

# Diferencijacija i aktivnost osteoblasta i osteoklasta u mišjem modelu reumatoidnoga artritisa

---

Ikić Matijašević, Marina

Doctoral thesis / Disertacija

2013

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:856472>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-14**



*Repository / Repozitorij:*

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





## **Središnja medicinska knjižnica**

**Ikić Matijašević, Marina (2013) *Diferencijacija i aktivnost osteoblasta i osteoklasta u mišjem modelu reumatoidnoga artritisa [Differentiation and activity of osteoblasts and osteoclasts in a mouse model of rheumatoid arthritis].* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/2170>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marina Ikić Matijašević**

**Diferencijacija i aktivnost osteoblasta  
i osteoklasta u mišjem modelu  
reumatoidnoga artritisa**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2013.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marina Ikić Matijašević**

**Diferencijacija i aktivnost osteoblasta  
i osteoklasta u mišjem modelu  
reumatoidnoga artritisa**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2013.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za molekularnu imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Pokusi u sklopu ovog istraživanja omogućeni su sredstvima znanstvenoistraživačkih projekata Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske 108-1080229-0142 (voditelj prof. dr. sc. Danka Grčević), 108-1080229-0140 (voditelj: prof. dr. sc. Ana Marušić) i 108-1080229-034 (voditelj: prof. dr. sc. Vedran Katavić).

Voditelj rada: prof. dr. sc. Danka Grčević

Zahvaljujem prof. dr. sc. Danki Grčević na poučavanju, usmjeravanju, pomoći, savjetima, ohrabrenju i nadasve strpljenju pri izradi i pisanju ovoga rada. Zahvaljujem (abecedno) prof. dr. sc. Vedranu Kataviću i doc. dr. sc. Nataši Kovačić na velikoj pomoći i savjetima tijekom izrade ovoga rada. Veliko hvala suradnicama (abecedno) Sanji Ivčević, bacc. med. lab. dg. i Katerini Zrinski-Petrović, med. lab. teh. na pomoći pri izvođenju pokusa, strpljenju pri poučavanju radu u laboratoriju i trajnoj podršci, te kolegama (abecedno): dr. sc. Hrvoju Cviji, ing. mol. biol., doc. dr. sc. Tomislavu Kelavi, dr. sc. Elviri Lazić Mosler, dr. med., i Saniji Kuzmac, ing. mol. biol. na savjetima i pomoći pri izvođenju pokusa. Zahvaljujem svojim roditeljima i sestrama što su uvijek vjerovali u moj uspjeh. Na kraju, zahvaljujem Urošu što mi je uvijek tu kad ga trebam, što mi je bio podrška kroz cijeli proces pisanja i sa strpljenjem i ljubavi mi pomogao da prebrodim krize.

# SADRŽAJ

POPIS KRATICA.....	i
1. UVOD.....	1
1.1. Koštano tkivo.....	1
1.1.1. Koštana međustanična tvar.....	2
1.1.2. Osteoklasti.....	3
1.1.3. Osteoblasti.....	5
1.1.4. Osteociti.....	8
1.2. Međudjelovanje osteoblasta i osteoklasta.....	8
1.3. Koštana pregradnja.....	10
1.4. Upalne bolesti zglobova.....	11
1.4.1. Reumatoidni artritis.....	12
1.4.2. Oštećenje kosti izazvano upalom.....	13
1.4.2.1. Sinovitis i osteitis.....	13
1.4.2.2. Oštećenje kosti u reumatoidnom artritisu.....	14
1.5. Međudjelovanje imunskog i koštanog sustava – uloga proupalnih citokina i kemokina u patogenezi reumatoidnoga artritisa i gubitku kosti.....	16
1.5.1. Citokini.....	17
1.5.2. Kemokini.....	20
1.6. Životinjski modeli reumatoidnoga artritisa.....	21
1.6.1. Artritis potaknut kolagenom (CIA).....	21
1.6.2. Patogeneza artritisa potaknutog kolagenom.....	23
2. CILJEVI I SVRHA ISTRAŽIVANJA.....	25
3. HIPOTEZA.....	26
4. MATERIJALI I METODE.....	27
4.1. Pokusne životinje.....	27
4.2. Ustroj pokusa.....	27
4.3. Izazivanje artritisa u C57BL/6 miševa.....	29
4.4. Klinička, laboratorijska i histološka procjena artritisa.....	30
4.5. Određivanje anti-kolagenskih protutijela s pomoću postupka ELISA.....	31
4.6. Kultura stanica.....	32
4.6.1. Kultura osteoklasta.....	32
4.6.2. Kultura osteoblasta.....	33

4.7. Kolorimetrijsko određivanje aktivnosti enzima TRAP i AP u staničnom lizatu.....	33
4.8. Analiza genskog izražaja.....	34
4.9. Protočna citometrija.....	36
4.10. Sortiranje osteoklastnih progenitora i kultura osteoklasta.....	36
4.11. Analiza koštanog metabolizma.....	37
4.11.1. Mikro-kompjutorizirana tomografija.....	37
4.11.2. Dinamička histomorfometrija.....	38
4.11.3. Statička histomorfometrija.....	38
4.12. Statistički postupci.....	39
5. REZULTATI.....	40
5.1. Klinička, laboratorijska i histološka procjena artritisa potaknutog kolagenom u miševa soja C57BL/6.....	40
5.1.1. Kliničko bodovanje artritisa.....	40
5.1.2. Analiza razine anti-kolagenskih protutijela u miševa s artritisom potaknutim kolagenom.....	41
5.1.3. Histološki nalaz oštećenja zgloba u artritisu potaknutom kolagenom.....	44
5.2. Učinak artritisa na koštani metabolizam <i>in vivo</i> .....	46
5.2.1. Učinak artritisa na sustavni gubitak kosti.....	46
5.2.2. Učinak artritisa na periartikularni gubitak kosti.....	47
5.3. Diferencijacija i aktivnost koštanih stanica u modelu artritisa potaknutog kolagenom.....	50
5.3.1. Diferencijacija i aktivnost osteoklasta u modelu artritisa potaknutog kolagenom.....	50
5.3.1.1. Učinak artritisa na osteoklastogenetski potencijal hematopoetskih stanica <i>in vitro</i> .....	50
5.3.1.2. Učinak artritisa na izražaj osteoklastnih diferencijacijskih gena u stanicama hematopoetskih tkiva.....	56
5.3.1.3. Učinak artritisa na stanične populacije osteoklastnih progenitora.....	62
5.3.2. Diferencijacija i aktivnost osteoblasta u modelu artritisa potaknutog kolagenom.....	68
5.3.2.1. Učinak artritisa na osteoblastogenetski potencijal stromalnih stanica <i>in vitro</i> .....	68
5.3.2.2. Učinak artritisa na izražaj osteoblastnih diferencijacijskih gena u mezenhimnim stanicama koštanog okoliša.....	71
5.3.2.3. Učinak artritisa na staničnu populaciju osteoblastnih progenitora.....	75
5.3.2.4. Učinak artritisa na aktivnost osteoblasta u periartikularnoj kosti.....	77
5.4. Učinak artritisa na populacije imunskih stanica i izražaj upalnih citokina i kemokina u staničnim populacijama mikrookoliša koštane srži i periferije.....	79
5.4.1. Učinak artritisa na promjene u populacijama imunskih stanica.....	79
5.4.2. Učinak artritisa na izražaj upalnih citokina i kemokina.....	86
6. RASPRAVA.....	91
6.1. Artritis uzrokuje pojačanu koštanu pregradnju te lokalni, periartikularni i sustavni gubitak kosti.....	91
6.2. Artritis uzrokuje gubitak kosti poticanjem diferencijacije i aktivnosti osteoklasta te smanjenjem aktivnosti osteoblasta.....	94
6.2.1. Diferencijacija i aktivnost osteoklasta u artritisu.....	94

6.2.2. Diferencijacija i aktivnost osteoblasta u artritisu.....	96
6.3. Artritis potaknut kolagenom stvara osteoresorptivni okoliš poticanjem mijelopoeze i mijenjanjem izražaja upalnih citokina i kemokina.....	98
6.3.1. Učinak artritisa na stanične populacije hematopoetskih tkiva koštanog okoliša i periferije.....	98
6.3.2. Učinak artritisa na izražaj upalnih citokina i kemokina.....	100
7. ZAKLJUČCI.....	103
8. SAŽETAK.....	106
9. SUMMARY.....	108
10. LITERATURA.....	110
11. ŽIVOTOPIS.....	120



## POPIS KRATICA

anti-CCP	protutijela usmjerena protiv cikličkih citruliranih proteina
AP	alkalna fosfataza (prema engl. <i>alkaline phosphatase</i> )
AP-1 (c-jun)	aktivirajuća bjelančevina 1, Jun onkogen (prema engl. <i>activating protein-1</i> )
APC	alofikocijanin (prema engl. <i>allophycocyanine</i> )
ATF4	aktivirajući transkripcijski čimbenik 4 (prema engl. <i>activating transcription factor 4</i> )
BMPs	koštane oblikotvorne bjelančevine (prema engl. <i>bone morphogenetic proteins</i> )
BMU	temeljna višestanična jedinica (prema engl. <i>basic multicellular unit</i> )
BSP	koštana sijalobjelančevina (prema engl. <i>bone sialoprotein</i> )
BV/TV	koštani volumen (prema engl. <i>bone volume/total volume</i> )
CalcR	kalcitoninski receptor (prema engl. <i>calcitonin receptor</i> )
Cat K	katapsin K (prema engl. <i>chatepsin K</i> )
CD	diferencijacijski biljeg (prema engl. <i>cluster of differentiation</i> )
cDNA	komplementarna DNA (prema engl. <i>complementary DNA</i> )
CFA	kompletni Freundov adjuvans (prema engl. <i>complete Freund's adjuvant</i> )
cFms	receptor čimbenika stvaranja monocitnih kolonija (prema engl. <i>macrophage colony-stimulating factor receptor</i> )
CIA	artritis potaknut kolagenom (prema engl. <i>collagen induced arthritis</i> )
Ct	prag broja ciklusa (prema engl. <i>cycle threshold</i> )
CII	kolagen tipa II
DC	dendritična stanica (prema engl. <i>dendritic cell</i> )
ELISA	imunoenzimski postupak (prema engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
FBS	fetalni goveđi serum (prema engl. <i>fetal bovine serum</i> )
FGF	čimbenik rasta fibroblasta (prema engl. <i>fibroblast growth factor</i> )
FITC	fluorescein-izotijocijanat (prema engl. <i>fluoresceinisothyocyanate</i> )
HGF	hepatocitni čimbenik rasta (prema engl. <i>hepatocyte growth factor</i> )
IFA	inkompletni Freundov adjuvans (prema engl. <i>incomplete Freund's adjuvant</i> )
IFN	interferon
IGF	čimbenik rasta sličan inzulinu (prema engl. <i>insulin-like growth factor</i> )
IL	interleukin
L2	drugi slabinski kralježak
M-CSF	čimbenik stvaranja monocitnih kolonija (M-CSF, prema engl. <i>macrophage colony-stimulating factor</i> )
MCP-1	monocitni kemotaktični protein (prema engl. <i>monocyte chemoattractant protein-1</i> )
MHCII	glavni sklop tkivne podudarnosti skupine II (prema engl. <i>major histocompatibility complex class II</i> )
MMPs	metaloproteinaze međustanične tvari (prema engl. <i>matrix metalloproteinases</i> )
MR	magnetska rezonancija
NFAT	jezgrin čimbenik aktiviranih limfocita T (prema engl. <i>nuclear factor of activated T cells</i> )
NF-κB	jezgrin čimbenik κB (prema engl. <i>nuclear factor κB</i> )
NK	prirodnoubilačka stanica (prema engl. <i>natural killer</i> )
OC	osteokalcin
OCIF	čimbenik inhibicije osteoklastogeneze (prema engl. <i>osteoclastogenesis inhibitory factor</i> )
ODAR	osteoklastni receptor za diferencijaciju i aktivaciju (prema engl. <i>osteoclast differentiation and activation receptor</i> )
ODF	čimbenik diferencijacije osteoklasta (prema engl. <i>osteoclast differentiation factor</i> )
OPG	osteoprotegerin
Osx	osteriks (prema engl. <i>osterix</i> )
PE	fikoeritrin (prema engl. <i>phycoerithrin</i> )
PE Cy7	fikoeritrin cijanin 7 (prema engl. <i>phycoerithrin-cyanine 7</i> )
PBS	fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (prema engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
qPCR	kvantitativna lančana reakcija polimerazom (prema engl. <i>quantitative polymerase chain reaction</i> )
PDGF BB	čimbenik rasta porijeklom iz trombocita (prema engl. <i>platelet derived growth factor BB</i> )
PTH	paratiroidni hormon
pNPP	p-nitrofenilni fosfat (prema engl. <i>p-nitrophenylphosphate</i> )

qPCR	kvantitativna lančana reakcija polimeraze (prema engl. <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i> )
RA	reumatoidni artritis
RANK	receptor za pobudu jezgrinog čimbenika κB (prema engl. <i>receptor activator of nuclar factor κB</i> )
RANKL	ligand receptora za pobudu jezgrinog čimbenika κB (prema engl. <i>receptor activator of nuclar factor κB ligand</i> )
RNA	ribonukleinska kiselina (prema engl. <i>ribonucleic acid</i> )
Runx2	transkripcijski čimbenik povezan s bjelančevinom "runt" 2 (prema engl. <i>runt-related transcription factor 2</i> )
SD	standardna devijacija
S1P	sfingozin 1 fosfat (prema engl. <i>sphingosine 1 phosphate</i> )
SIBLING	vrsta bjelančevinske obitelji (prema engl. <i>small integrin-binding ligand, N-glycosated protein</i> )
Tb.N	broj koštanih gredica (prema engl. <i>trabecular number</i> )
Tb.Th	širina koštanih gredica (prema engl. <i>trabecular thickness</i> )
Tb.Sp	razdvojenost koštanih gredica (prema engl. <i>trabecular separation</i> )
TGF	transformirajući čimbenik rasta (prema engl. <i>transforming growth factor</i> )
TNF	čimbenik tumorske nekroze (prema engl. <i>tumor necrosis factor</i> )
TNFR	TNF receptor
TRAP	kisela fosfataza otporna na tartarat (prema engl. <i>tartrate resistant acid phosphatase</i> )
TRAF	čimbenik povezan s receptorima obitelji TNF (prema engl. <i>TNF-receptor associated factor</i> )
Wnt	hibridna kratica od Wg (prema engl. <i>wingless in Drosophila</i> ) i Int (prema engl. <i>integration 1</i> )
1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	vitamin D3

# 1. UVOD

## 1.1. Koštano tkivo

Kost je specijalizirano vezivno tkivo koje ima nekoliko važnih funkcija: mehaničku (služi kao potporanj tijelu i omogućuje djelovanje mišića), zaštitnu (štiti organe i koštanu srž), metaboličku (održava ravnotežu tjelesnog kalcija i fosfata), te služi kao okoliš u kojem se odvija hematopoeza i spremnik je faktora rasta i citokina (1). Unatoč svojoj rigidnoj strukturi, kost je dinamičan organ koji tijekom života nekoliko puta prolazi proces razgradnje i ponovne izgradnje.

Kost se počinje stvarati između drugog i trećeg mjeseca unutarmaterničnoga života, a konačno se oblikuje u odrasloj dobi. Kost se stvara ili iz hrskavične osnove kosti koja se postupno resorbira i zamjenjuje koštanim tkivom, što nazivamo enhondralnim okoštavanjem, ili se razvija izravno iz mezenhimne osnove, intramembranskim okoštavanjem. Treći oblik stvaranja kosti, tzv. apozicijski rast, odvija se u području periosta, a njime kost raste u širinu (2, 3).

Po svojem izgledu kosti se mogu svrstati u duge kosti, plosnate kosti i kratke kosti. U dugim kostima razlikujemo dijafizu (središnji, najdulji dio kosti), epifizu (terminalni dio na oba kraja kosti koji se nalazi ispod zglobne hrskavice) i metafizu (područje između dijafize i epifize). U djece i mladih osoba u kojih kosti još uvijek rastu, na prijelazu između metafize i epifize, nalazi se ploča rasta građena od hrskavice koja je odgovorna za rast kosti u duljinu (2, 3). Dijafiza je primarno građena od čvrste kortikalne kosti, dok su metafiza i epifiza građene uglavnom od trabekularne kosti koja je okružena relativno tankom kortikalnom kosti. Ljudski kostur se sastoji od 80% kortikalne i 20% trabekularne kosti, iako različite kosti imaju drugačiji omjer kortikalne i trabekularne kosti (4). Kortikalna kost je gusta, čvrsta kost koja okružuje medularnu šupljinu i građena je od osteona kroz čiju sredinu prolaze Haversovi kanali, koji sadrže krvne žile i živčane stanice te su obloženi slojevima koštane međustanične tvari s osteocitima. Osteociti se nalaze u lakunama i tvore sincicij međusobno povezanih stanica, čineći mrežu svojim brojnim osteocitnim izdancima. Kortikalna kost je uobičajeno slabije metabolički aktivna u odnosu na trabekularnu kost. Poroznost kortikalne kosti je manja od 5%, ali to ovisi o omjeru neaktivnih i aktivnih osteona, u kojim se odvija koštana pregradnja. Pojačana koštana pregradnja dovodi do veće poroznosti kortikalne kosti i smanjene kortikalne mase. Kortikalna kost s vanjske strane ima periostalni sloj, a stvaranje

kosti na periostalnoj strani uobičajeno nadilazi razgradnju kosti, tako da se promjer kosti starenjem povećava. S unutrašnje strane, prema medularnoj šupljini, nalazi se endostalni sloj kortikalne kosti u kojem se odvija aktivnija koštana pregradnja, najvjerojatnije kao posljedica veće izloženosti citokinima iz koštane srži. Razgradnja kosti u endostalnom sloju uobičajeno nadilazi stvaranje kosti, tako da se medularna šupljina starenjem širi. Trabekularna kost se sastoji od koštanih gredica i pločica koje su međusobno povezane, a između kojih se nalaze šupljine ispunjene koštanom srži. S vanjske strane kost je obložena pokosnicom tj. periostom, a s unutrašnje strane kortikalne kosti i oko trabekularne kosti nalazi se tanko specijalizirano vezivno tkivo endost, koji sadrži obložne koštane stanice koje su uglavnom neaktivne i sprječavaju nepotrebnu razgradnju kosti osteoklastima (5). Medularna šupljina je ispunjena koštanom srži u kojoj se nalazi stroma s mezenhimnim stanicama, koje se mogu diferencirati u koštano tkivo, krvne žile i sazrijevajuće hematopoetske stanice koje se puštaju u krvotok. Sama medularna šupljina na endostalnoj strani kosti je mjesto međudjelovanja hematopoetskih matičnih stanica, osteoblasta, osteoklasta i imunskih stanica, što je potrebno za preživljenje i diferencijaciju tih stanica (1).

Histološki, kost je građena od koštane međustanične tvari u koju su uklopljene koštane stanice – osteoklasti (stanice koje razgrađuju koštanu međustaničnu tvar), osteoblasti (stanice koje stvaraju koštanu međustaničnu tvar) i osteociti (stanice koje djeluju kao mehanosenzori i imaju vodeću ulogu u koštanoj pregradnji).

### **1.1.1. Koštana međustanična tvar**

Koštana međustanična tvar se sastoji od anorganskog i organskog dijela. Anorganski dio većinom tvore mineralne soli kalcijevog hidroksiapatita, čiji su kristali uklopljeni u mrežu kolagenih vlakana. Organski dio (osteoid) uglavnom čine bjelančevine, a glavna bjelančevina je kolagen tipa I, kojega izlučuju osteoblasti. Ova bjelančevina je sastavljena od tri polipeptidna lanca (dva lanca  $\alpha 1$  i jednoga lanca  $\alpha 2$ ) omotanih na način da čine trostruku uzvojnici. Ostale koštane bjelančevine ne prelaze više od 10% udjela u bjelančevinama kosti, a radi se o: proteoglikanima, glikoproteinima, SIBLING-bjelančevinama (prema engl. *small integrin binding ligand*, N-glycosilated protein) i bjelančevinama gla ( $\gamma$ -karboksilirane bjelančevine) (5).

### 1.1.2. Osteoklasti

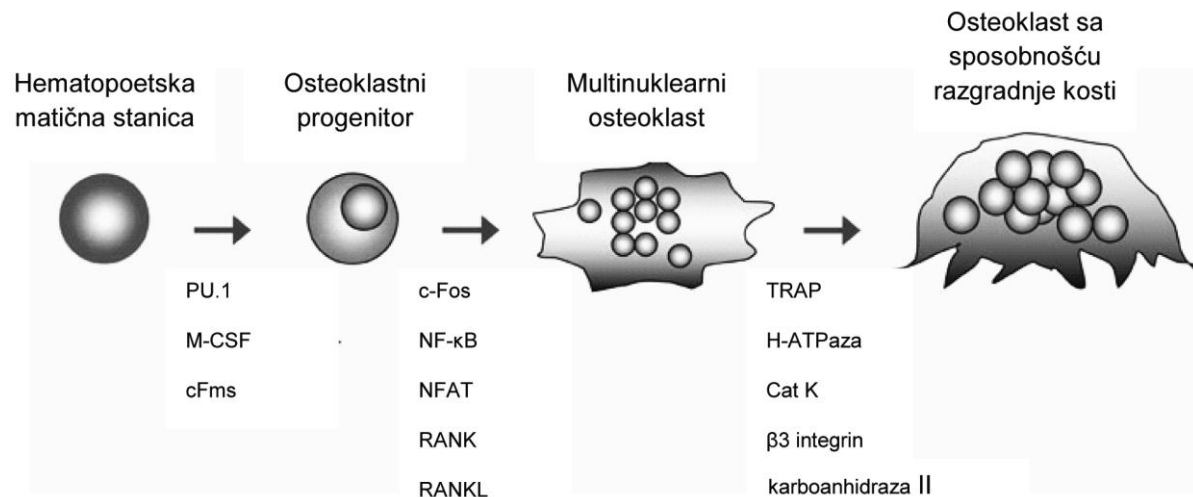
Osteoklasti su multinuklearne stanice koje imaju sposobnost resorpcije kosti i kao takve su nužne za proces koštane pregradnje, a nastaju citoplazmatskom fuzijom mononuklearnih monocitno/makrofagnih prethodnika s jednom jezgrom u zrele osteoklaste koji u citoplazmi mogu sadržavati i stotine jezgara (6) (Slika 1.). Zreli osteoklasti izražavaju kalcitoninski receptor (CalcR, prema engl. *calcitonin receptor*), vitronektinski receptor (CD51, vitronektinski receptor  $\alpha$ ), metaloproteinazu međustanične tvari 9 (MMP9, prema engl. *matrix metalloproteinase 9*), kiselu fosfatazu otpornu na tartarat (TRAP, prema engl. *tartrate resistant acid phosphatase*) i katepsin K (Cat K, prema eng. *cathepsin K*) (7, 8). Osteoklasti su stanice koje su relativno malobrojne, osim na mjestima intenzivne koštane pregradnje, a nalaze se s endostalne strane Haversovih kanala kortikalne i trabekularne kosti i periostalnoj površini ispod periosta. Morfološki gledano osteoklasti su polarizirane stanice koje imaju bazolateralnu stranu, koja je okrenuta od kosti, i specijaliziranu resorpcijsku površinu, koja je nabrana i priljubljena uz kost, a putem koje se odvija razgradnja kosti. Postoje dva osnovna mehanizma kojima osteoklasti razgrađuju kost; prvi je vakuolska protonska pumpa (H-ATPaza) koja stvara kiseli okoliš između nabrane površine osteoklasta i koštane površine u kojem se razgrađuje mineralizirana međustanična tvar, a drugi čine specijalizirani enzimi kao što su matriks metaloproteinaze i katepsini koji razgrađuju organsku međustaničnu tvar (9). Zbog svojih jedinstvenih karakteristika (polikarioni, protonska pumpa i visoka enzimatska aktivnost), osteoklasti su visoko specijalizirane stanice koje su na osnovu svoje građe stvorene za razgradnju kosti i jedine su stanice koje na takav način mogu razgraditi kost. Životni vijek osteoklasta je ograničen te oni nakon što su resorbirali kost odumiru apoptozom.

Osteoklastni prethodnici potiču iz mononuklearne monocitno/makrofagne linije hematopoetskih stanica i uobičajeno se nalaze u medularnoj šupljini, krvotoku i slezeni (10, 11), te se čini da monocitne stanice, uključujući i osteoklastne prethodnike, cirkuliraju krvotokom i migriraju do koštanih površina s ciljem resorpcije kosti (12-14). Osteoklastni prethodnici izražavaju monocitno/makrofagne biljege [CD11b (Mac-1), CD115, CD68 i Kn22]. Analiza usmjerenih post-mitotičnih osteoklastnih prethodnika protočnom citometrijom pokazala je da imaju fenotip sličan makrofagima, izražavaju nespecifičnu esterazu, Mac-1, Mac-2 i Gr-1, dok su negativni za biljege limfocita B (B220) i limfocita T (CD3), a za razliku od makrofaga ne izražavaju F4/80 i gube CD11b tijekom diferencijacije, te izražavaju 121F i integrin  $\alpha v \beta 3$  (15-17). Nekoliko je istraživačkih skupina definiralo populacije osteoklastnih prethodnika iz koštane srži i slezene te uvjete njihove diferencijacije *in vitro* u kokulturi

stromalnih stanica uz dodatak ligand receptora za pobudu jezgrinog čimbenika  $\kappa B$  (RANKL, prema engl. *receptor activator of nuclear factor (NF)  $\kappa B$  ligand* ili ODF, prema engl. *osteoclast differentiation factor*) i čimbenika stvaranja monocitnih kolonija (M-CSF, prema engl. *macrophage colony-stimulating factor*), koji usmjeravaju diferencijaciju stanica prema osteoklastima (18, 19). Osteoklasni prethodnici iz koštane srži ne izražavaju biljege limfocita B (B220), granulocita (Gr-1) i eritroidne loze (Ter119). Kasnije studije identificirale su najpotentniju populaciju osteoklastnih prethodnika fenotipa  $CD3^+B220^-CD117^+CD115^+CD11b^{-/low}$ , koja čini oko 2% stanica koštane srži i ima najveći osteoklastogenetski potencijal *in vitro* (20).

Proces razvoja osteoklasta sastoji se od proliferacije i diferencijacije osteoklastnih prethodnika u mononuklearne preosteoklaste, nakon čega slijedi stapanje preosteoklasta u multinuklearne osteoklaste (Slika 1.) (9). U samom koštanom tkivu nalaze se brojne molekule koje reguliraju novačenje i diferencijaciju osteoklastnih prethodnika. Za usmjeravanje hematopoetskih prethodničkih stanica prema monocitno/makrofagnim prethodnicima potreban je transkripcijski čimbenik PU.1 (21), a za preživljenje i diferencijaciju usmjerenih monocitno/makrofagnih prethodnika je ključan M-CSF koji se veže za receptor čimbenika stvaranja monocitnih kolonija (cFms, prema engl. *macrophage colony-stimulating factor receptor*) izražen na njihovoj površini (22) (Slika 1.). *In vitro* se osteoklastogeneza može potaknuti vitaminom D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), paratiroidnim hormonom (PTH), deksametazonom, prostaglandinom E<sub>2</sub> i interleukinom (IL) -6, no u kulturi je uvijek potrebna prisutnost stromalnih stanica koštane srži, tj. prethodnika osteoblasta (23, 24). Prisutnost osteoblasta je nužna jer je diferencijacija, aktivnost i preživljenje osteoklasta ovisna o RANKL-u, membranskoj molekuli iz obitelji TNF izraženoj na osteoblastima, mezenhimnim matičnim stanicama, sinovijalnim stanicama i aktiviranim limfocitima T (25), koja se veže na receptor za pobudu jezgrinog čimbenika  $\kappa B$  (RANK, prema engl. *receptor activator of NF- $\kappa B$*  ili ODAR, prema engl. *osteoclast differentiation and activation receptor*) izražen na stanicama osteoklastne loze (26). S druge strane, topljivi receptor osteoprotegerin (OPG ili OCIF, prema engl. *osteoclastogenesis inhibitory factor*), produkt zrelih osteoblasta, vezanjem za RANKL priječi sazrijevanje i aktivaciju osteoklasta, a omjer RANKL/OPG važan je čimbenik u određivanju ukupne koštane mase (27). Mnogi čimbenici koji su povezani s koštanom resorpcijom, poput čimbenik tumorske nekroze (TNF- $\alpha$ , prema engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ), IL-1, i IL-6, izravno potiču osteoklastogenezu povećavajući izražaj RANKL-a na aktiviranim limfocitima (28). Unutarstanični signal za osteoklastogenezu potaknutu RANKL-om uključuje aktivaciju transkripcijskog čimbenika c-Jun (c-jun, Jun onkogen, AP-1, prema engl.

*activator protein-1*) i jezgrinog čimbenika aktiviranih limfocita T (NFAT, prema engl. *nuclear factor of activated T cells*), kao i izražaj transkripcijskog čimbenika c-Fos (29). Sklop NFAT/Fos/Jun ključan je za stvaranje zrelih osteoklasta (30, 31) (Slika 1.).



**Slika 1. Ključne molekule u diferencijaciji i funkciji osteoklasta.** U ranom stadiju, M-CSF/cFms i PU.1 reguliraju diferencijaciju hematopoetskih matičnih stanica u osteoklastne progenitore, koji fuzijom tvore multinuklearne stanice. RANKL/RANK potiče aktivaciju susljednih molekula čime se stvaraju zreli osteoklasti koji razgrađuju kost. RANK, receptor za pobudu jezgrinog čimbenika κB (prema engl. *receptor activator of nuclear factor κB*); RANKL, ligand receptora za pobudu jezgrinog čimbenika κB (prema engl. *receptor activator of nuclear factor (NF) κB ligand*); M-CSF, čimbenik stvaranja monocitnih kolonija (prema engl. *macrophage colony-stimulating factor*); cFms, receptor čimbenika stvaranja monocitnih kolonija (prema engl. *macrophage colony-stimulating factor receptor*); NFAT, jezgrin čimbenik aktiviranih limfocita T (prema engl. *nuclear factor of activated T cells*); PU.1, transkripcijski faktor PU.1; c-Fos, transkripcijski faktor c-Fos; TRAP, kiselna fosfataza otporna na tartarat (prema engl. *tartrate resistant acid phosphatase*); Cat K, katepsin K (prema engl. *cathepsin K*). Modificirano prema Lee KN (31).

### 1.1.3. Osteoblasti

Osteoblasti su stanice s nekoliko bioloških funkcija. Ključne su stanice u proizvodnji kosti jer stvaraju koštanu međustaničnu tvar, a svojim doprinosom mikrookolišu koštane srži sudjeluju u održavanju homeostaze hematopoetskih matičnih stanica. Osteoblasti su važni za diferencijaciju osteoklasta, a prema najnovijim istraživanjima sudjeluju i u regulaciji metabolizma glukoze i muške fertilitnosti u miševa [putem osteoklacina (OC)] (32). Citološki,

osteoblasti imaju jako bazofilnu citoplazmu, obilno mitohondrija i velik Golgijev aparat, što je u skladu s proizvodnjom velikih količina izvanstaničnih proteina.

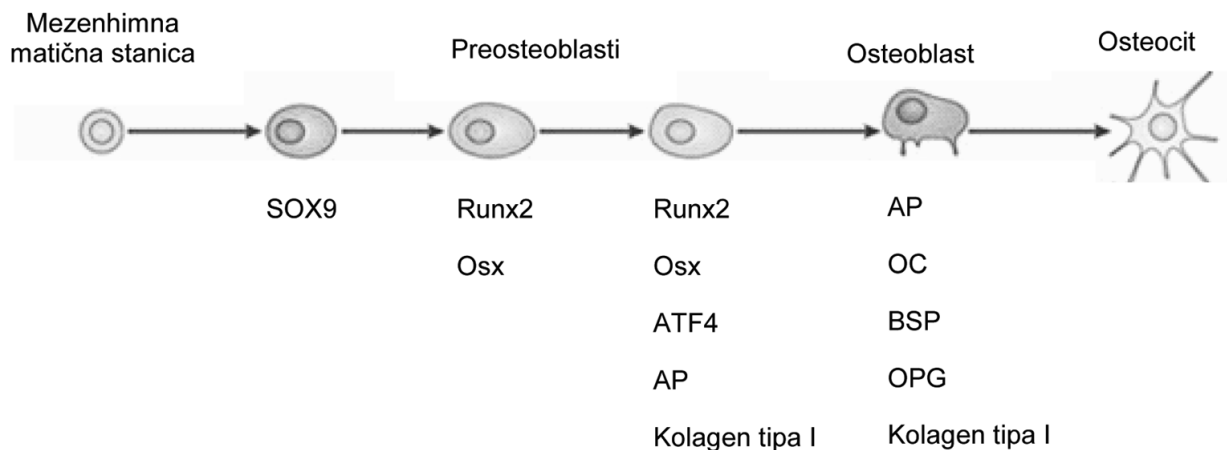
Proces diferencijacije osteoblasta je podijeljen u stadij mezenhimnih matičnih stanica koje potječu iz koštane srži, ali nalaze se i u drugim tkivima (sinovijalna ovojnica, pokosnica, mišićno i masno tkivo) (33), stadij preosteoblasta i stadij osteoblasta (Slika 2.). Mezenhimne matične stanice stvaraju kolonije fibroblastnih značajki (CFU-F, prema engl. *colony forming unit-fibroblast*), a imaju sposobnost sazrijevanja u osteoblaste, adipocite, hondrocite, mioblaste i fibroblaste (34). Ljudske mezenhimne matične stanice izražavaju biljeg Stro-1 (35, 36), a mišje mezenhimne stanice obilježava kombinacija membranskih biljega  $CD29^+CD44^+CD105^+Sca-1^+CD34^-Ter-119^-CD45^-CD11b^-$  (37), iako to još uvijek nije potpuno definirano.

Za diferencijaciju osteoblasta iz mezenhimnih matičnih stanica je potrebna aktivnost više transkripcijskih faktora koji su izraženi i djeluju u različitim fazama sazrijevanja osteoblasta i samim time definiraju različite razvojne stadije osteoblastne linije (Slika 2.) (32). SOX9, transkripcijski faktor čimbenika determinacije testisa (TDF, prema engl. *testis determining factor* ili SRY, prema engl. *sex-determining region*), sudjeluje u razvoju kostura i označava sve osteoblastne prethodnike. SOX9 je nepohodan za hondrogenezu (38) i označava mezenhimne prethodnike iz kojih nastaju osteoblasti, iako ga ne izražavaju zreli osteoblasti (Slika 2.) (39). Ključan transkripcijski faktor koji usmjerava mezenhimne stanice u osteoblastne prethodnike je transkripcijski čimbenik povezan s bjelančevinom "runt" 2 (Runx2, prema engl. *runt-related transcription factor 2*). Runx2 je čimbenik koji nadzire izražaj većine gena uključenih u stvaranje koštane međustanične tvari i nužan je za embrionalni razvoj kostura (40) te funkcionalno povezuje osteoblaste i osteoklaste aktivirajući promotor za OPG i samim time pojačavajući njegovu proizvodnju, što koči diferencijaciju osteoklasta (Slika 2.) (41). Razvoj osteoblasta iz mezenhimnih matičnih stanica nadzire i kanonički Wnt/ $\beta$ -kateninski (hibridna kratica od Wg, prema engl. *wingless in Drosophila* i *Int*, prema engl. *integration 1*) signalni put pojačavajući izražaj Runx2, a smanjujući izražaj adipogenih transkripcijskih čimbenika (42). Osteriks (Osx, prema engl. *osterix*) je ključan za postnatalnu diferencijaciju i funkciju osteoblasta i osteocita (43), a aktivirajući transkripcijski čimbenik 4 (ATF4, prema engl. *activating transcription factor 4*) izravno regulira izražaj osteokalcina i RANKL-a (Slika 2.) (32).

Većina čimbenika koji su uključeni u usmjeravanje mezenhimnih matičnih stanica prema osteoblastnoj lozi djeluje mijenjajući izražaj opisanih transkripcijskih čimbenika. Primjerice, paratiroidni hormon, estrogeni, glukokortikoidi i vitamin D nadziru izražaj Runx2, Osx i



bjelančevina  $\beta$ -kateninskog puta (42). Od lokalnih čimbenika su posebno važne koštane oblikotvorne bjelančevine (BMPs, prema engl. *bone morphogenetic proteins*) -2, -4, -6, i -7, nužne za usmjeravanje mezenhimnih matičnih stanica prema osteoblastima i stvaranje kostura, čimbenik rasta sličan inzulinu (IGF, prema engl. *insulin-like growth factor*) I i IGF II, čimbenik rasta fibroblasta (FGF, prema engl. *fibroblast growth factor*) I i FGF II, te transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ , prema engl. *transforming growth factor  $\beta$* ) (44). Tijekom svog sazrijevanja iz mezenhimnih stanica koštane srži preosteoblasti i osteoblasti stvaraju bjelančevine međustanične tvari (Slika 2.). Najranije se stvara kolagen tipa I, a potom se počinju izlučivati koštana sijalobjelančevina (BSP, prema engl. *bone sialoprotein*; BSP II) i alkalna fosfataza (AP, prema engl. *alkaline phosphatase*) čiji se izražaj smanjuje tijekom stadija sazrijevanja i početkom stadija ovapnjenja. Izražaj molekule BSP se smanjuje u stadiju sazrijevanja, pa se ponovo pojačava u stadiju ovapnjenja. Najkasnije se izražava OC, koji karakterizira zrele osteoblaste i jedini je specifični osteoblastni biljeg (45). Osteoblast svoj životni vijek može završiti na nekoliko načina; kao osteocit uklopljen u koštani matriks, kao neaktivni osteoblast, čime postaje obložna koštana stanica, odumiranjem programiranom staničnom smrću – apoptozom ili diferenciranjem u stanice koje odlažu hrskavicu (32, 46, 47).



**Slika 2. Ključne molekule u diferencijaciji i funkciji osteoblasta.** Prikazana je diferencijacija osteoblasta od mezenhimne matične stanice do osteocita. Mezenhimne matične stanice iz kojih se razvijaju osteoblasti i hondrociti izražavaju transkripcijski faktor SOX9. Aktivacija transkripcijskih faktora Runx2, Osx i ATF4 vodi preko preosteoblasta razvoju zrelih osteoblasta koji stvaraju koštanu međustaničnu tvar. Dio osteoblasta završava kao osteocit uklopljen u koštanu međustaničnu tvar. SOX9, transkripcijski faktor čimbenika determinacije testisa (TDF, prema engl. *testis determining factor* ili SRY, prema engl. *sex-determining region*); Runx2, transkripcijski čimbenik povezan s bjelančevinom “runt” 2 (prema engl. *runt-related transcription factor 2*); Osx, osteriks (prema engl. *osterix*); ATF4, aktivirajući transkripcijski čimbenik 4 (prema engl. *activating transcription factor 4*); AP, alkalna fosfataza (prema engl. *alkaline phosphatase*); BSP, koštana sijalobjelančevina (prema engl. *bone sialoprotein*); OPG, osteoprotegerin. Modificirano prema Long F (32).

#### **1.1.4. Osteociti**

Osteociti su paukolike stanice s mnogo staničnih izdanaka koje nastaju zarobljavanjem osteoblasta u lakune vlastite izlučene koštane međustanične tvari (Slika 2.). Osteociti su najdugovječnije i najbrojnije koštane stanice, te čine 90-95% svih koštanih stanica (48, 49). Osteociti su stanice koje izražavaju nisku razinu AP, visoku razinu OC i kazein-kinaze i CD44, a najnovija istraživanja su otkrila specifični osteocitni biljeg sklerostin (50). Nasuprot ranijem mišljenju da su oni pasivne stanice zarobljene u koštanoj međustaničnoj tvari, danas se zna da su osteociti multifunkcionalne stanice nužne za normalnu funkciju kosti i drugih organa. Osteociti su mehanosenzorne stanice koje sudjeluju u regulacije homeostaze fosfata i kalcija, mogu preoblikovati okolnu međustaničnu tvar, imaju značajnu ulogu u koštanoj pregradnji regulirajući aktivnost osteoblasta i osteoklasta, a djeluju i kao endokrine stanice izlučujući topljive čimbenike koji reguliraju rad bubrega (48, 49, 51, 52). Osteociti na kraju odumiru apoptozom ostavljajući unutar stare kosti prazne lakune.

#### **1.2. Međudjelovanje osteoblasta i osteoklasta**

U dosadašnjim istraživanjima je razmjerno dobro razjašnjena uloga osteoblasta i učinak citokina koje luče na sazrijevanje i aktivnost osteoklasta, međutim učinci osteoklasta na funkcije i aktivnost osteoblasta nisu još potpuno razjašnjeni. Međudjelovanje osteoblasta i osteoklasta je nužno za pravilnu koštanu pregradnju i očuvanje normalne koštane mase.

Jedan od prvih dokaza da osteoblasti reguliraju diferencijaciju osteoklasta jest životinjski model op/op osteopetroze u kojem ne dolazi do diferencijacije osteoklasta zbog nedovoljne proizvodnje M-CSF-a od strane osteoblasta i stromalnih stanica (53). M-CSF je ključan pozitivan signal u diferencijaciji osteoklasta (10, 54) kojeg u reumatoidnom artritisu izlučuju i sinovijalni fibroblasti, makrofagi i limfociti T (55). M-CSF djeluje na više stadija osteoklastogeneze, uključujući proliferaciju, diferencijaciju i fuziju osteoklastnih prethodnika, a u kasnijim stadijima diferencijacije djeluje na sposobnost resorpcije kosti, ali ne i na preživljavanje osteoklasta (56).

Također je razjašnjena i uloga sustava RANK/RANKL/OPG kao ključnog regulatora osteoklastogeneze. Brojni citokini i hormoni ostvaruju svoje djelovanje na koštanu pregradnju putem bjelančevina ovog sustava. RANK je receptor iz obitelji TNF receptora, a izražavaju ga stanice monocitno/makrofagne loze, ali i fibroblasti, limfociti T i B te dendritične stanice

(DC, prema engl. *dendritic cell*) (57, 58). Vežanjem RANKL-a na RANK dolazi do aktivacije čimbenika povezanog s receptorima obitelji TNF (TRAF, prema engl. *TNF associated factor*), a potom i niza transkripcijskih čimbenika kao što su NF- $\kappa$ B, c-jun, NFAT, i c-fos (29). RANKL je transmembranska bjelančevina iz TNF-obitelji liganada i ključan je regulator osteoklastogeneze. Miševi kojima nedostaje RANKL razvijaju tešku osteopetrozu radi potpunog nedostatka osteoklastogeneze (59). Glavni izvor RANKL-a su osteoblasti, ali RANKL također izražavaju i sinovijalne stanice, aktivirani T limfociti, zreli B limfociti i prirodno ubilačke stanice (NK-stanice, prema engl. *natural killer*) (60-62). Izražaj RANKL-a je pojačan djelovanjem PTH, 1,25(OH) $_2$ D $_3$  i proupalnim citokinima, IL-1, IL-6, IL-17 i TNF- $\alpha$  (63-65). *In vivo*, miševi kojima nedostaje RANKL su zaštićeni od koštanih erozija (66), a OPG štiti transgenične miševe s pojačanim izražajem citokina TNF- $\alpha$  od razaranja kosti (67). U ovim mišjim modelima inhibicija RANKL-a djeluje samo na koštano razaranje, ali ne i na upalu. Stoga je danas razvijeno ljudsko monoklonalno protutijelo denosumab, specifično za RANKL, koje se trenutno koristi u liječenju osteoporoze i koštanih metastaza. OPG kojeg stvaraju osteoblasti (68) se veže za RANKL, priječi njegovo vezanje za RANK i tako sprječava osteoklastogenezu. Zato je ravnoteža između RANKL-a i OPG-a glavni regulacijski čimbenik koštane pregradnje. OPG može i izravno djelovati na osteoklaste i tada smanjuje njihovu sposobnost razgradnje kosti (69).

Fiziološki proces koštane razgradnje je praćen koštanom izgradnjom radi očuvanja koštane mase i održanja homeostaze. Razgradnjom kosti iz koštane međustanične tvari se oslobađaju molekule koje potiču osteoblastogenezu. Međutim, nekoliko novijih istraživanja je pokazalo da osteoklasti također luče faktore koji djeluju na diferencijaciju i aktivnost osteoblasta. Među njima je identificiran čimbenik rasta porijeklom iz trombocita (PDGF, prema engl. *platelet derived growth factor*) BB koji potiče proliferaciju osteoblasta, ali u isto vrijeme koči njihovu diferencijaciju (70). Druga molekula identificirana u osteoklastno-osteoblastnom međudjelovanju jeste hepatocitni čimbenik rasta (HGF, prema engl. *hepatocyte growth factor*), čiji su receptori izraženi i na osteoklastima i na osteoblastima, te je pokazano da osteoklasti izlučuju HGF čime dolazi do parakrino/autokrine regulacije osteoblastogeneze (71). Sfingozin 1 fosfat (S1P, prema engl. *sphingosine 1 phosphate*) je čimbenik čije se stvaranje i izlučivanje pojačava u kulturama makrofaga koštane srži nakon dodavanja RANKL-a, a djeluje inhibirajuće na osteoklaste u odgovoru na RANKL te potiče migraciju i preživljavanje osteoblasta (72).

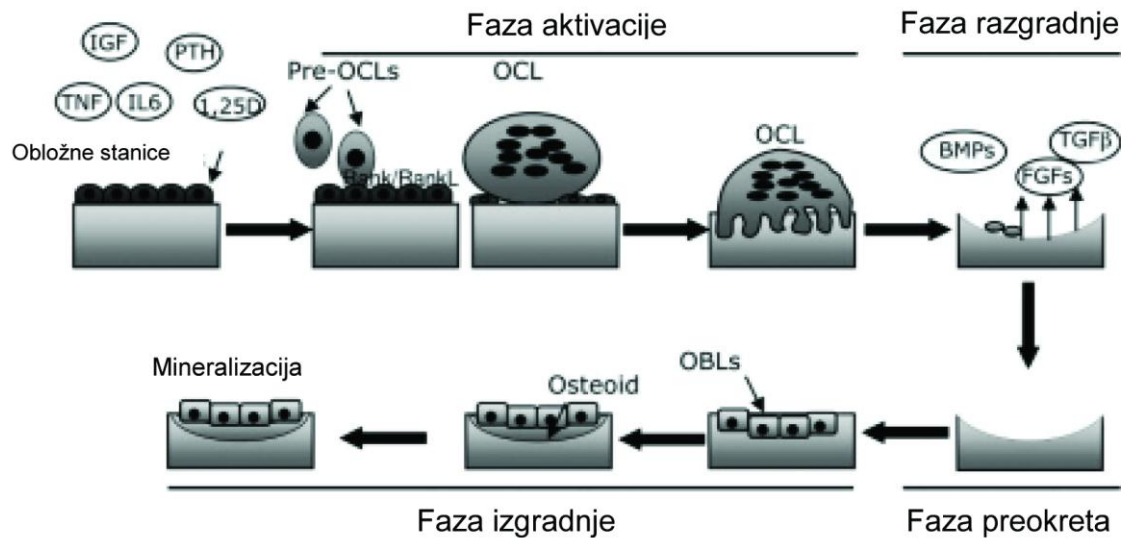
### 1.3. Koštana pregradnja

Koštana pregradnja je dinamičan proces stalne koštane razgradnje i izgradnje koji je nužan za postizanje sljedećih funkcija: odstranjivanje primarne i nezrele kosti te odlaganje mehanički kompetentne sekundarne kosti, obnavljanje stare kosti, odstranjivanje i zamjena ishemične kosti i mikrofraktura, i regulaciju homeostaze kalcija. Koštana pregradnja se temelji na ravnoteži između koštane razgradnje osteoklastima i koštane izgradnje osteoblastima, čije funkcije moraju biti usklađene ne samo kvantitativno, nego i vremenski i prostorno. Koštana pregradnja se odvija unutar ograničenog područja koje se naziva temeljna višestanična jedinica (BMU, prema engl. *basic multicellular unit*) kroz četiri faze (73, 74).

*Faza aktivacije* je faza u kojoj različiti procesi, uključujući stvaranje mikrofraktura, promjene u mehaničkom opterećenju koje osjećaju osteociti i lučenje različitih faktora otpuštenih u koštanom okolišu, primjerice IGF I, TNF- $\alpha$ , PTH i IL-6, dovode do diferencijacije stromalnih i/ili obložnih stanica u osteoblaste koji izlučuju citokine, što susljedno novači osteoklastne prethodnike (Slika 3.). Primjerice, obložne stanice povećavaju vlastiti izražaj RANKL-a koji se veže na receptor RANK na preosteoklastima, što dovodi do fuzije preosteoklasta i diferencijacije u multinuklearne osteoklaste (73). Isto tako, stromalne ili obložne stanice u odgovoru na PTH ili upalne citokine izlučuju monocitni kemotaktični protein (MCP-1, prema engl. *monocyte chemoattractant protein-1*) koji novači osteoklastne prethodnike na mjesto resorpcije kosti (75). *Faza razgradnje* je faza u kojoj zreli osteoklasti razgrađuju kost (na način koji je prethodno opisan u tekstu), te u ljudi traje oko 2 do 3 tjedna (Slika 3.). *Faza preokreta* je faza tijekom koje je aktivnost osteoklasta zaustavljena, najvjerojatnije poticanjem apoptoze, i u ljudi traje 10-tak dana. Tijekom te faze pojavljuju se makrofagima slične stanice, čija uloga još nije razjašnjena, ali se vjeruje da je njihova funkcija odstranjivanje razgradnih produkata nastalih tijekom rastapanja kosti i otpuštanje čimbenika koji inhibiraju osteoklaste i/ili potiču osteoblaste (Slika 3.). *Faza izgradnje* u ljudi traje oko 4 do 6 mjeseci. U ovoj fazi dolazi do novačenja osteoblasta u resorbirano područje pomoću faktora rasta otpuštenih iz kosti razgradnjom koštane međustanične tvari, uključujući BMP-2, BMP-4, IGF II i TGF- $\beta$  (Slika 3.) (74). Novačenje osteoblasta i njihova diferencijacija regulirani su molekulama izlučenim od strane osteoklasta, primjerice S1P, HGF i PDGFBB. Jednom kada su dospjeli u područje resorpcije, osteoblasti započinju proces koštane izgradnje odlaganjem koštane međustanične tvari.

Pravilna ravnoteža između razgradnje i izgradnje kosti je ključna za održavanje normalne koštane mase, a gubitak ravnoteže između ova dva procesa važan je u patogenezi bolesti

koštanog tkiva, primjerice osteoporoze. Osteoporoza može biti primarna, postmenopauzalna i povezana sa starenjem, te sekundarna, nastala u sklopu različitih kroničnih bolesti koje uključuju lokalnu i sustavnu upalnu komponentu, primjerice upalne bolesti zglobova.



**Slika 3. Proces koštane pregradnje.** Koštana pregradnja započinje kada različiti faktori otpušteni u koštanom okolišu [IGF, čimbenik rasta sličan inzulinu (prema engl. *insulin-like growth factor*), TNF- $\alpha$ , čimbenik tumorske nekroze  $\alpha$  (prema engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ), PTH, paratiroidni hormon, interleukin (IL) -6, vitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)] aktiviraju obložne stanice u osteoblaste koji na svojoj površini izražavaju RANKL. Međudjelovanjem RANKL/RANK diferenciraju se osteoklasti (Faza aktivacije). Osteoklasti razgrađuju kost (Faza razgradnje) čime se u okoliš oslobađaju faktori pohranjeni u kosti (BMP-2, BMP-4, IGF II, TGF- $\beta$ , FGF), koji novače osteoblaste u razgrađeno područje. Osteoblasti stvaraju novu koštanu međustaničnu tvar i potiču mineralizaciju (Faza izgradnje) čime se završava proces koštane pregradnje. Pre-OCL, pre-osteoklast; OCL, osteoklast; OBLs, osteoblasti; RANK, receptor za pobudu jezgrinog čimbenika  $\kappa B$  (prema engl. *receptor activator of nuclar factor  $\kappa B$* ); RANKL, ligand receptora za pobudu jezgrinog čimbenika  $\kappa B$  (prema engl. *receptor activator of nuclar factor (NF)  $\kappa B$  ligand*); BMPs, koštane oblikotvorne bjelančevine (prema engl. *bone morphogenetic proteins*); FGF, čimbenik rasta fibroblasta (prema engl. *fibroblast growth factor*); TGF- $\beta$ , transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  (prema engl. *transforming growth factor  $\beta$* ). Modificirano prema Rucci N (74).

#### 1.4. Upalne bolesti zglobova

Brojne bolesti imunskog sustava djeluju na homeostazu koštanog tkiva. Kronične upalne bolesti koštano-zglobnog sustava uključuju autoupalne bolesti karakterizirane kroničnom upalom bez znakova autoimunosti, kao što su sporadični kronični ne-bakterijski osteomijelitis i primarna hipertrofična osteoartropatija, i autoimune bolesti. Reumatoidni artritis, juvenilni idiopatski artritis, seronegativne spondiloartropatije koje među ostalima uključuju ankilozantni spondilitis i psorijatični artritis, i sistemski lupus eritematosus su primjeri reumatskih bolesti u kojima je upala zglobova povezana s patološkim procesima u koštanom

sustavu (jukstaartikularno i sustavno) te izvanzglobnim tkivima i organima (76). Svaka od upalnih bolesti zglobova ima jedinstven utjecaj na jukstaartikularnu kost ili na aksijalni i apendikularni kostur. Istraživanja u ljudi i na mišjim modelima artritisa su identificirala osteoklaste kao ključne stanice koje dovode do gubitka kosti u artritisu. Citokini i faktori rasta uključeni u upalni proces u reumatskim bolestima imaju ili izravan učinak na diferencijaciju i funkciju osteoklasta i osteoblasta, ili neizravan učinak djelovanjem na druge stanice koje modificiraju izražaj ključnih osteoklastogenih i osteoblastogenih faktora RANKL-a i njegovog inhibitora OPG-a.

#### **1.4.1. Reumatoidni artritis**

Reumatoidni artritis je kronična autoimuna bolest čija je glavna značajka poliartikularna upala povezana sa sinovitisom, osteitisom i periartikularnom osteopenijom, koju obilježavaju erozije subhondralne kosti i progresivno sužavanje zglobnih prostora. Te značajke uzrokuju progresivno oštećenje zglobova, gubitak njihove funkcije i invaliditet. Tijek bolesti se sastoji od egzacerbacija i remisija, a oko 40% bolesnika nakon 10-tak godina bolesti postaje nesposobno za rad najčešće zbog zglobnih deformacija, premda je ishod bolesti varijabilan (77). Osim što zahvaća koštano-zglobni sustav, reumatoidni artritis je sustavna bolest koja zahvaća i druga tkiva i organe, a očitavanja bolesti dijelimo na kožne i organ-specifične izvanzglobne manifestacije (78).

