

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Alan Šućur**

**Fenotipska i funkcijska  
karakterizacija osteoklastnih  
progenitora u bolesnika s  
reumatoidnim artritismom**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2017.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Alan Šućur**

**Fenotipska i funkcijska  
karakterizacija osteoklastnih  
progenitora u bolesnika s  
reumatoidnim artritisom**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2017.**

Disertacija je izrađena u Zavodu za fiziologiju i imunologiju  
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Voditelj rada: prof. dr. sc. Danka Grčević

Zahvaljujem prof.dr.sc. Danki Grčević na mentorstvu punom podučavanja, usmjeravanja, poticanja, predlaganja, uvažavanja, pomoći, razumijevanja i strpljenja. Zahvaljujem i svim članovima istraživačke grupe na pruženoj pomoći i podučavanju. Hvala mojoj obitelji, osobito suprugi Ivani i sinu Adrianu, na razumijevanju i podršci tokom izrade i pisanja ove disertacije.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Reumatoidni artritis .....	1
1.1.1. Osnovne značajke bolesti .....	1
1.1.2. Etiologija i patogeneza .....	3
1.1.3. Dijagnoza.....	7
1.1.4. Terapija.....	10
1.2. Gubitak kosti u reumatoidnom artritisu.....	12
1.2.1. Lokalni gubitak kosti .....	14
1.2.2. Sustavni gubitak kosti.....	14
1.2.3. Seronegativne spondiloartropatije .....	15
1.3. Osteoklasti i gubitak kosti izazvan upalom .....	17
1.3.1. Razvoj osteoklasta .....	17
1.3.2. Periferni osteoklastni progenitori .....	20
1.3.3. Uloga proupalnih citokina u gubitku kosti izazvanom upalom.....	26
1.3.4. Uloga kemokina u gubitku kosti izazvanom upalom .....	30
2. HIPOTEZA.....	33
3. CILJEVI I SVRHA ISTRAŽIVANJA .....	34
4. MATERIJALI I METODE.....	35
4.1. Bolesnici .....	36
4.2. Izolacija mononuklearnih stanica .....	37
4.3. Protočna citometrija.....	37
4.4. Razvrstavanje stanica .....	38
4.5. Diferencijacija osteoklasta iz razvrstanih mononuklearnih stanica periferne krvi .....	39
4.6. Test migracije .....	39
4.7. Identifikacija osteoklasta .....	40
4.8. Citometrijska metoda određivanja koncentracije proteina .....	41
4.9. Analiza izražaja gena.....	42
4.10. Kolorimetrijski imunoenzimski postupak ELISA .....	44
4.11. Statistička analiza .....	44
5. REZULTATI .....	46

5.1. Bolesnici koji boluju od reumatoidnog artritisa imaju visoku aktivnost bolesti s povišenim upanim, osteoresorptivnim i autoimunskim pokazateljima .....	46
5.2. Periferni osteoklastni progenitori bolesnika koji boluju od artritisa imaju specifične funkcionalne i fenotipske značajke .....	49
5.3. Periferni osteoklastni progenitori izražavaju kemokinske receptore te su izloženi povišenim plazmatskim koncentracijama kemokina .....	56
5.4. Razine kemokinskih receptora i liganda su povezane s kliničkim parametrima i ukazuju na njihovu biološku važnost u patogenezi i razvoju bolesti .....	62
5.5. Izražaj kemokinskih receptora je značajno promijenjen anti-TNF terapijom, sugerirajući ulogu kemokina u odgovoru na anti-TNF .....	65
5.6. Funkcionalna <i>in vitro</i> potvrda osteoklastogenog i kemotaksijskog učinka kemokina na periferne osteoklastne progenitore .....	68
6. RASPRAVA .....	73
6.1. Bolesnici i pokazatelji aktivnosti bolesti .....	73
6.2. Fenotipske i funkcionalne značajke osteoklastnih progenitora .....	74
6.3. Izražaj kemokinskih receptora na osteoklastnim progenitorima .....	76
6.4. Koncentracije kemokinskih liganda .....	77
6.5. Ograničenje studije .....	79
6.6. Periferni osteoklastni progenitori tijekom anti-TNF terapije .....	79
6.7. Osteoklastogeni učinak kemokina .....	80
6.8. Kemotaksijski učinak kemokina .....	81
6.9. Zaključak .....	82
7. ZAKLJUČCI .....	83
8. SAŽETAK .....	84
9. SUMMARY .....	85
10. LITERATURA .....	86
11. ŽIVOTOPIS .....	102

# POPIS KRATICA

aCCP - protutijelo na ciklički citrulinirani peptid, prema engl. *anti cyclic citrullinated peptide*

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

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

AP - alkalna fosfataza, prema engl. *alkaline phosphatase*

AP-1 - aktivirani protein 1

APC - alofikocijanin, prema engl. *allophycocyanine*

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

BMP - koštani morfogenetski proteina, prema engl. *bone morphogenetic protein*

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

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

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

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

CCL - kemokinski ligand s C-C motivom

CCR - receptor za C-C kemokin

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

CDAI - klinički indeks aktivnosti bolesti, prema engl. *clinical disease activity index*

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

c-Fms - receptor za čimbenik stimulacije kolonija makrofaga, CD115

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

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

CFU-GM - jedinica koja stvara kolonije granulocita i makrofaga, prema engl. *colony forming unit granulocyte macrophage*

