( $\text{CD11b}^+ \text{Ly6C}^+$ ), makrofaga ( $\text{CD11b}^+ \text{F4/80}^+$ ) i granulocita ( $\text{CD11b}^+ \text{Ly6G}^+$ ) u svim analiziranim tkivima u artritisu. U artritisu postoji pomak ukupne hematopoeze prema mijelopoezi, koji je najvjerojatnije uzrokovan prisutnošću proupalnih citokina. Poznato je da, primjerice virusne i bakterijske infekcije, uzrokuju neutrofiliju i pomak u lijevo, no mehanizam u podlozi toga učinka nije u potpunosti razjašnjen (140, 141). Čini se da u pomaku hematopoeze prema mijeloidnoj lozi glavnu ulogu ima proupalni citokin  $\text{TNF-}\alpha$ , koji, uz  $\text{IL-1}\beta$ , može izravno i neizravno kočiti razvoj limfocita B u koštanoj srži i potaknuti granulopoezu. Navedeni nalaz uočen je kod infekcije i primjene adjuvansa (142), a u našem istraživanju pokazali smo upravo pojačan izražaj gena za  $\text{TNF-}\alpha$  i  $\text{IL-1}\beta$  u periartikularnoj koštanoj srži i malim zglobovima tarzometatarzalnog dijela šape. U reumatoidnom artritisu uočen je povećan broj neutrofila u sinovijalnoj tekućini i tkivu bolesnika osobito u ranim stadijima bolesti (143), a također je izražena neutrofilija u modelu

reumatoidnog artritisa transferom seruma K/B×N (144), što upućuje na njihovu uključenost u patogenezu bolesti. Nadalje, u sinovijalnom tkivu panusa i unutar sinovijalne tekućine povećan je broj makrofaga koji se diferenciraju iz monocita privučeni iz periferije (139). Tom nagomilavanju stanica mijeloidne loze pridonose povećane koncentracije upalnih medijatora u zahvaćenim zglobovima.

## **6.5. Učinak kemokinskih signala na osteoklastne progenitore**

Funkcionalni odnos koštanih i perifernih OCP nije sasvim razjašnjen, a posebice nije poznato u kojoj mjeri koštani i periferni progenitori pridonose pojačanoj koštanoj resorpciji u upalnim bolestima. Periferni OCP se nalaze među populacijom monocita i razlikuju se fenotipski od progenitora u koštanoj srži (18, 46, 110). Kako je već navedeno, pretpostavka jest da CD11b<sup>-</sup> OCP razvojem stječu biljeg CD11b te odlaze u cirkulaciju. No i dalje nije razjašnjeno gube li CD11b<sup>+</sup> OCP izražaj toga biljega nakon povratka u koštanu srž iz periferije, privučeni kemotaktičnim signalima (145). Dokazano je da se u odgovarajućim uvjetima obje populacije mogu diferencirati u osteoklaste različitim potencijalom (72, 75). Nadalje, cirkulirajući progenitori mogu naseliti ektopičnu kost potaknutu koštanim morfogenetskim proteinom 2 (75), te kost miša spojenog u parabiozu (70). U našem smo istraživanju upotrebom *in vivo* bojenja protutijelom anti-CD11b analizirali intravaskularni i tkivni odjeljak hematopoetskih tkiva i zglobova zahvaćenih artritism. Utvrdili smo da se u upalom zahvaćenim tkivima nakuplja više CD11b<sup>+</sup> stanica u vaskularnom odjeljku u odnosu na kontrolne, što ukazuje na privlačenje perifernih monocita, među kojima se nalaze periferni OCP, na mjesto upale.

Valja istaknuti da se stanice OCP u malom postotku fiziološki nalaze u cirkulaciji, te da predstavljaju „puferski sustav“ homeostaze koštanog tkiva, s obzirom na to da mogu biti brzo privučeni odgovarajućim signalima na koštanu površinu (90). U svim se kostima odvija koštana pregradnja, ali sve kosti ne sadrže hematopoetski aktivnu crvenu koštanu srž. Stoga postoji potreba za migracijom stanica OCP, jer zreli su osteoklasti slabo pokretni (145). Dokazana je mogućnost ameboidnog kretanja stanica OCP unutar koštane srži (76). Fiziološko postojanje cirkulirajućih progenitora dodatno pridonosi njihovoj mobilnosti i čini ih lako dostupnim rezervoarom za fiziološku koštanu pregradnju i kontrolu mikrofraktura. Tijekom ozljede koštanog tkiva postoji pojačana potreba za djelovanjem osteoklasta, primjerice kod regeneracije kosti i pregradnje kalusa (146). U modelu artritisa, transplantacijom obilježenih OCP, razvrstanih iz periartikularne koštane srži i slezene, dokazali smo njihovo naseljavanje

perifernih i zglobnih tkiva miša primatelja. Taj nalaz te prethodni rezultat pojačanog intravaskularnog nakupljanja mijeloidnih stanica u tkivima zahvaćenim artritismom vjerojatno potvrđuje da migracija i tkivno nasljevanje perifernih OCP pridonosi ukupnom broju osteoklasta u područjima lokalne koštane resorpcije.

U upalnim bolestima kao što je reumatoidni artritis, pojačana aktivnost osteoklasta postoji unutar subhondralnog i periartikularnog odjeljka koštane šupljine, u blizini, ali odvojeno od sinovijalnog prostora barijerom zglobne hrskavice i kosti. S druge strane, invazija panusa kreće sa strane zglobne šupljine prema koštanoj srži, a posredovana je resorpcijskom aktivnosti osteoklasta koji su se diferencirali iz panusnog infiltrata (22). Zreli osteoklasti su razmjerno kratkovjeke stanice, koje nakon ciklusa koštane resorpcije odumiru apoptozom i potrebno ih je neprestano obnavljati tijekom patološkog procesa razaranja kosti u kroničnim upalnim bolestima zglobova (18). Poznavanje signala koji stanicama OCP omogućuju migraciju i nastanjenje u ciljnim tkivima stoga bi omogućilo razvoj ciljane terapijske intervencije kojom bi se spriječila njihova migracija, diferencijacija i aktivacija u artritismu. Kako bismo ispitali ulogu kemokinske signalizacije u migraciji stanica OCP u artritismu, odredili smo njihov profil kemokinskih receptora u različitim hematopoetskim tkivima i zahvaćenim zglobovima. Populacije OCP  $CD3^+B220^-NK1.1^-Ly6G^-CD45^+CD11b^{-/lo}CD115^+$  u koštanoj srži i  $CD3^+B220^-NK1.1^-Ly6G^-CD45^+CD11b^+CD115^+$  u slezeni miševa s artritismom pojačano izražavaju kemokinske receptore, posebice posebice CCR2 i CX3CR1 (oko 50% stanica OCP), što je usporedivo s dosadašnjim istraživanjima (72, 110). Kao što je već navedeno, receptor CX3CR1 izražen je na koštanim i perifernim OCP, te predstavlja receptor za CX3CL1 (nazvan i fraktalkin). To je jedinstveni kemokin po tome što postoji u membranskoj i topljivoj formi, te može djelovati kao kemotaktični faktor ili kao adhezijska molekula. Izražen je na stanicama koštane srži i osteoblastima, te potiče migraciju stanica OCP koje izražavaju receptor CX3CR1 (100). CCL2 (ili MCP-1), ligand za receptor CCR2, snažno usmjerava migraciju monocita, stanica NK i limfocita T te koordinira upalni odgovor tijekom infekcije. Snažno ga luče osteoblasti stimulirani proupalnim citokinima (110, 147). Brühl i sur. su u modelu CIA pokazali da deplecija stanica  $CD11b^+Gr-1^+CCR2^+$  *in vivo* korištenjem anti-CCR2 protutijela uzrokuje značajno ublažavanje artritisa, potvrđujući ulogu CCL2/CCR2 kemotaktičnog signala u patogenezi artritisa (71). Izražaj ostalih analiziranih kemokinskih receptora (CCR1, CCR3, CCR5, CCR9, CXCR4) također je povišen u artritismu, ali čini vrlo mali udio od ukupne populacije OCP, što ih čini neprikladnom metom za terapijsku intervenciju. Ranija istraživanja receptora CCR1 i CCR5 u miša i ljudi ukazala su na povišenje izražaja na zrelim osteoklastima

