

# Koštani fenotip miševa s transgenom za interleukin 7 (IL-7)

---

Žitnjak, Daniela

Doctoral thesis / Disertacija

2009

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:105:269193>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Daniela Žitnjak**

**Koštani fenotip miševa s transgenom  
za interleukin 7 (IL-7)**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2009.**

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za molekularnu imunologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Moj rad omogućen je sredstvima sljedećih znanstvenoistraživačkih projekata: Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske: 0108148 (prof. dr. sc. Ana Marušić) te 0108125 (doc dr. sc. Vedran Katavić) kao i projektom zaklade Wellcome Trust (Ujedinjeno Kraljevstvo) CRIGS 073828/Z/03/Z.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Ana Marušić

Zahvaljujem se osobama koje su me zadužile svojom pomoći i strpljenjem, prvenstveno mojoj mentorici prof. dr. sc. Ani Marušić, kao i ostalim suradnicima i prijateljima s kojima sam surađivala u Laboratoriju za molekularnu imunologiju. Također zahvaljujem mojem sadašnjem šefu, akademiku Kusiću, na razumijevanju i podršci u završetku ove doktorske disertacije. Konačno, moram zahvaliti najvećem osloncu i najčvršćoj stijeni u mojem životu, mojoj majci.

## Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Imunološki sustav	1
1.1.2. Građa imunološkog sustava	3
1.1.3. Organi imunološkog sustava	3
1.1.4. Stanice imunološkog sustava	4
1.2. Hematopoeza	4
1.3. Citokini	10
1.3.1. Interleukin 7	10
1.3.2. Interleukin 7 i limfociti B	13
1.4. Koštani sustav	15
1.4.1. Građa kosti	15
1.4.2. Koštane stanice	15
1.4.3. Koštana pregradnja	20
1.5. Međudjelovanje koštanog i imunološkog sustava	22
1.6. Transgenični mišji modeli	25
1.7. Svrha rada	27
2. Cilj i hipoteza	28
3. Materijali i metode	29
3.1. Pokusne životinje	29
3.2. Metode	30
3.2.1. Protočna citometrija	30
3.2.2. Histomorfometrijska analiza kosti	32
3.2.3. Histološka analiza organa	33
3.2.4. Kulture stanica koštane srži	33

3.2.5. Neutralizacija IL-7	36
3.2.6. Odvajanje CD45R <sup>+</sup> populacije pomoću magnetskih kuglica	36
3.2.7. Provjera funkcionalnosti osteoklasta	37
3.2.8. Analiza izražaja gena	38
3.3. Statistička analiza	40
4. Rezultati	
4.1. Miševi s transgenom za IL-7 imaju karakterističan imunološki fenotip	41
4.2. U miševa s transgenom za IL-7 povećana je koštana resorpcija što dovodi do razvoja osteopenije in vivo	43
4.3. Miševi s transgenom za IL-7 imaju povećan osteoklastični potencijal koji ne prati promjena osteoblastičnog potencijala koštane srži	47
4.4. CD45 <sup>+</sup> stanice pridonose osteoklastogenezi u miševa s transgenom za IL-7 kao potencijalne osteoklastne stanice preteče	50
4.5. U miševa s transgenom za IL-7 mikrookoliš u koštanoj srži omogućuje osteoklastogenezu iz CD45R <sup>+</sup> stanica	52
4.6. Miševi s transgenom za IL-7 imaju promijenjenu histološku građu limfatičnih organa	55
4.7. Promijen obrazac izražaja gena u miševa s transgenom za IL-7	57
5. Rasprava	59
6. Zaključak	66
7. Sažetak	69
8. Sumarry	70
9. Literatura	71
10. Životopis	105

## POPIS KRATICA

ALP – alkalna fosfataza (od engl. *alkaline phosphatase*)

APC – alofikocijanin (od engl. *allophycocyanin*)

BCP – stanica preteča limfocita B (od engl. *B cell progenitor*)

BMPs – koštane oblikotvorne bjelančevine (od engl. *bone morphogenetic proteins*)

BMU – temeljna višestanična jedinica (od engl. *basic multicellular unit*)

BRU – jedinica koštane pregradnje (od engl. *bone remodeling unit*)

BSAP – protein aktivator B linije (od engl. *B-cell specific protein activator*) = Pax5

CATK – enzim katepsin K (od engl. *cathepsin K*)

CD – stanični biljeg diferencijacije (od engl. *cluster of differentiation*)

cDNA – komplementarna DNA

CFU-E – stanica koštane srži eritrocitne loze (od engl. *colony-forming unit of erythroid lineage*)

CFU-F – stanica koštane srži fibroblastne loze (od engl. *colony-forming unit of fibroblast lineage*)

CFU-Eo- stanica koštane srži eozinofilno-granulocitne loze (od engl. *colony-forming unit of eosinophil-granulocyte lineage*)

CFU-GM - stanica koštane srži granulocitno-monocitne loze (od engl. *colony-forming unit of granulocyte-monocyte lineage*)

CFU-Ma - stanica koštane srži mastocitne loze (od engl. *colony-forming unit of mastocyte lineage*)

CFU-Me - stanica koštane srži megakariocitne loze (od engl. *colony-forming unit of megakaryocyte lineage*)

CLP – stanica preteča limfoidne loze (od engl. *common lymphoid progenitor*)

CMP – stanica preteča mijeloidne loze (od engl. *common myeloid progenitor*)

Col1 – kolagen (od engl. *collagene 1*)

CSF – čimbenik rasta za hematopoetske stanice (od engl. *colony-stimulating factor*)

CTR – kalcitoninski receptor (od engl. *calcitonin recptor*)

Ebf-1 – rani čimbenik diferencijacije limfocita B (od engl. *early B-cell factor*)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina (od engl. *etilendiaminetetraacetic acid*)

EP – stanica preteča eritrocita (od engl. *erythroid progenitor*)

EPO – eritropoetin (od engl. *erythropoietin*)

E2A – pojačivač vezanja molekula imunoglobulina (od engl. *immunoglobulin enhancer binding factor*)

Fas – Fas molekula

FasL – Fas ligand (CD95L, APO-1 ligand)

FBS – fetalni goveđi serum (od engl. *fetal bovine serum*)

FGF – fibroblastni čimbenik rasta (od engl. *fibroblast growth factor*)

FITC – reaktivni oblik fluoresceina (od engl. *fluorescein isothiocyanate form*)

Flt3 – enzim tirozin kinaza (od engl. *FMS-like tyrosine kinase 3*)

gld – generalizirana limfoproliferativna bolest (od engl. *generalized lymphoproliferative disease*)

GM-CSF – granulocitno-monocitni čimbenik rasta (od engl. *granulocyte-monocyte colony stimulating factor*)

GMP – stanica preteča granulocita i makrofaga (od engl. *granulocyte-macrophage progenitor*)

HE – hemalaun-eozin boja

HGF – čimbenik rasta hepatocita (od engl. *hepatocyte growth factor*)

HSC – hematopoetska matična stanica (od engl. *hematopoietic stem cell*)

IL-1 – interleukin 1

IL-2 – interleukin 2

IL-3 – interleukin 3

IL-4 – interleukin 4

IL-5 – interleukin 5

IL-6 – interleukin 6

IL-7 – interleukin 7

IL-7R – receptor za IL-7

IL-7R $\alpha$  –  $\alpha$  lanac receptora za IL-7

IL-7R $\gamma$ c –  $\gamma$ c lanac receptora za IL-7

IL-7 KO – miševi bez gena za IL-7 (od engl. *IL-7 knock-out mouse*)

IL-7 TG – miš s transgenom za IL-7

IL-8 – interleukin 8

IL-9 – interleukin 9

IL-12 – interleukin 12

IL-13 – interleukin 13

IL-17 – interleukin 17

IL-18 – interleukin 18

IL-21 – interleukin 21

Ig – imunoglobulin

INF $\alpha$  – intereferon  $\alpha$

INF $\gamma$  – intereferon  $\gamma$

LRP5 – lipoprotein male gustoće 5 (od engl. *low density lipoprotein receptor-related protein 5*)

MEM – minimalni esencijalni medij (od engl. *minimal essential medium*)

MHC – molekule tkivne podudarnosti (od engl. *major histocompatibility complex*)



M-CSF – čimbenik rasta kolonija makrofaga (od engl. *macrophage colony stimulating factor*)

NF-κB – jezgrin čimbenik kappa B (od engl. *nuclear factor κB*)

OC – osteokalcin

OPG – osteoprotegerin

OPG-L – ligand osteoprotegerina

Pax5 – Pax 5 gen = BSAP (od engl. *paired box gene 5*)

PBS – puferirani fosfatni pufer (od engl. *phosphated buffer saline*)

PDGF – trombocitni čimbenik rasta (od engl. *platelet derived growth factor*)

PI3K – fosfatidil-inozitol 3 kinaza (od engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*)

PTH – paratiroidni hormon

RANK – poticatelj receptora NF-κB (od engl. *receptor activator of nuclear factor κB*)

RANK-L – ligand poticatelja receptora NF-κB (od engl. *receptor activator of nuclear factor κB ligand*)

RNA – ribonukleinska kiselina (od engl. *ribonucleic acid*)

PCR – polimerazna lančana reakcija

SCF – čimbenik rasta matične stanice (od engl. *stem cell factor*)

SDF-1 – čimbenik koji potječe od stromalnih stanica (od engl. *stromal derived factor*)

SCID – teška kombinirana imunodeficijencija (od engl. *severe combined immunodeficiency*)

Src kinase – tirozin kinaza koja pripada SRC obitelji kinaza

STAT – aktivator transkripcijskih proteina (od engl. *signal transducers and activators of transcription proteins*)

TGF-β – transformirajući čimbenik rasta-β (od engl. *transforming growth factor-β*)

TNF – čimbenik nekroze tumora (od engl. *tumor necrosis factor*)

TNFR –TNF receptor

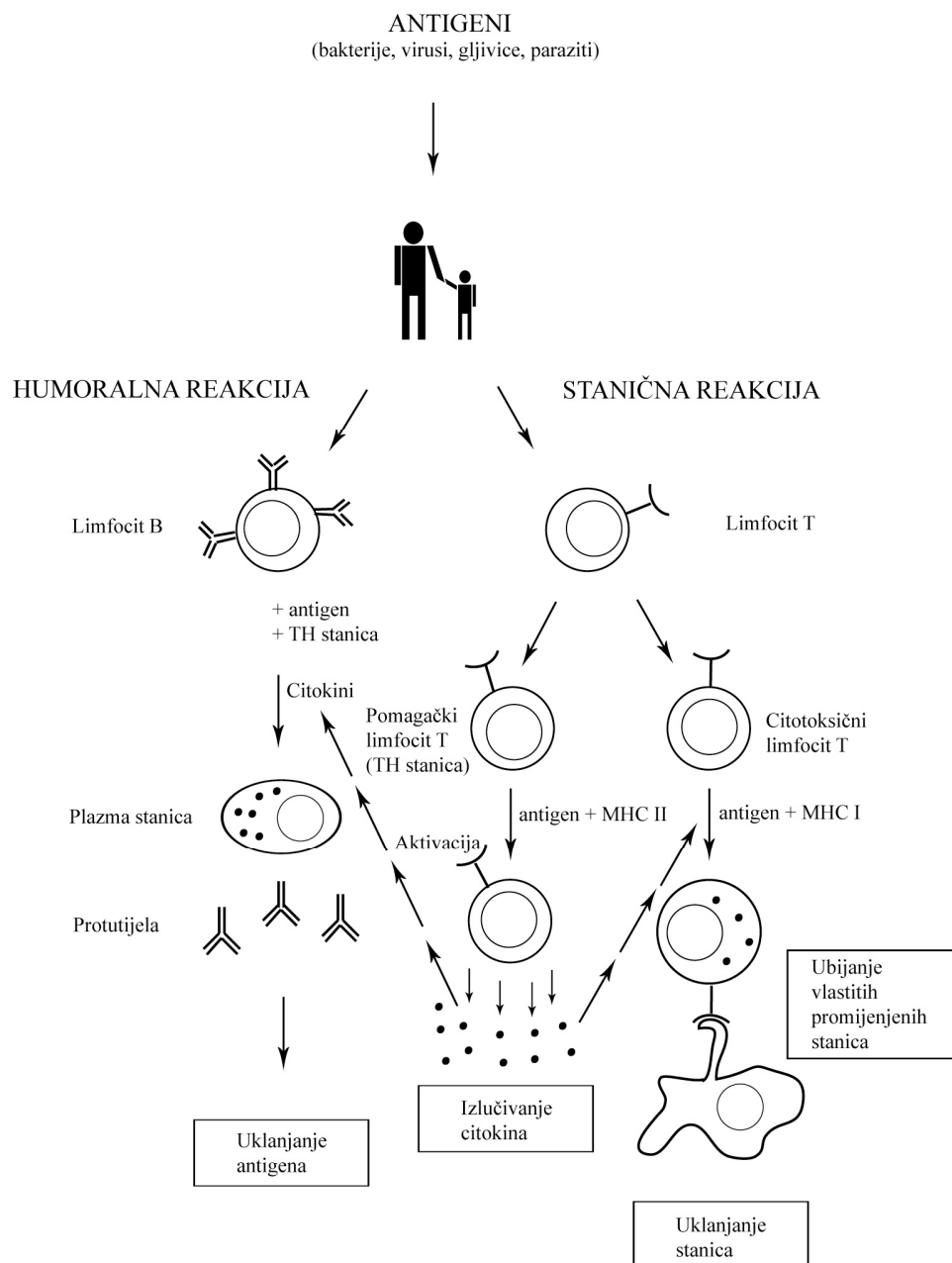
TPO – tiroidna peroksidaza (od engl. *thyroid peroxidase*)

TRAP – kisela fosfataza otporna na tartarate (od engl. *tartrate-resistant acid phosphatase*)

# 1. UVOD

## 1. 1. Imunološki sustav

Imunološki sustav je mreža stanica, tkiva i organa koji štite organizam od bolesti identificirajući i ubijajući patogene i tumorske stanice (1). Kroz povijest, pojam „imunost“ označavao je obranu od bolesti, točnije zaraznih bolesti. Imunost može biti prirođena, nespecifična, koja ne ostavlja dugotrajnu zaštitu domaćina, i stečena, visoko specifična, koja omogućuje prepoznavanje i pamćenje specifičnih patogena, razlikovanje „vlastitih“ od „ne-vlastitih“ antigena tijekom procesa prezentiranja antigena, stvaranje odgovora usmjerenog na maksimalnu eliminaciju patogena ili stanica zaraženih patogenom te razvoj imunološke memorije pri kojoj svaki patogen bude „zapamćen“ od strane određenog antigena (1-3) (Slika 1). Zajedničko i usklađeno djelovanje stanica i molekula imunološkog sustava potaknuto stranim tvarima, uključujući mikroorganizme i molekule poput polisaharida i proteina, nazivamo imunološkim odgovorom (1, 4-6). Poremećaji imunološkog sustava uključuju imunodeficijenciju, stanje u kojem je imunološki sustav nedovoljno aktivan što rezultira smrtonosnim infekcijama, ili autoimune bolesti pri kojima je imunološki sustav hiperaktivan i napada zdrava tkiva (7,8)



Slika 1. Humoralna i stanična specifična imunološka reakcija. Humoralna reakcija započinje antigenim podražajem limfocita B, uz pomoć pomagačkih limfocita T, koji potom diferenciraju u plazma stanice koje izlučuju protutijela i sudjeluju u odstranjivanju antigena. U staničnoj reakciji limfociti T prepoznaju antigen u sklopu vlastitih antigena na površini stanica, zatim proizvode citokine, a nastaju citotoksični limfociti T koji ubijaju vlastite promijenjene stanice.

### 1.1.1. Građa imunološkog sustava

Imunološki sustav čine organi, tkiva, stanice te njihovi proizvodi čija je uloga prepoznavanje tvari stranih organizmu te obrana od njih. Tijekom života, imunološki sustav suočava se s brojnim izazovima nastojeći uspješno ukloniti infektivne patogene. Prvo, mora biti sposoban prepoznati brojne mikroorganizme koji na različite načine ulaze u tijelo. Drugo, vrlo je malo djevičanskih limfocita koji specifično prepoznaju većinu antigena. Treće, efektorski mehanizmi (stanice i protutijela) moraju pronaći i uništiti mikroorganizme na mjestima udaljenim od početne infekcije. Upravo posebna obilježja njegovih stanica i tkiva omogućuju imunološkom sustavu savladavanje tih izazova. Specijalizirana tkiva, tj. periferni limfni organi, koncentriraju antigene koji ulaze na uobičajenim sjelima u organizmu: djevičanski limfociti migriraju u periferne limfatične organe i tamo prepoznavanjem antigena započinju imunološki odgovor; efektorski i memorijski limfociti cirkuliraju u krvi zadržavajući se samo na mjestima ulaza mikroorganizama (1, 9-11).

### 1.1.2. Organi imunološkog sustava

Kako bi međudjelovanje imunoloških stanica nužno za prepoznavanje antigena i aktivaciju specifičnog imunološkog odgovora bilo optimalno, limfociti i druge stanice koncentriraju se u anatomske određene tkivima i organima gdje se nakupljaju strani antigeni. Među organima imunološkog sustava razlikujemo primarne limfatične organe gdje limfociti prvotno izražavaju antigene receptore i sazrijevaju fenotipski i funkcionalno te sekundarne limfatične organe gdje limfociti započinju imunološki odgovor (1, 2). Koštana srž, izvor svih imunoloških stanica koje nastaju procesom hematopoeze i timus (prsna žlijezda), u kojem limfociti T sazrijevaju i postaju funkcionalni, ubrajaju se u primarne limfatične organe (1, 7). Sekundarni limfatični organi su slezena, imunološki filter krvi unutar kojeg se odvija aktivacija limfocita B,

limfni čvorovi, imunološki filter limfe koji uklanja antigene prije njenog povratka u cirkulaciju te imunološke sustav kože i imunološki sustav sluznica (1, 7).

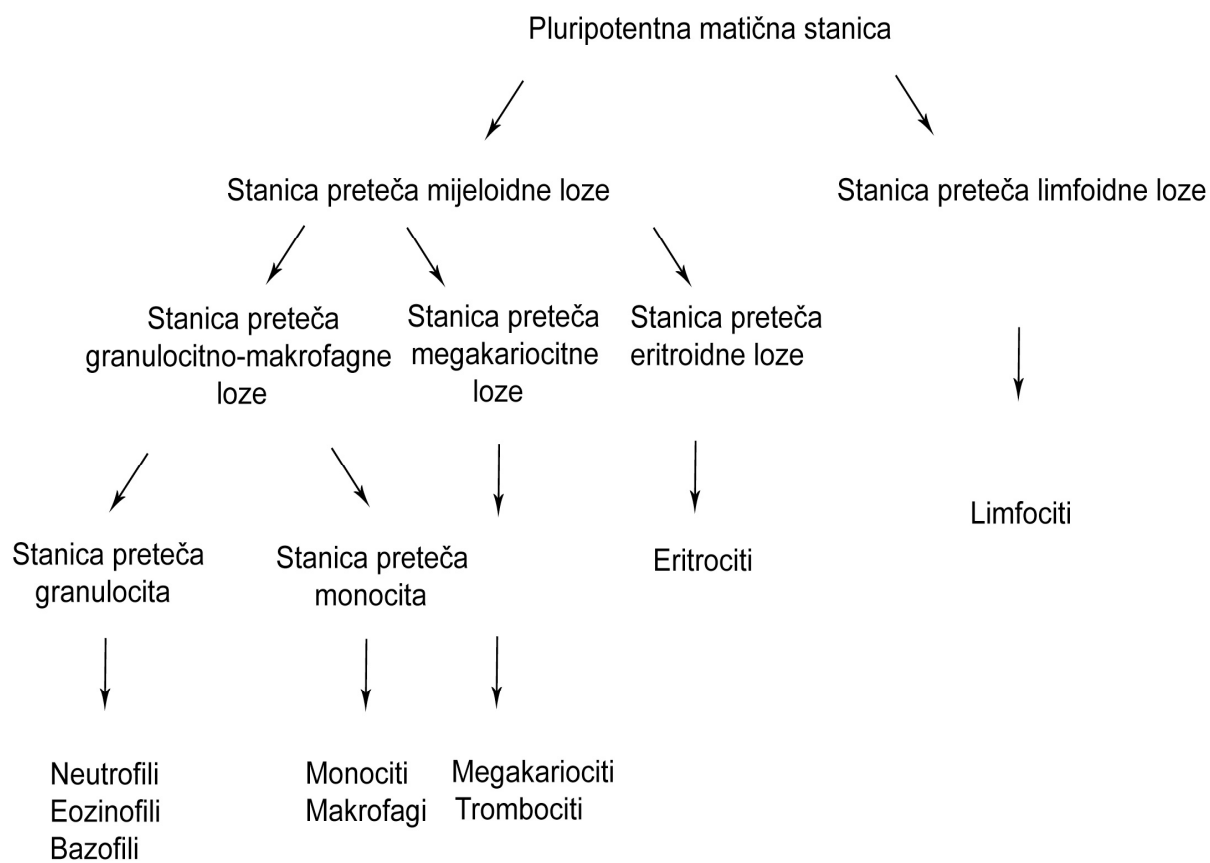
### 1.1.3. Stanice imunološkog sustava

Stanice koje sudjeluju u imunološkom odgovoru su antigen-specifični limfociti, specijalizirane antigen-prezentirajuće stanice koje predočuju antigene i aktiviraju limfocite i efektorske stanice, koje uklanjaju antigene (1, 9). Antigen-prezentirajuće stanice su dendritičke stanice, visoko specijalizirane stanice koje predstavljaju strane antigene B ili T stanicama i time započinju imunološki odgovor, učinkovitije od makrofaga, koji se također ubrajaju u tu vrstu stanica (1, 2). Efektorske stanice su limfociti T koji izlučuju specijalizirane produkte kojima aktiviraju druge stanice (nazivaju se još i pomoćnički limfociti T, obilježava ih CD4 antigen) ili ih suprimiraju (nazivaju se još i citotoksični limfociti T, karakterizira ih antigen CD8) ili izravno ubijaju, zatim limfociti B koji stvaraju protutijela kao odgovor na strane proteine bakterija, virusa i tumorskih stanica, NK stanice slične citotoksičnim limfocitima T koje izravno ubijaju tumorske stanice i stanice zaražene virusom te granulociti (polimorfonuklearni leukociti), tj. neutrofil, eozinofil i bazofil koji uklanjaju bakterije i parazite iz organizma) (1, 7, 9-11).

### 1.2. Hematopoeza

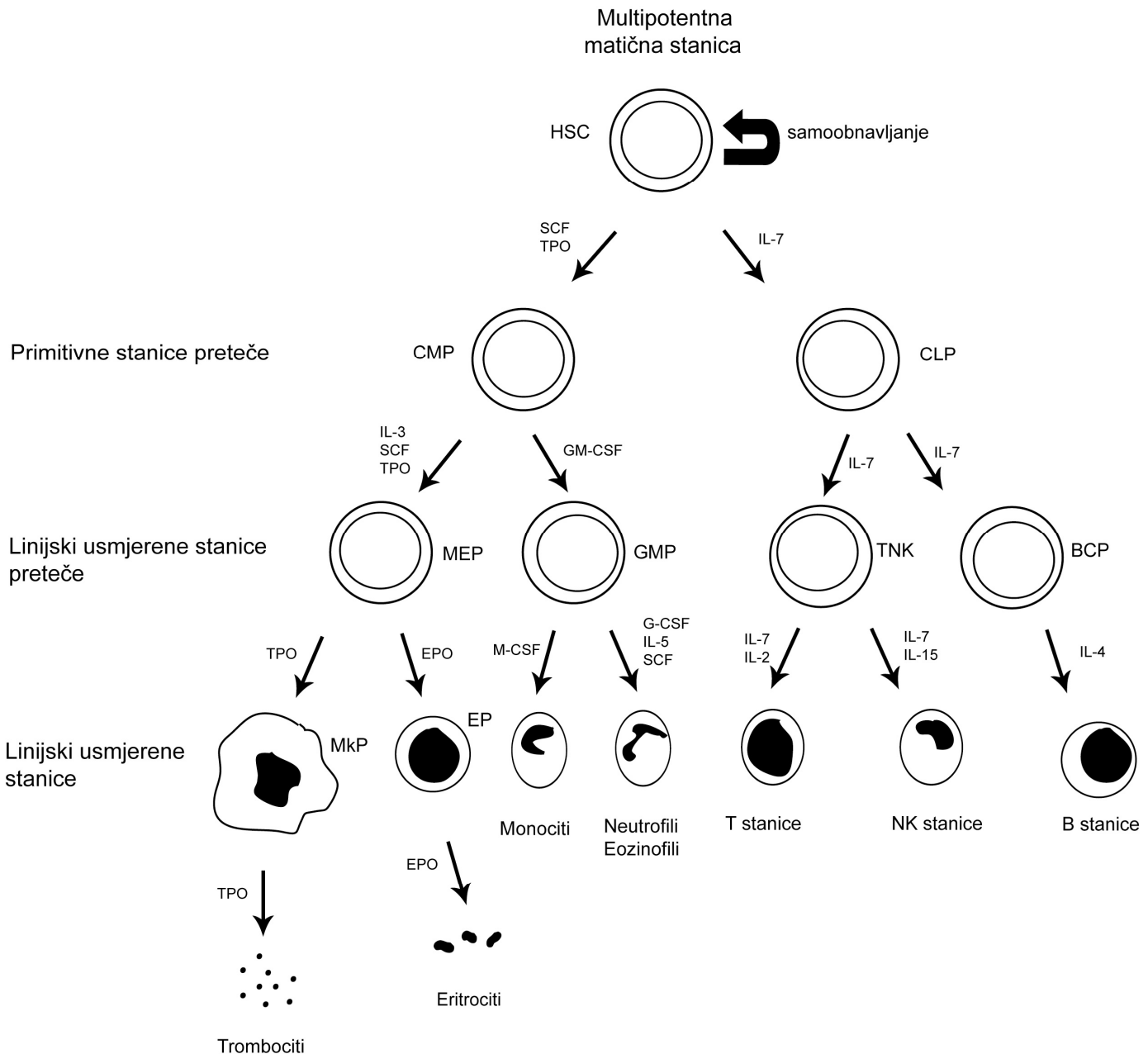
Hematopoeza, proces nastanka svih krvotvornih stanica, za vrijeme fetalnog života odvija se u žumanjčanoj vreći, paraaortalnom mezenhimu te kasnije slezeni i jetri (1, 2). Tijekom rasta tu funkciju postupno preuzima koštana srž, osobito srž plosnatih kostiju tako da se od puberteta hematopoeza većinom odvija u prsnoj kosti, kralješcima, ilijačnim (bočnim) kostima i rebrima. Crvena koštana srž nalazi se između koštanih trabekula, a čine ju masne stanice, fibroblasti i stanice preteče koje sazrijevaju i ulaze u krvotok. U slučaju ozljede koštane srži ili povećane potrebe za

stvaranjem krvotvornih stanica, u proizvodnju se uključuju slezena i jetra kao izvori ekstramedularne hematopoeze (1). Sve stanice potječu od zajedničke matične stanice, samoobnavljajuće stanice koja se usmjerava prema diferencijaciji specifičnih staničnih linija (eritrocitne, megakariocitne, granulocitne, monocitne i limfocitne) (12-14). Matična stanica ne izražava na površini biljege diferenciranih stanica, već je karakteriziraju dva proteina: CD34 (15-17) i Sca-1 (18, 19).



Slika 2. Hematopoeza. U odrasle osobe sve stanice imunološkog sustava nastaju u koštanoj srži, iz pluripotentne matične stanice.

Citokini koji se nazivaju čimbenicima stimulacije kolonija (CSF, od eng. *colony stimulating factor*) potiču proliferaciju i sazrijevanje stanica preteča (12-14). Stvaraju ih stromalne stanice i makrofagi oblikujući tako specifičan mikrookoliš te aktivirani limfociti T.