COX-2 - ciklooksigenaza 2, prema engl. *cyclooxygenase 2*

CRP - C-reaktivni protein

CTRL - kontrola, prema engl. *control*

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

CXCL - kemokinski ligand s C-X-C motivom

CXCR - receptor za C-X-C kemokin

Cy - cijanin, prema engl. *cyanine*

DAP 12 - DNAX-aktivirajući protein 12, prema engl. *DNAX-activating protein 12*

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindolom, prema engl. *4',6-diaminidino-2-phenylindole*

DAS28 - indeks aktivnosti bolesti uključujući 28 zglobova, prema engl. *disease activity score with 28-joint count*

DIP - distalni interfalangealni zglob, prema engl. *distal interphalangeal*

Dkk1 – s Dickkopfum povezan protein 1, prema engl. *Dickkopf-related protein 1*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

G-CSF - čimbenik stimulacije kolonija granulocita, prema engl. *granulocyte colony stimulating factor*

GM-CSF - čimbenik stimulacije kolonija granulocita i makrofaga, prema engl. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*

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

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

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

IFN- $\gamma$  - interferon- $\gamma$

IgG - imunoglobulin G

IL – interleukin

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

IP-10 - protein 10 induciran putem IFN- $\gamma$ , prema engl. *IFN- $\gamma$ -inducible protein 10* (CXCL10)

ITAM - imunoreceptorski motiv baziran na tirozinu, prema engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*

MCP - metakarpofalangealni zglob, prema engl. *metacarpophalangeal*

MCP-1 - protein 1 kemoatraktant monocita, prema engl. *monocyte chemoattractant protein 1* (CCL2)

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

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

MIG - monokin induciran putem IFN- $\gamma$ , prema engl. *monokine induced by IFN- $\gamma$*  (CXCL9)

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

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

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

MMP9 - metaloproteinaza međustanične tvari 9, prema engl. *matrix metalloproteinase 9*

MR - magnetska rezonancija

MTX - metotreksat, prema engl. *methotrexate*

NFAT - jezgreni čimbenik aktiviranih limfocita T, prema engl. *nuclear factor of activated T lymphocytes*

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

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

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

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

OSCAR - receptor povezan s osteoklastima, prema engl. *osteoclast associated receptor*

PBMC - mononuklearne stanice iz periferne krvi, prema engl. *peripheral blood mononuclear cells*



PBS - otopina fosfatnog pufera, prema engl. *phosphate buffered saline*

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

PE - fikoeritrin, prema engl. *phycoerithrin*

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

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

PIR-A - upareni receptor nalik imunoglobulinu A, prema engl. *paired immunoglobulin like receptor A*

PsA - psorijatični artritis

PTPN22 - protein tirozinska fosfataza, prema engl. *protein tyrosine phosphatase N22*

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

RA - reumatoidni artritis

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

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

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

RF - reumatoidni faktor

rh - rekombinantni ljudski, prema engl. *recombinant human*

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

SDAI - jednostavni indeks aktivnosti bolesti, engl. *simple disease activity index*

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

SE - sedimentacija eritrocita

SF - sinovijalna tekućina, prema engl. *synovial fluid*

SIRP- $\beta 1$  - protein regulacije signala  $\beta 1$ , prema engl. *signal-regulatory protein  $\beta 1$*

SJC - broj upaljenih zglobova, prema engl. *swollen joint count*

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

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

TJC - broj bolnih zglobova, prema engl. *tender joint count*

TLR - receptor nalik Tollu, prema engl. *Toll-like receptor*

TNFR - TNF receptor

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

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

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

TREM2 - receptor-okidač izražen na mijeloidnim stanicama 2, prema engl. *trigger receptor expressed by myeloid cells 2*