Oko 0,5% do 1% svjetskog stanovništva svih dobnih skupina boluje od reumatoidnog artritisa; incidencija bolesti raste s godinama i najviša je u dobi između 35 i 50 godina, premda se uočava pomak početka bolesti prema starijim dobnim skupinama (vrhunac s oko 60 godina) (79). Žene oboljevaju tri puta češće od muškaraca, ali razlike pobola prema spolu nestaju u starijim dobnim skupinama (80). Zbog svega navedenog ključno je bolest liječiti što ranije s ciljem suzbijanja upale i prevencije razaranja kosti i zglobne hrskavice te nastanka izvanzglobnih oboljenja (81).

Etiologija i patogeneza bolesti nisu u potpunosti razjašnjene. Patogeneza reumatoidnoga artritisa ima tri stadija: nastanak i razvoj autoimunog odgovora, kronična upala i razaranje kosti (82). Vjeruje se da reumatoidni artritis nastaje u genetski predisponiranih osoba nakon izlaganja još uvijek nedovoljno razjašnjenim okidačima bolesti, koji uključuju infekcije, mikrotraume, mikrovaskularna oštećenja i kompleksne neuroendokrine interakcije (82, 83). Genetski faktori kao nazočnost alela HLA-DR1 i gen izvan HLA sustava PTPN22 su važni za

podložnost bolesti, a novije genomske studije na velikom broju ispitanika su identificirale nove lokuse za proteine koji bi mogli imati značajnu ulogu u patofiziologiji reumatoidnoga artritisa (npr. stat4, ctla4, cd40, ccl21) (84-87). Također je potvrđeno da pušenje predstavlja ključni okolišni čimbenik u razvoju artritisa s pozitivnim reumatoidnim faktorom (RF), a odgovorno je i za stvaranje protutijela usmjerenih protiv cikličkih citruliniranih peptida (anti-CCP; anti-CCP pozitivan artritis) te je povezano s težim oblikom bolesti i lošijim odgovorom na liječenje (88-90). Nasljednost reumatoidnoga artritisa i postojanje autoantitijela (RF i anti-CCP) i prije same kliničke pojave bolesti podržavaju novi patogenetski model u kojem autoimuna podloga bolesti prethodi nepoznatim okidačem pokrenutoj upali u sinovijalnom zglobu i kosti (82). Nakon pokretanja razvija se klinička faza sa sinovitisom i osteitisom kao temeljnim patohistološkim promjenama.

#### **1.4.2. Oštećenje kosti izazvano upalom**

U reumatoidnom artritisu stanice koje se nalaze unutar upaljene sinovije i u koštanoj srži neposredno ispod zglobne hrskavice proizvode razne citokine i čimbenike koji remete ravnotežu koštane razgradnje posredovane osteoklastima i koštane regeneracije posredovane osteoblastima. To u konačnici dovodi do poremećaja koštane pregradnje i gubitka kosti posredovanog upalom.

##### **1.4.2.1. Sinovitis i osteitis**

Tradicionalna hipoteza pretpostavlja da reumatoidni artritis nastaje u sinovijalnoj membrani. Premda točan okidač bolesti još nije sa sigurnošću definiran (moguće su infekcije, mikrotraume, mikrovaskularna oštećenja, kompleksne neuroendokrine interakcije u genetski predisponiranih osoba), promijenjena sinovijalna membrana uzrokuje novačanje imunskih stanica u sinovijalni zglob. To dovodi do zadebljanja sinovije koja se potom transformira u tkivo slično tumorskom tj. panus, koje izravno invadira i razara zglobnu hrskavicu, subhondralnu kost i prodire do prostora ispod same subhondralne kosti, ispunjenog koštanom srži (91). Taj koncept predlažu brojne studije koje upućuju na zaključak da upaljena sinovijalna membrana ima visoko invazivan potencijal. Stvaranje enzima koji razgrađuju koštanu međustaničnu tvar, osobito katepsina i metaloproteinaza međustanične tvari (MMPs,

prema engl. *matrix metalloproteinases*), od strane sinovijalnih fibroblasta potaknutih imunskim stanicama, dovodi do degradacije zglobne hrskavice i drugih nekalcificiranih tkiva (92). Sinovitis, putem proupalnih citokina, potiče diferencijaciju osteoklasta koji resorbiraju mineraliziranu hrskavicu i kortikalnu kost, što je nužno za prekid tanke barijere između sinovijalnog odjeljka i odjeljka koštane srži (93). To omogućuje izravnu komunikaciju sinovije i odjeljka koštane srži. Radiološka istraživanja su otkrila jasne znakove prekida kortikalne kosti, a histopatološka istraživanja su pokazala izravnu komunikaciju između sinovijalnog tkiva i prostora ispunjenog koštanom srži (94, 95). S obzirom da su sinovijalno tkivo i tekućina razmjerno lako dostupni uzorci, brojna istraživanja u području reumatoidnoga artritisa rađena su upravo na tim tkivima. S druge strane, primjena modernih radioloških pretraga u istraživanju rane faze reumatoidnoga artritisa magnetskom rezonancijom (MR) su otkrila da se promjene koštane srži neposredno ispod zgloba mogu pojaviti i prije nego što se pojavila komunikacija sa sinovijom (96). Promjene u odjeljku koštane srži nađene MR-om uključuju redukciju masnog tkiva i nakupljanje vode, a histopatološka analiza navedenih promjena je pokazala da je masno tkivo zamijenjeno upalnim tkivom u kojem dominiraju limfociti (94, 95, 97). Također je u bolesnika koji boluju od reumatoidnoga artritisa nađen pojačan lokalni izražaj proupalnih citokina u koštanoj srži kao što su TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-8 (98). Štoviše, nekoliko istraživanja je utvrdilo da su ove lezije povezane sa strukturalnim oštećenjem zglobova i mogu prethoditi koštanim erozijama u reumatoidnom artritisu (99, 100). Suvremene imunohistokemijske tehnike su pokazale sudjelovanje zrelih limfocita B i aktiviranih limfocita T (101) u oblikovanju infiltrata smještenih uz trabekularnu kost, gdje je nađen veći broj osteoklasta. To upućuje na izravni učinak upale na razvoj erozivnog oštećenja trabekularne i susjedne kortikalne kosti, što znači da osteitis uzrokuje periartikularnu osteopeniju (102). Nadalje, učinak stanica koštane srži u reumatoidnom artritisu nije isključivo proresorptivan, jer je uočeno odlaganje kosti na endostalnoj strani u području osteitisa, a posebice je pokazano da limfociti B mogu poticati stvaranje kosti i tako, neizravno, ograničiti strukturalno oštećenje kosti (103).

#### **1.4.2.2. Oštećenje kosti u reumatoidnom artritisu**

Kao posljedica sinovitisa i osteitisa, odnosno kronične upale u kojoj dolazi do pojačanog stvaranja proupalnih citokina, u reumatoidnom artritisu razvija se oštećenje kosti, lokalno i



sustavno. U reumatoidnom artritisu možemo razlikovati nekoliko oblika oštećenja kosti: lokalne koštane erozije, periartikularni gubitak kosti i generaliziranu osteoporozu (104).

Lokalne koštane erozije su najznačajniji oblik gubitka kosti koji je potaknut upalom, a nastaju u području subhondralne kosti, odnosno u prostoru između zglobne hrskavice, mjesta pripajanja sinovijalne ovojnice na periost i podležee kosti. Koštane erozije posljedica su razaranja kosti osteoklastima, čija je diferencijacija iz monocitno/makrofagne linije potaknuta proupalnim citokinima. Radiološki nalaz koštanih erozija jedan je od klasifikacijskih kriterija za postavljanje dijagnoze reumatoidnoga artritisa (105) i ključan parametar za praćenje učinkovitosti antireumatskih lijekova u prevenciji, usporavanju ili zaustavljanju gubitka kosti. Nalaz koštanih erozija povezan je sa slabijim funkcionalnim ishodom kod oboljelih od reumatoidnoga artritisa (106).

Periartikularni gubitak kosti je rani radiološki znak reumatoidnoga artritisa, a javlja se i prije pojave lokalnih koštanih erozija. Tipično zahvaća trabekularnu kost u metafizama uz zglob zahvaćen upalom. Mehanizam nastanka nije u potpunosti razjašnjen, ali na temelju dosadašnjih istraživanja pretpostavlja se da ulogu imaju i sinovitis izvan kortikalne površine kosti, koji izravno ili neizravno djeluje na poticanje razgradnje trabekularne kosti u blizini zgloba, i osteitis, u kojem dolazi do infiltracije limfocita, produkcije proupalnih citokina i nakupljanja većeg broja osteoklasta koji oštećuju trabekularnu kost i time izravno uzrokuju periartikularnu osteopeniju (104).

Treći oblik gubitka kosti u reumatoidnom artritisu je sustavni, odnosno osteoporoza. Poznato je da u kroničnim upalnim bolestima zglobova, kao što su reumatoidni artritis, psorijatični artritis, ankilozantni spondilitis, ali, primjerice, i u upalnim bolestima crijeva, dolazi do osteoporoze i povećanog rizika od prijeloma kosti. Oko 25% bolesnika s ranim reumatoidnim artritisom ima i osteopeniju, a oko 10% ima osteoporozu čak i prije započinjanja liječenja (107). To ukazuje da oboljeli od reumatoidnoga artritisa imaju visok rizik za razvoj komplikacija koje se javljaju kao posljedica sustavnog gubitka kosti, jer je prevalencija niske koštane mase visoka već na početku bolesti. Razlozi za veliku učestalost osteopenije i osteoporoze leže i u koincidenciji standardnih rizičnih faktora, primjerice starija životna dob i ženski spol, ali i činjenici da se upala često javlja i prije pojave kliničkih znakova bolesti. Populacijske studije su pokazale da čak i malo povišenje C-reaktivnog proteina, kao indikatora blage razine sustavne upale, i u zdravoj populaciji značajno povećava rizik od prijeloma (108). Također je potvrđeno da oboljeli od reumatoidnog artritisa imaju dvostruko veći rizik od prijeloma kosti bez obzira na liječenje glukokortikoidima (109). Sve navedeno upućuje na zaključak da postoji značajna povezanost između sustavnog gubitka kosti i upalne

aktivnosti u reumatoidnom artritisu. Štoviše, težina bolesti, određena jačinom upalne aktivnosti, je nezavisni rizični čimbenik za ubrzani gubitak kosti i povećani rizik od prijeloma (110, 111).

Na temelju dosadašnjih saznanja možemo zaključiti da se osteoporoza razvija kao posljedica pomicanja ravnoteže između stvaranja i razgradnje kosti na stranu razgradnje i to povećanjem aktivnosti i broja osteoklasta ili smanjenjem aktivnosti i broja osteoblasta (112). Sustavni gubitak kosti u reumatoidnom artritisu, koji nastaje kao rezultat poremećaja koštane pregradnje, najvjerojatnije je uzrokovan sustavno povišenim proupalnim citokinima.

### **1.5. Međudjelovanje imunskog i koštanog sustava – uloga proupalnih citokina i kemokina u patogenezi reumatoidnoga artritisa i gubitku kosti**

Spoznaja da brojne autoimune i upalne bolesti uzrokuju poremećaj koštanog metabolizma dovela je do razvoja osteoimunologije, interdisciplinarnog istraživačkog područja koje obuhvaća osteologiju i imunologiju. Danas je poznato da su koštani i imunski sustav međusobno funkcionalno povezani i da se trebaju proučavati kao funkcionalna cjelina kako bi se razumjele bolesti koje zahvaćaju oba sustava. Povezanost koštanog i imunskog sustava vidljiva je, primjerice, iz činjenica da su osteoblasti ključni regulatori niše hematopoetskih matičnih stanica i da osteoklasti dijele zajedničko podrijetlo s mijeloidnim progenitorskim stanicama od kojih nastaju makrofagi i mijeloidne dendritične stanice (113).

Stanice imunskog sustava i njihovi produkti, citokini i kemokini, reguliraju aktivnost osteoklasta i osteoblasta uzrokujući poremećaj koštane pregradnje u upalnim procesima (114, 115). Tijekom upale, citokini, lokalni i cirkulirajući, proizvedeni od strane aktiviranih imunskih stanica potiču pojačanu koštanu pregradnju u bolestima poput karijesa, periodontitisa, osteomijelitisa, reumatoidnoga artritisa i upalnih bolesti crijeva (116, 117). U tim bolestima glavnu ulogu u gubitku kosti ima sustav RANKL/RANK/OPG. Osim osteoblasta, RANKL proizvode i mnoge druge stanice poput sinovijalnih stanica, aktiviranih limfocita T, zrelih limfocita B i NK-stanica (60-62). Tako stanice imunskog sustava mogu potaknuti diferencijaciju osteoklasta i razgradnju kosti. Te stanice proizvode i proupalne citokine koji pridonose koštanoj razgradnji pojačavajući učinak signala RANKL/RANK (118). Brojni citokini (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-3, IL-6, IL-7, IL-11, IL-15, IL-17) potiču osteoblastni izražaj RANKL-a, a time i gubitak kosti poticanjem sazrijevanja i aktivnosti osteoklasta. Nasuprot tome, neki citokini koče signal RANKL/RANK djelujući kao inhibitori

osteoklastogeneze (IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, INF- $\alpha$ , IFN- $\beta$  i IFN- $\gamma$ ). RANKL djeluje i na limfocite B pojačavajući proliferaciju pro-B stanica. *In vitro* istraživanja su pokazala da se progenitori limfocita B mogu diferencirati u osteoklaste te da limfociti B periferne krvi mogu podržavati osteoklastogenezu (14). Također, aktivirani limfociti T imaju važnu ulogu u upalnim procesima i njihovim učincima na kost, jer izražavaju RANKL i potiču razgradnju kosti lučenjem citokina koji imaju osteoklastogenetski učinak (119). Aktivirani limfociti T mogu i kočiti osteoklastogenezu i to djelovanjem na rane osteoklastne progenitore, snižavajući njihov izražaj molekula RANK, CD115, c-Fos i CalcR i usmjeravajući ih prema dendritičnim stanicama. Također, proizvodnjom citokina, npr. INF- $\gamma$ , inhibiraju osteoklastogenezu (120).

### 1.5.1. Citokini

Prema dosadašnjim istraživanjima nekoliko je ključnih citokina koji doprinose razvoju progresivne upale u reumatoidnom artritisu te djeluju na diferencijaciju i aktivnost osteoblasta i osteoklasta, čime doprinose poremećaju koštane pregradnje (115).

#### **TNF- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  proizvode aktivirani makrofagi, limfociti T i B, NK-stanice, osteoblasti i osteoklasti (121), a veže se za receptore koji se nalaze na osteoklastnim prethodnicima i zrelim osteoklastima te pojačava diferencijaciju i aktivnost osteoklasta (122). Njegova značajna uloga u koštanoj pregradnji je u aktivaciji osteoklasta pojačavanjem signalnih mehanizama RANK-a (123), dok su Kitaura i sur. pokazali TNF-ovisnu sekreciju M-CSF-a od strane stromalnih stanica koštane srži, što potiče osteoklastogenezu puno učinkovitije nego direktna stimulacija osteoklastnih prethodnika putem TNF- $\alpha$  (124). Nadalje, ovaj proupalni citokin je snažan poticatelj izražaja Dkk1 (prema engl. *Dickkopf-related protein 1*), odnosno antagonist Wnt, čime pozitivno djeluje na osteoklastogenezu povećavajući omjer RANKL/OPG (125). U modelu ljudskog TNF transgeničnog miša, TNF- $\alpha$  povećava broj CD11b-pozitivnih osteoklastnih prethodnika, učinak koji je neovisan od RANKL-a, ali je za njihovu diferencijaciju u zrele osteoklaste potrebna prisutnost RANKL-a (126). Važnost TNF- $\alpha$  u oštećenju kosti u artritisu je dokazana u nekoliko različitih mišjih modela artritisa i konačno je potvrđena u kliničkim studijama. Anti-TNF- $\alpha$  terapija (infliksimab, etanercept, adalimumab, golimumab, certolizumab) je trenutno najučinkovitija terapija u liječenju koštanog oštećenja u

reumatoidnom artritisu, iako se smatra da je zaštitno djelovanje od gubitka kosti posljedica i anti-inflamatornog, a ne samo anti-erozivnog djelovanja (127). *In vivo*, ljudski TNF transgenični miševi razvijaju teški artritis s kroničnom sinovijalnom upalom, destrukcijom hrskavice i sistemskim i lokalnim gubitkom kosti (128). U artritisu potaknutom kolagenom (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*) primjena TNF-neutralizirajućih protutijela smanjuje aktivnost bolesti i oštećenje kosti (129).

TNF- $\alpha$  utječe i na osteoblaste inhibicijom njihove diferencijacije i sazrijevanja, uz zapaženo smanjenje izražaja AP i OC (130-132). *In vitro*, dodatak TNF- $\alpha$  u pre-osteoblastne stanične kulture rezultira supresijom ključnog transkripcijskog faktora osteoblasta, Runx2 (133), te također dovodi do apoptoze pre-osteoblastnih staničnih linija (46).

## **IL-1**

U zglobovima oboljelih od reumatoidnoga artritisa, aktivirani makrofagi i sinovijalni fibroblasti su glavni izvor IL-1 (121). *In vitro* istraživanja su pokazala da IL-1 potiče fuziju osteoklastnih prethodnika i produžuje preživljenje osteoklasta, te je također bitan za njihovu aktivaciju (134-136). *In vivo*, IL-1 je ključan regulacijski citokin u mišjim modelima reumatoidnoga artritisa jer je dokazano da njegova prekomjerna ekspresija dovodi do razvoja artritisa s destrukcijom hrskavice i kosti (137), a miševi kojima nedostaje receptor za IL-1 ne razvijaju artritis u mišjem modelu serumom transferiranog artritisa (138). Unatoč ovim *in vitro* i *in vivo* dokazima, ciljano djelovanje na IL-1 receptor (pomoću anakinre, odnosno antagonista receptora IL-1) u ljudi nije još donijelo zadovoljavajuće rezultate u liječenju reumatoidnoga artritisa (81).

*In vitro* rezultati su pokazali da IL-1 djeluje i na osteoblaste, jer dodavanjem IL-1 u osteoblastne kulture dolazi do smanjenog stvaranja mineraliziranih otočića (139).

## **IL-6**

Prema dosadašnjim istraživanjima IL-6 je eksprimiran u sinovijalnim fibroblastima, makrofazima i limfocitima T sinovijalnog tkiva oboljelih od reumatoidnoga artritisa te je njegova koncentracija povišena u serumu i sinovijalnoj tekućini (140, 141). Miševi s genom izbačenim za IL-6 su zaštićeni od ovarijektomijom induciranog gubitka kosti (142), a prekomjeren izražaj ovog citokina je povezan s pojačanim gubitkom kosti i povećanim brojem osteoklasta (143). *In vitro*, IL-6 potiče otpuštanje RANKL-a od strane osteoblasta (144), a nedavne studije su pokazale smanjenu *in vitro* i *in vivo* diferencijaciju osteoklasta blokadom receptora za IL-6 (145). *In vivo*, miševi deficijentni za IL-6 su zaštićeni od CIA i

artritisa potaknutog adjuvansom (146, 147), a primjena neutralizirajućeg protutijela koje se veže za receptor IL-6 (IL-6R) smanjuje aktivnost bolesti u CIA (148). Također, specifično protutijelo za IL-6R, tocilizumab, u ljudi učinkovito smanjuje aktivnost bolesti i radiološku progresiju te se koristi u kliničkoj praksi (81).

### **IL-17**

IL-17 se nalazi u sinovijalnoj tekućini oboljelih od reumatoidnoga artritisa, a stvaraju ga Th17 stanice upaljene sinovije, ali i druge stanice kao što su mastociti (149, 150). Postoje jaki dokazi koji podržavaju bitnu ulogu IL-17 u osteoklastogenezi, ali detaljan mehanizam djelovanja nije još u potpunosti razjašnjen. U miševa s izbačenim genom za IL-17 je smanjena težina CIA, te je nađeno da lokalna prekomjerna ekspresija IL-17 u zglobovima pojačava težinu artritisa (151, 152). Liječenje artritčnih miševa u CIA s anti-IL-17 protutijelom dovodi do smanjenja zglobne upale, destrukcije kosti i koštanih erozija (153). *In vitro*, IL-17 uglavnom indirektno potiče osteoklastogenezu; s jedne strane pojačava izražaj RANKL-a u osteoblastima i fibroblastima, a s druge strane potiče sekreciju proupalnih citokina kao što su TNF- $\alpha$  i IL-1 iz monocita (154, 155). Nedavna istraživanja su također pokazala da IL-17 potiče osjetljivost RANK-a na djelovanje RANKL-a na ljudskim osteoklastnim prethodnicima te potiče osteoklastogenezu u kulturama ljudskih CD11b<sup>+</sup> stanica u odsustvu RANKL-a i osteoblasta (156, 157). Zbog svega navedenog trenutno su u tijeku klinička istraživanja u kojima se prati i anti-erozivni i anti-inflamatorni učinak IL-17 u oboljelih od reumatoidnoga artritisa.

### **Interferoni**

INF- $\gamma$  je proizvod prirodnih imunskih stanica i Th1 stanica i pripada tipu II interferona. U mišjim kulturama makrofaga koštane srži, INF- $\gamma$  snažno inhibira osteoklastogenezu supresijom RANK-a (158), a u ljudskim osteoklastnim prethodnicima suprimira ekspresiju cFms, receptora za M-CSF (159). Također, u CIA i lipopolisaharidom potaknutom upalnom gubitku kosti, nedostatak receptora za IFN- $\gamma$  dovodi do pojačane diferencijacije osteoklasta i razgradnje kosti (158, 160). Ovi podaci podržavaju inhibitornu ulogu INF- $\gamma$  u osteoklastogenezi *in vivo*. Unatoč tome, primjena rekombinantnog IFN- $\gamma$  u glodavaca potiče diferencijaciju osteoklasta i erozije kosti (161). Ovi kontradiktorni podaci o *in vivo* ulozi IFN- $\gamma$  su možda posljedica razlika u modelima bolesti, ili utjecaja IFN- $\gamma$  na različite tipove stanica. Primjerice, nedavna istraživanja su pokazala da IFN- $\gamma$  može direktno inhibirati diferencijaciju osteoklastnih prethodnika, ali može i indirektno poticati osteoklastogenezu stimulirajući

aktivaciju limfocita T i sekreciju pro-osteoklastogenih RANKL-a i TNF- $\alpha$  (162). INF- $\alpha$  i INF- $\beta$  pripadaju tipu I interferona. U miševa kojima nedostaje dio receptora za INF- $\alpha/\beta$  smanjena je trabekularna koštana masa uz povećan broj osteoklasta. RANKL potiče izražaj INF- $\beta$  u osteoklastima smanjujući pri tome izražaj gena za c-Fos, čime se inhibira osteoklastogeneza (163).

### **1.5.2. Kemokini**

Kemokini i njihovi receptori reguliraju migraciju stanica, angiogenezu, staničnu proliferaciju, apoptozu te obranu domaćina od patogena. Kemokini usmjeravaju migraciju osteoklastnih i osteoblastnih progenitora i sudjeluju u regulaciji koštane homeostaze (164).

#### **CCL2**

CCL2 (ili MCP-1, prema engl. *monocyte chemoattractant protein 1*), ligand za receptor CCR2, usmjerava migraciju monocita, NK-stanica i limfocita T te koordinira upalni odgovor tijekom infekcije (165). Snažno je izražen u osteoblastima stimuliranim proupalnim citokinima. Izražaj CCL2 u mononuklearnim progenitorskim stanicama potaknut je RANKL-om i djeluje osteoklastogenetski (166). Osteoblasti obrađeni PTH-om pojačano izražavaju CCL2 što pojačava fuziju preosteoklasta (75, 167).

#### **CCL3**

CCL3 (ili MIP-1- $\alpha$ , prema engl. *macrophage inflammatory protein 1-alpha*) se veže za receptore CCR1 i CCR5 te je primarno uključen u kemotaksiju monocita, makrofaga, DC i limfocita Th1. CCL3 je izražen u stanicama koštane srži i kosti te može izravno potaknuti osteoklastogenezu (168, 169).

#### **CCL5**

CCL5 (ili RANTES, prema engl. *Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*) je proupalni kemokin izražen u slezeni, timusnoj kori, tonzilama, bubregu i mnogim staničnim linijama. Djeluje kemotaksijski na monocite, memorijske limfocite T i eozinofile. CCL5 je uključen u patogenezu reumatoidnoga artritisa, osteoartritisa i osteomijelitisa. Osteoklasti koji luče CCL5 potiču osteoblastnu kemotaksiju pojačavajući izražaj kemokinskih receptora i migraciju stanica na mjesta resorpcije (170).

## **CXCL10**

CXCL10 (ili IP-10, prema engl. *interferon-gamma-inducible protein 10*) također djeluje proupalno, veže se za receptor CXCR3 i regulira imunski odgovor aktivacijom i novačenjem limfocita T, eozinofila, monocita i NK-stanica (171). RANKL potiče izražaj CXCL10 na osteoklastnim progenitorima, a CXCL10 pojačava izražaj RANKL-a u pomagačkim limfocitima T. CXCL10 potiče diferencijaciju osteoklasta u kokulturi osteoklastnih progenitora i CD4<sup>+</sup> limfocita T. U modelu CIA davanje neutralizirajućih protutijela anti-CXCL10 ublažava kliničke znakove bolesti i gubitak kosti (172).

## **CXCL12**

CXCL12 (ili SDF-1, prema engl. *stromal cell-derived factor 1*) sudjeluje u razvoju reumatoidnoga artritisa jer potiče osteoklastogenezu te pridonosi infiltraciji limfocita T u sinoviju. Osteoklasti uzgajani uz dodatak CXCL12 pojačano razgrađuju kost i luče MMP-9 (173).

## **1.6. Životinjski modeli reumatoidnoga artritisa**

Životinjski modeli artritisa se koriste za proučavanje patogeneze bolesti, identificiranje novih potencijalnih terapijskih postupaka te ispitivanje učinkovitosti novih lijekova. Unatoč brojnim poznatim modelima, i dalje je pitanje koji je od životinjskih modela najprikladniji za istraživanje reumatoidnoga artritisa kod ljudi. Do sada su se najčešće koristila dva modela reumatoidnoga artritisa; artritis potaknut adjuvansom (AIA, prema engl. *adjuvant-induced arthritis*) u štakora te artritis potaknut kolagenom u štakora i miševa (173). Ovi životinjski modeli dijele neke zajedničke značajke s ljudskim reumatoidnim artritiskom, ali pokazuju i neke različitosti. Stoga je s obzirom na glavni cilj istraživanja, ključno izabrati model artritisa koji je patologijom i/ili patogenezom najbliži ljudskom reumatoidnom artritisku.

### **1.6.1. Artritis potaknut kolagenom (CIA)**

Artritis potaknut kolagenom je najčešće korišten životinjski model ljudskog reumatoidnoga artritisa. Trentham i sur. su 1977. godine prvi objavili da 40% štakora nakon intradermalne

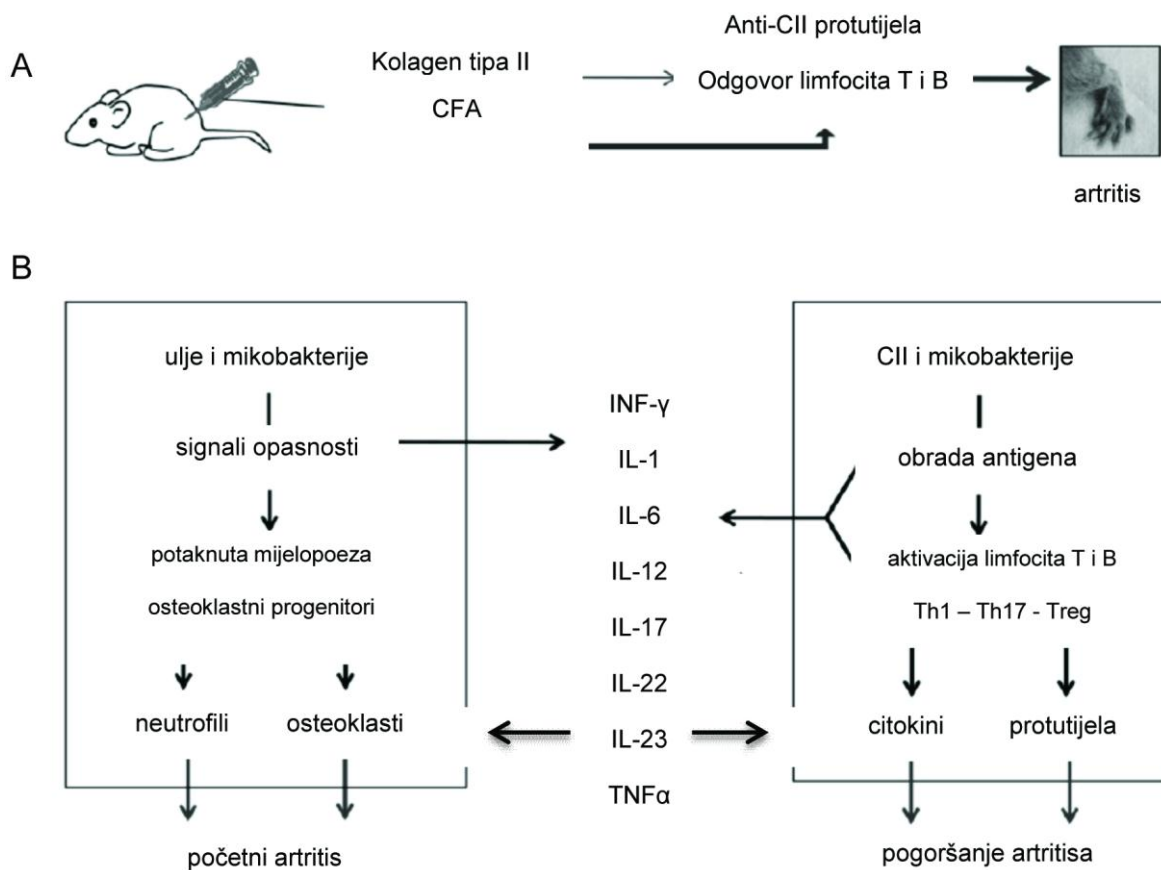
primjene kolagena tipa II (CII, prema engl. *type II collagen*) u potpunom Freundovom adjuvansu (CFA, prema engl. *complete Freund's adjuvant*) ili inkopletnom Freundovom adjuvansu (IFA, prema engl. *incomplete Freund's adjuvant*) razvije upalni artritis (174, 175). Podložnost miševa razvoju artritisa potaknutog kolagenom može se usporediti s podložnošću u ljudi prema razvoju reumatoidnoga artritisa i povezana je s izražajem određenih molekula MHC-II: sojevi podložni razvoju artritisa potaknutog kolagenom izražavaju haplotip H-2q (npr. DBA/1 miševi), H-2r (npr. B10.RIII miševi) ili H-2b (npr. C57BL/6 miševi) (176-178). Nekoliko istraživačkih skupina je pokazalo da se artritis potaknut kolagenom može izazvati s velikom reproducibilnošću (80-100%) i kod miševa soja C57BL/6, a sam artritis traje duže nego kod DBA/1 miševa (179, 180).

Artritis potaknut kolagenom u miševa dijeli puno zajedničkih kliničkih (crvenilo i otok zglobova), patohistoloških (sinovitis, stvaranje panusa, erozije hrskavice i zglobova) i imunskih (stvaranje protutijela usmjerenih protiv CII, hipergamaglobulinemija, čak i stvaranje RF) značajki s ljudskim reumatoidnim artritidom (181-183). Jasna razlika između mišjeg artritisa potaknutog kolagenom i ljudskog reumatoidnoga artritisa je što su kod miševa protutijela usmjerena na kolagen, dok kod velike većine bolesnika to nije slučaj, a sam artritis u miševa je blaži, ponekad i asimetričan, te često prolazan (184, 185). Reumatoidni artritis je sistemska bolest koja zahvaća više izvanzglobnih organa i stoga je zanimljivo što su do sada zanemareni sistemski aspekti te bolesti. Glavna izvanzglobna očitovanja u artritidu potaknutom kolagenom su izražena mijelopoeza s jakim promjenama u limfoidnim organima (uvećanje i strukturne promjene slezene, što je povezano s jakom ekspanzijom nezrelih CD11b<sup>+</sup> mijeloidnih stanica) i patološke promjene u respiratornom sustavu (186, 187). Danas se smatra da su sistemske promjene u artritidu potaknutom kolagenom povezane s mikobakterijskom komponentom CFA, stoga je uz klasičnu „autoimunu“ hipotezu nastanka artritisa povezanu s protutijelima usmjerenim na CII, razvijena i kombinirana „autoinflamatorna i autoimuna“ hipoteza (Slika 4.) (185). Na temelju svega navedenog smatra se da je artritis potaknut kolagenom dobar model za proučavanje svih značajki ljudske bolesti, a upravo zbog duljeg trajanja artritisa i pojačane mijelopoeze dobar je model ukoliko postoji potreba za proučavanjem poremećaja koštane pregradnje i gubitka koštane mase u ranom i kasnom tijeku bolesti.



### 1.6.2. Patogeneza artritisa potaknutog kolagenom

Artritis potaknut kolagenom uzrokuje promjene u limfoidnim organima; zapaženo je povećanje slezene i promjena njezine arhitekture zbog pojačane mijelopoeze koja rezultira stvaranjem puno nezrelih CD11b<sup>+</sup> mijeloidnih stanica. Patogeneza mu je složena, i uključuje kombinaciju autoinflamatornog i autoimunog odgovora (Slika 4.). Autoinflamatorna komponenta se pripisuje učinku CFA, odnosno emulziji ulja i mikobakterija, koji djeluje kao signal opasnosti koji potiče mijelopoezu i proizvodnju citokina. Zglobovi i druga tkiva su infiltrirani neutrofilima i monocitno/makrofagnim stanicama (osteoklastnim progenitorima) što uzrokuje početno oštećenje zglobova i izlaganje zglobnih specifičnih antigena, kao što je CII, već stvorenim anti-CII protutijelima. Antigen-predočne stanice usporedno su preradile unešeni ksenogenični CII i aktivirale limfocite T i B te su nastala anti-CII protutijela koja pokreću autoimuni odgovor i pojačavaju znakove artritisa (Slika 4.) (185).



**Slika 4. Patogeneza artritisa potaknutog kolagenom.** (A) U klasičnoj „autoimunoj“ hipotezi ulje i mikobakterije prisutne u kompletnom Freundovom adjuvansu (CFA, prema engl. *complete Freund's adjuvant*) potiču specifični antigen kolagen tipa II (CII, prema engl. *type II collagen*) da aktivira limfocite T i B, što dovodi do imunorekacije u zglobovima posredovane limfocitima i protutijelima. Emulzija vode u ulju osigurava produženu stimulaciju imunološkog sustava, a mikobakterije dalje pojačavaju imunosni odgovor. Smatra se da je uloga prirodene imunosti u ovoj hipotezi ograničena na stvaranje okoliša za potenciranje reakcije na antigen i stvaranje imunoloških efektor. (B) **Lijevi niz:** S druge strane, u kombiniranoj „autoimunoj i autoinflamatornoj“ hipotezi, smatra se da sam CFA uzrokuje početni artritis. Ulje i mikobakterija djeluju kao signali opasnosti koji dovode do ekspanzije mijeloidne loze i produkcije citokina, a prijemčivi zglobovi su infiltrirani neutrofilima i osteoklastnim prethodnicima. **Desni niz:** CII i mikobakterijski antigeni su prerađeni u antigen-predočnim stanicama što vodi do specifičnog staničnog i humoralnog imunosnog odgovora. Ta specifična imunost usmjerena na auto-antigen potencira upalu u zglobu. **U sredini:** citokini proizvedeni u procesu prirodnog ili stečenog imunosnog odgovora, koji prema dosadašnjim istraživanjima imaju inhibirajuću ili stimulirajuću ulogu u patogenezi artritisa potaknutog kolagenom. INF- $\gamma$ , interferon  $\gamma$ ; interleukin (IL) -1, 6, 12, 17, 22, 23; TNF- $\alpha$ , čimbenik tumorske nekroze  $\alpha$  (prema engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ). Modificirano prema Billiau i sur (185).

## 2. CILJEVI I SVRHA ISTRAŽIVANJA

Poznato je da upalni i imunosni procesi potiču lučenje brojnih regulacijskih čimbenika, primjerice citokina, kemokina i čimbenika rasta, koji djeluju na diferencijaciju i aktivnost koštanih stanica i ukupni koštani metabolizam. Stoga je svrha ove disertacije da u mišjem modelu artritisa potaknutog kolagenom istražimo specifične promjene u broju i aktivnosti koštanih stanica, te moguće medijatore koji uzrokuju sustavne i lokalne promjene koštane pregradnje.

Specifični ciljevi predloženog istraživanja su:

- 1) utvrditi promjene u fenotipu i broju osteoklastnih progenitorskih subpopulacija u koštanom okolišu (koštana srž i koštani cilindar) i periferiji (krv i slezena) nakon izazivanja artritisa;
- 2) utvrditi promjene u funkcionalnoj aktivnosti osteoklastnih progenitorskih subpopulacija u koštanom okolišu (koštana srž i koštani cilindar) i periferiji (krv i slezena) nakon izazivanja artritisa;
- 3) utvrditi promjene u fenotipu i broju osteoblastnih progenitorskih subpopulacija u koštanom okolišu (koštana srž i koštani cilindar) nakon izazivanja artritisa;
- 4) utvrditi promjene u funkcionalnoj aktivnosti osteoblastnih progenitorskih subpopulacija u koštanom okolišu (koštana srž i koštani cilindar) nakon izazivanja artritisa;
- 5) utvrditi dinamiku koštanog metabolizma u lokalnim koštanim lezijama, različitim dijelovima dugih kostiju i kralješcima *in vivo* nakon izazivanja artritisa;
- 6) utvrditi promjene u izražaju koštanih regulacijskih molekula, citokina i kemokina, nakon izazivanja artritisa.

### 3. HIPOTEZA

Hipoteza predloženog istraživanja je da kronična upalna i imunosna reakcija u artritisu potaknutom kolagenom potiče gubitak kosti, i to djelovanjem na osteoblastogenezu i osteoklastogenezu. Pretpostavka je da lokalni i sustavni upalni odgovor u artritisu potaknutom kolagenom djeluje na razvoj koštanih stanica tako da mijenja broj i diferencijacijski potencijal progenitorskih stanica osteoklasta i osteoblasta, ali i njihovo novačenje i naseljavanje na mjesta koštanih lezija.

Specifične hipoteze ovog istraživanja, provedenog na mišjem modelu reumatoidnoga artritisa, su sljedeće:

- 1) u koštanoj srži i perifernoj krvi porast će broj mijeloidnih prekursorskih stanica s osteoklastnim potencijalom u miševa s artritisom u odnosu na kontrolne miševe;
- 2) u koštanoj srži porast će broj mezenhimnih stanica s osteoblastogenetskim potencijalom u miševa s artritisom u odnosu na kontrolne miševe;
- 3) slijed osteoklastne diferencijacije, utvrđen analizom koštane razgradnje *in vivo* i analizom osteoklastne diferencijacije *ex vivo*, bit će promijenjen u miševa s artritisom u odnosu na kontrolne miševe;
- 4) slijed osteoblastne diferencijacije, utvrđen analizom koštane izgradnje *in vivo* i analizom osteoblastne diferencijacije *ex vivo*, bit će promijenjen u miševa s artritisom u odnosu na kontrolne miševe;
- 5) novačenje progenitorskih stanica osteoklastne i osteoblastne loze, i njihovo naseljavanje u područja koštanih lezija bit će potaknuto zbog promjena u ravnoteži osteoresorptivnih i osteoprotektivnih čimbenika koje proizvode različite subpopulacije imunosnih stanica.

## 4. MATERIJALI I METODE

Pokusi su napravljeni u Laboratoriju za molekularnu imunologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga. Skeniranje kostiju mikro-kompjutoriziranom tomografijom napravljeno je u Mellanby Centru za istraživanje kostiju na Zavodu za ljudski metabolizam Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Sheffieldu, Velika Britanija.

### 4.1. Pokusne životinje

U pokusima su korišteni muški miševi visokosrođenog soja C57BL/6J (H-2b), stari 8-10 tjedana, koji su uzgojeni u vivariju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Pokusne životinje držane su u standardnim laboratorijskim uvjetima: reguliran ciklus svjetla (10 sati svjetla i 14 sati tame dnevno), regulirana temperatura prostorije (23°C), regulirana vlažnost zraka (50-60%), sterilizacija kaveza i stelje. Pokusne životinje držane su u makrolonskim kavezima, u skupinama od 4-5 odnosno 8-15, ovisno o veličini kaveza, hranjene su kolačima za miševе (4RR25; Mucedola, Settimo Milanese, Italija) uz slobodan pristup vodi.

Držeći se načela „3R“ (prema engl. *replacement, reduction, refinement*) za istraživanje smo upotrijebili između 150 i 200 miševa soja C57BL/6J (H-2b). Za izvođenje pokusa dobivena je dozvola Etičkoga povjerenstva Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

### 4.2. Ustroj pokusa

#### Izazivanje, praćenje i procjena artritisa

U svrhu određivanja osteoklastogenetskog potencijala hematopoetskih stanica i osteoblastogenetskog potencijala mezenhimnih stanica koštane srži i koštanog cilindra, te analize koštanog metabolizma u mišjem modelu artritisa, korišteni su miševi kojima je prema dalje opisanom protokolu izazvan artritis potaknut kolagenom. U svaku skupinu uključeno je po slučaju 8-10 životinja odgovarajuće dobi i spola. Kontrolna skupina je obrađena na isti način kao i pokusna, samo je za obradu korištena fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (PBS; prema engl. *phosphate-buffered saline*) umjesto emulzije CII+CFA. Razvoj

artritisa se pratio pregledavanjem miševa svakog petog dana. Težina artritisa je utvrđena semikvantitativnom ljestvicom bodovanja kliničkih znakova artritisa. Da bi što iscrpnije istražili promjene u osteoklastogenezi i osteoblastogenezi, odnosno ukupnom koštanom metabolizmu tijekom bolesti, analiziran je razvoj i tijek artritisa u tri vremenske točke, i to 40 dana (rani artritis), 70 dana (kasni artritis) i 100 dana (vrlo kasni artritis) nakon primarne imunizacije. U tim točkama je u serumu određen i relativni titar anti-CII protutijela. Na histološkim preparatima prvog metatarzofalangealnog (MTP) zgloba obojanima hemalaun-eozinom (HE) utvrđeni su znakovi artritisa (sinovitis, osteitis, erozije zglobne hrskavice i subhondralne kosti), a na TRAP-obojanim preparatima utvrđivana je prisutnost osteoklasta u subhondralnoj kosti. Preparati obojani Goldner-Masson-trikrom bojom su služili za histomorfometrijsku analizu debljine zglobne hrskavice i udjela subhondralne kosti.

### **Analiza osteoklastogenetskog i osteoblastogenetskog potencijala**

U osteoklastogenetskim kulturama uzgojenim iz hematopoetskih tkiva miševa s artritiskom i kontrolnih životinja (koštana srž, koštani cilindar, slezena i periferna krv) utvrđen je broj diferenciranih osteoklasta, izmjerena aktivnost enzima TRAP, i analiziran izražaj specifičnih diferencijacijskih osteoklastnih gena (RANK, cFms, CalcR i Cat K), te testirana razlika između kontrolnih životinja i miševa s artritiskom. U osteoblastogenetskim kulturama koštane srži i koštanog cilindra kontrolnih i miševa s artritiskom utvrđen je broj osteoblastnih kolonija i površina koju zauzimaju u zdencu, izmjerena je aktivnost enzima AP, i analiziran izražaj specifičnih osteoblastnih diferencijacijskih gena (Runx2, Osx, AP, BSP i OC), te testirana razlika između kontrolnih životinja i miševa s artritiskom.

Protočnom citometrijom analizirali smo fenotip i udio osteoklastnih progenitorskih subpopulacija u koštanom okolišu (koštana srž i koštani cilindar) i periferiji (krv i slezena), i osteoblastnih progenitorskih subpopulacija u koštanom okolišu nakon izazivanja artritisa.

### **Analiza populacija imunskih stanica i izražaja upalnih citokina i kemokina u mikrookolišu koštane srži i periferije**

Promjene u glavnim populacijama imunskih stanica analizirane su protočnom citometrijom uporabom biljega specifičnih za pojedinu staničnu lozu. Za protočnu citometriju korišteni su mijeloidni i limfoidni biljezi, a analizirane su suspenzije stanica koštane srži, koštanog cilindra, slezene i periferne krvi u različitim vremenskim točkama trajanja artritisa. Upalni mikrookoliš djeluje na razvoj i aktivnost koštanih stanica. Stoga je analiziran izražaj upalnih citokina (TNF- $\alpha$  i IL-6) i kemokina (CCL2 i CCL5) u različitim tkivima; koštana srž, koštani

cilindar, slezena i periferna krv. Testiranjem razlika u izražaju tih molekula između kontrolnih i miševa s artritismom dobili smo uvid u njihovu moguću ulogu u regulaciji migracije i diferencijacije koštanih stanica.

### **Analiza koštanog metabolizma**

Promjene koštanog metabolizma periartikularno u metafizama bedrenih kostiju, te u udaljenim kostima tj. drugom slabinskom kralješku (L2), analizirane su pomoću mikro-kompjutorizirane tomografije. Promjene koštane građe i mase u miševa koji su razvili artritis potaknut kolagenom u odnosu na kontrolne miševe definirane su uporabom standardnih histomorfometrijskih parametara: određivanjem postotka volumena trabekularne kosti (BV/TV, prema engl. *bone volume/trabecular volume*; %), broja trabekula (Tb.N, prema engl. *trabecular number*; /mm), širine trabekula (Tb.Th, prema engl. *trabecular thickness*;  $\mu\text{m}$ ) i razdvojenosti trabekula (Tb.Sp, prema engl. *trabecular separation*;  $\mu\text{m}$ ). Nadalje, koštana izgradnja osteoblastima definirana je parametrima dinamičke histomorfometrije nakon injiciranja fluorescentne boje kalceina u određenom vremenskom razmaku. Parametre koštanog metabolizma smo usporedili s podacima dobivenim protočnocitometrijskom analizom, analizom izražaja gena i diferencijacijskim potencijalom koštanih stanica.

### **4.3. Izazivanje artritisa u C57BL/6 miševa**

Prema modificiranim protokolima (179, 180) za izazivanje artritisa u C57BL/6 miševa davanjem ksenogeničnog kolagena, miševi su anestetizirani i analgezirani tribromoetanolum (Avertin, Sigma-Aldrich Corp., Milwaukee, MI, SAD) te imunizirani emulzijom kokošnjeg kolagena tipa II (Collagen (*chicken sternal cartilage*), Sigma-Aldrich Corp.) i kompletnog Freundovog adjuvansa (Sigma-Aldrich Corp.). Prema protokolu područje injiciranja najprije se očistilo 70%-tnim etanolom te se iglom veličine 26G injicirala emulzija CII i CFA. Prema protokolu je važno da se igla uvodi usporedno s repom u području srednje trećine repa, odnosno pod tupim kutom se uvede 7-10 mm supkutano u područja između dorzalne i lateralne repne vene (ovaj način injiciranja odgovara intradermalnom, jer je u području repa jako malo supkutanog sloja). Ubrizgali smo 50  $\mu\text{L}$  emulzije, koja sadrži 100  $\mu\text{g}$  Mycobacterium tuberculosis i 100  $\mu\text{g}$  CII. Nakon što smo emulziju ubrizgali iglu smo lagano izvukli, a područje uboda čvrsto pritisnuli da se izbjegne vraćanje emulzije. Tri tjedna nakon primarne imunizacije na isti način je injicirana sekundarna doza emulzije CII i inkompletnog

Freundovog adjuvansa (Sigma-Aldrich Corp.) (sekundarna imunizacija). Važno je napomenuti da se sekundarna doza injicira u suprotnu stranu repa od primarne imunizacije da se izbjegne embolizacija do koje može doći zbog vazodilatacije repnih vena nakon primarne imunizacije. Kontrolna skupina miševa obrađena je na isti način kao i pokusna, samo se u repnu venu ubrizgavao PBS.

#### **4.4. Klinička, laboratorijska i histološka procjena artritisa**

Da bi utvrdili kliničke znakove artritisa miševa smo pregledavali svakih pet dana (179, 180, 188), počevši od petog dana od dana primarne imunizacije, do trenutka žrtvovanja. Prema protokolu se preporuča bodovanje na skali od 0 do 16 (0 do 4 za svaku šapu, zbrajajući bodove za sve četiri šape) koristeći se sljedećim kriterijima:

0-šapa bez znakova artritisa,

1-jedan prst upaljen i otečen,

2-upaljeno i otečeno više od jednog prsta, ali ne cijela šapa ili blaga otečenost cijele šape,

3-cijela šapa upaljena i otečena,

4-jako upaljena ili otečena šapa ili ankiloza šape (ako je šapa ankilozirana miš se ne može uhvatiti za poklopac kaveza).

Miševi su žrtvovani u nekoliko vremenskih točaka radi utvrđivanja promjena u različitim razvojnim stadijima artritisa, i to nakon 40 dana (rani artritis), 70 dana (kasni artritis) i 100 dana (vrlo kasni artritis) od dana primarne imunizacije.

Razvoj artritisa analizirali smo u prvom MTP zglobu pokusnih i kontrolnih životinja. Šape su uzete pri žrtvovanju životinja i fiksirane u otopini 4% paraformaldehida tijekom 24 sata na 4°, zatim demineralizirane u otopini 14% EDTA (prema engl. *etilen-diamine tetraacetic acid*) i 3% paraformaldehida tijekom 7 do 14 dana, dehidrirane u rastućim koncentracijama etanola te uklopljene u parafinske blokove. Serijski rezovi preparata debljine 6 µm izrezani na rotacijskom mikrotomu (Leica SM 2000 R, Leica, Nussloch, Njemačka) obojani su HE, Goldner-Masson-trikrom bojanjem i TRAP-bojanjem. Histološku analizu preparata obojanih HE smo radili na mikroskopu Axio Imager (Carl Zeiss Microimaging Inc., Oberkochen, Njemačka) priključenim na računalo. Na njima smo analizirali postojanje sinovitisa (celularnost sinovije), osteitisa (celularnost periartikularne šupljine koštane srži/zamjena masnih stanica koštane srži upalnim stanicama), eksudata u zglobnom prostoru, erozija zglobnih hrskavica i subhondralne kosti. Na rezovima prvog MTP zgloba miševa s artritismom i



kontrolnih miševa obojanim Goldner-Masson-trikrom smo procijenili debljinu hrskavice ( $\mu\text{m}$ ) i udio subhondralne kosti (%) parametrima statičke histomorfometrije. Područje interesa (ROI, engl. *region of interest*) u zglobu smo definirali kao područje koje ide od površine hrskavice i obuhvaća hrskavicu i subhondralnu kost, a jednako je udaljeno od oba ruba zgloba. Analizirana su oba zglobna tijela, tako da smo po zglobu analizirali dvije hrskavice i dva subhondralna područja. Debljinu hrskavice smo analizirali kao udaljenost između dvije označene linije (Ir.L.Wi; *interlabel width*) u  $\mu\text{m}$ , a udio subhondralne kosti kao postotak volumena kosti (BV/TV). Histomorfometrijska analiza je rađena Axio Imager mikroskopom (Carl Zeiss Microimaging Inc., Oberkochen, Njemačka) opremljenim s CCD kamerom pod povećanjem 5x, priključenim na elektronsko računalo s programom za analizu kosti (OsteoMeasure, OsteoMetrics, Decatur, GA, USA). TRAP-obojeni preparati zglobova šape služili su za utvrđivanje prisutnosti crveno obojanih TRAP-pozitivnih osteoklasta subhondralno.

#### **4.5. Određivanje anti-kolagenskih protutijela s pomoću postupka ELISA**

Nakon žrtvovanja uzeti su uzorci seruma pojedinačnih životinja. Svaki uzorak je analiziran u duplikatu pomoću imunoenzimske metode (ELISA, prema engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Pločica s 96 zdenaca je obložena otopinom Tris-pufera (0,05 M Tris) koja sadrži 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CII, ostavljena preko noći na sobnoj temperaturi, oprana 4 puta otopinom PBS/0,05% Tween i zatim blokirana otopinom PBS/1% BSA (prema engl. *bovine serum albumin*) 1 sat na sobnoj temperaturi. Pločica je ponovo oprana otopinom PBS/0,05% Tween, a nakon toga su nanešeni uzorci seruma u razrjeđenju 1:2000 u otopini PBS/1 mM EDTA/0,05% Triton X-100 (100  $\mu\text{l}/\text{zdenca}$ ). Uzorci su potom ostavljeni 2 h na sobnoj temperaturi, nakon čega je pločica ponovo oprana otopinom PBS/0,05% Tween (4 puta) i u zdence je dodano 100  $\mu\text{l}$  protutijela anti-IgG1 i anti-IgG2a označenih s HRP (prema engl. *horseradish peroxidase*) (BD Biosciences) i razrijeđenih 1:1000 u otopini PBS/1% tijekom 2 h na sobnoj temperaturi. U zdence je zatim dodana otopina supstrata TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, Sigma-Aldrich Corp.) i ostavljena 15-30 minuta na sobnoj temperaturi, a reakcija je zaustavljena otopinom 10 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Optička gustoća obojenja zdenaca izmjerena je pomoću optičkog čitača (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD) na 450 nm. Titar svakog protutijela odredili smo u relativnim jedinicama prema standardnoj krivulji dobivenoj

očitanjem serijskih razrjeđenja standardnog uzorka (pomiješani serumi 10 miševa s vrlo kasnim artritismom).

## 4.6. Kultura stanica

### 4.6.1. Kultura osteoklasta

Hematopoetske stanice su prikupljene iz koštane srži, koštanog cilindra, slezene i periferne krvi miševa odgovarajuće skupine. Periferna krv je skupljena u odgovarajuće epruvete s antikoagulansom (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) krvarenjem miševa iz retrobulbarnog spleta nakon anesteziranja i analgeziranja. Suspenzija stanica slezene je dobivena gnječenjem slezena u plastičnim zdjelicama. Koštana srž je dobivena ispiranjem bedrenih i potkoljениčnih kostiju, a stanice koštanog cilindra homogenizacijom ispranih cilindara bedrenih kostiju pomoću uređaja za homogenizaciju tvrdih tkiva (IKA Ultra-turax T 25, Labortechnik, Staufen, Njemačka) (189). Jednostanične suspenzije navedenih tkiva su pripravljene u kultivacijskom mediju  $\alpha$ -MEM (Gibco BRL, Grand Island, NY, SAD) protiskivanjem kroz iglu veličine 23G te završnim protiskivanjem kroz sterilnu mrežicu veličine pora 70  $\mu$ m, nakon liziranja eritrocita puferom za liziranje crvenih krvnih stanica (0.15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1.0 mM  $\text{KHCO}_3$ , 0.1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ). Broj stanica u suspenziji je određen brojanjem u Bürker-Türkovoj komorici korištenjem 0.05% tripanskog plavila kako bi isključili mrtve stanice.