te ulogu u njihovoj kemotaksiji i diferencijaciji, što ukazuje na njihov veći značaj u kasnijim fazama razvoja osteoklasta (63, 95, 148). Ispitivanjem migracijskog potencijala razvrstanih stanica OCP fenotipa  $CD3^+B220^-NK1.1^-Ly6G^+CD45^+CD11b^{-/lo}CD115^+$  potvrdili smo važnost kemotaktičnog djelovanja liganda CCL2, budući da je značajno veći broj stanica migrirao prema kemokinskom gradijentu u sustavu zdenaca odvojenih poriranom membranom, dok ligand CX3CL1 nije imao takav učinak. U našem prethodnom istraživanju, pokazali smo da leukociti periferne krvi potaknuti čimbenicima RANKL i M-CSF pojačano migriraju prema kemokinskom gradijentu liganda CCL2 i CCL5 u artritisu u odnosu na kontrolnu skupinu (46). Stoga smo zaključili da je profil kemokinskih receptora izražen na populaciji OCP ključan za selektivno privlačenje tih stanica na koštane površine i posljedično razaranje zglobova u artritisu.

## **6.6. Stanični mikrookoliš i koncentracija kemokina u artritisu**

Pojačana aktivnost osteoklasta u upali najvjerojatnije je posljedica učinka upalnog mikrookoliša. U literaturi je detaljno opisan izravan i neizravan utjecaj brojnih upalnih citokina i kemokina na pojačanje osteoklastogeneze i osteoresorpcije, posebice TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17, RANKL, CCL2, CCL5 i CXCL12 (26). Upalne stanice glavni su izvor citokina i kemokina koji se prvenstveno luče parakrino, no ovisno o intenzitetu dopijevaju u cirkulaciju i dovode do sustavnog poticanja upale. Kako smo pokazali u našem istraživanju, njihovim pojačanim lučenjem dolazi do promjena u hematopoezi unutar koštane srži (primjerice pomak prema mijeloidnoj lozi u artritisu potaknutom kolagenom) te promjena u uzorku naseljavanja tkiva zahvaćenih upalom pojedinim staničnim lozama (primjerice razmjerno bujanje mijeloidnih nasuprot limfoidnih loza). U modelu CIA i u perifernim hematopoetskim tkivima i u tkivima zahvaćenim artritisom dominira ekspanzija mijeloidne loze. Poznato je da kemokini upravljaju novačenjem i navođenjem upalnih stanica u artritisu i drugim kroničnim upalnim bolestima. Također se pretpostavlja da bi mogli biti uključeni u navođenje stanica OCP u perifernoj krvi prema zahvaćenim zglobovima, s obzirom na to da stanice osteoklastne loze izražavaju kemokinske receptore (18, 125). Opisane su povišene koncentracije kemokina CCL2, CCL3, CCL4 i CXCL10 u zglobovima i plazmi bolesnika s reumatoidnim artritisom (110). Kemokini privlače imunosne stanice na mjesto upale te tako nastaje upalni infiltrat sastavljen od neutrofila, monocita, makrofaga, dendritičnih stanica, limfocita, plazma-stanica i stanica NK u sinoviji i koštanoj srži. Upalni citokini i kemokini djeluju tako da potiču migraciju i

diferencijaciju osteoklasta, a mijenjaju i funkciju osteoblasta, koji primjerice povisuju izražaj čimbenika RANKL te luče CCL2 (98). U našem istraživanju, pokazali smo povišene koncentracije liganda CCL2 u serumu, te pojačan izražaj tog kemokina u periartikularnoj koštanoj srži i malim zglobovima tarzometatarzalnog dijela šapa. Slično je u istraživanju Zhanga i sur. potvrđena povišena koncentracija CCL2 u serumu, uz pozitivan koncentracijski gradijent prema sinovijalnoj tekućini zahvaćenih zglobova (118). Nadalje, poznato je da TNF- $\alpha$  potiče lučenje brojnih kemokina uključujući CCL2 (149), a izražaj TNF- $\alpha$  pojačan je u tkivima miševa s artritismom. CCL2 mogu lučiti makrofagi, endotelne stanice, sinovijalni fibroblasti i hondrociti u upaljenim zglobovima. Izražaj CCL2 u mononuklearnim progenitorskim stanicama potaknut je čimbenikom RANKL, te privlači OCP na mjesta resorpcije kosti. Iako liječenje reumatoidnog artritisa protutijelom usmjerenim na CCL2 nije pokazalo povoljan klinički učinak, istraživanja su pokazala da je razina CCL2 povezana s osteoklastogenim potencijalom stanica periferne krvi i aktivnošću bolesti (119, 125).

## 6.7. Osteoklastogeni potencijal osteoklastnih progenitora CCR2<sup>+</sup>

Receptor CCR2 je izražen na ljudskim i mišjim stanicama OCP (18, 110) te smo utvrdili značajan porast udjela populacije OCP CCR2<sup>+</sup> u miševa s artritismom. U našem *in vitro* modelu ta subpopulacija OCP pojačano migrira prema CCL2-kemotaktičnom gradijentu, što je pokazano i za ljudske monocite (150). Istraživanja su pokazala da miševi s izbačenim genom za CCR2, CCR2<sup>-/-</sup>, imaju slabiju diferencijaciju i funkciju osteoklasta te su stoga otporni na gubitak kosti nakon ovariektomije (151). Ti miševi stvaraju manji broj TRAP<sup>+</sup> osteoklasta u odnosu na divlji tip u kulturi, a isto *in vitro* opažanje vrijedi za CCL2<sup>-/-</sup> miševe (152), što upućuje na važnost CCL2/CCR2 signalizacije u osteoklastogenezi. Nadalje fenotipizacija i diferencijacija razvrstanih populacija pokazala je da izražaj kemokinskog receptora CCR2 definira subpopulacije OCP različitog osteoklastogenog potencijala. Premda i CCR2<sup>+</sup> i CCR2<sup>lo</sup> subpopulacije mogu generirati TRAP<sup>+</sup> osteoklaste koji resorbiraju koštani matriks *in vitro*, CCR2<sup>lo</sup> subpopulacija posjeduje snažniji osteoklastogeni potencijal. Ujedno ta je subpopulacija specifično potaknuta u artritisu, s obzirom na to da je u kontrolnih miševa izuzetno malobrojna. Subpopulacija OCP s jakim izražajem CCR2 (CCR2<sup>+</sup>) posjeduje manju proliferacijsku sposobnost u odnosu na subpopulaciju koja slabo izražava CCR2 (CCR2<sup>-/lo</sup>). Odgovarajuća gustoća OCP važan je faktor uspješnosti osteoklastogene stanične kulture zbog potrebe za staničnom fuzijom progenitora tijekom sazrijevanja, te ju CCR2<sup>lo/-</sup> populacija lako postiže



intenzivnom diobom nakon stimulacije čimbenicima RANKL i M-CSF. Ta populacija stanica miševa s artritismom jače izražava gen za RANK, što može objasniti najveći osteoklastogeni potencijal te subpopulacije *in vitro*, te vjerojatno predstavlja nezrelije progenitorske stanice s većim potencijalom proliferacije. S druge strane, subpopulacija CCR2<sup>+</sup> zahtjeva veću gustoću zasađenih stanica i duže vrijeme kultivacije, te vjerojatno predstavlja usmjerenije progenitore koji su predodređeni prema osteoklastnoj/makrofagnoj lozi, čemu u prilog govori jači izražaj gena za transkripcijski čimbenik c-Fos u miševa s artritismom (116).