VAS – procjena na vizualnoj mjeri, prema engl. *visual analogue scale*

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

VNR - vitronektinski receptor

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

# 1. UVOD

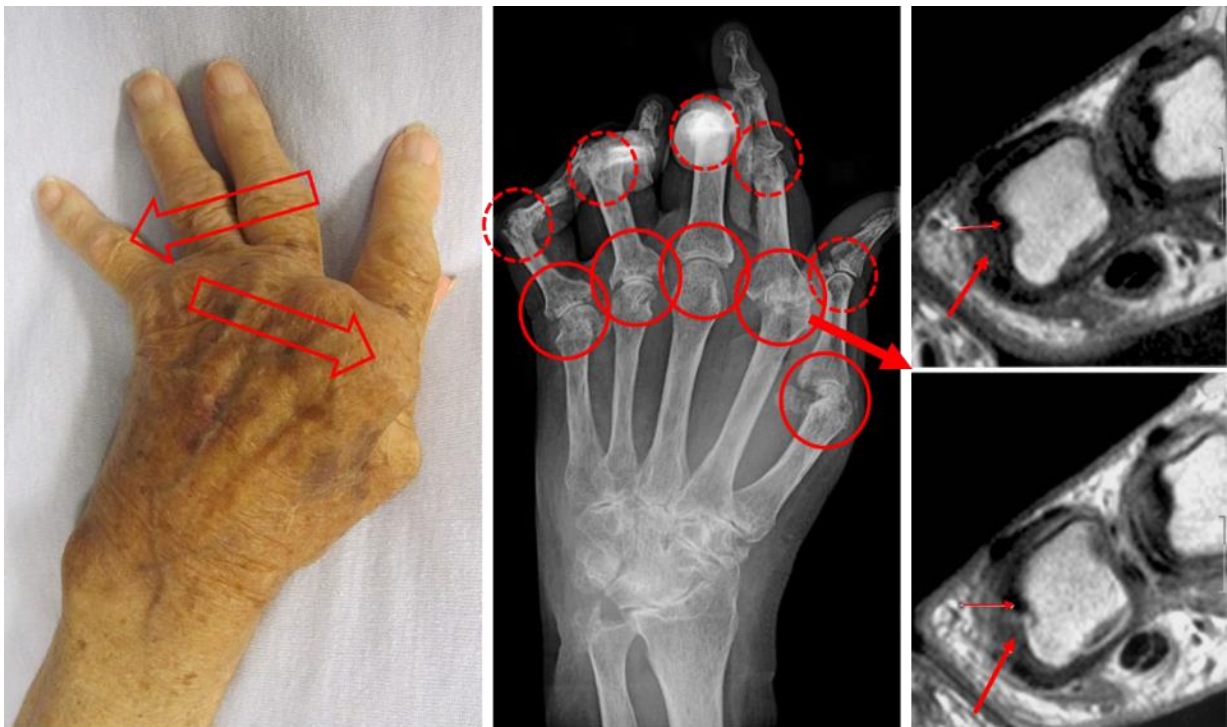
## 1.1. Reumatoidni artritis

### 1.1.1. Osnovne značajke bolesti

Reumatoidni artritis (RA) je kronična, sustavna, upalna bolest koja primarno zahvaća sinovijalne zglobove. Glavna značajka bolesti je poliartikularna upala povezana sa sinovitisom, osteitisom i periartikularnom osteopenijom, koju obilježavaju erozije subhondralne kosti i progresivno sužavanje zglobnih prostora. Iako se bolest obično postepeno razvija kao simetričan poliartritis, u nekih bolesnika može imati akutni početak s povremenom ili prolaznim zahvaćanjem različitih zglobova, ili kao artritis jednog zgloba. Simptomi artritisa utječu na bolesnikovu sposobnost obavljanja osnovnih aktivnosti (npr. hodanje, penjanje i silaženje po stepenicama, odijevanje, odlazak na zahod, ustajanje sa stolca, otvaranje staklenki ili vrata, tipkanje) i posljedično smanjuje radnu sposobnost, te, u slučaju nekontrolirane bolesti, mogu dovesti do deformacija i invaliditeta. Bolest obično započinje na distalnim zglobovima, a tijekom progresije se širi proksimalnije, uzrokujući znatnu lokomotornu nesposobnost tijekom razdoblja od 10 do 20 godina u ljudi koji ne reagiraju na terapiju. Tijek bolesti se sastoji od egzacerbacija i remisija, a oko 40% bolesnika postaje nesposobno za rad nakon desetak godina bolesti, najčešće zbog zglobnih deformacija. Osim što zahvaća koštano-zglobni sustav, RA je sustavna bolest koja zahvaća i druga tkiva i organe u više od 15-25% bolesnika, a izvanzglobne manifestacije mogu biti kožne i organospecifične. Sustavni simptomi mogu također biti prisutni u do trećine bolesnika, a očituju se kao izražena mialgija, umor, subfebrilnost, gubitak težine, te depresija. U bolesnika s dugotrajnom bolešću češće su izvanzglobne pojave poput anemije, potkožnih („reumatoidnih“) čvorića, episkleritisa, pleuroperikarditisa, neuropatije, splenomegalije, Sjögrenovog sindroma i vaskulitisa (1).

Tipična, „klasična“, klinička slika RA uključuje postepeni početak sa simptomima koji uključuju bol, ukočenost (osobito jutarnju) te oteknuća više zglobova. Bolnost i oteknuća zglobova posljedica su upale. Bol može biti prisutna pri dodiru i/ili pokretu, dok oteknuće zgloba može nastati zbog sinovijalne hipertrofije ili izljeva tekućine, ili kombinacije oboje. Obično su prvi zahvaćeni metakarpofalangealni (MCP, prema engl. *metacarpophalangeal*) i proksimalni interfalangealni (PIP, prema engl. *proximal interphalangeal*) zglobovi prstiju (Slika 1), interfalangealni zglobovi palaca, radiokarpalni zglob i metatarzofalangealni zglobovi nožnih palaca. Drugi sinovijalni zglobovi – radioulnarni, glenohumeralni, talokruralni te koljena, su također zahvaćeni u 20-50% bolesnika. Aksijalni kostur je obično pošteđen, s

rijeđom iznimkom cervikalne kralježnice u dugogodišnjih bolesnika. Bolnost metakarpofalangealnih i/ili metatarzofalangealnih zglobova s opipljivim zadebljanjem sinovije je karakteristično za RA. Crvenilo i toplina zahvaćenih zglobova obično nisu jako izraženi, iako su prisutni. Karakteristični deformiteti zglobova su kasne manifestacije bolesti. Iako je simetrična zahvaćenost zglobova karakteristična značajka bolesti, intenzitet upale i razaranja zgloba često zna biti izrazito asimetričan. Jutarnja zakočenost je čest simptom u bolesnika s aktivnim RA. Može se definirati kao usporenost ili poteškoća pomicanja zahvaćenih zglobova prilikom ustajanja iz kreveta, ili prilikom dugog mirovanja, a zahvaća obje strane tijela te se umanjuje prilikom kretanja. Iako se jutarnja zakočenost očituje u gotovo svim upalnim artropatijama, trajanje dulje od sat vremena je nešto što se u pravilu samo viđa u RA (3).