Stanice su potom posađene u pločice s 48 zdenaca u gustoći od  $0,5 \times 10^6$  stanica po zdencu u 0,5 mL diferencijacijskog medija koji je sadržavao  $\alpha$ -MEM uz 10% FBS (prema engl. *fetal bovine serum*), 100 U/mL penicilina, 100 U/mL streptomicina uz 15 ng/mL rekombinantnog mišjeg (rm) M-CSF (R&D systems, Minneapolis, MN, SAD) i 40 ng/mL rmRANKL (Amgen, Thousand Oaks, CA, SAD). Za svaki uzorak je zasađeno šest zdenaca, a diferencijacijski medij je promijenjen nakon trećeg dana. Nakon šest dana kultivacije stanice su fiksirane 2.5% glutaraldehidom u PBS-u 30 minuta na sobnoj temperaturi, a potom obojane postupkom za dokazivanje aktivnosti enzima TRAP, upotrebom seta kemikalija za enzimsku histokemiju (Leukocyte acid phosphatase kit; Sigma-Aldrich Corp.) prema uputama proizvođača. Ljubičasto obojane stanice s tri ili više jezgara po stanici smatrane su osteoklastima i brojane su pomoću invertnog svjetlosnog mikroskopa. Po skupini je također zasađeno dodatnih osam zdenaca za izolaciju RNA trećeg i šestog dana osteoklastogenetskih

kultura, a dodatna četiri zdenca po skupini su zasađena za određivanje aktivnosti enzima TRAP u staničnom lizatu trećeg i šestog dana stanične kulture.

#### **4.6.2. Kultura osteoblasta**

Stanične suspenzije koštane srži i stanica dobivenih iz homogeniziranog koštanog cilindra su pripremljene na isti način kao i za osteoklastogenetske kulture. Za uzgoj osteoblasta suspenzije stanica iz koštanih cilindara su zasađene u pločice s 24 zdenca, a u pločice sa šest zdenaca su zasađene stanice iz koštanih srži u gustoći  $1 \times 10^6$  stanica/mL  $\alpha$ -MEM hranjivog medija s 10% FBS, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina. Četvrtoga dana kulture je promijenjen hranjivi medij, čime su iz kulture odstranjene neadherentne i mrtve stanice. Sedmog dana kulture, u zdence je dodan diferencijacijski medij koji se sastoji od temeljnog medija  $\alpha$ -MEM s 10% FBS, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina, uz dodatak 50  $\mu$ g/mL askorbinske kiseline,  $10^{-8}$  M deksametazona i 8 mM  $\beta$ -glicerofosfata (Sigma-Aldrich Corp., Milwaukee, MI, SAD). Medij je potom mijenjan svaki drugi dan. Za svaki uzorak je zasađeno četiri zdenca na pločici za kulturu s 24 zdenca ili dva zdenca na pločici za kulturu sa šest zdenaca za histokemijsko bojanje kolonija koje izražavaju enzim AP. Kolonije su obojane 13. dana kulture, korištenjem komercijalno dostupnog seta kemikalija (Alkaline phosphatase leukocyte kit; Sigma-Aldrich Corp.), a crveno obojane AP-pozitivne kolonije su izbrojane pomoću invertnog svjetlosnog mikroskopa Axiovert 200 (Carl Zeiss Microimaging Inc., Oberkochen, Njemačka). Za izolaciju stanične RNA i za kolorimetrijsko određivanje aktivnosti enzima AP u staničnom lizatu u tri vremenske točke (7., 10. i 13. dan kulture), je zasađeno po četiri zdenaca na pločici za kulturu s 24 zdenca, odnosno dva zdenca na pločici za kulturu sa šest zdenaca po svakoj vremenskoj točki.

#### **4.7. Kolorimetrijsko određivanje aktivnosti enzima TRAP i AP u staničnom lizatu**

U kolorimetrijskom postupku za određivanje aktivnosti enzima TRAP i AP kao kromogeni supstrat je korišten p-nitrofenil fosfat (pNPP, prema engl. *p-nitrophenylphosphate*). Enzimi TRAP i AP hidroliziraju pNPP pri temperaturi 37°C u kiselom, odnosno alkalnom mediju uz stvaranje žuto obojenog p-nitrofenola (PNP, prema engl. *p-nitrophenol*). Ukratko, stanice iz gore navedenog broja zdenaca po uzorku iz kultura osteoklasta i osteoblasta su oprane tri puta

PBS otopinom, dodana je odgovarajuću količinu pufera za lizu stanica, npr. 200  $\mu$ L pufera po zdencu na pločici sa 48 zdenaca (pufer za lizu stanica osteoblasta: 10 mM Tris, 0.1% Triton X-100; pufer za lizu stanica osteoklasta: Na acetat, 0.5 M NaCl, 1% Triton X-100), te je sadržaj zdenaca premješten u epruvete. Potom su uzorci tri puta smrznuti i odmrznuti, a nakon trećeg odmrzavanja su centrifugirani 5 minuta na 12000 g. Supernatanti su premješteni u nove epruvete, te su uzorci pohranjeni na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Aktivnost enzima TRAP i AP je određena u pločicama s 96 zdenaca. U zdence je u duplikatu dodana preporučena količina uzorka, lizirajućeg pufera i kromogenog supstrata pNPP. Za negativnu kontrolu je dodan samo lizirajući pufer. Pločica je zatim inkubirana na  $37^{\circ}\text{C}$ , a potom su očitane apsorbancije na optičkom čitaču (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD) pri valnoj duljini 405 nm. Aktivnost enzima TRAP i AP smo izračunali koristeći jednadžbu pravca standardne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancija u standardnim uzorcima s poznatim koncentracijama PNP. Intenzitet žute boje proporcionalno odgovara količini PNP (mmol/min) i predstavlja aktivnost enzima u lizatu (U/L, prema engl. *units/liter*).

#### **4.8. Analiza genskog izražaja**

Izražaj gena je određen u kulturama osteoklasta (3. i 6. dan), osteoblasta (7., 10. i 13. dan) i u različitim tkivima (0. dan): koštanoj srži, koštanom cilindru, slezeni i perifernoj krvi. Za izolaciju RNA iz koštanog cilindra, cilindri su nakon dodavanja 1 ml otopine za izolaciju homogenizirani uređajem za homogenizaciju tvrdih tkiva (IKA Ultra-turax T 25, Labortechnik, Staufen, Njemačka). Tkiva su homogenizirana u odgovarajućem volumenu otopine za izolaciju RNA (TRI-Reagent; Molecular Research Center, Cincinnati, OH, SAD), a za uzimanje RNA iz stanične kulture najprije se odlio medij iz zdenaca, stanice su kratko isprane PBS otopinom, a potom je u svaki zdenac dodan odgovarajući volumen otopine za izolaciju RNA (TRI-Reagent). Nakon dodavanja otopine za izolaciju, uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta, a potom centrifugirani brzinom od 12000 g tijekom 30 minuta na  $+4^{\circ}\text{C}$ . Potom je u uzorke dodano 0.2 mL kloroforma, uzorci su inkubirani 2 minute na  $+4^{\circ}\text{C}$  i centrifugirani pri 10000 g tijekom 15 minuta na  $+4^{\circ}\text{C}$ . Gornja, vodena faza je prenešena u novu epruvetu, na nju je dodano 0.5 mL izopropanola i inkubirana je tijekom 60 minuta na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ponovnim centrifugiranjem pri 12000 g tijekom 15 minuta na  $+4^{\circ}\text{C}$  je spušten dobiveni precipitat na dno epruvete, opran je 75%-tnim etanolom i centrifugiran brzinom od 7500 rpm tijekom 5 minuta na  $+4^{\circ}\text{C}$ . Talog je otopljen u destiliranoj vodi, a

koncentracija i čistoća izolirane RNA je provjerena pomoću UV-VIS spektrofotometra za mjerenje malih uzoraka (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, SAD) mjerenjem apsorbancija pri 260 nm i 280 nm te određivanjem njihovog omjera. Izolirana RNA u količini od 2 µg po uzorku je prepisana u cDNA postupkom reverzne transkripcije upotrebom seta kemikalija High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) prema uputama proizvođača. Ukratko, u svaki uzorak RNA (u ukupnom volumenu 9 µl) je dodano 10 µl 2X RT pufera i 1 µl 20X mješavine enzima reverzne transkriptaze te je uzorak inkubiran na 37°C tijekom 60 minuta. Reakcija je zaustavljena grijanjem tijekom 5 minuta na 95°C. Dobivena cDNA umnožena je i analizirana postupkom kvantitativne polimerazne lančane reakcije (qPCR), pomoću uređaja ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Analiziran je izražaj specifičnih osteoklastnih diferencijacijskih gena (RANK, cFms, CalcR i Cat K), specifičnih osteoblastnih diferencijacijskih gena (Runx2, Osterix, AP, BSP, OC) te upalnih citokina i kemokina (TNF- $\alpha$ , IL-6, CCL2, CCL5) pomoću komercijalno dostupnih setova kemikalija TaqMan Assay (Applied Biosystems) i TaqMan Gene Expression Master mix (Applied Biosystems) prema uputama proizvođača. TaqMan Assay sastoji se od para specifičnih začetnika i probe koja na 5' kraju ima fluorescentnu boju 6-FAM, a na 3' kraju hvatač fluorescencije (NFQ, prema engl. *nonfluorescent quencher*). Proba se veže na cDNA između oba začetnika, a produljenjem začetnika, DNA polimeraza cijepa probu i tako dovodi do odvajanja fluorescentne boje od NFQ i porasta fluorescencije. Svaka reakcija sastojala se od duplikata, u reakcijskom volumenu 25 µL, u pločicama s 96 zdenaca (ABI PRISM Optical 96-Well Plate; Applied Biosystems). Smjesa sadržava: 0,25 µL cDNA; 0,25 U uracil N-glikozilaze (AmpErase; Applied Biosystems); po 200 nM začetnika 5' i začetnika 3'; 250 nM TaqMan probe i 0,625 U DNA polimeraze (AmpliTaq Gold DNA polymerase). Tijekom umnožavanja uzorci su inkubirani tijekom 2 minute na +50°C kako bi se aktivirao enzim uracil N-glikozilaza, a potom 10 minuta na +95°C da bi se uracil N-glikozilaza inaktivirala, a aktivirala DNA polimeraza. Potom slijedi 40 ciklusa tijekom kojih su uzorci inkubirani na: +95°C 15 s i 60°C 60 s. Rezultati su prikazani kao relativna količina cDNA uporabom standardne krivulje. Standardna krivulja dobivena je uporabom 5 serijskih razrjeđenja uzorka za kalibraciju (cDNA iz tkiva ili kulture osteoblasta i osteoklasta). Relativna količina RNA u uzorku je izražena u odnosu na količinu RNA za  $\beta$ -aktin, kao „endogena“ kontrola.

#### 4.9. Protočna citometrija

Hematopoetske stanice su prikupljene iz koštane srži, koštanog cilindra, slezene i periferne krvi miševa odgovarajuće skupine kao što je opisano u prethodnim odjeljcima. Iz periferne krvi eritrociti su uklonjeni puferom za liziranje (0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 1.0 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA/PBS) i potom inkubacijom na sobnoj temperaturi tijekom 5 min. Za analizu je korišteno 10<sup>6</sup> stanica po uzorku. Stanice su resuspendirane u 50 µL PBS/2% FBS i obilježene specifičnim protutijelima tijekom 40 minuta na +4°C u mraku te nakon toga su isprane dva puta i resuspendirane u 350 µL PBS/2% FBS. Suspenzije stanica su obilježene monoklonskim protutijelima (e-Bioscience, San Diego, CA, SAD), specifičnim za mišje stanične biljege, konjugiranim s fluorescentnim bojama fikoeritriinom (PE, prema engl. *phycoerithrin*), fluorescein-izotiocijanatom (FITC, prema engl. *fluorescein-isothiocyanate*), fikoeritriin-cijaninom 7 (PE Cy7, prema engl. *phycoerithrin-cyanine 7*) i alofikocijaninom (APC, prema engl. *allophycocyanine*). Za obilježavanje stanica korištena su sljedeća monoklonska protutijela: za populacije mijeloidnih stanica PE-anti-F4/80, FITC-anti-CD11b i APC-anti-CD11c; za populacije limfoidnih stanica PE-anti-CD8, FITC-anti-CD3, FITC-anti-NK1.1, PE-Cy7-anti-CD4 i APC-anti-B220; za populacije osteoklastnih progenitora PE-anti-CD115, FITC-anti-CD3, FITC-anti-B220, FITC-anti-NK1.1, PE Cy7-anti-CD11b i APC-anti-CD117; a za populacije osteoblastnih progenitora PE-anti-CD166, FITC-anti-Sca-1, PE Cy7-anti-CD31 i APC-anti-CD45, APC-anti-Ter119, APC-anti-CD11b, APC-anti-B220. Za ugađanje uređaja su korištene nebojene suspenzije te jednostruka bojanja suspenzije koštane srži kontrolne skupine. Obilježene suspenzije stanica smo analizirali protočnim citometrom FACSCalibur (Beckton Dickinson, San Jose, CA, SAD). Dobivene podatke smo analizirali pomoću programa CellQuest (Beckton Dickinson). Za analizu populacija prikupljeno je po uzorku 100 000 i više citometrijskih događaja (prema engl. *aquisition events*).

#### 4.10. Sortiranje osteoklastnih progenitora i kultura osteoklasta

Hematopoetske stanice su prikupljene iz koštane srži i slezene miševa odgovarajuće skupine. Stanice su resuspendirane i obilježene monoklonskim protutijelima kako bi se identificirale specifične populacije osteoklastnih progenitora: PE-anti-CD115, FITC-anti-CD3, FITC-anti-B220, FITC-anti-NK1.1 i PE Cy7-anti-CD11b. Osteoklastni progenitori iz koštane srži su definirani kao stanice fenotipa CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>-/low</sup>CD115<sup>+</sup>, a iz slezene kao stanice

fenotipa CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup>, te sortirane pomoću instrumenta BD FACSAria I (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Sortirane stanice su skupljene u kultivacijskom mediju  $\alpha$ -MEM/20%FBS te potom korištene za kulturu osteoklasta i analizu genskog izražaja. Stanice su posađene u pločice s 96 zdenaca u gustoći od 5 000 (koštana srž) i 10 000 (slezena) stanica po zdencu u 0,2 mL diferencijacijskog medija koji je sadržavao  $\alpha$ -MEM uz 10% FBS, 100 U/mL penicilina, 100 U/mL streptomicina uz 40 ng/mL rmM-CSF i 60 ng/mL rmRANKL koji je potom mijenjan svaki drugi dan uz 20 ng/mL rmM-CSF i 30 ng/mL rmRANKL. Za svaki uzorak zasađeno je 10 zdenaca. Nakon šest dana kultivacije stanice u pet zdenaca su obojane postupkom za dokazivanje aktivnosti enzima TRAP, kako je već opisano. Ljubičasto obojane stanice s tri ili više jezgara po stanici smatrane su osteoklastima i brojane su pomoću invertnog svjetlosnog mikroskopa. Ostalih pet zdenaca je korišteno za izolaciju RNA šestog dana osteoklastogenetskih kultura te je analiziran izražaj specifičnih osteoklastnih diferencijacijskih gena (RANK, cFms, CalcR i Cat K).

#### **4.11. Analiza koštanog metabolizma**

##### **4.11.1. Mikro-kompjutorizirana tomografija**

Distalne metafize bedrenih kostiju (procjena periartikularnog gubitka kosti) i drugog slabinskog kralješka (L2) (procjena sustavnog gubitka kosti) su skenirane sustavom za mikro-kompjutoriziranu tomografiju (1172SkyScan, SkyScan, Kontich, Belgija). Bedrene kosti su snimljene svakih 0.7° kroz 360° rotacije, pri rezoluciji od 2  $\mu$ m, te uz korištenje aluminijskog filtera debljine 0.5 mm, dok su kralješci snimljeni svakih 0.5° kroz 180° rotacije, pri rezoluciji od 9  $\mu$ m, te uz korištenje aluminijskog filtera debljine 0.5 mm. Skenirane slike su rekonstruirane pomoću SkyScan Recon programa i analizirane pomoću SkyScan CTAnalyser v. 1.10 2010 programa. Područje za trodimenzionalnu analizu i rekonstrukciju trabekularne kosti u bedrenoj kosti i L2 kralješčima je određeno u odnosu na ploču rasta, odnosno granicu hrskavice i kosti, a koje počinje otprilike na udaljenosti od 0,4 mm od zone rasta i proteže se visinom od 1 do 5 mm. Analizom kostiju su određene sljedeće varijable: koštani volumen (BV/TV; %), broj trabekula (Tb.N/mm), širina trabekula (Tb.Th;  $\mu$ m) i razdvojenost trabekula (Tb.Sp;  $\mu$ m).

#### 4.11.2. Dinamička histomorfometrija

Za dinamičku histomorfometriju, odnosno mjerenje parametara koštane formacije, miševima je injiciran kalcein (zeleno) koji se ugrađuje u novostvorenu kalcificiranu kost, 20 µg/g, u razmaku od pet dana, a sedmog dana od početka injiciranja životinje su žrtvovane. Bedrene kosti su uzete pri žrtvovanju životinja i fiksirane u otopini 4% paraformaldehida tijekom 24 sata na +4°, zatim demineralizirane u otopini 14% EDTA i 3% paraformaldehida tijekom 7 do 14 dana, dehidrirane u rastućim koncentracijama etanola te uklopljene u parafinske blokove. Serijski rezovi preparata debljine 6 µm su izrezani na rotacijskom mikrotomu (Leica SM 2000 R, Leica, Nussloch, Njemačka). Histomorfometrijska analiza je rađena na mikroskopu s fluorescentnom kamerom (Axio Imager, Zeiss), priključenim na računalo s programom za analizu kosti (OsteoMeasure, OsteoMetrics, Decatur, GA, SAD). Iz izmjerenih vrijednosti je u području trabekularne kosti i endostu izračunata brzina odlaganja minerala (MAR, prema engl. *mineral apposition rate*, µm/dan) (udaljenost dviju kalceinskih crta mineralizacije u odnosu na vrijeme između dvije primjene kalceinskog biljega) i brzina stvaranja kosti (BFR/BS, prema engl. *bone formation rate*, µm<sup>3</sup>/µm<sup>2</sup>/dan) koja je pokazatelj količine novostvorene mineralizirane kosti u određenom vremenu i izražava se u odnosu na koštanu površinu.

#### 4.11.3. Statička histomorfometrija

Na rezovima prvog MTP zgloba miševa s artritismom i kontrolnih miševa obojanim Goldner-Masson-trikromom je određena debljina hrskavice (µm) i udio subhondralne kosti (%) parametrima statičke histomorfometrije, kako je već opisano, a TRAP-obojeni rezovi su služili za određivanje prisutnosti osteoklasta subhondralno.

Na Goldnerom obojanim serijskim rezovima bedrenih kostiju, mjerenje je vršeno u području trabekularne kosti metafizealne regije, jedno vidno polje od ploče rasta, na jednakoj udaljenosti od endokorteksa jedne i druge strane pod povećanjem 5×. Histomorfometrijska analiza je rađena Axio Imager mikroskopom (Carl Zeiss Microimaging Inc., Oberkochen, Njemačka) opremljenim s CCD kamerom i priključenim na elektronsko računalo s programom za analizu kosti (OsteoMeasure, OsteoMetrics, Decatur, GA, USA). Promjene koštane građe u miševa koji su razvili artritis u odnosu na kontrolne miševe definirane su uporabom standardnih morfometrijskih parametara: određivanjem postotka trabekularnog



koštanog volumena (BV/TV; %), broja trabekula (Tb.N/mm), širine trabekula (Tb.Th; mm) i razmaka među trabekulama (Tb.Sp; mm), koji su izračunati automatski pomoću OsteoMeasure programa.

#### **4.12. Statistički postupci**

Svi pokusi ponovljeni su najmanje tri puta. Većina bioloških svojstava mjerenih u predviđenim pokusima ima normalnu raspodjelu u populaciji (190), stoga su rezultati reprezentativnih pokusa prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD, prema engl. *standard deviation*). Statistička analiza razlika između pokusne i kontrolne skupine za vrijednosti koštanih parametara i diferenciranih koštanih stanica u kulturi napravljena je korištenjem Studentovog t-testa. Korelacija kliničkog bodovanja artritisa i razine protutijela anti-CII u istog miša je napravljena pomoću korelacije ranga i Spearmanovog koeficijenta rho ( $\rho$ ) s 95%-tnim intervalom pouzdanosti (CI, prema engl. *confidence interval*). U svim smo testovima za razinu statističke značajnosti (vrijednost  $\alpha$ ) postavili  $p < 0,05$ . Metodološke studije analiza izražaja gena qPCR-om predlažu da se najmanjom razlikom u izražaju gena, koju je moguće reproducibilno zabilježiti, smatra biološki značajna razlika od barem 100% (191). Za statističku obradu podataka korišten je računalni program MedCalc (Mariakerke, Belgija).

## **5. REZULTATI**

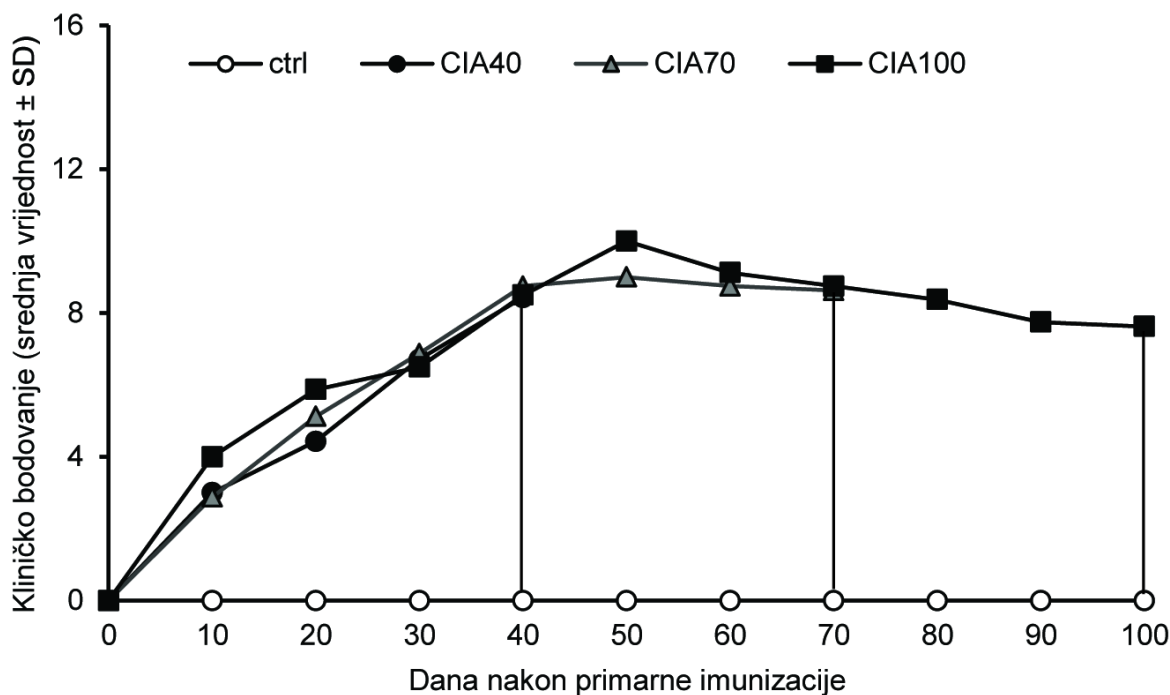
### **5.1. Klinička, laboratorijska i histološka procjena artritisa potaknutog kolagenom u miševa soja C57BL/6**

Mišji modeli reumatoidnoga artritisa služe za proučavanje patogeneze artritisa. U modelu artritisa potaknutog kolagenom procjena razvoja artritisa vrši se kliničkim bodovanjem zglobne upale, određivanjem specifičnih anti-kolagenskih protutijela u serumu životinja, histološkom potvrdom zglobne upale, analizom limfocitnih populacija i određivanjem citokinskog profila (179).

#### **5.1.1. Kliničko bodovanje artritisa**

Združenom analizom provedenih pokusa u modelu eksperimentalnog artritisa potaknutog kolagenom oko 80% miševa soja C57BL/6 razvilo je artritis nakon primarne (CII+CFA) (0. dan) i sekundarne (CII+IFA) imunizacije (21. dan), što je primarno ovisilo o uspješnosti intradermalnog injiciranja emulzije. Znakovi artritisa, kao što su upaljen jedan ili više prstiju, su se pojavili kod većine životinja 10. dana nakon primarne imunizacije, a maksimalan zbroj bodova analizom svih pokusa postignut je između 40. i 70. dana nakon primarne imunizacije (Slika 5.). Zbroj bodova kliničkih znakova artritisa se tijekom daljnjeg praćenja artritisa postepeno smanjuje, ali svi miševi koji su razvili artritis potaknut kolagenom praćenjem do 100. dana nakon primarne imunizacije imaju i dalje kliničke znakove artritisa (Slika 5.). Praćenjem razvoja i znakova artritisa smo opazili da miševi koji su razvili artritis imaju znakove i simetričnog i asimetričnog artritisa, s tim da se simetrični i asimetrični artritis može izmjenjivati kod istog miša, ali u konačnici veći broj miševa razvije znakove simetričnog artritisa (oko 80%) s jačim zahvaćanjem stražnjih šapa. Maksimalan zbroj bodova kojim je ocijenjen pojedinačni miš je bio 14/16, što znači da je taj miš imao jako otečenu šapu kojom se nije mogao držati za poklopac kaveza, ali niti jedan miš tijekom praćenja nije razvio ankilozu šape niti dosegnuo maksimalan zbroj bodova (16/16) na ljestvici kliničkog bodovanja artritisa. Kontrolna skupina miševa koja je obrađena PBS otopinom tijekom kliničkog praćenja nije pokazivala nikakve kliničke znakove artritisa (Slika 5.). Na Slici 5. su

prikazani rezultati dobiveni analizom izabranih pokusa ranog (CIA40), kasnog (CIA70) i vrlo kasnog (CIA100) artritisa.



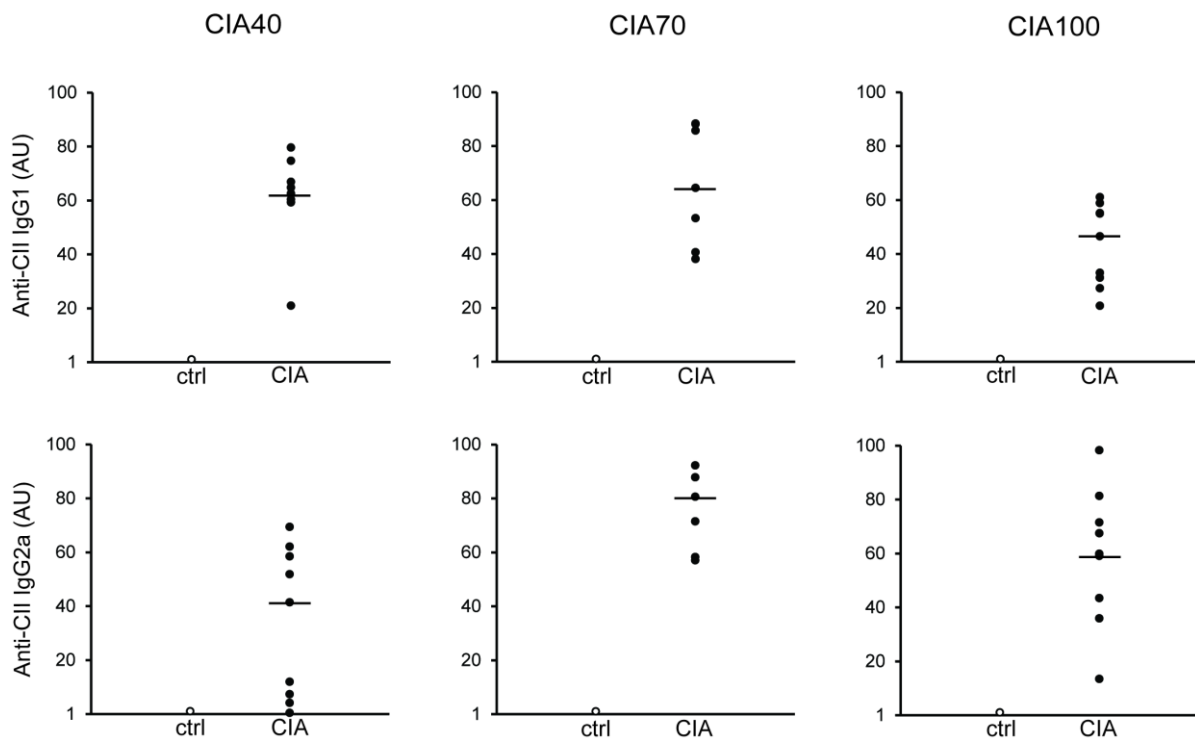
**Slika 5. Klinička procjena artritisa bodovanjem kliničkih znakova artritisa na ljestvici bodovanja od 0 do 16.** Prema protokolu miševi su injicirani emulzijom kokošjeg kolagena tipa II (CII) i kompletnog Freundovog adjuvansa. Tri tjedna nakon primarne imunizacije na isti način je injicirana sekundarna doza emulzije CII i inkompletnog Freundovog adjuvansa. Kontrolnoj skupini miševa je injiciran PBS (PBS; prema engl. *phosphate-buffered saline*). Kliničko bodovanje artritisa se provodilo svakog petog dana od dana primarne imunizacije (0. dan), a radi jasnijeg prikaza navedeni su rezultati dobiveni bodovanjem svakog desetog dana. Prema protokolu bodovani su znakovi zglobne upale na skali od 0 do 16 (0 do 4 za svaku šapu, zbrajajući bodove za sve četiri šape) koristeći se sljedećim kriterijima: 0 - šapa bez znakova artritisa, 1 - jedan prst upaljen i otečen, 2 - upaljeno i otečeno više od jednog prsta, ali ne cijela šapa ili blaga otečenost cijele šape, 3 - cijela šapa upaljena i otečena, 4 - jako upaljena ili otečena šapa ili ankiloza šape. Pokusi su ponovljeni tri puta s ukupno 8-10 miševa po svakoj skupini, sa sličnim rezultatima, a prikazani su rezultati izabranih nezavisnih pokusa ranog (CIA40), kasnog (CIA70) i vrlo kasnog (CIA100) artritisa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postignutog zbroja bodova svih miševa po skupini  $\pm$  standardna devijacija (SD). CIA, artritis potaknut kolagenom (prema engl. *collagen induced arthritis*).

### 5.1.2. Analiza razine anti-kolagenskih protutijela u miševa s artritisom potaknutim kolagenom

U modelu artritisa potaknutog kolagenom postupkom ELISA-e (179) određuje se razina specifičnih anti-kolagenskih protutijela anti-CII IgG1 i anti-CII IgG2a te vrši usporedba s

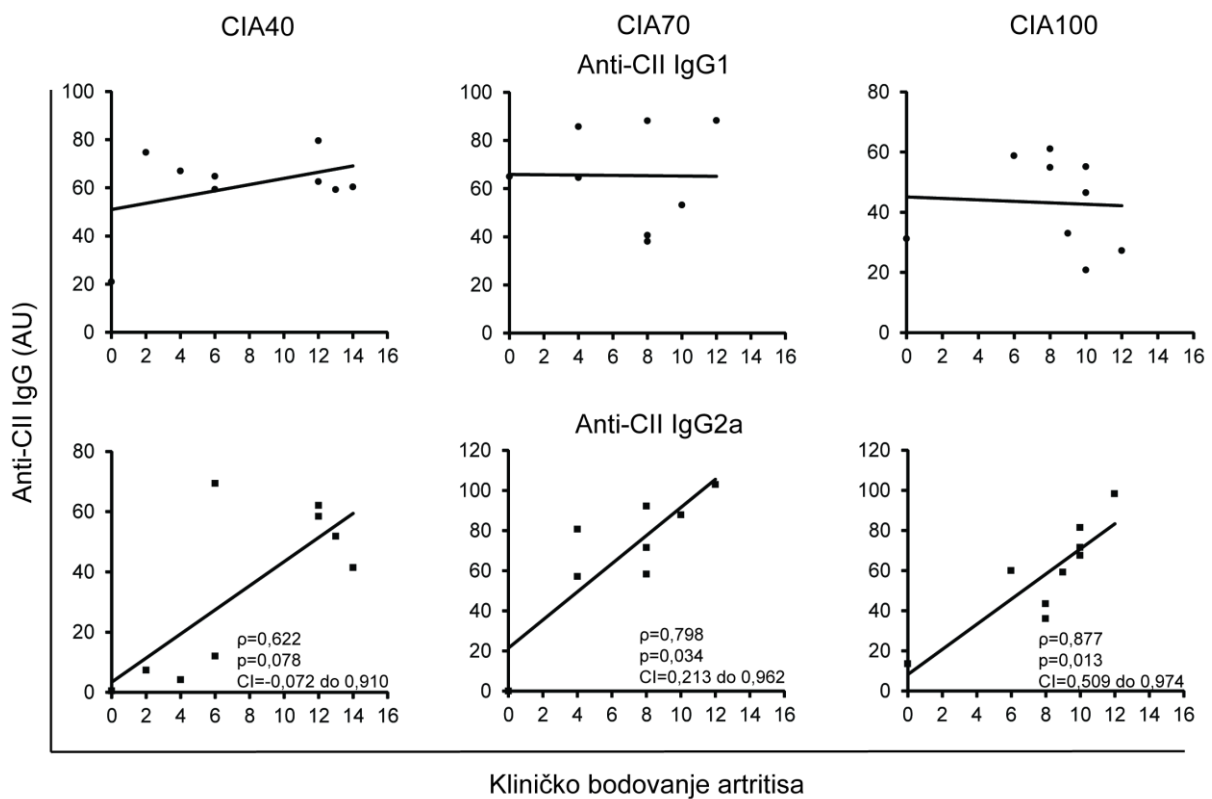
kontrolnom skupinom životinja koje su obrađene PBS otopinom. Prilikom žrtvovanja miševa prikupljeni su serumi svake pojedinačne životinje u skupini te je razina anti-kolagenskih protutijela uspoređena između seruma kontrolne skupine miševa i miševa s artritisom.

U serumima kontrolne skupine životinja anti-kolagenska protutijela nisu nađena. Nasuprot tome, u serumima miševa s artritisom su izmjerene visoke razine anti-kolagenskih protutijela na dan žrtvovanja (40., 70. i 100. dana od dana primarne imunizacije). Anti-kolagenska protutijela anti-CII IgG1 i anti-CII IgG2a u serumima miševa s artritisom ostaju prisutna na gotovo istim razinama tijekom ukupnog vremena praćenja bolesti, što je u skladu s rezultatima kliničkog bodovanja zglobne upale (Slika 6.).



**Slika 6. Razine anti-kolagenskih (CII) protutijela anti-CII IgG1 i anti-CII IgG2a u artritisu potaknutom kolagenom.** Prema protokolu miševi su injicirani emulzijom kokošjeg kolagena tipa II (CII) i potpunog Freundovog adjuvansa. Tri tjedna nakon primarne imunizacije na isti način je injicirana sekundarna doza emulzije CII i inkompletnog Freundovog adjuvansa. Kontrolnoj skupini miševa je injiciran PBS (PBS; prema engl. *phosphate buffered saline*). Miševi su žrtvovani 40, 70 i 100 dana od dana primarne imunizacije. Serumi kontrolne skupine miševa su grupirani zajedno, a serumi miševa s artritisom potaknutim kolagenom (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*) su uzeti pojedinačno. Svaki uzorak je analiziran u duplikatu pomoću imunoenzimske metode (ELISA, prema engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) i u njemu je određena razina anti-kolagenskih protutijela anti-CII IgG1 i anti-CII IgG2a. Pokusi su ponovljeni tri puta sa sličnim rezultatima, a prikazani su rezultati izabranih nezavisnih pokusa ranog (CIA40), kasnog (CIA70) i vrlo kasnog (CIA100) artritisa. Točke predstavljaju pojedinačne vrijednosti razine protutijela u serumu, a crta medijan tih vrijednosti.

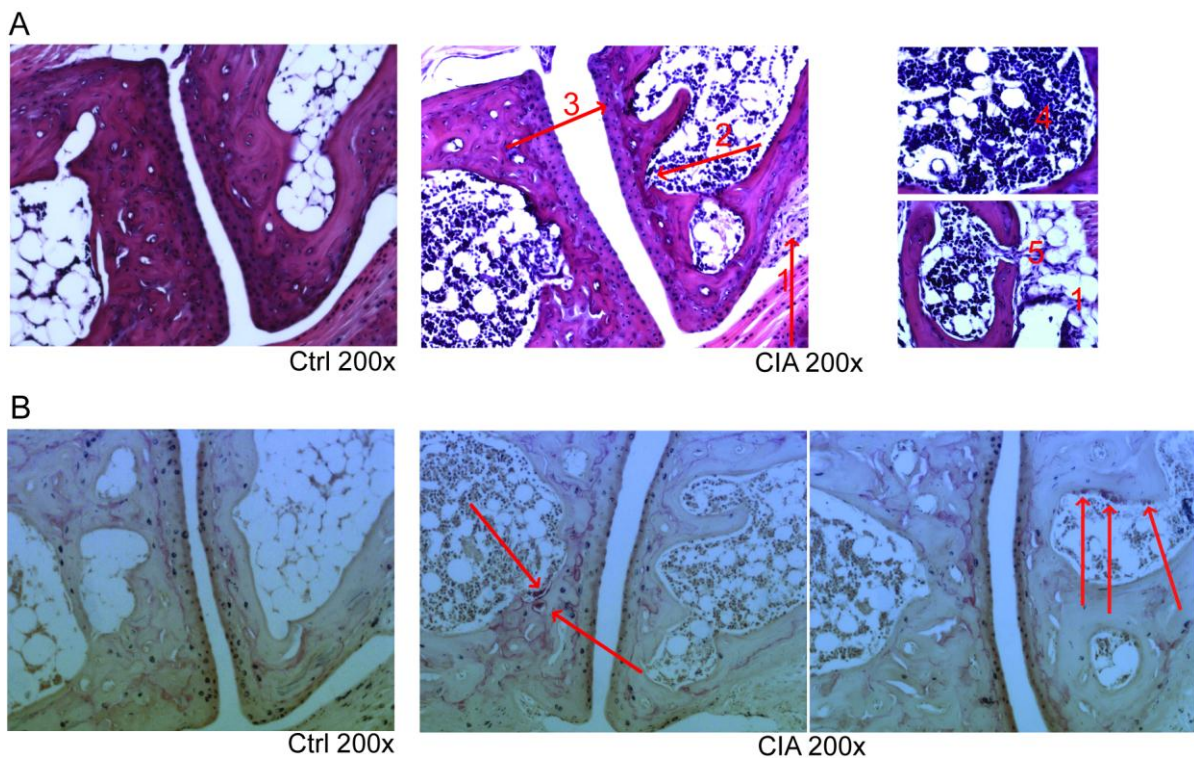
Također je testirana povezanost kliničkog bodovanja artritisa (ukupan broj bodova kojeg je pojedini miš postigao na dan žrtvovanja) i razine protutijela anti-CII IgG1 i anti-CII IgG2a u istog miša. Miševi koji kliničkim bodovanjem zglobne upale nisu razvili artritis ili imaju nizak broj bodova, nemaju anti-kolagenskih protutijela ili imaju niske razine protutijela u odnosu na miševe s većim brojem bodova. Nadalje, kliničko bodovanje artritisa u većini pokusa pozitivno korelira s razinom protutijela anti-CII IgG2a, ali ne i anti-CII IgG1, što pregledom literature u dosadašnjim istraživanjima nije objavljeno, iako je očekivano da težina artritisa može korelirati s razinom anti-CII protutijela (Slika 7.).



**Slika 7. Korelacija razine anti-kolagenskih (CII) protutijela anti-CII IgG1 i anti-CII IgG2a i kliničkog bodovanja artritisa u artritisu potaknutom kolagenom.** Prema protokolu miševi su injicirani emulzijom kokošnjeg kolagena tipa II (CII) i kompletnog Freundovog adjuvansa. Tri tjedna nakon primarne imunizacije na isti način je injicirana sekundarnu doza emulzije CII i inkompletnog Freundovog adjuvansa. Miševe su žrtvovani 40, 70 i 100 dana od dana primarne imunizacije, a prikazani rezultati kliničkog bodovanja artritisa se odnose na srednju vrijednost  $\pm$  standardna devijacija na dan žrtvovanja miša (prema protokolu su bodovani znakovi zglobne upale na skali od 0 do 16) te su serumi svakog pojedinačnog miša s artritisom potaknutim kolagenom (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*) uzeti pojedinačno. Svaki uzorak je analiziran u duplikatu pomoću imunoenzimske metode (ELISA, prema engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) i u njemu je određena razina anti-CII IgG1 i anti-CII IgG2a. Pokusi su ponovljeni tri puta sa sličnim rezultatima, a prikazani su rezultati izabranih nezavisnih pokusa ranog (CIA40), kasnog (CIA70) i vrlo kasnog (CIA100) artritisa. Točke predstavljaju svakog pojedinačnog miša u pokusu. Korelacija kliničkog bodovanja artritisa i razine protutijela anti-CII IgG2a u istog miša je napravljena pomoću korelacije ranga i Spearmanovog koeficijenta rho ( $\rho$ ) s 95%-tnim intervalom pouzdanosti (CI, prema engl. *confidence interval*). Razina statističke značajnosti (vrijednost  $\alpha$ ) je  $p < 0,05$ .

### 5.1.3. Histološki nalaz oštećenja zgloba u artritisu potaknutom kolagenom

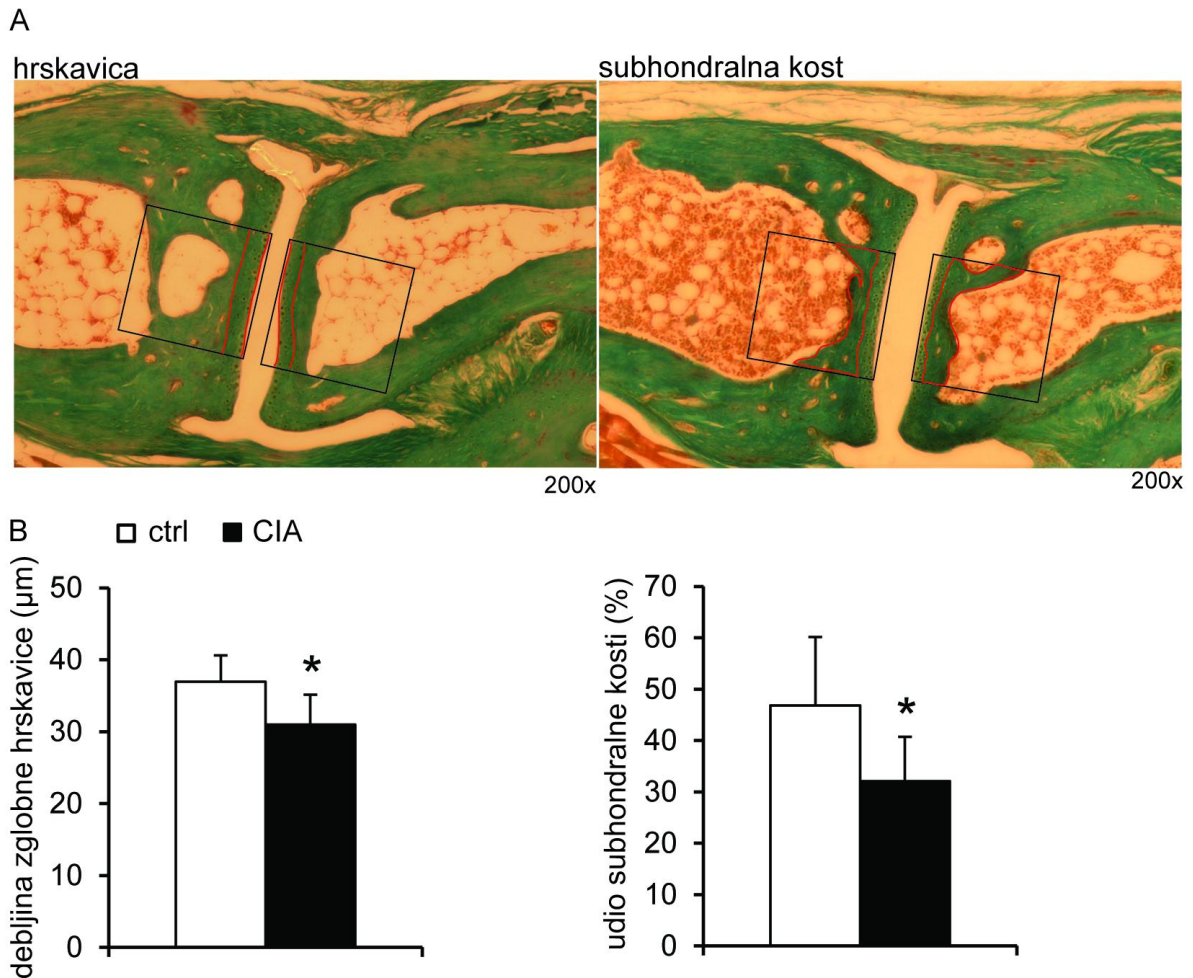
Histološka procjena zglobova 40, 70 i 100 dana nakon primarne imunizacije miševa je pokazala upalno oštećenje zglobova šapa miševa s artritisom potaknutim kolagenom u odnosu na kontrolnu skupinu miševa obrađenih PBS otopinom. Unatoč blagom sinovitisu, na svim histološkim preparatima obojanim postupkom HE izrazito je razvijen osteitis tj. zamjena masnih stanica koštane srži upalnim stanicama te veliki gubitak kosti u subhondralnom području. Nalaze se i erozije subhondralne kosti i hrskavice i stanjena zglobna hrskavica u miševa s artritisom u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 8.A). Na histološkim preparatima zglobova šape obojanim TRAP-om u području subhondralne kosti miševa s artritisom nalazimo TRAP-pozitivne osteoklaste, za razliku od kontrole, gdje nisu utvrđeni (Slika 8.B).



**Slika 8. Histološki nalaz zglobne upale u miševa s artritisom potaknutim kolagenom.** Prema protokolu miševi su injicirani emulzijom kokošjeg kolagena tipa II (CII) i kompletnog Freundovog adjuvansa. Tri tjedna nakon primarne imunizacije na isti način je injicirana sekundarna doza emulzije CII i inkompletnog Freundovog adjuvansa. Kontrolnoj skupini je injiciran PBS (PBS; prema engl. *phosphate buffered saline*). (A) Histološki preparati, obojani hemalaun-eozinom, metatarzofalangealnih zglobova kontrolnih (Ctrl) i miševa artritisom potaknutim kolagenom (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*). U kontrolnih miševa nije bilo znakova upalne infiltracije, koštane niti hrskavične destrukcije, te nije bilo znakova osteitisa. U miševa s CIA vidimo blagu upalnu infiltraciju sinovije/sinovitis (1), erozije i značajan gubitak subhondralne kosti uz prekid kortikalne barijere (2, 5), zamjenu masnih stanica koštane srži upalnim stanicama/osteitis (4), erozije i stanjenu zglobnu hrskavicu (3). (B) Histološki preparati, histokemijski obojani za TRAP (prema engl. *tartrate-resistant acid phosphatase*), metatarzofalangealnih zglobova kontrolnih miševa i miševa s artritisom. Strjelice pokazuju osteoklaste smještene uz subhondralnu kost. Prikazani su reprezentativni histološki rezovi metatarzofalangealnih zglobova miševa s artritisom. Povećanje 200x.



Navedene promjene analizirane su i na histološkim preparatima obojanim postupkom Goldner-Masson-trikrom procjenom debljine zglobne hrskavice i udjela subhondralne kosti u prvom metatarzofalangealnom zglobu miševa s artritisiom u odnosu na kontrolnu skupinu miševa (Slika 9.A). Debljina zglobne hrskavice i udio subhondralne kosti u miševa s artritisiom su statistički značajno manji u odnosu na kontrolnu skupinu miševa (Slika 9.B).



**Slika 9. Debljina zglobne hrskavice i udio subhondralne kosti u prvom metatarzofalangealnom zglobu miševa s artritisiom potaknutim kolagenom.** Prema protokolu miševi su injicirani emulzijom kokošnjeg kolagena tipa II (CII) i kompletnog Freundovog adjuvansa. Tri tjedna nakon primarne imunizacije na isti način je injicirana sekundarna doza emulzije CII i inkompletnog Freundovog adjuvansa. Kontrolna skupina je obrađena PBS otopinom (PBS; prema engl. *phosphate buffered saline*). **(A)** Goldner-Masson-trikrom obojani histološki preparati prvog metatarzofalangealnog zgloba. Slikovni prikaz histomorfometrijske analize: lijevo - histomorfometrijskom analizom izračunata je debljina zglobne hrskavice (µm) u regiji interesa kao udaljenost između dvije crvene linije, desno - histomorfometrijskom analizom izračunat je udio subhondralne kosti (%) kao volumen crveno označene kosti u regiji interesa. **(B)** Debljina zglobne hrskavice (µm) i udio subhondralne kosti (%) u miševa s artritisiom potaknutim kolagenom (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*) i kontrolne skupine (ctrl) su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. \* $p < 0,05$  (Studentov t-test). Povećanje 200x.

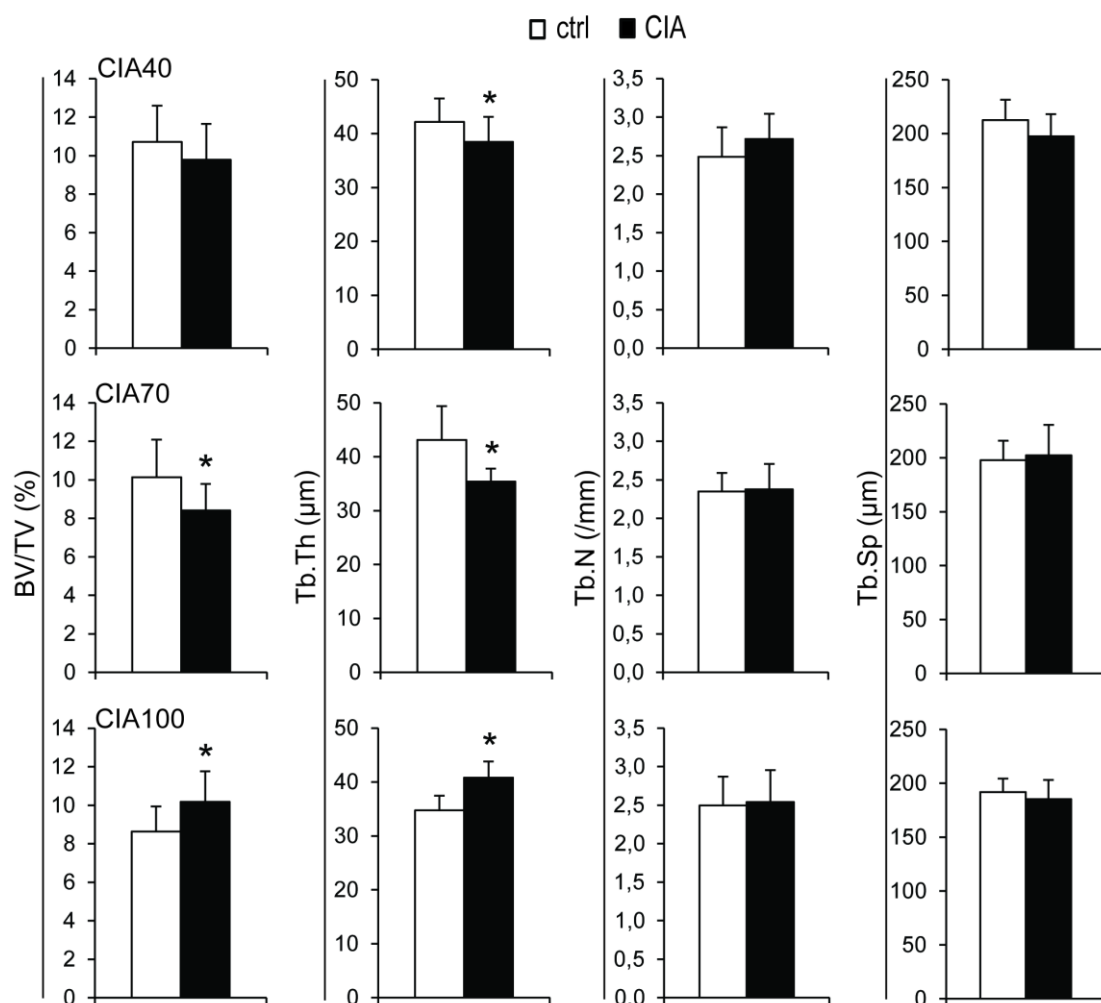
## **5.2. Učinak artritisa na koštani metabolizam *in vivo***

Iz ranijih rezultata je vidljivo da u artritisu potaknutom kolagenom dolazi do subhondralnog gubitka kosti, zbog čega su u sljedećem nizu pokusa analizirane sustavne promjene koštane pregradnje pomoću analize mikro-kompjutoriziranom tomografijom drugog slabinskog kralješka (L2) i periartikularne koštane pregradnje pomoću analize mikro-kompjutoriziranom tomografijom distalnih metafiza bedrenih kostiju. Rezultati periartikularne koštane pregradnje distalnih metafiza bedrenih kostiju su prikazani i parametrima statičke histomorfometrije na preparatima obojanim Goldner-Masson-trikrom.