## **6.8. Učinak utišavanja receptora CCR2 na migracijski potencijal osteoklastnih progenitora**

Kako bismo dokazali važnost kemokinskog signala koji se ostvaruje djelovanjem liganda CCL2 na receptor CCR2 na stanicama OCP, bilo je važno provesti funkcionalni test migracije OCP nakon utišavanja gena za CCR2. Primjenom siRNA *in vitro* uspješno smo snizili izražaj receptora CCR2 na razvrstanim stanicama OCP, čime se značajno smanjila njihova sposobnost migracije prema CCL2-kemokinskom gradijentu. Dosadašnja istraživanja *in vivo* inhibicije receptora CCR2 utišavanjem pomoću siRNA ili primjenom inhibirajućeg monoklalnog protutijela u miša pokazala su smanjenje monocitno-makrofagne infiltracije ciljnih tkiva (153-156). Unatoč tome, klinička studija primjene neutralizirajućeg monoklalnog protutijela protiv CCR2 u bolesnika s artritismom nije pokazala učinak na sinovijalnu upalu i infiltrat (119), dok učinak na osteoklastogenezu nije evaluiran. Negativan rezultat može se tumačiti redundancijom kemokinskog sustava prema kojoj drugi kemokinski parovi liganda i receptora mogu nadomjestiti disfunkciju blokiranog receptora.

Pretpostavka našeg istraživanja jest da različite terapijske strategije mogu odvojeno djelovati na komponentu upalne infiltracije i osteoklastne aktivacije, te ih je potrebno precizno evaluirati. Kombinirano djelovanje na kočenje upale i osteoklastogeneze stoga bi polučilo najbolje rezultate. U našem istraživanju fokusirali smo se na identifikaciju subpopulacije OCP specifično potaknute u artritismu te kemotaktične signale koji uzrokuju migraciju te subpopulacije. Ovaj rad jasno pokazuje umnažanje stanica OCP u cirkulaciji i zahvaćenim tkivima, te promjene njihovog fenotipa u artritismu. Posebice ističemo pojačan izražaj kemokinskih receptora i umnažanje subpopulacije koja slabo izražava receptor CCR2. Nadalje smo utvrdili važnost kemokinske signalizacije CCL2/CCR2 za njihovu migraciju i funkciju u upali. Većina terapeutika koji se primjenjuju u reumatoidnom artritismu cilja smanjenju upale te

time, neizravno, osteoklastogeneze potaknute upalom, primjerice inhibicijom TNF- $\alpha$ . Svrha je ovog rada predložiti terapijsku strategiju koja bi djelovala specifično na stanice OCP. Postojeći terapeutici za osteoresorptivna stanja ciljaju na blokiranje zrelih osteoklasta (bisfosfonati) ili progenitora u zadnjim stadijima diferencijacije (neutralizirajuće protutjelo za RANKL). Inhibicija kemokinskih receptora stoga je potencijalna meta u kočenju populacije nezrelih OCP i liječenju osteoresorpcije uzrokovane upalom u artritisu te drugim kroničnim upalnim bolestima.

## 7. Zaključci

1. Model CIA predstavlja model reumatoidnog artritisa, koji se u muških miševa soja C57Bl/6 razvija s incidencijom 50-60%, a karakterizira ga upala prednjih i stražnjih šapa, koja uključuje ukočenost, crvenilo, oteklinu i bol; intenzitet artritisa prati se kliničkom ocjenom s vrhuncem incidencije 35. do 45. dana od primarne imunizacije.
2. U miševa s artritismom potvrđena je pojačana osteoresorpcija na lokalnoj i sustavnoj razini fluorescentnim oslikavanjem *in vivo* pomoću probe koja otpušta signal nakon cijepanja katepsinom K, smanjenim udjelom kosti u tibiotalarnom zglobu analizom  $\mu$ CT te povišenim koncentracijama telopeptida CTX-I u serumu.
3. U subhondralnom i periartikularnom odjeljku zahvaćenih zglobova vidljiva je izrazita zamjena masnih stanica upalnim infiltratom i hipervaskularizacija, što odgovara nalazu osteitisa, uz povećan broj zrelih, aktivnih osteoklasta uz koštane površine u distalnoj tibiji, koji posreduju gubitak subhondralne i trabekularne kosti.
4. Stanice OCP u odjeljku koštane srži zahvaćenih zglobova ( $CD45^+CD3^-B220^-NK1.1^-Ly6G^-CD11b^{-/lo}CD115^+$ ) i u perifernim hematopoetskim tkivima ( $CD45^+CD3^-B220^-NK1.1^-Ly6G^-CD11b^+CD115^+$ ) značajno su brojnije u miševa s artritismom u odnosu na kontrolne miševe te miševe obrađene adjuvansom.
5. U miševa s artritismom dolazi do promjena u populacijama nezrelih stadija mijeloidne loze, osobito izraženih u periartikularnoj koštanoj srži, u vidu umnožene populacije CMP ( $CD45^+Lin^-Sca1^-CD127^-CD117^+CD34^+CD16/32^-$ ), te nezrelih ( $CD45^+CD3^-B220^-CD11b^{-/lo}CD115^+$ ) i zrelih ( $CD45^+CD3^-B220^-CD11b^+CD115^+$ ) mijeloidnih stanica.
6. Uz progenitorske stanice, u miševa s artritismom postoji značajna ekspanzija svih zrelih populacija mijeloidnih loza u koštanoj srži i slezeni ( $CD11b^+$ ,  $F4/80^+$  i  $Ly6G^+$ ), uz razmjerno smanjenje udjela limfoidnih loza ( $CD3^+$ ,  $B220^+$ ,  $NK1.1^+$ ) te uz povećanje mase slezene i celularnosti periartikularnog odjeljka koštane srži.
7. Ekspandirana populacija OCP u periartikularnom odjeljku koštane srži i slezene pojačano izražava kemokinske receptore u odnosu na kontrolne miševe, uključujući

CCR2 i CX3CR1; ostali kemokinski receptori (CCR1, CCR3, CCR5, CCR9, CXCR4) također su pojačano izraženi u artritisu, ali na vrlo malom udjelu populacije OCP.