**Slika 1. Šaka zahvaćena reumatoidnim artritismom.** Fotografija lijevo prikazuje radijalnu devijaciju u području metakarpofalangealnih (MCP, prema engl. *metacarpophalangeal*) zglobova te ulnarnu devijaciju u području proksimalnih interfalangealnih (PIP, prema engl. *proximal interphalangeal*) zglobova. Rentgenogram u sredini vizualizira oštećenje te posljedične deformacije MCP (puna crta) i PIP (isprekidana crta) zglobova. Magnetska rezonanca desno prije (gore) i poslije (dolje) primjene kontrasta prikazuje lokalnu eroziju kosti u MCP zglobu (tanka strelica) te hipertrofiranu sinovijalnu ovojnici pokraj nje (deblja strelica). Vizualni materijal ljubazno ustupljen dopuštenjem kolega liječnika James Heilmana, Martin Steinhoffa te Marcin Szkudlarek.

Samu bolest karakterizira izrazita varijabilnost tijeka i težine kliničke slike, koja se očituje u različitom broju i vrsti zahvaćenih zglobova, fluktuacijama u aktivnosti bolesti, različitim odgovorima na terapiju te brzine progresije i intenziteta strukturalnog oštećenja. Spontana remisija je rijetka, a prirodni tijek bolesti je gotovo uvijek obilježen trajnim smetnjama, fluktuacijama u aktivnosti bolesti u trajanju od nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci s povećanjem ili smanjenjem simptoma, te progresivnim razaranjem zglobnih struktura što dovodi do deformacija i invalidnosti. Zbog svega navedenog, ključno je što ranije započeti terapiju s ciljem suzbijanja upale i prevencije razaranja kosti i zglobne hrskavice te nastanka izvanzglobnih manifestacija. RA pogađa između 0,5 i 1% odraslih osoba u razvijenim zemljama, s godišnjom incidencijom između 5 i 50 na 100.000 ljudi. Bolest se najčešće pojavljuje u žena između 40 i 50 godina starosti, a u muškaraca nešto kasnije, premda je uočen pomak početka bolesti prema starijim dobnim skupinama. Žene obolijevaju tri puta češće od muškaraca, ali razlike pobola prema spolu nestaju u starijim dobnim skupinama. RA je uzrok 38.000 smrti u 2013. godini, u usporedbi s 28.000 smrtnih slučajeva u 1990. godini. Bolest skraćuje životni vijek u prosjeku od tri do dvanaest godina. Povećana smrtnost ovih bolesnika je uglavnom zbog ubrzanog nastanka i razvoja kardiovaskularnih bolesti, osobito u onih bolesnika s visokom aktivnošću bolesti i jakom kroničnom upalom. Dobar odgovor na terapiju može ukazivati na bolju prognozu. Novije studije upućuju na mogućnost da će upotreba novih bioloških terapija lijekovima produžiti životni vijek bolesnika koji boluju od RA te smanjiti rizik i progresiju ateroskleroze (3).

### **1.1.2. Etiologija i patogeneza**

Dosadašnji uvid u patogenezu RA otkriva interakciju genotipa, okolišnih čimbenika i vjerojatnosti, te se još uvijek ne može potpuno objasniti heterogenost bolesti. Bolest uključuje i aktivaciju limfocita T, makroskopski uočljivu stvaranjem reumatoidnih čvorića, i aktivaciju limfocita B, koja se očituje proizvodnjom protutijela na vlastite antigene. Mikroskopskim proučavanjem sinovijalnog tkiva zahvaćenih zglobova vidi se gusta, ali nespecifična infiltracija upalnih stanica –limfocita T i B, neutrofila, makrofaga i mastocita. Upalni odgovor je potaknut i usmjeravan složenom citokinskom mrežom u kojoj su makrofagi ključne stanice koje izlučuju proupalne citokine u upaljenoj sinoviji zgloba. Također je poznato da se imunološki odgovor mijenja trajanjem bolesti, pri čemu limfociti T imaju važniju ulogu u ranim stadijima (5). Upala u sinoviji rezultira stvaranjem destruktivnog panusa koji može dovesti koštanih erozija i posljedičnih deformiteta te smanjenja ili čak gubitka funkcije zgloba. Noviji radovi pokazuju

da edem koštane srži, vidljiv na magnetskoj rezonanci, može predvidjeti nastanak budućih erozija, što upućuje na mogućnost da proces erozije možda zapravo započinje u samoj kosti (6). Autoimunosna priroda RA je postala očita s Waalerovim i Roseovim otkrićem reumatoidnog faktora (RF) u serumu bolesnika, a za kojeg je kasnije utvrđeno da je protutijelo usmjereno na Fc segment imunoglobulina G (IgG). Iako je prvotna hipoteza etiopatogeneze bolesti bila stvaranje imunokompleksa s posljedičnom aktivacijom komplementa i oslobađanjem kemotaksijskih faktora, nije joj išlo u prilog prisutnost RF u zdravih starijih ljudi te u drugim autoimunskim bolestima ili infekcijama bez zahvaćanja zglobova. Kasnije su u serumima bolesnika nađena i druga protutijela na vlastite antigene, uključujući ona koja se vežu na citrulinirane proteine. Citrulinizacija je posttranslacijska modifikacija aminokiseline arginin, najčešće povezivana s procesom apoptoze. Takva protutijela usmjerena na citrulinirane peptide (ACPA, prema engl. *anti-citrullinated peptide antibodies*) se nalaze u 60-70% bolesnika koji boluju od RA, rijetko u drugim bolestima, a mogu biti prisutna i do dvadeset godina prije pojave simptoma (6). Kasnije je pokazano kako ACPA mogu izravno potaknuti diferencijaciju osteoklasta i razgradnju kosti, neovisno o drugim čimbenicima ili stanicama te se sustavni gubitak kosti i osteoporoza u RA čine dijelom posredovani učincima ACPA. Uočeno je da je sializacija protutijela razreda IgG jedan od glavnih regulatora proosteoklastogenog potencijala imunokompleksa, s obzirom da samo nesializirani imunokompleksi potiču osteoklastogenezu u RA, te da bolesnici s niskom razinom sializacije IgG i ACPA imaju lošiju koštanu mikrostrukturu. Takva resorpcija kosti se događa i u odsustvu upale te je nađena i u zdravih ljudi koji su ACPA-pozitivni (7).