### **5.2.1. Učinak artritisa na sustavni gubitak kosti**

Da bi utvrdili dolazi li u artritisu potaknutom kolagenom do sustavnog gubitka kosti, mikro-kompjutoriziranom tomografijom su analizirani trupovi kralješka L2. U ranom artritisu (CIA40) ne dolazi do smanjenja volumena trabekularne kosti, međutim dolazi do promjena u koštanom metabolizmu i građi kosti. To je vidljivo iz značajnog smanjenja širine koštanih gredica, ali i povećanja broja koštanih gredica u miševa s artritisom u odnosu na kontrolu, što bi govorilo u prilog jakom intenzitetu koštane pregradnje (razgradnje i izgradnje kosti) (Slika 10.). Nadalje, u kasnom artritisu (CIA70) dolazi do značajnog smanjenja volumena trabekularne kosti u miševa s artritisom u odnosu na kontrolnu skupinu sa značajnim smanjenjem širine koštanih gredica bez promjena u broju gredica (Slika 10.). Nasuprot tome, u vrlo kasnom artritisu (CIA100) dolazi do značajnog povećanja volumena trabekularne kosti u miševa s artritisom na račun povećanja širine koštanih gredica (Slika 10.). Iz navedene analize kralješka L2 vidimo da je koštani metabolizam u artritisu potaknutom kolagenom izrazito promijenjen u odnosu na kontrolu, što je najvjerojatnije posljedica promjene u aktivnosti i broju osteoklasta i osteoblasta u različitim stadijima bolesti.



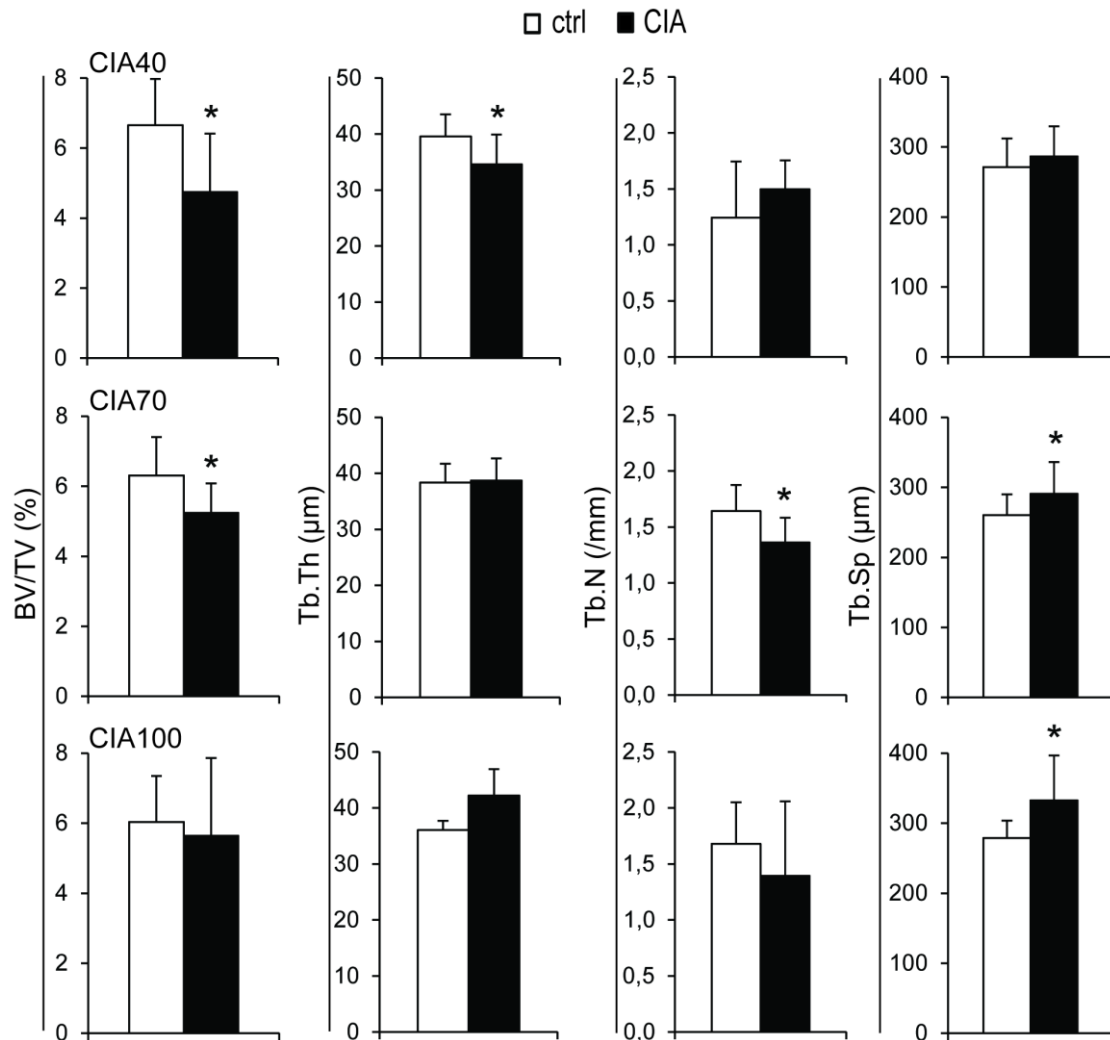


**Slika 10. Učinak artritisa potaknutog kolagenom na sustavnu razgradnju i izgradnju kosti analiziran mikro-kompjutoriziranom tomografijom trupa drugog slabinskog (L2) kralješka.** Miševi s ranim (CIA40), kasnim (CIA70) i vrlo kasnim (CIA100) artritisiom potaknutim kolagenom (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*) i kontrolni miševi obrađeni PBS otopinom (ctrl) su žrtvovani, a kosti su snimljene na svakih 0.5° kroz 180° rotacije, pri rezoluciji od 9 µm te uz korištenje aluminijskog filtera debljine 0.5 mm i rekonstruirane korištenjem programa SkyScan Recon. Najmanji broj miševa po skupini je bio šest, analiza je ponovljena u dva pokusa, a prikazani su kumulativni rezultati oba pokusa. Udio trabekularne kosti (BV/TV, prema engl. *bone volume/total volume*; %), širina trabekula (Tb.Th, prema engl. *trabecular thickness*; µm), broj trabekula (Tb.N, prema engl. *trabecular number*; /mm) i razdvojenost trabekula (Tb.Sp, prema engl. *trabecular separation*; µm) su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). \*p<0,05 (Studentov t-test).

### 5.2.2. Učinak artritisa na periartikularni gubitak kosti

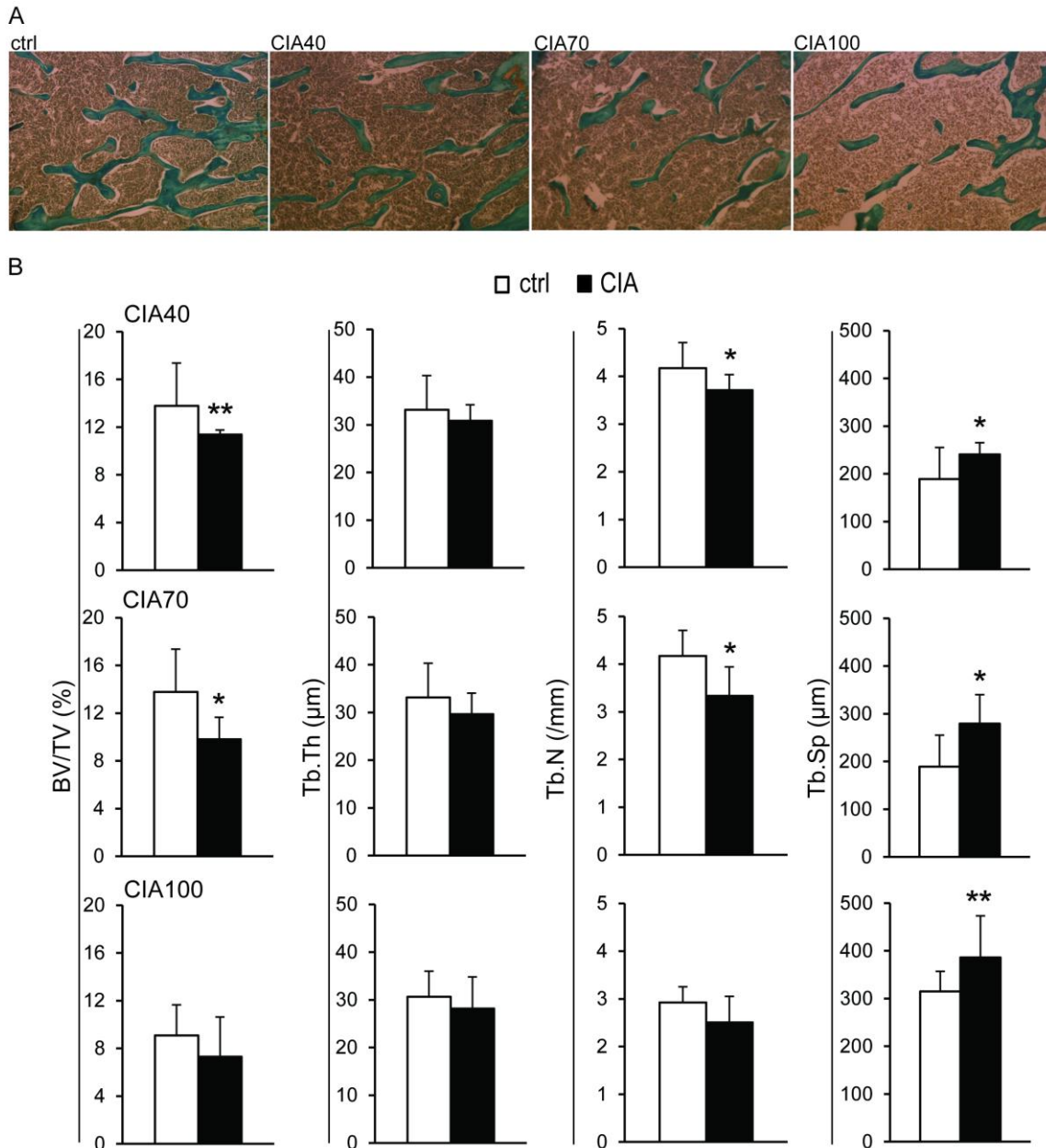
Analiza mikro-kompjutoriziranom tomografijom distalnih metafiza bedrenih kostiju miševa s ranim i kasnim artritisiom je pokazala statistički značajno smanjenje koštanog volumena, što je u ranom artritisiu posljedica statistički značajno smanjene širine koštanih gredica, a u kasnom artritisiu značajno smanjenog broja koštanih gredica u miševa s artritisiom u odnosu na kontrolnu skupinu miševa (Slika 11.). Nasuprot tome, u vrlo kasnom artritisiu nema značajnih

promjena u koštanom volumenu, širini ili broju koštanih gredica, osim veće razdvojenosti trabekula što bi mogla biti posljedica promjena u koštanoj pregradnji u ranijim stadijima artritisa (Slika 11.).



**Slika 11. Učinak artritisa potaknutog kolagenom na periartikularnu razgradnju i izgradnju kosti analiziran mikro-kompjutoriziranom tomografijom distalnih metafiza bedrenih kostiju.** Miševi s ranim (CIA40), kasnim (CIA70) i vrlo kasnim (CIA100) artritiskom potaknutim kolagenom (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*) i kontrolni miševi obrađeni PBS otopinom (ctrl) su žrtvovani, a kosti su snimljene svakih 0.7° kroz 360° rotacije, pri rezoluciji od 2 μm te uz korištenje aluminijskog filtera debljine 0.5 mm i rekonstruirane korištenjem programa SkyScan Recon. Najmanji broj miševa po skupini je bio šest, analiza je ponovljena u dva pokusa, a prikazani su kumulativni rezultati oba pokusa. Udio trabekularne kosti (BV/TV, prema engl. *bone volume/total volume*; %) , širina trabekula (Tb.Th, prema engl. *trabecular thickness*; μm), broj trabekula (Tb.N, prema engl. *trabecular number*; /mm) i razdvojenost trabekula (Tb.Sp, prema engl. *trabecular separation*; μm) su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). \*p<0,05 (Studentov t-test).

Rezultati histomorfometrijske analize na histološkim preparatima obojanim Goldnerom su također pokazali statistički značajno smanjenje koštanog volumena u ranom i kasnom artritisku, ali na račun smanjenog broja koštanih gredica i njihove veće separacije (Slika 12.).



**Slika 12. Učinak artritisa potaknutog kolagenom na periartikularnu razgradnju i izgradnju kosti analiziran parametrima statičke histomorfometrije distalnih metafiza bedrenih kostiju.** Miševi s ranim (CIA40), kasnim (CIA70) i vrlo kasnim (CIA100) artritiskom potaknutim kolagenom (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*) i kontrolni miševi obrađeni PBS otopinom (ctrl) su žrtvovani, a histomorfometrijska analiza je provedena na frontalnim rezovima distalnih dijelova bedrenih kostiju, obojanim tehnikom Goldner-Masson-trikrom. Najmanji broj miševa po skupini je bio osam. Pokus je ponovljen tri puta, a prikazani su rezultati nezavisnih pokusa ranog, kasnog i vrlo kasnog artritisa. **(A)** Reprerzentativni rezovi distalnih metafiza bedrenih kostiju. **(B)** Udio trabekularne kosti (BV/TV, prema engl. *bone volume/total volume*; %), širina trabekula (Tb.Th, prema engl. *trabecular thickness*; μm), broj trabekula (Tb.N, prema engl. *trabecular number*; /mm), i razdvojenost trabekula (Tb.Sp, prema engl. *trabecular separation*; μm) su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). \* $p < 0,05$ , \*\* $p = 0,06$  (statistički granična razlika) (Studentov t-test).

### **5.3. Diferencijacija i aktivnost koštanih stanica u modelu artritisa potaknutog kolagenom**

#### **5.3.1. Diferencijacija i aktivnost osteoklasta u modelu artritisa potaknutog kolagenom**

U sljedećem nizu pokusa utvrdili smo učinak upale u tri vremenske točke artritisa (ranom, kasnom i vrlo kasnom artritisu) na stanice mikrookoliša koštane srži i perifernih tkiva. Testiran je osteoklastogenetski potencijal hematopoetskih stanica mikrookoliša koštane srži (koštana srž i koštani cilindar) i periferije (slezena i periferna krv) *in vitro* uzgajanjem stanica u staničnoj kulturi. Njihova diferencijacija u TRAP-pozitivne osteoklaste potaknuta je dodavanjem čimbenika RANKL i M-CSF. Promjene u fenotipu i udjelu osteoklastnih progenitorskih subpopulacija u koštanom okolišu i periferiji su analizirane protočnom citometrijom.

##### **5.3.1.1. Učinak artritisa na osteoklastogenetski potencijal hematopoetskih stanica *in vitro***

Diferencijacija i aktivnost osteoklasta u mišjem modelu reumatoidnoga artritisa je određena brojanjem TRAP-pozitivnih stanica s tri ili više jezgara i određivanjem aktivnosti enzima TRAP u staničnom lizatu. Enzim TRAP je produkt zrelih osteoklasta (192), a mjerenjem aktivnosti enzima TRAP može se procijeniti resorptivna aktivnost osteoklasta.

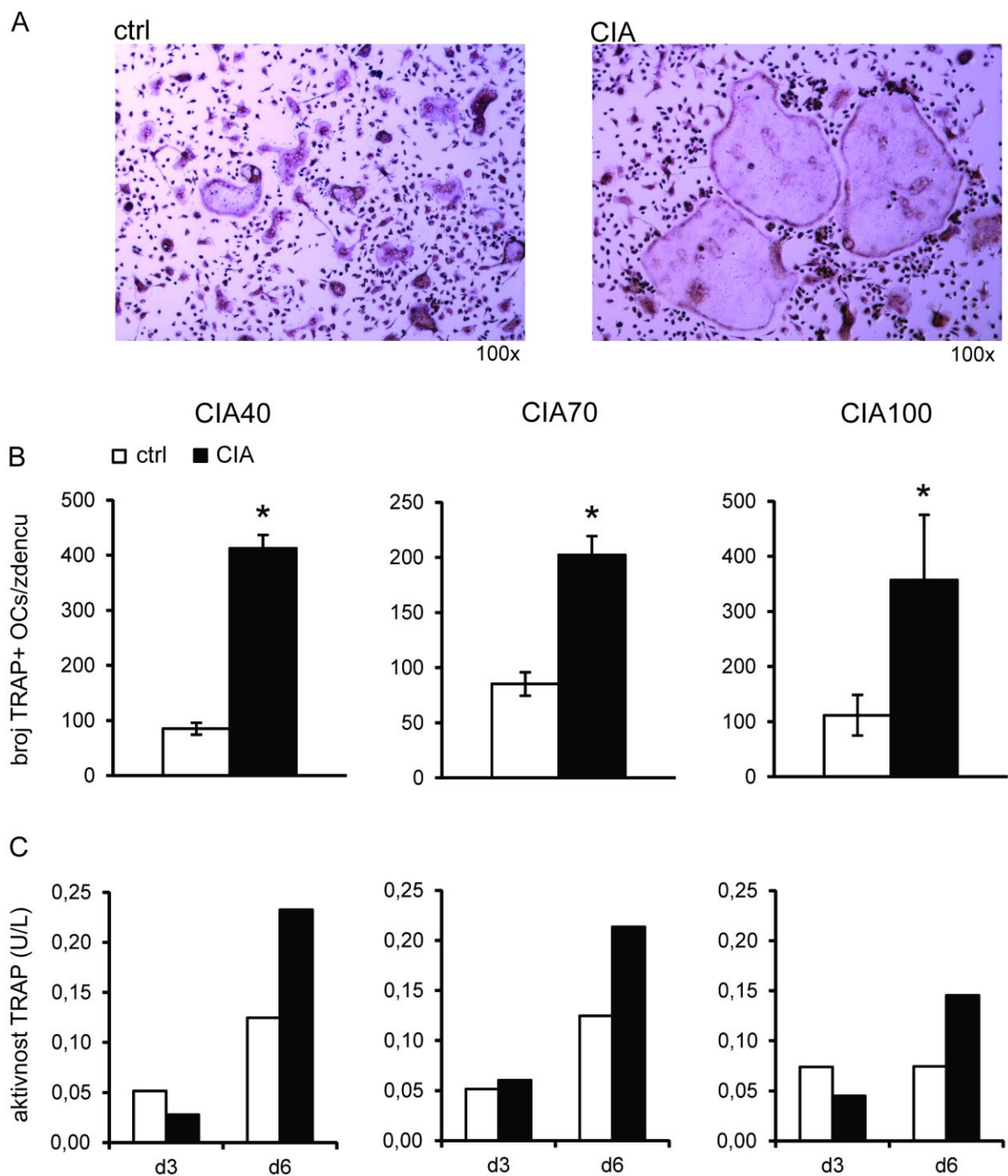
Broj diferenciranih osteoklasta u kulturama koštane srži i koštanog cilindra artritčnih miševa je statistički značajno veći u odnosu na broj osteoklasta u kulturama kontrolnih miševa u sve tri vremenske točke (Slika 13.B i Slika 14.B). Aktivnost enzima TRAP prati broj osteoklasta u kulturama i najviša je u ranom, potom u kasnom, a najniža u vrlo kasnom artritisu (Slika 13.C i Slika 14.C).

Osteoklastogenetski potencijal perifernih tkiva miševa s artritismom se također značajno razlikovao u odnosu na kontrolnu skupinu. Miševi koji su razvili artritis u odnosu na kontrolnu skupinu miševa razvijaju statistički značajno veći broj osteoklasta, kao i veću aktivnost enzima TRAP u staničnim lizatima, u ranom, kasnom i vrlo kasnom artritisu (Slika 15.B,C i Slika 16.B,C).

Međutim, ako uspoređujemo aktivnost enzima TRAP u staničnim lizatima sva četiri hematopoetska tkiva (Slika 13.C, Slika 14.C, Slika 15.C i Slika 16.C) uviđamo da je aktivnost

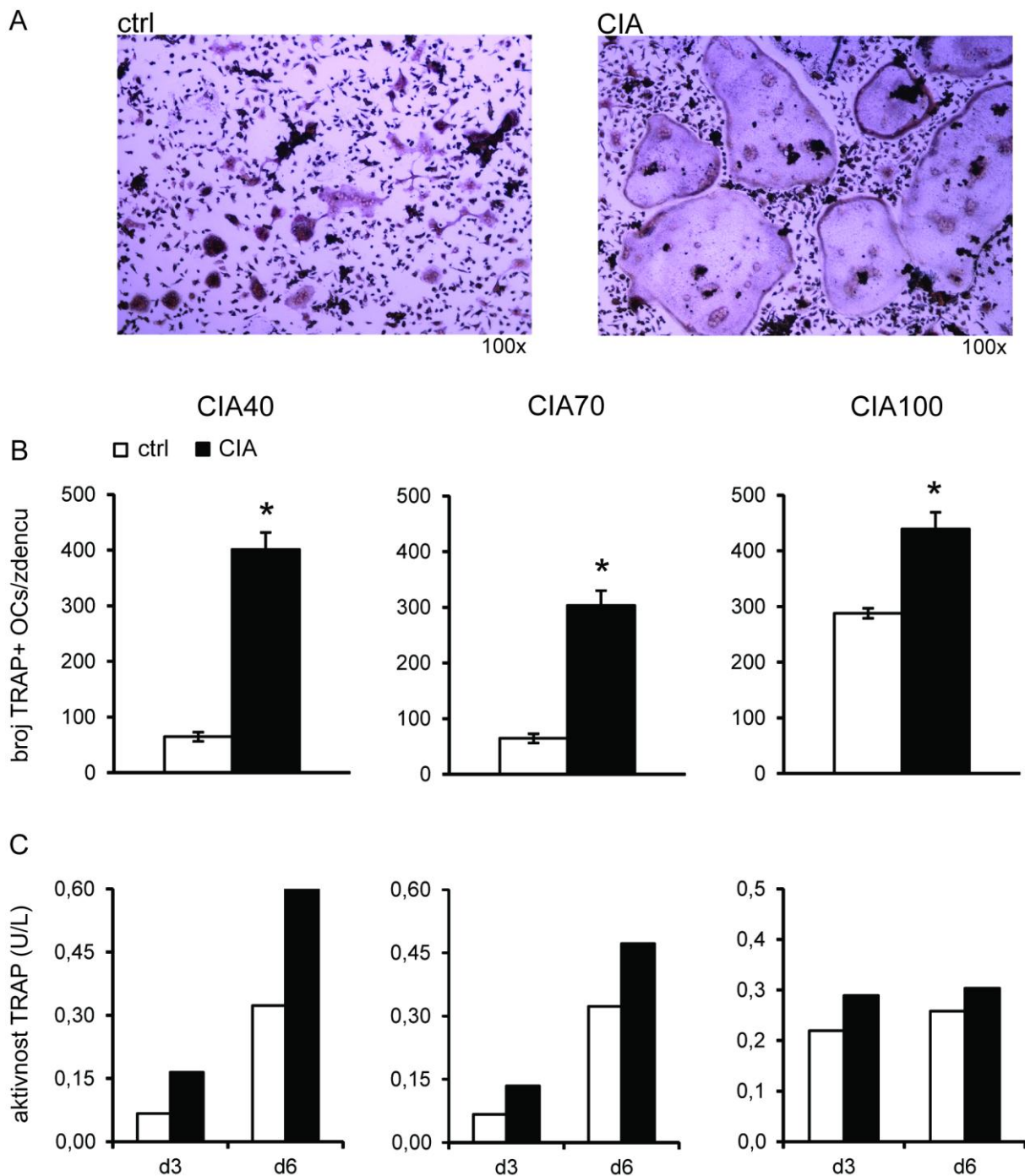
enzima TRAP u perifernim tkivima (slezena i periferna krv) manja u odnosu na aktivnost enzima u mikrookolišu koštane srži (koštana srž i koštani cilindar), što bi govorilo u prilog manjoj resorptivnoj sposobnosti tih osteoklasta. Najveća aktivnost enzima TRAP je utvrđena u staničnom lizatu osteoklasta diferenciranih iz prethodničkih stanica koštanog cilindra miševa s artritisom (Slika 14.C).

Također, analizom morfologije osteoklasta diferenciranih iz prethodničkih stanica slezene i periferne krvi miševa s artritisom, možemo utvrditi da su osteoklasti diferencirani iz tih tkiva manji u odnosu na osteoklaste diferencirane iz koštane srži i koštanog cilindra, što je u korelaciji s njihovom manjom resorptivnom sposobnošću (Slika 13.A, Slika 14.A, Slika 15.A i Slika 16.A).

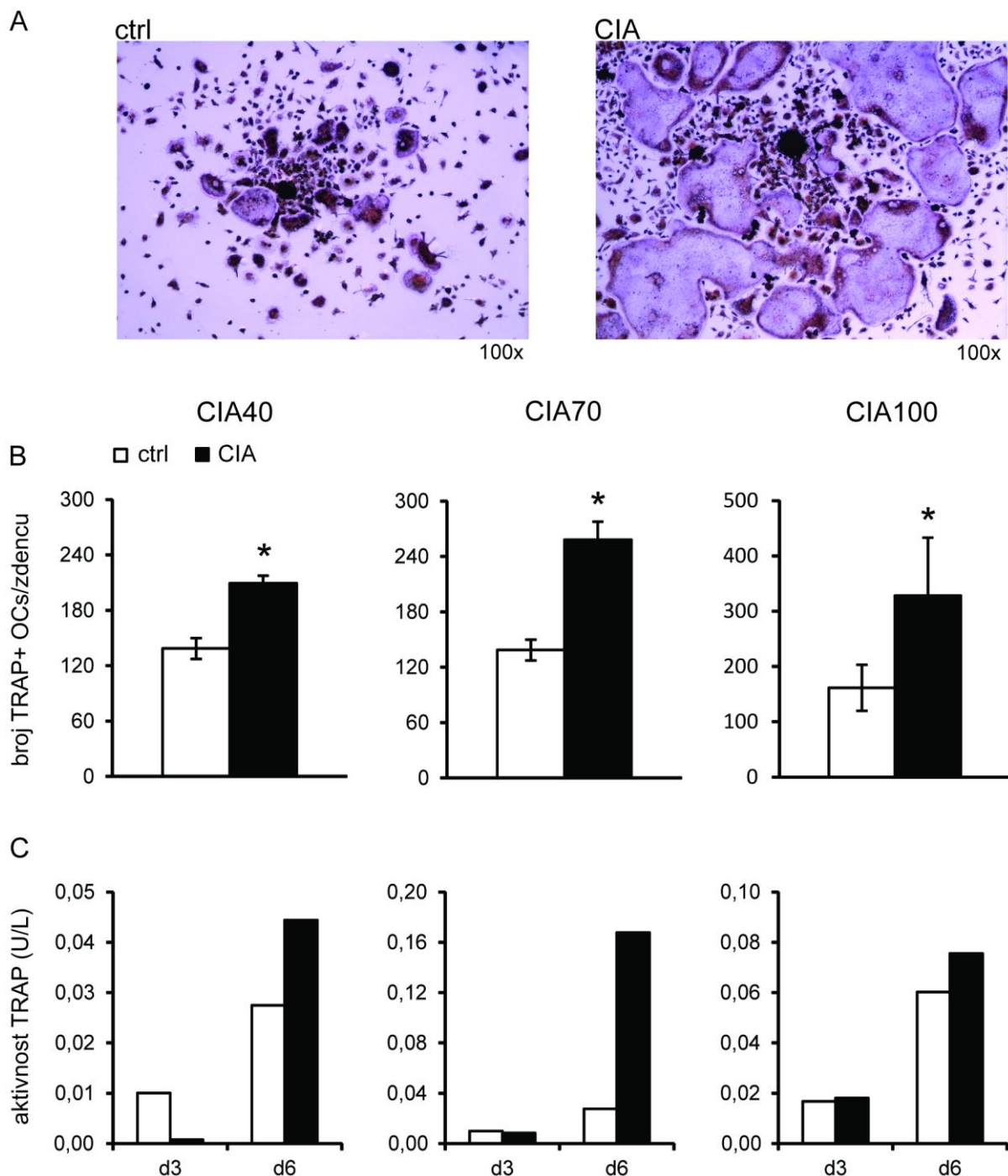


**Slika 13. Osteoklastogenetski potencijal stanica koštane srži miševa s artritisa potaknutim kolagenom.** Stanice koštane srži su zasijane u pločice s 48 zdenaca u gustoći od  $0,5 \times 10^6$  stanica po zdenacu u 0,5 mL diferencijacijskog medija koji je sadržavao  $\alpha$ -MEM uz 10% FBS (prema engl. *fetal bovine serum*), 100 U/mL penicilina, 100 U/mL streptomocina uz 15 ng/mL rekombinantnog mišjeg (rm) M-CSF i 40 ng/mL rmRANKL, a diferencijacijski medij je promijenjen nakon trećeg dana. Nakon šest dana kultivacije stanice su obojane postupkom za dokazivanje aktivnosti enzima TRAP (prema engl. *tartrate-resistant acid phosphatase*), a trećeg (d3) i šestog (d6) dana kulture je u staničnim lizatima dobivenim združivanjem po 2 zdenaca iz pločice određena aktivnost enzima TRAP. **(A)** Morfologija uzgojenih osteoklasta u kulturama stanica koštane srži miševa s artritisa – osteoklasti su stanice ljubičaste boje s  $\geq 3$  jezgara koje izražavaju enzim TRAP, povećanje 100x. **(B)** Prosječan broj TRAP-pozitivnih osteoklasta po zdenacu i **(C)** aktivnost enzima TRAP u ranom (CIA40), kasnom (CIA70) i vrlo kasnom (CIA100) artritisa. Pokusi su ponovljeni tri puta s ukupno 8-10 miševa po svakoj skupini, sa sličnim rezultatima, a prikazani su rezultati izabranih nezavisnih pokusa ranog, kasnog i vrlo kasnog artritisa. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). \* $p < 0,05$  (Studentov t-test). CIA (prema engl. *collagen induced arthritis*), artritisa potaknut kolagenom; OCs, osteoklasti.



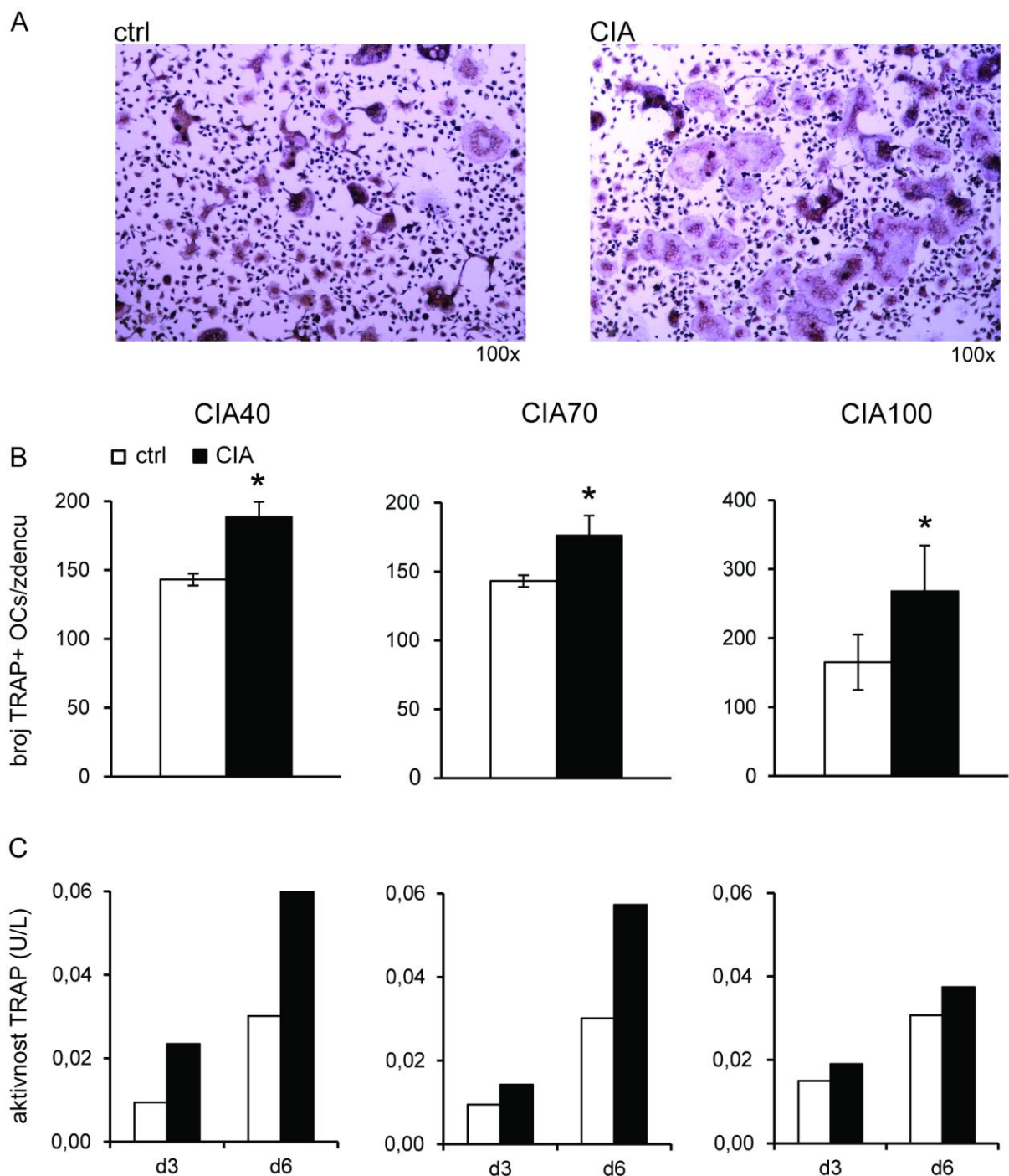


**Slika 14. Osteoklastogenetski potencijal stanica koštanog cilindra miševa s artritisa potaknutim kolagenom.** Stanice iz koštanog cilindra su zasijane u pločice s 48 zdenaca u gustoći od  $0,5 \times 10^6$  stanica po zdencu u 0,5 mL diferencijacijskog medija koji je sadržavao  $\alpha$ -MEM uz 10% FBS (prema engl. *fetal bovine serum*), 100 U/mL penicilina, 100 U/mL streptomicina uz 15 ng/mL rekombinantnog mišjeg (rm) M-CSF i 40 ng/mL rmRANKL, a diferencijacijski medij je promijenjen nakon trećeg dana. Nakon šest dana kultivacije stanice su obojane postupkom za dokazivanje aktivnosti enzima TRAP (prema engl. *tartrate resistant acid phosphatase*), a trećeg (d3) i šestog (d6) dana kulture je u staničnim lizatima dobivenim združivanjem po 2 zdenaca iz pločice određena aktivnost enzima TRAP. (A) Morfologija uzgojenih osteoklasta u kulturama stanica koštanog cilindra miševa s artritisa – osteoklasti su stanice ljubičaste boje s  $3 \geq$  jezgara koje izražavaju enzim TRAP, povećanje 100x. (B) Prosječan broj TRAP-pozitivnih osteoklasta po zdencu i (C) aktivnost enzima TRAP u ranom (CIA40), kasnom (CIA70) i vrlo kasnom (CIA100) artritisa. Pokusi su ponovljeni tri puta s ukupno 8-10 miševa po svakoj skupini, sa sličnim rezultatima, a prikazani su rezultati izabranih nezavisnih pokusa ranog, kasnog i vrlo kasnog artritisa. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). \* $p < 0,05$  (Studentov t-test). CIA (prema engl. *collagen induced arthritis*), artritis potaknut kolagenom; OCs, osteoklasti.



**Slika 15. Osteoklastogenetski potencijal stanica slezene miševa s artritisa potaknutim kolagenom.** Stanice slezene su zasijane u pločice s 48 zdenaca u gustoći od  $0,5 \times 10^6$  stanica po zdencu u 0,5 mL diferencijacijskog medija koji je sadržavao  $\alpha$ -MEM uz 10% FBS (prema engl. *fetal bovine serum*), 100 U/mL penicilina, 100 U/mL streptomocina uz 15 ng/mL rekombinantnog mišjeg (rm) M-CSF i 40 ng/mL rmRANKL, a diferencijacijski medij je promijenjen nakon trećeg dana. Nakon šest dana kultivacije stanice su obojane postupkom za dokazivanje aktivnosti enzima TRAP (prema engl. *tartrate resistant acid phosphatase*), a trećeg (d3) i šestog (d6) dana kulture je u staničnim lizatima dobivenim združivanjem po 2 zdenaca iz pločice određena aktivnost enzima TRAP. (A) Morfologija uzgojenih osteoklasta u kulturama slezene miševa s artritisa – osteoklasti su stanice ljubičaste boje s  $\geq 3$  jezgara koje izražavaju enzim TRAP, povećanje 100x. (B) Prosječan broj TRAP-pozitivnih osteoklasta po zdencu i (C) aktivnost enzima TRAP u ranom (CIA40), kasnom (CIA70) i vrlo kasnom (CIA100) artritisa. Pokusi su ponovljeni tri puta s ukupno 8-10 miševa po svakoj skupini, sa sličnim rezultatima, a prikazani su rezultati izabranih nezavisnih pokusa ranog, kasnog i vrlo kasnog artritisa. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). \* $p < 0,05$  (Studentov t-test). CIA (prema engl. *collagen induced arthritis*), artritisa potaknut kolagenom; OCs, osteoklasti.





**Slika 16. Osteoklastogenetski potencijal stanica periferne krvi miševa s artritisa potaknutim kolagenom.** Stanice periferne krvi su zasijane u pločice s 48 zdenaca u gustoći od  $0,5 \times 10^6$  stanica po zdencu u 0,5 mL diferencijacijskog medija koji je sadržavao  $\alpha$ -MEM uz 10% FBS (prema engl. *fetal bovine serum*), 100 U/mL penicilina, 100 U/mL streptomicina uz 15 ng/mL rekombinantnog mišjeg (rm) M-CSF i 40 ng/mL rmRANKL, a diferencijacijski medij je promijenjen nakon trećeg dana. Nakon šest dana kultivacije stanice su obojane postupkom za dokazivanje aktivnosti enzima TRAP (prema engl. *tartrate resistant acid phosphatase*), a trećeg (d3) i šestog (d6) dana kulture je u staničnim lizatima dobivenim združivanjem po 2 zdenaca iz pločice određena aktivnost enzima TRAP. **(A)** Morfologija uzgojenih osteoklasta u kulturama periferne krvi miševa s artritisa – osteoklasti su stanice ljubičaste boje s  $3 \geq$  jezgara koje izražavaju enzim TRAP, povećanje 100x. **(B)** Prosječan broj TRAP-pozitivnih osteoklasta po zdencu i **(C)** aktivnost enzima TRAP u ranom (CIA40), kasnom (CIA70) i vrlo kasnom (CIA100) artritisa. Pokusi su ponovljeni tri puta s ukupno 8-10 miševa po svakoj skupini, sa sličnim rezultatima, a prikazani su rezultati izabranih nezavisnih pokusa ranog, kasnog i vrlo kasnog artritisa. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). \* $p < 0,05$  (Studentov t-test). CIA (prema engl. *collagen induced arthritis*), artritisa potaknut kolagenom; OCs, osteoklasti.

### **5.3.1.2. Učinak artritisa na izražaj osteoklastnih diferencijacijskih gena u stanicama hematopoetskih tkiva**

Postupkom qPCR analiziran je osteoklastogenetski potencijal hematopoetskih stanica mikrookoliša koštane srži i perifernih hematopoetskih tkiva na razini izražaja specifičnih osteoklastnih diferencijacijskih gena, nakon izazivanja artritisa potaknutog kolagenom u tri vremenske točke (rani, kasni i vrlo kasni artritis). Izražaj specifičnih osteoklastnih gena određen je 3. i 6. dana kultura stanica koštane srži, koštanih cilindara, slezene i periferne krvi. Poznato je da je izražaj gena RANK (receptor za RANKL) i cFms (receptor za M-CSF) u stanicama monocitno/makrofagne loze nužan za njihovo usmjeravanje prema zrelim funkcionalnim osteoklastima (193, 194). CalcR je specifični biljeg zrelih osteoklasta (7, 9), kao i Cat K, enzim ključan u razgradnji organske međustanične tvari (195). Prilikom analize izražaja gena za reproducibilnu, biološki značajnu razliku odredili smo 100%-tnu ili veću razliku prema kontrolnoj skupini (191).

U kulturi osteoklasta diferenciranih iz hematopoetskih stanica koštane srži (Slika 17.) miševa s ranim artritismom (CIA40) je nađen trostruki porast izražaja gena za RANK u odnosu na kontrolnu kulturu 6. dana, a kod kasnog artritisa (CIA70) taj porast je dvostruko veći. Nadalje, 6. dana stanične kulture je utvrđen značajan porast izražaja zrelih osteoklastnih biljega CalcR i Cat K u kulturi stanica miševa s artritismom u odnosu na kontrolnu skupinu i u ranom i u kasnom artritisu. U kulturi diferenciranoj iz koštane srži miševa s vrlo kasnim artritismom (CIA100) nalazimo povećan izražaj gena za cFms i Cat K u odnosu na kontrolnu kulturu, ali bez biološki značajne razlike.

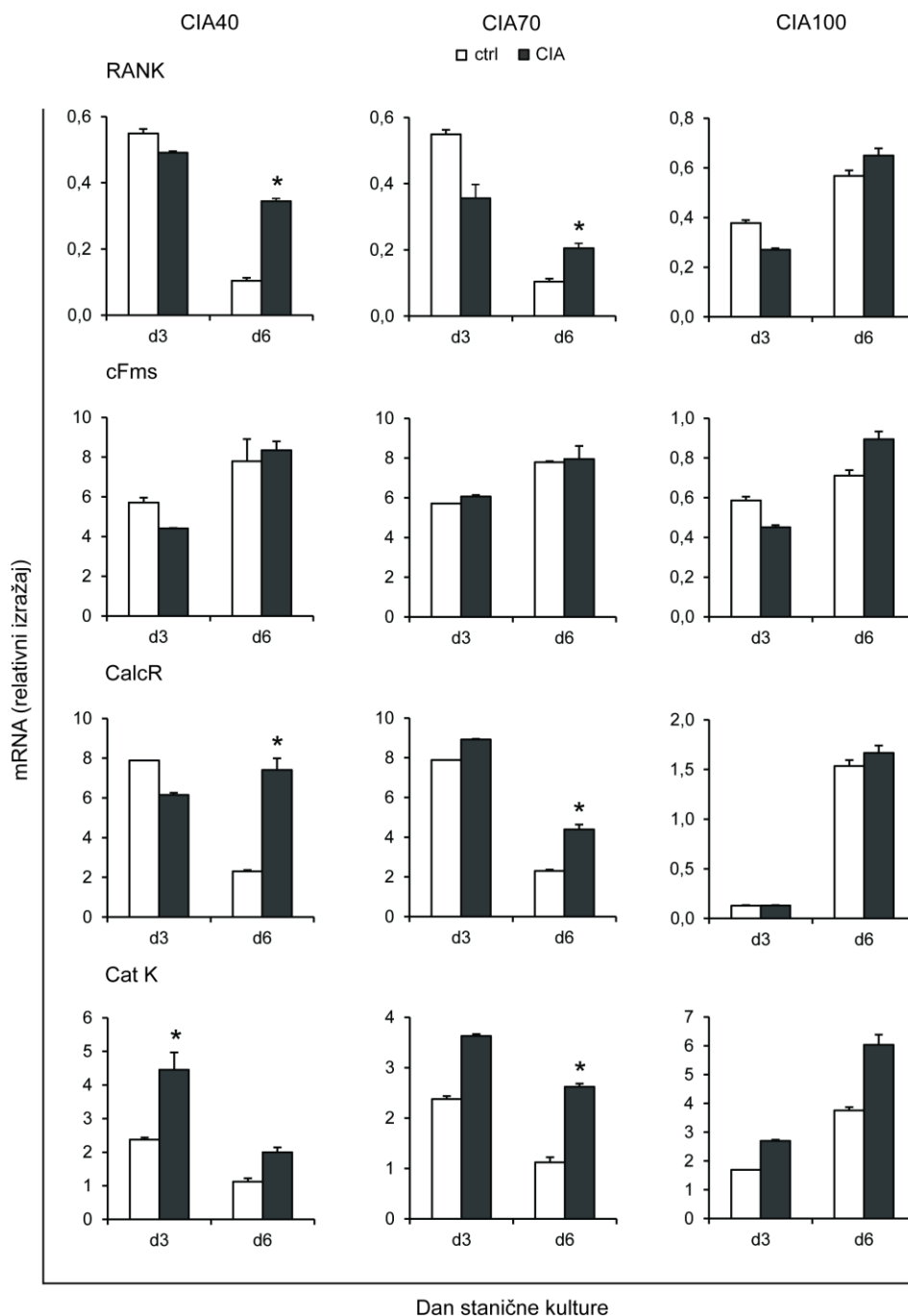
Analizom osteoklastnih kultura diferenciranih iz stanica koštanog cilindra (Slika 18.) 6. dana kulture uočavamo relativni porast izražaja gena za RANK i cFms u artritisu u odnosu na kontrolnu skupinu, ali manji od postavljene granice biološke značajnosti. Značajan porast genskog izražaja nalazimo za CalcR 6. dana kulture u ranom, kasnom i vrlo kasnom artritisu te za Cat K 6. dana kulture u ranom i kasnom artritisu.

Nadalje, na temelju analize izražaja osteoklastnih diferencijacijskih gena nalazimo i povećan osteoklastogenetski potencijal stanica slezene miševa s ranim i kasnim artritismom (Slika 19.). Izražaj gena za RANK povećan je 3. dana kulture stanica artritičnih miševa u odnosu na kontrolnu skupinu, a prati ga izražaj gena za cFms koji je povećan i 6. dana kulture. Slično je 3. dana osteoklastogenetske kulture stanica slezene artritičnih miševa povećan izražaj gena za CalcR i Cat K. U vrlo kasnom artritisu nema razlika u izražaju diferencijacijskih gena.

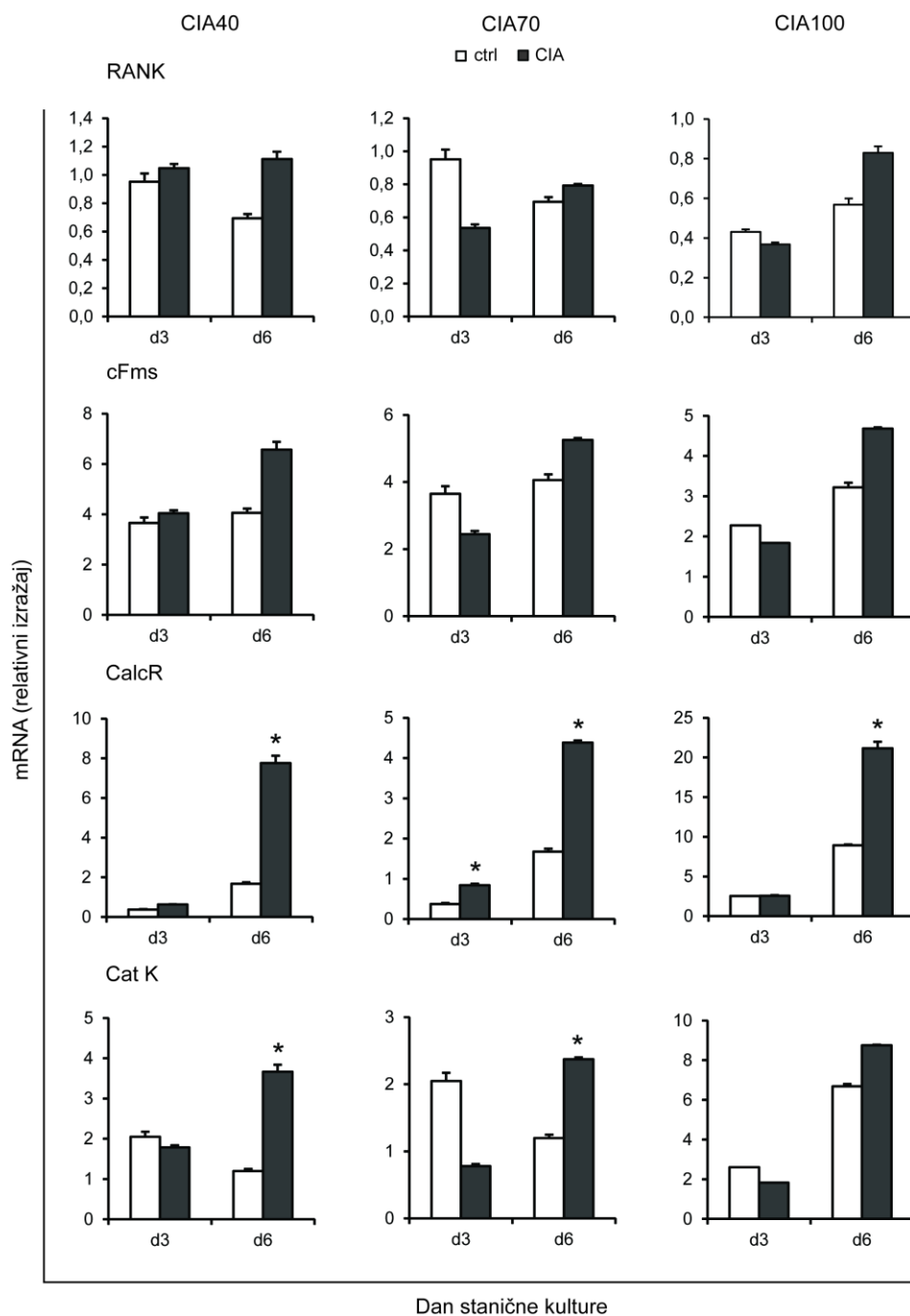
Izražaj gena za RANK i cFms u osteoklastogenetskim kulturama periferne krvi (Slika 20.) 6. dana stanične kulture značajno je veći u ranom i kasnom artritisu u odnosu na kontrolne skupine. Također je utvrđen veći izražaj gena za CalcR i Cat K u ranom (6. dan), kasnom (6. dan) i vrlo kasnom artritisu (3. dan) u odnosu na kontrolne skupine.

Navedeni rezultati su u skladu s rezultatima broja osteoklasta i aktivnosti enzima TRAP u staničnim kulturama, gdje smo utvrdili značajno potaknutu osteoklastogenezu u miševa s artritisom.

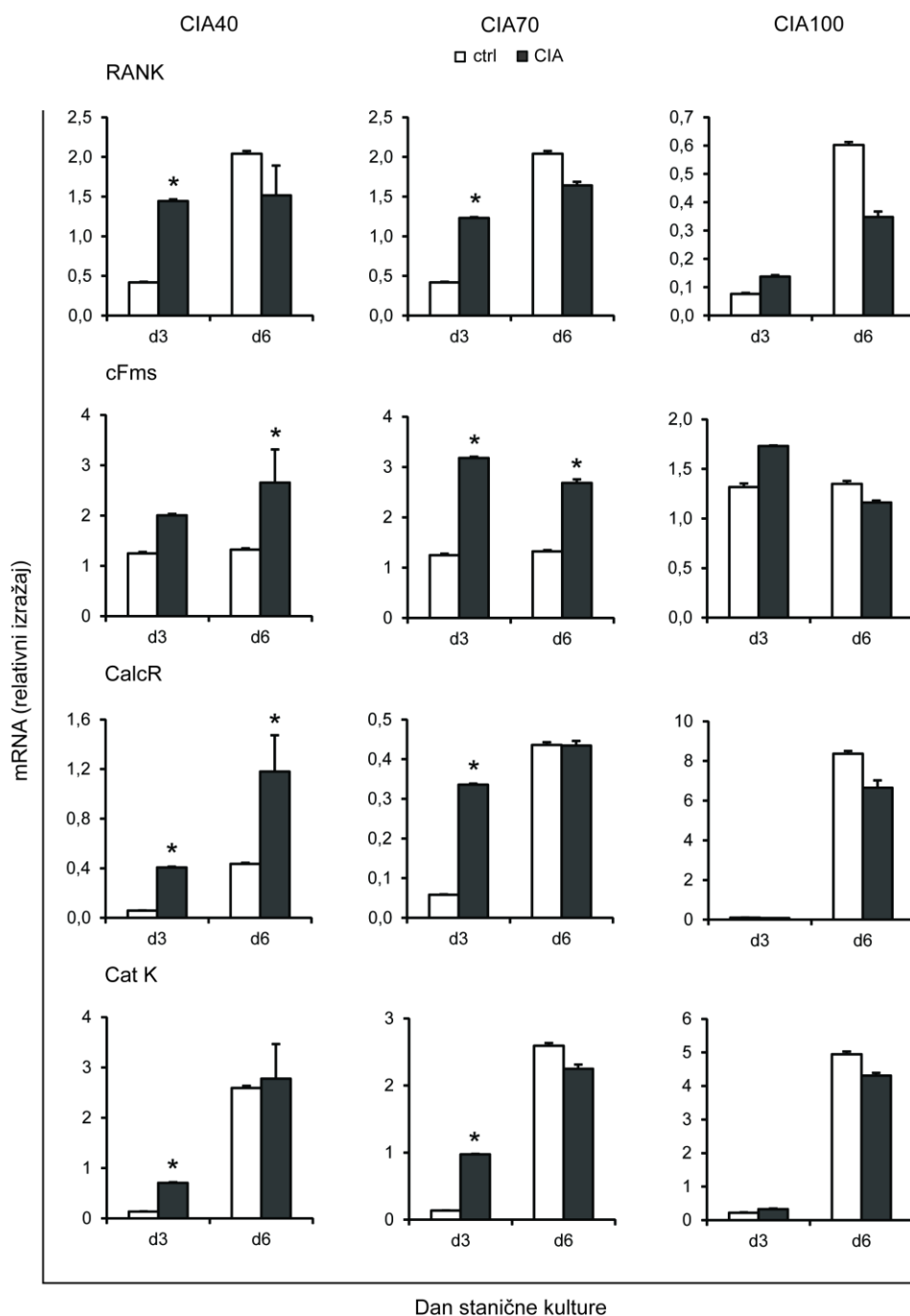
Na temelju svega navedenog može se zaključiti da je osteoklastogenetski potencijal stanica mikrookoliša koštane srži i perifernih hematopoetskih tkiva povećan u artritisu potaknutom kolagenom, što je u skladu s postavljenom hipotezom.