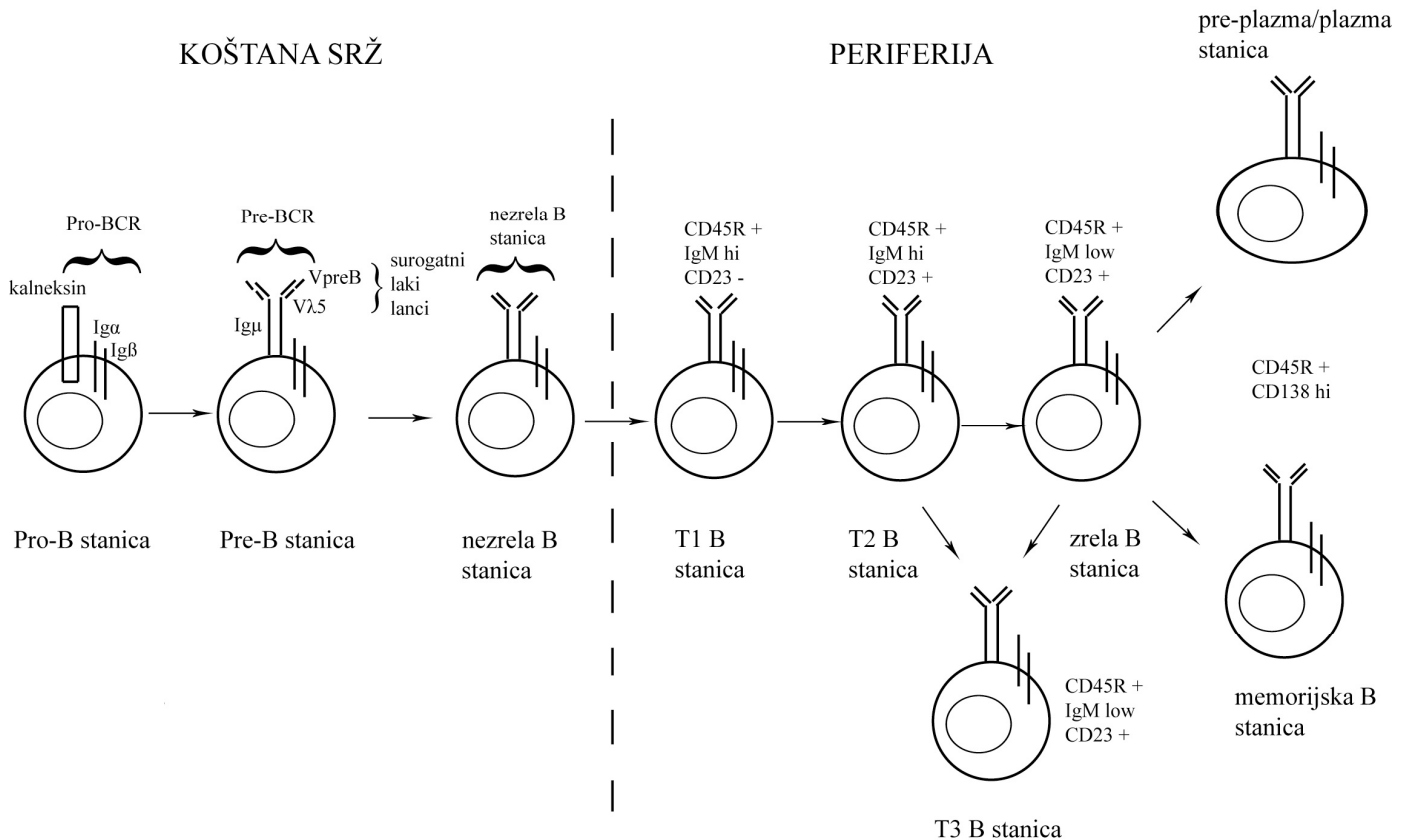
Slika 3. Citokini koji reguliraju hematopoezu. Citokini djeluju na multipotentne stanice preteče i usmjerene stanice. Skraćenice: NK – NK stanica, HSC (hematopoietic stem cell) – hematopoetska matična stanica, CLP (common lymphoid progenitor) – zajednička limfoidna stanica preteča, CMP (common myeloid progenitor) – zajednička mijeloidna stanica preteča, GMP (granulocyte-macrophage progenitor) – granulocitno-makrofagna stanica preteča, MEP (megakaryocyte-erythroid progenitor) – eritrocitno-megakariocitna stanica preteča, TNK (T lymphocyte-NK cell progenitor) – stanica preteča limfocita T i NK stanica, BCP (B cell progenitor) – stanica preteča limfocita B, EP (erythroid progenitor) – stanica preteča eritrocita, MkP (megakaryocyte progenitor) – stanica preteča megakariocita. GM-CSF (granulocyte-monocyte colony stimulating factor) – granulocitno-monocitni čimbenik rasta, G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) – granulocitni čimbenik rasta, EPO (erythropoietin) – eritropoetin, TPO (thrombopoietin) – trombopoetin, IL (interleukin) – interleukin, SCF (stem cell factor) – čimbenik rasta matične stanice.

### 1.2.1. Razvoj limfocita B

Limfocitno sazrijevanje je proces kojim preteče limfocita koje potječu iz koštane srži postaju zreli limfociti i naseljavaju periferna limfatična tkiva, a tako nastali skup antigenih receptora izraženih na površini limfocita B (i T) naziva se limfocitni repertoar (1, 2). Razvoj i sazrijevanje limfocita B može se podijeliti u tri stadija, sljedećim redoslijedom: rano sazrijevanje koje uključuje linijsko usmjeravanje i proliferaciju, zatim izražavanje gena za antigenski receptor te selekcija zrelog repertoara, a sve s ciljem nastanka djelotvornog B staničnog receptora, koji je karakteriziran preslagivanjem gena za protutijela, tj. lake i teške lance. Svako je

protutijelo građeno od dva laka (L) i dva teška (H) lanca, a odgovarajući se geni nalaze na lokusu za „L“ lanac gdje postoje dvije regije, V i J, koje se preslaguju i lokusu za „H“ lanac, gdje postoje tri regije, V, D i J, čijim preslagivanjem nastaje jedinstvena varijabilna domena imunoglobulina svakog limfocita B (1, 2, 7). Razvojni stadiji uključuju: preteče limfocita B (zametni, nepresloženi L i H lanci), rane pro-B limfocite (preslagivanje D-J gena H lanca), kasne pro-B limfocite (preslagivanje V-DJ gena H lanca), velike pre-B limfocite (presloženi VDJ geni H lanca, zametni L lanac), male pre-B limfocite (preslagivanje V-J gena L lanca), nezrele limfocite B (presloženi VJ geni L lanca, presloženi VDJ geni H lanca, ekspresija IgM na površini) i zrele limfocite B (izražaj IgD na površini) (20). U slučaju pogreške tijekom sazrijevanja, B stanice se uklanjaju apoptozom (klonska delecija). Ako tijekom sazrijevanja B stanica prepozna vlastite antigene, postaje suprimirana (anergija) ili se uklanja apoptozom (negativna selekcija). U svakom razvojnom stadiju na staničnoj površini limfocita B nalaze se specifični biljezi: CD43, CD19, CD10 u pro-B stadiju (21, 22), CD45R i CD43 u pre-B stadiju (3,4), slabo izražen IgM („niski“ IgM) na površini nezrelih limfocita (21, 22) te jasno izražen IgM („visoki“ IgM) na površini zrelih limfocita (21, 22).

Rani razvoj limfocita B karakterizira visoka mitotska aktivnost koju potiče IL-7 (23), a čija je posljedica znatan porast broja stanica. Upravo ta visoka mitotska aktivnost osigurava dovoljno veliku zalihu stanica s vrlo različitim repertoarom antigen-specifičnih limfocita. Transkripcijski čimbenici koji sudjeluju u razvoju limfocita B su PU.1, Ikaros, E2A, Ebf-1 i Pax-5 (24).



Slika 4. Stadiji razvoja limfocita B. Razvoj B limfocita u koštanoj srži i perifernim tkivima. Tijekom razvoja od pro-B stanice preko pre-B stanice do nezrelih B limfocita preslagivanje imunoglobulinskih gena rezultira izražavanjem pre-B staničnog receptora na površini stanice te na kraju zrelog B staničnog receptora koji može vezati antigen. Klonskom delecijom uklanjaju se potencijalno autoreaktivni klonovi, a stanice koje prežive tu kontrolnu točku napuštaju koštanu srž kao T1 stanice (tranzicijske T1 stanice) i sazrijevaju u folikularne B stanice (ili B stanice marginalne zone). Tijekom imunološkog odgovora, antigen specifične B stanice postaju plazma stanice ili memorijske B stanice. Tranzicijske T3 stanice danas se smatraju autoreaktivnim anergičnim B stanicama. CD45, CD23 – stanični biljezi. IgM – imunoglobulin M.

### 1.3. Citokini

Citokini su bjelančevine koje stvaraju imunološke stanice, a koji reguliraju njihovo djelovanje, a time modificiraju i sam imunološki odgovor (1, 2, 7). Lučenje citokina potiču mikroorganizmi i drugi patogeni, a svaka vrsta citokina posreduje drugačiji imunološki odgovor. U aktivacijskoj fazi imunološkog odgovora citokini potiču rast i diferencijaciju limfocita, dok u efektorskoj fazi aktiviraju efektorske stanice koje uklanjaju mikroorganizme i druge antigene. Citokini koje stvaraju mononuklearni fagociti nazivaju se monokini, dok limfokinima zovemo citokine koje stvaraju limfociti (1, 2, 7). Budući da većina limfokina potječe od leukocita (makrofaga i limfocita T) i svojim djelovanjem utječu na druge leukocite, nazivamo ih interleukinima. Djelovanje započinju vezivanjem za receptor, a ono može biti autokrino, parakrino ili endokrino. Citokini također potiču hematopoezu, zbog čega su važni za kliničku medicinu, kao terapijski agensi ili meta za specifične antagoniste u imunološkim i upalnim bolestima (1, 2).

#### 1.3.1. Interleukin 7 (IL-7)

Interleukin 7 (IL-7) je citokin, hematopoetski čimbenik rasta kojeg stvaraju stromalne stanice koštane srži i timusa, i koji ima sposobnost poticanja proliferacije limfoidnih progenitora (25). Bjelančevina koju određuje gen za IL-7 je citokin koji obavlja važne funkcije tijekom ranog razvoja limfocita B i T u miša, kao što pokazuju studije na knock-out miševima (25-27). Zajedno s čimbenikom rasta hepatocita (HGF) sačinjava heterodimer koji služi kao čimbenik rasta pre-pro-B stanica, tj. odgovoran je za prijelaz proB stanica u preB stanice. Inače, otkriven je kao faktor koji inducira proliferaciju štakorskih pro-B stanica (27), a kasnijim radom s rekombinantnom IL-7 bjelančevinom utvrđena je njena sposobnost povećavanja obiju limfocitnih populacija (28, 29) kao i njena nužnost za preživljavanje i proliferaciju i zrelih i djevičanskih

perifernih limfocita T u miša (30-32). Ima ulogu u homeostazi T stanica i njihovom obnavljanju (33-37). Nužna je i za razvoj limfocita T u čovjeka, budući da osobe s mutacijom  $\alpha$  lanca IL-7 receptora razvijaju teški kombiniranu imunodeficijenciju (SCID) (25). IL-7 je uključen je i u patogenezu drugih ljudskih bolesti kao što su reumatski artritis (38-40), imunodeficijencija (41, 42), upalne bolesti crijeva (43, 44), multipli mijelom (45-47).

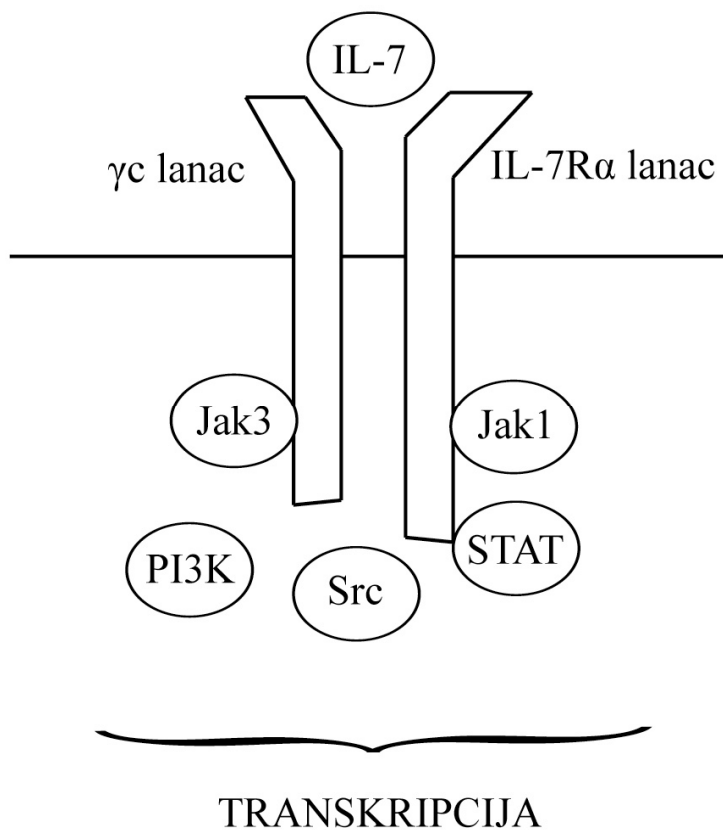
Ljudski gen za IL-7 nalazi se na kromosomu 8q12-13 (48) i sastoji se od 6 egzona i 9 introna, 534 parova baza, uključujući i signalni peptid od 25 aminokiselina (49).

Homologija između ljudskog i štakorskog gena iznosi 81% u kodirajućim regijama, odnosno 60 do 70% u nekodirajućim regijama (25). Molekularna težina ljudskog gena iznosi 17,4 kd, dok glikozilacijom nastaje aktivni protein težine 25 kd. IL-7 je klasificiran kao tip 1 citokin kratkog lanca koji pripada skupini hematopoetskih čimbenika rasta u koju se ubrajaju i IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, IL-9, IL-13, IL-15, M-CSF i SCF (49).

IL-7 proizvode stromalne stanice unutar koštane srži i timusa. Unutar timusa, glavne stanice koje ga proizvode su MHC II pozitivne epitelne stanice (25). Druga mjesta njegove proizvodnje su intestinalni epitel, fetalna jetra, jetra odraslog čovjeka, keratinociti i folikularne dendritičke stanice (25). U normalnim limfocitima, IL-7 mRNA nije otkrivena. Prema tome, IL-7 je tkivni citokin, čiji su glavni izvor stromalne i epitelne stanice na različitim lokacijama, dok su dendritičke stanice nastale iz stanica koštane srži njegov manje značajan izvor (25).

Postoji antagonistički odnos između IL-7 i TGF- $\beta$  pri kojem TGF- $\beta$  smanjuje proizvodnju IL-7 u stromalnim stanicama, a IL-7 smanjuje proizvodnju TGF- $\beta$  (50, 51).

IL-7 svoje djelovanje ostvaruje preko receptora na staničnoj površini koji je građen od dvije podjedinice: IL-7 receptor alfa lanca (IL-7R $\alpha$ ; CD127), i zajedničkog gama lanca ( $\gamma_c$ ), koji sadržavaju i receptori za IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 i IL-21 (7). IL-7R $\alpha$  izražavaju hematopoetske stanice, osobito one limfoidne linije: fetalne NK/dendritičke preteče stanice, zajednički T/NK/B limfoidne preteče stanice, T i B limfociti u razvoju, zreli T limfociti i makrofagi potekli iz koštane srži (52). Kao i kod drugih receptora koji se ubrajaju u obitelj hematopoetskih receptora, IL-7R $\alpha$  je membranski glikoprotein tipa 1 koji sadrži izvanstaničnu domenu građenu od 220 aminokiselina homolognu s onom drugih pripadnika iste obitelji. Sadrži i jednu transmembransku regiju od 25 aminokiselina i citoplazmatsku domenu od 195 aminokiselina važnu za aktiviranje unutarstaničnih signalnih molekula, točnije kinaza, koje su nužne za prenošenje signala (25). Put signalizacije je sljedeći: IL-7 se veže za IL-7R $\alpha$  lanac što dovodi do dimerizacije s  $\gamma_c$  lancem i jukstapozicije unutarstaničnih signalnih molekula Jak 1 i Jak 3. Fosforilacija tirozinskih ostataka na citoplazmatskoj domeni IL-7R $\alpha$  lanca rezultira aktivacijom signalnih puteva koji uključuju Jak1, STAT molekula, PI3 kinaze i src kinaze (25, 53).



Slika 5. IL-7 receptor je dimer građen od IL-7R $\alpha$  i  $\gamma$ c lanca u čiji su put signalizacije uključene Jak, src, STAT i PI3K kinaze.

### 1.3.2. Interleukin 7 i limfociti B

Faze razvoja limfocita B u miša mogu se razlikovati s obzirom na površinski fenotip stanica (54). Razvoj limfocita B započinje sa zajedničkom limfoidnom stanicom pretečom koja na svojoj površini izražava IL-7R $\alpha$  i c-kit, ali nema specifičnih linijskih biljega kao što je CD45R (54, 55). Prva stanica preteča usmjerena prema B liniji je pre-pro B stanica koja izražava CD45R na površini (54, 55). Prijelaz u pro B stanicu odvija se tijekom proliferacije i preslagivanja teških lanaca imunoglobulina (kao što je prije opisano). Dovršetkom preslagivanja stanica ulazi u ranu pre B fazu, u kojoj stanice koje su uspješno presložile gene ekspandiraju potaknute s IL-7 i drugim

čimbenicima (55). U kasnoj pre B fazi stanice prestaju izražavati IL-7R $\alpha$  (55). IL-7 je prvotno i otkriven temeljem njegove sposobnosti da potakne rast nezrelih limfocita B (56-58). Istraživanja rađena na miševima deficitarnim za IL-7 i IL-7R te istraživanja u kojima su korištena monoklonska protutijela potvrdila su nužnost IL-7 za razvoj limfocita B u miša (59-61). Primjena vanjskog IL-7 u normalnih miševa dovodi do izrazitog povećanja populacije pre B limfocita i zrelih limfocita B (62-64).

Suprafiziološka razina IL-7, kao što je utvrđeno i u našem transgeničnom modelu, dovodi do povećanja populacije preteča limfocita B, a time i povećanja cijelog B staničnog odjeljka. Međutim, ovisnost limfocita B o IL-7 ovisi o fazi razvoja. Pre-pro B stanice pokazuju visok prag za proliferaciju potaknutu s IL-7, taj se prag smanjuje u pro B fazi, a zatim je ponovno visok kod pre B stanica (65). Nadalje, u pre-pro B fazi utjecaj IL-7 ovisan je o stromalnom kontaktu koji u pro B fazi nije bitan (66, 67).

Osim proliferativnog učinka tijekom razvoja limfocita B, IL-7 ima i trofički učinak, tj. održava B stanice osiguravajući im signal za preživljavanje putem skupine unutarstaničnih, membranskih proteina iz bcl-2 obitelji koja uključuje proapoptičke i antiapoptičke molekule (68). U IL-7<sup>-/-</sup> miševa, nedostatak IL-7 dovodi do smanjenja razine antiapoptičke molekule bcl-2 i time do povećane apoptoze razvojnih B limfocita (69). U poticanju proliferacije limfocita B u razvoju, IL-7 djeluje sinergistički s čimbenicima kao što su SCF i SDF-1 te flt3 (70-72). Također, proliferativni učinak IL-7 na pro B i pre B stanice usko je povezan s mikrookolišem unutar koštane srži u kojoj je razvoj B limfocita reguliran kombinacijom antigenskih receptora, osjetljivosti na IL-7 i drugih čimbenika rasta s učinkom na B stanice. Zreli limfociti B općenito su neosjetljivi na IL-7.

Što se tiče ljudskih limfocita B, IL-7 nije nužan za njihov razvoj. Međutim, nezreli ljudski limfociti B proliferiraju pod utjecajem IL-7, što znači da farmakološke doze ili



povećana dostupnost endogenog IL-7 mogu utjecati na stvaranje limfocita B u ljudi (25).

#### 1.4. Koštani sustav

Koštani sustav štiti unutarnje organe, oblikuje tijelo i služi kao potpora, osigurava hematopoezu, predstavlja zalihu minerala (osobito kalcija i fosfora), omogućuje kretanje, održava acido-baznu ravnotežu (kost djeluje kao pufer apsorbirajući ili otpuštajući alkalne soli), sudjeluje u detoksikaciji (kost može pohranjivati teške metale i druge strane tvari iz krvi) i omogućuje prijenos zvuka.

##### 1.4.1. Građa kosti

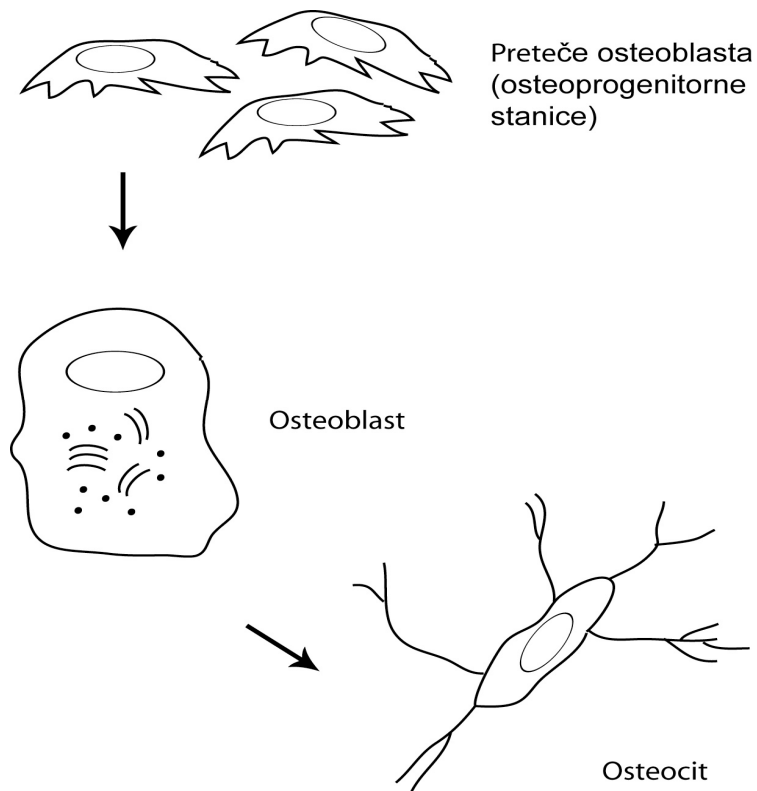
Kost je građena od matriksa i stanica. Koštani matriks čine kolagenska vlakna, nekolagenske bjelančevine te mineralne soli i kalcij u obliku kristala hidroksiapatita, koje međusobno veže osnovna tvar sastavljena od glikoproteina i proteoglikana (73, 74). Koštane stanice, osteoblasti i osteoklasti, okružene su koštanim matriksom. Osteoblasti stvaraju kost mineralizacijom osteoida, dok su osteoklasti odgovorni za resorpciju kosti.

##### 1.4.2. Koštane stanice

###### a) Osteoblasti

Osteoblasti su mononuklearne stanice koje nalazimo na površini kosti, a glavna im je zadaća stvaranje i odlaganje koštanog matriksa te regulacija aktivnosti osteoklasta (75, 76). Potječu od mezenhimalnih multipotentnih (mogu diferencirati i u stromalne stanice i adipocite, hondroblaste, fibroblaste) osteoprogenitornih stanica u periostu ili koštanoj srži (77, 78), koje tijekom embrionalnog razvoja počinju izražavati transkripcijski čimbenik RunX2 (od eng. run-related transcription factor 2) što prethodi samoj diferencijaciji osteoblasta (75, 79, 80). RunX2 je bitan i za funkciju zrelih osteoblasta što se očituje u činjenici da utječe na aktivnost većine gena koji

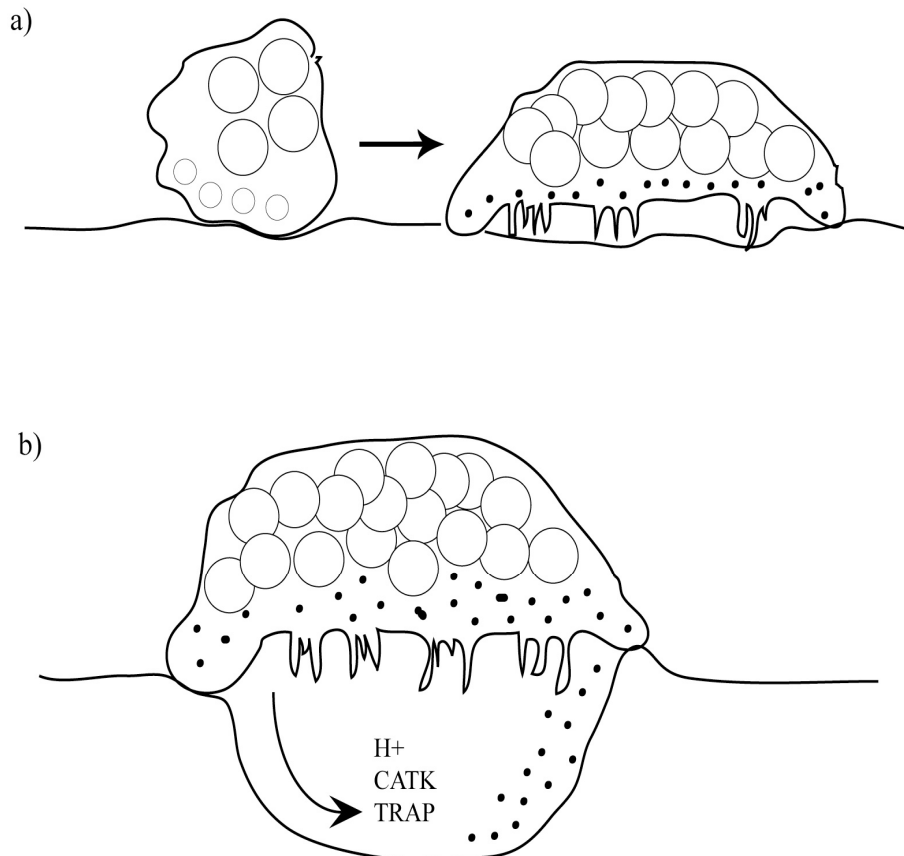
imaju ulogu u stvaranju koštanog matriksa (79). Također, izražaj osteokalcina, biljega specifičnog za zrele osteoblaste, po utjecajem je čimbenika RunX2 (81). Osteoblasti diferenciraju pod utjecajem raznih čimbenika rasta: koštanih morfogenetskih bjelančevina (BMPs, od eng. bone morphogenetic protein) koje usmjeravaju diferencijaciju matičnih stanica u osteoblaste i nužne su za normalan razvoj kostiju (82-84), čimbenika rasta fibroblasta (FGF, od eng. fibroblast growth factor) (85-87), čimbenika rasta trombocita (PDGF, od eng. platelet derived growth factor) (88, 89) i transformirajućeg čimbenika rasta beta (TGF- $\beta$ , od eng. transforming growth factor  $\beta$ ) (90, 91). Razvoj osteoblasta, osim navedenih čimbenika rasta, kontroliraju i hormoni: paratireoidni hormon (PTH), peptid srodan s PTH (92, 93) te koreceptor bjelančevina LRP5 (94). Kako koštani matriks kalcificira djelovanjem specifične koštane alkalne fosfataze koju proizvode sami osteoblasti, dio njih ostaje “zarobljen” unutar matriksa te ih tada nazivamo osteocitima. To su stanice koje više nemaju sposobnost stvaranja koštanog matriksa, ali stvaraju osteokalcin i prenose minerale, kao odgovor na mehaničku silu koja djeluje na kost te tako svojim signalima reguliraju koštanu pregradnju (95-97). Zrele osteoblaste identificiramo genetskim biljezima: osteokalcin, osteonektin, osteopontin, alkalna fosfataza (ALP), kolagen tipa I (Col1) (98-101).



Slika 6. Osteoblasti su stanice s okruglom staničnom jezgrom i bogatim izražajem enzima alkalne fosfataze čija je glavna zadaća stvaranje bjelančevina međustaničnog matriksa. Kao osteociti ostaju zarobljeni unutar međustaničnog matriksa i čine najbrojniju staničnu populaciju u kosti.

#### b) Osteoklasti

Osteoklasti su velike multinuklearne stanice odgovorne za resorpciju kosti (102, 103).

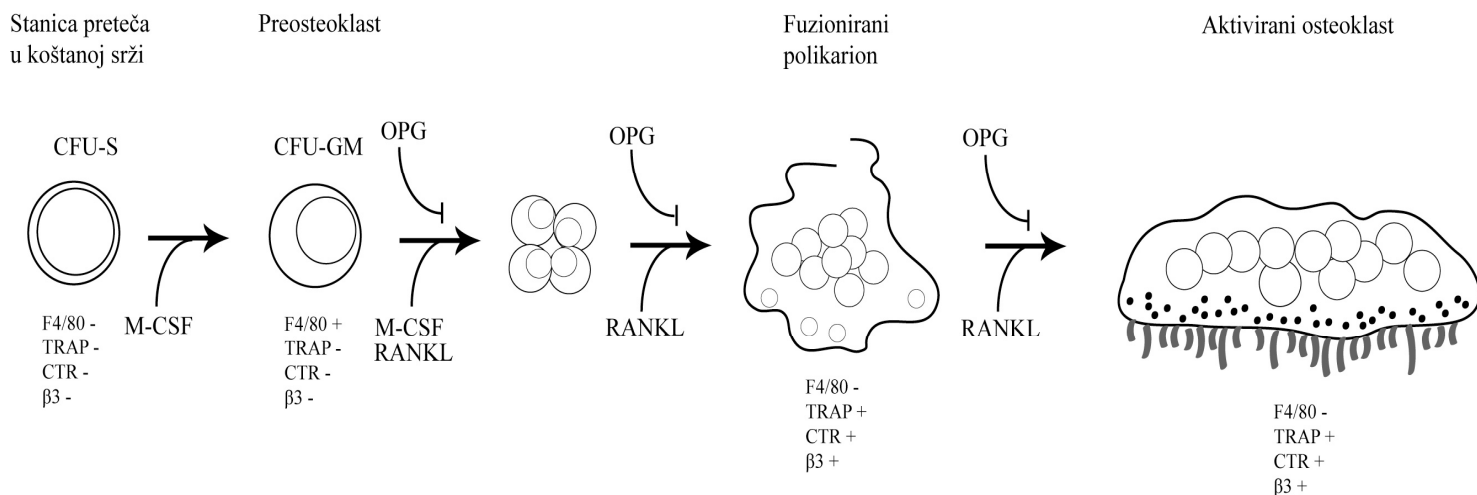


Slika 7. Osteoklasti su stanice s više jezgara koje resorbiraju kost. MCSF i RANKL aktiviraju multrinuklearne polikarione koji adheriraju za kost i diferenciraju u zrele osteoklaste (a). RANKL potiče aktivnost osteoklasta tj. lučenje protona ( $H^+$ ) i litičkih enzima (CATK – katepsin K, TRAP) u zatvorenu resorpcijsku vakuolu koja nastaje između površine kosti i osteoklasta (b).