Izrazito povišene razine Th1-citokina, kao što je interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ , prema engl. *interferon  $\gamma$* ), te relativno nepromijenjene razine Th2-citokina, kao što su interleukin (IL)-4, IL-5 i IL-12, podupirale su hipotezu o RA kao bolesti Th1-kraka imunološke reakcije. No, to gledište se izmijenilo otkrićem Th17-stanica, subpopulacije regulacijskih limfocita T koji proizvode IL-17. Proizvodnju IL-17 iz tih stanica potiče IL-23 koji dijeli jednu podjedinicu s IL-12. Važnost tih citokina potvrđuje pronalazak povećanih koncentracija IL-17 i IL-23 u serumima bolesnika koji boluju od RA u odnosu na kontrole s osteoartritisom (8). Uz to, miševi kojima nedostaje IL-23 otporni su na razvijanje artritisa u modelu artritisa potaknutog kolagenom– mišjg modela RA. Th17-stanice proizvode čimbenik nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , prema engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ), IL-6, IL-17, IL-22 te čimbenik stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (GM-CSF, prema engl. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), za koje je poznato da su važni u nastanku upale. IL-17 je važan stimulator daljnje proizvodnje citokina, uključujući IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-23, GM-CSF, čimbenika stimulacija kolonija granulocita (G-CSF, prema

engl. *granulocyte colony stimulating factor*), čimbenika rasta krvožilnog endotela (VEGF, prema engl. *vascular endothelial growth factor*) i ciklooksigenaze 2 (COX-2, prema engl. *cyclooxygenase 2*) te time potiče daljni razvoj upale. Th17-stanice su stoga postaje jedan od glavnih fokusa daljnjeg istraživanja patogeneze i mogućih terapija RA (9). Aktivirani makrofagi u sinoviji zahvaćenih zglobova imaju ključnu ulogu u održavanju kronične upale. Osim interakcije s limfocitima T i fibroblastima, makrofagi proizvode proupalne citokine, izražavaju receptore nalik Tollu (TLR, prema engl. *Toll-like receptor*) te su uključeni u preradbu i predočavanje antigena. Uz to, imaju sposobnost fagocitoze i sudjeluju u remodeliranju tkiva. Pošto estrogen inhibira izlučivanje IL-1 iz njih, to je mogući razlog zašto mnoge oboljele žene tijekom trudnoće dožive poboljšanje simptoma RA (10).

Postojanje protutijela na vlastite antigene, nastanak struktura u sinoviji zahvaćenih zglobova nalik zametnim središtima limfnih čvorova i dobar odgovor na uklanjanje limfocita B sugeriraju važnost te loze u patogenezi bolesti. Limfociti B imaju nekoliko uloga u stečenoj i urođenoj imunosti, uključujući prezentaciju antigena te proizvodnju protutijela i citokina. TLR-ovi predstavljaju vezu između stečene i urođene imunosti na limfocitima B. Ti receptori mogu vezati hipometilirane CpG-sekvence na bakterijskoj ili mitohondrijskoj deoksiribonukleinskoj kiselini (DNA, prema engl. *deoxyribonucleic acid*), jednolančanoj ribonukleinskoj kiselini (RNA, prema engl. *ribonucleic acid*) ili komponente bakterijske stijenke te je pokazano da mitohondrijska DNA iz apoptotičnih stanica može ovim putem potaknuti autoreaktivne limfocite B (11).

Gubitak tolerancije na vlastito je ključan okidač za razvoj autoimunosti. S obzirom da se RA pojavljuje u dobi kada je funkcija timusa izrazito smanjena, vjerojatno se radi o poremećaju periferne, a ne središnje tolerancije. Nije poznato što bi mogao biti specifični okidač, ali se repertoar limfocita T u RA razlikuje od zdravih ljudi, među ostalim, skraćenim telomerama koje upućuju na rano starenje te je i do deset puta siromašniji. Pošto proliferacija naivnih limfocita T ovisi o stimulaciji antigenom, ovo će tijekom vremena dovesti do repertoara limfocita T s povećanim afinitetom za vlastito. Stoga se pretpostavlja da poremećena selekcija u timusu zajedno s perifernom selekcijom tijekom vremena predisponira osjetljivu osobu za razvoj autoimunosne bolesti (12).