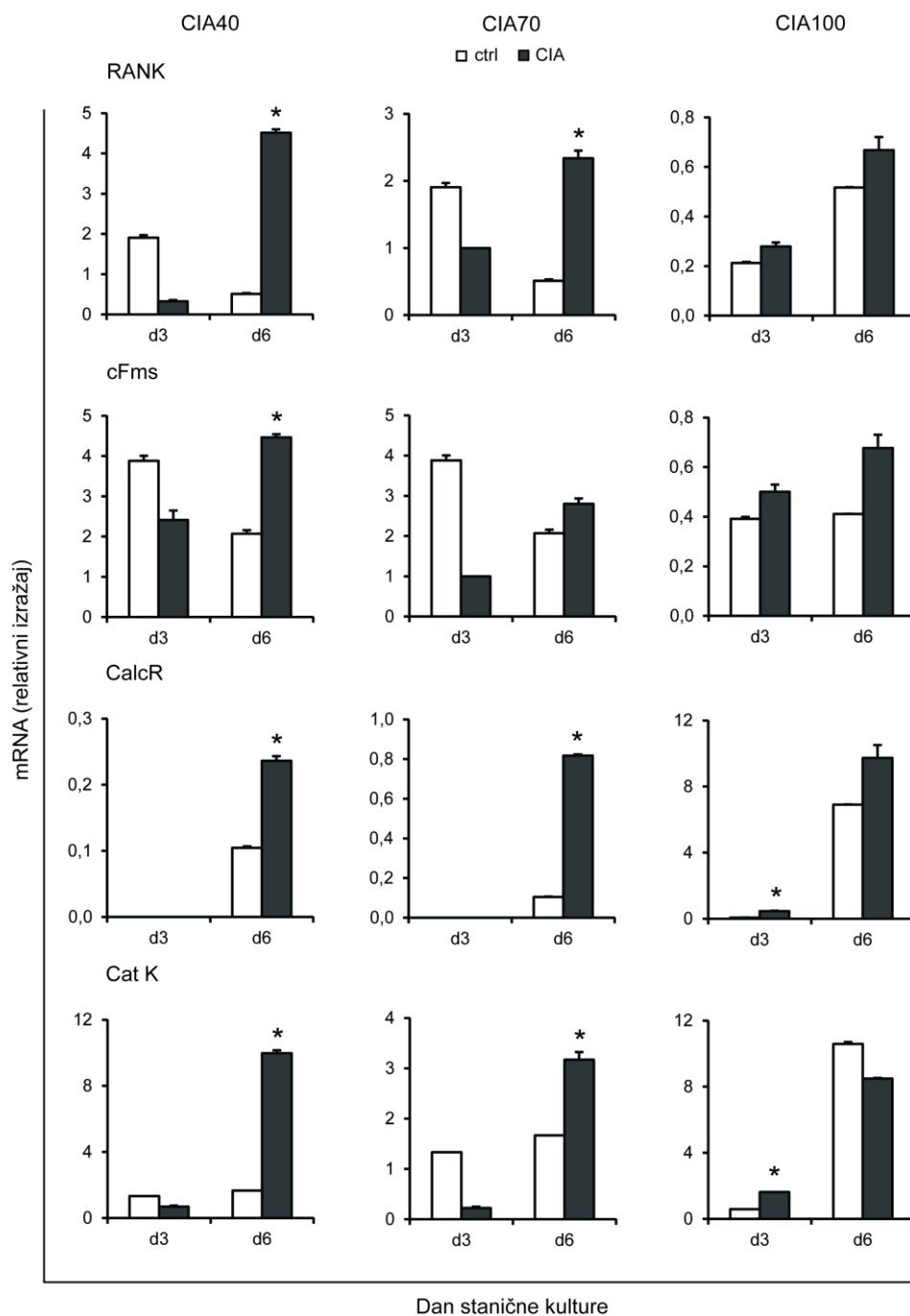
**Slika 17. Izražaj specifičnih osteoklastnih diferencijacijskih gena u osteoklastogenetskim kulturama stanica koštane srži miševa s artritism potaknutim kolagenom.** Stanice koštane srži su zasijane u pločice s 48 zdenaca u gustoći od  $0,5 \times 10^6$  stanica po zdencu u 0,5 mL diferencijacijskog medija koji je sadržavao  $\alpha$ -MEM uz 10% FBS, 100 U/mL penicilina, 100 U/mL streptomocina uz 15 ng/mL rekombinantnog mišjeg (rm) M-CSF i 40 ng/mL rmRANKL, a diferencijacijski medij je promijenjen nakon trećeg dana. Stanice za izolaciju RNA su dobivene združivanjem 4 zdenaca po skupini trećeg (d3) i šestog (d6) dana stanične kulture, a vrijednosti izražaja mRNA su dobivene uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju (cDNA iz kulture osteoklasta) i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za  $\beta$ -aktin („endogena“ kontrola). Pokusi su ponovljeni tri puta s ukupno 8-10 miševa po svakoj skupini, sa sličnim rezultatima, a prikazani su rezultati izabranih nezavisnih pokusa ranog (CIA40), kasnog (CIA70) i vrlo kasnog (CIA100) artritisa. CIA, artritis potaknut kolagenom (prema engl. *collagen induced arthritis*); RANK, poticatelj receptora jezgrinog čimbenika kB (prema engl. *receptor activator of nuclar factor kB*); cFms, receptor čimbenika stvaranja monocitnih kolonija (prema engl. *macrophage colony-stimulating factor receptor*); CalcR, kalcitoninski receptor (prema engl. *calcitonin receptor*); Cat K, katepsin K (prema engl. *cathepsin K*). \*prikazuje biološki značajnu razliku u izražaju ( $\geq 100\%$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu.



**Slika 18. Izražaj specifičnih osteoklastnih diferencijacijskih gena u osteoklastogenetskim kulturama stanica koštanog cilindra miševa s artritism potaknutim kolagenom.** Stanice koštanog cilindra su zasijane u pločice s 48 zdenaca u gustoći od  $0,5 \times 10^6$  stanica po zdencu u 0,5 mL diferencijacijskog medija koji je sadržavao  $\alpha$ -MEM uz 10% FBS, 100 U/mL penicilina, 100 U/mL streptomocina uz 15 ng/mL rekombinantnog mišjeg (rm) M-CSF i 40 ng/mL rmRANKL, a diferencijacijski medij je promijenjen nakon trećeg dana. Stanice za izolaciju RNA su dobivene združivanjem 4 zdenaca po skupini trećeg (d3) i šestog (d6) dana stanične kulture, a vrijednosti izražaja mRNA su dobivene uporabom standardne krivulje izražaja ciljnih gena u uzorku za kalibraciju (cDNA iz kulture osteoklasta) i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za  $\beta$ -aktin („endogena“ kontrola). Pokusi su ponovljeni tri puta s ukupno 8-10 miševa po svakoj skupini, sa sličnim rezultatima, a prikazani su rezultati izabranih nezavisnih pokusa ranog (CIA40), kasnog (CIA70) i vrlo kasnog (CIA100) artritisa. CIA, artritis potaknut kolagenom (prema engl. *collagen induced arthritis*); RANK, poticatelj receptora jezgrinog čimbenika kB (prema engl. *receptor activator of nuclar factor kB*); cFms, receptor čimbenika stvaranja monocitnih kolonija (prema engl. *macrophage colony-stimulating factor receptor*); CalcR, kalcitoninski receptor (prema engl. *calcitonin receptor*); Cat K, katepsin K (prema engl. *cathepsin K*). \*prikazuje biološki značajnu razliku u izražaju ( $\geq 100\%$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu.



**Slika 19. Izražaj specifičnih osteoklastnih diferencijacijskih gena u osteoklastogenetskim kulturama stanica slezene miševa s artritism potaknutim kolagenom.** Stanice slezene su zasijane u pločice s 48 zdenaca u gustoći od  $0,5 \times 10^6$  stanica po zdencu u 0,5 mL diferencijacijskog medija koji je sadržavao  $\alpha$ -MEM uz 10% FBS, 100 U/mL penicilina, 100 U/mL streptomicina uz 15 ng/mL rekombinantnog mišjeg (rm) M-CSF i 40 ng/mL rmRANKL, a diferencijacijski medij je promijenjen nakon trećeg dana. Stanice za izolaciju RNA su dobivene združivanjem 4 zdenaca po skupini trećeg (d3) i šestog (d6) dana stanične kulture, a vrijednosti izražaja mRNA su dobivene uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju (cDNA iz kulture osteoklasta) i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za  $\beta$ -aktin („endogena“ kontrola). Pokusi su ponovljeni tri puta s ukupno 8-10 miševa po svakoj skupini, sa sličnim rezultatima, a prikazani su rezultati izabranih nezavisnih pokusa ranog (CIA40), kasnog (CIA70) i vrlo kasnog (CIA100) artritisa. CIA, artritis potaknut kolagenom (prema engl. *collagen induced arthritis*); RANK, poticatelj receptora jezgrinog čimbenika kB (prema engl. *receptor activator of nuclar factor kB*); cFms, receptor čimbenika stvaranja monocitnih kolonija (prema engl. *macrophage colony-stimulating factor receptor*); CalcR, kalcitoninski receptor (prema engl. *calcitonin receptor*); Cat K, katepsin K (prema engl. *cathepsin K*). \*prikazuje biološki značajnu razliku u izražaju ( $\geq 100\%$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu.



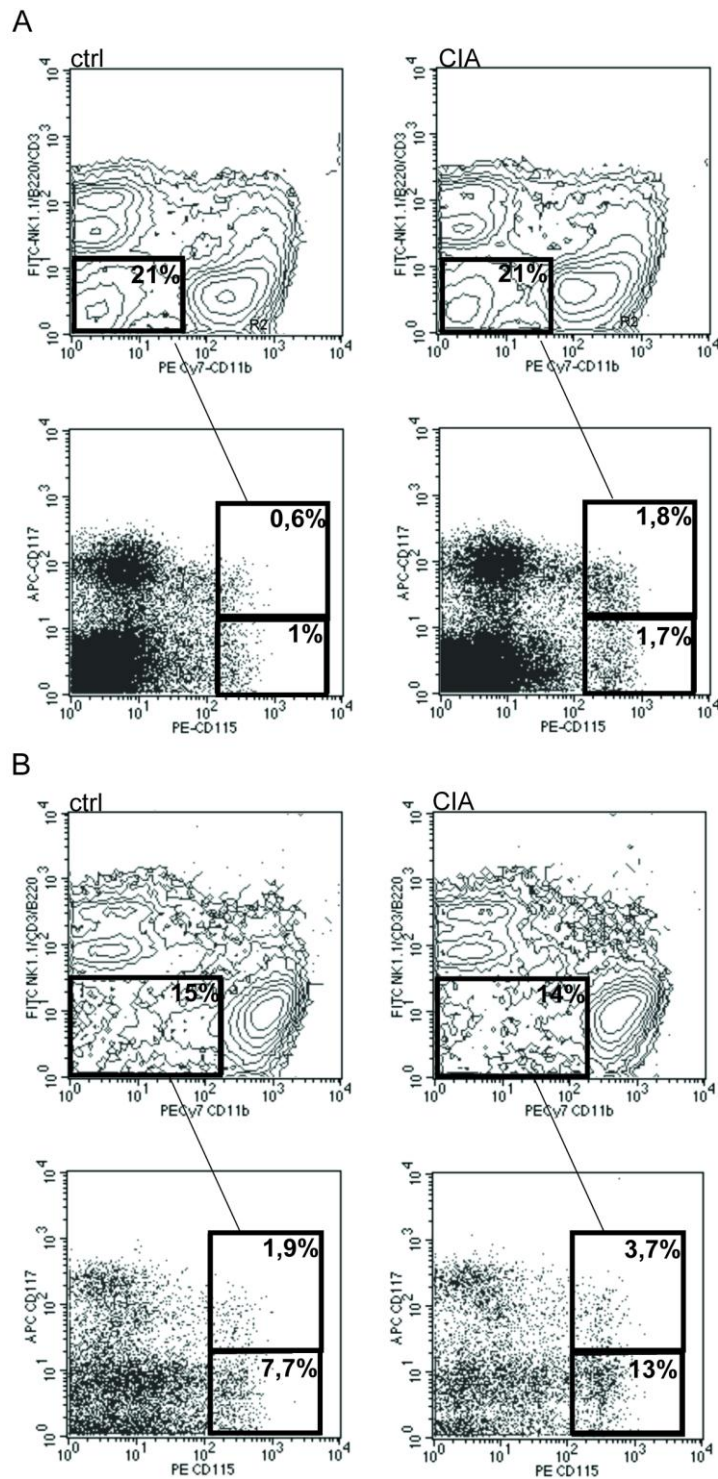
**Slika 20. Izražaj specifičnih osteoklastnih diferencijacijskih gena u osteoklastogenetskim kulturama stanica periferne krvi miševa s artritisa potaknutim kolagenom.** Stanice periferne krvi su zasijane u pločice s 48 zdenaca u gustoći od  $0,5 \times 10^6$  stanica po zdencu u 0,5 mL diferencijacijskog medija koji je sadržavao  $\alpha$ -MEM uz 10% FBS, 100 U/mL penicilina, 100 U/mL streptomicina uz 15 ng/mL rekombinantnog mišjeg (rm) M-CSF i 40 ng/mL rmRANKL, a diferencijacijski medij je promijenjen nakon trećeg dana. Stanice za izolaciju RNA su dobivene združivanjem 4 zdenaca trećeg (d3) i šestog (d6) dana stanične kulture, a vrijednosti izražaja mRNA su dobivene uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju (cDNA iz kulture osteoklasta) i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za  $\beta$ -aktin („endogena“ kontrola). Pokusi su ponovljeni tri puta s ukupno 8-10 miševa po svakoj skupini, sa sličnim rezultatima, a prikazani su rezultati izabranih nezavisnih pokusa ranog (CIA40), kasnog (CIA70) i vrlo kasnog (CIA100) artritisa. CIA, artritis potaknut kolagenom (prema engl. *collagen induced arthritis*); RANK, poticatelj receptora jezgrinog čimbenika kB (prema engl. *receptor activator of nuclar factor kB*); cFms, receptor čimbenika stvaranja monocitnih kolonija (prema engl. *macrophage colony-stimulating factor receptor*); CalcR, kalcitoninski receptor (prema engl. *calcitonin receptor*); Cat K, katepsin K (prema engl. *cathepsin K*). \*prikazuje biološki značajnu razliku u izražaju ( $\geq 100\%$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu.

### 5.3.1.3. Učinak artritisa na stanične populacije osteoklastnih progenitora

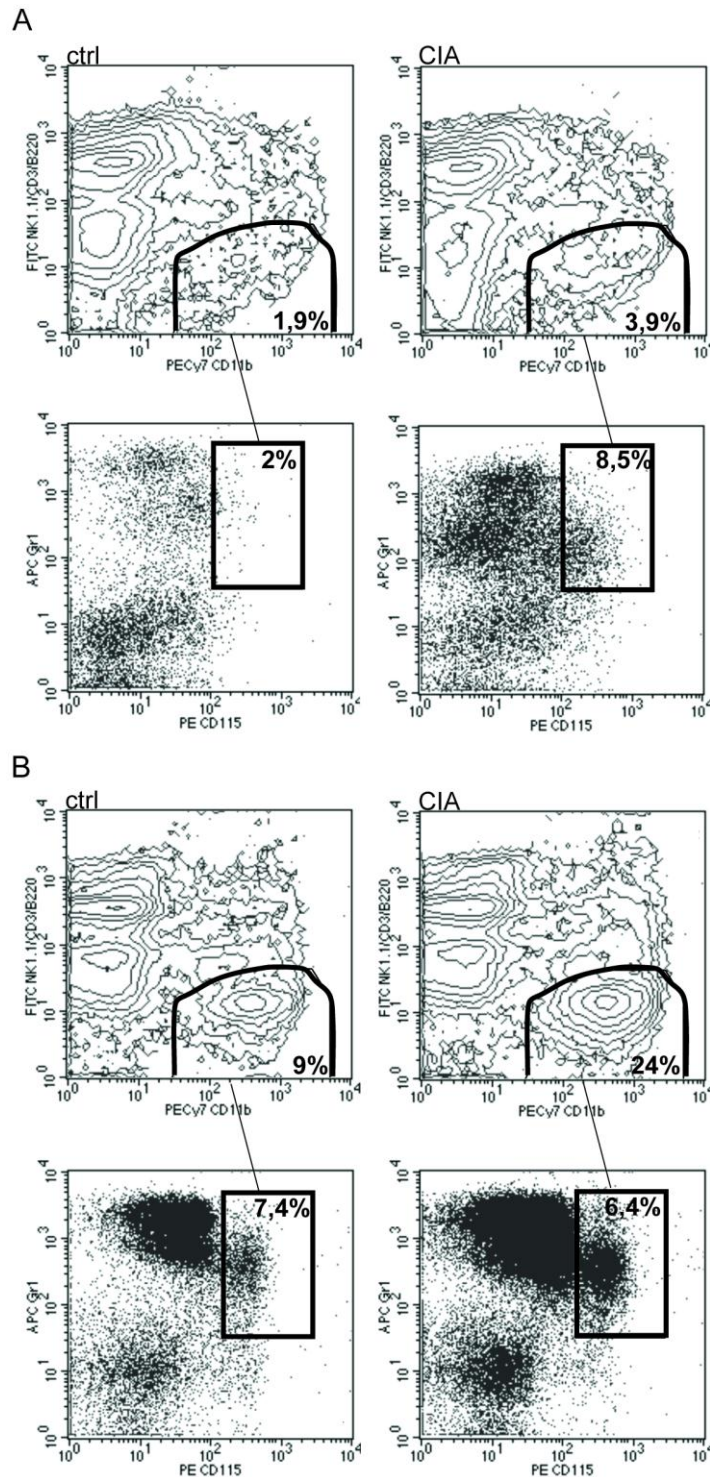
Idućim nizom pokusa analiziran je izražaj membranskih biljega specifičnih za populaciju osteoklastnih progenitora u stanicama koštanog okoliša (koštana srž i koštani cilindar) i periferije (periferna krv i slezena). Populacija stanica koja posjeduje najveći osteoklastogenetski potencijal ne izražava limfoidne biljege B220, CD3 i NK1.1. U koštanoj srži i koštanom cilindru izražava biljeg CD115 (cFms) te ne izražava ili slabo izražava biljeg mijeloidnih stanica CD11b (196, 197). Ta populacija ( $CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^{-low}$ ) može se analizirati u odnosu na izražaj biljega CD115 i CD117 te podijeliti u nekoliko subpopulacija s obzirom na osteoklastogenetski potencijal. Najveći osteoklastogenetski potencijal imaju stanice  $CD115^+CD117^+$ , a nešto manji populacija  $CD115^+CD117^-$ , dok populacije  $CD115^-CD117^+$  i  $CD115^-CD117^-$  ne sadrže osteoklastne progenitore (196, 197). U slezeni i perifernoj krvi populacija stanica s najvećim osteoklastogenetskim potencijalom ne izražava limfoidne biljege (B220, CD3 i NK1.1), ali izražava mijeloidni biljeg CD11b. Ta populacija također izražava biljege CD115 i Gr-1 (197, 198).

Protočnometrijska analiza staničnih populacija koštane srži i koštanog cilindra ranog, kasnog i vrlo kasnog artritisa je pokazala da stanične populacije mikrookoliša koštane srži miševa s artritism sadrže više stanica fenotipa  $CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^{-low}CD115^+$  u odnosu na kontrolnu skupinu. Na Slici 21. su radi preglednosti prikazani samo rezultati analize osteoklastnih progenitora mikrookoliša koštane srži u ranom artritism; udio stanica  $CD115^+CD117^+$  u koštanoj srži miševa s artritism je oko tri puta veći (Slika 21.A), a u koštanom cilindru oko dva puta veći u odnosu na kontrolu (Slika 21.B), dok je udio stanica  $CD115^+CD117^-$  dva puta veći u mikrookolišu koštane srži (koštana srž i koštani cilindar) miševa s artritism. Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da miševi s artritism imaju veći osteoklastogenetski potencijal u odnosu na kontrolnu skupinu te da su artritism potaknute i subpopulacije progenitora  $CD117^+$  i  $CD117^-$ . Među ukupnom populacijom stanica slezene miševa s ranim artritism povećan je udio osteoprogenitorskih stanica  $CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^+CD115^+Gr-1^+$  u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 22.A). U perifernoj krvi miševa s artritism tijekom cijelog praćenja bolesti nalazimo oko dva puta više stanica  $CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^+CD115^+Gr-1^+$  u odnosu na kontrolnu skupinu. Također, povećana je ukupna populacija  $CD11b^+$  (monocitno/makrofagnih) stanica (Slika 22.B).





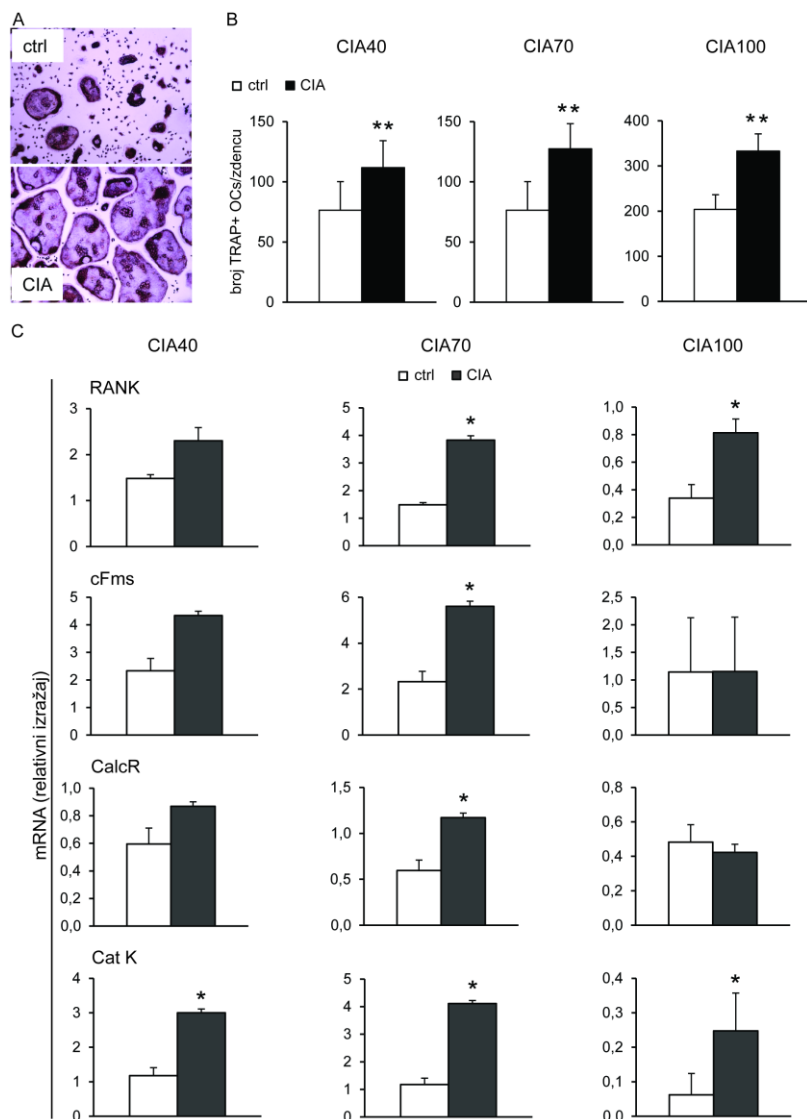
**Slika 21. Izražaj membranskih biljega specifičnih za populacije osteoklastnih progenitora u koštanoj srži i koštanom cilindru u artritisu potaknutom kolagenom.** Protočnim citometrom je analiziran izražaj površinskih biljega specifičnih za populacije osteoklastnih progenitora: CD3<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>CD11b<sup>-low</sup>CD115<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> i CD3<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>CD11b<sup>-low</sup>CD115<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup> uporabom monoklonskih protutijela konjugiranih fluorokromima [fluorescein-izotiocijanatan (FITC)-anti-CD3/B220/NK1.1, fikoeritrin-cijanin 7 (PE Cy7)-anti-CD11b, fikoeritrin (PE)-anti-CD115 i alofikocijanin (APC)-anti-CD117] u koštanoj srži (**A**) i koštanom cilindru (**B**) kontrolnih miševa (ctrl) i miševa s artritisom potaknutim kolagenom (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*). Analizirano je 350 000 vijabilnih stanica koštane srži i 150 000 vijabilnih stanica koštanog cilindra po uzorku i prikazano grafikonom u programu CellQuest na uređaju FACSCalibur. Prikazan je reprezentivni pokus ranog artritisa od tri ponovljena pokusa sa sličnim rezultatima.



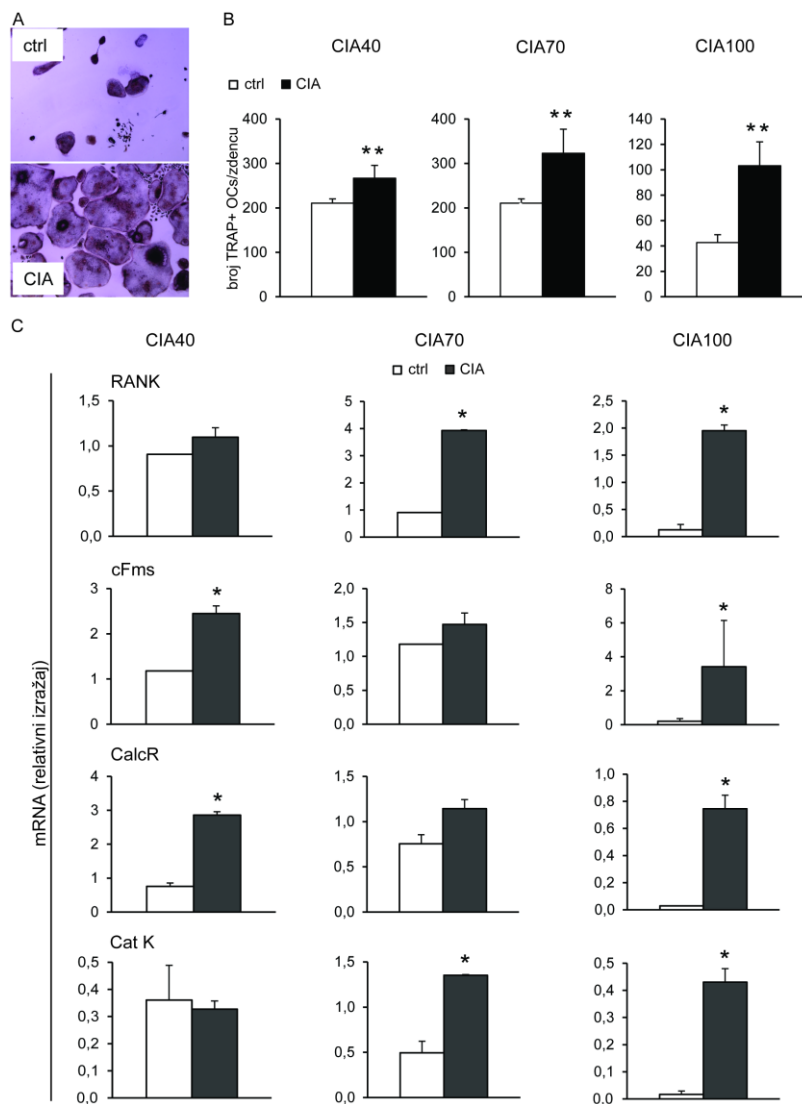
**Slika 22. Izražaj membranskih biljega specifičnih za populacije osteoklastnih progenitora u slezeni i perifernoj krvi u artritisu potaknutom kolagenom.** Protočnim citometrom je analiziran izražaj površinskih biljega specifičnih za populacije osteoklastnih progenitora:  $CD3^+B220^+NK1.1^+CD11b^+CD115^+Gr-1^+$  uporabom monoklonskih protutijela konjugiranih fluorokromima [fluorescein-izotiocijanat (FITC)-anti-CD3/B220/NK1.1, fikoeritrin-cijanin 7 (PE Cy7)-anti-CD11b, fikoeritrin (PE)-anti-CD115 i alofikocijanin (APC)-anti-Gr-1] u slezeni (**A**) i perifernoj krvi (**B**) kontrolnih miševa (ctrl) i miševa s artritisom potaknutim kolagenom (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*). Analizirano je 500 000 vijabilnih stanica slezene i 400 000 vijabilnih stanica periferne krvi po uzorku i prikazano grafikonom u programu CellQuest na uređaju FACSCalibur. Prikazan je reprezentativni pokus ranog artritisa od tri ponovljena pokusa sa sličnim rezultatima.

Protočnociometrijskom analizom smo dokazali da miševi s artritismom imaju veći udio osteoklastnih progenitora u mikrookolišu koštane srži i periferije, te smo se stoga odlučili na stanično sortiranje osteoklastnih progenitora iz koštane srži i slezene te poticanje njihove diferencijacije u kulturi. Time smo *in vitro* testirali funkcionalnu aktivnost osteoklastnih progenitora u miševa s artritismom.

Miševi koji su razvili artritis u odnosu na kontrolnu skupinu miševa razvijaju statistički značajno veći broj TRAP-pozitivnih osteoklasta iz sortiranih progenitorskih stanica koštane srži i slezene (Slika 23.B i Slika 24.B). U kulturi osteoklasta diferenciranih iz osteoklastnih progenitora koštane srži miševa s kasnim artritismom (CIA70) je nađen statistički značajno veći izražaja gena za RANK, cFms, CalcR i Cat K u odnosu na kontrolnu kulturu (Slika 23.C). Nadalje, u kulturi osteoklasta diferenciranih iz osteoklastnih progenitora slezene je utvrđen veći izražaj gena za cFms i CalcR u ranom, za RANK i Cat K u kasnom i za RANK, cFms, CalcR i Cat K u vrlo kasnom artritisu u odnosu na kontrolne skupine (Slika 24.C).



**Slika 23. Osteoklastogenetski potencijal osteoklastnih progenitora koštane srži miševa s artritismom potaknutim kolagenom.** Sortirani osteoklastni progenitori koštane srži definirani kao stanice fenotipa  $CD3^- B220^+ NK1.1^+ CD11b^{low} CD115^+$  su zasijani (5 000 stanica/zdenacu) u pločice s 96 zdenaca u 0,2 mL diferencijacijskog medija koji je sadržavao  $\alpha$ -MEM uz 10% FBS, 100 U/mL penicilina, 100 U/mL streptomicina uz 40 ng/mL rekombinantnog mišjeg (rm) M-CSF i 60 ng/mL rmRANKL, a diferencijacijski medij je promijenjen nakon trećeg dana. Nakon šest dana kultivacije stanice su obojane postupkom za dokazivanje aktivnosti enzima TRAP (prema engl. *tartrate resistant acid phosphatase*). Stanice za izolaciju RNA su dobivene združivanjem 5 zdenaca šestog dana stanične kulture, a vrijednosti izražaja mRNA su dobivene uporabom standardne krivulje izražaja ciljnih gena u uzorku za kalibraciju (cDNA iz kulture osteoklasta) i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za  $\beta$ -aktin („endogena“ kontrola). (A) Morfologija uzgojenih osteoklasta u kulturama osteoklastnih progenitora miševa s artritismom – osteoklasti su stanice ljubičaste boje s  $\geq 3$  jezgara koje izražavaju enzim TRAP, povećanje 100x, (B) prosječan broj TRAP-pozitivnih osteoklasta po zdenacu i (C) izražaj specifičnih osteoklastnih diferencijacijskih gena u osteoklastogenetskim kulturama progenitora koštane srži miševa s artritismom potaknutim kolagenom. Pokusi su ponovljeni tri puta s ukupno 8-10 miševa po svakoj skupini, sa sličnim rezultatima, a prikazani su rezultati izabranih nezavisnih pokusa ranog, kasnog i vrlo kasnog artritisa. CIA, artritis potaknut kolagenom (prema engl. *collagen induced arthritis*); RANK, poticatelj receptora jezgrinog čimbenika kB (prema engl. *receptor activator of nuclear factor kB*); cFms, receptor čimbenika stvaranja monocitnih kolonija (prema engl. *macrophage colony-stimulating factor receptor*); CalcR, kalcitoninski receptor (prema engl. *calcitonin receptor*); Cat K, katepsin K (prema engl. *cathepsin K*). Broj osteoklasta (OCs) je izražen kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). \*\* $p < 0,05$  (Studentov t-test). \*prikazuje biološki značajnu razliku u izražaju ( $\geq 100\%$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu.



**Slika 24. Osteoklastogenetski potencijal osteoklastnih progenitora slezene miševa s artritismom potaknutim kolagenom.** Sortirani osteoklastni progenitori slezene definirani kao stanice fenotipa CD3<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup> su zasijani (10 000 stanica/zdenca) u pločice s 96 zdenaca u 0,2 mL diferencijacijskog medija koji je sadržavao  $\alpha$ -MEM uz 10% FBS, 100 U/mL penicilina, 100 U/mL streptomicina uz 40 ng/mL rekombinantnog mišjeg (rm) M-CSF i 60 ng/mL rmRANKL, a diferencijacijski medij je promijenjen nakon trećeg dana. Nakon šest dana kultivacije stanice su obojane postupkom za dokazivanje aktivnosti enzima TRAP (prema engl. *tartrate resistant acid phosphatase*). Stanice za izolaciju RNA su dobivene združivanjem 5 zdenaca šestog dana stanične kulture, a vrijednosti izražaja mRNA su dobivene uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju (cDNA iz kulture osteoklasta) i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za  $\beta$ -aktin („endogena“ kontrola). **(A)** Morfologija uzgojenih osteoklasta u kulturama osteoklastnih progenitora miševa s artritismom – osteoklasti su stanice ljubičaste boje s  $\geq 3$  jezgara koje izražavaju enzim TRAP, povećanje 100x, **(B)** prosječan broj TRAP-pozitivnih osteoklasta po zdenca i **(C)** izražaj specifičnih osteoklastnih diferencijacijskih gena u osteoklastogenetskim kulturama progenitora slezene miševa s artritismom potaknutim kolagenom. Pokusi su ponovljeni tri puta s ukupno 8-10 miševa po svakoj skupini, sa sličnim rezultatima, a prikazani su rezultati izabranih nezavisnih pokusa ranog, kasnog i vrlo kasnog artritisa. CIA, artritis potaknut kolagenom (prema engl. *collagen induced arthritis*); RANK, poticatelj receptora jezgrinog čimbenika kB (prema engl. *receptor activator of nuclear factor kB*); cFms, receptor čimbenika stvaranja monocitnih kolonija (prema engl. *macrophage colony-stimulating factor receptor*); CalcR, kalcitoninski receptor (prema engl. *calcitonin receptor*); Cat K, katepsin K (prema engl. *cathepsin K*). Broj osteoklasta (OCs) je izražen kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). \*\* $p < 0,05$  (Studentov t-test). \*prikazuje biološki značajnu razliku ( $\geq 100\%$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu.



### **5.3.2. Diferencijacija i aktivnost osteoblasta u modelu artritisa potaknutog kolagenom**

Učinak artritisa na osteoblastogenetski potencijal mezenhimnih stanica koštane srži i koštanog cilindra utvrđen je analizom osteoblastogenetskih kultura. Stanice su diferencirane u osteoblaste dodatkom  $\beta$ -glicerofosfata, askorbinske kiseline i deksametazona, koji potiču sazrijevanje i mineralizaciju osteoblastnih kolonija.

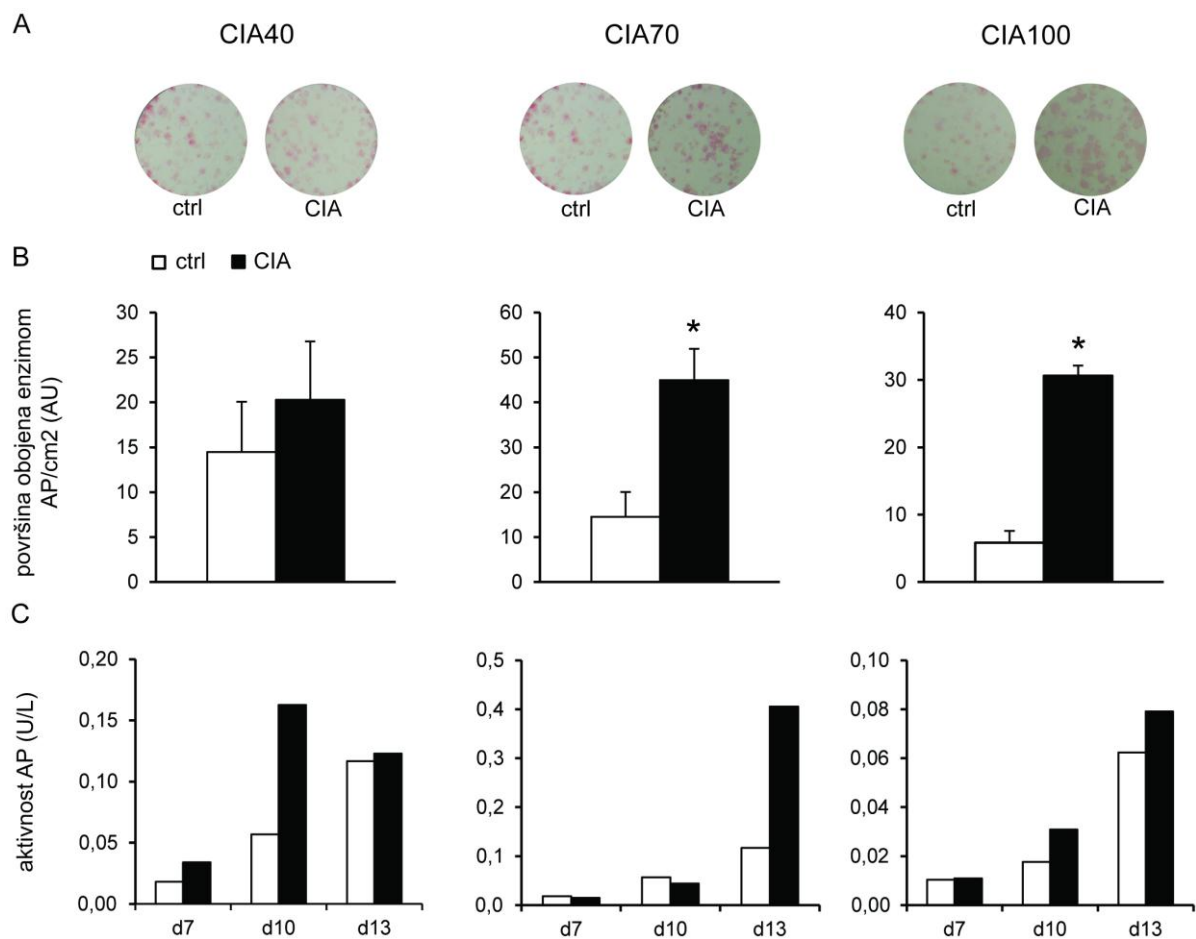
#### **5.3.2.1. Učinak artritisa na osteoblastogenetski potencijal mezenhimnih stanica *in vitro***

U kulturama osteoblasta mezenhimnih stanica koštane srži i koštanog cilindra kontrolnih miševa i miševa s artritiskom u tri vremenske točke (ranom, kasnom i vrlo kasnom artritiskom) odredili smo broj AP-pozitivnih osteoblastnih kolonija, površinu zdenca obojenu histokemijskim bojanjem enzima AP i aktivnost enzima AP u staničnom lizatu. Enzim AP sudjeluje u procesu kalcifikacije kosti i biljeg je preosteoblasta i osteoblasta (32, 199).

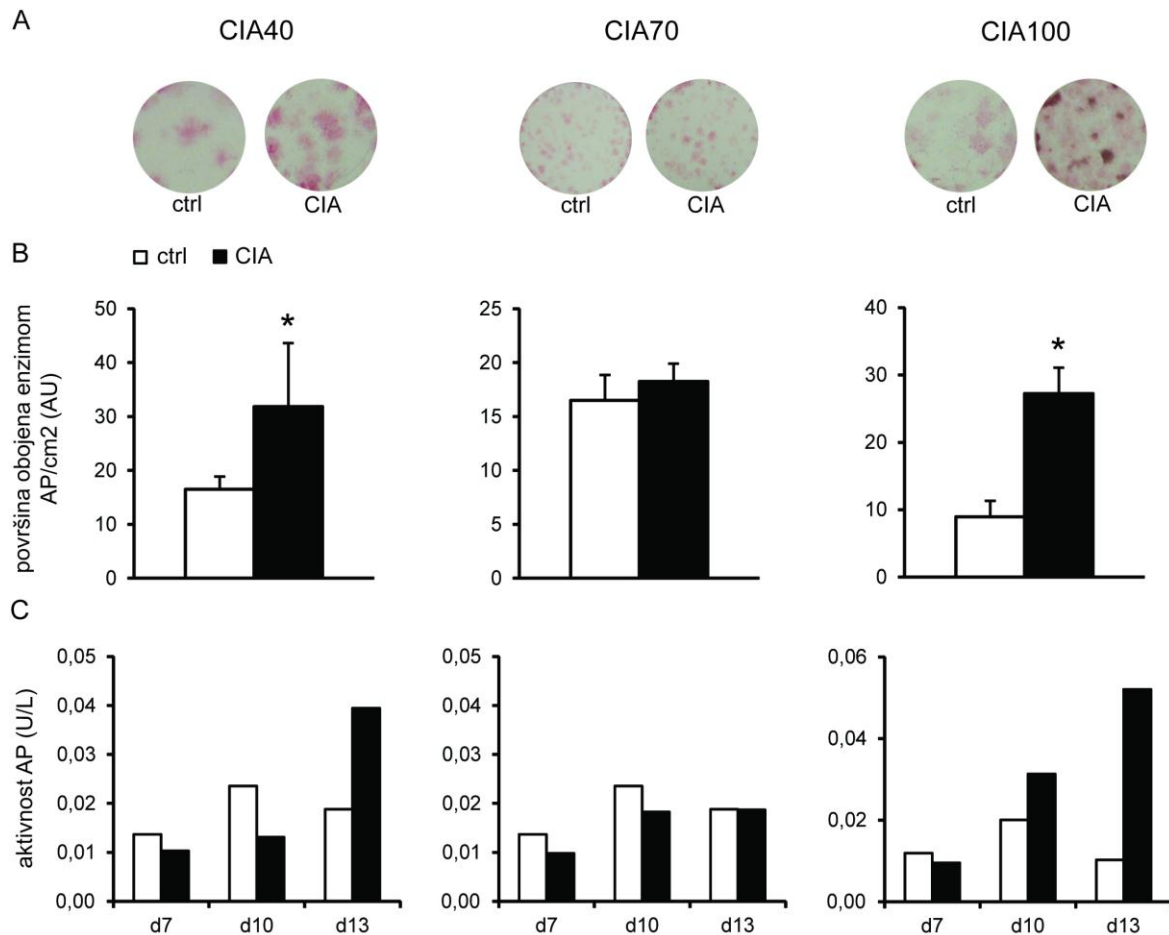
Mezenhimne stanice koštane srži miševa s kasnim (CIA70) i vrlo kasnim artritiskom (CIA100) 13. dana kulture su razvile veći broj i veću površinu osteoblastnih kolonija koje izražavaju enzim AP u odnosu na kontrolne miševe (Slika 25.A,B). Nasuprot tome, skupina miševa s ranim (CIA40) artritiskom 13. dana kulture se nije razlikovala u broju i površini osteoblastnih kolonija u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 25.A,B).

Mezenhimne stanice koštanog cilindra miševa s ranim (CIA40) i vrlo kasnim artritiskom (CIA100) 13. dana kulture su razvile veći broj i veću površinu osteoblastnih kolonija koje izražavaju enzim AP u odnosu na kontrolne miševe (Slika 26.A,B).

Nadalje, aktivnost enzima AP u kulturi osteoblasta diferenciranih iz koštane srži (Slika 25.C) i koštanog cilindra (Slika 26.C) povećava se s trajanjem kulture i sazrijevanjem osteoblasta.



**Slika 25. Osteoblastogenetski potencijal mezenhimnih stanica koštane srži miševa s artritisom potaknutim kolagenom.** Mezenhimne stanice koštane srži su zasijane u pločice sa 6 zdenca u gustoći  $10^6$  stanica/mL  $\alpha$ MEM hranjivog medija s 10% fetalnog goveđeg seruma, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina. Sedmoga dana kulture u zdence je dodan diferencijacijski medij koji se sastoji od temeljnog medija  $\alpha$ -MEM s 10% fetalnog goveđeg seruma, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina, uz dodatak 50  $\mu$ g/mL askorbinske kiseline,  $10^{-8}$  M deksametazona i 8 mM  $\beta$ -glicerofosfata, i potom mijenjan svaki drugi dan. **(A)** Kolonije stanica osteoblastne loze trinaestog dana stanične kulture histokemijski obojene crveno korištenjem kemikalija za određivanje aktivnosti alkalne fosfataze (AP). **(B)** Intenzitet bojanja enzima AP izmjeren u 2 zdenca u kulturi podrijetlom iz stanica koštane srži. **(C)** Aktivnost enzima AP u staničnim lizatima mezenhimnih stanica koštane srži tijekom osteoblastne diferencijacije sedmog (d7), desetog (d10) i trinaestog (d13) dana dobivenim združivanjem po 2 zdenca. Pokusi su ponovljeni tri puta s ukupno 8-10 miševa po svakoj skupini, sa sličnim rezultatima, a prikazani su rezultati izabranih nezavisnih pokusa ranog (CIA40), kasnog (CIA70) i vrlo kasnog (CIA100) artritisa. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). \* $p < 0,05$  (Studentov t-test). CIA (prema engl. *collagen induced arthritis*), artritis potaknut kolagenom.



**Slika 26. Osteoblastogenetski potencijal mezenhimnih stanica koštanog cilindra miševa s artritism potaknutim kolagenom.** Mezenhimne stanice iz koštanog cilindra su zasijane u pločice s 24 zdenca u gustoći  $10^6$  stanica/mL  $\alpha$ MEM hranjivog medija s 10% fetalnog goveđeg seruma, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina. Sedmoga dana kulture u zdence je dodan diferencijacijski medij koji se sastoji od temeljnog medija  $\alpha$ -MEM s 10% fetalnog goveđeg seruma, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina, uz dodatak 50  $\mu$ g/mL askorbinske kiseline,  $10^{-8}$  M deksametazona i 8 mM  $\beta$ -glicerofosfata, i potom mijenjan svaki drugi dan. **(A)** Kolonije stanica osteoblastne loze trinaestog dana stanične kulture, histokemijski obojene crveno korištenjem kemikalija za određivanje aktivnosti alkalne fosfataze (AP). **(B)** Intenzitet bojanja enzima AP izmjeren u 4 zdenca u kulturi podrijetlom iz stanica koštane srži. **(C)** Aktivnost enzima AP u staničnim lizatima mezenhimnih stanica koštane srži tijekom osteoblastne diferencijacije sedmog (d7), desetog (d10) i trinaestog (d13) dana dobivenim združivanjem po 4 zdenca. Pokusi su ponovljeni tri puta s ukupno 8-10 miševa po svakoj skupini, sa sličnim rezultatima, a prikazani su rezultati izabranih nezavisnih pokusa ranog (CIA40), kasnog (CIA70) i vrlo kasnog (CIA100) artritisa. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). \* $p < 0,05$  (Studentov t-test). CIA (prema engl. *collagen induced arthritis*), artritis potaknut kolagenom.



### **5.3.2.2. Učinak artritisa na izražaj osteoblastnih diferencijacijskih gena u mezenhimnim stanicama koštanog okoliša**

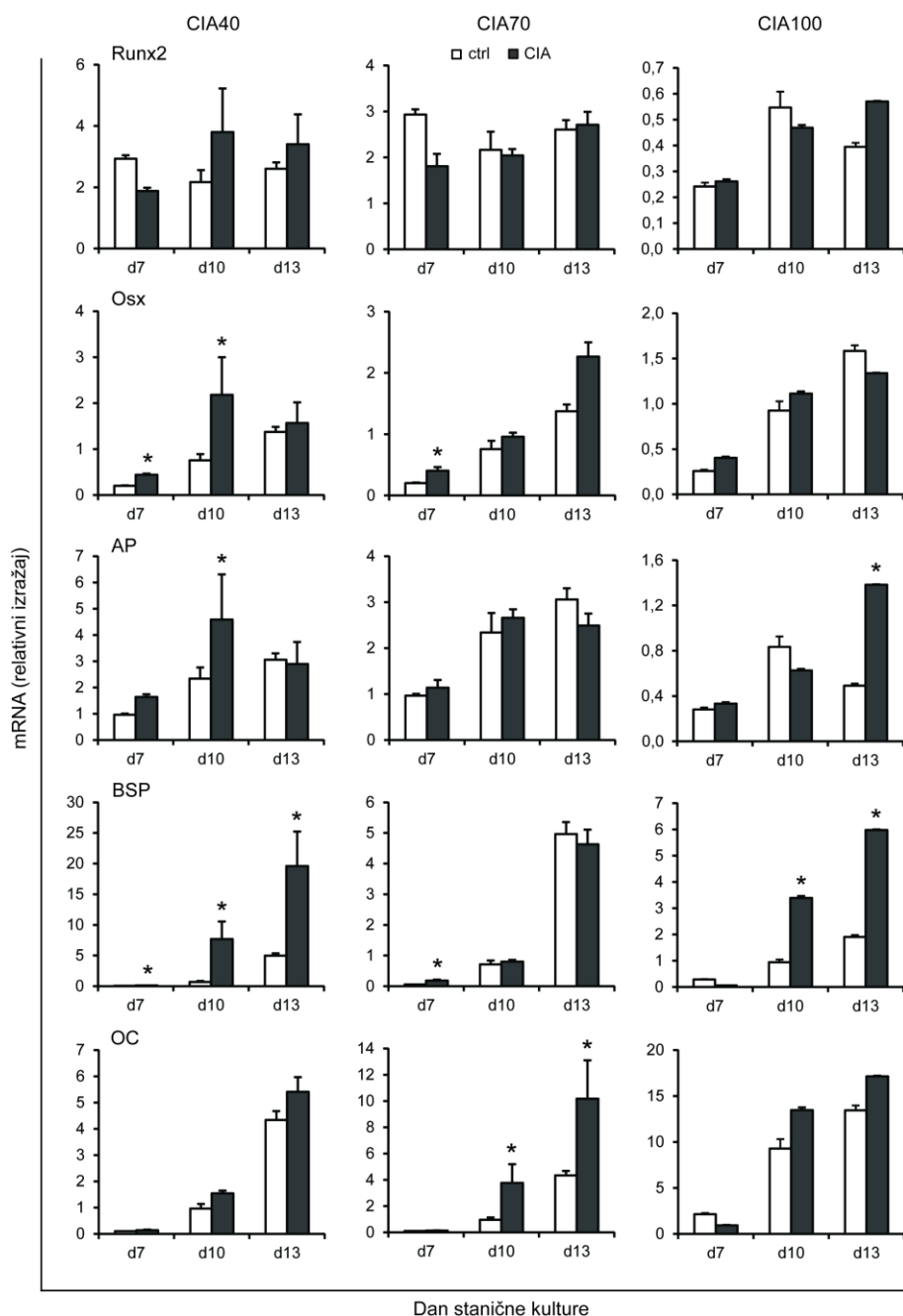
Izražaj specifičnih osteoblastnih diferencijacijskih gena analiziran je postupkom qPCR u osteoblastogenetskim kulturama stanica koštane srži i koštanog cilindra. Transkripcijski čimbenici Runx2 i Osx glavni su geni uključeni u diferencijaciju osteoblasta. Runx2 je izražen vrlo rano tijekom koštanog razvoja i nužan je tijekom stvaranja kosti i hipertrofične hrskavice. Transkripcijski faktor Osx također je izražen rano tijekom sazrijevanja i ključan je za diferencijaciju pre-osteoblasta u osteoblaste (200-202). Gen za AP je jedan od prvih izraženih u procesu mineralizacije i rabi se kao preosteoblastni/osteoblastni biljeg, čiji se izražaj smanjuje tijekom stadija sazrijevanja i početkom stadija ovapnjenja. Izražaj gena za BSP se također smanjuje u stadiju sazrijevanja, ali se ponovo pojačava u stadiju ovapnjenja. OC je izražen u kasnoj fazi sazrijevanja koštanog tkiva i služi kao biljeg zrelih osteoblasta (45) (Slika 2.). Prilikom analize izražaja gena za reproducibilnu, biološki značajnu razliku odredili smo 100%-tnu ili veću razliku prema kontrolnoj skupini (191).

U kulturi mezenhimnih stanica koštane srži (Slika 27.) miševa s ranim artritismom (CIA40) značajno raste izražaj gena za Osx 7. dana kulture, a Osx i AP 10. dana kulture u odnosu na kontrolnu kulturu. Isto tako značajno raste izražaj gena za BSP u svim danima stanične kulture životinja s ranim artritismom u odnosu na kontrolnu skupinu. Nadalje, kod kasnog artritisa (CIA70) 7. dan stanične kulture značajno raste izražaj gena za transkripcijski faktor Osx i BSP, dok u kasnijim danima osteoblastne kulture (10. i 13. dana) značajno raste izražaj gena za OC u odnosu na kontrolnu kulturu. U osteoblastogenetskim kulturama koštane srži životinja s vrlo kasnim artritismom 13. dana kulture značajno raste izražaj gena za AP i BSP. Izražaj osteoblastnih diferencijacijskih gena u kulturama stanica koštane srži je veći u miševa s artritismom u odnosu na kontrolnu skupinu i u skladu je s brojem diferenciranih osteoblastnih kolonija koje izražavaju enzim AP.