Nastaju fuzijom mononuklearnih stanica preteča iz monocitno-makrofagne loze (103-107). Za diferencijaciju osteoklasta nužna je prisutnost liganda receptora za pobudu jezgrenog čimbenika  $\kappa B$  (RANKL, od eng. receptor activator of nuclear factor  $\kappa B$  ligand) i čimbenika poticanja makrofagnih kolonija (M-CSF, od eng. macrophage colony stimulating factor) koje proizvode susjedne stromalne stanice i osteoblasti, pri

čemu je potreban izravan kontakt svih triju vrsta stanica (108-112). M-CSF djeluje putem receptora na površini osteoklasta (c-fms), transmembranskog tirozin-kinaza receptora (113), dok se RANKL veže na svoj receptor RANK (od eng. receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B) čime se aktiviraju signalni putevi unutar same stanice (114). Osteoprotegerin, izlučen iz osteoblasta, vezivanjem za RANKL sprječava međudjelovanje s RANK-om i time inhibira diferencijaciju osteoklasta (114). Djelovanje osteoklasta regulira parathormon (PTH) iz doštitnih žlijezda, kalcitonin iz štitnjače i IL-6 (115). Zrele osteoklaste karakterizira visoka ekspresija tartarat-rezistentne kisele fosfataze (TRAP, od eng. tartarate resistant alkaline phosphatase) (116-119) i katepsina K (120-122).

Iako je njihovo mijeloidno porijeklo utvrđeno, brojna novija istraživanja pokazala su da limfociti B i osteoklasti imaju zajedničku bipotentnu stanicu preteču (123, 124), štoviše postoje ideje da stanice iz B stanične linije mogu poslužiti kao osteoklastni progenitori. Pax 5  $-/-$  miševi kod kojih postoji zastoj u razvoju B limfocita u pro B fazi, imaju povećan broj osteoklasta i smanjenu koštanu masu (125). Također, osteoklasti nastaju u kulturama stanica koštane srži pozitivnih na CD45R, B limfocitni razvojni antigen (126).

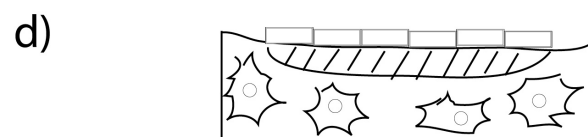
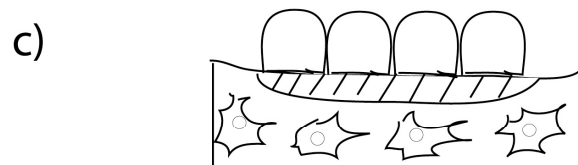
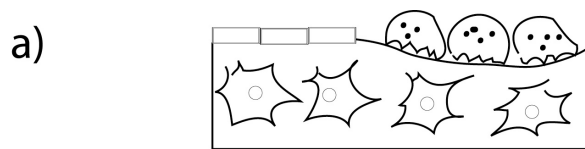


Slika 8. Razvoj osteoklasta. Osteoklasti, polikarioni nastali fuzijom 10-20 individualnih stanica, sazrijevaju iz mononuklearno-makrofagnih stanica preteča koje potječu iz matične hematopoetske stanice preteče. M-CSF (CSF-1) i RANKL su nužni za njihov razvoj. OPG može vezati i neutralizirati RANKL i tako inhibirati osteoklastogenezu i aktivaciju zrelih osteoklasta. F4/80 – panmakrofagni biljeg, TRAP – tartrat rezistentna kisela fosfataza, osteoklastni biljeg (enzim), CTR – kalcitoninski receptor, osteoklastni biljeg,  $\beta_3$  – integrin, osteoklastni biljeg, CFU-GM – stanica koštane srži granulocitno-monocitne loze (od engl. *colony-forming unit of granulocyte-monocyte lineage*), CFU-S – stanica koštane srži slezene (od engl. *colony-forming unit – spleen*).

#### 1.4.3. Koštana pregradnja

Koštana pregradnja ili preoblikovanje važan je aspekt koštanog metabolizma. To je proces izmjene mikroskopskih količina tkiva, bez promjene ukupne mase i građe kosti, a u svrhu održavanja ravnoteže kalcija, uklanjanja svakodnevnih mikrooštećenja i oblikovanja skeleta tijekom rasta (127-130). Za taj proces odgovorne su tzv. temeljne višestanične jedinice (BMU) ili jedinice koštane pregradnje (BRU) koje čine osteoklasti i osteoblasti međusobno usklađeni parakrinom staničnom signalizacijom (131). Resorpcija kosti i njeno stvaranje tako su povezani anatomski, vremenski i regulacijski. Koštanoj pregradnji i izgradnji prethodi resorpcija kosti (132). Primjerice, vitamin D i PTH potaknut će osteoblaste na lučenje RANKL-a i interleukina 6 koji stimuliraju osteoklaste i resorpciju kosti (133) te M-CSF-a koji potiče diferencijaciju osteoklasta iz stanica preteča (134, 135) i smanjuje izlučivanje osteoprotegerina koji inhibira resorpciju kosti (136, 137). Nakon resorpcije osteoblasti počinju odlagati osteoid koji se mineralizira nakon čega nastaje lamelarna kost (138).

Osteoblasti mogu biti potaknuti na stvaranje kosti povećanim stvaranjem osteoida pod utjecajem hormona rasta (139, 140), inzulina (141-144) ili spolnih hormona (145-148).



Slika 9. Koštana pregradnja: aktivacija (a) – stimulirani osteoklasti pod utjecajem citokina i čimbenika rasta diferenciraju u zrele aktivne osteoblaste; resorpcija (b) – osteoklasti probavljaju koštani matriks, tj. staru kost; formacija (c) - osteoklasti stvaraju novu kost; mirovanje (d) – osteoklasti postaju obložne, tj. mirujuće stanice na površini nove kosti.

### 1.5. MEĐUDJELOVANJE IMUNOLOŠKOG I KOŠTANOG SUSTAVA

Imunološki i koštani sustav vezani su anatomski, razvojno i funkcionalno.

Osteoimunologija, kao interdisciplinarna znanost, privlači sve veću pozornost, posebice nakon istraživanja koja su koristeći mišje modele pokazala da imunološki poremećaji uzrokuju promjene koštanog metabolizma te da nedostatak ključnih imunomodulatornih molekula dovodi do razvoja specifičnog koštanog fenotipa (149-151).

Limfociti T mogu, ovisno o načinu aktivacije i prisutnim citokinima, poticati (152, 153) ili inhibirati osteoklastogenezu (154-156). Odstranjenje limfocita T *in vitro* potiče diferencijaciju osteoklasta, a *in vivo* dovodi do stvaranja hrskavice i kosti u nekoštanom tkivu (151). *In vitro* studije pokazale su da IL-7 ima inhibitorni učinak na diferencijaciju i aktivnost osteoklasta (156, 157) te na aktivnost osteoblasta (158). *In vivo* studijama, primjenom IL-7 ili protutijela za IL-7 i IL-7R te nadomještanjem koštane srži stanicama koje pojačano izražavaju IL-7 kod miševa ozračenih letalnom dozom zračenja, nastojala se rasvijetliti uloga IL-7. Primjena IL-7 *in vivo* dovela je do povećanja B limfopoeze (159). Primjenom protutijela za IL-7 smanjen je broj djevičanskih T limfocita (150, 160), dok primjena protutijela za IL-7R nije promijenila periferne limfocitne T i B populacije (161). Miševi kod kojih je ozračena koštana srž zamijenjena stanicama koje pojačano izražavaju IL-7 razvili su



splénomegaliju i limfadenopatiju obilježenu povećanjem  $CD4^+CD8^+$  i  $CD4^-CD8^+$  subpopulacija u slezeni i limfnim čvorovima (162).

Tri transkripcijska čimbenika važna za rani razvoj B limfocita, PU.1, Ebf-1 i Pax-5, imaju ulogu i u razvoju koštanih stanica. PU.1 regulira diferencijaciju i proliferaciju B staničnih i makrofagnih stanica preteča (163-165). Usmjerenost ranih stanica preteča prema B liniji ovisi o niskoj razini, tj. aktivnosti PU.1 u stanicama, dok usmjerenost prema makrofagnoj (osteoklastnoj) lozi zahtijeva visoku aktivnost PU.1 (166, 167). PU.1 regulira usmjeravanje stanica preteča prema specifičnoj liniji izravnom kontrolom izražavanja IL-7 receptora te c-fms gena (168). Ebf je nužan za usmjerenost stanica prema B liniji, ali Ebf mRNA izražavaju i osteoblasti u svim stadijima diferencijacije (169, 170). Ebf  $-/-$  miševi imaju povećani broj osteoblasta, povećani volumen osteoida i povećano stvaranje kosti, te povećani broj osteoklasta u odrasloj dobi (171). Pax-5 gen kodira specifični čimbenik aktivacije transkripcijskog čimbenika B stanične linije (BSAP) koji izražavaju B stanice tijekom razvoja, od pro B stanica do zrelih B limfocita (172-174). Nedostatak Pax-5 gena dovodi do izrazitog smanjenja volumena trabekularne kosti, Pax  $-/-$  miševi imaju više nego 100%-tno povećanje broja osteoklasta (125).

Brojni citokini i lokalni imunološki čimbenici reguliraju funkciju koštanih stanica. RANKL, član TNF obitelji, potiče stvaranje osteoklasta iz stanica preteča, to je kritični citokin koji usmjerava osteoklastne stanice preteče te potiče i održava resorpcijsku sposobnost u zrelih osteoklastima (175-177). Proizvode ga stromalne stanice i osteoblasti, a regulacija izražavanja njegove mRNA u staničnim kulturama korelira s aktivacijom osteoklastogeneze (178). Osteoprotegerin (OPG), koji pripada istoj obitelji, inhibira stvaranje osteoklasta djelujući kao lažni receptor za RANKL (133, 179, 180). Biološki aktivni receptor za RANKL je RANK, također član TNF

obitelji, koji se nalazi na osteoklastnim stanicama pretečama i zrelim osteoklastima (180, 181). Čimbenik stimulacije kolonije makrofaga (M-CSF) također je važan za normalan razvoj osteoklasta (135, 182). Njegov membranski oblik olakšava diferencijaciju osteoklasta iz stanica preteča. M-CSF također potiče izražaj RANK-a na osteoklastnim stanicama pretečama i ima kritičnu ulogu u povećanju njihovog broja (182, 183). Čimbenik stimulacije kolonije granulocita i makrofaga (GM-CSF) i interleukin 3 (IL-3) inhibiraju osteoklastogenezu posredovanu RANKL-om, dok su druge strane povećavaju ekspanziju osteoklastnih stanica preteča (184-187).

Čimbenik stimulacije kolonije granulocita (G-CSF) mobilizira hematopoetske prekursorne stanice iz koštane srži u cirkulaciju (188, 189) i povećava broj cirkulirajućih osteoklastnih prekursora (190). IL-1 povećava aktivnost RANKL-a i time njegov učinak na osteoklastogenezu (191, 192). Čimbenik nekroze tumora (TNF) povećava stvaranje stanica sličnih osteoklastima u kulturama stanica koštane srži, mehanizmima neovisnim o RANK-u (193, 194). Fas ligand (FasL) i njegov receptor Fas, koji reguliraju apoptozu, izražavaju i osteoklastne stanice preteče i zreli osteoklasti (195-197). Dodavanje FasL u stanične kulture osteoklastnih stanica preteča, tretirane s RANKLom i M-CSFom, povećalo je stvaranje osteoklasta u kulturi (25). Brojni interleukini imaju različite učinke na koštane stanice, npr. IL-6 regulira diferencijaciju progenitora u zrele osteoklaste i izravno potiče stvaranje RANKL-a i OPG-a u kosti (198-201), IL-8 potiče osteoklastogenezu i resorpciju kosti i ima ulogu u nastanku osteolitičkih koštanih metastaza (202-204), IL-10 izravno inhibira osteoklastogenezu i osteoblastogenezu (205-207), IL-12 također inhibira osteoklastogenezu (208), IL-15 povećava broj osteoklastnih stanica preteča u kulturi (209), IL-17 potiče osteoklastogenezu putem poticanja RANKL-a (210-212), IL-18 posredno potiče osteoklastogenezu preko učinka na T limfocite (213-215). Interferoni

također utječu na koštane stanice:  $INF\gamma$  inhibira resorpciju kosti putem učinka na osteoklastne stanice preteče (218-221),  $INF\alpha$  inhibira resorpciju kosti *in vitro* (221, 222),  $INF\beta$  inhibira osteoklastogenezu posredovanu RANKL-om (223). I drugi lokalni, "inhibitorni" citokini djeluju na osteoklaste i osteoblaste. Naša istraživačka skupina pokazala je da TNFR-1 signalni put sudjeluje u endohondralnoj osteogenezi inhibirajući BMP i RANK/RANKL sustav (224). Također, uočili smo važnost Fas/FasL interakcije u ranoj endohondralnoj osteogenezi (197) kao i sposobnost inhibicije osteoblastogeneze *in vitro* putem FasL posredovana aktivacijom kaspaze 8 (197).

#### 1.6. TRANSGENIČNI MIŠJI MODELI

Laboratorijski miševi pripadaju rodu kućnog miša (*Mus musculus*) (225) i predstavljaju važan eksperimentalni model u biologiji i medicini. Stoviše, miš je najčešće upotrebljavana laboratorijska životinja (226). Razlog tome je činjenica da su miševi sisavci, i prema tome visoko homologni s čovjekom. Mišji genom je sekvencioniran, i skoro svak mišji gen ima homologni gen u čovjeka. Miševi su također pogodni jer su mali, jeftini, lako ih se održava i brzo se razmnožavaju. Estrusni ciklus ženka traje 4-6 dana, gestacijski period 19-21 dan, a ženka okoti 3-14 mladunaca (u prosjeku 6-8). (227) Ženka ima 5-10 okota godišnje tako da populacija raste vrlo brzo te je moguće u kratkom razdoblju proučavati više generacija (227). Većina laboratorijskih miševa su hibidi različitih podvrsta, najčešće *Mus musculus domesticus* i *Mus musculus musculus* (227). Neki su miševi srođeni (uzgojeni sparivanjem bliskih rođaka), kako bi se takvim uzgojem dobile genetički identične životinje (228, 229). Prvo takvo srođivanje napravila je Clarence Cook Little 1909. godine (230). Postoje brojne mutirane mišje linije, dobivene različitim metodama, kao npr. miševi koji razvijaju dijabetes (NOD miševi) (231), miševi s poremećajem

unutarnjeg uha koji hodaju u krug, imunodeficientni miševa koji ne proizvode limfocite T (nude miševi) (232-234), miševi s teškom imunodeficijencijom (SCID miševi) (235) – sve navedene linije dobivene su normalnim uzgojem. Međutim, postoje i linije transgeničnih miševa sa stranim genom umetnutim u njihov genom: abnormalno veliki miševi s umetnutim štakorskim genom za hormon rasta, onkomiševi s aktiviranim onkogenom i time povećanim rizikom razvoja raka i sl. (236). Također postoje i tzv. «knockout» miševi kod kojih je točno određeni gen inaktiviran takozvanim genskim izbacivanjem, a s ciljem proučavanja funkcije proteina produkta tih gena ili simulacije neke ljudske bolesti (237): pretili miševi s nedostatkom karboksipeptidaze ili snažni miševi s defektnim genom za miostatin (238). Ili u slučaju interleukina 7, u IL-7  $-/-$  miševa razvoj limfocita B zaustavljen je u prijelazu pro B stanica u pre B stanice (239), dok u IL-7R $\alpha$   $-/-$  miševa blok nastaje ranije, u pre-pro B fazi (240).

Transgenične mišje linije koje izražavaju IL-7 pomoću raznih promotora razvijaju različite fenotipe u rasponu od benignog porasta broja limfocita T i B do limfoproliferativnih poremećaja i tumora (241-243). Transgenični miševi kod kojih je IL-7 transgen pod kontrolom kolagenskog promotora u osteoblastima imaju povećani broj nezrelih limfocita B u koštanoj srži i povećanu masu trebekularne kosti (244). Transgenični miševi kod kojih je IL-7 cDNA vezana za P $\mu$  promotor teškog lanca imunoglobulina razvijaju alopeciju, hiperkeratozu te B i T stanične limfome (245, 246). U našem pokusnom modelu, transgeničnoj liniji kod koje je izražaj gena za IL-7 pod kontrolom MHC II (E $\alpha$ ) promotora uz specifičan imunološki fenotip karakteriziran nakupljanjem pre-B stanica, limfocita T i dermalnom infiltracijom  $\gamma\delta$  stanicama (242, 243), uočen je i koštani fenotip.

## 1.7. SVRHA RADA

Kao što je prethodno spomenuto, osteoimunologija kao interdisciplinarna znanost privlači sve veću pozornost, osobito zbog rezultata istraživanja koja su pomoću mišjih modela pokazala da imunološki poremećaji dovode do promjena koštanog metabolizma te da gubitak specifičnih imunomodulatornih molekula dovodi do razvoja koštanog fenotipa (149-151). Stanice koštanog i imunološkog sustava potječu od zajedničkih stanica preteča, trebaju isti poticajni mikrookoliš i ovise o istim regulatornim molekulama (151). Primjerice, makrofagi i osteoklasti dijele iste bipotentne stanice preteče (247, 248), a stromalne stanice, uključujući i stanice preteče osteoblasta, izražavaju molekule važne za osteoklastogenezu i svojim prostornim rasporedom osiguravaju normalnu hematopoezu (249). Neke signalne molekule, citokini i čimbenici rasta, kao što su TNF, IL-1, IL-6, osteoprotegerin ili NF- $\kappa$ B sudjeluju u radu oba sustava (149-151). Sposobnost CD45R<sup>+</sup> stanica koštane srži da stvaraju osteoklaste *in vivo* regulirana je estrogenom što pojašnjava ulogu imunoloških stanica u gubitku kosti zbog nedostatka estrogena u postmenopauzalnih žena (250-252). Stvaranje proupalnih citokina od strane imunoloških stanica i posljedično poticanje stvaranja osteoklasta njihovim utjecajem na RANKL uočeni su u nekim ljudskim bolestima, osobito reumatskom artritisu i sličnim upalnim bolestima zglobova (253-255). Koštane presadnice karcinoma, od kojeg u današnje vrijeme oboljeva svaka treća osoba (256), utječu na koštani mikrookoliš, a stanice karcinoma potiču osteoblaste i osteoklaste na stvaranje i resorpciju kosti lučenjem čimbenika poput PTH-vezanog proteina, IL-7 i IL-8 koji regrutiraju ili aktiviraju limfocite T (257). IL-7 modulira osteoklastogenezu u bolesnika sa solidnim tumorima, uočene su značajne razlike u njegovoj serumskoj razini ovisno o postojanju koštanih presadnica (258) što pretpostavlja mogućnost korištenja serumske razine IL-7 kao jednostavnog,

lako dostupnog kliničkog pokazatelja progresije bolesti. U istraživanju karcinoma pluća uočena je povezanost serumske razine IL-7, kojeg pojačano stvaraju tumorske stanice, s povećanom spontanom osteoklastogenezom, tj. kada su bolesnici s povišenom razinom IL-7 i pojačanom osteoklastogenezom izdvojeni kao suspekti i klinički obrađeni nađene su rane sekundarne koštane lezije (259). Nadali smo se da će pojašnjenje uloge jednog od citokina imunološkog sustava u metabolizmu kosti pridonijeti razumijevanju regulacijskih sustava i eventualno potaknuti daljnja istraživanja koja bi rezultirala jednostavnijom dijagnostikom i praćenjem bolesti. Definirani koštani *in vivo* modeli, pogodni su za ispitivanje učinaka lijekova na kost ili za osmišljavanje novih terapijskih postupaka, a rezultati dobiveni na taj način primjenjivi su u farmaceutskim i biotehnološkim istraživanjima.

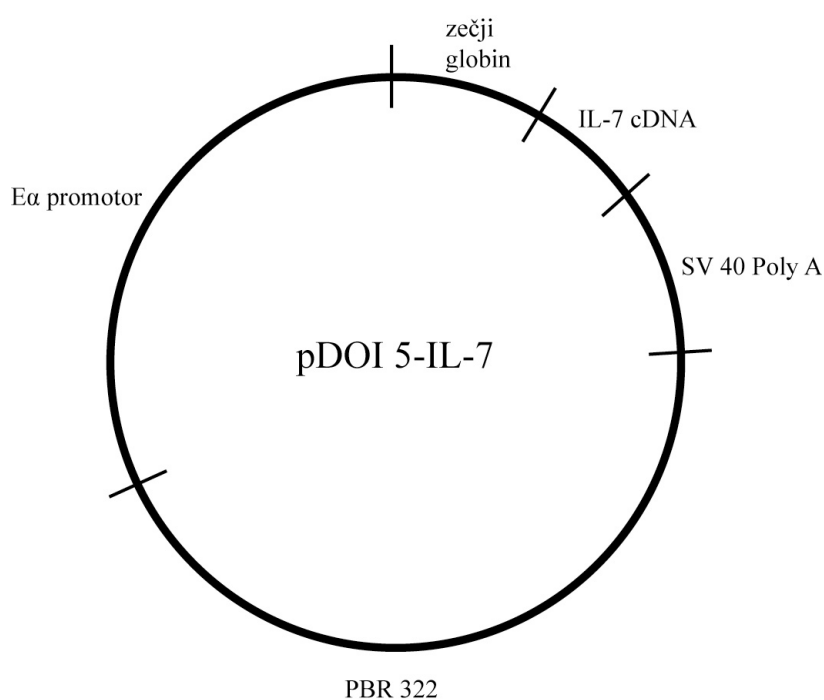
## 2. CILJ I HIPOTEZA

Ciljevi disertacije bili su: opisati koštani fenotip, čija je prisutnost u našem modelu dokazana *in vivo* i *in vitro*, zatim pojasniti kakvu ulogu imaju CD45R<sup>+</sup> stanice koje prožimaju sve imunološke organe transgeničnih miševa u povećanoj osteoklastogenezi i smanjenom volumenu trabekularne kosti, što smo pokušali učiniti pokusom razdvajanja populacija stanica koštane srži i njihovim uzgojem u kulturi i prijenosom nadtaloga osteoklastičnih kultura te uočiti eventualni obrazac genskog izražaja u pozadini koštanog fenotipa. Naime, prijašnja istraživanja opisuju razvoj specifičnog imunološkog fenotipa u ovom transgeničnom mišjem modelu (241-243). Obzirom na rezultate istraživanja koja su pomoću mišjih modela pokazala da imunološki poremećaji dovode do promjena koštanog metabolizma (149-151), pretpostavili smo da će u specifičnom imunološkom okruženju, tj. u transgeničnom modelu karakteriziranom povećanim izražavanjem IL-7, nastati specifični koštani fenotip.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. POKUSNE ŽIVOTINJE

Mužjaci i ženke heterozigotni za IL-7 transgen, uzgojeni na genetskoj pozadini C57BL/6 (242, 243) i njima srodni kontrolni miševi odgovarajuće dobi i spola, analizirani su u dobi od 8 tjedana, 6 mjeseci i 12 mjeseci.



Slika 10. IL-7 transgen. pDOI-5-IL-7 – plazmid koji potiče izražaj ugrađene IL-7 cDNA pomoću E $\alpha$  promotora. SV40 PolyA – SV40 (Suman virus 40) poliadenilacijski signal.

Nositelji transgena IL-7 identificirani su izolacijom DNA iz repa i posljedičnim PCR umnožavanjem IL-7 transgena (243, 251). Kako bismo uzgojili heterogene životinje,

nositelji transgena sparivani su s miševima divljeg soja, nakon čega je u njihovih potomaka analizirana prisutnost transgena. Prema Mendelovim zakonima genskog nasljeđivanja, transgeni roditelji s transgenim i potomcima divljeg tipa, smatrani su heterozigotima.

Sve su životinje uzgojene u štali Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom istraživanja životinje održavane su prema propisima, u kontroliranim uvjetima od 4-5 životinja po kavezu, uz režim svjetla od 14 sati na dan i mraka od 10 sati na dan, standardnu prehranu i tekućina po želji. U svrhu istraživanja, životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom.

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Protočna citometrija

Suspenzije stanica koštane srži dobivne su ispiranjem šupljine koštane srži bedrene i goljenične kosti miševa 0,1 M fiziološkom otopinom puferiranom fosfatnim puferom (PBS, eng. phosphate buffered saline) s iglom od 23G. Suspenzije stanica limfnih čvorova (preponskih i pazušnih), slezene i prsne žlijezde dobivene su usitnjavanjem navedenih organa u 0,1 M PBS-u. Svaki pojedini uzorak za protočnu citometriju načinjen je združivanjem tkiva svih miševa pripadajuće skupine. Stanice su potom resuspendirane u PBS-u (uzastopno protiskivane kroz iglu od 23G) i propuštene kroz najlonsku mrežicu promjera oko 70  $\mu\text{m}$  (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania, USA). Periferna krv, dobivena iz retrobulbarnog spleta nakon enukleiranja miša, prikupljena je u odgovarajuće epruvete s antikoagulansom (BD Biosciences, San Jose, California, USA). Eritrociti su lizirani pomoću otopine za liziranje (150 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 mM  $\text{KHCO}_3$ , 0,1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) inkubiranjem uzoraka na sobnoj temperature 15



minuta. Stanice su potom oprane u 0,1 M PBS-u i resuspendirane (uzastopno protiskivane kroz iglu od 23G) su u 0,1 M PBS-u.

Koncentracija stanica u staničnoj suspenziji svih uzoraka izračunata je brojenjem stanica u 0,5%-tnom tripanskom modrilu pomoću Bürker-Türkove mrežice.

Za protočnu citometriju uzeto je  $3 \times 10^6$  stanica svakog uzorka koje su resuspendirane u 100  $\mu$ l 0,1M PBS-a te tretirane odgovarajućim protutijelima. To su monoklonska protutijela koja su specifična za bjelančevine miša te konjugirana s različitim fluorescentnim bojama: fluorescein-izotiocijanatom (FITC, eng. fluorescein-isothiocyanate), fikoeritriinom (PE, eng. phycoerythrin), alofikocijaninom (APC, eng. allophycocyanine) i peridinin-klorofilom (PerCP, eng. peridinin-chlorophyll-protein complex). Za imunološku analizu staničnih populacija korištena su trostruka i četverostruka bojenja, tj. kombinacije sljedećih protutijela: FITC-anti-CD45R ili PerCP-anti-CD45R, FITC-anti-CD3 ili PE-anti-CD3, FITC-anti-IgM, FITC-anti-IgD, APC-anti-CD11b, PE-anti-CD19 i PE-anti-CD115. Postupak bojenja bio je sljedeći:  $3 \times 10^6$  stanica po uzorku ( $n=4$ ) inkubirano je s 1  $\mu$ g protutijela 30 minuta, u mraku, na 4°C, uzorci su zatim oprani u 0,1M PBS-u i resuspendirani u 300  $\mu$ l 0,1M PBS-a te analizirani na stroju FACSCalibur II (Beckton Dickinson) pomoću računalnog programa CellQuest (Beckton Dickinson). Svaki je uzorak analiziran kada je prikupljeno 40 000 događaja (eng. *acquisition events*). Kao kontrola korišteni su nebojani uzorci te izotipske kontrole: IgG<sub>1</sub> $\kappa$  armenskog hrčka-FITC (BD Pharmingen), IgG<sub>2a</sub> $\kappa$  štakora-PerCP (BD Pharmingen), IgG<sub>2a</sub> $\kappa$  štakora-PE (BD Pharmingen) i IgG<sub>2a</sub> $\kappa$  štakora-APC (BD Pharmingen) prema kojima su postavljene granice pojedinih kvadranta. Iz analize su isključene mrtve stanice.

### 3.2.2. Histomorfometrijska analiza kosti

Nakon žrtvovanja, goljениčne kosti i kralježnice IL-7 transgeničnih miševa i kontrolnih životinja izvađene su i očišćene od okolnog mekog tkiva, a potom su odvojeni lumbalni kralješci. Nakon fiksacije u 4% paraformaldehidu na 4°C, goljениčne kosti su demineralizirane u 0,5 M EDTA (engl. Etilen-diamine acid) u 4% para-formaldehidu 7 dana, dehidriranieu rastućim koncentracijama alkohola i uklopljene u parafin, a kralješci su fiksirani u 70% alkoholu, dehidrirani u rastućim koncentracijama alkohola i uklopljeni u plastiku (LR white). Serijski rezovi preparata debljine 5  $\mu\text{m}$  ili 8  $\mu\text{m}$  dobiveni rezanjem na rotacijskom mikrotomu (Lieca SM 2000 R, Nussloch, Njemačka) bojени su Goldnerovim trikrom bojenjem za mjerenje statičkih parametara. Mjerenje je vršeno u području trabekularne kosti proksimalne metafize, 200  $\mu\text{m}$  od ploče rasta, na jednakoj udaljenosti od endokorteksa jedne i druge strane. Histomorfometrijska analiza rađena je mikroskopom Axio Imager A1 (povećanjem 10x) priključenim na elektronsko računalo s programom za analizu kosti Osteomeasure. Slike su rađene pomoću mikroskopa s priključenom video kamerom. Mjereni su sljedeći parametri: volumen trabekularne kosti, debljina ploče rasta i duljina endokorteksa. Osteoklasti su identificirani na serijskim rezovima obojenim tartarat rezistentnom kiselom fosfatazom (TRAP) kao TRAP pozitivne stanice s tri ili više jezgara. Brojeni su na različitim dijelovima kosti: epifiznoj ploči, trabekularnoj kosti i subendostalno. Broj osteoklasta izražavan je po milimetru koštane duljine. Broj trabekula, razdvojenost trabekula i debljina trabekula izračunati su iz izravno izmjerenih vrijednosti dobivenih programom za analizu Osteomeasure (ukupna tkivna površina= T.Ar., površina trabekula=Tb.Ar. i opseg trabekula=Tb.Pm.): Tb.Wi. (eng. *Trabecular width*) kao Tb.Ar./Tb.Pm, Tb.Sp. (eng. *Trabecular separation*) kao T.Ar.-Tb.Ar./Tb.Pm. i Tb.No. (eng. *Trabecular number*) kao Tb.Pm./T.Ar.