Poznati genetski čimbenici nisu ni nužni niti dovoljni za razvoj RA, ali imaju važnu ulogu u sklonosti za razvoj bolesti. Studije blizanaca ukazale su da su genetski čimbenici odgovorni za 50% varijabilnosti u prevalenciji RA. Bolest se razvija u oba jednojajčana blizanca u 15 do 30% slučajeva, dok u oba dvojajčana u 5% slučajeva. Širokogenomske analize pokazuju da genetičku osnovu bolesti čine čimbenici koji reguliraju imunološku reakciju, među kojima je

osobito istaknut kompleks gena i antigena tkivne podudarnosti, odnosno ljudski leukocitni antigen (HLA, prema engl. *human leukocyte antigen*)-DR, a kojem se pripisuje 30% ukupnog genskog utjecaja na razvoj bolesti. Varijacije u uskom segmentu sekvence treće hipervarijabilne regije  $\beta$  lanca HLA-DR povećavaju ili smanjuju rizik od ACPA-pozitivnog RA, modulirajući odgovor limfocita T (13). Sekvenca koja povećava rizik od RA nalazi se u 8 različitih alela HLA-DR te se naziva „zajedničkim epitopom“, a oboljele osobe koje imaju jedan od tih alela obično imaju teži, erozivniji oblik bolesti te je učinak dodatno pojačan u homozigota. Daljnja istraživanja uočila su vezu između HLA-DR3 lokusa i ACPA-negativnog RA, za kojeg se pretpostavlja da povećava rizik za stvaranje još neotkrivenog protutijela na vlastito. Također je uočena i povezanost polimorfizma gena za tirozin fosfatazu (PTPN22, prema engl. *protein tyrosine phosphatase N22*), enzima koji inhibira prijenos signala receptora limfocita T, s razvojem ACPA-pozitivnog RA i nekih drugih autoimunskih bolesti, vjerojatno zbog neodgovarajuće selekcije limfocita T u timusu (14).

Dosta pažnje se pridaje i okolišnim čimbenicima, obzirom da genetski čimbenici ne mogu potpuno objasniti sklonost za razvoj bolesti. Istraživana je uloga raznih patogena koji su povezivani s razvojem RA, uključujući Epstein-Barrov virus, Parvovirus B19, mikobakterije, razne sojeve *Proteusa* i *Escherichije coli* te njihovih produkata (npr. proteini toplinskog šoka). Do danas, nisu otkriveni specifični patogeni antigeni koji bi potaknuli razvoj RA, te hipoteza molekularne mimikrije još uvijek ostaje nepotvrđena s obzirom na nedostatak dokaza.

Okolišni čimbenik s najviše dokaza o povezanosti s razvojem RA je pušenje cigareta, za koje postoji veza između broja kutija cigareta po godini i rizika od razvoja RA, a rizik može biti i do 21 puta veći u pušača, pri čemu pušenje povećava rizik od ACPA-pozitivnog RA, ali ne i negativnog te je rizik povećan u onih sa spomenutim zajedničkim epitopom. Pretpostavlja se da pušenje uzrokuje apoptozu u plućima s posljedičnim stvaranjem citruliniranih peptida, te da tvari u cigaretnom dimu dodatno potiču izlučivanje IL1- $\beta$ , IL-6 i IL-8, ali i smanjuju unutarstanične razine aktivnog metotreksata, doprinoseći lošem ishodu u terapiji pušača (15).

S razvojem bolesti povezani su i drugi okolišni čimbenici kao pijenje kave i/ili alkohola, periodontitis, izloženost mineralnim uljima te indeks tjelesne mase, ali bez toliko jasne i izražene veze kao za pušenje. Trudnoća je također rizični okidač, s obzirom da 12% bolesnica razvije bolest u godini nakon poroda. Osim povećanog rizika za razvoj bolesti, protutijela na vlastite antigene, genetski čimbenici, pušenje i slab socioekonomski status su povezani i s lošom prognozom (16).



### 1.1.3. Dijagnoza

Američki koledž reumatologije (ACR, prema engl. American College of Rheumatology,) i Europska liga protiv reumatizma (EULAR, prema European League Against Rheumatism) su 2010. godine zajedno donijeli smjernice za klasifikaciju RA nazvane 2010 ACR/EULAR, po čijim kriterijima je napravljena bodovna ljestvica od 0 do 10. Sama klasifikacija je prvenstveno orijentirana na identifikaciju bolesti s visokim rizikom razvoja kroničnog oblika artritisa, a tek 6 ili više bodova neupitno označava osobu koja boluje od RA. Kriteriji obuhvaćaju četiri područja: zahvaćenost zglobova, serološke parametre (postojanje te razina RF i ACPA), reaktante akutne faze (povišene vrijednosti sedimentacije eritrocita (SE) ili C-reaktivni proteina (CRP)), te trajanje artritisa 6 tjedana ili dulje. Za razliku od starijih kriterija iz 1987. godine, u kojima se pridavala važnost radiološki vidljivim oštećenjima, u novijoj klasifikaciji naglasak je na autoimunim komponentama i serologiji, s ciljem ranijeg postavljanja dijagnoze RA u bolesnika koji ne bi mogli biti dijagnosticirani klasifikacijom iz 1987. godine. Novi kriteriji ne uključuju prisutnost reumatoidnih čvorića ili radiološki evidentirane erozije, koji su manje vjerojatni u ranijim stadijima RA. Simetrični artritis također nije potreban po novim kriterijima, čime se omogućuje dijagnoza RA i pri ranoj asimetričnoj slici (17).