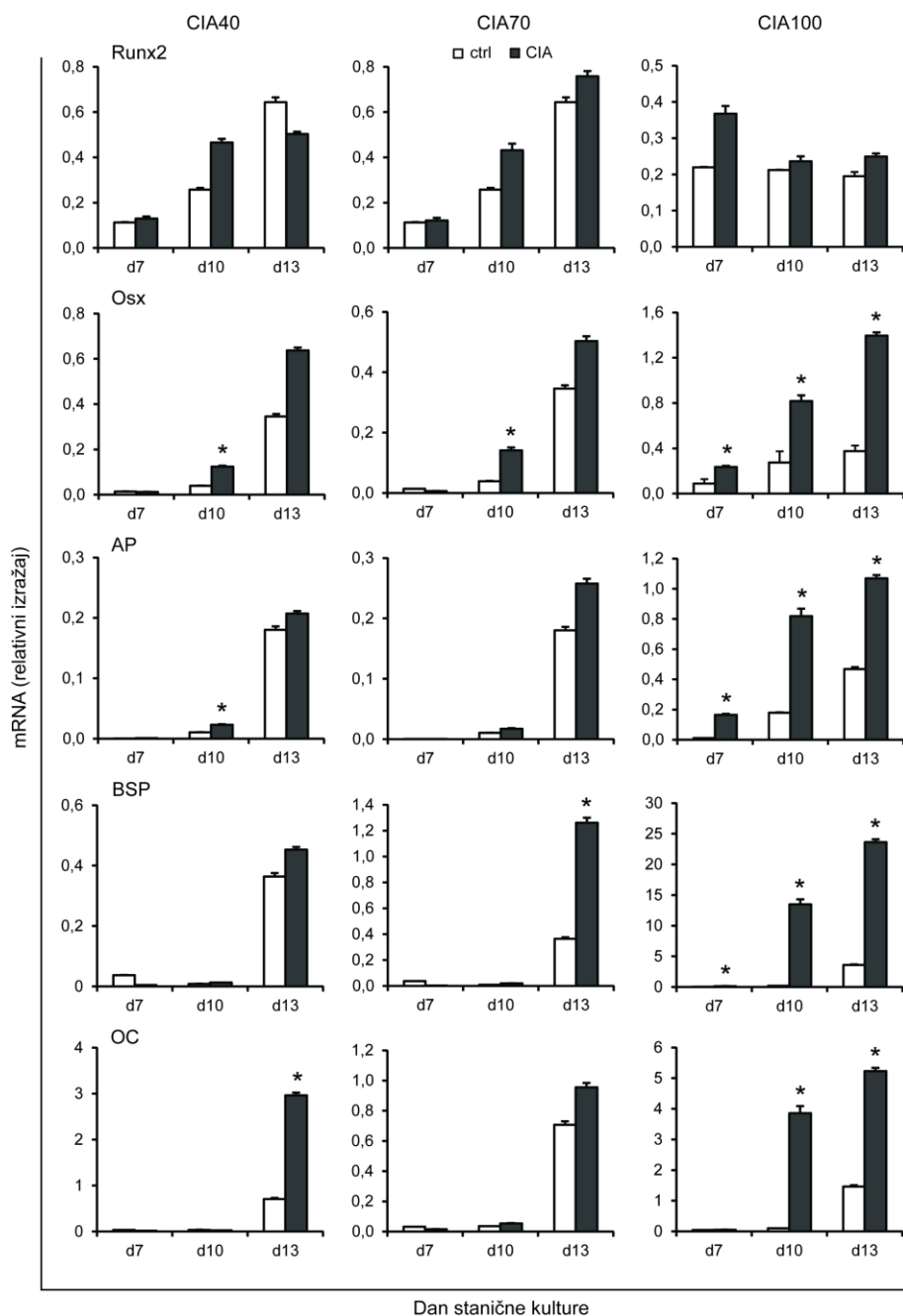
Izražaj osteoblastnih diferencijacijskih gena u kulturi mezenhimnih stanica koštanog cilindra (Slika 28.) u ranom artritisu (CIA40) značajno je veći u odnosu na kontrolnu kulturu, posebice za Osx i AP 10. dana, a OC 13. dana stanične kulture. To je u korelaciji s rezultatima broja AP-pozitivnih osteoblastnih kolonija i AP-aktivnosti u toj vremenskoj točki. Premda na temelju broja osteoblastnih kolonija i aktivnosti enzima AP u kasnom artritisu (CIA70) možemo zaključiti da miševi s artritismom nemaju veći osteoblastogenetski potencijal stromalnih stanica koštanog cilindra (Slika 26.), ipak u staničnim kulturama značajno je veći izražaj gena za Osx (10. dana kulture) i BSP (13. dana kulture) u odnosu na kulture

diferencirane iz mezenhimnih stanica kontrolnih životinja (Slika 28.). Tijekom diferencijacije mezenhimnih stanica koštanog cilindra miševa s vrlo kasnim artritisom (CIA100) značajno je veći izražaj gena za *Osx*, *AP* i *BSP* 7., 10. i 13. dana kulture, a *OC* 10. i 13. dana u odnosu na kontrolu (Slika 28.).

Ovim nizom pokusa zaključili smo da miševi s artritisom potaknutim kolagenom imaju jači genski izražaj specifičnih osteoblastnih biljega, i u osteoblastogenetskim kulturama koštane srži i koštanog cilindra u odnosu na kontrolne kulture, te da miševi s artritisom imaju veći osteoblastogenetski potencijal u odnosu na kontrolne životinje. Navedeni zaključak je u skladu s hipotezom postavljenom na početku istraživanja.



**Slika 27. Izražaj osteoplastnih diferencijacijskih gena u osteoplastogenetskim kulturama stanica koštane srži miševa s artritismom potaknutim kolagenom.** Mezenhimne stanice koštane srži su zasijane u pločice sa 6 zdenca u gustoći  $10^6$  stanica/mL  $\alpha$ MEM hranjivog medija s 10% FBS, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina. Sedmoga dana kulture u zdenca je dodan diferencijacijski medij koji se sastoji od temeljnog medija  $\alpha$ -MEM s 10% FBS, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina, uz dodatak 50  $\mu$ g/mL askorbinske kiseline,  $10^{-8}$  M deksametazona i 8 mM  $\beta$ -glicerofosfata, i potom mijenjan svaki drugi dan. Stanice za izolaciju RNA su dobivene združivanjem 2 zdenca sedmog (d7), desetog (d10) i trinaestog (d13) dana stanične kulture, a vrijednosti izražaja mRNA su dobivene uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju (cDNA iz kulture osteoblasta) i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za  $\beta$ -aktin („endogena“ kontrola). Pokusi su ponovljeni tri puta s ukupno 8-10 miševa po svakoj skupini, sa sličnim rezultatima, a prikazani su rezultati izabranih nezavisnih pokusa ranog, kasnog i vrlo kasnog artritisa. CIA, artritis potaknut kolagenom (prema engl. *collagen induced arthritis*); Runx2, transkripcijski čimbenik Runx2 (prema engl. *runt related transcription factor 2*); Osx, transkripcijski čimbenik Osx (prema engl. *osterix*); AP, alkalna fosfataza (prema engl. *alkaline phosphatase*); BSP, koštana sijalobjelančevina (prema engl. *bone sialoprotein*); OC, osteoklacin. \*prikazuje biološki značajnu razliku u izražaju ( $\geq 100\%$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu (ctrl).

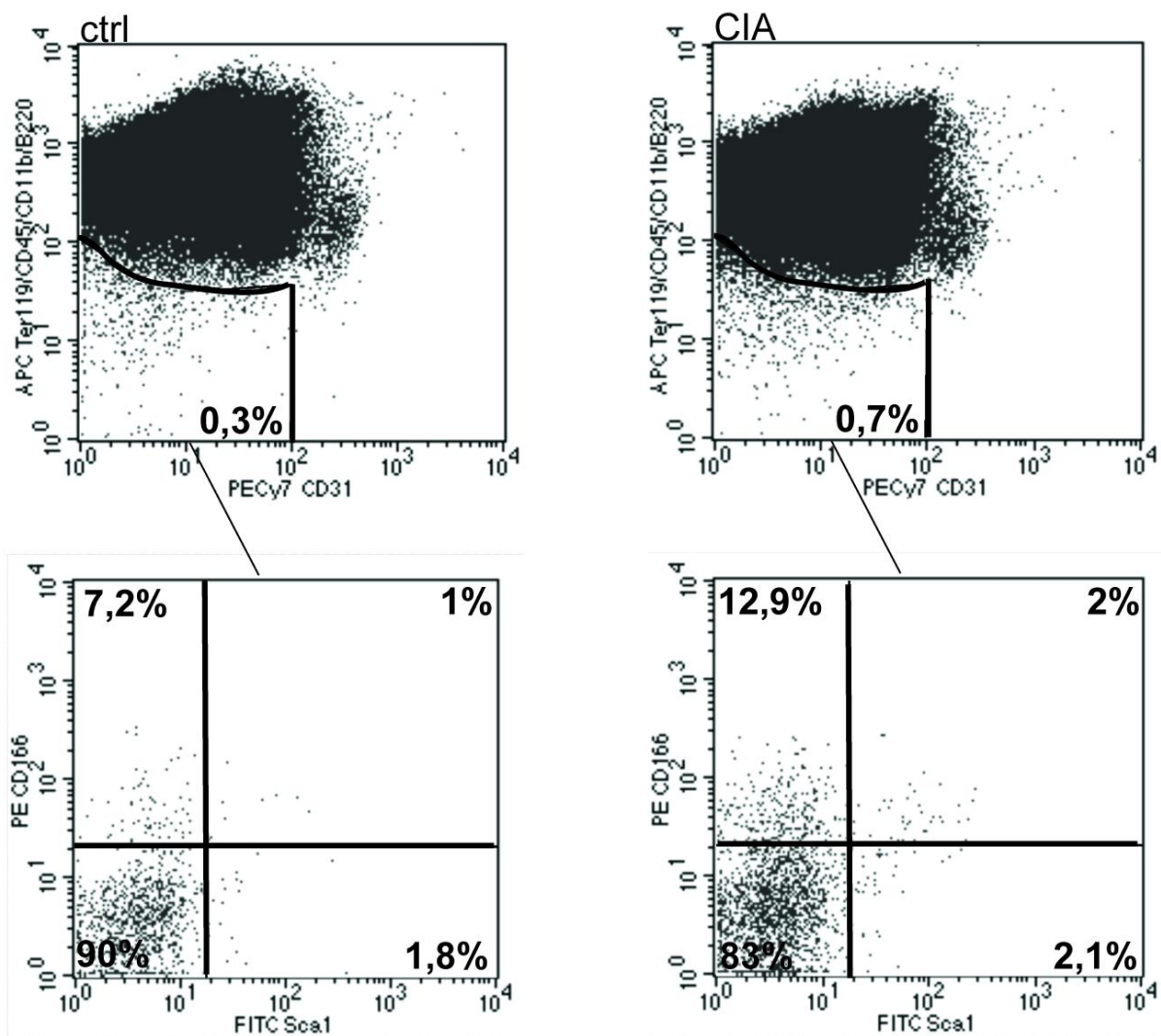


**Slika 28. Izražaj osteoblastnih diferencijacijskih gena u osteoblastogenetskim kulturama stanica koštanog cilindra miševa s artritisa potaknutim kolagenom.** Mezenhimne stanice koštanog cilindra su zasijane u pločice s 24 zdenca u gustoći  $10^6$  stanica/mL  $\alpha$ MEM hranjivog medija s 10% FBS, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina. Sedmog dana kulture u zdenca je dodan diferencijacijski medij koji se sastoji od temeljnog medija  $\alpha$ -MEM s 10% FBS, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina, uz dodatak 50  $\mu$ g/mL askorbinske kiseline,  $10^{-8}$  M deksametazona i 8 mM  $\beta$ -glicerofosfata, i potom mijenjan svaki drugi dan. Stanice za izolaciju RNA su dobivene združivanjem 4 zdenca sedmog (d7), desetog (d10) i trinaestog (d13) dana stanične kulture, a vrijednosti izražaja mRNA su dobivene uporabom standardne krivulje izražaja ciljnih gena u uzorku za kalibraciju (cDNA iz kulture osteoblasta) i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za  $\beta$ -aktin („endogena“ kontrola). Pokusi su ponovljeni tri puta s ukupno 8-10 miševa po svakoj skupini, sa sličnim rezultatima, a prikazani su rezultati izabranih nezavisnih pokusa ranog, kasnog i vrlo kasnog artritisa. CIA, artritis potaknut kolagenom (prema engl. *collagen induced arthritis*); Runx2, transkripcijski čimbenik Runx2 (prema engl. *runt related transcription factor 2*); Osx, transkripcijski čimbenik Osx (prema engl. *osterix*); AP, alkalna fosfataza (prema engl. *alkaline phosphatase*); BSP, koštana sijalobjelančevina (prema engl. *bone sialoprotein*); OC, osteoklacin. \*prikazuje biološki značajnu razliku u izražaju ( $\geq 100\%$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu (ctrl).

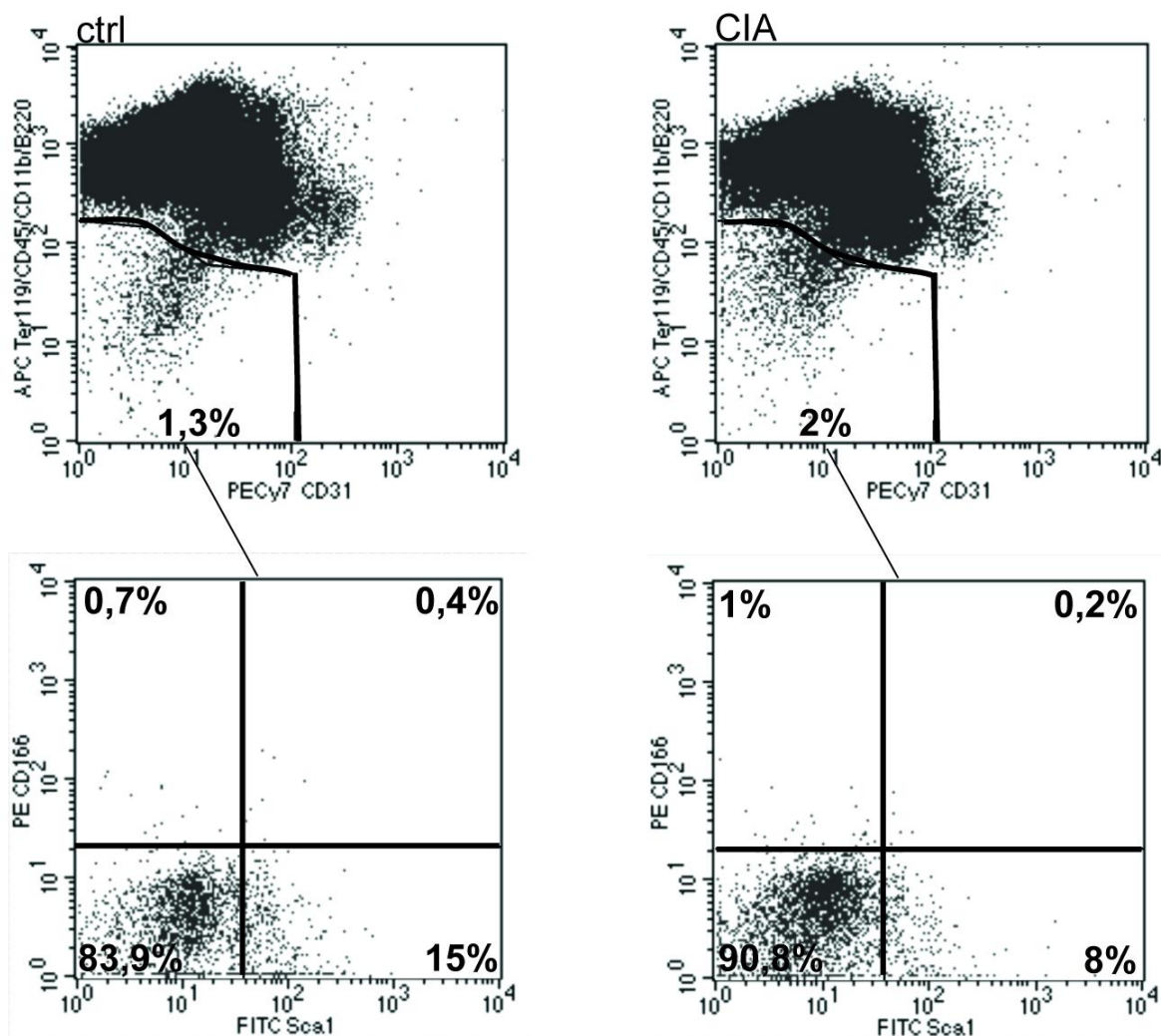
### 5.3.2.3. Učinak artritisa na staničnu populaciju osteoblastnih progenitora

Brojne studije nastojale su definirati fenotip mezenhimnih osteoprogenitorskih stanica (203-206). Nakamura i sur. (206) su u svom istraživanju identificirali subpopulaciju endostalnih stanica koštane srži koje ne izražavaju hematopoetske i endotelne biljege (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>). Na temelju izražaja biljega CD166 (također poznat kao ALCAM, prema engl. *activated leukocyte cell adhesion molecule*), koji se nalazi na hematopoetskim matičnim stanicama, mezenhimnim matičnim stanicama i osteoblastičnim staničnim linijama, i Sca-1 (prema engl. *stem cell antigen-1*), koji je izražen na mezenhimnim matičnim stanicama podijelili su ih na nekoliko subpopulacija. Najnezrelija subpopulacija osteoblastnih progenitorskih stanica izražava biljeg Sca-1 (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>). Zrelije populacije ne izražavaju biljeg Sca-1 (Sca-1<sup>-</sup>CD166<sup>-</sup> i Sca-1<sup>-</sup>CD166<sup>+</sup>) i izražavaju enzim AP.

Protočnometrijskom analizom stanica koštane srži miševa s ranim artritismom utvrdili smo da je udio stanica CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>B220<sup>-</sup> gotovo dvostruko veći u odnosu na kontrolnu skupinu, a u toj subpopulaciji stanica miševi s artritismom imaju veći udio stanica CD166<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup> i stanica CD166<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup> (Slika 29.). Dakle, koštana srž miševa s artritismom sadrži veći udio osteoblastnih progenitora i zrelijih mezenhimnih stanica u odnosu na kontrolu. Istovjetnom analizom stanica dobivenih iz koštanog cilindra utvrdili smo da miševi s artritismom imaju veći udio stanica CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>B220<sup>-</sup> u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 30.). Međutim, ta stanična populacija koja ne izražava hematopoetske i limfoidne biljege, zbog ukupno većeg udjela u koštanom cilindru u miševa s artritismom u odnosu na kontrolnu skupinu, ima samo povećan udio stanica CD166<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup> u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 30.). Na osnovu toga smo zaključili da se u koštanom cilindru, kao što je i očekivano, nalaze zrelije mezenhimne stanice te da ih je više u miševa s artritismom nego u kontrolnih miševa.



**Slika 29. Izražaj površinskih biljega specifičnih za populaciju osteoblastnih progenitora u koštanoj srži u artritisu potaknutom kolagenom.** Protočnim citometrom je analiziran izražaj površinskih biljega specifičnih za populaciju osteoblastnih progenitora: CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>CD166<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup> uporabom monoklonskih protutijela konjugiranih fluorokromima [alofikocijanin (APC)-anti-CD45/Ter119/CD11b/B220, fikoeritricijanin 7 (PE Cy7)-anti-CD31, fikoeritrin (PE)-anti-CD166 i fluorescein-izotiocijanat (FITC)-anti-Sca-1] kontrolnih miševa (ctrl) i miševa s artritisom potaknutim kolagenom (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*). Analizirano je 300 000 vijabilnih stanica po uzorku i prikazano točkastim grafikonom u programu CellQuest na uređaju FACSCalibur. Prikazan je reprezentativni pokus ranog artritisa.



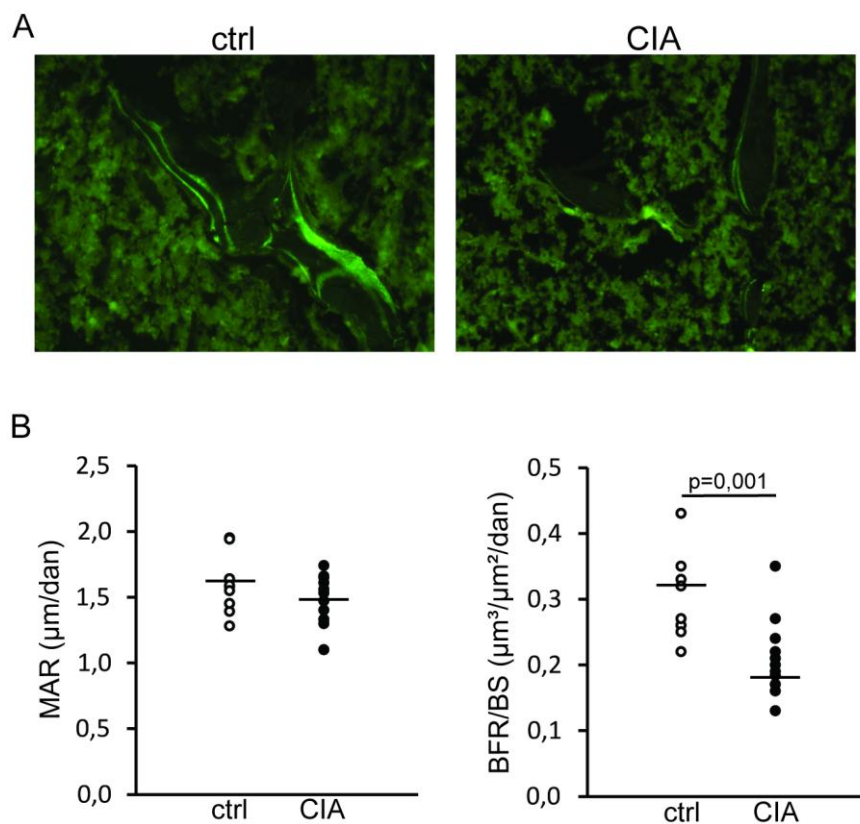
**Slika 30. Izražaj površinskih biljega specifičnih za populaciju osteoblastnih progenitora u koštanom cilindru u artritisu potaknutom kolagenom.** Protočnim citometrom je analiziran izražaj površinskih biljega specifičnih za populaciju osteoblastnih progenitora: CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>CD166<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup> uporabom monoklonskih protutijela konjugiranih fluorokromima [alofikocijanin (APC)-anti-CD45/Ter119/CD11b/B220, fikoeritrin-cijanin 7 (PE Cy7)-anti-CD31, fikoeritrin (PE)-anti-CD166 i fluorescein-izotiocijanat (FITC)-anti-Sca-1] kontrolnih miševa (ctrl) i miševa s artritisom potaknutim kolagenom (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*). Analizirano je 300 000 vijabilnih stanica po uzorku i prikazano točkastim grafikonom u programu CellQuest na uređaju FACSCalibur. Prikazan je reprezentativni pokus ranog artritisa.

#### 5.3.2.4. Učinak artritisa na aktivnost osteoblasta u periartikularnoj kosti

Prethodnim pokusima je nađen pojačan osteoblastogenetski potencijal stanica koštane srži *in vitro* u miševa s artritisom potaknutim kolagenom. Međutim, analiza mikro-kompjutoriziranom tomografijom i statičkom histomorfometrijom distalnih metafiza bedrenih kostiju je pokazala da u miševa s ranim i kasnim artritisom dolazi do značajnog smanjenja volumena trabekularne kosti. Pretpostavili smo da je u artritisu unatoč pojačanoj



diferencijaciji osteoblasta *in vitro* poremećena njihova aktivnost stvaranja kosti *in vivo*. Da bi utvrdili aktivnost osteoblasta u periartikularnoj kosti, miševi smo u određenom vremenskom razmaku obradili kalceinom te izmjerili brzinu odlaganja minerala (MAR,  $\mu\text{m}/\text{dan}$ ) i brzinu stvaranja kosti (BFR/BS,  $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dan}$ ). Ti parametri su pokazatelj količine novostvorene kosti. Dinamičkom histomorfometrijom trabekula distalnih metafiza bedrenih kostiju pokazali smo da miševi s artritisa potaknutim kolagenom imaju smanjenju brzinu odlaganja minerala i značajno smanjenu brzinu stvaranja kosti u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 31.). Na endostalnoj kosti ne dolazi do promjena u brzini odlaganja minerala niti brzini stvaranja kosti (rezultati nisu prikazani).



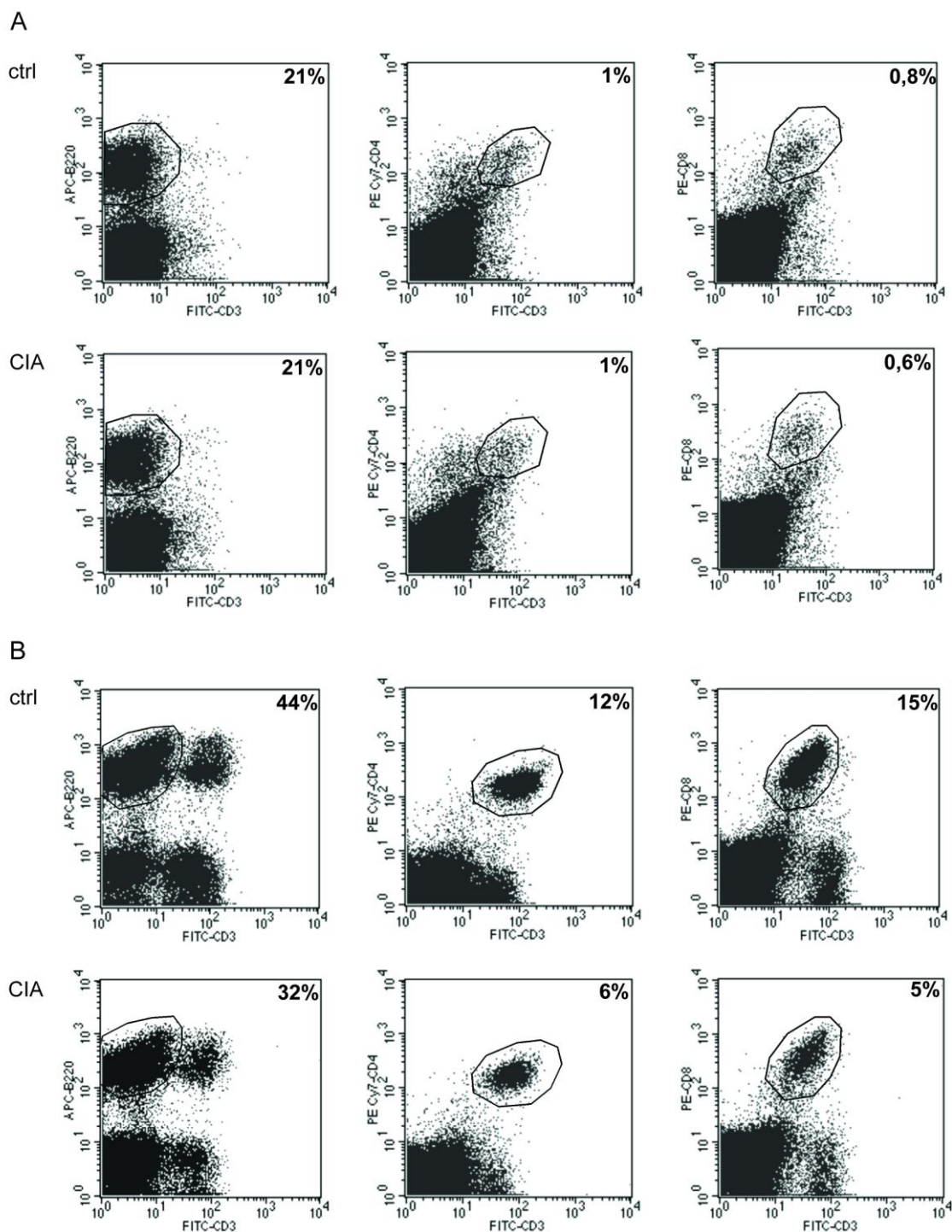
**Slika 31. Učinak artritisa potaknutog kolagenom na periartikularnu izgradnju kosti analiziran dinamičkom histomorfometrijom distalnih metafiza bedrenih kostiju.** Miševi su u razmaku od 5 dana obrađeni kalceinom koji se ugrađuje u novostvorenu kalcificiranu kost, a 7. dana od početka injiciranja životinje su žrtvovane. **(A)** Prikazani su nebojani histološki rezovi koštanih gredica u području distalne metafize bedrene kosti u miševa s artritisa potaknutim kolagenom (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*) i kontrolnih miševa (ctrl). Fluorescentna zelena linija predstavlja kalceinsku liniju mineralizacije. **(B)** Histomorfometrijska analiza je rađena na mikroskopu s fluorescentnom kamerom (Axio Imager, Zeiss), priključenim na računalo s programom za analizu kosti (OsteoMeasure, OsteoMetrics, Decatur, GA, SAD). Iz izmjerenih vrijednosti su u području trabekularne kosti izračunate brzina odlaganja minerala (MAR, engl. *mineral apposition rate*,  $\mu\text{m}/\text{dan}$ ) i brzina stvaranja kosti na ukupnoj koštanoj površini u određenom vremenu (BFR/BS, engl. *bone formation rate*,  $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dan}$ ). Najmanji broj miševa po skupini je bio devet, a prikazani su rezultati jednog pokusa ranog artritisa potaknutog kolagenom. Točke predstavljaju pojedinačne vrijednosti za svakog miša, a crta medijan tih vrijednosti. Statistička značajnost je određena Studentovim t-testom ( $p<0,05$ ).



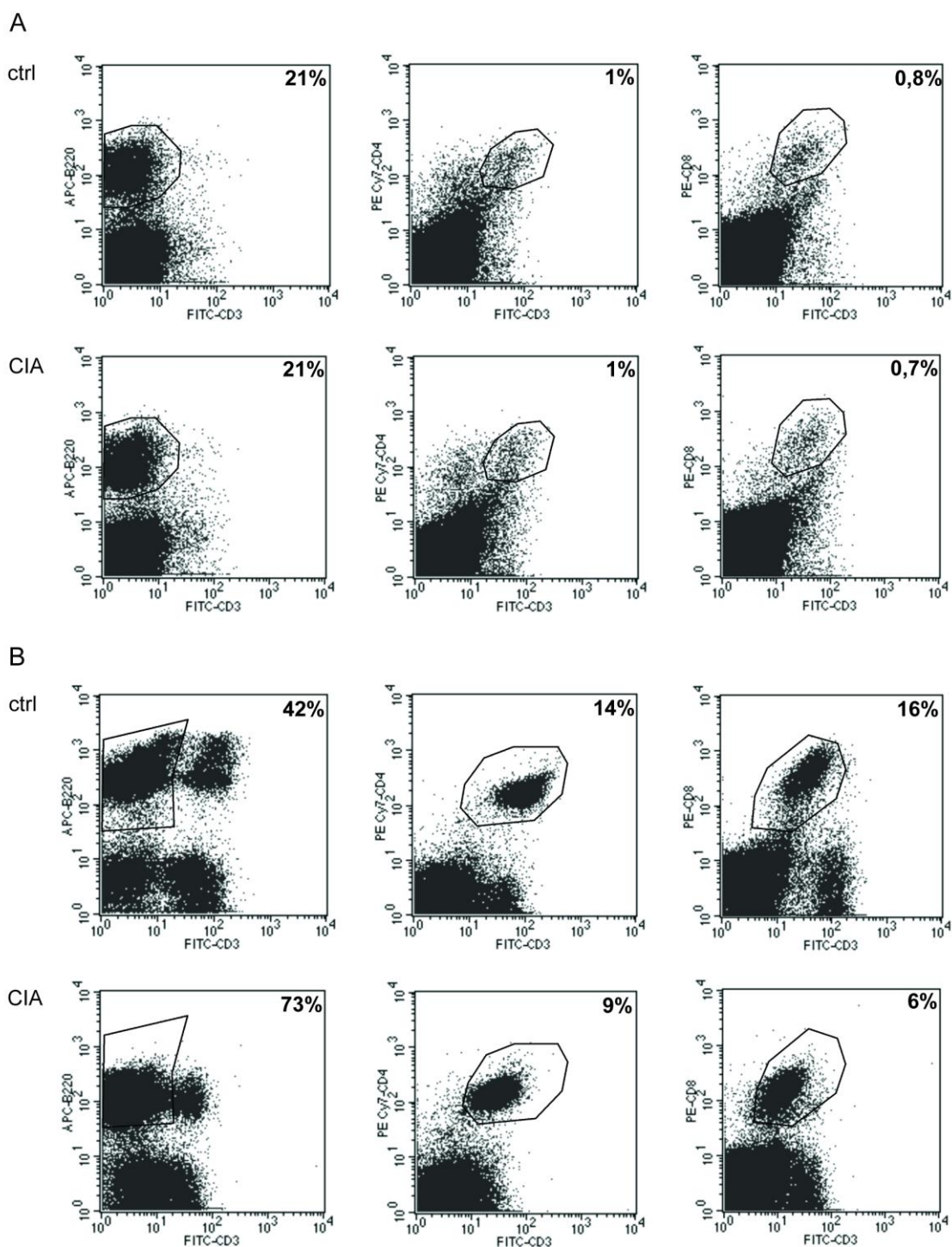
## **5.4. Učinak artritisa na populacije imunskih stanica i izražaj upalnih citokina i kemokina u staničnim populacijama mikrookoliša koštane srži i periferije**

### **5.4.1. Učinak artritisa na promjene u populacijama imunskih stanica**

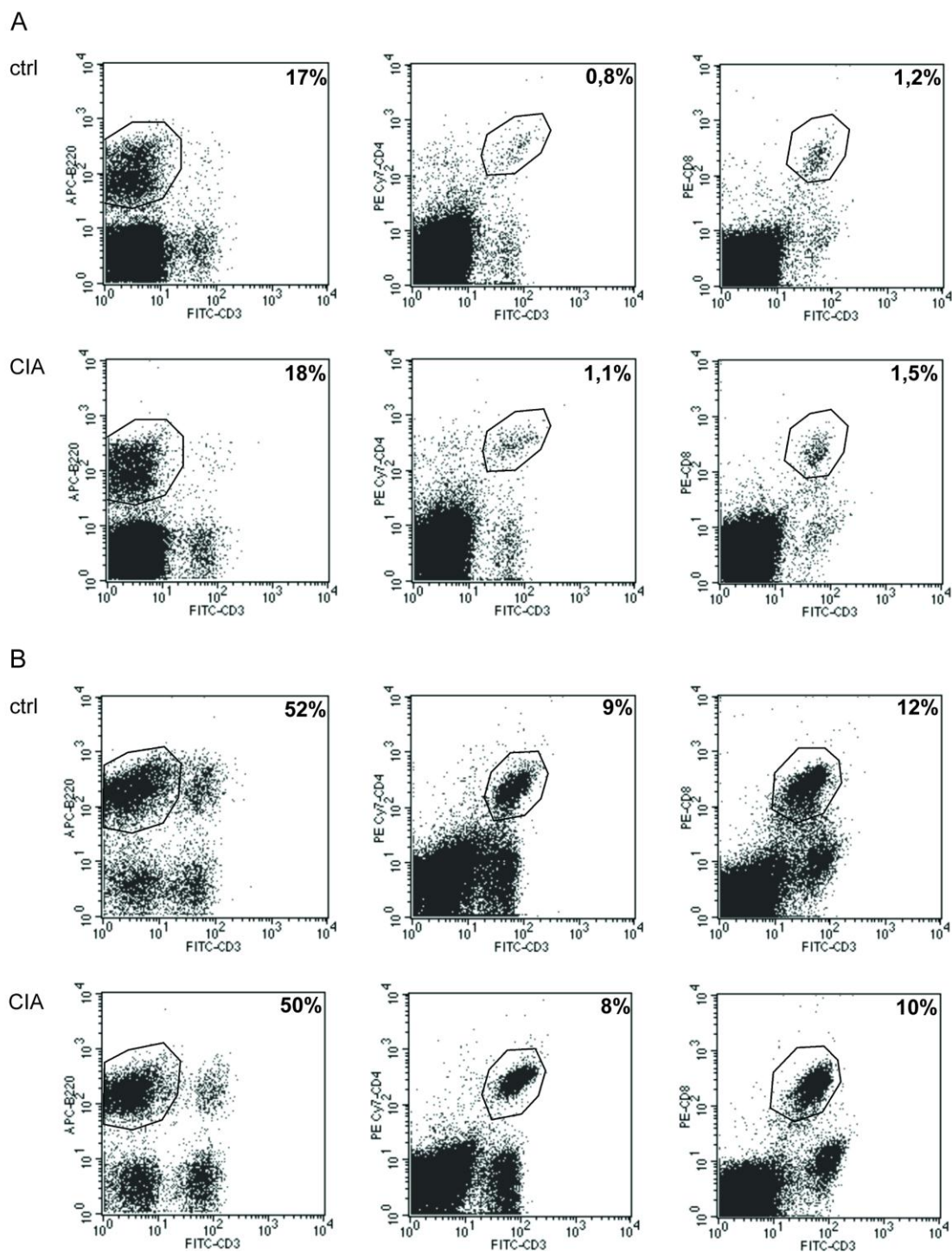
U artritisu potaknutom kolagenom, kao i u reumatoidnom artritisu, dolazi do aktivacije upalnih/imunskih stanica što potiče njihovo lučenje proupalnih molekula (185, 207). Protočnom citometrijom smo utvrdili učinak artritisa na osnovne populacije imunskih stanica koštanog okoliša i periferije, uključujući limfocite T i B, makrofage, DC i stanice NK. Analiziran je izražaj površinskih biljega specifičnih za populacije pomagačkih ( $CD3^+CD4^+$ ) i citotoksičnih ( $CD3^+CD8^+$ ) limfocita T, limfocita B ( $B220^+$ ), makrofaga ( $CD11b^+F4/80^+$ ), stanica NK ( $CD11b^+NK1.1^+$ ) te mijeloidnih DC ( $CD11b^+CD11c^+$ ) i limfoidnih DC ( $CD11b^-CD11c^+$ ). Radi preglednosti prikazani su rezultati dobiveni analizom koštane srži i periferne krvi u sve tri vremenske točke, jer su u tim populacijama uočene najveće promjene u artritisu. U miševa s ranim, kasnim i vrlo kasnim artritisom u koštanoj srži, koštanom cilindru i slezeni ne dolazi do značajnih promjena u populaciji limfocita B, međutim u perifernoj krvi u kasnom artritisu dolazi do prolaznog povećanja udjela populacije limfocita B u odnosu na kontrolnu skupinu miševa (Slika 33.B). U ranom i kasnom artritisu u perifernoj krvi dolazi do smanjenja udjela pomagačkih i citotoksičnih limfocita T u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 32.B i Slika 33.B). U vrlo kasnom artritisu udio limfocita T ponovno je podjednak u obje skupine (Slika 34.B). U ostalim tkivima nije bilo razlika između pokusne i kontrolne skupine u udjelu limfocita T. Unutar mijeloidne loze, koja sadrži i osteoklastne progenitore, artritis uzrokuje izražene promjene u udjelima pojedinih populacija u koštanoj srži i perifernoj krvi, dok u koštanom cilindru i slezeni nema većih promjena. Koštana srž i periferna krv miševa s artritisom u ranom, kasnom i vrlo kasnom artritisu imaju veći udio makrofaga ( $CD11b^+F4/80^+$ ) i mijeloidnih DC ( $CD11b^+CD11c^+$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu, dok se udio populacije limfoidnih DC ne razlikuje od kontrolne skupine (Slika 35., Slika 36. i Slika 37.). Udio stanične populacije koja izražava biljege NK stanica ( $CD11b^+NK1.1^+$ ) je veći u koštanoj srži i perifernoj krvi miševa s artritisom u svim vremenskim točkama u odnosu na kontrolnu skupinu, s tim da među stanicama  $NK1.1^+$  prevladava subpopulacija  $CD11b^+$  nasuprot populaciji  $CD11b^{low}$  (Slika 35., Slika 36. i Slika 37.).



**Slika 32. Izražaj površinskih biljega specifičnih za limfocitne populacije u koštanoj srži i perifernoj krvi u ranom artritisu potaknutom kolagenom.** Analiziran je izražaj površinskih biljega za populacije limfocita T i limfocita B u koštanoj srži (**A**) i perifernoj krvi (**B**) kontrolnih miševa (ctrl) i miševa s artritisom potaknutim kolagenom (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*). Analiziran je izražaj površinskih biljega specifičnih za sljedeće populacije: limfociti B ( $B220^+$ ), pomagački limfociti T ( $CD3^+CD4^+$ ) i citotoksični limfociti T ( $CD3^+CD8^+$ ), uporabom monoklonskih protutijela konjugiranih fluorokromima (fluorescein-izotiocijanat (FITC)-anti-CD3, alofikocijanin (APC)-anti-B220, fikoeritrin-cijanin 7 (PE Cy7)-anti-CD4 i fikoeritrin (PE)-anti-CD8). Analizirano je 100 000 vijabilnih stanica po uzorku i prikazano točkastim grafikonom u programu CellQuest na uređaju FACSCalibur. Prikazan je reprezentativni od tri ponovljena pokusa sa sličnim rezultatima.

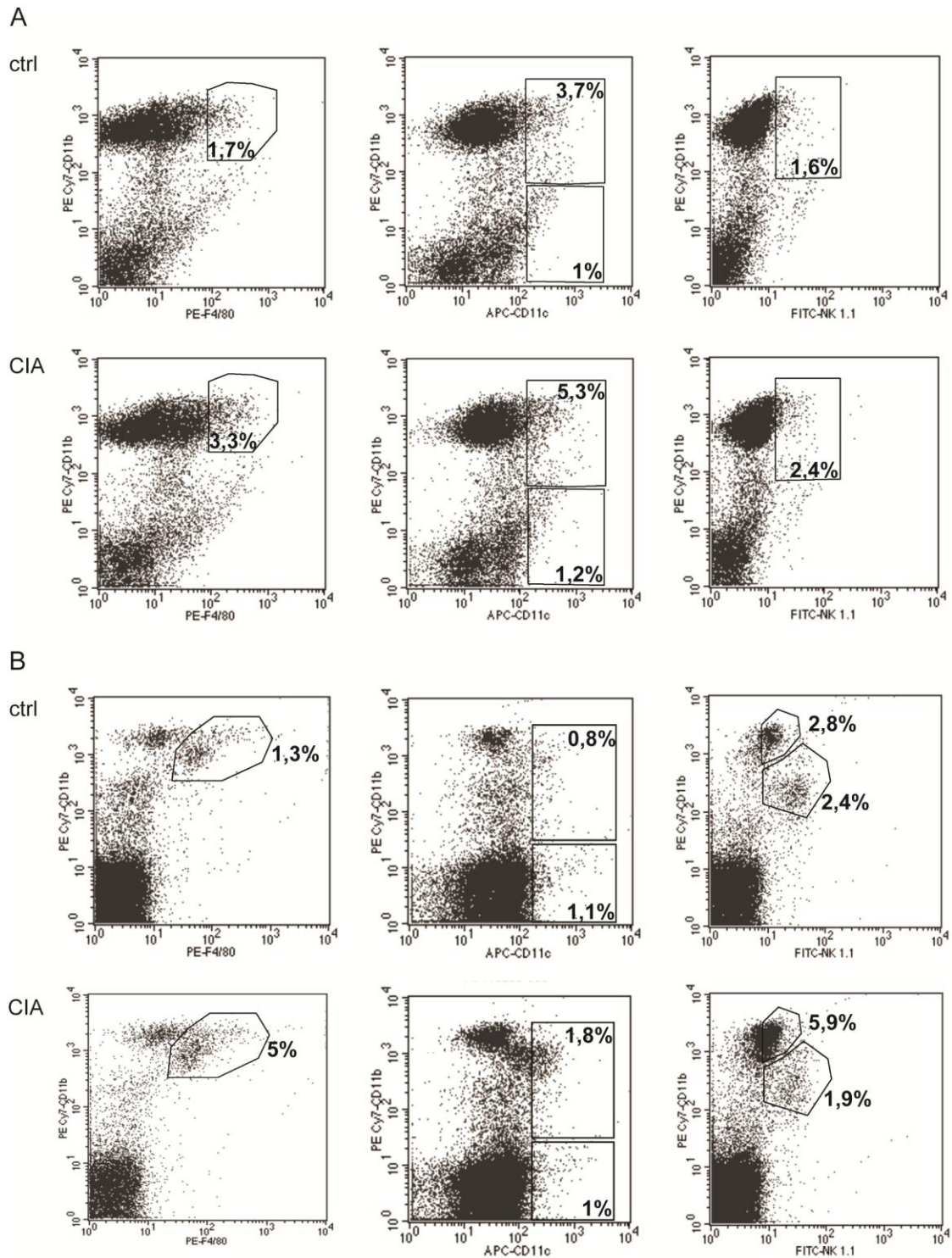


**Slika 33. Izražaj površinskih biljega specifičnih za limfocitne populacije u koštanoj srži i perifernoj krvi u kasnom artritisu potaknutom kolagenom.** Analiziran je izražaj površinskih biljega za populacije limfocita T i limfocita B u koštanoj srži (**A**) i perifernoj krvi (**B**) kontrolnih miševa (ctrl) i miševa s artritisom potaknutim kolagenom (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*). Analiziran je izražaj površinskih biljega specifičnih za sljedeće populacije: limfociti B (B220<sup>+</sup>), pomagački limfociti T (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) i citotoksični limfociti T (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), uporabom monoklonskih protutijela konjugiranih fluorokromima (fluorescein-izotiocijanat (FITC)-anti-CD3, aloflokocijanin (APC)-anti-B220, fikoeritrin-cijanin 7 (PE Cy7)-anti-CD4 i fikoeritrin (PE)-anti-CD8). Analizirano je 100 000 vijabilnih stanica po uzorku i prikazano točkastim grafikonom u programu CellQuest na uređaju FACSCalibur. Prikazan je reprezentativni od tri ponovljena pokusa sa sličnim rezultatima.

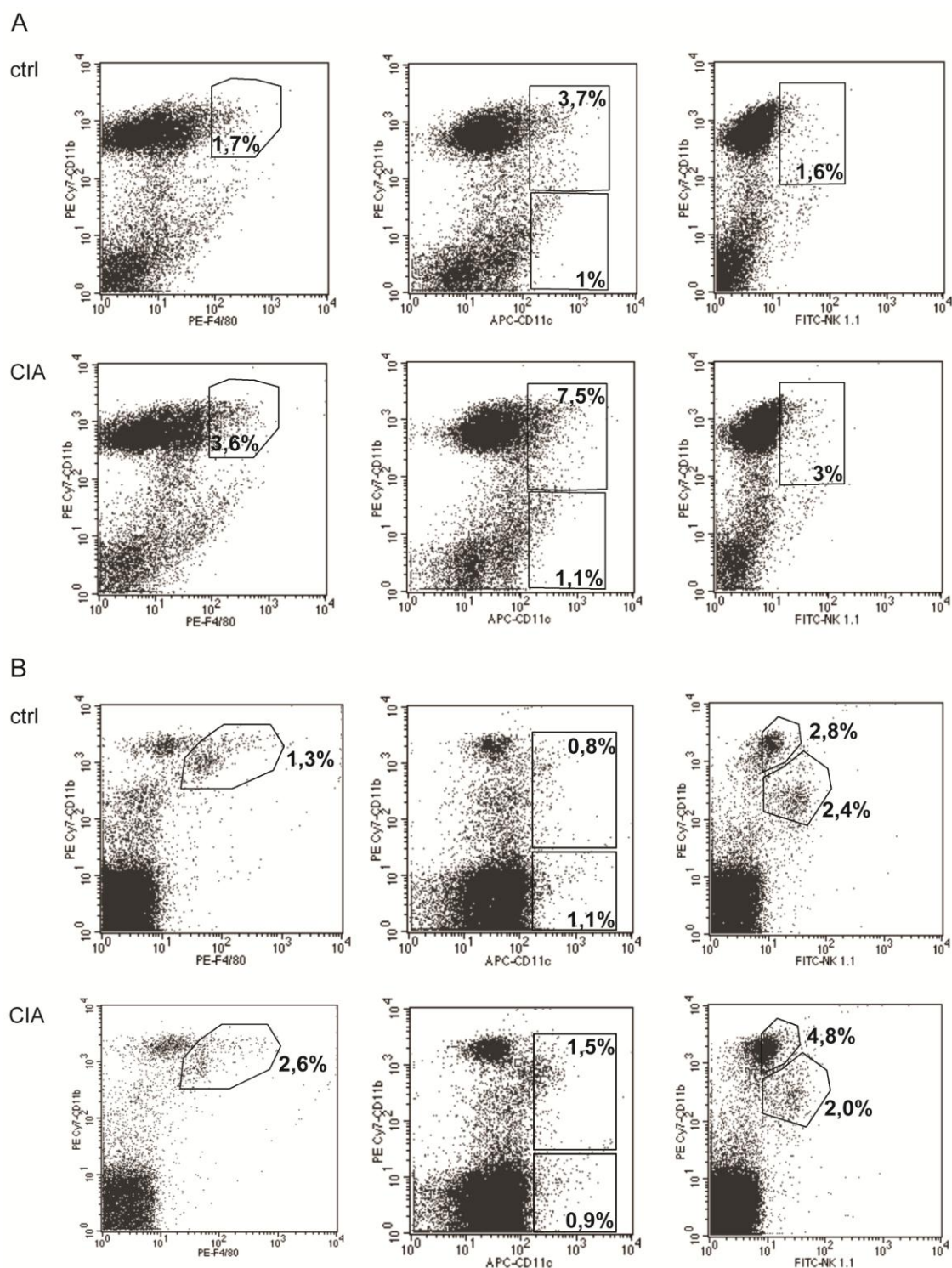


**Slika 34. Izražaj površinskih biljega specifičnih za limfocitne populacije u koštanoj srži i perifernoj krvi u vrlo kasnom artritisu potaknutom kolagenom.** Analiziran je izražaj površinskih biljega za populacije limfocita T i limfocita B u koštanoj srži (**A**) i perifernoj krvi (**B**) kontrolnih miševa (ctrl) i miševa s artritisom potaknutim kolagenom (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*). Analiziran je izražaj površinskih biljega specifičnih za sljedeće populacije: limfociti B (B220<sup>+</sup>), pomagački limfociti T (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) i citotoksični limfociti T (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), uporabom monoklonskih protutijela konjugiranih fluorokromima (fluorescein-izotiocijanat (FITC)-anti-CD3, alofikocijanin (APC)-anti-B220, fikoeritrin-cijanin 7 (PE Cy7)-anti-CD4 i fikoeritrin (PE)-anti-CD8). Analizirano je 100 000 vijabilnih stanica po uzorku i prikazano točkastim grafikonom u programu CellQuest na uređaju FACSCalibur. Prikazan je reprezentativni od tri ponovljena pokusa sa sličnim rezultatima.



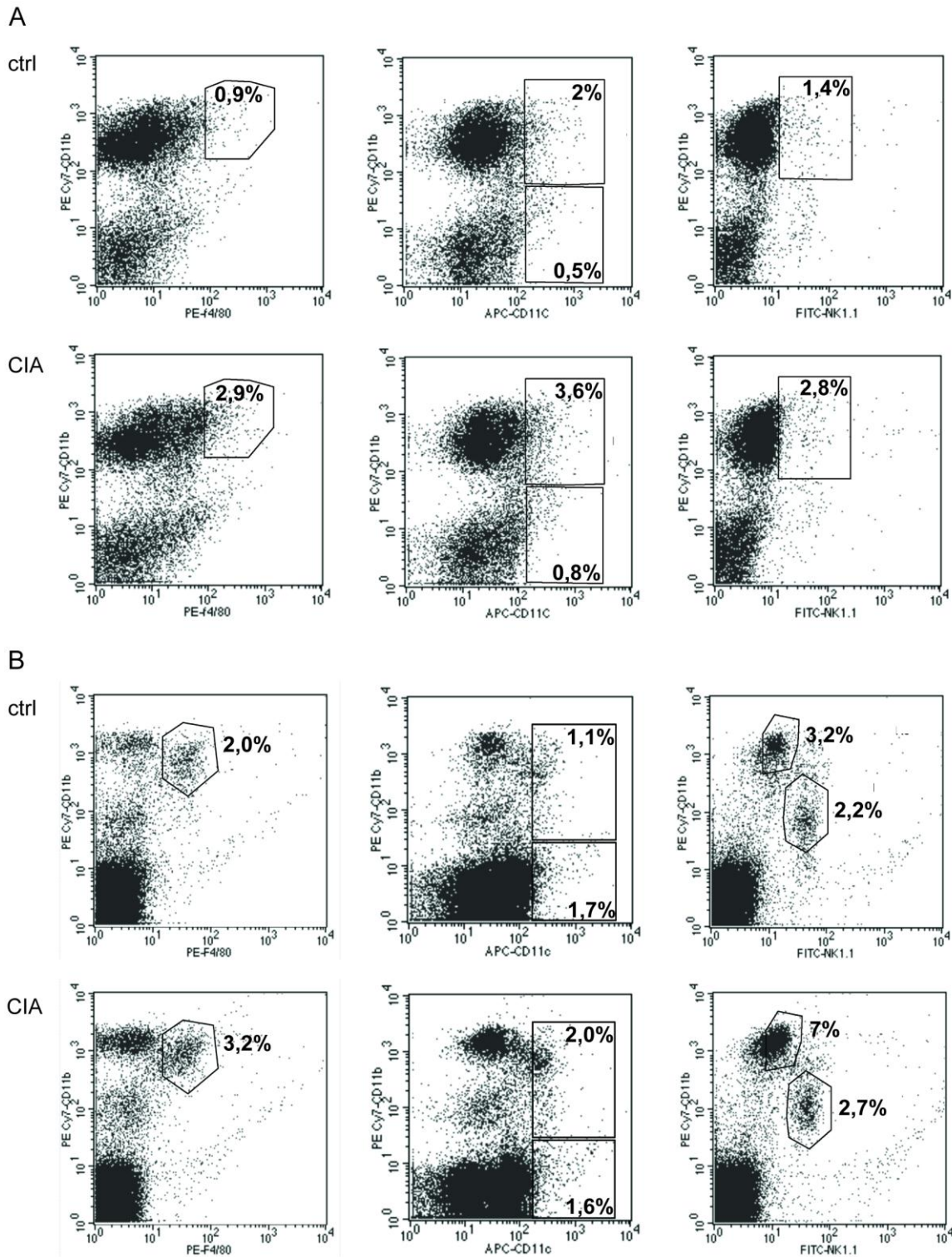


**Slika 35. Izražaj površinskih biljega specifičnih za mijeloidne populacije u koštanoj srži i perifernoj krvi u ranom artritisu potaknutom kolagenom.** Analiziran je izražaj površinskih biljega specifičnih za sljedeće populacije: makrofage ( $CD11b^+F4/80^+$ ), mijeloidne dendritične stanice ( $CD11b^+CD11c^+$ ), limfoidne dendritične stanice ( $CD11b^+CD11c^+$ ) i stanice NK ( $CD11b^+NK1.1^+$ ) u koštanoj srži (**A**) i perifernoj krvi (**B**) kontrolnih miševa (ctrl) i miševa s artritisom potaknutim kolagenom (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*) uporabom monoklonskih protutijela konjugiranih fluorokromima (fikoeritrin (PE)-anti-F4/80, fikoeritrin-cijanin 7 (PE Cy7)-anti-CD11b, alofikocijanin (APC)-anti-CD11c i fluorescein-izotiocijanat (FITC)-anti-NK1.1). Analizirano je 250 000 vijabilnih stanica po uzorku i prikazano točkastim grafikonom u programu CellQuest na uređaju FACSCalibur. Prikazan je reprezentativni od tri ponovljena pokusa sa sličnim rezultatima.



**Slika 36. Izražaj površinskih biljega specifičnih za mijeloidne populacije u koštanoj srži i perifernoj krvi u kasnom artritisu potaknutom kolagenom.** Analiziran je izražaj površinskih biljega specifičnih za sljedeće populacije: makrofage ( $CD11b^+F4/80^+$ ), mijeloidne dendritične stanice ( $CD11b^+CD11c^+$ ), limfoidne dendritične stanice ( $CD11b^+CD11c^+$ ) i stanice NK ( $CD11b^+NK1.1^+$ ) u koštanoj srži (**A**) i perifernoj krvi (**B**) kontrolnih miševa (ctrl) i miševa s artritisom potaknutim kolagenom (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*) uporabom monoklonskih protutijela konjugiranih fluorokromima (fikoeritrin (PE)-anti-F4/80, fikoeritrin-cijanin 7 (PE Cy7)-anti-CD11b, alofikocijanin (APC)-anti-CD11c i fluorescein-izotiocijanat (FITC)-anti-NK1.1). Analizirano je 250 000 vijabilnih stanica po uzorku i prikazano točkastim grafikonom u programu CellQuest na uređaju FACSCalibur. Prikazan je reprezentativni od tri ponovljena pokusa sa sličnim rezultatima.