Za mjerenje dinamičkih parametara, tj. udjela novostvorene kosti, životinje su prethodno injicirane kalceinom i tetraciklinom u razmaku od 3 dana te žrtvovane 6. dan od početka injiciranja. Kralježnice su potom izvađene i očišćene od okolnog mekog tkiva. Lumbalni kralješci su odvojeni, fiksirani u 4% paraformaldehidu na 4°C, demineralizirani u 0,5 M EDTA (etilendiaminska kiselina) u 4% para-formaldehidu 7 dana, dehidrirani u rastućim koncentracijama alkohola i uklopljeni u parafin. Serijski rezovi preparata debljine 5  $\mu\text{m}$  dobiveni su rezanjem na rotacijskom mikrotomu (Lieca SM 2000 R, Nussloch, Njemačka). Histomorfometrijska analiza rađena je mikroskopom Axio Imager A1 (povećanjem 10x) s fluorescentnom kamerom, priključenim na elektronsko računalo s programom za analizu kosti Osteomeasure. Udio novostvorene kosti izračunat je iz izravno izmjerenih vrijednosti.

### 3.2.3. Histološka analiza organa

Nakon žrtvovanja, prsna žlijezda, limfni čvorovi (pazušni, preponski i mezenterijalni) i slezena IL-7 transgeničnih miševa i kontrolnih životinja izvađeni su i očišćeni od okolnog mekog tkiva. Nakon fiksacije u 4% paraformaldehidu na 4°C, organi su uklopljeni u parafin. Serijski rezovi preparata debljine 5  $\mu\text{m}$  dobiveni rezanjem na rotacijskom mikrotomu (Lieca SM 2000 R, Nussloch, Njemačka) bojeni su Hemalaun-eozinskim bojenjem. Histološka analiza rađena je mikroskopom Axio Imager A1 (povećanjem 10x) s fluorescentnom kamerom, priključenim na elektronsko računalo.

### 3.2.4. Kulture stanica koštane srži

Suspenzije stanica koštane srži dobivene su ispiranjem šupljine koštane srži bedrene i goljenične kosti miševa hranjivim medijem  $\alpha$ -MEM i iglom od 23G. Stanice su oprane tri puta  $\alpha$ -MEM mediju, propuštene kroz najlonsku mrežicu promjera oko 40  $\mu\text{m}$  (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) i resuspendirane u mediju  $\alpha$ -

MEM obogaćenom s 10% fetalnog goveđeg seruma,  $\alpha$ -MEM/10%FBS (FBS, eng. Fetal bovine serum, Hyclone, Logan, USA). Koncentracija stanica u staničnoj suspenziji izračunata je brojenjem stanica u 0,5%-tnom tripanskom modrilu pomoću Bürker-Türkove mrežice.

Za uzgoj osteoklastnih kultura, stanice koštane srži inkubirane su preko noći s 5 ng/ml rekombinantnog mišjeg M-CSF-a (rmM-CSF, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) u  $\alpha$ -MEM/10%FBS, s ciljem stimulacije monocitno-makrofagne loze, nakon čega su pipetom pokupljene stanice u nadtalogu koje nisu adherirale, a među kojima je znatan broj neusmjerenih hematopoetskih progenitora (156). Pokupljene stanice su izbrojene kao što je prethodno navedeno i posađene u pločicu s 48 jažica u koncentraciji od  $0,5 \times 10^6$  stanica u 0,5 ml po jažici te uzgajane u  $\alpha$ -MEM,10%FBS s dodatkom 100 U/ml penicilina i 100U/ml streptomicina na 37°C s 5% CO<sub>2</sub>. U svakoj pokusnoj skupini posađeno je 6 jažica. U svrhu poticanja razvoja osteokasta u medij je dodano 10 ng/ml rekombinantnog mišjeg RANKL-a (rmRANKL, Amgen, Seattle, USA) i 20 ng/ml rmM-CSF. Medij je zamijenjen 3. dan kulture, a 6. dan stanice su fiksirane 2,5% glutaraldehydom u PBS-u, 30 minuta na sobnoj temperaturi, a potom obojene radi dokazivanja enzima kisele fosfataze otporne na tartarat (eng. TRAP, tartrate resistant acid phosphatase) pomoću komercijalnog kita (Leukocyte acid phosphatase kit, Sigma, Aldrich) prema uputama proizvođača. Stanice pozitivne na TRAP s tri ili više jezgara brojene su kao osteoklasti. Za brojenje je korišten invertni mikroskop.

Za izolaciju monocita iz periferne krvi, krv je sakupljana u odgovarajuće epruvete s antikoagulansom (BD Biosciences, San Jose, California, USA) iz retrobulbarnog spleta nakon enukleiranja miša, potom razrijeđena pomoću 0,1 M PBS-a u omjeru 1:1, nadslojena na Histopaque u omjeru 3:2 i centrifugirana 20 minuta brzinom od

2000 okreta po minuti na sobnoj temperaturi. Stanice monocitniog sloj su pokupljene pipetom, prebačene u novu epruvetu, oprane tri puta u  $\alpha$ -MEM/10%FBS, izbrojene kao što je prethodno opisano i posađene u pločicu s 48 jažica za uzgoj osteoklastnih kultura, u koncentraciji od  $1 \times 10^6$  stanica u 0,5 ml medija po jažici, uz dodatak 100 U/ml penicilina i 100 U/ml streptomicina, na 37°C s 5% CO<sub>2</sub> te s dodatkom 10 ng/ml rmRANKL i 20 ng/ml rmM-CSF radi poticanja rasta osteoklasta. Medij je zamijenjen 3. dan kulture, a 6. dan stanice su fiksirane 2,5% glutaraldehydom u PBS-u, 30 minuta na sobnoj temperaturi, a potom obojene radi dokazivanja enzima kisele fosfataze otporne na tartarat (eng. TRAP, tartrate resistant acid phosphatase) pomoću komercijalnog kita (Leukocyte acid phosphatase kit, Sigma, Aldrich) prema uputama proizvođača. Stanice pozitivne na TRAP s tri ili više jezgara brojene su kao osteoklasti. Za brojenje je korišten invertni mikroskop.

Za uzgoj kokultura, nadtalog osteoklastnih kultura IL-7 transgenika i kontrolnih miševa sakupljen je 6. dan kulture, smrznut i naknadno dodan u kulture stanica koštane srži, zajedno s  $\alpha$ -MEM/10%FBS, rmRANKL i rmM-CSF, uz dodatak 100 U/ml penicilina i 100 U/ml streptomicina, na 37°C s 5% CO<sub>2</sub>. Nadtalog kontrolnih osteoklastnih kultura dodan je u kulture stanica koštane srži transgeničnih životinja i obratno. Udio nadtaloga u ukupnom volumenu u jažici bio je 25%. Tako obogaćen medij promijenjen je 3. dan kulture, a 6. dan stanice su fiksirane 2,5% glutaraldehydom u PBS-u, 30 minuta na sobnoj temperaturi, a potom obojene radi dokazivanja enzima kisele fosfataze otporne na tartarat (eng. TRAP, tartarate resistant acid phosphatase) pomoću komercijalnog kita (Leukocyte acid phosphatase kit, Sigma, Aldrich) prema uputama proizvođača. Stanice pozitivne na TRAP s tri ili više jezgara brojene su kao osteoklasti. Za brojenje je korišten invertni mikroskop.

Za uzgoj osteoblastnih kultura, stanice koštane srži su izbrojene i posađene u pločicu sa 6 jažica i uzgajane u koncentraciji od  $7 \times 10^6$  stanica u 3 ml  $\alpha$ -MEM/10%FBS po jažici, uz dodatak 100 U/ml penicilina i 100 U/ml streptomocina, na 37°C s 5% CO<sub>2</sub>. Za svaku pokusnu skupinu posađene su 3 jažice. Četvrti dan kulture medij je zamijenjen. Sedmi dan medij je zamijenjen i u svrhu poticanja rasta osteoblasta obogaćen 8 mM  $\beta$ -glicerofosfata (Sigma-Aldrich Corp.),  $10^{-8}$ M deksametazona (Sigma-Aldrich Corp.) i 50  $\mu$ g/ml askorbinske kiseline (Sigma-Aldrich Corp.). Tako obogaćen medij zamijenjen je 9. dan kulture. Jedanaesti dan kulture stanice su fiksirane 2% paraformaldehidom u PBS-u, 10 minuta na sobnoj temperaturi i zatim obojene radi dokazivanja enzima alkalne fosfataze (AP, eng. Alkaline phosphatase) pomoću komercijalnog kita (Leukocyte acid phosphatase kit, Sigma-Aldrich Corp.) prema uputama proizvođača, radi dokazivanja ovapnjenja Von Kossa bojenjem i radi dokazivanja ukupnog broja fibroblastnih kolonija bojenjem metilenskim modrilom (REF). Brojene su kolonije pozitivne na AP, kolonije koje mineraliziraju i fibroblastne kolonije, pomoću invertnog mikroskopa (197).

### 3.2.5. Neutralizacija IL-7

Neutralizacija IL-7 provedena je inkubiranjem stanica koštane srži kontrolnih miševa u  $\alpha$ -MEM/10%FBS i  $\alpha$ -MEM/10%FBS obogaćenom nadtalogom kontrolnih osteoklastnih kultura ili transgeničnih osteoklastnih kultura, s IL-7 protutijelom, tijekom sat vremena na 37°C, nakon čega su kokulture uzgajane i bojene radi dokazivanja TRAP-a kao što je prethodno opisano. Koncentracija IL-7 protutijela bila je 1  $\mu$ g/ml i 2  $\mu$ g/ml.

### 3.2.6. Odvajanje CD45R<sup>+</sup> populacije pomoću magnetskih kuglica

CD45R pozitivna populacija izdvojena je pomoću magnetskih kuglica, prema uputama proizvođača (Dynal). Magnetske kuglice oprane su u puferu s niskim

sadržajem proteina (PBS obogaćen s 0,1% goveđeg serumskog albumina). Stanice su resuspendirane u puferu i inkubirane sa sekundarnim protutijelom (FITC-konjugirano štakorsko protu-mišje CD45R protutijelo) 30 minuta na ledu, zatim oprane tri puta u gore spomenutom puferu i inkubirane s magnetskim kuglicama 30 minuta na ledu. Nakon toga stanice su odvajane na magnetskom separatoru 10 minuta, a potom je nadtalog pažljivo sakupljen, bez diranja taloga. Stanice su resuspendirane u svježem mediju. Postupak odvajanja je ponavljan sve dok udio CD45R pozitivnih stanica u nadtalogu nije bio manji od 1%, što je provjeravano protočnom citometrijom. Odvojene CD45R pozitivna i CD45R negativna populacija, posađane su u jažice za uzgoj osteoklastnih kultura, u uvjetima jednakima onim prethodno opisanim za stanice koštane srži.

### 3.2.7. Provjera funkcionalnosti osteoklasta

Kao što je poznato od prije, aktivni osteoklasti stvaraju resorpcijske jamice koje se mogu vidjeti svjetlosnim mikroskopom kao udaljeni, tamni objekti (260). Imajući na umu tu činjenicu, aktivnost osteoklasta u kuturi procjenjivana je njihovom sposobnošću stvaranja resorpcijskih jamica, koristeći se pritom sustavom BD BioCoat Osteologic Bone Cell Culture System (BD Biosciences). Stanice koštane srži su pripremljene za kulturu kao što je prethodno opisano i posađene u pločicu s 24 jažice na čijem su se dnu nalazile 12,7 mm debele, okrugle, sterilizirane pločice, tj. diskovi ( $0,5 \times 10^6$  stanica po jažici, jedan disk po jažici) te uzgajane u  $\alpha$ -MEM/10%FBS s dodatkom 10 ng/ml rmRANKL i 20 ng/ml rmM-CSF. Nakon 8 dana, 4 jažice obojene su radi dokazivanja enzima TRAP pomoću komercijalnog kita (Leukocyte acid phosphatase kit, Sigma-Aldrich Corp.) prema uputama proizvođača, dok su stanice iz ostalih jažica uklonjene pomoću otopine za izbjeljivanje (5,2% NaCl, 6% NaOCl).

Diskovi su potom oprani u destiliranoj vodi, osušeni na zraku i analizirani pomoću faznog mikroskopa, pri 20x povećanju.

### 3.2.8. Analiza izražaja gena

RNA je izolirana iz kosti, koštane srži, osteoklastne (2. i 5. dan) i osteoblastne kulture (7, 14. i 17. dan) pomoću otopine za izolaciju RNA, prema uputama proizvođača (TRI-Reagent, Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio, USA). Kostu su, nakon dodavanja 1 ml otopine izolaciju homogenizirane uređajem za homogenizaciju tvrdih tkiva (IKA Ultra-turax T 25, Labortechnik, Staufen, Njemačka). Stanice koštane srži su isprane iz šupljine goljenične i bedrene kosti miša kao što je prethodno opisano, centrifugirane 5 min na 500 g nakon čega je nadtalog odvojen, a talog resuspendiran u otopini za izolaciju RNA. Nadtalog osteoklastnih i osteoblastnih kultura je sakupljen pipetom, centrifugiran 5 min na 500 g te resuspendiran u otopini za izolaciju RNA. Sve su stanice u navedenoj otopini inkubirane na sobnoj temperaturi 10 min. Potom su uzorci centrifugirani na 12 000 g 30 minuta radi odvajanja staničnog lizata na kojeg je dodano 0,2 ml kloroforma. Nakon 2 min na ledu, uzorci su centrifugirani 15 min na 12 000 g. Vodena faza prenesena je u novu epruvetu te je dodano 0,5 ml izopropanola radi precipitiranja. Nakon 60 min na -20°C uzorci su centrifugirani 15 min na 12 000 g čime je precipitat istaložen. Talog je potom opran u 75%-tnom etanolu, centrifugiran 5 min na 7500 g te otopljen u vodi. Količina i čistoća RNA mjerena je pomoću UV-VIS spektrofotometra (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Za PCR umnožavanje, 2 µg RNA je prepisano u cDNA postupkom obrnutog prepisivanja (RT, eng. reverse transcription). Ukupni volumen reakcije bio je 25 µl. Postupak je bio sljedeći: 2 µg RNA inkubirano je sa slučajnim začetnicima (eng. random hexamers, Applied Biosystems) i inhibitorom ribonukleaze (RNase inhibitor, Applied Biosystems) 10 min na 70°C. Nakon 5 min na ledu dodan



je pufer (50 mmol Tris-HCl, 75 mmol/l KCl, 3mmol/l MgCl<sub>2</sub>), deoksinukleotid-trifosfati (dNTPs, eng. deoxynucleotid-triphosphates, Gibco BRL), 1,4-ditio-treitol (DTT, Gibco BRL) i reverzna transkriptaza (MULV reverse transcriptase, Applied Biosystems). Navedena je otopina inkubirana 45 min na 37°C, potom je uzorcima ponovno dodana reverzna transkriptaza te su inkubirani još sat vremena na istoj temperaturi. Uzorci su ohlađeni na ledu, te umnoženi lančanom reakcijom polimerazom (qPCR, eng. quantitative polymerase chain reaction) pomoću stroja qPCR ABI Prism 7000 Sequence Detection. Umnožena je količina cDNA koja odgovara 20 ng reverzno prepisane RNA. Produkti umnožavanja identificirani su pomoću komercijalnog kita SYBR Green PCR Master Mix prema uputama proizvođača (Applied Biosystems). Svaka reakcija rađena je u triplikatu, u pločici s 96 jažica (ABI PRISM optical 96-well plate, Applied Biosystems), u ukupnom volumenu od 25 µl (0,25 µl cDNA, 0,25 U uracil N-glikozilaze proizvođača Applied Biosystems, 200 nM 3' i 5' začetnika, jedan SYBR Green PCR Master Mix set) pomoću začetnika za β-aktin (sense 5' CATTGCTGACAGGATGCAGAA3', antisense 5' GCTGATCCACATCTGCTGGA3'; Applied Biosystems), RANK (sense 5' GACTGAGGAGACCACCCAA3', antisense 5' ACAACGGTCCCCTGAGGACT3'; Applied Biosystems), RANKL (sense 5' TGCAGCATCGCTCTGTTCC3', antisense 5' CCCACAATGTGTTGCAGTTCC3'; Applied Biosystems), CD115 (sense 5' AGTCCACGGCTCATGCTGAT3', antisense 5' TAGCTGGAGTCTCCCTCGGA3'; Applied Biosystems), i osteokalcin (OC) (sense 5' CAAGCAGGAGGGCAATAAGGT3', antisense 5' AGGCGGTCTTCAAGCCATACT3'; Applied Biosystems). Uzorci su inkubirani 2 min na 50°C (aktivacija uracil N-glikozilaze), inkubirani 10 min na 95°C (inaktivacija

uracil N-glikozilaze i aktivacija DNA polimeraze), inkubirani 40 ciklusa 15 s na 95°C, 60 s na 60°C te disocirani zagrijavanjem od 60°C na 95°C. Ekspresija OPG-a i kalcitoninskog receptora analizirana je pomoću komercijalnih kitova TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) i TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Tom metodom produkt umnožavanja identificira se pomoću specifične oligonukleotidna probe vezane na dvije boje (eng. reporter dye i catcher dye). Naime, tijekom umnožavanja produljenje začetnika dovodi do pojačanja fluorescencije koja se bilježi kao signal. Svaka reakcija rađena je u triplicatu, u pločici s 96 jažica (ABI PRISM optical 96-well plate, Applied Biosystems), u ukupnom volumenu od 25  $\mu$ l.

Dobiveni podaci qPCR-a analizirani su grafički uspoređivanjem fluorescentnog signala  $\Delta R_n$  (na ordinati) i broja ciklusa (na apscisi), gdje je  $\Delta R_n$  razlika između fluorescencije reakcije i temeljne fluorescencije. Prag je proizvoljno postavljen na srednju linearnu točku logaritma  $\Delta R_n$  na broj ciklusa. Prag ciklusa ( $C_t$ , eng. cycle threshold) određen je kao broj ciklusa pri kojem  $\Delta R_n$  prelazi taj prag. Ekspresija određenog gena je mjerena u odnosu na standardnu krivulju ekspresije gena u kalibratornom uzorku (cDNA iz osteoblastne ili osteoklastne kulture) i normalizirana prema ekspresiji gena za  $\beta$ -aktin ("endogena" kontrola).

### 3.3. STATISTIČKA ANALIZA

Sve vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Skupine su uspoređivane pomoću ANOVA-e i Student–Newman–Keuls post hoc testa.  $\alpha$  vrijednost postavljena je na 0,05. Svi pokusi ponovljeni su najmanje tri puta, a prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa.

## 4. REZULTATI

### 4.1. MIŠEVI S TRANSGENOM ZA IL-7 IMAJU KARAKTERISTIČAN

#### IMUNOLOŠKI FENOTIP

Kako bismo potvrdili prisutnost imunološkog fenotipa miševa s transgenom za IL-7 opisanog u prijašnjim publikacijama (242, 243) i detaljnije ga opisali, analizirali smo izražaj staničnih biljega karakterističnih za pojedine razvojne stadije stanica limfocitne i monocitno-makrofagne loze protočnocitometrijskom analizom stanica koštane srži i periferne krvi transgeničnih miševa i odgovarajućih kontrola (Tablica 1). U miševa starih 12 mjeseci, udio stanica koje izražavaju biljeg CD45R, membranski biljeg koji se pojavljuje staničnoj membrani limfocita tijekom njihovog razvoja i to od stadija ranih pro-B limfocita do stadija zrelih limfocita B (21, 22, 261, 262), bio je za tri do četiri puta veći u koštanoj srži miševa s transgenom za IL-7 nego u kontrolnoj skupini. U perifernoj krvi, taj je udio bio značajnije veći samo u 8 tjedana starih transgenika ( $29,3 \pm 5,3\%$  u IL-7 TG nasuprot  $10,3 \pm 3,3\%$  u kontrolnoj skupini). Povećani udio CD45R<sup>+</sup> stanica našli smo i u prsnoj žlijezdi 12-mjesečnih transgeničnih miševa. Dok su u prsnoj žlijezdi miševa divljeg soja sve CD45R<sup>+</sup> stanice izražavale i CD3 stanični biljeg, obilježje aktiviranih limfocita T (263), CD45R<sup>+</sup> stanice u prsnoj žlijezdi transgenika nisu ga izražavale. Udio stanica pozitivnih za CD19 stanični biljeg, diferencijacijski antigen koji obilježava B staničnu liniju, te udio dvostruko pozitivnih CD19<sup>+</sup>CD45R<sup>+</sup> stanica, tj. stanica koje na membrani izražavaju oba biljega i koje predstavljaju kasniji stadij razvojnih limfocita B (262), bio je četiri puta veći u koštanoj srži miševa s transgenom za IL-7 (Tablica 1). U perifernoj krvi porast udjela dvostruko pozitivne populacije nije zamijećen. Udio stanica koje izražavaju membranski biljeg CD11b, tj. koje pripadaju mijeloidnoj lozi (264), bio je smanjen u koštanoj srži transgenika, dok promjena navedene

populacije u perifernoj krvi nije bilo (Table 1). Populacija stanica obilježenih staničnim biljekom monocitno-makrofagne linije CD115 (265), bila je znatno manja u perifernoj krvi miševa s transgenom za IL-7 (Tablica 1). Nije bilo razlike u udjelu dvostruko pozitivnih CD45R<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> stanica, koje su spominjane kao mogući izvor osteoklastnih prekursora u koštanoj srži (250) (Tablica 1).

U miševa starih 8 tjedana uočili smo porast CD45R<sup>+</sup> populacije u koštanoj srži, u manjem postotku nego u 12-mjesečnih životinja ( $48,5 \pm 8,8\%$  nasuprot  $28,9 \pm 2,7\%$  CD45R<sup>+</sup> stanica u koštanoj srži kontrolne skupine) što ukazuje na početni stadij razvoja gore opisanog imunološkog fenotipa. U transgenika starih 6 mjeseci imunološki fenotip već je u potpunosti razvijen ( $59,8 \pm 16,3\%$  nasuprot  $16,8 \pm 10,1\%$  CD45R<sup>+</sup> stanica u koštanoj srži kontrolne skupine).

Tablica 1. Analiza koštane srži i periferne krvi protočnim citometrom u 12-mjesečnih miševa s transgenom za IL-7 (IL-7 TG) i miševa divljeg tipa odgovarajućeg spola i dobi.

Stanična populacija	Koštana srž (%)		Periferna krv (%)	
	Wt	IL-7 TG	Wt	IL-7 TG
CD45R <sup>+</sup>	$26,5 \pm 2,6$	$76,9 \pm 9,9^*$	$34,4 \pm 6,2$	$43,9 \pm 5,1$
CD45R <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup>	$1,5 \pm 0,6$	$1,7 \pm 1,2$	$0,9 \pm 0,7$	$0,7 \pm 0,3$
CD11b <sup>+</sup>	$53,9 \pm 9,9^*$	$17,4 \pm 5,3$	$6,6 \pm 2,6$	$7,4 \pm 2,7$
CD45R <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup>	$22,5 \pm 3,7$	$75,2 \pm 12,6^*$	$42,4 \pm 1,1$	$63,7 \pm 4,1$
CD3 <sup>+</sup>	$4,5 \pm 2,1$	$4,5 \pm 1,8$	$20,3 \pm 3,4$	$26,7 \pm 6,2$
CD115 <sup>+</sup>	$5,2 \pm 2,3$	$5,3 \pm 3,1$	-	-

CD45R – biljeg B limfocita u razvoju; CD19 - biljeg B limfocita u razvoju; CD11b – biljeg monocitno-makrofagne populacije; CD115 – biljeg monocitno-makrofagne

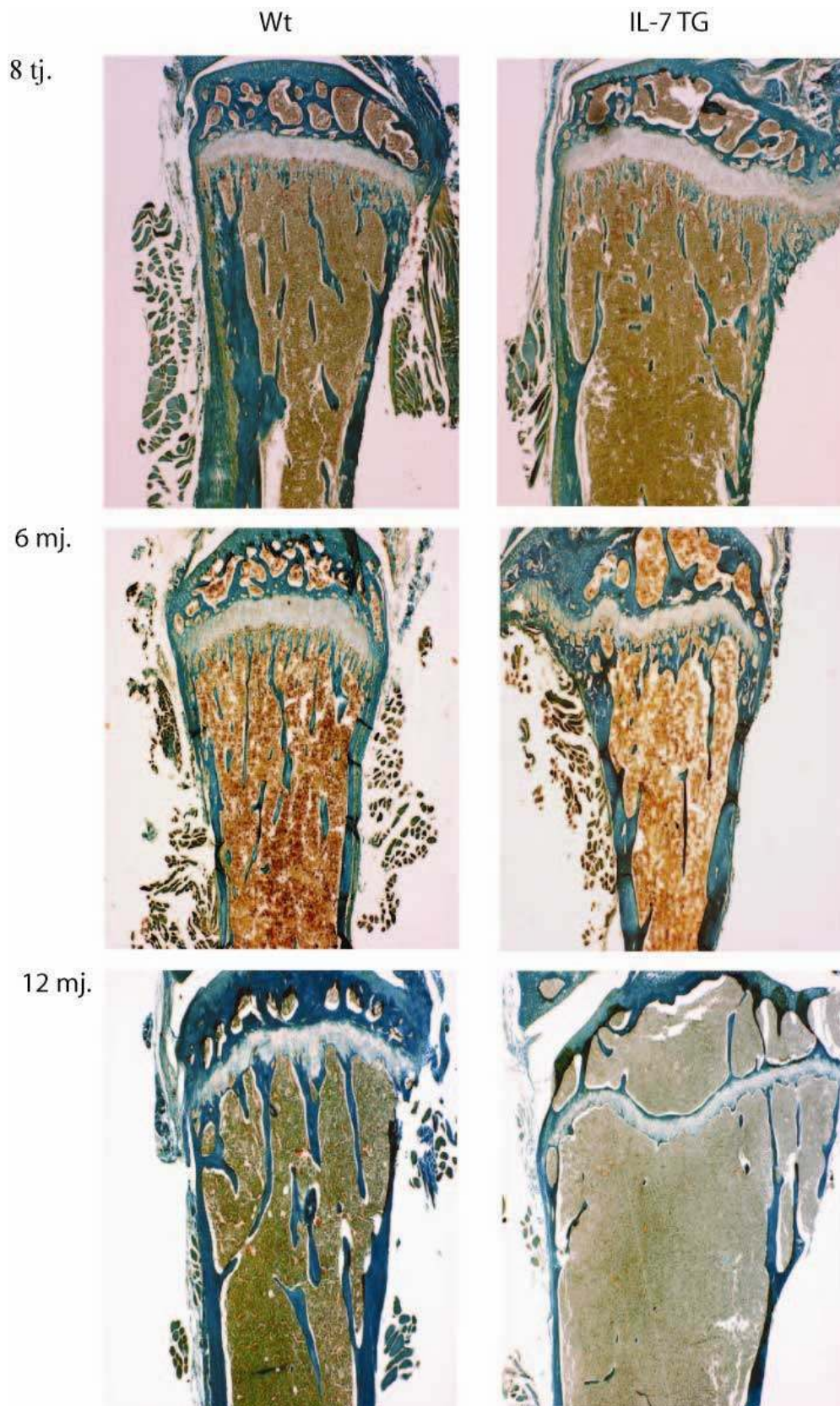
populacije, receptor za M-CSF; CD3 – biljeg limfocita T, povezan s T staničnim receptorom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija.