Patološki nalazi iz krvi uključuju čestu prisutnost ACPA i/ili RF, povišene reaktante akutne faze te anemiju kronične bolesti (u 33% do 60% svih bolesnika). Oko 75 do 80% bolesnika koji boluju od RA je pozitivno na RF, ACPA, ili oboje. Takvi bolesnici su definirani da imaju tzv. "seropozitivni" RA, a prisutnost protutijela ima dijagnostičku, terapijsku i prognostičku vrijednost. Oko četvrtine do trećine bolesnika ima također antinuklearna protutijela. RF može biti pozitivan i u drugim bolestima, kao npr. sistemskom lupusu eritematozusu, Sjogrenovu sindromu, hepatitisu C, pa i u 10% zdrave populacije, obično u starijih ljudi. Reumatoidni faktor je često negativan tijekom prve godine bolesti, s tendencijom konverzije u seropozitivnost tijekom vremena. Zbog relativno niske specifičnosti RF, mjeri se i razina ACPA, od kojih se najčešće testira protutijelo na ciklički citrulinirani peptid (aCCP, prema engl. *anti cyclic citrulinated peptide*). Ta protutijela imaju nešto manju osjetljivost (pozitivna u 60-75% bolesnika), no veću specifičnost (oko 95%) te su, kao i RF, prisutna i u dijelu bolesnika prije kliničke manifestacije bolesti. Reaktanti akutne faze uključuju SE i razinu CRP-a te su obično povišene u bolesnika i koreliraju s aktivnošću bolesti, iako ponekad ne moraju biti povišeni u blagoj bolesti (18).

**Tablica 1. Klasifikacijski kriteriji Američkog koledža za reumatologiju iz 2010. godine za reumatoidni artritis**

Vrsta kriterija	Razina kriterija	Bodova (≥6 ukupno označava reumatoidni artritis)
Zahvaćaj zglobova		
	1 veliki zglob	0
	2-10 velikih zglobova	1
	1-3 mala zglobova (sa ili bez velikih zglobova)	2
	4-10 malih zglobova (sa ili bez velikih zglobova)	3
	>10 zglobova (barem 1 mali)	5
Serologija		
	negativan RF i ACPA	0
	nisko pozitivan RF ili ACPA	2
	visoko pozitivan RF ili ACPA	3
Reaktanti akutne faze		
	normalni CRP i SE	0
	povišen CRP ili SE	1
Trajanje simptoma		
	<6 tjedana	0
	>6 tjedana	1

\* RF, reumatoidni faktor; ACPA, protutijela na citrulinirane peptide (prema engl. anti citrullinated protein antibodies); CRP, C-reaktivni protein; SE, brzina sedimentacije eritrocita.

U bolesnika koji boluju od RA nastaju suženja zglobnog prostora i koštane erozije, što je vidljivo na rentgenogramima ruku i nogu. U ranoj fazi bolesti, rentgenogram ne mora pokazivati promjene, ili može pokazati jukstaartikularnu osteopeniju, edem mekog tkiva te suženje zglobnog prostora. Iako promjene mogu biti prisutne pri prvom pregledu, češće postaju vidljive tijekom daljnjeg razvoja bolesti. Erozije hrskavice i kosti su među glavnim obilježjima RA. Međutim, također mogu biti prisutne kod nekih drugih oblika upalnih artropatija i stoga

nisu patognomonične za RA. Erozijske u MCP i PIP zglobovima vidljive su na rentgenogramu u 15% do 30% bolesnika u prvoj godini bolesti. U bolesnika koji ne reagiraju na terapiju, ukupna učestalost erozija je 90% do kraja druge godine bolesti. Također može biti prisutno suženje zglobnog prostora. Radiološki vidljiva oštećenja često su naglašenija na dominantnoj ruci. U iznimnom oštećenju, jačina erozija može dosegnuti razinu iznad koje daljnju progresiju ne možemo procijeniti radiološki. Ultrazvukom s visokim frekvencijama (10 MHz i više) koštane erozije se mogu prikazati i bolje nego radiografijom, a Doppler-prikazom se može vizualizirati prokrvljenost sinovije, koja ovisi o jačini upale te je korisna u procjeni njene jakosti. To je osobito važno u ranim fazama RA, kada je prvenstveno zahvaćen sinovij, a čija zahvaćenost je jedna od najboljih prediktivnih markera bolesti. Doppler ultrazvuk i kontrastna magnetska rezonancija (MR) u 75% bolesnika daju sličan nalaz te otkrivaju patologiju u zglobovima koji nisu vidljivo natečeni ili upaljeni. MR omogućava višestruko bolju detekciju erozija u odnosu na rentgenogram, omogućuje kvantifikaciju proliferacije sinovije, te otkrivanje i prikaz edema koštane srži – prediktivnog markera kasnijeg razvoja erozivne bolesti (19).

Poznato je više od 60 mjera za praćenje aktivnosti bolesti i remisije RA. No, samo šest ima preporuku ACR-a kao mjere koje točno odražavaju aktivnost bolesti, osjetljive su na promjene, dobro razlikuju između niske, srednje i visoke aktivnosti, imaju kriterij za remisiju te su lako primjenjive u kliničkom okruženju. Od tih šest, indeks aktivnosti bolesti uključujući 28 zglobova (DAS28, prema engl. *disease activity score with 28-joint count*), klinički indeks aktivnosti bolesti (CDAI, prema engl. *clinical disease activity index*) i jednostavni indeks aktivnosti bolesti (SDAI, prema engl. *simple disease activity index*) se najčešće koriste. DAS28 je vrlo dobar pokazatelj aktivnosti RA i odgovora na liječenje. Uključuje sljedeće zglobove (bilateralno): PIP zglobovi (10), MCP zglobovi (10), zglobovi (2), laktovi (2), ramena (2) i koljena (2). Zglobovi se broje po broju bolnih (TJC, prema engl. *tender joint count*) i broju otečenih (SJC, prema engl. *swollen joint count*). Osim afekcije zglobova, u standardnu formulu je uključena i izmjerena SE te bolesnikova procjena aktivnosti bolesti tijekom prethodnih 7 dana na vizualnoj mjeri koja se boduje od 0 do 10, pri čemu 0 znači da "nema nikakve aktivnosti", a 10 je "najveća moguća aktivnost". CDAI dodaje liječnikovu procjena aktivnosti bolesti, dok SDAI koristi CRP kao upalni parametar (20).