**Slika 37. Izražaj površinskih biljega specifičnih za mijeloidne populacije u koštanoj srži i perifernoj krvi u vrlo kasnom artritisu potaknutom kolagenom.** Analiziran je izražaj površinskih biljega specifičnih za sljedeće populacije: makrofage ( $CD11b^+F4/80^+$ ), mijeloidne dendritične stanice ( $CD11b^+CD11c^+$ ), limfoidne dendritične stanice ( $CD11b^+CD11c^+$ ) i stanice NK ( $CD11b^+NK1.1^+$ ) u koštanoj srži (**A**) i perifernoj krvi (**B**) kontrolnih miševa (ctrl) i miševa s artritisom potaknutim kolagenom (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*) uporabom monoklonskih protutijela konjugiranih fluorokromima (fikoeritrin (PE)-anti-F4/80, fikoeritrin-cijanin 7 (PE Cy7)-anti-CD11b, alofikocijanin (APC)-anti-CD11c i fluorescein-izotocijanat (FITC)-anti-NK1.1). Analizirano je 250 000 vijabilnih stanica po uzorku i prikazano točkastim grafikonom u programu CellQuest na uređaju FACSCalibur. Prikazan je reprezentativni od tri ponovljena pokusa sa sličnim rezultatima.

#### 5.4.2. Učinak artritisa na izražaj upalnih citokina i kemokina

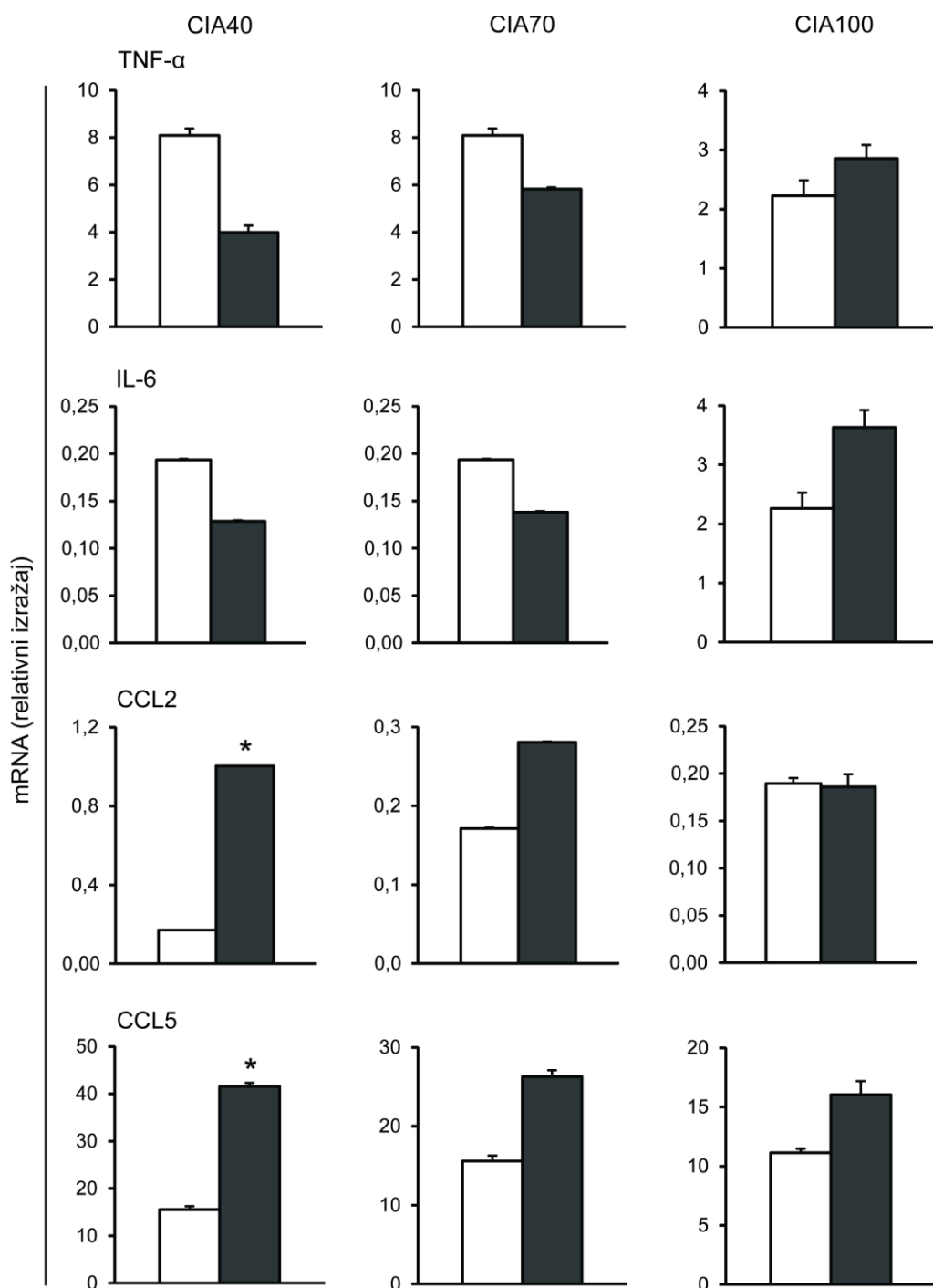
Poznato je da tijekom upale, citokini, lokalni i cirkulirajući, proizvedeni od strane aktiviranih imunskih stanica potiču pojačanu koštanu pregradnju u upalnim bolestima, kao što su reumatoidni artritis i upalne bolesti crijeva (116, 117). Kemokini usmjeravaju migraciju osteoklastnih i osteoplastnih progenitora i sudjeluju u regulaciji koštane homeostaze (164). Stoga smo u sljedećem nizu pokusa utvrdili izražaj odabranih citokina (TNF- $\alpha$  i IL-6) i kemokina (CCL2 i CCL5) u ranom, kasnom i vrlo kasnom artritisu u hematopoetskim tkivima; koštanoj srži, koštanom cilindru, slezeni i perifernoj krvi u kojima smo ranije analizirali diferencijacijski potencijal i aktivnost osteoklasta i osteoplasta. Prilikom analize izražaja gena za reproducibilnu, biološki značajnu razliku odredili smo 100%-tnu ili veću razliku prema kontrolnoj skupini (191).

Izražaj proupalnih citokina i kemokina povećan je u analiziranim tkivima miševa s artritisom u odnosu na kontrolne miševe, posebice u perifernoj krvi.

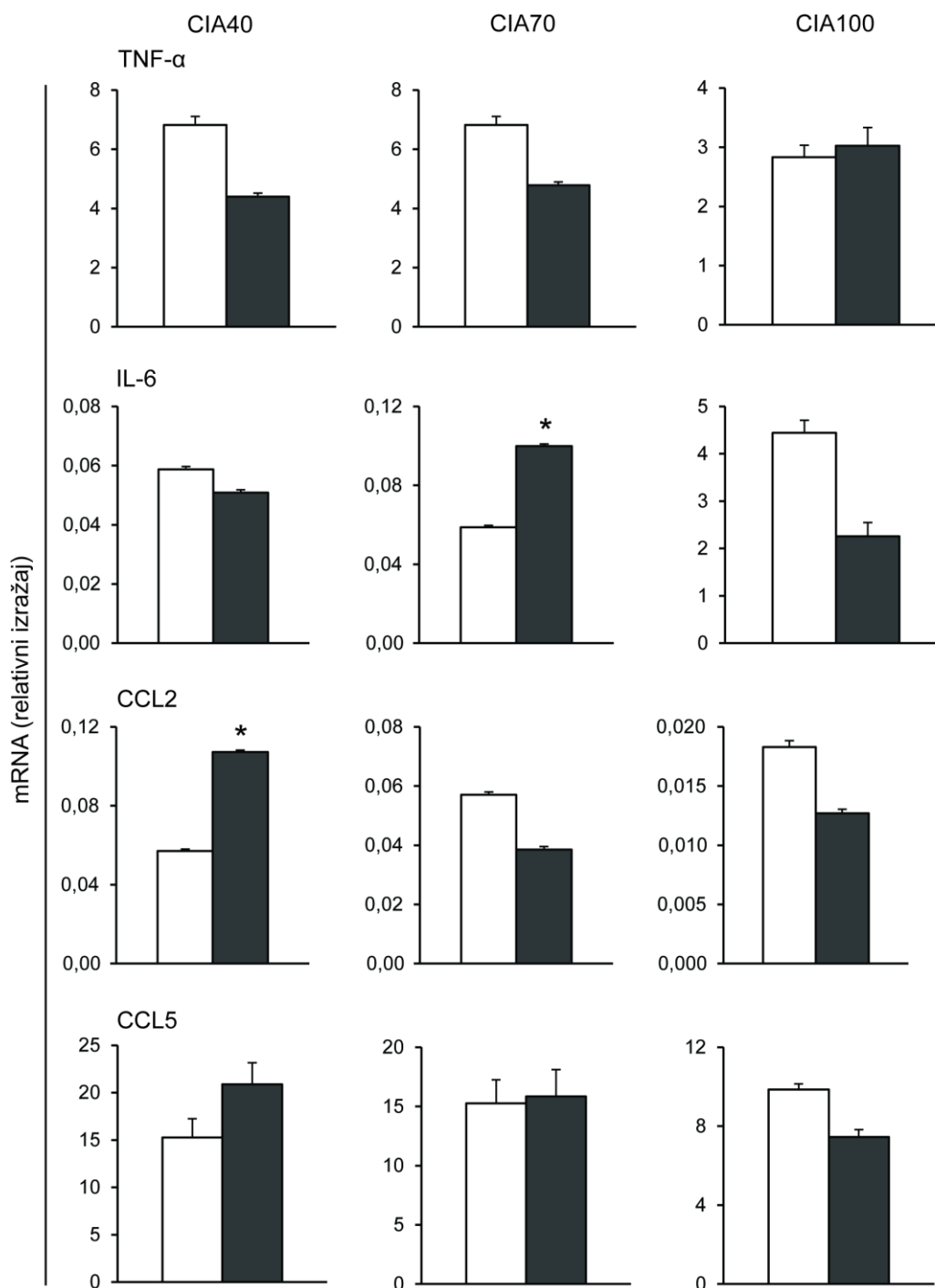
Izražaj gena za TNF- $\alpha$  veći je u miševa s artritisom u slezeni i perifernoj krvi u svim vremenskim točkama artritisa u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 40. i Slika 41.), ali biološki značajnu razliku nalazimo samo u perifernoj krvi miševa s ranim artritisom (Slika 41.). Nadalje, značajno je pojačan i izražaj gena za IL-6 i u stanicama koštanog cilindra u kasnom artritisu (Slika 39.) i u perifernoj krvi u ranom artritisu (Slika 41.) u pokusnih životinja u odnosu na kontrolnu skupinu.

Izražaj gena za CCL2 je biološki značajno veći u svim tkivima miševa s ranim artritisom u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 38., Slika 39., Slika 40. i Slika 41.), a u perifernoj krvi opažamo pojačan izražaj tijekom cijelog praćenja (Slika 41.). Slično, gen za CCL5 je jače izražen u koštanoj srži, slezeni i perifernoj krvi artritčnih miševa u odnosu na kontrolnu skupinu, posebice u ranom i kasnom artritisu (Slika 38., Slika 40. i Slika 41.).

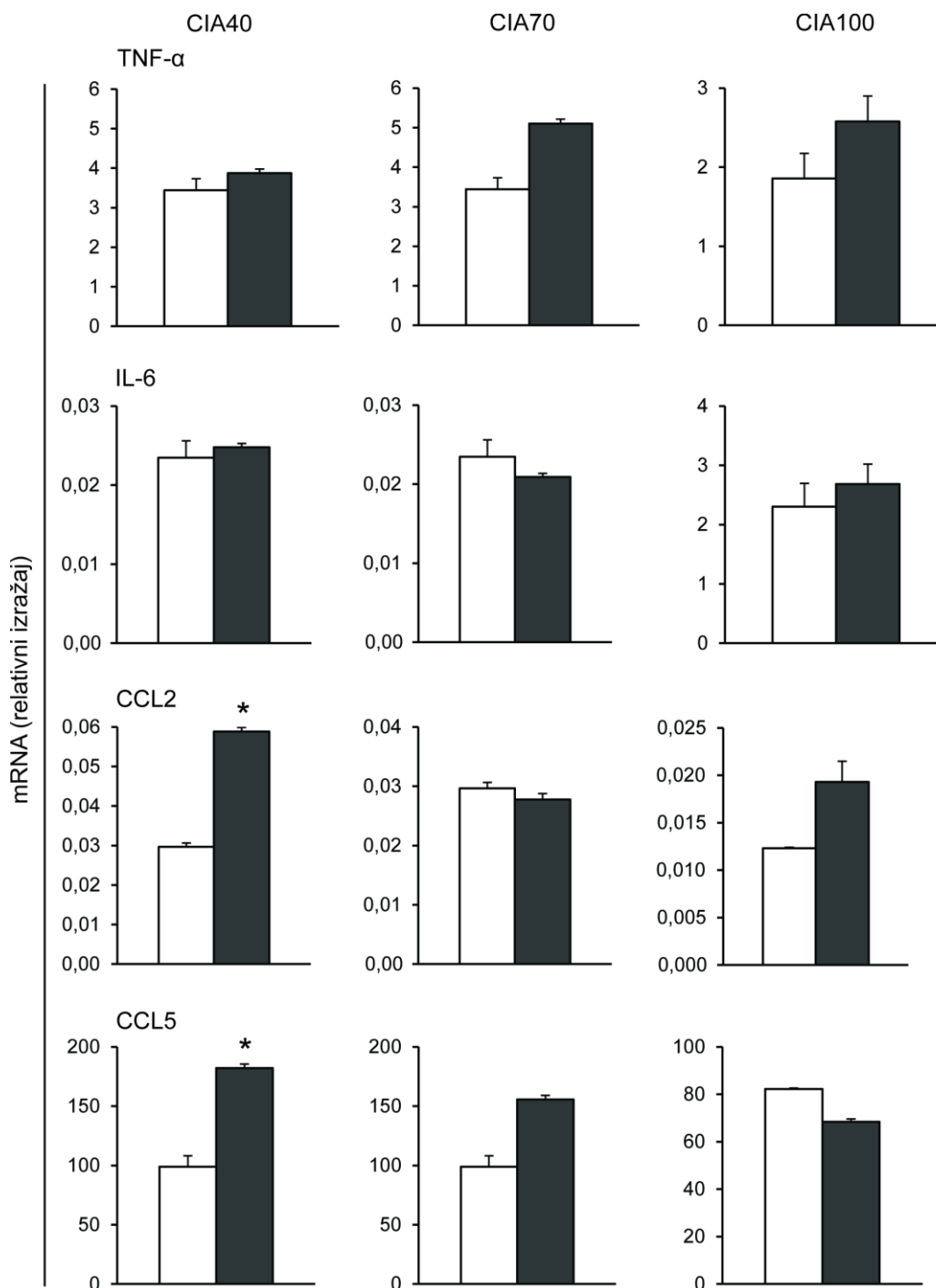




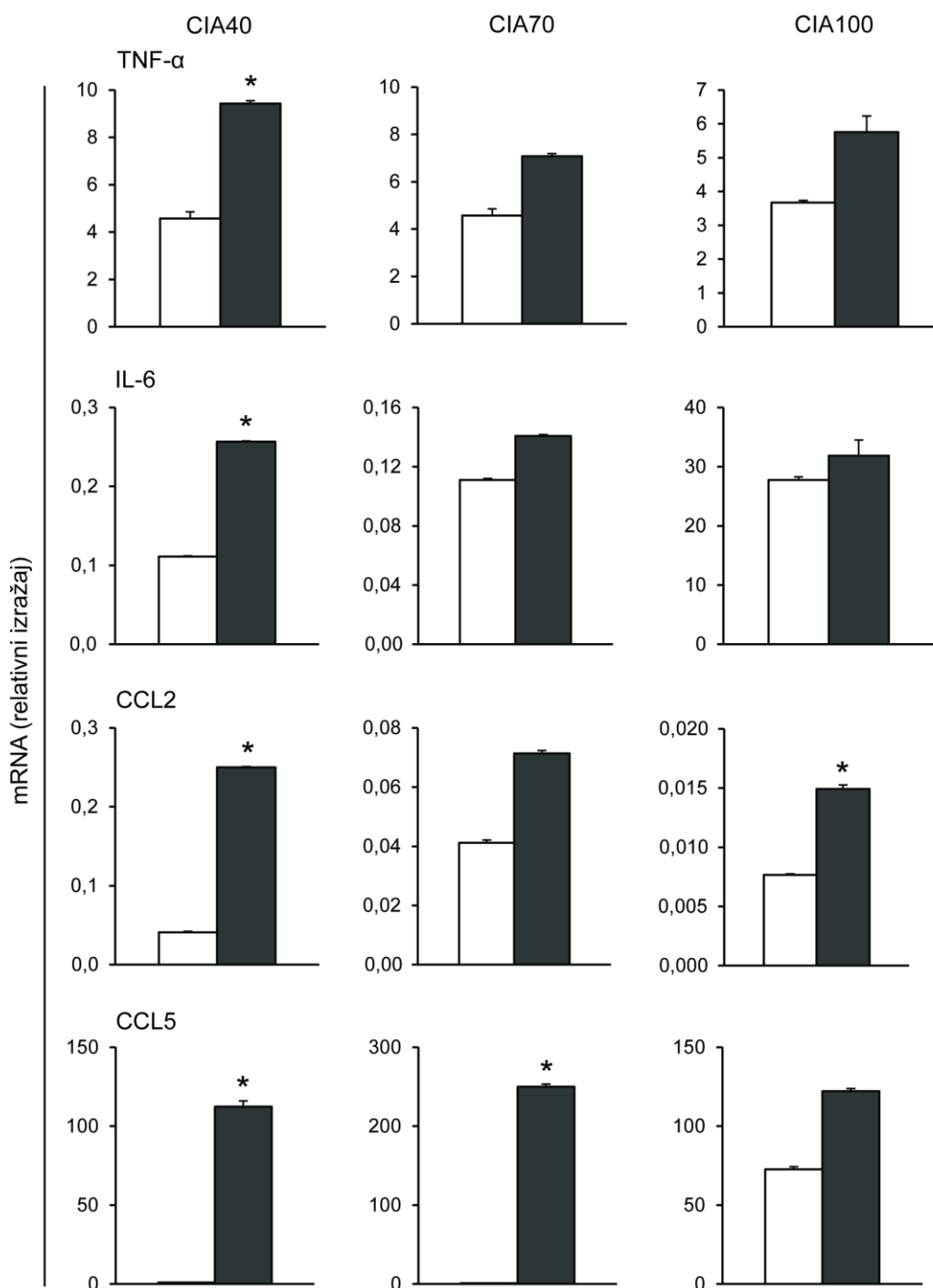
**Slika 38. Izražaj upalnih citokina i kemokina u koštanoj srži miševa s artritisa potaknutim kolagenom.** Analiziran je izražaj gena za interleukin (IL)-6 i čimbenik tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , prema engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) te izražaj gena za kemokine CCL2 i CCL5 u stanicama koštane srži kontrolnih miševa (bijeli stupci) i miševa s ranim (CIA40), kasnim (CIA70) i vrlo kasnim (CIA100) artritisa potaknutim kolagenom (sivi stupci). Vrijednosti izražaja mRNA su dobivene uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju (cDNA iz tkiva) i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za  $\beta$ -aktin („endogena“ kontrola). \*prikazuje biološki značajnu razliku u izražaju ( $\geq 100\%$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu. Prikazan je reprezentativni pokus od tri ponovljena pokusa sa sličnim rezultatima. CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*; artritis potaknut kolagenom.



**Slika 39. Izražaj upalnih citokina i kemokina u koštanom cilindru miševa s artritismom potaknutim kolagenom.** Analiziran je izražaj gena za interleukin (IL)-6 i čimbenik tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , prema engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) te izražaj gena za kemokine CCL2 i CCL5 u stanicama koštanog cilindra kontrolnih miševa (bijeli stupci) i miševa s ranim (CIA40), kasnim (CIA70) i vrlo kasnim (CIA100) artritismom potaknutim kolagenom (sivi stupci). Vrijednosti izražaja mRNA su dobivene uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju (cDNA iz tkiva) i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za  $\beta$ -aktin („endogena“ kontrola). \*prikazuje biološki značajnu razliku u izražaju ( $\geq 100\%$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu. Prikazan je reprezentativni pokus od tri ponovljena pokusa sa sličnim rezultatima. CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*; artritis potaknut kolagenom.



**Slika 40. Izražaj upalnih citokina i kemokina u slezeni miševa s artritism potaknutim kolagenom.** Analiziran je izražaj gena za interleukin (IL)-6 i čimbenik tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , prema engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) te izražaj gena za kemokine CCL2 i CCL5 u stanicama slezene kontrolnih miševa (bijeli stupci) i miševa s ranim (CIA40), kasnim (CIA70) i vrlo kasnim (CIA100) artritism potaknutim kolagenom (sivi stupci). Vrijednosti izražaja mRNA su dobivene uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju (cDNA iz tkiva) i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za  $\beta$ -aktin („endogena“ kontrola). \*prikazuje biološki značajnu razliku u izražaju ( $\geq 100\%$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu. Prikazan je reprezentativni pokus od tri ponovljena pokusa sa sličnim rezultatima. CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*; artritis potaknut kolagenom.



**Slika 41. Izražaj upalnih citokina i kemokina u perifernoj krvi miševa s artritismom potaknutim kolagenom.** Analiziran je izražaj gena za interleukin (IL)-6 i čimbenik tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , prema engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) te izražaj gena za kemokine CCL2 i CCL5 u stanicama periferne krvi kontrolnih miševa (bijeli stupci) i miševa s ranim (CIA40), kasnim (CIA70) i vrlo kasnim (CIA100) artritismom potaknutim kolagenom (sivi stupci). Vrijednosti izražaja mRNA su dobivene uporabom standardne krivulje izražaja ciljnih gena u uzorku za kalibraciju (cDNA iz tkiva) i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za  $\beta$ -aktin („endogena“ kontrola). \*prikazuje biološki značajnu razliku u izražaju ( $\geq 100\%$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu. Prikazan je reprezentativni pokus od tri ponovljena pokusa sa sličnim rezultatima. CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*; artritis potaknut kolagenom.

## 6. RASPRAVA

### 6.1. Artritis uzrokuje pojačanu koštanu pregradnju te lokalni, periartikularni i sustavni gubitak kosti

Poznato je da u bolesnika koji boluju od reumatoidnoga artritisa dolazi do gubitka subhondralne i periartikularne kosti te sustavne osteoporoze, što je posljedica kronične sustavne i lokalne upale. Upala se smatra ključnim faktorom u mehanizmu gubitka kosti jer je koštani metabolizam, posredovanjem proupalnih citokina, poremećen u smislu pojačane koštane razgradnje što za posljedicu ima razvoj osteoporoze (208).

Značajka reumatoidnoga artritisa, ali i drugih imunskih i autoimunih bolesti praćenih poremećajem koštane mase, narušen je međuodnos imunskog i koštanog sustava. Međutim, točni mehanizmi djelovanja imunskih procesa u artritisu na koštane progenitorske stanice nisu potpuno razjašnjeni. Stoga je cilj istraživanja u okviru ove disertacije bio definirati značajke narušenog mikrookoliša kosti i koštane srži, utvrditi dinamiku koštanog metabolizma u lokalnim koštanim lezijama, različitim dijelovima dugih kostiju i kralješcima *in vivo* te diferencijacijski potencijal osteoklastogenetskih i osteoblastogenetskih stanica *ex vivo* na mišjem modelu artritisa potaknutog kolagenom.

Fokalne koštane erozije (marginalne erozije) su značajka reumatoidnoga artritisa, a stanice odgovorne za njihov nastanak su osteoklasti, što je dokazano u više mišjih modela upalnog artritisa i u uzorcima dobivenim od ljudi koji boluju od reumatoidnoga artritisa (97, 209-211). Stoga je u sklopu ovog istraživanja analizirana subhondralna regija metatarzofalangealnih zglobova šape miševa C57BL/6 nakon izazivanja artritisa potaknutog kolagenom, što nije analizirano u dosadašnjim studijama. Rezultati histomorfometrijske analize prvog metatarzofalangealnog zgloba miševa pokazali su značajni gubitak subhondralne kosti u odnosu na kontrolnu skupinu miševa što se podudara s rezultatima analize šapa mikro-kompjutoriziranom tomografijom koje su objavili Chao i sur. (209), u modelu artritisa potaknutom kolagenom u miševa B10.RIII. Do pojačane koštane razgradnje dolazi zbog kroničnog osteitisa i sinovitisa, odnosno kronične lokalne upale i stvaranja proupalnih citokina, primjerice TNF- $\alpha$  (211) i RANKL (209), koji lokalno potiču osteoklastogenezu i/ili suprimiraju osteoblastogenezu (210). Osteitis i promjene koštane srži neposredno ispod zglobne hrskavice, gdje je masno tkivo zamijenjeno upalnim tkivom u kojem dominiraju osteoklasti, makrofagi, plazma-stanice, limfociti T i B (94, 95, 97), mogu se pojaviti i prije

razaranja hrskavice i uspostave komunikacije između subhondralnog prostora i sinovije (96, 212). Štoviše, nekoliko istraživanja je pokazalo da su lezije zbog osteitisa povezane sa strukturalnim oštećenjem zglobova i mogu prethoditi koštanim erozijama u reumatoidnom artritisu (99, 100). Na histološkim preparatima zglobova šape obojenim histokemijskim bojanjem enzima TRAP u području subhondralne kosti miševa s artritisom smo detektirali TRAP-pozitivne osteoklaste, za razliku od kontrole gdje nisu utvrđeni.

Periartikularni gubitak kosti je rani radiološki znak reumatoidnoga artritisa i javlja se prije pojave lokalnih koštanih erozija te tipično zahvaća trabekularnu kost u metafizama uz zglob zahvaćen upalom (104), a sam mehanizam nastanka još uvijek nije u potpunosti razjašnjen (213). Metafizno područje ne nalazi se neposredno uz upaljenu sinoviju, odnosno mjesta najjače upale, pa promjene tog područja ukazuju na učinak artritisa na aktivnost koštanih stanica i izvan zahvaćenih zglobova. Gubitak periartikularne kosti u našem istraživanju procijenjen je u distalnim metafizama bedrenih kostiju. Dosadašnja istraživanja koštane pregradnje u različitim modelima eksperimentalnog artritisa, pa i u artritisu potaknutom kolagenom u štakora i miševa, su pokazala da do gubitka kosti dolazi u jukstaartikularnom području (214-216). U modelu artritisa potaknutog kolagenom u miševa C57BL/6 analizom mikro-kompjutoriziranom tomografijom nalazimo značajnu periartikularnu razgradnju i gubitak trabekularne kosti u području distalnih metafiza bedrenih kostiju. Rezultati pokazuju da s napredovanjem artritisa dolazi do stanjenja, a kasnije i do smanjenja broja koštanih gredica. Prema rezultatima diferencijacijskog potencijala koštanih stanica možemo zaključiti da je gubitak periartikularne kosti posljedica pojačane osteoklastogeneze u upalno promijenjenoj koštanoj srži (213). Pojačana diferencijacija osteoklasta dokazana je i *in vitro* uz pojačanu aktivnost osteoklastnih progenitora. Usporedno je značajno smanjena aktivnost osteoblasta i stvaranje trabekularne kosti periartikularnog područja *in vivo*. Nasuprot tome, diferencijacijski osteoblastogenetski potencijal stanica koštane srži *in vitro* je povećan. Walsh i sur. istraživali su model artritisa K/B3N, prenesenog serumom (koji po svojim značajkama više odgovara spondiloartropatijama), i pokazali da je mineralizacija u području navikularne kosti u artritisu smanjena na mjestima koja se nalaze neposredno uz upalno tkivo u usporedbi s mjestima koja su udaljena od mjesta najjače upalne infiltracije, uz normalnu koštanu srž (210). U tom modelu u području distalnog femura nije bilo promjena u parametrima koštane izgradnje što je protumačeno izostankom upale u koštanoj srži u tom području. Moguće je da je smanjena aktivnost osteoblasta u periartikularnom području u modelu artritisa potaknutog kolagenom, u kojem dolazi do sustavne imunosne reakcije i naglašene mijelopoeze, posljedica djelovanja upalno promijenjene koštane srži i stvaranja proupalnih citokina (primjerice TNF- $\alpha$

i IL-6) (217). Ti citokini koče sazrijevanje i funkciju osteoblasta, zbog čega se ne može kompenzirati pojačana koštana razgradnja osteoklastima te dolazi do gubitka koštane mase. Kočenje Wnt-signalnog puta, ključnog za aktivnost osteoblasta i stvaranje kosti, upalnim citokinima moglo bi biti odgovorno za smanjenje funkcije osteoblasta u mišjim modelima upalnog artritisa, jer je primjena neutralizirajućeg protutijela anti-Dkk1, koji je inhibitor Wnt-signalnog puta, zaštitila miševe od nastanka koštanih erozija (218, 219). U vrlo kasnom artritisu (u kojem je izražaj citokina TNF- $\alpha$  i IL-6, te kemokina CCL2 i CCL5 u koštanoj srži jednak kao u kontrolnoj skupini) nema značajne razlike u strukturnim koštanim parametrima metafiza bedrenih kostiju između pokusnih i kontrolnih životinja. Pretpostavljamo da je uspostavljena ravnoteža između razgradnje i izgradnje kosti *in vivo*, premda je osteoklastogenetski i osteoblastogenetski potencijal koštane srži *in vitro* pojačan i u vrlo kasnom artritisu. Postignuta ravnoteža u koštanoj pregradnji mogla bi biti posljedica smanjenog intenziteta lokalne i sustavne upale, a dokazano je da rezolucija upale potiče funkciju osteoblasta i smanjuje funkciju osteoklasta (220).

Bolesnici koji boluju od reumatoidnoga artritisa imaju visok rizik od razvoja sustavne osteoporoze, uz važnu patogenetsku ulogu upale. Reumatoidni artritis udvostručuje rizik frakture kuka i kralješka bez obzira na primjenu kortikosteroida. Aktivnost bolesti je značajno povezana s niskom mineralnom gustoćom kosti, a dobra kontrola upale protuupalnim lijekovima zaustavlja gubitak koštane mase (76). Hanyu i sur. su u svom istraživanju prvi pokazali, u modelu artritisa potaknutom kolagenom u štakora, da u ranoj fazi artritisa dolazi do gubitka koštanog volumena u slabinskim kralješcima. U kasnijoj fazi artritisa u slabinskim kralješcima je brzina stvaranja kosti značajno veća u odnosu na kontrolnu skupinu (214) što su protumačili rezolucijom upale. Navedene promjene u slabinskoj kralježnici u glodavaca s artritisom potaknutim kolagenom su u ranijem tijeku bolesti sukladne nalazu kod ljudi, dok u kasnijem tijeku bolesti kod glodavaca dolazi do djelomične ili potpune regresije artritisa i ublažavanja upale te se koštana masa normalizira. Nasuprot tome, u većine oboljelih nalazimo kroničnu upalu koja često perzistira u subkliničkom obliku i uz liječenje, te uzorkuje napredovanje koštanih oštećenja.

U našem modelu artritisa analiza mikro-kompjutoriziranom tomografijom je pokazala gubitak koštanog volumena trabekularne kosti u drugom slabinskom kralješku u miševa s artritisom, koji se razvija kasnije od gubitka periartikularnog koštanog tkiva u distalnim metafizama bedrenih kostiju. Kralježnica je znatno udaljenija od mjesta najjače upale unutar zahvaćenih zglobova, ali zbog sustavno povišenih proupalnih citokina i kemokina moguće je da dolazi do migracije osteoklastnih progenitora iz koštane srži u cirkulaciju, što olakšava njihovo daljnje

naseljavanje u koštano tkivo (13). Usporedo je diferencijacija osteoklasta *in vitro* iz stanica koštane srži, slezene i periferne krvi značajno potaknuta u miševa s artritismom. Naša prethodna istraživanja su pokazala da je broj diferenciranih osteoklasta iz mononuklearnih stanica periferne krvi bolesnika oboljelih od reumatoidnoga i psorijatičnoga artritisa značajno veći u odnosu na zdrave kontrole, što je pozitivno koreliralo s vrijednošću sedimentacije eritrocita te proupalnih citokina u serumu oboljelih (rad u postupku objavljivanja). Sukladno s rezultatima Hanyu i sur. (214), u našem modelu artritisa u kralješku L2 miševa s vrlo kasnim artritismom nalazimo povećan volumen trabekularne kosti u odnosu na kontrolu, što tumačimo smanjenjem intenziteta sustavne upale u toj fazi bolesti. Da bi se postigao oporavak lokalnih koštanih erozija i sustavnog gubitka kosti potrebno je zakočiti koštanu razgradnju i potaknuti koštanu izgradnju (221, 222).

## **6.2. Artritis uzrokuje gubitak kosti poticanjem diferencijacije i aktivnosti osteoklasta te smanjenjem aktivnosti osteoblasta**

### **6.2.1. Diferencijacija i aktivnost osteoklasta u artritisu**

U mišjem modelu reumatoidnoga artritisa (CIA) dolazi do pojačane koštane razgradnje, zbog čega je bilo potrebno utvrditi promjene u fenotipu i broju osteoklastnih progenitorskih stanica u mikrokolišu koštane srži, slezene i periferne krvi miševa s artritismom te vidjeti mijenja li artritis diferencijacijski potencijal osteoklastnih progenitorskih stanica u *in vitro* uvjetima.

Razgradnja kosti odvija se pomoću osteoklasta, jedinih stanica koje su sposobne resorbirati koštanu međustaničnu tvar. Djelovanje osteoklasta uključuje nekoliko koraka; migraciju, diferencijaciju i koštanu resorpciju (10). Osteoklastne progenitorske stanice su podrijetlom mononuklearne monocitno/makrofagne hematopoetske stanice koje se fiziološki nalaze u koštanoj srži i cirkulaciji, a potaknute su u bolesnika koji boluju od reumatoidnoga artritisa (10, 11). Dokazano je da se osteoklasti mogu diferencirati *in vitro* iz mijeloidnih progenitora u koštanoj srži, cirkulaciji i slezeni (13, 197).

Jacquin i sur. su u svom istraživanju imunofenotipizirali osteoklastnu progenitorsku staničnu populaciju koštane srži te pokazali da stanice koje imaju sposobnost diferencijacije u zrele osteoklaste *in vitro* imaju fenotip CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11<sup>-/low</sup>CD115<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> i CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11<sup>-/low</sup>CD115<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup> (196, 197). Naši rezultati protočnocitometrijske analize su pokazali da se u miševa s artritismom u koštanoj srži nalazi dvostruko veći udio tih osteoklastnih



progenitorskih stanica u odnosu na kontrolne miševе. Isto tako, hematopoetske stanice koštane srži *in vitro* imaju veći osteoklastogenetski potencijal u miševa s artritismom, a veći broj diferenciranih osteoklasta u kulturi je praćen većom aktivnošću enzima TRAP u staničnim lizatima. Nadalje, osteoklasti diferencirani iz koštane srži miševa s artritismom jače izražavaju specifične osteoklastne gene RANK, CalcR i Cat K u odnosu na kontrolnu skupinu. Staničnim sortiranjem osteoklastnih progenitora iz koštane srži (stanice CD3<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>-/low</sup>CD115<sup>+</sup>) i poticanjem njihove diferencijacije u kulturi smo *in vitro* testirali funkcionalnu aktivnost osteoklastnih progenitora u miševa s artritismom te pokazali da miševi koji su razvili artritis u odnosu na kontrolnu skupinu miševa razvijaju statistički značajno veći broj TRAP-pozitivnih osteoklasta iz sortiranih progenitorskih stanica koštane srži. Navedenim rezultatima smo dokazali da je osteoklastogenetski potencijal koštane srži miševa s artritismom veći u odnosu na zdrave miševе. Moguće je da je koštana srž rezervoar osteoklastnih progenitora koji pod utjecajem kemokinskog gradijenta migriraju iz koštane srži u cirkulaciju, i dalje do koštanog tkiva i mjesta upale (223-225). Osteoklasti odgovorni za koštane erozije subhondralno i periartikularno mogu potjecati izravno iz subhondralne kosti (226, 227). U reumatoidnom artritisu se koštane erozije mogu razvijati i „iznutra prema van“, odnosno iz endostealnog koštanog tkiva prema sinovijalnoj membrani (228). Upala unutar subhondralne kosti može sudjelovati u procesu intraosealne osteoklastogeneze. U reumatoidnom artritisu subhondralna koštana srž sadrži makrofage, plazma-stanice, limfocite T i B (9, 223). S tim u skladu su rezultati magnetske rezonancije u bolesnika oboljelih od reumatoidnoga artritisa koji pokazuju da edem koštane srži bolje predviđa razvoj koštanih erozija od sinovitisa, a da sam edem korelira s prisutnošću osteoklasta na istim mjestima (99, 229). Nedavno su Binder i sur. dokazali da anti-TNF- $\alpha$  terapija značajno reducira broj subhondralnih koštanih erozija u miševa s artritismom što je posljedica smanjenog broja CD115-pozitivnih osteoklastnih progenitora u koštanoj srži, slezeni i perifernoj krvi, a bez usporednog učinka na sinovitis i smanjenje upale unutar zglobne šupljine (230). U oboljelih od reumatoidnoga artritisa anti-TNF- $\alpha$  terapija može značajno smanjiti broj koštanih erozija, bez utjecaja na kliničke znakove i simptome upale (231, 232). Sve navedeno govori u prilog zaključku da osteoklasti odgovorni za gubitak periartikularne i subhondralne kosti ne moraju primarno potjecati iz unutarzglobne šupljine, nego izravno iz upalno promijenjene koštane srži u blizini zgloba (208).

Mononuklearne stanice periferne krvi bolesnika oboljelih od reumatoidnoga artritisa imaju sposobnost diferencijacije u zrele osteoklaste *in vitro* dodatkom čimbenika RANKL i M-CSF, s tim da se iz mononuklearnih stanica periferne krvi oboljelih od reumatoidnoga artritisa

diferencira značajno veći broj osteoklasta u usporedbi s kontrolnom skupinom zdravih ljudi (rad u postupku objavljivanja) (233, 234). Li i sur. su u mišjem modelu upalnog artritisa u perifernoj krvi i slezeni dokazali povećan broj osteoklastnih progenitora uslijed migracije progenitora iz koštane srži, koji pripadaju populaciji  $CD11b^+CD115^+$  ili  $CD11b^+CD115^-$  (235). Druga istraživačka skupina dokazala je povećan udio stanica  $CD11b^+CD115^+Gr-1^{low}$  u perifernoj krvi miševa s artritismom te pojačanu diferencijaciju hematopoetskih stanica slezene prema osteoklastnoj lozi (230). Na osnovu istraživanja Jacome-Galarza i sur. (197) smo imunofenotipizirali osteoklastne progenitore periferne krvi i slezene u miševa s artritismom potaknutim kolagenom i definirali ih kao populaciju fenotipa  $CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^+CD115^+Gr-1^+$ . Miševi s artritismom imaju dvostruko više osteoklastnih progenitorskih stanica u perifernoj krvi tijekom svih faza artritisa, a četverostruko više u slezeni u ranom artritismu. Isto tako, hematopoetske stanice slezene i periferne krvi *in vitro* imaju značajno veći osteoklastogenetski potencijal, a veći broj osteoklasta u kulturi je praćen većom aktivnošću enzima TRAP u staničnim lizatima. Nadalje, osteoklasti diferencirani iz stanica slezene i periferne krvi miševa s ranim i kasnim artritismom jače izražavaju specifične osteoklastne gene RANK, cFms, CalcR i CatK u odnosu na kontrolu. Da bi *in vitro* testirali funkcionalnu aktivnost osteoklastnih progenitora u miševa s artritismom sortirali smo osteoklastne progenitore iz slezene (stanice  $CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^+CD115^+$ ) i diferencirali ih u kulturi. Time smo pokazali da miševi koji su razvili artritis u odnosu na kontrolnu skupinu miševa razvijaju statistički značajno veći broj TRAP-pozitivnih osteoklasta iz sortiranih progenitorskih stanica slezene. Poznato je da se u stanju homeostaze zrele stanice imunskog sustava otpuštaju iz koštane srži, odnosno prostora niše matičnih stanica (236), u cirkulaciju, dok se vrlo mali broj nezrelih progenitora i matičnih stanica fiziološki otpušta u cirkulaciju (237, 238). Međutim, u reumatoidnom artritismu i drugim imunskim bolestima povezanim s gubitkom kosti dolazi do pojačane migracije osteoklastnih progenitora u cirkulaciju (239).

### **6.2.2. Diferencijacija i aktivnost osteoblasta u artritismu**

Pokazali smo da u artritismu potaknutom kolagenom dolazi do smanjene brzine koštane mineralizacije i statistički značajno smanjene brzine stvaranja kosti na ukupnoj koštanoj površini u miševa s ranim artritismom u odnosu na kontrolnu skupinu. Nadalje smo utvrdili promjene u fenotipu i broju osteoblastnih progenitorskih stanica u mikrookolišu koštane srži i

koštanog cilindra miševa s artritismom te istražili mijenja li artritis diferencijacijski potencijal osteoblastnih progenitorskih stanica u *in vitro* uvjetima.

Osteoblasti su stanice koje izgrađuju kost, a sudjeluju i u regulaciji osteoklastne diferencijacije proizvodnjom čimbenika RANKL i OPG. Diferencijacijski proces osteoblasta možemo podijeliti u stadij mezenhimnih progenitora, preosteoblasta i osteoblasta, iako razlikovanje pojedinih stadija još uvijek nije dobro razjašnjeno, a stadij preosteoblasta obuhvaća dosta heterogenu populaciju stanica između stadija osteoblastnih progenitora i zrelih osteoblasta. Važno je naglasiti da tijekom sazrijevanja prema zrelim stanicama koje odlažu kost, osteoblasti smanjuju izražaj čimbenika RANKL i povećavaju izražaj čimbenika OPG, stvarajući mikrokoliš koji koči koštanu razgradnju i pogoduje povećanju koštane mase (106).

Nakamura i sur. (206) su u svom istraživanju imunofenotipizirali osteoblastnu progenitorsku staničnu populaciju koštane srži te pokazali da populacija stanica koja ima sposobnost diferencijacije u osteoblaste *in vitro* ima fenotip CD45<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD166<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>. Ta populacija sadrži osteoblastne progenitore, dok se zrelije stanice osteoblastne loze, koje izražavaju enzim AP, nalaze unutar populacije Sca-1<sup>-</sup>. Naši rezultati protočnociometrijske analize su pokazali da koštana srž miševa s artritismom sadrži oko četiri puta veći udio stanica CD45<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD166<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup> i dvostruko veći udio stanica CD45<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD166<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>, što upućuje na zaključak da je populacija mezenhimnih osteoblastnih progenitora i zrelijih osteoblastnih stanica značajno ekspanzirana u artritisu. Isto tako, mezenhimne stanice koštane srži *in vitro* imaju veći diferencijacijski potencijal u osteoblastogenetskim kulturama te jače izražavaju enzim AP i specifične osteoblastne gene *Osx*, *AP*, *BSP* i *OC* u odnosu na kontrolnu skupinu. Navedenim rezultatima smo pokazali da je diferencijacijski potencijal koštane srži miševa s artritismom veći u odnosu na zdrave miševe. Pretpostavljamo da je u našem modelu artritisa koštana razgradnja, potaknuta upalom, stvorila uvjete za pojačanu osteoblastogenezu jer se razlaganjem koštane međustanične tvari oslobađaju prethodno vezani faktori rasta poput IGF-I, TGF- $\beta$ , FGF i BMP, koji potiču proliferaciju i diferencijaciju mezenhimnih matičnih stanica prema osteoblastima (73). Također, molekule izlučene od strane osteoklasta kao što su S1P, HGF i PDGFBB uzrokuju novačenje osteoblastnih prethodnika i njihovu diferencijaciju (73). Na taj način pojačana osteoklastogeneza i razgradnja kosti tijekom upalnog procesa susljedno uzorkuje pojačanu osteoblastogenezu.

Međutim, naši rezultati su pokazali da unatoč većem broju osteoblastnih progenitora i pojačanoj osteoblastogenezi *in vitro*, dolazi do smanjenog stvaranja kosti *in vivo* u miševa s

artritisom. U bolesnika koji boluju od reumatoidnoga artritisa iznimno rijetko dolazi do reparacije koštanih erozija i to samo u slučaju remisije bolesti uz primjenu lijekova koji modificiraju tijek bolesti (uključujući i biološke lijekove) i ublažavaju upalu (222, 240). U reumatoidnom artritisu razjašnjen je mehanizam učinka upale na aktivnost osteoblasta i koštanu izgradnju otkrićem uloge Wnt-signalnog puta u kontroli diferencijacije i funkcije osteoblasta. Diarra i sur. su pokazali da se tijekom upale u bolesnika oboljelih od reumatoidnoga artritisa pod utjecajem citokina, kao što je TNF- $\alpha$ , u sinoviji proizvode obilne količine molekule Dkk1, inhibitora Wnt-signalnog puta. Dkk1 je povišen u serumu bolesnika oboljelih od reumatoidnoga artritisa i korelira s aktivnošću bolesti. Upotreba anti-TNF- $\alpha$  lijekova smanjuje razinu molekule Dkk1 u serumu (219). Nadalje, u mišjem modelu reumatoidnoga artritisa je otkriveno da blokada anti-Dkk1 protutijelom dovodi do poboljšanja koštane izgradnje i inhibicije koštane razgradnje. To je objašnjeno činjenicom da Dkk1 djeluje na diferencijaciju osteoblasta kočenjem diferencijacije preosteoblasta u osteoblaste i supresijom osteoblastne aktivnosti stvaranja kosti. Nadalje, preosteoblasti stvaraju veću količinu čimbenika RANKL koji potiče diferencijaciju osteoklasta i koštanu razgradnju, a smanjenu količinu čimbenika OPG, inhibitora RANKL-a, kojeg proizvode zreli osteoblasti (210, 241, 242). Kočenje diferencijacije preosteoblasta i kočenje stvaranja kosti onemogućava odlaganje mineralizirane koštane međustanične tvari. TNF- $\alpha$  u reumatoidnom artritisu također potiče osteocitnu proizvodnju sklerostina koji blokira diferencijaciju osteoblastnih progenitora u osteoblaste (243). Novije istraživanje koje su proveli Chen i sur. (244) je pokazalo da inhibicija sklerostina zaustavlja periartikularni i sustavni gubitak kosti te potiče reparaciju koštanih erozija, ali bez učinka na otok zglobova i sinovitis, pogotovo u kombinaciji s inhibicijom citokina TNF- $\alpha$  (245, 246). Na osnovu tih otkrića i rezultata našeg istraživanja zaključujemo da upalni proces u artritisu potaknutom kolagenom pojačava koštanu razgradnju koja susljedno aktivira osteoblastne progenitore u koštanoj srži. Međutim, upalni medijatori, moguće putem molekula Dkk1 i sklerostina, koče diferencijaciju preosteoblasta u osteoblaste i stvaranje koštanog tkiva (245).

### **6.3. Artritis potaknut kolagenom stvara osteoresorptivni okoliš poticanjem mijelopoeze i mijenjanjem izražaja upalnih citokina i kemokina**

#### **6.3.1. Učinak artritisa na stanične populacije hematopoetskih tkiva koštanog okoliša i periferije**

Artritis potaknut kolagenom uzrokuje promjene u broju i udjelima hematopoetskih staničnih populacija. Dolazi i do promjena u limfoidnim organima; zapaženo je povećanje slezene i poremećaj njezine arhitekture zbog pojačane mijelopoeze koja rezultira ekspanzijom nezrelih CD11b<sup>+</sup> mijeloidnih stanica. Patogenetski mehanizmi tog modela artritisa uključuju kombinaciju autoinflamatornog i autoimunog odgovora. Navedene promjene se pripisuju učinku CFA, odnosno emulziji ulja i mikobakterija, koji djeluje kao signal opasnosti uzrokujući mijeloidnu ekspanziju i produkciju citokina, a zglobovi i druga tkiva su infiltrirani neutrofilima i monocitno/makrofagnim stanicama, uključujući osteoklastne progenitore. To dovodi do oštećenja zglobova i izlaganja zglobnih specifičnih antigena, primjerice CII, već stvorenim protutijelima anti-CII. Predočne stanice prerađuju unešeni ksenogenični CII, aktiviraju imunološki odgovor limfocita T i B, čime se stvaraju protutijela anti-CII koja dalje pojačavaju artritis (185).

Protočnometrijskom analizom hematopoetskih tkiva (koštane srži, koštanog cilindra, slezene i periferne krvi) je utvrđeno da koštana srž i periferna krv miševa s artritismom sadrži veći udio makrofaga (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>), mijeloidnih DC (CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) i stanica NK (CD11b<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>) u odnosu na kontrolnu skupinu. Mijeloidne populacije uslijed upale pojačano proliferiraju iz progenitora u koštanoj srži, a zatim migriraju u periferiju na mjesta tkivnih oštećenja (247). Monocitno/makrofagne stanice imaju važnu ulogu u patofiziologiji reumatoidnoga artritisa jer infiltriraju mjesta upale (zglob) i proizvode proupalne citokine (primjerice TNF- $\alpha$ ) (248, 249). Deplecija monocita pomoću specifičnih protutijela sprječava njihovo nakupljanje u panusu i ublažava upalu u artritisu potaknutom kolagenom u DBA/1 miševa (250). Osim što imaju značajan učinak na razvoj upale, monocitno/makrofagne stanice sadrže populaciju osteoklastnih progenitora koja se diferencira pomoću čimbenika RANKL i M-CSF u osteoklaste, uzrokujući koštanu resorpciju u reumatoidnom artritisu. Sinovijalna tekućina u reumatoidnom artritisu sadrži veći broj mijeloidnih DC, gdje one migriraju privučene gradijentom lokalno proizvedenih citokina i kemokina ili se diferenciraju lokalno u zglobu iz mijeloidnih progenitora pomoću faktora rasta sadržanih u sinovijalnoj tekućini

(251). Same DC doprinose upali proizvodnjom proupalnih citokina IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$  (251). Nadalje, DC se mogu diferencirati u osteoklaste, s tim da osteoklasti diferencirani iz DC proizvode više proupalnih citokina, a osteoklasti diferencirani iz monocitnih stanica više protuupalnih citokina (252). U ljudi i miševa manje je poznata uloga NK- stanica u patogenezi artritisa. Zna se da naseljavaju mjesta upale kao što je sinovijalna tekućina, proizvode neke kemokine, uključujući CCL3, CCL4 i CCL5 te potiču sazrijevanje monocita u DC (253). Osim mijeloidne loze, opažene su značajne razlike i u populacijama limfocita T i B. Imunogenetička istraživanja reumatoidnoga artritisa upućuju na ključnu ulogu aberantnih puteva aktivacije limfocita T u inicijaciji i daljnjem poticanju bolesti, a najjači dokaz koji podržava ulogu CD4<sup>+</sup> limfocita T u patogenezi bolesti je povezanost između reumatoidnoga artritisa i HLA-DRB1 (254). U perifernoj krvi artritčnih miševa dolazi do smanjenja udjela populacije limfocita T (CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>) što je vjerojatno posljedica migracije limfocita T na mjesta zglobne upale gdje stvaraju upalne infiltrate (folikularne strukture) koji imaju ulogu u suradnji limfocita T i B u lokalnoj proizvodnji specifičnih protutijela (254). Paralelno smo našli da je u kasnom artritisu, kada je zabilježena i najveća razina anti-CII protutijela, povećan udio populacije limfocita B (B220<sup>+</sup>) koji doprinose patološkom imunom odgovoru osim proizvodnjom protutijela i sekrecijom citokina, kostimulacijom limfocita T i predočavanjem antigena (255).

### **6.3.2. Učinak artritisa na izražaj upalnih citokina i kemokina**

Promjene u broju i tkivnoj raspodjeli pojedinih imunskih staničnih loza, uključujući i osteoklastne progenitore, posljedica je promjena u diferencijaciji i migraciji pojedinih populacija. Kemokinski signali imaju važnu ulogu u regulaciji migracije progenitorskih i zrelih imunskih stanica (165). Kemokini se proizvode najviše u perifernim tkivima na mjestima upale i imaju značajnu ulogu u patogenezi upale; novače neutrofile, monocite, nezrele DC, limfocite T i B te stanice NK u upaljeni zglob. Osteoklasti i osteoblasti također mogu proizvoditi kemokine i izražavati kemokinske receptore te tako djelovati na koštani okoliš i stanice imunskog sustava.

Analiza kemokina CCL2 i CCL5 u našem modelu je pokazala njihov pojačan genski izražaj u koštanoj srži, koštanom cilindru, slezeni i perifernoj krvi u miševa s artritisom. CCL2 proizvode makrofagi, endotelne stanice, sinovijalni fibroblasti i hondrociti u upaljenim zglobovima bolesnika oboljelih od reumatoidnoga artritisa. Prethodna istraživanja također su

pokazala povišene razine kemokina CCL2 u sinovijalnoj tekućini i serumu oboljelih od reumatoidnoga artritisa (164). Naše istraživanje (neobjavljeni rezultati) je pokazalo da bolesnici oboljeli od reumatoidnoga artritisa imaju povišenu razinu CCL2 u serumu, koja korelira s brojem osteoklasta diferenciranih iz mononuklearnih stanica periferne krvi. Isto tako smo našli pozitivnu korelaciju između izražaja CCL2 u osteoklastima diferenciranim iz mononuklearnih stanica sinovijalne tekućine i broja diferenciranih osteoklasta. Kim i sur. pretpostavljaju da osteoklasti stimulirani RANKL-om šalju kemokinske signale da bi privukli osteoklastne progenitore na mjesta pojačanog izražaja RANKL-signala, što rezultira fuzijom mononuklearnih stanica u multinuklearne osteoklaste (256).

Ranija istraživanja pokazuju da je kemokin CCL5 uključen u patogenezu reumatoidnoga artritisa; potiče novačenje osteoklastnih progenitora na mjesta upale, a sami osteoklasti imaju sposobnost lučenja CCL5 čime potiču osteoblastnu kemotaksiju pojačavajući izražaj kemokinskih receptora i migraciju stanica na mjesta koštane razgradnje (170). Yu i sur. su pokazali *in vitro* da preosteoklasti u koštanoj srži izražavaju CC-kemokinski receptor 1 (CCR1) te da osteoblasti koji proizvode kemokine CCL2, CCL5 i CCL7 potiču kemotaksiju preosteoklasta, stimuliraju fuziju osteoklastnih prekursora u veće multinuklearne osteoklaste te pojačavaju pokretljivost i migracijska svojstva zrelih osteoklasta (257).