†  $p < 0,05$  Wt vs. IL-7 TG, ANOVA i Student-Newman-Keuls post hoc test

#### 4.2. U MIŠEVA S TRANSGENOM ZA IL-7 POVEĆANA JE KOŠTANA RESORPCIJA ŠTO DOVODI DO RAZVOJA OSTEOPENIJE *IN VIVO*

Miševi s transgenom za IL-7 starenjem razvijaju izraženu osteopeniju (Slika 12). Histomorfološki parametri koje smo koristili u analizi koštane mase bili su: volumen trabekularne kosti, broj trabekula, razdvojenost trabekula, širina trabekula i debljina epifizne ploče. U dugim kostima 12-mjesečnih transgenika uočili smo smanjeni broj trabekula uz smanjenje i njihove širine čemu je prethodio gubitak trabekularne kosti u kralješcima u dobi od 6 mjeseci (Tablica 2, Slika 12 i 13). Kao posljedica smanjenja broja trabekula i njihove širine, povećana je njihova međusobna razdvojenost, a time i prostor ispunjen stanicama koštane srži (Slika 13). Nadalje, uočili smo da je učinak povećanog izražaja IL-7 specifičan za trabekularnu kost budući da je rast kosti u području epifizne ploče, procjenjivan na osnovi njezine debljine, ostao nepromijenjen (Slika 12 i 13). Navedeni gubitak trabekularne kosti očito je posljedica povećane koštane razgradnje koja je rezultat povećanja broja aktivnih osteoklasta na području metafize i trabekula uočenog već u dobi od 6 mjeseci te njihovog kasnijeg povećanja na endostalnoj površini u dobi od 12 mjeseci (Tablica 2). Rezultati ukazuju na to da je pojačani izražaj IL-7 djelovao ciljano na resorpciju kosti *in vivo*, kao što je bio slučaj i u drugim *in vivo* modelima u kojima su miševi tretirani s IL-7, odnosno u IL-7R KO miševa (266). Izgradnja nove kosti nije se razlikovala u transgeničnih miševa u

odnosu na njihove kontrole ( $3,8 \pm 0,24$  IL-7 TG nasuprot  $3,04 \pm 0,55$   $\mu\text{m/d}$  u miševa divljeg tipa,  $p < 0,05$ , ANOVA i Student-Newman-Keuls post hoc test).



Slika 11. Goldnerovo trikromno bojenje goljeničnih kostiju ženki miševa s transgenom za IL-7 (IL-7 TG ) i miševa divljeg tipa (Wt): zeleno se boji mineralizirana kost. Smanjen trabekularni volumen u miševa s transgenom za IL-7 (IL-7 TG) uočen je u dobi od 6 mjeseci, a najizraženiji je bio u dobi od 12 mjeseci.

Tablica 2. Broj TRAP pozitivnih osteoklasta u goljeničnim kostima miševa s transgenom za IL-7 i miševa divljeg tipa odgovarajućeg spola i dobi.

Stanice	Miševi	Broj osteoklasta		
		8 tjedana	6 mjeseci	12 mjeseci
hondroklasti	Wt	0,0 ± 0,0	2,6 ± 1,5	0,0 ± 0,0
	IL-7 TG	0,0 ± 0,0	2,9 ± 0,9	0,0 ± 0,0
metafizealni osteoklasti	Wt	3,3 ± 1,4	10,8 ± 4,7	28,0 ± 2,6
	IL-7 TG	3,7 ± 1,3	19,9 ± 6,4*	70,7 ± 20,2*
trabekularni osteoklasti	Wt	2,2 ± 0,7	1,4 ± 0,8	6,3 ± 4,8
	IL-7 TG	2,4 ± 1,3	6,3 ± 2,3*	16,3 ± 6,3*
subendostealni osteoklasti	Wt	0,3 ± 0,1	0,9 ± 0,7	23,7 ± 7,4
	IL-7 TG	0,2 ± 0,1	2,7 ± 2,0	51,3 ± 15,9*
ukupan broj osteoklasta	Wt	5,8 ± 1,9	15,4 ± 3,3	58,0 ± 7,6
	IL-7 TG	6,4 ± 0,5	31,8 ± 3,01*	138,3 ± 52,4*

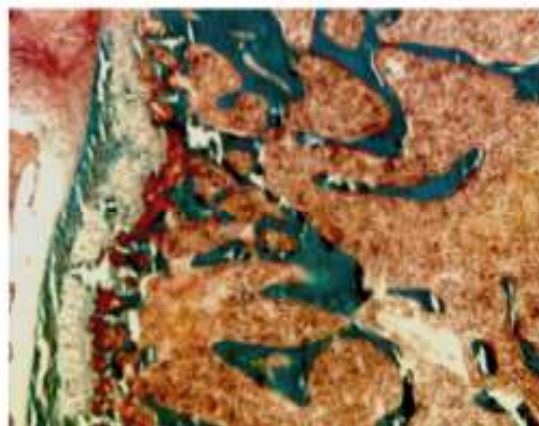
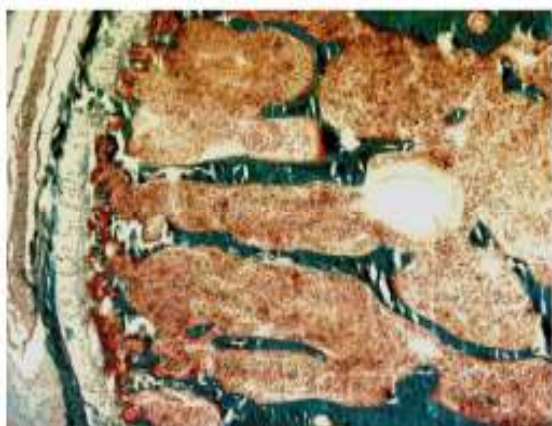
Serijski rezovi goljeničnih kostiju miševa s transgenom za IL7 (IL-7 TG) i miševa divljeg tipa odgovarajućeg spola i dobi (Wt) bojeni su na TRAP nakon čega su brojeni osteoklasti na različitim dijelovima kosti. Broj osteoklasta izražen je po mm duljine kosti i prikazan kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Analizirana su 4 serijska reza za svaku goljeničnu kost (n=6♀). Prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa.

\* p<0,05 vs.Wt, ANOVA i Student-Newman-Keuls post hoc test.

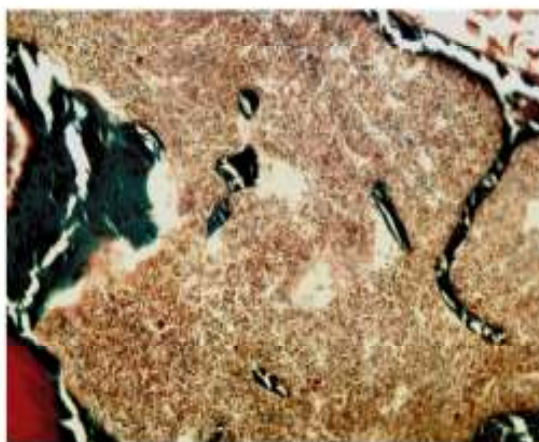
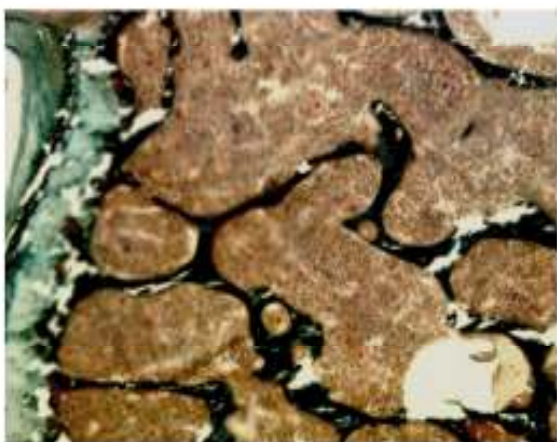
Wt

IL-7 TG

8 tj



6 mj



12 mj





Slika 12: Goldnerovo trikromno bojenje kralježaka ženki miševa s transgenom za IL-7 (IL-7 TG) i miševa divljeg tipa (Wt): zeleno se boji mineralizirana kost. Znatno smanjenje trabekularnog volumena kralježaka u miševa s transgenom za IL-7 (IL-7 TG) uočeno je već u dobi od 6 mjeseci.

#### 4.3. MIŠEVI S TRANSGENOM ZA IL-7 IMAJU POVEĆAN OSTEOKLASTIČNI POTENCIJAL KOJI NE PRATI PROMJENA OSTEOBLASTIČNOG POTENCIJALA KOŠTANE SRŽI

Gubitak kosti *in vivo* može biti posljedica promjene osteoklastne loze, tj. broja i aktivnosti osteoklasta, ali i smanjenja broja i aktivnosti osteoblasta ili pak poremećaja međusobne ravnoteže osteoklasta i osteoblasta (155, 158, 267). Vođeni tom mišlju, ispitivali smo osteoklastogenični i osteoblastogenični potencijal koštane srži transgenih miševa, na način i u uvjetima prethodno opisanim u metodama.

U dobi od 8 mjeseci, neadherirane stanice koštane srži transgeničnih miševa i miševa divljeg tipa stvarale su jednak broj osteoklasta u *ex vivo* kulturama (Tablica 3). U dobi od 6 i 12 mjeseci u kulturama stanica koštane srži transgeničnih miševa bilo je značajno više osteoklasta (Tablica 3). U svim staničnim kulturama osteoklasti su bili funkcionalni i stvarali resorpcijske jamice na koštanim diskovima (Slika 15).

Osteoblastogenični potencijal stanica koštane srži, koji smo određivali prema broju kolonija pozitivnih na alkalnu fosfatazu (Slika 14), bio je jednak u obje ispitivane skupine. Kolonije stanica sačinjavali su većinom fibroblasti, što smo utvrdili bojenjem metilenskim modrilom, dok smo Von Kossa bojenjem pokazali njihov podjednak mineralizirajući potencijal (Slika 14). Izostanak učinka IL-7 na diferencijaciju osteoblasta suprotan je nalazima u drugim modelima, npr. modelu kalvarijskih kultura i inhibicije stvaranja nove kosti u istima pod utjecajem IL-7

(158). Nepromijenjen osteoblastogenični potencijal koštane srži transgeničnih miševa ukazuje na činjenicu da je povećana ekspresija IL-7 u MHC II pozitivnim stanicama *in vivo* usmjerena na osteoklastne stanice preteče, što je u skladu s prijašnjim *in vitro* dokazima o povećanju broja mijeloidnih stanica preteča pod utjecajem IL-7 primjenjenog u kombinaciji s drugim čimbenicima rasta kolonija (160).

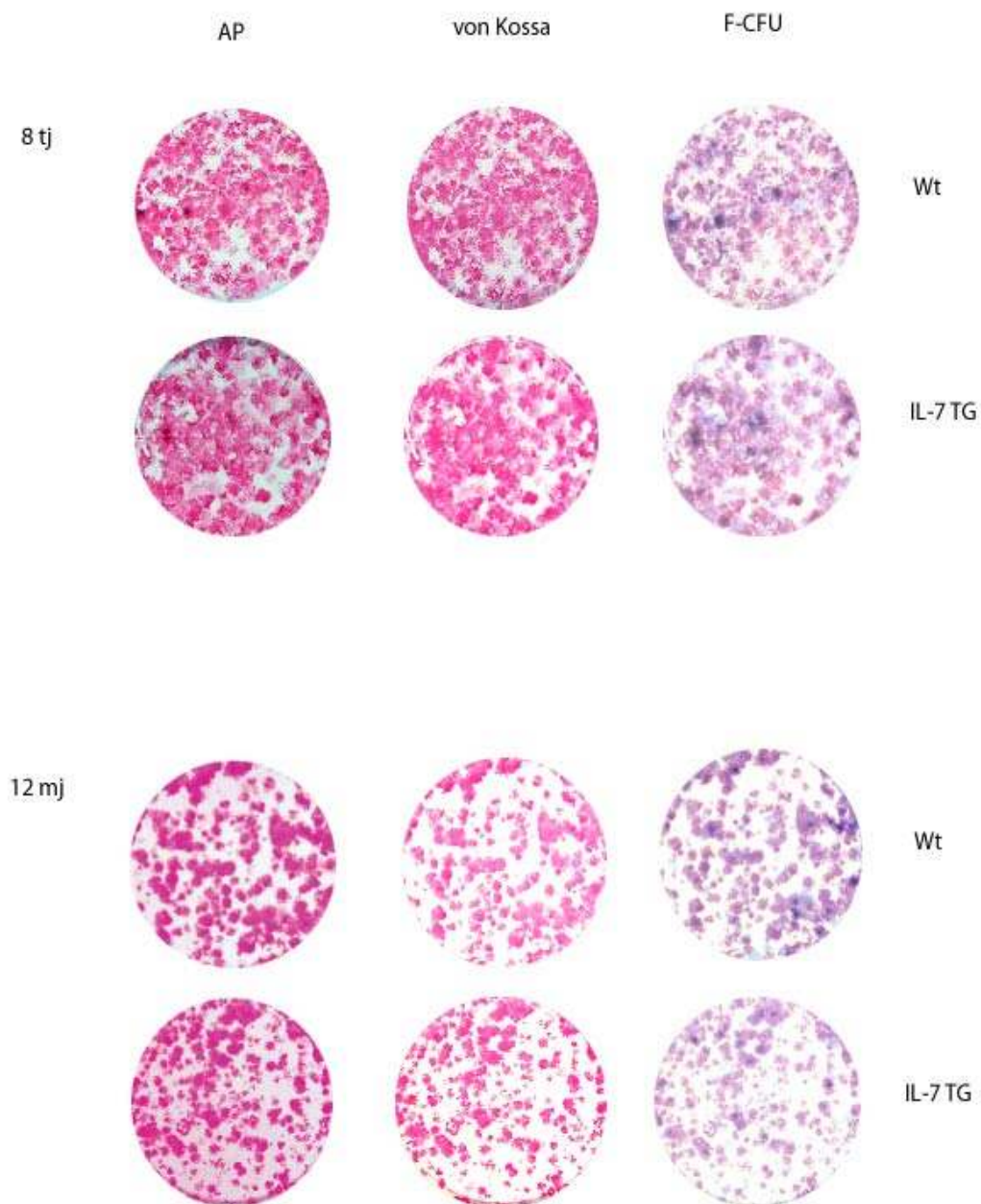
Stvaranje osteoklasta u kulturama monocita iz periferne krvi također je bilo povećano u 12-mjesečnih transgenika ( $262 \pm 23,4$  IL-7 TG nasuprot  $141,1 \pm 31,2$  OCL/jožici u miševa divljeg tipa,  $p < 0,05$ , ANOVA i Student-Newman-Keuls post hoc test).

Tablica 3. Osteoklastni i osteoblastni potencijal koštane srži miševa s transgenom za IL-7 i miševa divljeg tipa odgovarajuće dobi i spola.

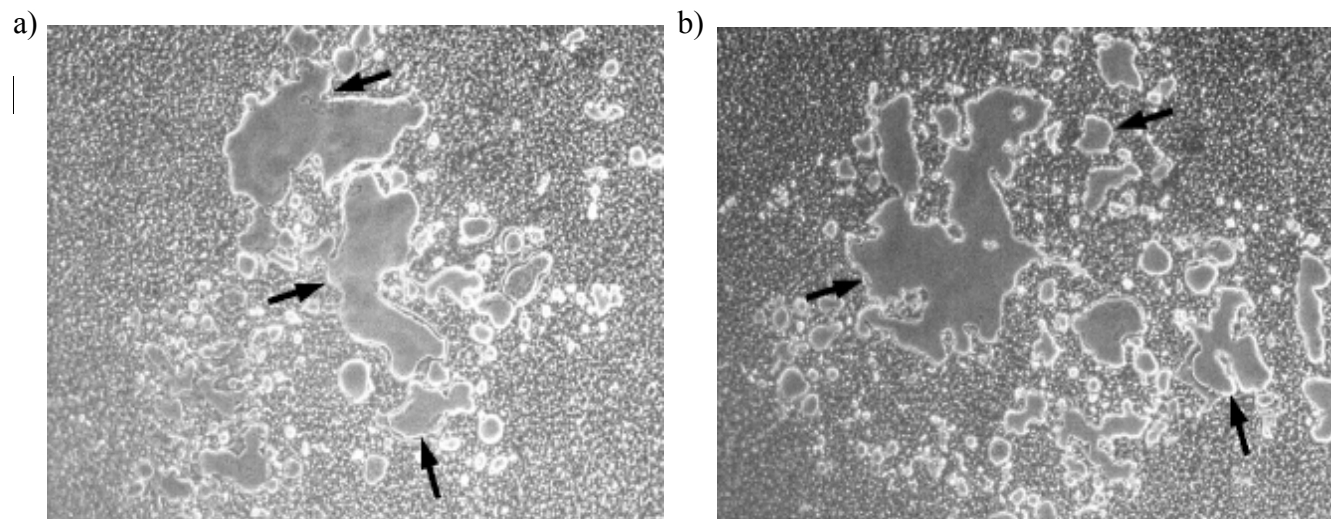
Dob	Broj osteoklasta		Broj osteoblastnih kolonija	
	Wt	IL-7 TG	Wt	IL-7 TG
8 tjedana	$194,7 \pm 45,9$	$196,3 \pm 36,7$	$49,3 \pm 2,8$	$48,7 \pm 3,8$
6 mjeseci	$267,0 \pm 31,0$	$457,0 \pm 50,3^*$	$60,3 \pm 1,1$	$50,0 \pm 5,8$
12 mjeseci	$199,5 \pm 15,2$	$428,7 \pm 48,7^*$	$79,0 \pm 3,6$	$84,0 \pm 2,6$

Za razvoj osteoklasta stanice koštane srži posađene su u pločice s 48 jažica u gustoći od  $0,5 \times 10^6$  stanica u 0,5 ml po jažici, 6 jažica po skupini, i uzgajane u  $\alpha$ -MEM/10%FBS mediju s dodatkom 10 ng/ml rmM-CSF i 20 ng/ml rmRANKL. Nakon 6 dana, stanice su obojene na TRAP te su TRAP pozitivne stanice s tri ili više jezgara brojene kao osteoklasti. Za razvoj osteoblasta stanice koštane srži posađene su u pločice sa 6 jažica u gustoći od  $7 \times 10^6$  stanica u 3 ml po jažici, 3 jažice po skupini, i uzgajane u  $\alpha$ -MEM/10%FBS mediju s dodatkom 8 mM  $\beta$ -glicerofosfata, 50  $\mu$ g/ml

askorbinske kiseline i  $10^{-8}$ M deksametazona. Nakon 11 dana, stanice su bojene na AP te su AP pozitivne kolonije brojene kao osteoblastne. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. Skraćenice: Wt, miševi divljeg tipa; IL-7 TG, miševi s transgenom za IL-7 (n=6♀). \* p<0,05 vs Wt, ANOVA i Student-Newman-Keuls post hoc test.



Slika 13. Nepromijenjen osteoblastogenetski potencijal stanica koštane srži miševa s transgenom za IL-7 (IL-7 TG). Osteoblastogenetski potencijal stanica određen je brojem kolonija pozitivnih na alkalnu fosfatazu (AP), bojenje metilenskim modrilom (F-CFU) potvrdilo je da kolonije sačinjavaju fibroblasti, a Von Kossa bojenje pokazalo njihov mineralizirajući potencijal. Wt – osteoblastne kulture stanica koštane srži miševa divljeg tipa. 8 tj – miševi stari 8 tjedana, 12 mj – miševi stari 12 mjeseci.

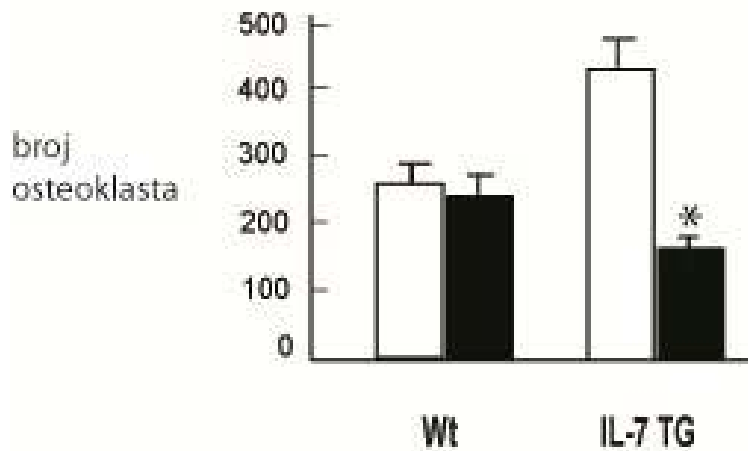


Slika 14. Provjera funkcionalnosti osteoklasta. Aktivni osteoklasti stvaraju resorpcijske jamice na sterilnim koštanim diskovima koje se svjetlosnim mikroskopom prikazuju kao tamne mrlje (strelice). a) Wt – miševi divljeg tipa, b) IL-7TG – miševi s transgenom za IL-7.

#### 4.4. CD45<sup>+</sup> STANICE PRIDONOSE OSTEOKLASTOGENEZI U MIŠEVA S TRANSGENOM ZA IL-7 KAO POTENCIJALNE OSTEOKLASTNE STANICE PRETEČE

Povećan udio CD45R<sup>+</sup> stanica u koštanoj srži glavno je obilježje imunološkog fenotipa miševa s transgenom za IL-7 (243). Prema nekim istraživanjima, CD45R<sup>+</sup> stanice mogu *in vitro* diferencirati u osteoklaste (161, 162). Kako bismo proučili doprinos povećanog udjela CD45R<sup>+</sup> stanica povećanju osteoklastogeničnog potencijala stanica koštane srži transgenih miševa, uzgajali smo kulture CD45R<sup>+</sup> stanica koje su prethodno izdvojene iz koštane srži kao što je opisano u Metodama. CD45R<sup>+</sup> stanice iz koštane srži transgeničnih miševa i miševa divljeg tipa imale su podjednak osteoklastogenični potencijal ( $86,5 \pm 18,7$  u IL-7 TG miševa nasuprot  $74,5 \pm 10,2$  OCL/jožici u miševa divljeg tipa,  $p=0,1919$ , ANOVA i Student-Newman-Keuls post hoc test).

Nadalje, uzgajali smo kulture stanica pune koštane srži usporedno s kulturama stanica koštane srži iz koje je prethodno odstranjena CD45R<sup>+</sup> populacija stanica, koristeći naravno iste uvjete kulture opisane u Metodama. U miševa divljeg tipa, uklanjanje CD45R<sup>+</sup> stanica iz koštane srži nije utjecalo na diferencijaciju osteoklasta u kulturi, dok je broj osteoklasta u kulturi stanica koštane srži transgeničnih miševa u istim uvjetima bio za 60% manji (Slika 16), što govori u prilog tvrdnji da povećani udio CD45R<sup>+</sup> populacije pridonosi povećanju osteoklastogeneze u miševa s transgenom za IL-7. Međutim, kako u takvim uvjetima kulture mogućnost kontaminacije malim brojem CD45R<sup>-</sup> stanica ne može sa 100% sigurnošću biti isključena (247), pretpostavljamo da sama promjena diferencijacijskog udjela CD45R<sup>+</sup> populacije stanica nema dovoljan utjecaj na povećanje osteoklastogeneze u miševa s transgenom za IL-7, nego su presudne njene interakcije s CD45R<sup>-</sup> mikrookolišem.

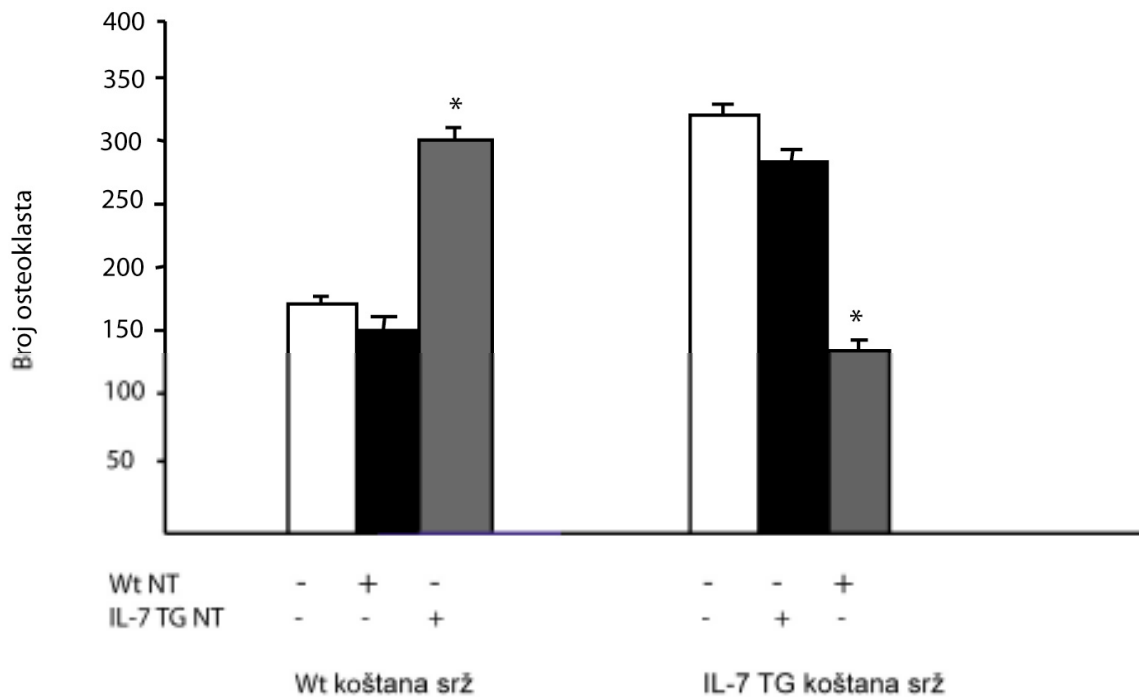


Slika 15. Stvaranje osteoklasta u kulturama stanica pune koštane srži i koštane srži iz koje je odstranjena CD45R<sup>+</sup> populacija miševa divljeg tipa i miševa s transgenom za IL-7. Odstranjenje CD45R<sup>+</sup> populacije iz koštane srži transgeničnih životinja značajno smanjuje broj osteoklasta u kulturi. ANOVA i Student-Newman-Keuls post hoc test.  $p < 0,05$ .  $n = 6♀$ . Otvoreni stupci: puna srž, tamni stupci: srž bez CD45R<sup>+</sup> populacije. IL-7TG – miševi s transgenom za IL-7, Wt – miševi divljeg tipa.

#### 4.5. U MIŠEVA S TRANSGENOM ZA IL-7 MIKROOKOLIŠ U KOŠTANOJ SRŽI OMOGUĆUJE OSTEOKLASTOGENEZU IZ CD45R<sup>+</sup> STANICA

Vođeni pretpostavkom o važnosti mikrookoliša pokušali smo istražiti postoji li u uvjetima povećanog izražaja IL-7 neki specifični humoralni čimbenik (161) koji usmjerava stanice prema osteoklastnoj lozi. S tom idejom, dodavali smo nadtalog transgeničnih ili kontrolnih 6-dnevnih osteoklastnih kultura kulturama stanica koštane srži uzgajanih u uvjetima pogodnim za razvoj osteoklasta, kao što je prethodno opisano u Metodama, i to 1. i 3. dan, u omjeru 4:1. Nadtalog transgeničnih kultura stimulirao je stvaranje osteoklasta ( $167,4 \pm 26,8$  OCL/jožici u kulturama stanica

miševa divljeg tipa bez dodavanja nadtaloga;  $319,2 \pm 39,3$  OCL/jožici u kulturama stanica transgeničnih miševa bez dodavanja nadtaloga;  $280,2 \pm 13,7$  OCL/jožici u kulturama stanica transgeničnih miševa s dodanim nadtalogom kontrolnih osteoklastnih kultura;  $309,0 \pm 30,8$  OCL/jožici u kulturama stanica miševa divljeg tipa s dodanim nadtalogom transgeničnih osteoklastnih kultura,  $p < 0,05$ , ANOVA i Student-Newman-Keuls post hoc test; Slika 17). Ovi rezultati ukazuju na postojanje topljivog čimbenika u nadtalogu transgeničnih osteoklastnih kultura koji, pretpostavljamo, potiče osteoklastogenezu. Dodavanje IL-7 protutijela u koncentracijama koje, prema prethodno objavljenim istraživanjima, u potpunosti inhibiraju aktivnost IL-7 (157) nije neutraliziralo učinak prijenosa nadtaloga ( $230,3 \pm 15,2$  OCL/jožici u kulturama stanica miševa divljeg tipa,  $387,3 \pm 21,3$  OCL/jožici u kulturama stanica miševa divljeg tipa s 25% nadtaloga iz transgeničnih osteoklastnih kultura i  $386,3 \pm 37,2$  OCL/jožici u kulturama stanica miševa divljeg tipa s 25% nadtaloga iz transgeničnih osteoklastnih kultura i 2  $\mu\text{g/mL}$  IL-7 antitijela,  $p < 0,05$ , ANOVA i Student-Newman-Keuls post hoc test). Ovi rezultati pokazuju da IL-7 nije jedini posrednik povećane osteoklastogeneze u miševa s transgenom za IL-7, već da je nužna njegova interakcija s mikrookolišem unutar koštane srži. To je u skladu s prijašnjim nalazima o različitim učincima IL-7 ovisno o tome je li primjenjen sistemski ili lokalno (149).



Slika 16. Dodavanje nadtaloga osteoklastnih kultura stanica koštane srži miševa s transgenom za IL-7 (IL-7 TG NT) kulturama stanica koštane srži miševa divljeg tipa potiče stvaranje osteoklasta. Stvaranje osteoklasta u kulturi stanica koštane srži miševa divljeg tipa (Wt koštana srž) uzgajanih u  $\alpha$ -MEM/10% FBS mediju s rmM-CSF i rmRANKL (-) i u  $\alpha$ -MEM/10% FBS mediju s rmM-CSF i rmRANKL obogaćenom nadtalogom iz osteoklastnih kultura miševa s transgenom za IL-7 (IL-7 TG NT+) ili miševa divljeg tipa (Wt NT+) i u kulturi stanica koštane srži miševa s transgenom za IL-7 (IL-7 TG koštana srž) u  $\alpha$ -MEM/10%FBS mediju s rmM-CSF i rmRANKL (-) ili u  $\alpha$ -MEM/10% FBS mediju s rmM-CSF i rmRANKL obogaćenom nadtalogom iz osteoklastnih kultura stanica koštane srži miševa divljeg tipa (Wt NT+) ili miševa s transgenom za IL-7 (IL-7 TG NT+)

\* statistički značajna razlika (ANOVA i Student-Newman-Keuls post hoc test.