8. Osteoklastogeni potencijal stanica OCP razlikuje se s obzirom na izražaj kemokinskog receptora CCR2, s tim da se subpopulacija sa slabim izražajem receptora (CCR2<sup>lo</sup>) specifično umnaža u artritisu, generira najveći broj TRAP<sup>+</sup> osteoklasta *in vitro* te pokazuje značajno veći izražaj gena za RANK u odnosu na kontrolu.
9. Premda i CCR2<sup>+</sup> i CCR2<sup>lo</sup> subpopulacije mogu generirati TRAP<sup>+</sup> osteoklaste koji resorbiraju koštani matriks *in vitro*, subpopulacija CCR2<sup>+</sup> zahtjeva veću gustoću zasađenih stanica i duže vrijeme kultivacije, dok subpopulacija CCR2<sup>lo</sup> pokazuje znatno veći proliferacijski indeks te ju vjerojatno čine nezrelije progenitorske stanice.
10. U periartikularnoj koštanoj srži i malim zglobovima šapa miševa s artritisom pojačan je izražaj gena za TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i CCL2, u slezeni nalazimo pojačan izražaj gena za IL-1 $\beta$ , IL-6, CCL2 i CX3CL1, a u serumu povećane koncentracije kemokina CCL2, upućujući na njegovu značajnu ulogu u kemotaksiji stanica OCP.
11. Analiza periartikularne koštane srži i tazometatarzalnog tkiva pokazuje da je rezidentna populacija mijeloidnih stanica malobrojna (oko 15% u koštanoj srži, oko 5% u zglobovima), dok većinu mijeloidnih stanica čini intravaskularna populacija (30-40%) koja je umnožena u artritisu te u zglobove migrira privučena kemotaksijom.
12. Razvrstane stanice OCP pojačano migriraju prema CCL2-gradijentu u sustavu zdenaca odvojenih poriranom membranom *in vitro*, a utišavanje gena za CCR2 primjenom siRNA značajno smanjuje taj migracijski potencijal, što znači da je kemotaktični učinak liganda CCL2 putem receptora CCR2 djelotvoran u privlačenju stanica OCP.

## 8. Sažetak

Osteoklasti, stanice hematopoetskog podrijetla specijalizirane za resorpciju kosti, pojačano su aktivni u reumatoidnom artritisu, dovodeći do gubitka kosti i razaranja zglobova. Osteoklastni progenitori (OCP) potječu iz mijeloidnih progenitora monocitno/makrofagne loze te su normalno prisutni u koštanoj srži i među cirkulirajućim monocitima. U upalnim uvjetima, zasad još nedovoljno razjašnjeni mehanizmi i kemotaktični signali privlače subpopulacije OCP na mjesta upale. U ovom radu istražili smo brojnost i izražaj kemokinskih receptora na subpopulacijama OCP u cirkulaciji i periartikularnoj koštanoj srži (PBM) C57Bl/6 miševa s artritisom potaknutim kolagenom (CIA). Uočili smo da su subpopulacije  $CD3^{-}B220^{-}NK1.1^{-}CD45^{+}CD11b^{+}CD115^{+}$  i  $CD3^{-}B220^{-}NK1.1^{-}CD45^{+}CD11b^{-/lo}CD115^{+}$  povećane brojnosti u krvi i PBM zahvaćenih zglobova u CIA, sa značajnim izražajem CCR2 i CX3CR1, te slabijim izražajem CCR1, CCR3, CCR5, CCR9 i CXCR4. Serumska koncentracija CCL2 i genski izražaj TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 te CCL2 značajno su povećani u zahvaćenim područjima i slezeni u CIA. Subpopulacija OCP iz PBM pojačano migrira prema CCL2-kemotaktičnom gradijentu, dok utišavanje CCR2, uporabom siRNA, smanjuje njezin migracijski potencijal. Intravaskularno *in vivo* bojenje pokazuje povećanu recirkulaciju  $CD45^{+}CD11b^{+}$  stanica kroz PBM i stražnje šape u CIA, sa sposobnošću navođenja u tkiva nakon adoptivnog transfera. Ovi rezultati sugeriraju mogućnost privlačenja umnožene OCP-subpopulacije u upaljene zglobove kemokinima, stoga blokada kemokinske signalizacije predstavlja obećavajući terapijski pristup za smanjenje osteoklastne aktivnosti u artritisu.

## 9. Summary

Characterization of osteoclast progenitor responses and increased osteoresorption in mouse model of rheumatoid arthritis

Darja Flegar

2018

Osteoclasts, specialized bone resorbing cells of hematopoietic origin, become overactive in rheumatoid arthritis, leading to bone loss and joint destruction. Osteoclast progenitor cells (OCP) arise from myeloid precursors of monocyte/macrophage lineage and are normally present in the bone marrow and among circulatory monocytes. Under inflammatory conditions their subpopulations get attracted to inflamed sites by yet unknown mechanisms and chemotactic signals. Here, we investigated frequencies and chemokine receptor expression of OCP subpopulations in circulation and periarticular bone marrow (PBM) of C57BL/6 mice with collagen induced arthritis (CIA). We found both lymphoid-negative CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup> and lymphoid-negative CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>-/lo</sup>CD115<sup>+</sup> subsets of OCPs to be increased in blood and PBM of affected joints in CIA. Chemokine receptors were increasingly expressed by both mentioned OCP subsets in CIA, with substantial expression of CCR2 and CX3CR1, and lower expression of CCR1, CCR3, CCR5, CCR9 and CXCR4. CCL2 serum levels, and gene expression for TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and CCL2 in affected areas and spleen were significantly increased in CIA. PBM population of OCP increasingly migrated toward CCL2 chemotactic gradient, whereas down-regulation of CCR2 expression by siRNA significantly reduced the migration potential. Intravascular *in vivo* staining demonstrated increased recirculation of CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells through PBM and hind paws in CIA, with the ability of tissue homing after adoptive transfer. These results suggest that highly induced OCP subpopulations in CIA migrate to inflamed joints due to chemotaxis and therefore blocking of chemokine signaling may reduce osteoclast activity in arthritis.

## 10. Popis literature

1. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18001.
2. Bortoluzzi A, Furini F, Generali E, Silvagni E, Luciano N, Scire CA. One year in review 2018: novelties in the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2018;36(3):347-61.
3. Benson RA, McInnes IB, Garside P, Brewer JM. Model answers: Rational application of murine models in arthritis research. *Eur J Immunol*. 2018;48(1):32-8.
4. Choudhary N, Bhatt LK, Prabhavalkar KS. Experimental animal models for rheumatoid arthritis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2018;40(3):193-200.
5. Horton JE, Raisz LG, Simmons HA, Oppenheim JJ, Mergenhagen SE. Bone resorbing activity in supernatant fluid from cultured human peripheral blood leukocytes. *Science*. 1972;177(4051):793-5.
6. Lorenzo J, Choi Y, Horowitz MC, Takayanagi H, Schett G. Chapter 1 - Overview: The Developing Field of Osteoimmunology. In: Lorenzo J, Horowitz MC, Choi Y, Takayanagi H, Schett G, editors. *Osteoimmunology (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2016. p. 1-3.
7. Lorenzo J. Interactions between immune and bone cells: new insights with many remaining questions. *The Journal of Clinical Investigation*. 2000;106(6):749-52.
8. Sharrock WJ. Bone and the hematopoietic and immune systems: a report of the proceedings of a scientific workshop. *J Bone Miner Res*. 1998;13(4):537-43.
9. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000;289(5484):1504-8.
10. Ginaldi L, De Martinis M. Osteoimmunology and Beyond. *Curr Med Chem*. 2016;23(33):3754-74.
11. Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*. 2007;40(2):251-64.
12. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93(2):165-76.

13. Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol.* 2014;5:511.
14. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature.* 2010;466(7308):829-34.
15. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7.
16. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 2008;3(3):301-13.
17. Nishikawa K, Nakashima T, Takeda S, Isogai M, Hamada M, Kimura A, et al. Maf promotes osteoblast differentiation in mice by mediating the age-related switch in mesenchymal cell differentiation. *J Clin Invest.* 2010;120(10):3455-65.
18. Sucur A, Katavic V, Kelava T, Jajic Z, Kovacic N, Grcevic D. Induction of osteoclast progenitors in inflammatory conditions: key to bone destruction in arthritis. *Int Orthop.* 2014;38(9):1893-903.
19. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997;89(2):309-19.
20. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.* 1999;13(18):2412-24.
21. Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med.* 1998;188(5):997-1001.
22. Bugatti S, Manzo A, Caporali R, Montecucco C. Inflammatory lesions in the bone marrow of rheumatoid arthritis patients: a morphological perspective. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(6):229.
23. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med.* 2006;203(12):2673-82.
24. Gruber R. Cell biology of osteoimmunology. *Wien Med Wochenschr.* 2010;160(17-18):438-45.



25. Geusens P, Lems WF. Osteoimmunology and osteoporosis. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(5):242.
26. Flegar D, Sucur A, Markotic A, Kovacic N, Greecevic D. Osteoporosis in the view of osteoimmunology: common feature underlined by different pathogenic mechanisms. *Periodicum Biologorum.* 2015;117(1):35-43.
27. Kim SY, Schneeweiss S, Liu J, Daniel GW, Chang CL, Garneau K, et al. Risk of osteoporotic fracture in a large population-based cohort of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(4):R154.
28. Geusens P, Goldring SR, Briot K, Roux C. Chapter 11 - The Role of the Immune System in the Development of Osteoporosis and Fracture Risk. In: Lorenzo J, Horowitz MC, Choi Y, Takayanagi H, Schett G, editors. *Osteoimmunology (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2016. p. 187-214.
29. Haugeberg G, Green MJ, Quinn MA, Marzo-Ortega H, Proudman S, Karim Z, et al. Hand bone loss in early undifferentiated arthritis: evaluating bone mineral density loss before the development of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2006;65(6):736-40.
30. Littlejohn EA, Monrad SU. Early Diagnosis and Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Prim Care.* 2018;45(2):237-55.
31. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1987;30(11):1205-13.
32. Dissick A, Redman RS, Jones M, Rangan BV, Reimold A, Griffiths GR, et al. Association of periodontitis with rheumatoid arthritis: a pilot study. *J Periodontol.* 2010;81(2):223-30.
33. Nieuwenhuis WP, van Steenberg HW, Stomp W, Stijnen T, Huizinga TW, Bloem JL, et al. The Course of Bone Marrow Edema in Early Undifferentiated Arthritis and Rheumatoid Arthritis: A Longitudinal Magnetic Resonance Imaging Study at Bone Level. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(5):1080-8.
34. Zhang H, Xu H, Chen S, Mao X. The application value of MRI in the diagnosis of subclinical inflammation in patients with rheumatoid arthritis in remission. *J Orthop Surg Res.* 2018;13(1):164.
35. Hetland ML, Ejbjerg B, Horslev-Petersen K, Jacobsen S, Vestergaard A, Jurik AG, et al. MRI bone oedema is the strongest predictor of subsequent radiographic progression in early

rheumatoid arthritis. Results from a 2-year randomised controlled trial (CIMESTRA). *Ann Rheum Dis.* 2009;68(3):384-90.

36. Boyesen P, Haavardsholm EA, Ostergaard M, van der Heijde D, Sesseng S, Kvien TK. MRI in early rheumatoid arthritis: synovitis and bone marrow oedema are independent predictors of subsequent radiographic progression. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(3):428-33.

37. Finzel S, Englbrecht M, Engelke K, Stach C, Schett G. A comparative study of periarticular bone lesions in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(1):122-7.

38. Sakaguchi S, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Sakaguchi N. SKG mice, a new genetic model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy.* 2003;5(Suppl 3):10-.

39. Bessis N, Decker P, Assier E, Semerano L, Boissier MC. Arthritis models: usefulness and interpretation. *Semin Immunopathol.* 2017;39(4):469-86.

40. Hegen M, Keith JC, Jr., Collins M, Nickerson-Nutter CL. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(11):1505-15.

41. Bevaart L, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum.* 2010;62(8):2192-205.

42. Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol.* 2001;70(6):849-60.

43. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc.* 2007;2(5):1269-75.

44. Inglis JJ, Criado G, Medghalchi M, Andrews M, Sandison A, Feldmann M, et al. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice is associated with a robust and sustained T-cell response to type II collagen. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(5):R113.

45. Inglis JJ, Simelyte E, McCann FE, Criado G, Williams RO. Protocol for the induction of arthritis in C57BL/6 mice. *Nat Protoc.* 2008;3(4):612-8.

46. Ikić Matijasević M, Flegar D, Kovacic N, Katavic V, Kelava T, Sucer A, et al. Increased chemotaxis and activity of circulatory myeloid progenitor cells may contribute to enhanced osteoclastogenesis and bone loss in the C57BL/6 mouse model of collagen-induced arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2016;186(3):321-35.

47. Pfeifle R, Rothe T, Ipseiz N, Scherer HU, Culemann S, Harre U, et al. Regulation of autoantibody activity by the IL-23-TH17 axis determines the onset of autoimmune disease. *Nat Immunol.* 2017;18(1):104-13.
48. Le Goff B, Berthelot JM, Maugars Y, Heymann D. Osteoclasts in RA: diverse origins and functions. *Joint Bone Spine.* 2013;80(6):586-91.
49. Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, Nakagawa T, Yamamoto A, Miyazaki T, et al. Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(2):259-69.
50. Choi Y, Arron JR, Townsend MJ. Promising bone-related therapeutic targets for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2009;5(10):543-8.
51. Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 2008;118(11):3537-45.
52. Galliera E, Locati M, Mantovani A, Corsi MM. Chemokines and bone remodeling. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2008;21(3):485-91.
53. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 2008;214(2):149-60.
54. Yao Z, Xing L, Qin C, Schwarz EM, Boyce BF. Osteoclast precursor interaction with bone matrix induces osteoclast formation directly by an interleukin-1-mediated autocrine mechanism. *J Biol Chem.* 2008;283(15):9917-24.
55. Adamopoulos IE, Chao CC, Geissler R, Laface D, Blumenschein W, Iwakura Y, et al. Interleukin-17A upregulates receptor activator of NF-kappaB on osteoclast precursors. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(1):R29.
56. Szekanecz Z, Vegvari A, Szabo Z, Koch AE. Chemokines and chemokine receptors in arthritis. *Front Biosci (Schol Ed).* 2010;2:153-67.
57. Bar-Shavit Z. The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *J Cell Biochem.* 2007;102(5):1130-9.
58. Aguila HL, Rowe DW. Skeletal development, bone remodeling, and hematopoiesis. *Immunol Rev.* 2005;208:7-18.
59. Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev.* 2008;29(4):403-40.
60. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 2008;473(2):139-46.

61. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(6937):337-42.
62. Haynes DR. Inflammatory cells and bone loss in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(3):104.
63. Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2004;19(12):2065-77.
64. Kim MS, Magno CL, Day CJ, Morrison NA. Induction of chemokines and chemokine receptors CCR2b and CCR4 in authentic human osteoclasts differentiated with RANKL and osteoclast like cells differentiated by MCP-1 and RANTES. *J Cell Biochem*. 2006;97(3):512-8.
65. Sorensen MG, Henriksen K, Schaller S, Henriksen DB, Nielsen FC, Dziegiel MH, et al. Characterization of osteoclasts derived from CD14+ monocytes isolated from peripheral blood. *J Bone Miner Metab*. 2007;25(1):36-45.
66. O'Brien CA. Control of RANKL gene expression. *Bone*. 2010;46(4):911-9.
67. Jacquin C, Gran DE, Lee SK, Lorenzo JA, Aguila HL. Identification of multiple osteoclast precursor populations in murine bone marrow. *J Bone Miner Res*. 2006;21(1):67-77.
68. Jacome-Galarza CE, Lee SK, Lorenzo JA, Aguila HL. Parathyroid hormone regulates the distribution and osteoclastogenic potential of hematopoietic progenitors in the bone marrow. *J Bone Miner Res*. 2011;26(6):1207-16.
69. Charles JF, Hsu LY, Niemi EC, Weiss A, Aliprantis AO, Nakamura MC. Inflammatory arthritis increases mouse osteoclast precursors with myeloid suppressor function. *J Clin Invest*. 2012;122(12):4592-605.
70. Kotani M, Kikuta J, Klauschen F, Chino T, Kobayashi Y, Yasuda H, et al. Systemic circulation and bone recruitment of osteoclast precursors tracked by using fluorescent imaging techniques. *J Immunol*. 2013;190(2):605-12.
71. Bruhl H, Cihak J, Plachy J, Kunz-Schughart L, Niedermeier M, Denzel A, et al. Targeting of Gr-1+,CCR2+ monocytes in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56(9):2975-85.
72. Jacome-Galarza CE, Lee SK, Lorenzo JA, Aguila HL. Identification, characterization, and isolation of a common progenitor for osteoclasts, macrophages, and dendritic cells from murine bone marrow and periphery. *J Bone Miner Res*. 2013;28(5):1203-13.

73. Matthys P, Vermeire K, Mitera T, Heremans H, Huang S, Schols D, et al. Enhanced autoimmune arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice is conditioned by mycobacteria in Freund's adjuvant and by increased expansion of Mac-1<sup>+</sup> myeloid cells. *J Immunol.* 1999;163(6):3503-10.
74. Li P, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Ma L, Looney RJ, Ritchlin CT, et al. Systemic tumor necrosis factor alpha mediates an increase in peripheral CD11b<sup>high</sup> osteoclast precursors in tumor necrosis factor alpha-transgenic mice. *Arthritis Rheum.* 2004;50(1):265-76.
75. Muto A, Mizoguchi T, Udagawa N, Ito S, Kawahara I, Abiko Y, et al. Lineage-committed osteoclast precursors circulate in blood and settle down into bone. *J Bone Miner Res.* 2011;26(12):2978-90.
76. Ishii M, Egen JG, Klauschen F, Meier-Schellersheim M, Saeki Y, Vacher J, et al. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature.* 2009;458:524.
77. Grigoriadis AE, Kennedy M, Bozec A, Brunton F, Stenbeck G, Park IH, et al. Directed differentiation of hematopoietic precursors and functional osteoclasts from human ES and iPS cells. *Blood.* 2010;115(14):2769-76.
78. Chiu YG, Shao T, Feng C, Mensah KA, Thullen M, Schwarz EM, et al. CD16 (FcRgammaIII) as a potential marker of osteoclast precursors in psoriatic arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(1):R14.
79. Hase H, Kanno Y, Kojima H, Sakurai D, Kobata T. Coculture of osteoclast precursors with rheumatoid synovial fibroblasts induces osteoclastogenesis via transforming growth factor beta-mediated down-regulation of osteoprotegerin. *Arthritis Rheum.* 2008;58(11):3356-65.
80. Kim YG, Lee CK, Oh JS, Kim SH, Kim KA, Yoo B. Effect of interleukin-32gamma on differentiation of osteoclasts from CD14<sup>+</sup> monocytes. *Arthritis Rheum.* 2010;62(2):515-23.
81. Yago T, Nanke Y, Ichikawa N, Kobashigawa T, Mogi M, Kamatani N, et al. IL-17 induces osteoclastogenesis from human monocytes alone in the absence of osteoblasts, which is potently inhibited by anti-TNF-alpha antibody: a novel mechanism of osteoclastogenesis by IL-17. *J Cell Biochem.* 2009;108(4):947-55.
82. Ikić M, Jajić Z, Lazić E, Ivčević S, Grubišić F, Marusić A, et al. Association of systemic and intra-articular osteoclastogenic potential, pro-inflammatory mediators and disease activity with the form of inflammatory arthritis. *Int Orthop.* 2014;38(1):183-92.

83. Ritchlin CT, Haas-Smith SA, Li P, Hicks DG, Schwarz EM. Mechanisms of TNF-alpha- and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *J Clin Invest.* 2003;111(6):821-31.
84. Dalbeth N, Pool B, Smith T, Callon KE, Lobo M, Taylor WJ, et al. Circulating mediators of bone remodeling in psoriatic arthritis: implications for disordered osteoclastogenesis and bone erosion. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(4):R164.
85. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(6):429-42.
86. Grcevic D, Jajic Z, Kovacic N, Lukic IK, Velagic V, Grubisic F, et al. Peripheral blood expression profiles of bone morphogenetic proteins, tumor necrosis factor-superfamily molecules, and transcription factor Runx2 could be used as markers of the form of arthritis, disease activity, and therapeutic responsiveness. *J Rheumatol.* 2010;37(2):246-56.
87. Bugatti S, Manzo A, Bombardieri M, Vitolo B, Humby F, Kelly S, et al. Synovial tissue heterogeneity and peripheral blood biomarkers. *Curr Rheumatol Rep.* 2011;13(5):440-8.
88. Furst DE. Development of TNF inhibitor therapies for the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2010;28(3 Suppl 59):S5-12.
89. Durand M, Boire G, Komarova SV, Dixon SJ, Sims SM, Harrison RE, et al. The increased in vitro osteoclastogenesis in patients with rheumatoid arthritis is due to increased percentage of precursors and decreased apoptosis - the In Vitro Osteoclast Differentiation in Arthritis (IODA) study. *Bone.* 2011;48(3):588-96.
90. Kikuta J, Nevius E, Ishii M, Pereira JP. Chapter 3 - Trafficking of Osteoclast Precursors. In: Lorenzo J, Horowitz MC, Choi Y, Takayanagi H, Schett G, editors. *Osteoimmunology (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2016. p. 25-40.
91. Ishii M, Kikuta J, Shimazu Y, Meier-Schellersheim M, Germain RN. Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo. *J Exp Med.* 2010;207(13):2793-8.
92. Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, Pereira JP, Regard JB, Xu Y, et al. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science.* 2007;316(5822):295-8.
93. Kikuta J, Wada Y, Kowada T, Wang Z, Sun-Wada G-H, Nishiyama I, et al. Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function. *The Journal of Clinical Investigation.* 2013;123(2):866-73.