U našoj studiji izražaj TNF- $\alpha$  povećan je u slezeni i perifernoj krvi miševa s artritismom, a IL-6 u perifernoj krvi i koštanom cilindru. TNF- $\alpha$  proizvode imunosne stanice, osteoblasti i osteoklasti (121), a veže se za receptore koji se nalaze na osteoklastnim prethodnicima i zrelim osteoklastima te pojačava diferencijaciju i aktivnost osteoklasta (122). Nadalje, ovaj proupalni citokin snažno potiče izražaj molekule Dkk1, čime pozitivno djeluje na osteoklastogenezu povećavajući omjer RANKL/OPG (125). S druge strane, TNF- $\alpha$  djeluje i na osteoblaste inhibicijom njihove diferencijacije i sazrijevanja, uz zapaženo smanjenje izražaja AP i OC (131-132). *In vitro*, dodatak TNF- $\alpha$  u pre-osteoblastne stanične kulture smanjuje izražaj ključnog transkripcijskog faktora osteoblasta Runx2 (133), te, također, uzorkuje apoptozu pre-osteoblastnih staničnih linija (46). Prekomjeren izražaj IL-6, koji se nalazi u serumu i sinovijalnoj tekućini oboljelih od reumatoidnog artritisa, je povezan s pojačanim gubitkom kosti i povećanim brojem osteoklasta (143). *In vitro*, IL-6 potiče otpuštanje RANKL-a od strane osteoblasta (144), a novije studije su pokazale smanjenu *in vitro* i *in vivo* diferencijaciju osteoklasta blokadom receptora za IL-6 (145).

U okviru ove disertacije analizirali smo izražaj nekoliko proupalnih molekula važnih u regulaciji koštane pregradnje. U nastavku istraživanja analizirat ćemo detaljnije obrazac lučenja proupalnih medijatora, njihovo stanično podrijetlo i tkivnu distribuciju, kako bi

detaljno razjasnili međudjelovanje imunskih i koštanih staničnih loza te mehanizme koštane razgradnje tijekom upalnih bolesti zglobova.



## 7. ZAKLJUČCI

1. Analiza dinamike koštanog metabolizma u lokalnim koštanim lezijama, dugim kostima i kralješcima *in vivo* u artritisu potaknutom kolagenom pokazala je poremećaj koštane pregradnje, u kojem preteže koštana razgradnja, što susljedno izaziva gubitak koštane mase. Navedene promjene potvrđuju da je istraživani model prikladan za proučavanje promjena koštanog metabolizma i gubitka kosti, te nalikuje koštanim poremećajima u bolesnika oboljelih od reumatoidnoga artritisa.

2. U artritisu potaknutom kolagenom dolazi do gubitka subhondralne i periartikularne kosti uslijed lokalne upale (osteitisa i sinovitisa), koja narušava lokalnu ravnotežu između koštane razgradnje osteoklastima i koštane izgradnje osteoblastima.

3. U artritisu potaknutom kolagenom dolazi do sustavnog gubitka kosti tj. do gubitka volumena trabekularne kosti u slabinskoj kralježnici. To je posljedica sustavne upale i djelovanja oslobođenih proupalnih citokina i kemokina koji potiču migraciju osteoklastnih progenitorskih stanica iz koštane srži u cirkulaciju, te njihovo naseljavanje u koštano tkivo i susljednu razgradnju kosti.

4. Protočnometrijska analiza osteoklastnih progenitorskih stanica koštane srži, koštanog cilindra, slezene i periferne krvi pokazuje da miševi s artritisom potaknutim kolagenom imaju više progenitorskih stanica u odnosu na kontrolne miševe. Osteoklastna progenitorska populacija u koštanoj srži i koštanom cilindru se nalazi podjednako u subpopulacijama fenotipa  $CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^{-/low}CD115^+CD117^+$  i  $CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^{-/low}CD115^+CD117^-$ , a u slezeni i perifernoj krvi u subpopulaciji fenotipa  $CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^+CD115^+Gr-1^+$ .

5. Hematopoetske stanice koštane srži, koštanog cilindra, slezene i periferne krvi miševa s artritisom imaju pojačan osteoklastogenetski potencijal *in vitro* u odnosu na kontrolnu skupinu. Veći broj diferenciranih osteoklasta praćen je većom aktivnošću enzima TRAP u staničnim lizatima, a diferencirani osteoklasti jače izražavaju specifične osteoklastne gene RANK, CalcR i Cat K. Pretpostavljamo da kronični imunosni podražaj uzrokuje povećanje frekvencije i aktivnosti osteoklastnih progenitora u koštanoj srži i cirkulaciji.

6. Protočnometrijska analiza osteoblastnih progenitorskih stanica koštane srži pokazuje da miševi s artritism potaknutim kolagenom imaju više mezenhimnih progenitorskih stanica i zrelijih stanica osteoblastne loze u odnosu na kontrolne miševe. Mezenhimna progenitorska populacija u koštanoj srži se nalazi u subpopulaciji fenotipa CD45<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>CD166<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>, a zrelije osteoprogenitorske stanice u subpopulaciji fenotipa CD45<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>CD166<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>.

7. Osteoblastogenetski potencijal mezenhimnih stanica koštane srži povećan je *in vitro* u miševa s artritism u odnosu na kontrolnu skupinu. Veći broj osteoblasta u kulturi je praćen većom aktivnošću enzima AP u staničnim lizatima, a osteoblasti diferencirani iz kulture koštane srži miševa s artritism jače izražavaju specifične osteoblastne gene *Osx*, *AP*, *BSP* i *OC*. Pretpostavljamo da se pojačana osteoblastogeneza razvija sekundarno, kao posljedica pojačane razgradnje koštanog matriksa i oslobađanja faktora koji potiču osteoblastnu proliferaciju i diferencijaciju.

8. Dinamička histomorfometrija upućuje da je u miševa s artritism potaknutim kolagenom aktivnost osteoblasta *in vivo* smanjena uslijed upale. To dovodi do smanjenog stvaranja mineralizirane koštane međustanične tvari i posljedičnog smanjenja koštane mase, unatoč većem broju osteoblastnih progenitora u koštanoj srži i pojačanoj diferencijaciji prema osteoblastnoj lozi *in vitro*.

9. U artritismu potaknutom kolagenom dolazi do promjena u staničnim lozama koštane srži. Posebice je važno povećavanje udjela populacija mijeloidne loze; makrofaga, mijeloidnih DC i stanica NK. Pojačana mijelopoieza povezana je s većim osteoklastogenetskim potencijalom jer se osteoklasti mogu diferencirati iz monocitno/makrofagnih i DC, a same imunosne stanice (makrofagi, DC i stanice NK) imaju sposobnost lučenja proupalnih citokina i kemokina čime se stvara pro-osteoklastogenetski okoliš.

10. U perifernoj krvi miševa s artritism dolazi do prolaznog povećanja udjela populacije limfocita B, što bi moglo biti povezano s pojačanom proizvodnjom anti-kolagenskih protutijela. Usporedo dolazi do smanjenja udjela populacije limfocita T, za koje pretpostavljamo da naseljavaju zahvaćene zglobove ili se prolazno zadržavaju u perifernim limfnim tkivima.

11. Upalni okoliš u artritisu potaknutom kolagenom djeluje na stanice koštanog i imunskog sustava. Pojačana proizvodnja proupalnih citokina (TNF- $\alpha$  i IL-6) i kemokina (CCL2 i CCL5) vjerojatno potiče migraciju osteoklastnih progenitora iz koštane srži te njihovu diferencijaciju i aktivnost na koštanim površinama. U isto vrijeme citokinski i kemokinski signali djeluju na migraciju imunskih stanica iz koštane srži i perifernih limfnih tkiva do mjesta tkivnih i zglobnih oštećenja, gdje proizvodnjom citokina pridonose upalnom procesu.

## 8. SAŽETAK

Artritis potaknut kolagenom se koristi kao mišji model reumatoidnoga artritisa. Postupak izazivanja artritisa u miševa C57BL/6 se provodi intradermalnim ubrizgavanjem emulzije kokošjeg kolagena tipa II (CII) i kompletnog Freundovog adjuvansa. Nakon tri tjedna ponavlja se imunizacija davanjem emulzije CII i inkompletnog Freundovog adjuvansa. Patogeneza artritisa potaknutog kolagenom je složena i uključuje kombinaciju autoinflamatornog i autoimunog odgovora. Najprije dolazi do ekspanzije mijeloidne loze i produkcije citokina te infiltracije zglobova neutrofilima i monocitno/makrofagnim stanicama, što izaziva oštećenje zglobova. Zglobni specifični kolagenski antigeni CII izloženi su protutijelima anti-CII koja su nastala kao rezultat obrade ksenogeničnim CII te poticanjem limfocitnog T i B odgovora.

Cilj ovog istraživanja je bio utvrditi dinamiku koštanog metabolizma u lokalnim koštanim lezijama, različitim dijelovima dugih kostiju i kralješcima *in vivo* nakon induciranja artritisa. Također je analiziran broj osteoklastnih progenitora u hematopoetskim tkivima i osteoblastnih progenitora u koštanoj srži te njihov diferencijacijski osteoklastogenetski i osteoblastogenetski potencijal.

U miševa s artritisom potaknutim kolagenom dolazi do gubitka subhondralne i periartikularne kosti te do sustavnog gubitka kosti. Lokalna upala (osteitis i sinovitis) uzrokuje povećanje broja osteoklastnih progenitora u koštanoj srži i njihovu pojačanu diferencijaciju *in vitro* te potiče njihovu funkcionalnu sposobnost razgradnje kosti neposredno ispod zglobne hrskavice i periartikularno. Pretpostavka je da, kao posljedica razgradnje kosti, dolazi do oslobađanja koštanih čimbenika rasta iz koštanog matriksa te do povećanja broja osteoblastnih progenitora. S druge strane, proupalni citokini koji su pojačano izraženi mogu inhibirati funkcionalnu aktivnost osteoblasta. Kemokini CCL2 i CCL5, čiji je izražaj u koštanoj srži, slezeni i perifernoj krvi pojačan u artritisu potaknutom kolagenom, potiču migraciju osteoklastnih progenitora iz koštane srži u cirkulaciju. U miševa s artritisom nalazimo veći broj perifernih osteoklastnih progenitora, te povećan osteoklastogenetski potencijal tih stanica *in vitro*. Povećan udio mijeloidnih staničnih subpopulacija u koštanoj srži i perifernoj krvi pridonosi stvaranju osteoresorptivnog okoliša povećanjem osteoklastne diferencijacije iz monocitno/makrofagnih i dendritičnih stanica te pojačanim izražajem proupalnih citokina, čime se koštana pregradnja u artritisu potaknutom kolagenom pomiče na stranu razgradnje. Ublažavanjem upale, s trajanjem artritisa, dolazi do poticanja koštane izgradnje, što se očituje

povećanjem volumena trabekularne kosti metafiza bedrenih kostiju i slabinskih kralježaka u miševa s vrlo kasnim artritismom.

Temeljni zaključak ovog istraživanja je da u mišjem modelu reumatoidnoga artritisa dolazi do povećanja udjela i aktivnosti najpotentnijih subpopulacija osteoklastnih progenitora unutar koštane srži i u cirkulaciji. Ti mobilizirani progenitori mogu dalje naseljavati koštano tkivo, što se očituje pojačanom razgradnjom kosti. Koštana razgradnja susljedno potiče usmjeravanje mezenhimnih progenitorskih stanica prema osteoblastnoj lozi. S druge strane upalni okoliš koči diferencijaciju osteoblasta *in vivo*, vjerojatno blokiranjem Wnt-signalnog puta, pa je konačni učinak artritisa smanjenje koštane izgradnje. Složene promjene u udjelima hematopoetskih i mezenhimnih staničnih loza praćene su promjenama u izražaju ključnih proupalnih citokina i kemokina.

## 9. SUMMARY

Marina Ikić Matijašević, MD: *Differentiation and activity of osteoblasts and osteoclasts in a mouse model of rheumatoid arthritis*; 2013

Collagen induced arthritis is a commonly used mouse model of rheumatoid arthritis. Protocol to induce arthritis in C57BL/6 mice includes intradermal injection of the emulsion containing chicken collagen type II (CII) and complete Freund's adjuvant. After three weeks, immunization is boosted with an emulsion of CII and incomplete Freund's adjuvant. The pathogenesis of collagen induced arthritis is complex, comprising both autoinflammatory and autoimmune response. Initially, immunization induces myeloid expansion and cytokine production, and subsequent infiltration of joint with neutrophil and monocyte/macrophage cells, leading to joint impairment. Joint destruction exposes joint-specific collagen antigens (CII) to anti-CII antibodies produced in response to xenogeneic CII by T and B lymphocyte mediated immune reaction.

The aim of this study was to determine the dynamic of bone metabolism in local bone lesions, different sites of long bones and vertebrae *in vivo* following arthritis induction. Also, the number of osteoclast progenitors in various hematopoietic tissues and osteoblast progenitors in the bone marrow was assessed, as well as their osteoclastogenic and osteoblastogenic differentiation potential.

Collagen induced arthritis in mice causes loss of subchondral and periarticular bone as well as systemic bone loss. Local inflammation (synovitis and osteitis) induces an increase in the number of osteoclast progenitors in bone marrow and their increased differentiation potential *in vitro*. Also, it promotes their functional ability to degrade subchondral and periarticular bone. We proposed that bone growth factors are released from the bone matrix as a result of bone resorption, leading to an increase in the number of osteoblast progenitors. On the other hand, highly expressed proinflammatory cytokines may inhibit the functional activity of osteoblasts. Chemokines CCL2 and CCL5, whose expression in the bone marrow, spleen and peripheral blood is increased in collagen induced arthritis, stimulate osteoclast progenitors to migrate from the bone marrow into the bloodstream. In arthritic mice, we observed higher proportion of peripheral osteoclast progenitors and their increased osteoclastogenic potential *in vitro*. Expansion of myeloid cell subpopulations in the bone marrow and peripheral blood contributes to the osteoresorptive environment by enhancing osteoclast differentiation from

monocyte/macrophage and dendritic cells, and increasing the expression of proinflammatory cytokines. The net effect on bone remodeling is predominance of osteoresorption. With the duration of arthritis inflammation gradually attenuates allowing intensified bone formation, as evidenced by the increased volume of trabecular bone in the metaphyseal area of femur and lumbar vertebrae in the very late stage of arthritis.

In general, we concluded that in a mouse model of rheumatoid arthritis there is an increase in the proportion and activity of most potent subpopulations of osteoclast progenitors within the bone marrow and in circulation. These mobilized progenitors can further home to bone tissue, as evidenced by an increased bone resorption. Consequently, bone degradation induces differentiation of mesenchymal progenitor cells toward osteoblast lineage. On the other hand, inflammatory environment may inhibit osteoblast differentiation *in vivo* by blocking Wnt-signaling pathway, so the final effect of arthritis is decreased bone formation. Complex changes in the proportions of hematopoietic and mesenchymal cell lineages are associated with changes in the expression of key proinflammatory cytokines and chemokines.

## 10. LITERATURA

1. Taichman RS. Blood and bone: Two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem cell niche. *Blood* 2005;105:2631-9.
2. Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ. Principles of Bone Biology. 3. izd. Amsterdam: Elsevier; 2008.
3. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3 Suppl 3:131-9.
4. Eriksen EF, Axelrod DW, Melsen F. Bone Histomorphometry. New York: Raven Press; 1994.
5. Camozzi V, Vescini F, Luisetto G, Moro L. Bone organic matrix components: their roles in skeletal physiology. *J Endocrinol Invest* 2010;33:13-5.
6. Baron R, Neff L, Tran Van P, Nefussi JR, Vignery A. Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. *Am J Pathol* 1986;122:363-78.
7. Inoue D, Shih C, Galson DL, Goldring SR, Horne WC, Baron R. Calcitonin-dependent down-regulation of the mouse C1a calcitonin receptor in cells of the osteoclast lineage involves a transcriptional mechanism. *Endocrinology* 1999;140:1060-8.
8. 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.
9. Miyamoto T. Regulators of osteoclast differentiation and cell-cell fusion. *Keio J Med* 2011;60:101-5.
10. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 2003;4:638-49.
11. Xing L, Schwarz EM, Boyce BF. Osteoclast precursors, RANKL/RANK, and immunology. *Immunol Rev* 2005;208:19-29.
12. Mizoguchi T, Muto A, Udagawa N, i sur. Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. *J Cell Biol* 2009;184:541-54.
13. Muto A, Mizoguchi T, Udagawa N, i sur. Lineage-committed osteoclast precursors circulate in blood and settle down into bone. *J Bone Miner Res* 2011;26:2978-90.
14. Walsh MC, Kim N, Kadono Y, i sur. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol* 2006;24:33-63.
15. Rebel VI, Miller CL, Thornbury GR, Dragowska WH, Eaves CJ, Lansdorp PM. A comparison of long-term repopulating hematopoietic stem cells in fetal liver and adult bone marrow from the mouse. *Exp Hematol* 1996;24:638-48.
16. Roodman GD. Regulation of osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1068:100-9.
17. Zanjani ED, Ascensao JL, Tavassoli M. Liver-derived fetal hematopoietic stem cells selectively and preferentially home to the fetal bone marrow. *Blood* 1993;81:399-404.
18. Harrison DE, Zhong RK, Jordan CT, Lemischka IR, Astle CM. Relative to adult marrow, fetal liver repopulates nearly five times more effectively long-term than short-term. *Exp Hematol* 1997;25:293-7.
19. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000;100:157-68.
20. Aguila HL, Rowe DW. Skeletal development, bone remodeling, and hematopoiesis. *Immunol Rev* 2005;208:7-18.
21. DeKoter RP, Walsh JC, Singh H. PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *EMBO J* 1998;17:4456-68.
22. Felix R, Cecchini MG, Fleisch H. Macrophage colony stimulating factor restores in vivo bone resorption in the op/op osteopetrotic mouse. *Endocrinology* 1990;127:2592-4.
23. Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, i sur. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 1988;123:2600-2.
24. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, i sur. The bone marrow-derived stromal cell lines MC3T3-G2/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in cocultures with mouse spleen cells. *Endocrinology* 1989;125:1805-13.
25. Takahashi N, Udagawa N, Suda T. A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;256:449-55.
26. Lacey DL, Timms E, Tan HL, i sur. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-76.
27. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008;473:139-46.



28. Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, i sur. Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:259-69.
29. Teitelbaum SL. RANKing c-Jun in osteoclast development. *J Clin Invest* 2004;114:463-5.
30. Ikeda F, Nishimura R, Matsubara T, i sur. Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. *J Clin Invest* 2004;114:475-84.
31. Lee NK. Molecular Understanding of Osteoclast Differentiation and Physiology. *Endocrinol Metab* 2010;25:264-269.
32. Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;13:27-38.
33. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 1988;136:42-60.
34. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001;19:180-92.
35. Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 1994;84:4164-73.
36. Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, i sur. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med* 2005;352:1959-66.
37. Sung JH, Yang HM, Park JB, i sur. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 2008;40:2649-54.
38. Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nature Genet* 1999;22:85-89 .
39. Akiyama H, Kim JE, Nakashima K, i sur. Osteo-chondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:14665-14670.
40. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;89:747-54.
41. Thirunavukkarasu K, Miles RR, Halladay DL, i sur. Stimulation of osteoprotegerin (OPG) gene expression by transforming growth factor-beta (TGF-beta). Mapping of the OPG promoter region that mediates TGF-beta effects. *J Biol Chem* 2001;276:36241-50.
42. Marie PJ. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys* 2008;473:98-105.
43. Zhou X. Multiple functions of Osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:12919-24.
44. Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol* 1998;76:899-910.
45. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 2000;289:1501-4.
46. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res* 1998;13:793-802.
47. Manolagas SC. Review Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000;21:115-37.
48. Bonewald LF. The Amazing Osteocyte. *J Bone Miner Res* 2011;26:229-238.
49. Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int* 2010;21:1457-69.
50. ten Dijke P, Krause C, de Gorter DJ, Löwik CW, van Bezooijen RL. Osteocyte-derived sclerostin inhibits bone formation: its role in bone morphogenetic protein and Wnt signaling. *Bone Joint Surg Am* 2008;90:31-5.
51. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The Osteocyte: An Endocrine Cell and More. *Endocr Rev* 2013 [U tisku]
52. Kalajzic I, Matthews BG, Torreggiani E, Harris MA, Divieti Pajevic P, Harris SE. In vitro and in vivo approaches to study osteocyte biology. *Bone* 2013;54:296-306.
53. Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, i sur. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 1990;345:442-4.
54. Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, i sur. Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest* 1993;91:257-263.
55. Atkins GJ, Haynes DR, Geary SM, Loric M, Crotti TN, Findlay DM. Coordinated cytokine expression by stromal and hematopoietic cells during human osteoclast formation. *Bone* 2000;26:653-661.
56. Hodge JM, Kirkland MA, Nicholson GC. Multiple roles of M-CSF in human osteoclastogenesis. *J Cell Biochem* 2007;102:759-768.
57. Page G, Miossec P. RANK and RANKL expression as markers of dendritic cell-T cell interactions in paired samples of rheumatoid synovium and lymph nodes. *Arthritis Rheum* 2005;52:2307-12.

58. Barbaroux JB, Beleut M, Brisken C, Mueller CG, Groves RW. Epidermal receptor activator of NF-kappaB ligand controls Langerhans cells numbers and proliferation. *J Immunol* 2008;181:1103-8.
59. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 1999;13:2412-2424.
60. O'Brien CA. Control of RANKL gene expression. *Bone* 2010;46:911-919.
61. Li Y, Toraldo G, Li A, et al. B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood* 2007;109:3839-3848.
62. Soderstrom K, Stein E, Colmenero P, et al. Natural killer cells trigger osteoclastogenesis and bone destruction in arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:13028-13033.
63. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:768-775.
64. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 1999;103:1345-1352.
65. Wittrant Y, Gorin Y, Mohan S, Wagner B, Abboud-Werner SL. Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) directly inhibits receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) expression by osteoblasts. *Endocrinology* 2009;150:4977-4988.
66. Pettit AR, Ji H, von Stechow D, et al. TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *Am J Pathol* 2001;159:1689-1699.
67. Redlich K, Hayer S, Maier A, et al. Tumor necrosis factor alpha-mediated joint destruction is inhibited by targeting osteoclasts with osteoprotegerin. *Arthritis Rheum* 2002;46:785-792.
68. 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.
69. Hakeda Y, Kobayashi Y, Yamaguchi K, et al. Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251:796-801.
70. Kubota K, Sakikawa C, Katsumata M, Nakamura T, Wakabayashi K. Platelet-derived growth factor BB secreted from osteoclasts acts as an osteoblastogenesis inhibitory factor. *J Bone Miner Res* 2002;17:257-65.
71. Grano M, Galimi F, Zambonin G, et al. Hepatocyte growth factor is a coupling factor for osteoclasts and osteoblasts in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7644-8.
72. Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys* 2008;473:201-9.
73. Del Fattore A, Teti A, Rucci N. Bone cells and the mechanisms of bone remodelling. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012;4:2302-21.
74. Rucci N. Molecular biology of bone remodelling. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2008;5:49-56.
75. Li X, Qin L, Bergenstock M, Bevelock LM, Novack DV, Partridge NC. Parathyroid hormone stimulates osteoblastic expression of MCP-1 to recruit and increase the fusion of pre-osteoclasts. *J Biol Chem* 2007;282:33098-106.
76. Roux C. Osteoporosis in inflammatory joint diseases. *Osteoporos Int* 2011;22:421-33.
77. Sokka T, Kautiainen H, Möttönen T, Hannonen P. Work disability in rheumatoid arthritis 10 years after the diagnosis. *J Rheumatol* 1999;26:1681-5.
78. Prete M, Racanelli V, Digiglio L, Vacca A, Dammacco F, Perosa F. Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: An update. *Autoimmun Rev* 2011;11:123-31.
79. Symmons DP, Barrett EM, Bankhead CR, Scott DG, Silman AJ. The incidence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: results from the Norfolk Arthritis Register. *Br J Rheumatol* 1994;33:735-9.
80. Ahlmén M, Svensson B, Albertsson K, Forslind K, Hafström I; BARFOT Study Group. Influence of gender on assessments of disease activity and function in early rheumatoid arthritis in relation to radiographic joint damage. *Ann Rheum Dis* 2010;69:230-3.
81. Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis* 2010;69:964-75.
82. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011;365:2205-19.
83. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2007;7:429-42.
84. Gourraud PA, Dieude P, Boyer JF, et al. A new classification of HLA-DRB1 alleles differentiates predisposing and protective alleles for autoantibody production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2007;9:27.
85. Wesoly J, van der Helm-van Mil AH, Toes RE, et al. Association of the PTPN22 C1858T single-nucleotide polymorphism with rheumatoid arthritis phenotypes in an inception cohort. *Arthritis Rheum* 2005;52:2948-2950.

86. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, i sur. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2007;357:977-986.
87. Orozco G, Eyre S, Hinks A, Ke X, i sur. Association of CD40 with rheumatoid arthritis confirmed in a large UK case-control study. *Ann Rheum Dis* 2010;69:813-6.
88. Kallberg H, Padyukov L, Plenge RM, i sur. Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2007;80:867-75.
89. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, i sur. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* 2006;54:38-46.
90. van Oosterhout M, Bajema I, Levarht EW, Toes RE, Huizinga TW, van Laar JM. Differences in synovial tissue infiltrates between anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:53-60.
91. Chen FH, Tuan RS. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Res Ther* 2008;10:223.
92. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2010;233:233-55.
93. Gravallesse EM, Harada Y, Wang JT, Gorn AH, Thornhill TS, Goldring SR. Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 1998;152:943-51.
94. Jimenez-Boj E, Redlich K, Türk B, i sur. Interaction between synovial inflammatory tissue and bone marrow in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2005;175:2579-88.
95. Jimenez-Boj E, Nöbauer-Huhmann I, Hanslik-Schnabel B, i sur. Bone erosions and bone marrow edema as defined by magnetic resonance imaging reflect true bone marrow inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:1118-24.
96. Moore EA, Jacoby RK, Ellis RE, Fry ME, Pittard S, Vennart W. Demonstration of a geode by magnetic resonance imaging: a new light on the cause of juxta-articular bone cysts in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1990;49:785-7.
97. Dalbeth N, Smith T, Gray S, i sur. Cellular characterisation of magnetic resonance imaging bone oedema in rheumatoid arthritis; implications for pathogenesis of erosive disease. *Ann Rheum Dis* 2009;68:279-82.
98. Jongen-Lavrencic M, Peeters HR, Wognum A, Vreugdenhil G, Breedveld FC, Swaak AJ. Elevated levels of inflammatory cytokines in bone marrow of patients with rheumatoid arthritis and anemia of chronic disease. *J Rheumatol* 1997;24:1504-9.
99. Hetland ML, Ejlberg B, Hørslev-Petersen K, i sur. MRI bone oedema is the strongest predictor of subsequent radiographic progression in early rheumatoid arthritis. Results from a 2-year randomised controlled trial (CIMESTRA). *Ann Rheum Dis* 2009;68:384-90.
100. Duer-Jensen A, Hørslev-Petersen K, Hetland ML, i sur. Bone edema on magnetic resonance imaging is an independent predictor of rheumatoid arthritis development in patients with early undifferentiated arthritis. *Arthritis Rheum* 2011;63:2192-202.
101. Bugatti S, Caporali R, Manzo A, Vitolo B, Pitzalis C, Montecucco C. Involvement of subchondral bone marrow in rheumatoid arthritis: lymphoid neogenesis and in situ relationship to subchondral bone marrow osteoclast recruitment. *Arthritis Rheum* 2005;52:3448-59.
102. McQueen FM. Bone marrow edema and osteitis in rheumatoid arthritis: the imaging perspective. *Arthritis Res Ther* 2012;14:224.
103. Hayer S, Polzer K, Brandl A, i sur. B-cell infiltrates induce endosteal bone formation in inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res* 2008;23:1650-60.
104. Deal C. Bone loss in rheumatoid arthritis: systemic, periarticular, and focal. *Curr Rheumatol Rep* 2012;14:231-7.
105. van der Heijde D, van der Helm-van Mil AH, Aletaha D, i sur. EULAR definition of erosive disease in light of the 2010 ACR/EULAR rheumatoid arthritis classification criteria. *Ann Rheum Dis* 2013;72:479-81.
106. Karmakar S, Kay J, Gravallesse EM. Bone damage in rheumatoid arthritis: mechanistic insights and approaches to prevention. *Rheum Dis Clin North Am* 2010;36:385-404.
107. Güler-Yüksel M, Bijsterbosch J, Goekoop-Ruiterman YP, i sur. Bone mineral density in patients with recently diagnosed, active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1508-1512.
108. Schett G, Kiechl S, Weger S, i sur. High-sensitivity C-reactive protein and risk of non-traumatic fractures in the Bruneck study. *Arch Intern Med* 2006;166:2495-2501.
109. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, McCloskey E. FRAX and the assessment of fracture probability in men and women from the UK. *Osteoporos Int* 2008;19:385-397.

110. Gough AK, Lilley J, Eyre S, Holder RL, Emery P. Generalised bone loss in patients with early rheumatoid arthritis. *Lancet* 1994;344:23-7.
111. Kvien TK, Haugeberg G, Uhlig T, i sur. Data driven attempt to create a clinical algorithm for identification of women with rheumatoid arthritis at high risk of osteoporosis. *Ann Rheum Dis* 2000;59:805-11.
112. Tanaka Y, Nakayamada S, Okada Y. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005;4:325-8.
113. Alnaeeli M, Penninger JM, Teng YT. Immune interactions with CD4+ T cells promote the development of functional osteoclasts from murine CD11c+ dendritic cells. *J Immunol* 2006;177:3314-26.
114. Schett G. Osteoimmunology in rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2009;11:210.
115. Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev* 2008;29:403-40.
116. Mormann M, Thederan M, Nackchbandi I, Giese T, Wagner C, Hansch GM. Lipopolysaccharides (LPS) induce the differentiation of human monocytes to osteoclasts in a tumour necrosis factor (TNF) alpha-dependent manner: a link between infection and pathological bone resorption. *Mol Immunol* 2008;45:3330-7.
117. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol* 2002;20:795-823.
118. Haynes DR. Inflammatory cells and bone loss in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2007;9:104.
119. Weitzmann MN, Pacifici R. The role of T lymphocytes in bone metabolism. *Immunol Rev* 2005;208:154-68.
120. Grcevic D, Lukic IK, Kovacic N, Ivcevic S, Katavic V, Marusic 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-kappaB and c-Fos. *Clin Exp Immunol* 2006;146:146-58.
121. MacNaul KL, Hutchinson NI, Parsons JN, Bayne EK, Tocci MJ. Analysis of IL-1 and TNF-alpha gene expression in human rheumatoid synoviocytes and normal monocytes by in situ hybridization. *J Immunol* 1990;145:4154-66.
122. 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.
123. Zhang YH, Heulsmann A, Tondravi 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;276:563-8.
124. Kitaura H, Zhou P, Kim HJ, Novack DV, Ross FP, Teitelbaum SL. M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis. *J Clin Invest* 2005;115:3418-27.
125. Glass DA 2nd, Bialek P, Ahn JD, i sur. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 2005;8:751-64.
126. Li P, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Ma L, Boyce BF, Xing L. RANK signaling is not required for TNFalpha-mediated increase in CD11(hi) osteoclast precursors but is essential for mature osteoclast formation in TNFalpha-mediated inflammatory arthritis. *Bone Miner Res* 2004;19:207-13.
127. Furst DE. Development of TNF inhibitor therapies for the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2010;28 Suppl 59:S5-12.
128. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, i sur. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 1991;10:4025-31.
129. Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:9784-8.
130. Gilbert L, He X, Farmer P, i sur. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology* 2000;141:3956-64.
131. Panagakos FS, Hinojosa LP, Kumar S. Formation and mineralization of extracellular matrix secreted by an immortal human osteoblastic cell line: modulation by tumor necrosis factor-alpha. *Inflammation* 1994;18:267-84.
132. Kuroki T, Shingu M, Koshihara Y, Nobunaga M. Effects of cytokines on alkaline phosphatase and osteocalcin production, calcification and calcium release by human osteoblastic cells. *Br J Rheumatol* 1994;33:224-30.
133. Gilbert L, He X, Farmer P, i sur. Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 2002;277:2695-701.
134. Jimi E, Nakamura I, Duong LT, i sur. Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. *Exp Cell Res* 1999;247:84-93.

135. Jimi E, Shuto T, Koga T. Macrophage colony-stimulating factor and interleukin-1 alpha maintain the survival of osteoclast-like cells. *Endocrinology* 1995;136:808-11.
136. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, i sur. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med* 2000;191:275-86.
137. Niki Y, Yamada H, Kikuchi T, i sur. Membrane-associated IL-1 contributes to chronic synovitis and cartilage destruction in human IL-1 alpha transgenic mice. *J Immunol* 2004;172:577-84.
138. Ji H, Pettit A, Ohmura K, i sur. Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody-induced arthritis. *J Exp Med* 2002;196:77-85.
139. Tanabe N, Ito-Kato E, Suzuki N, i sur. IL-1alpha affects mineralized nodule formation by rat osteoblasts. *Life Sci* 2004;75:2317-27.
140. Okamoto H, Yamamura M, Morita Y, Harada S, Makino H, Ota Z. The synovial expression and serum levels of interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997;40:1096-105.
141. Houssiau FA, Devogelaer JP, Van Damme J, de Deuxchaisnes CN, Van Snick J. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum* 1988;31:784-8.
142. Poli V, Balena R, Fattori E, i sur. Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *EMBO J* 1994;13:1189-96.
143. De Benedetti F, Rucci N, Del Fattore A, i sur. Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: a model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis Rheum* 2006;54:3551-63.
144. 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-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol* 2002;169:3353-62.
145. Axmann R, Böhm C, Krönke G, Zwerina J, Smolen J, Schett G. Inhibition of interleukin-6 receptor directly blocks osteoclast formation in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum* 2009;60:2747-56.
146. Ohshima S, Saeki Y, Mima T, i sur. Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8222-6.
147. Sasai M, Saeki Y, Ohshima S, i sur. Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6-deficient mice. *Arthritis Rheum* 1999;42:1635-43.
148. Takagi N, Mihara M, Moriya Y, i sur. Blockage of interleukin-6 receptor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:2117-21.
149. Chabaud M, Durand JM, Buchs N, i sur. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1999;42:963-70.
150. Hueber AJ, Asquith DL, Miller AM, i sur. Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* 2010;184:3336-40.
151. Lubberts E, Joosten LA, van de Loo FA, Schwarzenberger P, Kolls J, van den Berg WB. Overexpression of IL-17 in the knee joint of collagen type II immunized mice promotes collagen arthritis and aggravates joint destruction. *Inflamm Res* 2002;51:102-4.
152. Lubberts E, Koenders MI, van den Berg WB. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther* 2005;7:29-37.
153. Koenders MI, Lubberts E, Oppers-Walgreen B, i sur. Blocking of interleukin-17 during reactivation of experimental arthritis prevents joint inflammation and bone erosion by decreasing RANKL and interleukin-1. *Am J Pathol* 2005;167:141-9.
154. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, i sur. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 1996;183:2593-603.
155. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, i sur. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol* 1998;160:3513-21.
156. Adamopoulos IE, Chao CC, Geissler R, i sur. Interleukin-17A upregulates receptor activator of NF-kappaB on osteoclast precursors. *Arthritis Res Ther* 2010;12:29.
157. Yago T, Nanke Y, Ichikawa N, i sur. IL-17 induces osteoclastogenesis from human monocytes alone in the absence of osteoblasts, which is potently inhibited by anti-TNF-alpha antibody: a novel mechanism of osteoclastogenesis by IL-17. *Cell Biochem* 2009;108:947-55. .
158. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, i sur. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* 2000;408:600-5.
159. Ji JD, Park-Min KH, Shen Z, i sur. Inhibition of RANK expression and osteoclastogenesis by TLRs and IFN-gamma in human osteoclast precursors. *J Immunol* 2009;183:7223-33.

160. Vermeire K, Heremans H, Vandeputte M, Huang S, Billiau A, Matthys P. Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol* 1997;158:5507-13.
161. Vignery A, Niven-Fairchild T, Shepard MH. Recombinant murine interferon-gamma inhibits the fusion of mouse alveolar macrophages in vitro but stimulates the formation of osteoclastlike cells on implanted syngeneic bone particles in mice in vivo. *J Bone Miner Res* 1990;5:637-44.
162. Gao Y, Grassi F, Ryan MR, i sur. IFN-gamma stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. *J Clin Invest* 2007;117:122-32.
163. Takayanagi H, Kim S, Matsuo K, i sur. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature* 2002;416:744-9.
164. Szekanecz Z, Vegvari A, Szabo Z, Koch AE. Chemokines and chemokine receptors in arthritis. *Front Biosci* 2010;2:153-67.
165. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006;354:610-21.
166. Kim MS, Day CJ, Morrison NA. MCP-1 is induced by receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, promotes human osteoclast fusion, and rescues granulocyte macrophage colony-stimulating factor suppression of osteoclast formation. *J Biol Chem* 2005;280:16163-9.
167. Rahimi P, Wang CY, Stashenko P, Lee SK, Lorenzo JA, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 expression and monocyte recruitment in osseous inflammation in the mouse. *Endocrinology* 1995;136:2752-9.
168. Abe M, Hiura K, Wilde J, i sur. Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Blood* 2002;100:2195-202.
169. Kukita T, Nomiya H, Ohmoto Y, i sur. Macrophage inflammatory protein-1 alpha (LD78) expressed in human bone marrow: its role in regulation of hematopoiesis and osteoclast recruitment. *Lab Invest* 1997;76:399-406.
170. Yano S, Mentaverri R, Kanuparthi D, i sur. Functional expression of beta-chemokine receptors in osteoblasts: role of regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in osteoblasts and regulation of its secretion by osteoblasts and osteoclasts. *Endocrinology* 2005;146:2324-35.
171. Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, i sur. Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med* 1993;177:1809-14.
172. Kwak HB, Ha H, Kim HN, i sur. Reciprocal cross-talk between RANKL and interferon-gamma-inducible protein 10 is responsible for bone-erosive experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:1332-42.
173. Kong YY, Feige U, Sarosi I, i sur. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999;402:304-9.
174. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 1977;146:857-68.
175. Holmdahl R, Lorentzen JC, Lu S, i sur. Arthritis in rats with non-immunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2001;184:184-202.
176. Stuart JM, Townes, AS, Kang AH. Collagen autoimmune arthritis. *Annu Rev Immunol* 1984;2:199-218.
177. Wooley PH, Luthra HS, Stuart JM, David CS. Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates. *J Exp Med* 1981;154:688-700.
178. Brand DD, Kang AH, Rosloniec EF. Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 2003;25:3-18.
179. Inglis JJ, Simelyte E, McCann FE, Criado G, Williams RO. Protocol for the induction of arthritis in C57BL/6 mice. *Nat Protoc* 2008;3:612-8.
180. Campbell IK, Hamilton JA, Wicks IP. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2000;30:1568-75.
181. Hegen M, Keith JC Jr, Collins M, Nickerson-Nutter CL. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1505-15.
182. Holmdahl R, Andersson ME, Goldschmidt TJ, i sur. Collagen induced arthritis as an experimental model for rheumatoid arthritis. Immunogenetics, pathogenesis and autoimmunity. *APMIS* 1989;97:575-84.
183. Wooley PH, Dutcher J, Widmer MB, Gillis S. Influence of a recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor FC fusion protein on type II collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol* 1993;151:6602-7.
184. Bevaart L, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* 2010;62:2192-205.

185. Billiau A, Matthys P. Collagen-induced arthritis and related animal models: how much of their pathogenesis is auto-immune, how much is auto-inflammatory? *Cytokine Growth Factor Rev* 2011;22:339-44.
186. Matthys P, Vermeire K, Mitera T, i sur. Enhanced autoimmune arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice is conditioned by mycobacteria in Freund's adjuvant and by increased expansion of Mac-1+ myeloid cells. *J Immunol* 1999;163:3503-10.
187. Schurgers E, Mertens F, Vanoirbeek JA, i sur. Pulmonary inflammation in mice with collagen-induced arthritis is conditioned by complete Freund's adjuvant and regulated by endogenous IFN- $\gamma$ . *Eur J Immunol* 2012;42:3223-34.
188. Inglis JJ, Criado G, Medghalachi M, i sur. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice is associated with a robust and sustained T-cell response to type II collagen. *Arthritis Res Ther* 2007;9:113.
189. Delany AM, Hankenson KD. Thrombospondin-2 and SPARC/osteonectin are critical regulators of bone remodeling. *J Cell Commun Signal* 2009;3:227-38.
190. Altman DG, Bland JM. Statistics notes: the normal distribution. *BMJ* 1995;310:298.
191. Kovacic N, Grcevic D, Katavic V, i sur. Fas receptor is required for estrogen deficiency-induced bone loss in mice. *Lab Invest* 2007;90:402-13.
192. Kirstein B, Chambers TJ, Fuller K. Secretion of tartrate-resistant acid phosphatase by osteoclasts correlates with resorptive behavior. *J Cell Biochem* 2006;98:1085-94.
193. Bar-Shavit Z. The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *J Cell Biochem* 2007;102:1130-9.
194. H, Takayanagi. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 2007;7:292-304.
195. Troen BR. The regulation of cathepsin K gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1068:165-72.
196. Jacquin C, Gran DE, Lee SK, Lorenzo JA, Aguila HL. Identification of multiple osteoclast precursor populations in murine bone marrow. *J Bone Miner Res* 2006;21:67-77.
197. Jacome-Galarza CE, Lee SK, Lorenzo JA, Aguila HL. Identification, characterization, and isolation of a common progenitor for osteoclasts, macrophages, and dendritic cells from murine bone marrow and periphery. *J Bone Miner Res* 2013;28:1203-13.
198. Jacome-Galarza CE, Lee SK, Lorenzo JA, Aguila HL. Parathyroid hormone regulates the distribution and osteoclastogenic potential of hematopoietic progenitors in the bone marrow. *J Bone Miner Res* 2011;26:1207-16.
199. Golub EE, Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase. *Curr Opin Ortho* 2007;18:444-448.
200. Franceschi RT, Ge C, Xiao G, Roca H, Jiang D. Transcriptional regulation of osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1116:196-207.
201. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, i sur. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002;108:17-29.
202. Komori T. Regulation of bone development and maintenance by Runx2. *Front Biosci* 2008;13:898-903.
203. Chitteti BR, Cheng YH, Kacena MA, Srour EF. Hierarchical organization of osteoblasts reveals the significant role of CD166 in hematopoietic stem cell maintenance and function. *Bone* 2013;54:58-67.
204. Mayack SR, Wagers AJ. Osteolineage niche cells initiate hematopoietic stem cell mobilization. *Blood* 2008;112:519-31.
205. Chitteti BR, Cheng YH, Streicher DA, i sur. Osteoblast lineage cells expressing high levels of Runx2 enhance hematopoietic progenitor cell proliferation and function. *J Cell Biochem* 2010;111:284-94.
206. Nakamura Y, Arai F, Iwasaki H, i sur. Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells. *Blood* 2010;116:1422-32.
207. Williams RO. Collagen-induced arthritis in mice: a major role for tumor necrosis factor-alpha. *Methods Mol Biol* 2007;361:265-84.
208. Geusens P, Lems WF. Osteoimmunology and osteoporosis. *Arthritis Res Ther* 2011;3:242.
209. Chao CC, Chen SJ, Adamopoulos IE, Judo M, Asio A, Ayanoglu G, Bowman EP. Structural, cellular, and molecular evaluation of bone erosion in experimental models of rheumatoid arthritis: assessment by  $\mu$ CT, histology, and serum biomarkers. *Autoimmunity* 2010;43:642-53.
210. Walsh NC, Reinwald S, Manning CA, i sur. Osteoblast function is compromised at sites of focal bone erosion in inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res* 2009;24:1572-85.
211. Zwerina J, Tuerk B, Redlich K, Smolen JS, Schett G. Imbalance of local bone metabolism in inflammatory arthritis and its reversal upon tumor necrosis factor blockade: direct analysis of bone turnover in murine arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:22.
212. Bugatti S, Manzo A, Caporali R, Montecucco C. Inflammatory lesions in the bone marrow of rheumatoid arthritis patients: a morphological perspective. *Arthritis Res Ther* 2012;14:229.
213. Schett G. Bone marrow edema. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1154:35-40.

214. Hanyu T, Chotanaphuti T, Arai K, Tanaka T, Takahashi HE. Histomorphometric assessment of bone changes in rats with type II collagen-induced arthritis. *Bone* 1999;24:485-90.
215. Hoshino K, Hanyu T, Arai K, Takahashi HE. Mineral density and histomorphometric assessment of bone changes in the proximal tibia early after induction of type II collagen-induced arthritis in growing and mature rats. *J Bone Miner Metab* 2001;19:76-83.
216. Nishida S, Tsurukami H, Sakai A, i sur. Stage-dependent changes in trabecular bone turnover and osteogenic capacity of marrow cells during development of type II collagen-induced arthritis in mice. *Bone* 2002;30:872-9.
217. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res* 2011;343:289-302.
218. Walsh NC, Gravallesse EM. Bone remodeling in rheumatic disease:a question of balance. *Immunol Rev* 2010;233:301-12.
219. Diarra D, Stolina M, Polzer K, i sur. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* 2007;13:156-63.
220. Matzelle MM, Gallant MA, Condon KW, i sur. Resolution of inflammation induces osteoblast function and regulates the Wnt signaling pathway. *Arthritis Rheum* 2012;64:1540-50.
221. Redlich K, Görtz B, Hayer S, i sur. Repair of local bone erosions and reversal of systemic bone loss upon therapy with anti-tumor necrosis factor in combination with osteoprotegerin or parathyroid hormone in tumor necrosis factor-mediated arthritis. *Am J Pathol* 2004;164:543-55.
222. Finzel S, Rech J, Schmidt S, i sur. Repair of bone erosions in rheumatoid arthritis treated with tumour necrosis factor inhibitors is based on bone apposition at the base of the erosion. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1587-93.
223. Proulx ST, Kwok E, You Z, i sur. Elucidating bone marrow edema and myelopoiesis in murine arthritis using contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum* 2008;58:2019-29.
224. Hirohata S, Yanagida T, Itoh K, i sur. Accelerated generation of CD14+ monocyte-lineage cells from the bone marrow of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 1996;39:836-43.
225. Hayashida K, Ochi T, Fujimoto M, i sur. Bone marrow changes in adjuvant-induced and collagen-induced arthritis. Interleukin-1 and interleukin-6 activity and abnormal myelopoiesis. *Arthritis Rheum* 1992;35:241-5.
226. Bugatti S, Caporali R, Manzo A, Vitolo B, Pitzalis C, Montecucco C. Involvement of subchondral bone marrow in rheumatoid arthritis: lymphoid neogenesis and in situ relationship to subchondral bone marrow osteoclast recruitment. *Arthritis Rheum.* 2005;52:3448-59.
227. Kaneko M, Tomita T, Nakase T, i sur. Expression of proteinases and inflammatory cytokines in subchondral bone regions in the destructive joint of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40:247-55.
228. Schett G, Firestein GS. Mr Outside and Mr Inside: classic and alternative views on the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010;69:787-9.
229. McQueen FM, Benton N, Perry D, Crabbe J, Robinson E, Yeoman S, McLean L, Stewart N. Bone edema scored on magnetic resonance imaging scans of the dominant carpus at presentation predicts radiographic joint damage of the hands and feet six years later in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1814-27.
230. Binder NB, Puchner A, Niederreiter B, i sur. Tumor necrosis factor-inhibiting therapy preferentially targets bone destruction but not synovial inflammation in a tumor necrosis factor-driven model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2013;65:608-17.
231. Smolen JS, Han C, Bala M, i sur. Evidence of radiographic benefit of treatment with infliximab plus methotrexate in rheumatoid arthritis patients who had no clinical improvement: a detailed subanalysis of data from the anti-tumor necrosis factor trial in rheumatoid arthritis with concomitant therapy study. *Arthritis Rheum* 2005;52:1020-30.
232. Landewé R, van der Heijde D, Klareskog L, van Vollenhoven R, Fatenejad S. Disconnect between inflammation and joint destruction after treatment with etanercept plus methotrexate: results from the trial of etanercept and methotrexate with radiographic and patient outcomes. *Arthritis Rheum* 2006;54:3119-25.
233. Durand M, Boire G, Komarova SV, i sur. The increased in vitro osteoclastogenesis in patients with rheumatoid arthritis is due to increased percentage of precursors and decreased apoptosis - the In Vitro Osteoclast Differentiation in Arthritis (IODA) study. *Bone* 2011;48:588-96.
234. Hirayama T, Danks L, Sabokbar A, Athanasou NA. Osteoclast formation and activity in the pathogenesis of osteoporosis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:1232-9.
235. Li P, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Ma L, Looney RJ, Ritchlin CT, Boyce BF, Xing L. Systemic tumor necrosis factor alpha mediates an increase in peripheral CD11bhigh osteoclast precursors in tumor necrosis factor alpha-transgenic mice. *Arthritis Rheum* 2004;50:265-76.



236. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 2006;6:93-106.
237. Abkowitz JL, Robinson AE, Kale S, Long MW, Chen J. Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. *Blood* 2003;102:1249-53.
238. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol* 2002;30:973-81.
239. Kikuta J, Ishii M. Osteoclast migration, differentiation and function: novel therapeutic targets for rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford)* 2013;52:226-34.
240. Ideguchi H, Ohno S, Hattori H, Senuma A, Ishigatsubo Y. Bone erosions in rheumatoid arthritis can be repaired through reduction in disease activity with conventional disease-modifying antirheumatic drugs. *Arthritis Res Ther* 2006;8:76.
241. Goldring SR, Goldring MB. Eating bone or adding it: the Wnt pathway decides. *Nat Med* 2007;13:133-4.
242. Goldring SR, Purdue PE, Crotti TN, et al. Bone remodelling in inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 2013;72 Suppl 2:52-5.
243. Vincent C, Findlay DM, Welldon KJ, et al. Pro-inflammatory cytokines TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) and TNF $\alpha$  induce the mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent expression of sclerostin in human osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2009;24:1434-49.
244. Chen XX, Baum W, Dwyer D, et al. Sclerostin inhibition reverses systemic, periarticular and local bone loss in arthritis. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1732-6.
245. Ke HZ, Richards WG, Li X, Ominsky MS. Sclerostin and Dickkopf-1 as therapeutic targets in bone diseases. *Endocr Rev* 2012;33:747-83.
246. McDonald MM, Morse A, Mikulec K, et al. Inhibition of sclerostin by systemic treatment with sclerostin antibody enhances healing of proximal tibial defects in ovariectomized rats. *J Orthop Res* 2012;30:1541-8.
247. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010;327:656-61.
248. Lioté F, Boval-Boizard B, Weill D, Kuntz D, Wautier JL. Blood monocyte activation in rheumatoid arthritis: increased monocyte adhesiveness, integrin expression, and cytokine release. *Clin Exp Immunol* 1996;106:13-9.
249. Kinne RW, Stuhlmüller B, Burmester GR. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2007;9:224.
250. Brühl H, Cihak J, Plachý J, et al. Targeting of Gr-1+, CCR2+ monocytes in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:2975-85.
251. Khan S, Greenberg JD, Bhardwaj N. Dendritic cells as targets for therapy in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2009;5:566-71.
252. Le Goff B, Berthelot JM, Maugars Y, Heymann D. Osteoclasts in RA: Diverse origins and functions. *Joint Bone Spine* 2013 [U tisku]
253. Shegarfi H, Naddafi F, Mirshafiey A. Natural killer cells and their role in rheumatoid arthritis: friend or foe? *ScientificWorldJournal* 2012;2012:491974.
254. Cope AP, Schulze-Koops H, Aringer M. The central role of T cells in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2007;5 Suppl 46:4-11.
255. Blüml S, McKeever K, Ettinger R, Smolen J, Herbst R. B-cell targeted therapeutics in clinical development. *Arthritis Res Ther* 2013;15 Suppl 1:S4.
256. Kim MS, Day CJ, Selinger CI, Magno CL, Stephens SR, Morrison NA. MCP-1-induced human osteoclast-like cells are tartrate-resistant acid phosphatase, NFATc1, and calcitonin receptor-positive but require receptor activator of NF $\kappa$ B ligand for bone resorption. *J Biol Chem* 2006;281:1274-85.
257. Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2004;19:2065-77.

## 11. ŽIVOTOPIS

### Marina Ikić Matijašević

Adresa:  
Klinička bolnica „Sveti Duh“ Zagreb  
Odjel za kliničku imunologiju i reumatologiju  
Sveti Duh 64  
10000 Zagreb  
Mobitel: 095 901 9569  
e-mail: ikic.marina@gmail.com

Kućna adresa:  
Stjepana Ljubića-Vojvode 16, 10000 Zagreb

Datum i mjesto rođenja:  
26. lipnja, 1983., Novi Sad

#### OBRAZOVANJE:

2001.-2007.: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, srednja ocjena 4.7  
2008.-2011.: Doktorski poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

#### AKADEMSKI NASLOV:

2007.: Doktor medicine

#### RADNO ISKUSTVO:

2007.-2008.: Pripravnički staž, Klinička bolnica „Merkur“, Zagreb  
2008.: Instruktor na EMBO tečaju - “Anatomija i embriologija miša”  
2008.-2009.: Znanstveni novak-asistent na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu i mlađi istraživač u Laboratoriju za molekularnu imunologiju na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, na projektu prof. dr. sc. Danke Grčević „*Molekularni mehanizmi učinaka imunskih poremećaja na kost*“  
2009.-: Specijalizacija iz interne medicine, Klinička bolnica „Sveti Duh“ Zagreb

#### ZNASTVENI RADOVI:

1. Artuković M, **Ikić M**, Kustelega J, Artuković IN, Kaliterna DM. Influence of UV radiation on immunological system and occurrence of autoimmune diseases. *Coll Antropol* 2010;34 Suppl 2:175-8.
2. Topić I, **Ikić M**, Ivčević S, Kovačić N, Marušić A, Kušec R, Grčević D. Bone morphogenetic proteins regulate differentiation of human promyelocytic leukemia cells. *Leuk Res* 2013;37:705-12.
3. **Ikić M**, Jajić Z, Lazić E, Ivčević S, Grubišić F, Marušić A, Kovačić N, Grčević D. Association of systemic and intra-articular osteoclastogenic potential, proinflammatory mediators and disease activity with the form of inflammatory arthritis [Rad prihvaćen za objavljivanje u *Int Orthop*]