$p < 0,05$ )

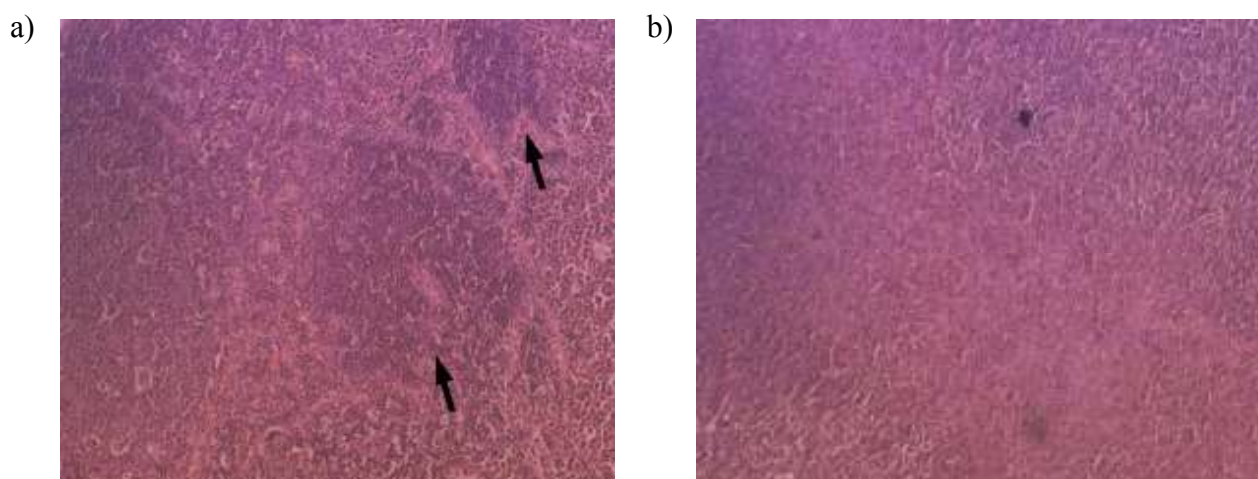


#### 4.6. MIŠEVI S TRANSGENOM ZA IL-7 IMAJU PROMIENJENU HISTOLOŠKU GRAĐU LIMFATIČNIH ORGANA

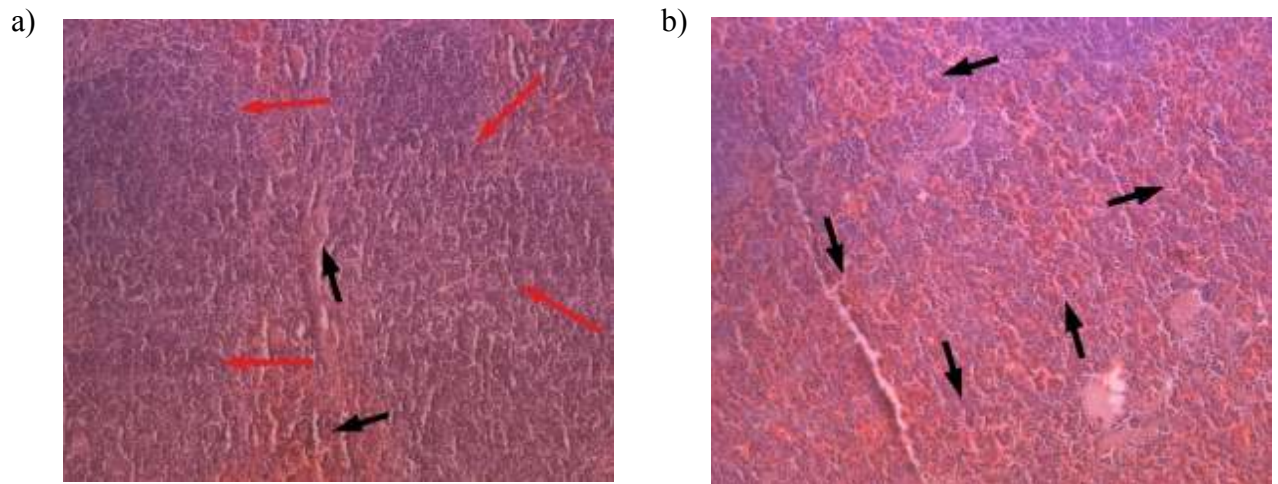
Pri žrtvovanju životinja uočili smo povećanje prsne žlijezde, limfnih čvorova i slezene u 6 i 12-mjesečnih transgeničnih miševa pa smo te organe i histološki analizirali.

Osim vidljivih makroskopskih promjena, našli smo promjene i u mikroarhitekturi.

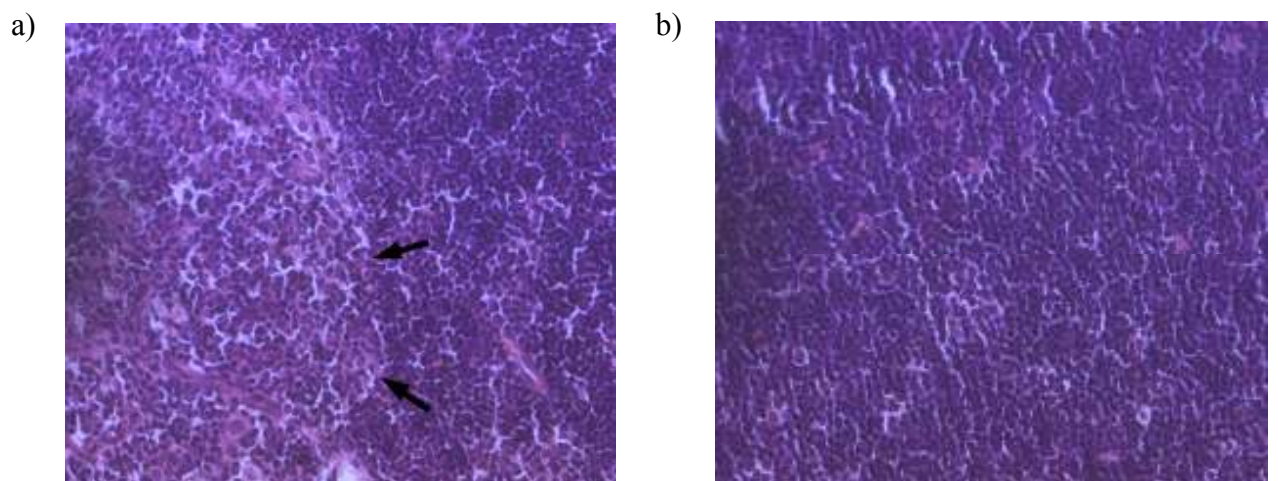
Prsna žlijezda bila je puna sitnih stanica s tamnom jezgrom i oskudnom citoplazmom koje odgovaraju nezrelim limfocitima (Slika 20). Unutar limfnih čvorova nije bilo uobičajene prepoznatljive građe folikula, niti je u slezeni bilo moguće razlikovati bijelu i crvenu pulpu, već su organi bili u potpunosti infiltrirani nezrelim limfocitima (Slika 17 i 18).



Slika 17. Tkivo limfnog čvora (HE bojenje): a) miša divljeg tipa i b) IL-7 TG miša. U miša divljeg tipa vidljiva je normalna građa limfnog čvora s folikulima (strelice), dok je u IL-7 TG miša tkivo limfnog čvora prožeto nezrelim limfocitima (sitne stanice s tamnom jezgrom i oskudnom citoplazmom), bez prepoznatljive građe folikula.



Slika 18. Tkivo slezene (HE bojenje): a) miša divljeg tipa i b) IL-7 TG miša. U miša divljeg tipa uočavamo normalnu histološku građu slezena: crvenu (crvene strelice) i bijelu pulpu (crne strelice), dok je u IL-7 TG miša tkivo slezene prožeto nezrelim limfocitima (sitne stanice s tamnom jezgrom i oskudnom citoplazmom) koje proširuju sinusoidalne prostore bijele pulpe (crne strelice) i tako potiskuju crvenu pulpu.



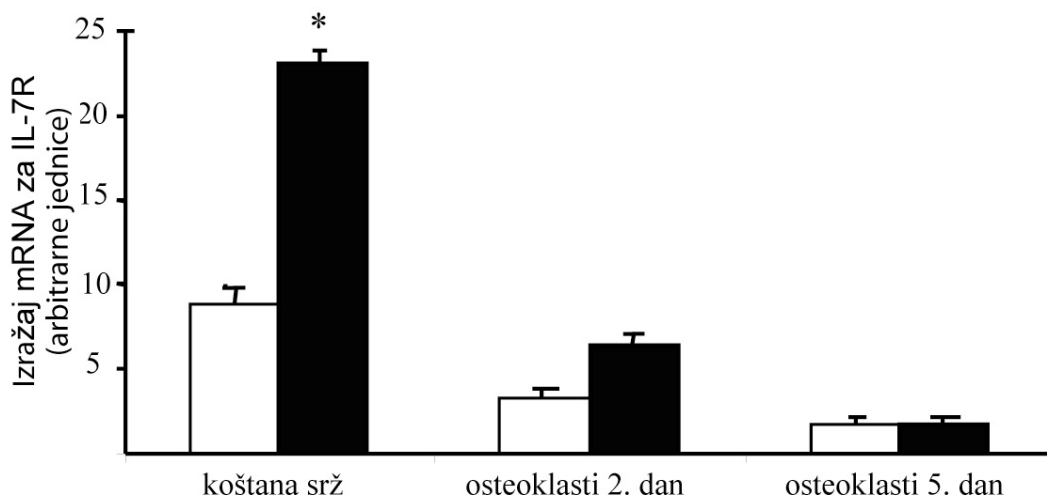
Slika 19. Tkivo prsne žlijezde (HE bojenje): a) miša divljeg tipa i b) IL-7 TG miša. U miša divljeg tipa vidljiva je normalna histološka građa pri kojoj razlikujemo koru

(tamnije obojeno) i srž (strelice) i normalna limfocitna celularnost dok je tkivo prsne žlijezde u IL-7 TG miša potpuno infiltrirano nezrelim limfocitima.

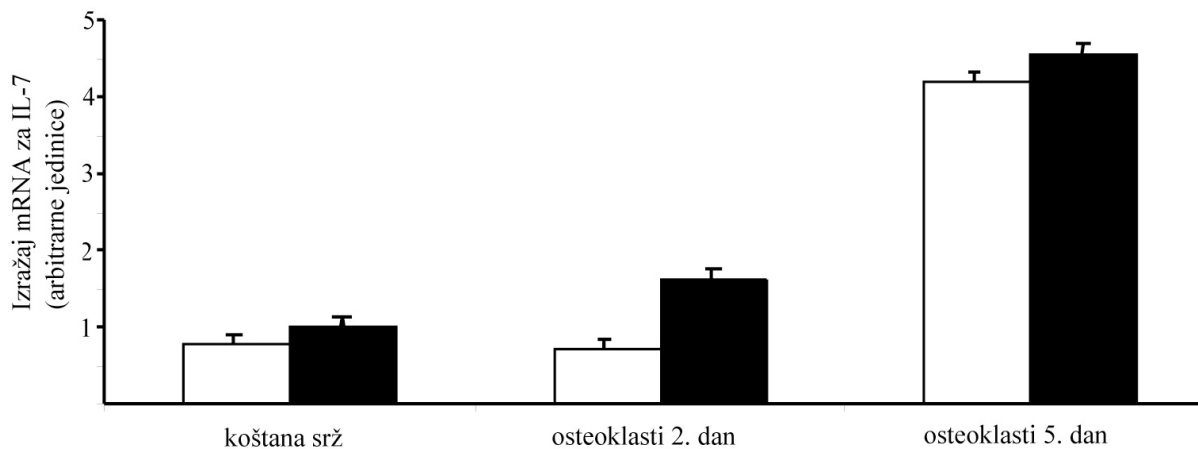
#### 4.7. PROMJENA OBRASCA IZRAŽAJA GENA U MIŠEVA S TRANSGENOM ZA IL-7

Kako bismo utvrdili prate li koštani fenotip promjenama u izražaju gena, kvantificirali smo izražaj gena specifičnih za osteoklaste i osteoblaste metodom kvantitativnog PCR-a. Izražaj osteoblastnih gena mjeren je 0, 7, 14. i 17. dan kulture, a osteoklastnih gena 0, 3. i 5. dan kulture stanica pune koštane srži te 0. i 2. dan kultura razdvojenih CD45R<sup>+</sup> i CD45R<sup>-</sup> populacija. Mjeren je izražaj sljedećih gena: alkalne fosfataze (Akp2) i kolagen transkripcijskog faktora (Runx2) kao molekularnih biljega ranog stadija diferencijacije osteoblasta (268, 269), osteokalcina (OC) kao molekularnog biljega kasnog stadija diferencijacije osteoblasta (270), RANKL-a i OPG-a kao biljega regulacije pregradnje kosti (114), c-Fms-a i RANK-a koji su izraženi na osteoklastnim stanicama pretečama (113, 114) i kalcitoninskog receptora (CTR) kojeg izražavaju zreli osteoklasti (271). Izražaj IL-7 i IL-7R dodatno je mjeren na izdvojenim CD45R<sup>+</sup> i CD45R<sup>-</sup> populacijama. Izražaj IL-7R mRNA bio je povećan u ranim osteoklastnim kulturama transgeničnih miševa (0-ti dan IL-7R RNA kvantitativno  $23,0 \pm 1,3$  nasuprot  $8,8 \pm 0,9$  u kulturama stanica miševa divljeg tipa – Slika 20), što se može tumačiti povećanom osjetljivošću osteoklastnih stanica preteča iz srži transgeničnih miševa na IL-7 koja rezultira njihovom vjerojatno većom sposobnošću diferencijacije prema osteoklastnoj lozi. Potvrda ovim nalazima su studije koje pokazuju da IL-7 *in vitro* potiče diferencijaciju osteoklasta iz stanica koje se nalaze na površini kosti povećavajući zalihu osteoklastnih stanica preteča (149) kao i diferencijaciju osteoklasta iz matičnih stanica periferne krvi u ljudi putem povećanja

proizvodnje osteoklastogeničnih čimbenika od strane limfocita T (149, 161). Izražaj IL-7 mRNA povećavao se usporedno s povećanjem diferencijacije osteoklasta (mRNA kvantitativno 0-ti dan:  $0,99 \pm 0,2$ , 2. dan:  $1,61 \pm 0,7$ , 5. dan:  $4,53 \pm 0,9$  – Slika 21).



Slika 20. Izražaj mRNA za IL-7R u osteoklastnim staničnim kulturama miševa s transgenom za IL-7 i miševa divljeg tipa. Izražaj IL-7R mRNA povećan je u ranim osteoklastnim kulturama transgeničnih miševa u odnosu na miševe divljeg tipa.  $p < 0,05$ , ANOVA i Student-Newman-Keuls post hoc test.  $n=6$ ♀. Otvoreni stupci: miševi divljeg tipa, tamni stupci: miševi s transgenom za IL-7.



Slika 21. Izražaj mRNA za IL-7 u osteoklastnim staničnim kulturama miševa s transgenom za IL-7 i miševa divljeg tipa. Izražaj IL-7 mRNA povećava se usporedno s povećanjem diferencijacije osteoklasta.  $p < 0,05$ , ANOVA i Student-Newman-Keuls post hoc test.  $n=6♀$ . Otvoreni stupci: miševi divljeg tipa, tamni stupci: miševi s transgenom za IL-7.

## 5. RASPRAVA

### 5.1. MIŠEVI S TRANSGENOM ZA IL-7 OSIM IMUNOLOŠKOG IMAJU I

#### KOŠTANI FENOTIP

Naše istraživanje pokazalo je da sustavno povećan izražaj IL-7, vezan za izražaj MHC II molekula, ne uzrokuje samo nakupljanje nezrelih B stanica u različitim stadijima razvoja, nego i povećanu diferencijaciju osteoklasta te posljedični gubitak trabekularne kosti *in vivo*. Broj trabekula i njihova širina bili su smanjeni, a šupljina koštane srži povećana. Nadalje, gubitak kosti pokazao se specifičnim za trabekularnu kost, budući da je epifizna ploča rasta ostala nepromijenjena. Taj je gubitak posljedica

povećanog broja osteoklasta na trabekularnim i endostalnim površinama. Naši rezultati upućuju na to da je pojačan izražaj IL-7 djelovao prvenstveno na resorpciju kosti *in vivo*, bez obzira na uzrok pojačanog izražaja IL-7, budući da promjene uočene pri pojačanom izražaju IL-7 u MHC II pozitivnim stanicama odgovaraju onima u drugim *in vivo* modelima, kao što je npr. primjena IL-7 u normalnih miševa ili u IL-7R KO miševa (252).

## 5.2. U MIŠEVA S TRANSGENOM ZA IL-7 POVEĆANA JE

### OSTEOKLASTOGENEZA IN VITRO

Povećana osteoklastogeneza, kao direktni uzrok gubitka kosti, potvrđena je pokusom pri kojem stanice koštane srži transgeničnih miševa stvaraju više funkcionalnih osteoklasta *in vitro* nego koštana srž miševa divljeg tipa odgovarajućeg spola i dobi. Promjene osteoklastogenetskog potencijala ovise o dobi, budući da je povećana osteoklastogeneza bila uočljiva tek u 6-mjesečnih životinja, a potpuno izraženi koštani fenotip životinje su imale tek u dobi od 12 mjeseci.

Gubitak kosti često je uzrokovan poremećajem ravnoteže između stvaranja i razgradnje kosti, međutim povećan izražaj IL-7 u MHC II pozitivnim stanicama nije utjecao na diferencijaciju osteoblasta, što je suprotno nalazima na drugim modelima povećanog izražaja IL-7, kao što je npr. stvaranje nove kosti potaknuto s IL-7 u neonatalnim kulturama kalvarijskih stanica (158). Nepromijenjen osteoblastogenični potencijal koštane srži u našem modelu upućuje na to da je pojačan izražaj IL-7 usmjeren *in vivo* na osteoklastne stanice preteče što je pak u skladu s *in vitro* dokazima o povećanju broja stanica preteča mijeloidne linije u kulturama stanica tretiranim kombinacijom IL-7 i drugih čimbenika poticanja rasta kolonija (250). Naši rezultati pokazuju da se izražaj IL-7R mRNA povećava rano u osteoklastnim kulturama transgeničnih miševa (0.dan IL-7R RNA kvantitativno  $23,0 \pm 4,3$  nasuprot

8,8 ± 2,9 u divljeg tipa), što znači da su osteoklastne stanice preteče iz transgenične koštane srži osjetljivije na IL-7 te je moguće da imaju veću sposobnost diferenciranja prema osteoklastnoj lozi. U prilog toj teoriji idu studije kojima je pokazano da IL-7 stimulira u štakora *in vitro* diferencijaciju osteoklasta iz stanica koje se nalaze na površini kosti povećavajući broj osteoklastnih stanica preteča (247), kao i diferencijaciju osteoklasta iz matičnih stanica periferne krvi u ljudi potičući T limfocite na izlučivanje čimbenika koji potiču osteoklastogenezu (162, 247).

### 5.3. MIKROOKOLIŠ IMA VAŽNU ULOGU U NASTANKU KOŠTANOG FENOTIPA

Povećenje zalihe („poola”) osteoklastnih stanica preteča vjerojatno nije jedini mehanizam kojim povećani izražaj IL-7 utječe na koštanu srž, budući da smo porast osteoklastogeneze uspjeli „prenijeti“ *in vitro* humoralnim čimbenicima iz transgeničnih kultura. Nadalje, nemogućnost poništavanja učinka prijenosa nadtaloga specifičnim IL-7 protutijelom ukazuje na to da IL-7 nije jedini posrednik povećane osteoklastogeneze u miševa s transgenom za IL-7, već je ona vjerojatno posljedica njegovih interakcija s cijelim mikrookolišem u koštanoj srži. Ta je pretpostavka u skladu s razmišljanjima da učinak IL-7 na koštane stanice ovisi o tome djeluje li on sistemski ili lokalno (247).

Mikrookoliš u koštanoj srži ima ključnu ulogu u hematopoezi, osobito za limfocite B (272). Pretpostavljamo da povećani izražaj IL-7 mijenja mikrookoliš na taj način da on postaje poticajan za diferencijaciju CD45R<sup>+</sup> stanica u osteoklaste, ali i time što potiče izlučivanje još neidentificiranog osteoklastogeničnog čimbenika u CD45R<sup>-</sup> populaciji. Poznato je da IL-7 potiče izlučivanje citokina iz stanica strome koštane srži koje izražavaju IL-7R (272). Jedan od važnih citokina u okruženju bogatom IL-7 kojeg smo razmatrali kao mogućeg „poticajnog čimbenika” mogao bi biti RANKL,

inače ključni osteoklastogenični čimbenik koji se veže na svoj receptor RANK na osteoklastnim stanicama pretečama (155) i koji u kombinaciji s IL-7 može potaknuti proliferaciju CD45R<sup>+</sup> stanica (273). RANKL, čija koncentracija raste poticanjem limfocita T pomoću IL-7 (155), u miševa tretiranih s IL-7 posreduje u koštanoj razgradnji zajedno s TNF- $\alpha$  (162). Međutim, budući da smo prema od prije uhodanim metodama uzgoja osteoklastnih kultura u kulture stanica koštane srži dodavali topljivi RANKL i M-CSF, doprinos povećanog izražaja RANKL-a u stromalnim stanicama ili limfocitima T nismo mogli procijeniti.

Naše istraživanje pokazalo je kako sustavan *in vivo* pojačani izražaj IL-7, osim proliferacije limfocita B uzrokuje i povećanu diferencijaciju osteoklasta i posljedični gubitak kosti koji specifično zahvaća trabekularnu kost. Šupljina koštane srži bila je proširena zbog smanjenja broja i širine trabekula. Transgenični miševi korišteni u našem istraživanju izražavaju IL-7 pod kontrolom E $\alpha$  promotora koji pripada skupini MHC II promotora. Na taj način IL-7 postaje sastavnica svih stanica koje izražavaju MHC II molekulu, uključujući makrofage, pre-B stanice i limfocite B (149).

Detaljnije morfolometrijsko proučavanje transgenične linije pokazalo je povećani broj osteoklasta na serijskim rezovima tibija obojenih TRAP-om te stvaranje subendostalnog sloja osteoklasta. Iz stanica koštane srži miševa s transgenom za IL-7 u kulturama je nastalo više TRAP pozitivnih osteoklasta nego iz stanica koštane srži kontrolnih miševa odgovarajuće dobi i spola. Osteoklasti su stvarali resorpcijske jamice na koštanim diskovima što je potvrda njihove funkcionalnosti. Promjene osteoklastogeničnog potencijala su barem djelomično vezane za starosnu dob životinja budući da povećana osteoklastogeneza nije bila prisutna u 8 tjedana starih miševa, a tek su 12-mjesečne životinje imale potpuno razvijen koštani fenotip. Nije bilo razlike u osteoblastogenezi. Budući da proces pregradnje kosti ovisi o međudjelovanju



osteoblasta i osteoklasta (267), koštani fenotip mogao bi biti posljedica neravnoteže u njihovom međuovisnom djelovanju prouzročene povećanim brojem osteoklasta s jedne strane te nepromijenjenim brojem osteoblasta s druge strane. Različit utjecaj IL-7 na te dvije linije mogao bi biti posljedica razlike u njihovom porijeklu: osteoklasti nastaju iz zajedničke mijeloidne stanice preteče, a osteoblasti su mezenhimalnog porijekla. Iako sama mijeloidna stanica preteča ne izražava IL-7R, *in vitro* je dokazano da IL-7 u kombinaciji s drugim čimbenicima poticanja rasta kolnija povećava broj stanica preteča u mijeloidnoj liniji (160). Također, pokazano je da primjena rekombinantnog IL-7 uzrokuje porast nezrelih mijeloidnih stanica u miševa (63).

#### 5.4. MEĐUDJELOVANJE CD45R<sup>+</sup> STANICA I MIKROOKOLIŠA NUŽNO JE ZA NASTANAK KOŠTANOG FENOTIPA

Povećanju broju osteoklasta pridonosi i specifični imunološki fenotip miševa s transgenom za IL-7, koji obilježava tri do četiri puta veća CD45R<sup>+</sup> populacija u koštanoj srži. Već je prije pretpostavljeno da stanice B limfocitne linije u ranijim fazama razvoja mogu sudjelovati u osteoklastogenezi na dva načina: izražavanjem RANKL-a na svojoj površini ili u ulozi stanica preteča (257). U našem istraživanju iz CD45R<sup>+</sup> stanica koje su izdvojene iz koštane srži miševa s transgenom za IL-7 nastali su osteoklasti. Dvije su mogućnosti razvoja osteoklasta iz CD45R<sup>+</sup> stanica navedene u literaturi: 1.) dio CD45R<sup>+</sup> stanica diferencira u makrofage koji potom diferenciraju u osteoklaste – ta je populacija stanica dvostruko pozitivna CD45R<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> populacija, i 2.) stanice izravno diferenciraju u osteoklaste ili fuzioniraju sa stanicama makrofagne linije – to je CD115 (c-fms) pozitivna populacija (250). U našoj transgeničnoj liniji u koštanoj srži, kako je pokazano protočnom citometrijom, nije bilo porasta dvostruko pozitivne CD45R<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> populacije koju bismo smatrali gore

navedenom populacijom i izvorom osteoklasta. Također, u koštanoj srži miševa s transgenom za IL-7 udio CD11b<sup>+</sup> i CD115<sup>+</sup> populacije, tj. monocitne i makrofagne populacije, bio je manji nego u kontrolnih životinja, tako da je malo vjerojatno da je fuzija CD45R<sup>+</sup> stanica i makrofaga, prethodno spominjana kao jedna od mogućnosti, odgovorna za porast broja osteoklasta. Vjerojatno CD45R<sup>+</sup> stanice diferenciraju izravno u osteoklaste. Neki su autori tvrdili da je CD45R<sup>+</sup> populacija sama po sebi nesposobna diferencirati u osteoklaste i da je njen osteoklastogenični potencijal u stvari onečišćenje s CD45R<sup>-</sup> populacijom (247). U našem istraživanju čistoća izdvojene populacije provjeravana je protočnim citometrom (>99%), i CD45R<sup>+</sup> stanice diferencirale su u osteoklaste *in vitro*. Ipak, u opisanim uvjetima kulture mogućnost kontaminacije malim brojem CD45R<sup>-</sup> stanica ne može sa 100% sigurnošću biti isključena (247), tako da ne možemo tvrditi da se radi isključivo o promjeni diferencijacijskog udjela CD45R<sup>+</sup> populacije i da ona sama po sebi ima dovoljan utjecaj na povećanje osteoklastogeneze. Vjerojatnija je uloga, tj. međudjelovanje navedene populacije s mikrookolišem unutar koštane srži. Naime, poznato je da koštani mikrookoliš ima važnu ulogu u diferencijaciji i razvoju stanica: npr. utvrđeno je da se B-limfociti mogu razvijati samo u specifičnom mikrookolišu unutar koštane srži (272, 274-276). Pretpostavljamo da pojačani izražaj IL-7 uzrokuje promjene unutar koštanog mikrookoliša koji potom usmjerava prisutne CD45R<sup>+</sup> stanice prema osteoklastogenezi. Poznato je da IL-7 može poticati izlučivanje iz stanica koje nose IL-7 receptor te na taj način regulirati milje mikrookoliša (273). U prijašnjim istraživanjima miševa s transgenom za IL-7 uočen je specifičan obrazac lokalizacije CD45R<sup>+</sup> stanica pri fokalnoj osteolizi (243). Povećana šupljina koštane srži u tih miševa puna je nezrelih limfocita koji postaju stanice preteče osteoklasta pomoću posredovanja IL-7.

Citokini osjetljivi na utjecaj IL-7, a koji bi se mogli smatrati odgovornima za diferencijaciju CD45R<sup>+</sup> stanica u osteoklaste, još nisu poznati. RANKL djeluje na stanice preteče steoklasta i posreduje u njihovom sazrijevanju vezanjem za RANK receptor na njihovoj membrani (277, 278). U postmenopauzalnih žena s povećanom resorpcijom kosti uočena je povišena ekspresija RANKL na stromalnim stanicama (279, 280). Naši rezultati pokazuju povišenu razinu mRNA RANKL-a u zrelim osteoblastima miševa s transgenom za IL-7. Također, pokazano je da RANKL u kombinaciji s IL-7 potiče proliferaciju CD45R<sup>+</sup> stanica (162, 281, 282). Međutim, ulogu RANKL-a kao glavnog citokina odgovornog za uočeni koštani fenotip nismo mogli adekvatno procijeniti budući da smo topljivi RANKL i M-CSF dodavali u osteoklastne kulture kao dio uhodanog protokola njihovog uzgoja.