94. Oba Y, Lee JW, Ehrlich LA, Chung HY, Jelinek DF, Callander NS, et al. MIP-1alpha utilizes both CCR1 and CCR5 to induce osteoclast formation and increase adhesion of myeloma cells to marrow stromal cells. *Exp Hematol*. 2005;33(3):272-8.
95. Hoshino A, Iimura T, Ueha S, Hanada S, Maruoka Y, Mayahara M, et al. Deficiency of chemokine receptor CCR1 causes osteopenia due to impaired functions of osteoclasts and osteoblasts. *J Biol Chem*. 2010;285(37):28826-37.
96. Yang M, Mailhot G, MacKay CA, Mason-Savas A, Aubin J, Odgren PR. Chemokine and chemokine receptor expression during colony stimulating factor-1-induced osteoclast differentiation in the toothless osteopetrotic rat: a key role for CCL9 (MIP-1gamma) in osteoclastogenesis in vivo and in vitro. *Blood*. 2006;107(6):2262-70.
97. Lean JM, Murphy C, Fuller K, Chambers TJ. CCL9/MIP-1gamma and its receptor CCR1 are the major chemokine ligand/receptor species expressed by osteoclasts. *J Cell Biochem*. 2002;87(4):386-93.
98. Zhu JF, Valente AJ, Lorenzo JA, Carnes D, Graves DT. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human osteoblastic cells stimulated by proinflammatory mediators. *J Bone Miner Res*. 1994;9(7):1123-30.
99. Siddiqui JA, Partridge NC. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein 1 and Parathyroid Hormone Action on Bone. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:49.
100. Koizumi K, Saitoh Y, Minami T, Takeno N, Tsuneyama K, Miyahara T, et al. Role of CX3CL1/fractalkine in osteoclast differentiation and bone resorption. *J Immunol*. 2009;183(12):7825-31.
101. Hoshino A, Ueha S, Hanada S, Imai T, Ito M, Yamamoto K, et al. Roles of chemokine receptor CX3CR1 in maintaining murine bone homeostasis through the regulation of both osteoblasts and osteoclasts. *Journal of Cell Science*. 2013;126(4):1032.
102. Bab I, Zimmer A. Cannabinoid receptors and the regulation of bone mass. *British Journal of Pharmacology*. 2008;153(2):182-8.
103. Idris AI, Sophocleous A, Landao-Bassonga E, van't Hof RJ, Ralston SH. Regulation of Bone Mass, Osteoclast Function, and Ovariectomy-Induced Bone Loss by the Type 2 Cannabinoid Receptor. *Endocrinology*. 2008;149(11):5619-26.
104. Ofek O, Karsak M, Leclerc N, Fogel M, Frenkel B, Wright K, et al. Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(3):696-701.

105. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, et al. The Essential Functions of Adipo-osteogenic Progenitors as the Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Niche. *Immunity*. 2010;33(3):387-99.
106. Shao WH, Del Prete A, Bock CB, Haribabu B. Targeted disruption of leukotriene B4 receptors BLT1 and BLT2: a critical role for BLT1 in collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol*. 2006;176(10):6254-61.
107. Perilli E, Cantley M, Marino V, Crotti TN, Smith MD, Haynes DR, et al. Quantifying not only bone loss, but also soft tissue swelling, in a murine inflammatory arthritis model using micro-computed tomography. *Scand J Immunol*. 2015;81(2):142-50.
108. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010;25(7):1468-86.
109. Kovacic N, Grcevic D, Katavic V, Lukic IK, Grubisic V, Mihovilovic K, et al. Fas receptor is required for estrogen deficiency-induced bone loss in mice. *Lab Invest*. 2010;90(3):402-13.
110. Sucur A, Jajic Z, Artukovic M, Matijasevic MI, Anic B, Flegar D, et al. Chemokine signals are crucial for enhanced homing and differentiation of circulating osteoclast progenitor cells. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):142.
111. Li H, Jiang X, Delaney J, Franceschetti T, Bilic-Curcic I, Kalinovsky J, et al. Immature osteoblast lineage cells increase osteoclastogenesis in osteogenesis imperfecta murine. *Am J Pathol*. 2010;176(5):2405-13.
112. Hawkins ED, Hommel M, Turner ML, Battye FL, Markham JF, Hodgkin PD. Measuring lymphocyte proliferation, survival and differentiation using CFSE time-series data. *Nat Protoc*. 2007;2(9):2057-67.
113. Quah BJ, Warren HS, Parish CR. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc*. 2007;2(9):2049-56.
114. Anderson KG, Mayer-Barber K, Sung H, Beura L, James BR, Taylor JJ, et al. Intravascular staining for discrimination of vascular and tissue leukocytes. *Nat Protoc*. 2014;9(1):209-22.
115. Challen GA, Boles N, Lin KK, Goodell MA. Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis. *Cytometry A*. 2009;75(1):14-24.



116. Arai A, Mizoguchi T, Harada S, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Yasuda H, et al. Fos plays an essential role in the upregulation of RANK expression in osteoclast precursors within the bone microenvironment. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 12):2910-7.
117. Braun T, Schett G. Pathways for bone loss in inflammatory disease. *Curr Osteoporos Rep.* 2012;10(2):101-8.
118. Zhang L, Yu M, Deng J, Lv X, Liu J, Xiao Y, et al. Chemokine Signaling Pathway Involved in CCL2 Expression in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Yonsei Med J.* 2015;56(4):1134-42.
119. Vergunst CE, Gerlag DM, Lopatinskaya L, Klareskog L, Smith MD, van den Bosch F, et al. Modulation of CCR2 in rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Arthritis Rheum.* 2008;58(7):1931-9.
120. Chao CC, Chen SJ, Adamopoulos IE, Judo M, Asio A, Ayanoglu G, et al. Structural, cellular, and molecular evaluation of bone erosion in experimental models of rheumatoid arthritis: assessment by muCT, histology, and serum biomarkers. *Autoimmunity.* 2010;43(8):642-53.
121. Walsh NC, Reinwald S, Manning CA, Condon KW, Iwata K, Burr DB, et al. Osteoblast function is compromised at sites of focal bone erosion in inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res.* 2009;24(9):1572-85.
122. Salamanna F, Maglio M, Borsari V, Giavaresi G, Aldini NN, Fini M. Peripheral Blood Mononuclear Cells Spontaneous Osteoclastogenesis: Mechanisms Driving the Process and Clinical Relevance in Skeletal Disease. *J Cell Physiol.* 2016;231(3):521-30.
123. Souza PP, Lerner UH. The role of cytokines in inflammatory bone loss. *Immunol Invest.* 2013;42(7):555-622.
124. Baum R, Gravallesse EM. Impact of inflammation on the osteoblast in rheumatic diseases. *Curr Osteoporos Rep.* 2014;12(1):9-16.
125. Szekanecz Z, Koch AE. Successes and failures of chemokine-pathway targeting in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(1):5-13.
126. Pan M, Kang I, Craft J, Yin Z. Resistance to development of collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice is due to a defect in secondary, but not in primary, immune response. *J Clin Immunol.* 2004;24(5):481-91.
127. Campbell IK, Hamilton JA, Wicks IP. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol.* 2000;30(6):1568-75.

128. Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(20):9784-8.
129. Grahnmemo L, Andersson A, Nurkkala-Karlsson M, Stubelius A, Lagerquist MK, Svensson MN, et al. Trabecular bone loss in collagen antibody-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:189.
130. Shimizu T, Takahata M, Kimura-Suda H, Kameda Y, Endo K, Hamano H, et al. Autoimmune arthritis deteriorates bone quantity and quality of periarticular bone in a mouse model of rheumatoid arthritis. *Osteoporos Int*. 2017;28(2):709-18.
131. Xie Za, Liu G, Tang P, Sun X, Chen S, Qin A, et al. Bone-targeted methotrexate–alendronate conjugate inhibits osteoclastogenesis in vitro and prevents bone loss and inflammation of collagen-induced arthritis in vivo. *Drug Delivery*. 2018;25(1):187-97.
132. Schett G. Bone marrow edema. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1154:35-40.
133. Ivashkiv LB, Zhao B, Park-Min KH, Takami M. Feedback inhibition of osteoclastogenesis during inflammation by IL-10, M-CSF receptor shedding, and induction of IRF8. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1237:88-94.
134. Matthews BG, Torreggiani E, Roeder E, Matic I, Grcevic D, Kalajzic I. Osteogenic potential of alpha smooth muscle actin expressing muscle resident progenitor cells. *Bone*. 2016;84:69-77.
135. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Akdis M, Andra I, Annunziato F, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol*. 2017;47(10):1584-797.
136. Chen J, Namiki S, Toma-Hirano M, Miyatake S, Ishida K, Shibata Y, et al. The role of CD11b in phagocytosis and dendritic cell development. *Immunol Lett*. 2008;120(1-2):42-8.
137. Park-Min KH, Lee EY, Moskowitz NK, Lim E, Lee SK, Lorenzo JA, et al. Negative regulation of osteoclast precursor differentiation by CD11b and beta2 integrin-B-cell lymphoma 6 signaling. *J Bone Miner Res*. 2013;28(1):135-49.
138. Fierro FA, Nolta JA, Adamopoulos IE. Concise Review: Stem Cells in Osteoimmunology. *Stem Cells*. 2017;35(6):1461-7.
139. Xiao Y, Palomero J, Grabowska J, Wang L, de Rink I, van Helvert L, et al. Macrophages and osteoclasts stem from a bipotent progenitor downstream of a macrophage/osteoclast/dendritic cell progenitor. *Blood Adv*. 2017;1(23):1993-2006.
140. Kondo M. Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Immunol Rev*. 2010;238(1):37-46.

141. Burg ND, Pillinger MH. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol.* 2001;99(1):7-17.
142. Ueda Y, Yang K, Foster SJ, Kondo M, Kelsoe G. Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. *J Exp Med.* 2004;199(1):47-58.
143. Kaplan MJ. Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(5):219.
144. Wipke BT, Allen PM. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 2001;167(3):1601-8.
145. Aliprantis AO, Charles JF, Nakamura MC. Chapter 2 - The Origins of the Osteoclast. In: Lorenzo J, Horowitz MC, Choi Y, Takayanagi H, Schett G, editors. *Osteoimmunology (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2016. p. 5-23.
146. Steen BM, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Chapter 17 - The Role of the Immune System in Fracture Healing. In: Lorenzo J, Horowitz MC, Choi Y, Takayanagi H, Schett G, editors. *Osteoimmunology (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2016. p. 297-310.
147. Rahimi P, Wang CY, Stashenko P, Lee SK, Lorenzo JA, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 expression and monocyte recruitment in osseous inflammation in the mouse. *Endocrinology.* 1995;136(6):2752-9.
148. Oba Y, Lee JW, Ehrlich LA, Chung HY, Jelinek DF, Callander NS, et al. MIP-1 $\alpha$  utilizes both CCR1 and CCR5 to induce osteoclast formation and increase adhesion of myeloma cells to marrow stromal cells. *Experimental Hematology.* 2005;33(3):272-8.
149. Xia L, Lu J, Xiao W. Blockage of TNF-alpha by infliximab reduces CCL2 and CCR2 levels in patients with rheumatoid arthritis. *J Investig Med.* 2011;59(6):961-3.
150. Rollins BJ, Walz A, Baggiolini M. Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood.* 1991;78(4):1112-6.
151. Binder NB, Niederreiter B, Hoffmann O, Stange R, Pap T, Stulnig TM, et al. Estrogen-dependent and C-C chemokine receptor-2-dependent pathways determine osteoclast behavior in osteoporosis. *Nat Med.* 2009;15(4):417-24.
152. Khan UA, Hashimi SM, Bakr MM, Forwood MR, Morrison NA. CCL2 and CCR2 are Essential for the Formation of Osteoclasts and Foreign Body Giant Cells. *J Cell Biochem.* 2016;117(2):382-9.
153. Kitagawa K, Wada T, Furuichi K, Hashimoto H, Ishiwata Y, Asano M, et al. Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney. *Am J Pathol.* 2004;165(1):237-46.

154. Kim J, Chung K, Choi C, Beloor J, Ullah I, Kim N, et al. Silencing CCR2 in Macrophages Alleviates Adipose Tissue Inflammation and the Associated Metabolic Syndrome in Dietary Obese Mice. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2016;5:e280.
155. Leuschner F, Courties G, Dutta P, Mortensen LJ, Gorbato R, Sena B, et al. Silencing of CCR2 in myocarditis. *Eur Heart J*. 2015;36(23):1478-88.
156. Leuschner F, Dutta P, Gorbato R, Novobrantseva TI, Donahoe JS, Courties G, et al. Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes in mice. *Nat Biotechnol*. 2011;29(11):1005-10.

## 11. Životopis

Darja Flegar rođena je 28.10.1988. godine u Varaždinu. Osnovnu školu i opću gimnaziju završila je u Ivancu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2007. godine i diplomirala 2013. godine s odličnim uspjehom. Zatim je obavila pripravnički staž te položivši stručni ispit stekla odobrenje za samostalni rad 2014. godine. Nakon kraćeg rada u općoj i obiteljskoj medicini zaposlena je kao asistent na projektu Hrvatske zaklade za znanost „Karakterizacija reakcije osteoklastnih progenitora na artritis“ voditeljice prof. dr. sc. Danke Grčević na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu gdje istovremeno upisuje poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“. Dosadašnji rad rezultirao je objavom četiriju međunarodno indeksiranih znanstvenih radova. 2017. godine boravila je u laboratoriju *Center for Regenerative Medicine and Skeletal Development* (Uconn Health, SAD) na usavršavanju istraživačkih tehnika. Nagrađena je Nagradom za najbolji rad na Danu doktorata Medicinskog fakulteta (2017.), Posebnom dekanovom nagradom (2013.) za rad u uredništvu časopisa *Medicinar* i Potvrđnicom o izvrsnosti u patofiziologiji (2010.). Za boravke na međunarodnim skupovima dodijeljene su joj dvije potpore *European Federation of Immunological Societies* (2017. i 2018.) te tri Akademske mobilnosti Sveučilišta u Zagrebu (2015., 2017. i 2018.). Član je Hrvatskog imunološkog društva. Redoviti je sudionik zagrebačkog Festivala znanosti (predavanja i radionice 2015.-2018.).

### POPIS PUBLIKACIJA AUTORICE

1. Lazić Mosler E, Lukac N, **Flegar D**, Fadljević M, Radanović I, Cvijeta H i sur. Fas receptor induces apoptosis of synovial bone and cartilage progenitor populations and promotes bone loss in antigen-induced arthritis. *FASEB J.* 2018:fj201801426R.
2. Sućur A, Jajić Z, Artuković M, Ikić Matijasević M, Anić B, **Flegar D**, i sur. Chemokine signals are crucial for enhanced homing and differentiation of circulating osteoclast progenitor cells. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):142.
3. Ikić Matijasević M\*, **Flegar D**\*, Kovacić N, Katavić V, Kelava T, Sućur A, i sur. Increased chemotaxis and activity of circulatory myeloid progenitor cells may contribute to enhanced osteoclastogenesis and bone loss in the C57BL/6 mouse model of collagen-induced arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2016;186(3):321-335. \*jednak doprinos
4. **Flegar D**, Sućur A, Markotić A, Kovacić N, Grčević D. Osteoporosis in the View of Osteoimmunology: Common Feature Underlined by Different Pathogenic Mechanisms. *Period Biol.* 2015;117(1).