U našoj smo studiji uočili da dodavanje nadtaloga transgeničnih osteoklastnih kultura mediju za kultiviranje stanica koštane srži, povećava broj osteoklasta u kulturama kontrolne skupine. To upućuje na činjenicu da nadtalog transgeničnih kultura sadržava autokrini ili parakrini topljivi čimbenik koji potiče osteoklastogenezu u kulturama stanica koštane srži kontrolne skupine. Suprotno našim očekivanjima, neutralizacija IL-7 nije imala učinka na uočeni efekt. Pretpostavljamo da je osteoklastogenični učinak IL-7 u korištenom transgeničnom modelu kombinacija imunološkog fenotipa obilježenog povećanjem CD45R<sup>+</sup> populacije i njegovog utjecaja na koštani mikrookoliš u kojem te stanice bivaju unaprijeđene u osteoklastne stanice preteče. Činjenica da rane CD45R<sup>+</sup> stanice iz koštane srži miševa kojima je izbačen gen za IL-7 receptor također mogu diferencirati u osteoklaste (155) upućuje na to da je stvaranje pogodnog mikrookoliša nužno za poticanje osteoklastogeneze te da se samo u uvjetima međudjelovanja s takvim mikrookolišem učinak povećanog izražaja IL-7 na kost ostvaruje u potpunosti.

Iako je IL-7 prvotno definiran kao čimbenik rasta B stanica, njegovo je djelovanje raznoliko: regulira limfopoezu B i T stanica te održava ravnotežu zrelih limfocita T u miša (283). U našoj transgeničnoj liniji, sustavno povećano izražavanje IL-7 dovodi do nastanka specifičnog koštanog fenotipa u kojem CD45R<sup>+</sup> stanice, čiji je udio znatno povećan pod utjecajem IL-7, mogu imati ulogu osteoklastnih stanica preteča i poticati stvaranje topljivih čimbenika koji povećavaju osteoklastogenetski potencijal stanica koštane srži. Ti su nalazi bitni za imunološke poremećaje koji uključuju IL-7, a u kojima su promjene imunološkog sustava popraćene promjenama koštanog metabolizma, kao npr. multipli mijelom (45-47), reumatoidni artritis (253-255) i postmenopauzalna osteoporoza (250-252). IL-7 je citokin koji se ne smije zanemariti zbog njegova posredovanja u nastanku osteolitičkih koštanih metastaza (257-259), osobito danas kada se zna da svaka treća osoba oboli od neke vrste raka (256). Nadalje, naši rezultati podržavaju ideju o međuovisnosti regulacije razvoja osteoklasta i ranih B limfocita (251). Također, potvrđuju činjenicu da se imunološki poremećaji ne mogu se razdvojiti od promjena u koštanom metabolizmu.

## 6. ZAKLJUČCI:

1. *In vivo*, miševi s transgenom za IL-7 razvijaju specifičan koštani fenotip obilježen osteopenijom. Taj gubitak kosti specifičan je za trabekularnu kost i posljedica je povećanog broja osteoklasta na trabekularnim i endostalnim površinama, tj. povećane resorpcije kosti. Izrazito smanjenje volumena trabekularne kosti u dugim kostima uočeno je u 12-mjesečnih životinja, dok je takav gubitak trabekularne kosti u kralješcima vidljiv već u 6-mjesečnih životinja.

2. *In vivo*, miševi s transgenom za IL-7 pokazuju limfadenopatiju i splenomegaliju i hiperplaziju timusa. Navedeni organi u potpunosti su infiltrirani su malim stanicama s izraženom jezgrom i oskudnom citoplazmom koje odgovaraju nezrelim B limfocitima i gube svoju histološku strukturu.
3. *In vitro*, miševi s transgenom za IL-7 pokazuju povećan osteoklastični potencijal stanica koštane srži. U kulturama stanice koštane srži transgeničnih miševa stvaraju više funkcionalnih osteoklasta nego koštana srž miševa divljeg tipa odgovarajućeg spola i dobi.
4. *In vitro*, osteoblastični potencijal stanice koštane srži miševa s transgenom za IL-7 je nepromijenjen. U kulturama stanice koštane srži transgeničnih miševa broj kolonija pozitivnih na alkalnu fosfatazu nije se značajno razlikovao od njihovog broja u kulturama stanica koštane srži miševa divljeg tipa. Nepromijenjen osteoblastogenični potencijal koštane srži u našem transgeničnom modelu upućuje na to da je pojačan izražaj IL-7 usmjeren na osteoklastne stanice preteče.
5. *In vitro*, dodavanjem nadtaloga osteoklastnih kultura stanica koštane srži miševa s transgenom za IL-7 mediju za kultiviranje stanica koštane srži povećan je broj osteoklasta u kulturama stanica miševa divljeg tipa. Nadtalog transgeničnih kultura sadržava topljivi čimbenik koji potiče osteoklastogenezu u kulturama stanica koštane srži kontrolne skupine.
6. Specifični imunološki fenotip miševa s transgenom za IL-7 obilježen tri do četiri puta većom CD45R<sup>+</sup> populacijom u koštanoj srži preduvjet je razvoja koštanog fenotipa. Pojačani izražaj IL-7 uzrokuje promjene unutar koštanog mikrokoliša koji potom usmjerava prisutne CD45R<sup>+</sup> stanice prema osteoklastogenezi. Upravo međudjelovanje IL-7 i poticajnog mikrokoliša

omogućuje ostvarenje CD45R<sup>+</sup> stanica kao osteoklastnih preteča i time razvoj potpunog koštanog fenotipa.

7. U osteoklastnim kulturama stanica koštane srži miševa s transgenom za IL-7 izražaj IL-7R mRNA povećava se rano u odnosu na kulture stanica miševa divljeg tipa što znači da su osteoklastne stanice preteče iz transgenične koštane srži osjetljivije na IL-7 te je moguće da imaju veću sposobnost diferenciranja prema osteoklastnoj lozi.

## 7. SAŽETAK

Miševi s transgenom za IL-7 koji je pod kontrolom  $E_{\alpha}$  promotora pojačano izražavaju IL-7 u svim stanicama koje na staničnoj membrani nose MHC II antigen te razvijaju karakterističan imunološki fenotip koji obilježava porast udjela stanica pozitivnih za CD45R antigen u koštanoj srži i u perifernoj krvi. Ženke tih miševa pokazuju i koštani fenotip obilježen gubitkom trabekularne kosti u aksijalnim i dugim kostima koji se razvija tijekom njihovog starenja. Osteopenija je posljedica povećanog broja aktivnih osteoklasta na površini trabekularne kosti. Nadalje, u kulturama neadheriranih i CD45R<sup>+</sup> stanica koštane srži transgeničnih miševa nisu uočene promjene u broju osteoblasta, unatoč povećanom osteoklastogeničnom potencijalu koštane srži. Povećani izražaj IL-7 dovodi do promjena u mikrookolišu unutar koštane srži čime su stanice preteče usmjerene prema osteoklastnoj lozi.

## 8. SUMMARY

Daniela Salopek, MD: Bone phenotype of IL-7 transgenic mice, 2009.

Mice with an interleukin (IL)-7 transgene under the control of  $E_{\alpha}$  promoter over-express IL-7 in MHC class II-positive cells and develop specific immune phenotype, marked by an increase in  $CD45R^{+}$  cells in both the bone marrow and peripheral blood. We show that female IL-7 transgenic mice have a bone phenotype characterized by an age-related loss of trabecular bone in both axial and long bones. Osteopenia was the result of increased number of active osteoclasts on the surface of trabecular bone. Furthermore, IL-7 transgenic mice showed increased osteoclastic but unchanged osteoblastic potential of the bone marrow *in vitro*, both from nonadherent bone marrow cells and  $CD45R^{+}$  marrow cells. IL-7 over-expression also created osteoclastogenic microenvironment within the bone marrow which promoted the commitment of precursors towards the osteoclast lineage.



## 9. LITERATURA

1. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. 5. izd. Philadelphia: WB Saunders; 2007, str. 3-39.
2. Beck G, Habicht GS. Immunity and the Invertebrates. Scientific American 1996;60-66.
3. Litman G, Cannon J, Dishaw L. Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. Nat Rev Immunol 2005;5:866-79.
4. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature 2007;449:819-26.
5. Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. Nat Immunol 2006;7:131-7.
6. Pancer Z, Cooper M. The evolution of adaptive immunity. Annu Rev Immunol 2006;24:497-518.
7. Parham P. The immune system. 2. izd. New York: Garland Science; 2005, str. 344.
8. Rose NR, MacKay IR. The Autoimmune Diseases. 4. izd. San Diego: Elsevier Academic Press; 2006, str. 25-37.
9. Bowers W. Immunology: Cells involved in immune responses. U: Microbiology and Immunology On-Line Textbook. University of South Carolina School of Medicine, 2006.
10. Abbas A, Murphy K, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature 1996;383:787-93.
11. Küppers R. Human memory B cells: Memory B cells of a special kind. Immunol Cell Biol 2008;86:635-636.

12. Muller-Sieburg CE, Cho RH, Thoman M, Adkins B, Sieburg HB.  
Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood* 2002;100:1302-9.
13. Sieburg HB, Cho RH, Dykstra B, Eaves CJ, Muller-Sieburg CE. The hematopoietic stem cell compartment consists of a limited number of discrete stem cell subsets. *Blood* 2006;107:2311-6.
14. Guo Y, Lubbert M, Engelhardt M. CD34- Hematopoietic Stem Cells: Current Concepts and Controversies. *Stem Cells* 2003;21:15-20.
15. Simmons DL, Satterthwaite AB, Tenen DG, Seed B. Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. *J Immunol* 1992;148:267-71.
16. Satterthwaite AB, Burn TC, Le Beau MM, Tenen DG. Structure of the gene encoding CD34, a human hematopoietic stem cell antigen. *Genomics* 1992;12:788-94.
17. Furness SG, McNagny K. Beyond mere markers: functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis. *Immunol Res* 2006;34:13-32.
18. Uchida N, Weissman IL. Searching for hematopoietic stem cells: Evidence that Thy-1.1<sup>lo</sup> Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *J Exp Med* 1992;175:175-184.
19. Demoulin JB et al. Ly-6A/E induction by interleukin-6 and interleukin-9 in T cells. *Eur Cyt Net* 1999;10:49-56.
20. Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R, Alt FW. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol* 2006;24:541-70.

21. Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol* 2006;24: 287-320.
22. LeBien TW. Fates of human B-cell precursors. *Blood* 2000;96: 9-23.
23. Milne CD, Paige CJ. IL-7: A key regulator of B lymphopoiesis. *Sem Immunol* 2006;18: 20–30.
24. Singh H, Pongubala JMR, Medina KL. Gene regulatory networks that orchestrate the development of B-lymphocyte precursors. *Adv Exp Med Biol* 2007;596: 57-62.
25. Fry TJ, Mackall CL. Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood* 2002;99: 3892-3904.
26. Namen AE, Lupton S, Hjerrild K, Wignall J, Mochizuki DY, Schmierer A, Mosley B, March CJ, Urdal D, Gillis S. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature* 1988;333: 571-3.
27. Hofmeister R, Khaled AR, Benbernou N, Rajnavolgyi E, Muegge K, Durum SK. Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999;10: 41-60.
28. Khaled AR, Durum SK. The role of cytokines in lymphocyte homeostasis. *Biotechniques* 2002;Suppl:40-45.
29. Marrack P, Kappler J. Control of T cell viability. *Annu Rev Immunol* 2004;22: 765- 87.
30. Gutierrez JC, Palacios R. Heterogeneity of thymic epithelial cells in promoting T-lymphocyte differentiation in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88: 642.
31. Samaridis J, Casorati G, Traunecker A, Iglesias A, Gutierrez JC, Mueller U, Palacios R. Development of lymphocytes in interleukin 7-transgenic mice. *Eur J Immunol*;1991. 21: 453.

32. Heufler C, Topar G, Grasseger A, Stanyl U, Koch F, Romani N, Namen AE, Schuler G. Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes. *J Exp Med* 1993;178: 1109.
33. Tan JT, Dudl E, LeRoy E, et al. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:8732-8737.
34. Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrancois L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 2000;1:426-432.
35. Bolotin E, Annett G, Parkman R, Weinberg K. Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count. *Bone Marrow Transpl* 1999;23:783-788.
36. Fry TJ, Connick E, Falloon J, et al. A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood* 2001;97:2983-2990.
37. Napolitano LA, Grant RM, Deeks SG, et al. Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat Med* 2001;7:73-79.
38. Li P, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Ma L, Boyce BF, Xing L. RANK signaling is not required for TNF $\alpha$ -mediated increase in CD11 (hi) osteoclast precursors but is essential for mature osteoclast formation in TNF $\alpha$ -mediated inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res* 2004;19:207-13.
39. Boyce BF, Schwarz EM, Xing L. Osteoclast precursors: cytokine-stimulated immunomodulators of inflammatory bone disease. *Curr Opin Rheumatol* 2006;18: 427-32.
40. Van Roon JA, Verweij MC, Wijk MW, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP. Increased intraarticular interleukin-7 in rheumatoid arthritis patients stimulates

- cell contact-dependent activation of CD4(+) T cells and macrophages. *Arthr Rheum* 2005;52:1700-10.
41. Puel A, Ziegler SF, Buckley RH, Leonard WJ. Defective IL7R expression in TB NK severe combined immunodeficiency. *Nat Gen* 1998; 20:394-397.
  42. Holm AM, Aukrust P, Damås JK, Müller F, Halvorsen B, Frøland SS. Abnormal interleukin-7 function in common variable immunodeficiency. *Blood* 2005;105:2887-90.
  43. Tomita T, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Sakamoto N, Watanabe M. Systemic, but not intestinal IL-7 is essential for the persistence of chronic colitis. *J Immunol* 2008;180: 383-390.
  44. Watanabe M, Ueno Y, Yamazaki M, Hibi T. Mucosal IL-7-mediated immune responses in chronic colitis-IL-7 transgenic mouse model. *Immunol Res* 1999;20: 251-259.
  45. Giuliani N, Colla S, Sala R, Moroni M, Lazzaretti M, La Monica S, Bonomini S, Hojden M, Sammarelli G, Barille S, Bataille R, Rizzoli V. Human myeloma cells stimulate the receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) in T lymphocytes: a potential role in multiple myeloma bone disease. *Blood* 2002;100: 4615-21.
  46. Merico F, Bergui L, Gregoret MG, Ghia P, Aimò G, Lindley IJ, Caligaris-Cappio F. Cytokines involved in the progression of multiple myeloma. *Clin Exp Immunol* 1993;92: 27-31.
  47. Kröning H, Täger M, Thie U, Ittenson A, Reinhold D, Bühling F, Kettner E, Sigfried A. Overproduction of IL-7, IL-10 and TGF- $\beta$ 1 in Multiple Myeloma. *Acta Haematol* 1997;98:116-118

48. Sutherland GR, Baker E, Fernandez KE, et al. The gene for human interleukin 7 (IL7) is at 8q12–13. *Hum Genet* 1989;82:371-372.
49. Lupton SD, Gimpel S, Jerzy R, et al. Characterization of the human and murine IL-7 genes. *J Immunol* 1990;144:3592-3601.
50. Huang M, Sharma S, Zhu LX, Keane MP, Luo J, Zhang L, Burdick MD, Lin YQ, Dohadwala M, Gardner B, Batra RK, Strieter RM, Dubinett SM. IL-7 inhibits fibroblast TGF-beta production and signaling in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 2002;109:931-7.
51. Tang J, Nuccie BL, Ritterman I, Liesveld JL, Abboud CN, Ryan DH. TGF-beta down-regulates stromal IL-7 secretion and inhibits proliferation of human B cell precursors. *J Immunol* 1997;159:117-25.
52. Jiang, Q., Li, W.Q., Aiello, F.B., Mazzucchelli, R., Asefa, B., Khaled, A.R., Durum, S.K., Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16: 513-33.
53. Hofmeister R, Khaled AR, Benbernou N, Rajnavolgyi E, Muegge K, Durum SK. Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999;10:41-60.
54. Hardy RR, Carmack CE, Shinton SA, Kemp JD, Hayakawa K. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med* 1991;173:1213-1225.
55. Hayakawa K, Li Yue-Sheng, Wasserman R, Sauder S, Shinton S, Hardy RR. B Lymphocyte Developmental Lineages. *B Lymphocytes and Autoimmunity, Annals of the New York Academy of Sciences* 1997;815:15-28

56. Namen AE, Schmierer AE, March CJ, et al. B cell precursor growth-promoting activity: purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors. *J Exp Med* 1988;167:988-1002.
57. Goodwin RG, Lupton S, Schmierer A, et al. Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:302-306.
58. Namen AE, Lupton S, Hjerrild K, et al. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin. *Nature* 1988;333:571-573.
59. Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, et al. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 1994;180:1955-1960.
60. von Freeden-Jeffry U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE, Murray R. Lymphopenia in interleukin(IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 1995;181:1519-1526.
61. Grabstein KH, Waldschmidt TJ, Finkelman FD, et al. Inhibition of murine B and T lymphopoiesis in vivo by an anti-interleukin 7 monoclonal antibody. *J Exp Med* 1993;178:257-264.
62. Morrissey PJ, Conlon P, Braddy S, Williams DE, Namen AE, Mochizuki DY. Administration of IL-7 to mice with cyclophosphamide-induced lymphopenia accelerates lymphocyte repopulation. *J Immunol* 1991;146:1547-1552.
63. Damia G, Komschlies KL, Faltynek CR, Ruscetti FW, Wiltrot RH. Administration of recombinant human interleukin-7 alters the frequency and number of myeloid progenitor cells in the bone marrow and spleen of mice. *Blood* 1992;79:1121-1129.

64. Komschlies KL, Gregorio TA, Gruys ME, BackTC, Faltynek CR, Wiltrout RH. Administration of recombinant human IL-7 to mice alters the composition of B-lineage cells and T cell subsets, enhances T cell function, and induces regression of established metastases. *J Immunol* 1994;152:5776-5784.
65. Marshall AJ, Fleming HE, Wu GE, Paige CJ. Modulation of the IL-7 dose-response threshold during pro-B cell differentiation is dependent on pre-B cell receptor expression. *J Immunol* 1998;161:6038-6045.
66. Lee G, Namen AE, Gillis S, Ellingsworth LR, Kincade PW. Normal B cell precursors responsive to recombinant murine IL-7 and inhibition of IL-7 activity by transforming growth factor-beta. *J Immunol* 1989;142:3875-3883.
67. Sudo T, Ito M, Ogawa Y, et al. Interleukin 7 production and function in stromal cell-dependent B cell development. *J Exp Med.* 1989;170:333-338.
68. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998;16:395-419.
69. Lu L, Chaudhury P, Osmond DG. Regulation of cell survival during B lymphopoiesis: apoptosis and Bcl-2/Bax content of precursor B cells in bone marrow of mice with altered expression of IL-7 and recombina-se-activating gene-2. *J Immunol* 1999;162:1931-1940.
70. Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2305-2309.
71. McNiece IK, Langley KE, Zsebo KM. The role of recombinant stem cell factor in early B cell development: synergistic interaction with IL-7. *J Immunol* 1991;146:3785-3790.



72. Namikawa R, Muench MO, de Vries JE, Roncarolo MG. The FLK2/FLT3 ligand synergizes with interleukin-7 in promoting stromal cell-independent expansion and differentiation of human fetal pro-B cells in vitro. *Blood* 1996;87:1881-1890.
73. Jee WSS. The skeletal tissues. U: Weiss L, ur. *Histology, cell and tissue biology*. New York: Elsevier Biomedical; 1983, str. 200-255.
74. Vigorita VJ. *Orthopaedic pathology*. Philadelphia: J.B. Lippincot, 1998.
75. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 2000;289:1501-4.
76. Aubin JE. The role of osteoblasts. U: Henderson JE, Goltzman D, ur. *The osteoporosis primer*. Cambridge: Cambridge University Press; 2000, str. 18-36.
77. Aubin JE, Triffitt JT. Mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation. U: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, ur. *Principles of bone biology*, 2. izd. San Diego: Academic Press; 2002, str. 59-81.
78. Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci* 1988; Suppl10:63-76.
79. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;89:747-54.
80. Kobayashi T, Kronenberg H. Minireview: transcriptional regulation in development of bone. *Endocrinol* 2005;146:1012-7.
81. Mackie EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:1301-5.
82. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-9.
83. Capdevila J, Izpisua Belmonte JC. Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:87-132.

84. Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* 2002;2:389-406.
85. Marie PJ, Debiais F, Hay E. Regulation of human cranial osteoblast phenotype by FGF-2, FGFR-2 and BMP-2 signaling. *Histol Histopatol* 2002;17:877-85.
86. Maija P. Valta, Teuvo Hentunen, Qiang Qu, Eeva M. Valve, Anna Harjula, Jani A. Seppänen, Kalervo H. Väänänen, and Pirkko L. Härkönen. Regulation of Osteoblast Differentiation - A Novel Function for FGF-8. *Endocrinol* 2006;147:2171-82.
87. Takashi S, Toru O, Akiko Y, Daichi Ch, Hirotaka K, Kozo N, Nobuyuki I, Hiroshi K. Regulation of Osteoblast, Chondrocyte, and Osteoclast Functions by Fibroblast Growth Factor (FGF)-18 in Comparison with FGF-2 and FGF-10. *J Biol Chem* 2002;277: 7493-7500.
88. Dehong Y, Jianting C, Zongsen J, Dadi J. Platelet-derived growth factor (pdgf)-aa: a self-imposed cytokine in the proliferation of human fetal osteoblasts. *Cytokine* 2000;12:1271-1274.
89. Wang W, Zhuang H, Levitz CL, Fan H, Seldes RM, Tahernia AD, Brighton CT. The increased level of PDGF-A contributes to the increased proliferation induced by mechanical stimulation in osteoblastic cells. *IUBMB Life* 1997;43:339-346.
90. Erlebacher A, Filvaroff EH, Ye JQ, Derynck R. Osteoblastic Responses to TGF-beta during Bone Remodeling. *Mol Biol Cell* 1998;9:1903-1918.
91. Filvaroff E, Erlebacher A, Ye JQ, Gitelman SE, Lotz J, Heillman M, Derynck R. Inhibition of TGF-b receptor signaling in osteoblasts leads to decreased bone remodeling and increased trabecular bone mass. *Develop* 1999;126: 4267-4279.

92. Hock JM, Fitzpatrick LA, Bilezikian JP. Actions of parathyroid hormone. U: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, ur. Principles of bone biology, 2. izd. San Diego: Academic Press; 2002, str. 463-481.
93. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003;425:841-6.
94. Boyden LM, Mao J, Belsky J, et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 2002;346:1513-21.
95. Nijweide P, Burger EH, Klain-Nulend J. The osteocyte. U: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, ur. Principles of bone biology. 2. izd. San Diego: Academic Press; 2002, str. 93-107.
96. Rho J, Takami M, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the immune and skeletal systems. *Mol Cells* 2004;17:1-9.
97. Mullender MG, Huiskes R. Osteocytes and bone lining cells: which are the best candidates for mechano-sensors in cancellous bone? *Bone* 1997;20:527-32
98. Fedrako NS, Sponseller PD, Shapiro JR. Long-term extracellular matrix metabolism by cultured human osteogenesis imperfecta osteoblasts. *J Bone Miner Res* 1996;11:800-5.
99. Malaval L, Liu F, Roche P, Aubin JE. Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Biochem* 1999;74:616-27.
100. Malaval L, Modrowski D, Gupta AK, Aubin JE. Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 1994;158:555-72.

101. Kalajzic I, Staal A, Yang WP, Wu Y, Johnson SE, Feyen JHM, Krueger W, Maye P, Yu F, Zhao Y, Kuo L, Gupta RR, Achenie LEK, Wang HW, Shin DG, Rowe DW. Expression profile of osteoblast lineage at defined stages of differentiation. *J Biol Chem* 2005; 280:24618-24626.
102. Wadadekar ND. Osteoclasts – the cells that break bone. *U: Biology Articles: Anatomy and Physiology: Human Anatomy. Suite101*; 2005.
103. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000;289:1504-8.
104. Massey HM, Flanagan AM. Human osteoclasts derive from CD14-positive monocytes. *Br J Haematol* 1999;106: 167-70.
105. Cory S. Wavering on commitment. *Nature* 1999;401:538-9.
106. Hayase Y, Muguruma Y, Lee MY. Osteoclast development from hematopoietic stem cells: apparent divergence of the osteoclast lineage prior to macrophage commitment. *Exp Hematol* 1997;25:19-25.
107. Hayashi S, Miyamoto A, Yamane T, et al. Osteoclast precursors in bone marrow and peritoneal cavity. *J Cell Physiol* 1997;170:241-7.
108. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337-42.
109. Miyamoto T, Arai F, Ohneda O, Takagi K, Anderson DM, Suda T. An adherent condition is required for formation of multinuclear osteoclasts in the presence of macrophage colony-stimulating factor and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand. *Blood* 2000;96:4335-43.
110. Suda T, Nakamura I, Jomo E, Takahashi N. Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res* 1997;12:869-79.
111. Roodman GD: Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol* 1999;27:1229-41.

112. Takami M, Woo JT, Nagai K. Osteoblastic cells induce fusion and activation of osteoclasts through a mechanism independent of macrophage-colony-stimulating factor production. *Cell Tissue Res* 1999;298:327-334.
113. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T et al. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7260-4.
114. 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;17:165-76.
115. Baron R, Chakraborty M, Chatterjee D, Horne W, Lomri A, Ravesloot JH: Biology of the osteoclast. U: Mundy GR, Martin TJ, eds. *Physiology and pharmacology of bone*. New York: Springer Verlag; 1993, str 50-55.
116. Minkin C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 1982;34:285-90.
117. Kaye M. When is it an osteoclast? *J Clin Pathol* 1984;37:398-400.
118. Faust J, Lacey DL, Hunt P, Burgess TL, Scully S, Van G et al. Osteoclast markers accumulate on cells develop from human peripheral blood mononuclear precursors. *J Cell Biochem* 1999;72:67-80
119. Reddy S, et al. Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the mouse tartrate-resistant acid phosphatase gene. *J Bone Miner Res* 1993;8:1263-70.
120. Tezuka K, Tezuka Y, Maejima A, Sato T, Nemoto K, Kamioka H, Hakeda Y, Kumegawa M. Molecular cloning of possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts. *J Biol Chem* 1994;269:1106-1109.

121. Inaoka T, Bilb G, Ishibashi O, Tezuka K, Kumegawa M, Kokubo T.  
Molecular cloning of human cDNA for cathepsin D: novel cysteine  
proteinase predominantly expressed in bone. *Biochem Biophys Res Commun*  
1995;206:89-96.
122. Goto T, Tsukuba T, Ayasaka N, Yamamoto K, Tanaka T.  
Immunocytochemical localization of cathepsin D in the rat osteoclast.  
*Histochem* 1991;97:13-18.
123. Katavić V, Grčević D, Lee SK, et al. The surface antigen CD45R identifies a  
population of estrogen-regulated murine marrow cells that contain osteoclast  
precursors. *Bone* 2003;32:581-90.
124. Blin-Wakkach C, Wakkach A, Rochet N, Carle GF. Characterization of a  
novel bipotent hematopoietic progenitor population in normal and  
osteopetrotic mice. *J Bone Miner Res* 2004;19:1137-43.
125. Horowitz MC, Xi Y, Pflugh DL, Hesslein DG, Schatz DG, Lorenzo JA,  
Bothwell AL. Pax5-deficient mice exhibit early onset osteopenia with  
increased osteoclast progenitors. *J Immunol*. 2004;173:6583-91.
126. Katavić V, Grčević D, Lee SK, Kalinowski J, Jastrzebski S, Dougall W,  
Anderson D, Puddington L, Aguila HL, Lorenzo JA. The surface antigen  
CD45R identifies a population of estrogen-regulated murine marrow cells  
that contain osteoclast precursors. *Bone* 2003;32:581-90.
127. Tran Van P, Vignery A, Baron R. Cellular kinetics of the bone remodeling  
sequence in the rat. *Anat Rec* 1982;202:445-51.
128. Vignery A, Baron R. Dynamic histomorphometry of alveolar bone  
remodeling sequence in the adult rat. *Anat Rec* 1980;196:191-200.

129. Frost HM. Some concepts crucial to the effective study of bone turnover and balance in human skeletal disease and in experimental models of skeletal physiology and pathophysiology. U: Jaworski ZGF, ur. Bone morphometry. Ottawa: Ottawa University Press; 1976, str. 219-23.
130. Baron R, Tross R, Vignery A. Evidence of sequential remodeling in rat trabecular bone: morphology, dynamic histomorphometry, and changes during skeletal maturation. *Anat Rec* 1984;208:137-45.
131. Compston JE. Bone marrow and bone: a functional unit. *J Endocrinol* 2002;173:387-94.
132. Hayden JM, Mohan S, Baylink DJ. The insulin-like growth factor system and the coupling of formation to resorption. *Bone* 1995;17:93-98.
133. Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-76.
134. Zaidi M, Blair HC, Moonga BS, Abe E, Huang CL. Osteoclastogenesis, bone resorption, and osteoclast-based therapeutics. *J Bone Miner Res* 2003;18:599-609.
135. Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, et al. Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest* 1993;91:257-63.
136. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-19.
137. Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. *N Engl J Med* 1995;332:305-11.

138. Eriksen EF, Axelrod DW, Melsen F. Bone macroanatomy and microanatomy. U: Eriksen EF, Axelrod DW, Melsen F, ur. Bone Histomorphometry. New York: Raven Press; 1994, str. 3-12.
139. Kassem M, Mosekilde L, Eriksen EF. Growth hormone stimulates proliferation of normal human bone marrow stromal osteoblast precursor cells in vitro. *Growth Regul* 1994;4:131-5.
140. Morel G, Chavassieux P, Barenton B, Dubois PM, Meunier PJ, Boivin G. Evidence for a direct effect of growth hormone on osteoblasts. *Cell Tissue Res* 1993;273:279-86.
141. Hahn TJ, Downing SJ, Phang JM. Insulin effects on amino acid transport in bone. *Biochim Biophys Acta* 1969;184:675-77.
142. Stuart CA, Furlanetto RW, Lebovitz HE. Insulin receptor of embryonic chicken cartilage. *Endocrinol* 1979;105:1293-302.
143. Peck WA, Messinger K. Nucleoside and ribonucleic acid metabolism in isolated bone cells. Effects of insulin and cortisol in vitro. *J Biol Chem* 1970;245:2722-9.
144. Kream BE, Smith MD, Canalis E, Raisz LG. Characterization of the effect of insulin on collagen synthesis in fetal rat bone. *Endocrinol* 1985;116:296-302.
145. Ducharme J-R, Forest MG, DePeretti E, Sempe M, Collu R, Bertrand J. Plasma adrenal and gonadal sex steroids in human pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab* 1976;42:468-76.
146. Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, Riggs BL. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 1988;241:84-86.



147. Komm BS, Terpening CM, Benz DJ, Graeme KA, Gallegos A, Korc M et al. Estrogen binding, receptor mRNA, an biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science* 1988;241:81-4.
148. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 2003;423:349-355.
149. Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev* 2008;29:403-440.
150. Lorenzo J, Choi Y. Osteoimmunology. *Immunol Rev* 2005. 208:5-6.
151. Grčević D, Katavić V, Lukić IK, Kovačić N, Lorenzo JA, Marušić A. Cellular and molecular interactions between immune system and bone. *Croat Med J* 2001;42:384-392.
152. Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC. CD4+ T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun* 1999;67:2804-9.
153. Udagawa N. The mechanism of osteoclast differentiation from macrophages: possible roles of T lymphocytes in osteoclastogenesis. *J Bone Min Res* 2004;21:337-343.
154. John V, Hock JM, Short LL, Glasebrook AL, Galvin RJ. A role for CD8+ T lymphocytes in osteoclast differentiation in vitro. *Endocrinol* 1996;137:2457-463.
155. Grčević D, Lee SK, Marušić A, Lorenzo JA. Depletion of CD4 and CD8 T lymphocytes in mice in vivo enhances 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-stimulated osteoclast-like cell formation in vitro by a mechanism that is dependent on prostaglandin synthesis. *J Immunol* 2000;165:4231-4238.

156. Grčević D, Lukić IK, Kovačić N, Ivčević S, Katavić V, Marušić A. Activated T lymphocytes suppress osteoclastogenesis by diverting early monocyte/macrophage progenitor lineage commitment towards dendritic cell differentiation through down-regulation of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B and c-Fos. *Clin Exp Immunol* 2006;146:146-58.
157. Lee SK, Kalinowski JF, Jastrzebski SL, Puddington L, Lorenzo JA. Interleukin-7 is a direct inhibitor of in vitro osteoclastogenesis. *Endocrinol* 2003;144:3524-31.
158. Weitzmann MN, Roggia C, Toraldo G, Weitzmann L, Pacifici R. Increased production of IL-7 uncouples bone formation from bone resorption during estrogen deficiency. *J Clin Invest* 2002;110:1643-1650.
159. Morrissey PJ, Conlon P, Charrier K, Braddy S, Alpert A, Williams D, Namen AE, Mochizuki D. Administration of IL-7 to normal mice stimulates B-lymphopoiesis and peripheral lymphadenopathy. *J Immunol* 1991;147:561-568.
160. Faltynek CR, Wang S, Miller D, Young E, Tiberio L, Kross K et al. Administration of human recombinant IL-7 to normal and irradiated mice increases the numbers of lymphocytes and some immature cells of the myeloid lineage. *J Immunol* 1992;149:1276-82.
161. Sato T, Watanabe K, Masuhara M, Hada N, Hakeda Y. Production of IL-7 is increased in ovariectomized mice, but not RANKL mRNA expression by OBLs/stromal cells in bone, and IL-7 enhances generation of osteoclast precursors in vitro. *J Bone Miner Res* 2007;25:19-27.
162. Toraldo G, Roggia C, Qian WP, Pacifici R, Weitzmann MN. IL-7 induces bone loss in vivo by induction of receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand

- and tumor necrosis factor  $\alpha$  from T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:125-130.
163. Anderson KL, Smith KA, Pio F, Torbett BE, Maki RA. Neutrophils deficient in PU.1 do not terminally differentiate or become functionally competent. *Blood* 1998;92:1576-85.
164. Singh H, Pongubala JMR, Medina KL. Gene regulatory networks that orchestrate the development of B lymphocyte precursors. U: Gupta S, Alt F, Cooper M, Melchers F, Rajewsky K, ur. *B cell biology: Mechanisms of lymphocyte activation and regulation XI: Advances in experimental medicine and biology*. New York: Springer; 2007, 596:57-62.
165. DeKoter R, Walsh JC, Singh H. PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *EMBO J* 1998;17:4456-4468.
166. DeKoter RP, Singh H. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* 2000;288:1439-41.
167. Scott EW, Simon MC, Anastasi J, Singh H. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 1994;265:1573-7.
168. DeKoter RP, Lee HJ, Singh H. PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity* 2002;16:297-309.
169. Hagman J, Belanger C, Travis A, Turck CW, Grosschedl R. Cloning and functional characterization of early B-cell factor, a regulator of lymphocyte-specific gene expression. *Genes Dev* 1993;7:760-73.
170. O'Riordan M, Grosschedl R. Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity* 1999;11:21-31.

171. Lin H, Grosschedl R. Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature* 1995;376:263-7.
172. Thevenin C, Nutt SL, Busslinger M. Early function of Pax5 (BSAP) before the pre-B cell receptor stage of B lymphopoiesis. *J Exp Med* 1998;188:735-744.
173. Walther C, Guenet JL, Simon D, Deutsch U, Jostes B, Goulding MD, Plachov D, Balling R, Gruss P. Pax: a murine multigene family of paired box-containing genes. *Genomics* 1991;11:424-34.
174. Maier H, Hagman J. Roles of EBF and Pax-5 in B lineage commitment and development. *Sem Immunol* 2002;14:415-422.
175. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337-42.
176. Takayanagi H, Kim S, Matsuo K, et al. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature* 2002;416:744-9.
177. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger IM. RANKL-RANK signalling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med* 2006;12:17-25.
178. Lee SK, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinol* 1999;140:3552-61.
179. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-19.

180. Stejskal D, Bartek J, Pastorkova R, Ružiča V, Oral I, Horalik D.  
Osteoprotegerin, RANK, RANKL. *Biomed Papers* 2001. 145:61-64.
181. Boyce B, Xing L. Biology of RANK, RANKL and osteoprotegerin. *Arth Res Ther* 2007;9Suppl1:1-7.
182. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ.  
Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine Rev* 1999;20:345-357.
183. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature* 2003;4:638-649.
184. Lorenzo JA, Sousa SL, Fonseca JM, Hock JM, Medlock ES. Colony-stimulating factors regulate the development of multinucleated osteoclasts from recently replicated cells in vitro. *J Clin Invest* 1987;80:160-4.
185. MacDonald BR, Mundy GR, Clark S, Wang EA, Kuehl TJ, Stanley ER, Roodman GD. Effects of human recombinant CSF-GM and highly purified CSF-1 on the formation of multinucleated cells with osteoclast characteristics in long-term bone marrow cultures. *J Bone Miner Res* 1986;1:227-33.
186. Kurihara N, Chenu C, Miller M, Civin C, Roodman GD. Identification of committed mononuclear precursors for osteoclast-like cells formed in long term human marrow cultures. *Endocrinol* 1990;126:2733-41.
187. Takahashi N, Udagawa N, Akatsu T, Tanaka H, Shionome M, Suda T. Role of colony-stimulating factors in osteoclast development. *J Bone Miner Res* 1991;6:977-85.
188. Iwasaki M, Adachi Y, Minamno K, Suzuki Y, Zhang Y, Okigaki M, Nakano K, Koike Y, Wang J, Mukaide H, Taketani S, Mori Y, Takahashi H, Iwasaka

- T, Ikehara S. Mobilization of bone marrow cells by G-CSF rescues mice from cisplatin-induced renal failure and M-CSF enhances the effects of G-CSF. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:658-666.
189. Fu S, Liesveld J. Mobilization of hematopoietic stem cells. *Blood Rev* 2000;14:205-218.
190. Mena C, Kurihara N, Roodman GD. CFU-GM derived cells form osteoclasts at a very high efficiency: *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267:943-946.
191. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 2005;115:282-290.
192. Zhang YH, Heulsmann A, Tondravis MM, Mukherjee A, Abu-Amer Y. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *J Biol Chem* 2001;276:563-568.
193. Tashjian AH, Jr., Voelkel EF, Lazzaro M, Goad D, Bosma T, Levine L. Tumor necrosis factor-alpha (Cachectin) stimulates bone resorption in mouse calvaria via a prostaglandin-mediated mechanism. *Endocrinol* 1987;120:2029-36.
194. Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem* 2000;275:4858-64.
195. Park H, Jung YK, Park OJ, Lee YJ, Choi JY, Choi Y. Interaction of Fas ligand and Fas expressed on osteoclast precursors increases osteoclastogenesis. *J Immunol* 2005;175:7193-7201.

196. Wu X, McKenna MA, Feng X, Nagy TR, McDonald JM. Osteoclast apoptosis: the role of Fas in vivo and in vitro. *Endocrinol* 2003;144:5545-5555.
197. Kovačić N, Lukić IK, Grčević D, Katavić V, Croucher P, Marušić A. The Fas/Fas ligand system inhibits differentiation of murine osteoblasts but has a limited role in osteoblast and osteoclast apoptosis. *J Immunol* 2007;178:3379-3389.
198. Manolagas SC, Jilka RL. Mechanisms of disease: Bone marrow, cytokines, and bone remodeling--Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Eng J Med* 1995;332:305-11.
199. Roodman GD. Interleukin-6: an osteotropic factor? *J Bone Miner Res* 1992;7:475-8.
200. Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, Leukemia Inhibitory Factor, and Oncostatin M Stimulate Bone Resorption and Regulate the Expression of Receptor Activator of NF-kappaB Ligand, Osteoprotegerin, and Receptor Activator of NF-kappaB in Mouse Calvariae. *J Immunol* 2002;169:3353-62.
201. Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E(2) signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK) ligand/RANK system. *Endocrinol* 2005;146:1991-8.
202. Bendre MS, Gaddy-Kurten D, Mon-Foote T, Akel NS, Skinner RA, Nicholas RW, Suva LJ. Expression of Interleukin 8 and not Parathyroid

- Hormone-related Protein by Human Breast Cancer Cells Correlates with Bone Metastasis in Vivo. *Cancer Res* 2002;62:5571-9.
203. Bendre MS, Margulies AG, Walser B, Akel NS, Bhattacharyya S, Skinner RA, Swain F, Ramani V, Mohammad KS, Wessner LL, Martinez A, Guise TA, Chirgwin JM, Gaddy D, Suva LJ. Tumor-derived interleukin-8 stimulates osteolysis independent of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand pathway. *Cancer Res* 2005;65:11001-9.
204. Bendre MS, Montague DC, Peery T, Akel NS, Gaddy D, Suva LJ. Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone* 2003;33:28-37.
205. Owens JM, Gallagher AC, Chambers TJ. IL-10 modulates formation of osteoclasts in murine hemopoietic cultures. *J Immunol* 1996;157:936-40.
206. Xu LX, Kukita T, Kukita A, Otsuka T, Niho Y, Iijima T. Interleukin-10 selectively inhibits osteoclastogenesis by inhibiting differentiation of osteoclast progenitors into preosteoclast-like cells in rat bone marrow culture system. *J Cell Physiol* 1995;165:624-9.
207. Van Vlasselaer P, Borremans B, Van Der Heuvel R, Van Gorp U, De Waal Malefyt R. Interleukin-10 inhibits the osteogenic activity of mouse bone marrow. *Blood* 1993;82:2361-70.
208. Amcheslavsky A, Bar-Shavit Z. Interleukin (IL)-12 mediates the anti-osteoclastogenic activity of CpG-oligodeoxynucleotides. *J Cell Physiol* 2006;207:244-250.



209. Ogata Y, Kukita A, Kukita T, Komine M, Miyahara A, Miyazaki S, Kohashi O. A Novel Role of IL-15 in the Development of Osteoclasts: Inability to Replace Its Activity with IL-2. *J Immunol* 1999;162:2754-60.
210. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 1999;103:1345-52.
211. Lubberts E, Joosten LAB, Chabaud M, Van den Bersselaar L, Oppers B, Coenen-de Roo CJJ, Richards CD, Miossec P, Van den Berg WB. IL-4 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion. *J Clin Invest* 2000;105:1697-710.
212. Lubberts E, Van Den BL, Oppers-Walgreen B, Schwarzenberger P, Coenen-De Roo CJ, Kolls JK, Joosten LA, Van den Berg WB. IL-17 Promotes Bone Erosion in Murine Collagen-Induced Arthritis Through Loss of the Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand/Osteoprotegerin Balance. *J Immunol* 2003;170:2655-62.
213. Kawase Y, Hoshino T, Yokota K, Kuzuhara A, Nakamura M, Maeda Y, Nishiwaki E, Zenmyo M, Hiraoka K, Aizawa H, Yoshino K. Bone malformations in interleukin-18 transgenic mice. *J Bone Min Res* 2003;18:975-83.
214. Yamada N, Niwa S, Tsujimura T, Iwasaki T, Sugihara A, Futani H, Hayashi S, Okamura H, Akedo H, Terada N. Interleukin-18 and interleukin-12 synergistically inhibit osteoclastic bone-resorbing activity. *Bone* 2002;30:901-8.

215. Dai SM, Nishioka K, Yudoh K. Interleukin (IL) 18 stimulates osteoclast formation through synovial T cells in rheumatoid arthritis: comparison with IL1 beta and tumour necrosis factor alpha. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1379-86.
216. Peterlik M, Hoffmann O, Swetly P, Klaushofer K, Koller K. Recombinant gamma-interferon inhibits prostaglandin-mediated and parathyroid hormone-induced bone resorption in cultured neonatal mouse calvaria. *FEBS Lett* 1985;185:287-90.
217. Takahashi N, Mundy GR, Roodman GD. Recombinant human interferon-gamma inhibits formation of human osteoclast-like cells. *J Immunol* 1986;137:3544-9.
218. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, Taniguchi T. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- gamma. *Nature* 2000;408:600-5.
219. Hattersley G, Dorey E, Horton MA, Chambers TJ. Human macrophage colony-stimulating factor inhibits bone resorption by osteoclasts disaggregated from rat bone. *J Cell Physiol* 1988;137:199-203.
220. Shiina-Ishimi Y, Abe E, Tanaka H, Suda T. Synthesis of colony-stimulating factor (CSF) and differentiation inducing factor (D-factor) by osteoblastic cells, clone MC3T3-E1. *Biochem Biophys Res Comm* 1986;134:400-6.
221. Avnet S, Cenni E, Perut F, Granchi D, Brandi ML, Giunti A, Baldini N. Interferon-alpha inhibits in vitro osteoclast differentiation and renal cell carcinoma-induced angiogenesis. *Int J Oncol* 2007;30:469-76.

222. Goodman GR, Dissanayake IR, Gorodetsky E, Zhou H, Ma YF, Jee WS, Epstein S. Interferon-alpha, unlike interferon-gamma, does not cause bone loss in the rat. *Bone* 1999;25:459-63.
223. Takayanagi H, Kim S, Matsuo K, Suzuki H, Suzuki T, Sato K, Yokochi T, Oda H, Nakamura K, Ida N, Wagner EF, Taniguchi T. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature* 2002;416:744-9.
224. Lukić IK, Grčević D, Kovačić N, Ivčević S, Kalajzić I, Marušić A. Alteration of newly induced endochondral bone formation in adult mice without tumour necrosis factor receptor 1. *Clin Exp Immunol* 2005;132:236-244.
225. Simpson GG. The principles of classification and a classification of mammals. *Bull Amer Museum Nat Hist* 1945;85:88-90.
226. [www.nc3rs.org.uk](http://www.nc3rs.org.uk)
227. Bruell JH. Behavioral population genetics and wild *Mus musculus*. U: Lindzey G, Thiessen, ur. Contributions to behavior-genetic analysis. The mouse as a prototype. New York: Appleton-Century-Crofts; 1970, str. 261-91.
228. Snell GD, Staats J, Lyon M, Dunn LC, Grüneberg H, Hertwig P, et al. Standardized nomenclature for in bredstrains of mice: second listing. *Cancer Res* 1960;20:145-69.
229. Staats J. Standardized nomenclature for in bredstrains of mice: seventh listing. *Cancer Res* 1980;40:2083-128.
230. Crow JF, Little CC. Cancer and Inbred Mice. *Genetics* 2002;161:1357-1361.
231. Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: A Model of Immune Dysregulation. *Ann Rev Immunol* 2004;123:447-485.

232. Pantelouris EM. Observation on the immunobiology of nude mice. *Immunol* 1971;20:247.
233. Wortis HH. Pleiotropic effects of the nude mutation. *Birth Defects* 1975;11:582.
234. Wortis HH, Nehlsen S, Owen JJ. Abnormal development of the thymus in nude mice. *J Exp Med* 1971;134:681.
235. EA Hendrickson. The SCID mouse: relevance as an animal model system for studying human disease. *Am J Pathol* 1993;143:1511-1522.
236. Smithies O. Animal models of human genetic diseases. *Trend Genet* 1993;9:112-6.
237. Shastry BS. More to learn from gene knockouts. *Molec Cell Biochem* 1994;136:171-82.
238. <http://en.wikipedia.org>
239. von Freeden-Jeffry, P Vieira, LA Lucian, T McNeil, SE Burdach, R Murray. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 1995;181:1519-1526.
240. Hesslein DGT, Yang SY, Schatz DG. Origins of peripheral B cells in IL-7 receptor-deficient mice. *Mol Immunol* 2006;43:326-334.
241. Samaridis J, Casorati G, Traunecker A, Iglesias A, Gutierrez JC, Mueller U et al. Development of lymphocytes in interleukin 7-transgenic mice. *Eur J Immunol* 1991;21:453-60.
242. Fisher AG, Burdet C, LeMeur M, Haasner D, Gerber P, Ceredig R. Lymphoproliferative disorders in an IL-7 transgenic mouse line. *Leukemia* 1993;2:66-8.

243. Mertsching E, Meyer V, Linares J, Lombard-Platet S, Ceredig R.  
Interleukin-7, a non-redundant potent cytokine whose over-expression  
massively perturbs B-lymphopoiesis. *Int Rev Immunol* 1998;16:285–308.
244. Lee SK, Surh CD. Role of interleukin-7 in bone and T-cell homeostasis.  
*Immunol Rev* 2005;208:169–80.
245. BE Rich, J Campos-Torres, RI Tepper, RW Moreadith and P Leder.  
Cutaneous lymphoproliferation and lymphomas in interleukin 7 transgenic  
mice. *J Exp Med* 1993;177: 305-316.
246. Uehira M, Matsuda H, Hikita I, Sakata T, Fujiwara H, Nishimoto H. The  
development of dermatitis infiltrated by  $\gamma\delta$  T cells in IL-7 transgenic mice. *Int  
Immunol* 1993;5:1619-1627.
247. Jacquin C, Gran DE, Lee SK, Lorenzo JA, Aguil HL. Identification of  
Multiple Osteoclast Precursor Populations in Murine Bone Marrow. *J Bone  
Min Res* 2006;21:67-77.
248. Roodman GD. Advances in Bone Biology: The Osteoclast. *Endocrine Rev*  
1996;17: 308-332.
249. Reddy SV, Roodman GD. Control of osteoclast differentiation. *Crit Rev  
Eukaryot Gene Expr* 1998;8:1-17.
250. Sato T, Takeshi S, Ikeda K, Watanabe K. Generation of Bone-Resorbing  
Osteoclasts from B220<sup>+</sup> Cells: Its Role in Accelerated Osteoclastogenesis due  
to Estrogen Deficiency. *J Bone Min Res* 2001;16:2215-2221.
251. Katavić V, Grčević D, Lee SK, Kalinowski J, Jastrzebski S, Dougall W, et  
al. The surface antigen CD45R identifies a population of estrogen-regulated  
murine marrow cells that contain osteoclast precursors. *Bone* 2003;32:581–90.

252. Miyaura C, Onoe Y, Inada M, Maki K, Ikuta K, Ito M, et al. Increased B-lymphopoiesis by interleukin 7 induces bone loss in mice with intact ovarian function: similarity to estrogen deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9360–5.
253. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003;423:356-361.
254. Romas E, Gillespie M, Martin T. Involvement of receptor activator of NF $\kappa$ B ligand and tumor necrosis factor- $\alpha$  in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone* 2002;30:340-346.
255. Ulf Müller-Ladner, Thomas Pap, Renate E Gay, Michel Neidhart and Steffen Gay. Mechanisms of Disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Prac Rheumatol* 2005;1:102-110.
256. Ahmedin Jemal, Rebecca Siegel, Elizabeth Ward, Yongping Hao, Jiaquan Xu, Taylor Murray and Michael J. Thun. *Cancer Statistics 2008*; *CA Cancer J Clin* 2008. 58:71-96.
257. Fournier PG, Chirgwin JM, Guise TA. New insights into the role of T cells in the vicious cycle of bone metastases. *Curr Opin Rheumatol* 2006;18:396-404.
258. Roato I, Gorassini E, Beunetti G, Grano M, Ciufreda L, Mussa A, Ferracini R. IL-7 modulates osteoclastogenesis in patients affected by solid tumors. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1117:377-84.
259. Roato I, Gorassini E, Buffoni L, Lyberis P, Ruffini E, Bonello L, Baldi I, Cufreda L, Mussa A, Ferracini R. Spontaneous osteoclastogenesis is a predictive factor for bone metastases from non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2008;61:109-16.

260. Takashi Kameda, Hiroshi Mano, Tatsuhisa Yuasa, Yoshihisa Mori, Koshi Miyazawa, Miho Shiokawa, Yukiya Nakamaru, Emi Hiroi, Kenji Hiura, Akira Kameda, Na N. Yang, Yoshiyuki Hakeda, Masayoshi Kumegawa. Estrogen Inhibits Bone Resorption by Directly Inducing Apoptosis of the Bone-resorbing Osteoclasts. *J Exp Med* 1997;186:489-495.
261. Robert J. Benschop, John C. Cambier. B cell development: signal transduction by antigen receptors and their surrogates. *Curr Op Immunol* 1999;11:143-151.
262. Melchers F. B cell development and its deregulation to transformed states at the pre-B cell receptor-expressing pre-BII cell stage. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005;294:1-17.
263. Skeen MJ, Ziegler HK. Induction of murine peritoneal gamma/delta T cells and their role in resistance to bacterial infection. *J Exp Med* 1993. 178:971-84.
264. Husheem M, Nyman JK, Vaaraniemi J, Vaananen HK, Hentunen TA. Characterization of circulating human osteoclast progenitors: development of in vitro resorption assay. *Calcif Tissue Int* 2005;76:222-30.
265. Sasmono RT, Oceandy D, Pollard JW, Tong W, Pavli P, Wainwright BJ, Ostrowski MC, Himes SR, Hume DA. A macrophage colony-stimulating factor receptor-green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse. *Blood* 2003;101:1155-63.
266. Lee SK, Kalinowski JF, Jastrzebski SL, Puddington L, Lorenzo JA. Interleukin-7 is a direct inhibitor of in vitro osteoclastogenesis. *Endocrinol* 2003;144:3524-31.

267. Tayyar S, Weinhold PS, Butler RA, Woodard JC, Zardiackas LD, St John KR, Bledsoe JM, Gilbert JA. Computer simulation of trabecular remodeling using a simplified structural model. *Bone* 1999;25: 733-9.
268. Franceschi RT, Ge C, Xiao G, Roca H, Jiang D. Transcriptional regulation of osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1116:196-207.
269. Komori T. Regulation of bone development and maintenance by Runx2. *Front Biosci* 2008;13:898-903.
270. Shen J, Hovhannisyanyan H, Lian JB, Montecino MA, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ. Transcriptional Induction of the Osteocalcin Gene during Osteoblast Differentiation Involves Acetylation of Histones H3 and H4. *Mol Endocrinol* 2003;17:743-56.
271. Granholm S, Lundberg P, Lerner UH. Expression of the calcitonin receptor, calcitonin receptor-like receptor, and receptor activity modifying proteins during osteoclast differentiation. *J Cell Biochem* 2008;104:920-933.
272. Carsetti R. The development of B cells in the bone marrow is controlled by the balance between cell-autonomous mechanisms and signals from the microenvironment. *J Exp Med* 2000;191:5-8.
273. Iwata M, Graf L, Awaya N, Torok-Storb B. Functional interleukin-7 receptors (IL-7Rs) are expressed by marrow stromal cells: binding of IL-7 increases levels of IL-6 mRNA and secreted protein. *Blood* 2002;100:1318-1325.
274. Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi BI, Nagasawa T. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 2004;20:707-718.



275. Labrie JE III, Sah AP, Allman DM, Cancro MP, Gerstein RM. Bone marrow microenvironmental changes underlie reduced RAG-mediated recombination and B cell generation in aged mice. *J Exp Med* 2004;200:411-423.
276. Labrie JE III, Borghesi L, Gerstein RM. Bone marrow microenvironmental changes in aged mice compromise V(D)J recombinase activity and B cell generation. *Sem Immunol* 2005;17:347-355.
277. Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasei K, Miyada T, Anderson DM, Suda T. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-fms and receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B (RANK) receptors. *J Exp Med* 1999;190:1741-1754.
278. Nakao A, Fukushima H, Kajiya H, Ozeki S, Okabe K. RANKL-stimulated TNF $\alpha$  production in osteoclast precursor cells promotes osteoclastogenesis by modulating RANK signaling pathways. *Biochem Biophys Res Comm* 2007;357:945-950.
279. Fatourechhi GE, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest* 2003;111:1221-1230.
280. Giner M, Rios MJ, Montoya MJ, Vazquez MA, Naji L, Perez-Cano R. RANKL/OPG in primary cultures of osteoblasts from post-menopausal women. Differences between osteoporotic hip fractures and osteoarthritis. *J St Biochem Mol Biol* 2009;113:46-51.
281. Lorenzo J. Characterization of osteoclast precursor cells in murine bone marrow. *J Musculoskel Neuron Interact* 2003;3:273-277.

282. Blin-Wakkach C, Wakkach A, Quincey D, Carle GF. Interleukin-7 partially rescues B-lymphopoiesis in osteopetrotic oc/oc mice through the engagement of B220+CD11b+ progenitors. *Exp Hematol* 2006;34:851-9.
283. Baird AM, Gerstein RM, Berg LJ. The role of cytokine receptor signaling in lymphocyte development. *Curr Opin Immunol* 1999;11:157-66.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1978. godine u Zagrebu. Osnovnu i srednju školu završila sam u Velikoj Gorici. Medicinski fakultet upisala sam 1997. godine, a završila 2003. godine s prosječnom ocjena 4,5. Tijekom studija bila sam demonstrator u Zavodu za patologiju. Državni ispit položila sam 2004. godine. Nakon obavljenog pripravniškog staža radila sam kao znanstveni novak u Zavodu za anatomiju "Drago Perović" Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu gdje sam sudjelovala u vođenju nastave na hrvatskom i engleskom studiju te. Tijekom tog perioda, kao novak na projektu prof. Ane Marušić bavila sam se koštanom imunologijom u laboratoriju za molekularnu imunologiju. Krajem 8. mjeseca 2006. godine započela sam specijalizaciju iz Kliničke onkologije i radioterapije u Klinici za onkologiju i nuklearnu medicinu Kliničke bolnice Sestre milosrdnice.

Autor sam i koautor nekoliko znanstvenih radova:

1. Salopek D, Lovrić J, Hren D, Marušić A. Temporal structure of firstyear courses and success at course exams: comparison of traditional continual and block delivery of anatomy and chemistry courses. *Croat Med J* 2009;50:61-8
2. Murgić J, Salopek D, Prpić M, Jukić T, Kusić Z. Clinical guidelines development and usage: a critical insight and literature review: thyroid disease diagnostic algorithms. *Coll Antropol.* 2008 Dec;32(4):1283-90.
3. Salopek D, Grčević D, Katavić V, Kovačić N, Lukić IK, Marušić A. Increased bone resorption and osteopenia are a part of the lymphoproliferative phenotype of mice with systemic over-expression of interleukin-7 gene driven by MHC class II promoter. *Immunol Lett.* 2008 Dec 22;121(2):134-9.

4. Petrovečki V, Salopek D, Topic I, Marušić A. Chronic unreduced anterior shoulder dislocation. Application of anatomy to forensic identification. *Am J Forensic Med Pathol* 2008;29: 89–91.
5. Barbarić I, Perry MJ, Dear TN, Rodrigues Da Costa A, Salopek D, Marušić A, Hough T, Wells S, Hunter AJ, Cheeseman M, Brown SD. An ENU-induced mutation in the *Ankrd11* gene results in an osteopenia-like phenotype in the mouse mutant Yoda. *Physiol Genomics*. 2008 Feb 19;32(3):311-21.
6. Salopek D, Dujmović A, Hađina J, Topić I. Bilateral arterial and nervous variations in the human upper limb: a case report. *Ann Anat*. 2007;189(3):290-4.