**Tablica 2. Najčešće korištene mjere aktivnosti bolesti u reumatoidnom artritisu**

	Formula za izračunavanje	Velika aktivnost	Blaga/umjerena aktivnost	Remisija
DAS28	$0,54 \times \sqrt{\text{TJC}} + 0,039 \times \text{SJC} \times \ln(\text{SE}) + 0,0013 \times \text{bolesnikVAS}$	>5,1	3,2-5,1	<2,6
SDAI	TJC + SJC + liječnikVAS + CRP	>26	11-26	<3,3
CDAI	TJC + SJC + liječnikVAS	>22	10-22	<2,8

\* DAS28, indeks aktivnosti bolesti uključujući 28 zglobova (prema engl. *disease activity score with 28-joint count*); CDAI, klinički indeks aktivnosti bolesti (prema engl. *clinical disease activity index*); SDAI, jednostavni indeks aktivnosti bolesti (prema engl. *simple disease activity index*); TJC, broj bolnih zglobova (prema engl. *tender joint count*); SJC, broj otečenih zglobova (prema engl. *swollen joint count*); CRP, C-reaktivni protein; SE, brzina sedimentacije eritrocita; bolesnikVAS, bolesnikova procjena aktivnosti bolesti vizualnom mjerom (prema engl. *patient visual analogue scale*); liječnikVAS, liječnikova procjena aktivnosti bolesti vizualnom mjerom (prema engl. *physician visual analogue scale*).

#### 1.1.4. Terapija

Izliječenje RA nije trenutno moguće, ali liječenje može umanjiti simptome i usporiti napredovanje bolesti. Ciljevi terapije uključuju smanjivanje boli i otečenosti zglobova, sprečavanje koštanih erozija i posljedičnih deformacija, održavanje kvalitete života, te kontrolu izvanzglobnih manifestacija. Idealno se želi postići remisija bolesti, iako je niska aktivnost bolesti prihvatljiva alternativa. To se često može postići pomoću dvije glavne vrste lijekova: analgetika kao što su nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID, prema engl. *nonsteroid antiinflammatory drugs*) i antireumatski lijekovi koji modificiraju bolest (DMARD, prema engl. *disease modifying antirheumatic drugs*). Ukoliko se nakon 3-6 mjeseci terapija pokaže nedjelotvornom, predlaže se izmjena terapije (21).

DMARD su glavni oslonac terapije za RA te njihova primjena daje najbolje rezultate kada je započeta rano (sugerirajući tzv. povoljan vremenski okvir), te agresivno, s mogućnošću remisije u do 50% bolesnika - naglašavajući višestruku prednost rane intenzivne terapije. Lijekovi ove skupine smanjuju simptome i oštećenja zglobova te poboljšavaju funkcionalnu sposobnost. DMARD mogu biti biološki ili nebiološki. Klasični, nebiološki, DMARD su metotreksat (MTX, prema engl. *methotrexate*), hidroksiklorokin, sulfasalazin i leflunomid. Najčešće

korišteni DMARD je MTX, kao najvažniji i obično prvi lijek, a rjeđe se primjenjuju i sulfasalazin te leflunomid. Toksične nuspojave uključuju gastrointestinalne (smanjuju se uzimanjem folne kiseline), hematološke, plućne i jetrene (povišenje krvne razine jetrenih enzima u 15% ljudi). Kombinirana terapija s dva ili više DMARD je učinkovitija od monoterapije, no i nuspojave su također izraženije (22).

Biološki lijekovi se u principu koriste samo ako MTX i drugi klasični DMARD nisu pokazali djelotvornost nakon razdoblja od tri mjeseca primjene. Biološke DMARD čine monoklonska protutijela i rekombinantni receptori za blokiranje proupalnih citokina. U njih pripadaju inhibitori TNF- $\alpha$  (adalimumab, etanercept, golimumab, infliximab, certolizumab), blokator kostimulacije limfocitima T preko staničnog biljega 80 (CD80, prema engl. *cluster of differentiation 86*) i CD86 (abatacept), monoklonska protutijela protiv markera CD20 limfocita B (rituksimab), receptora za IL1 (anakinra), te receptora za IL-6 (tocilizumab). Ta skupina lijekova povezana je s višom stopom ozbiljnih infekcija u usporedbi s drugim DMARD. Inhibitori TNF- $\alpha$  i MTX imaju sličnu učinkovitost kada se koriste pojedinačno, a bolji rezultati se postižu kada se koriste zajedno te se stoga često primjenjuju u kombinaciji. Različiti inhibitori TNF- $\alpha$  pokazuju sličnu učinkovitost, s tim da se etanercept čini najsigurnijim. Tocilizumab pokazuje sličnu učinkovitost kao i inhibitorima TNF- $\alpha$ . Rituksimab i abatacept pokazuju u oko petine ljudi boji odgovor nego monoterapija klasičnim DMARD. Problematičan je nedostatak podataka kako bi se pouzdano razlikovala učinkovitosti pojedinih skupina bioloških lijekova. Problem su i visoke cijene te povezanost s infekcijama, uključujući tuberkulozu. Kombinirana primjena više bioloških lijekova se ne preporuča zbog neprihvatljivo visoke stope nuspojava (23).

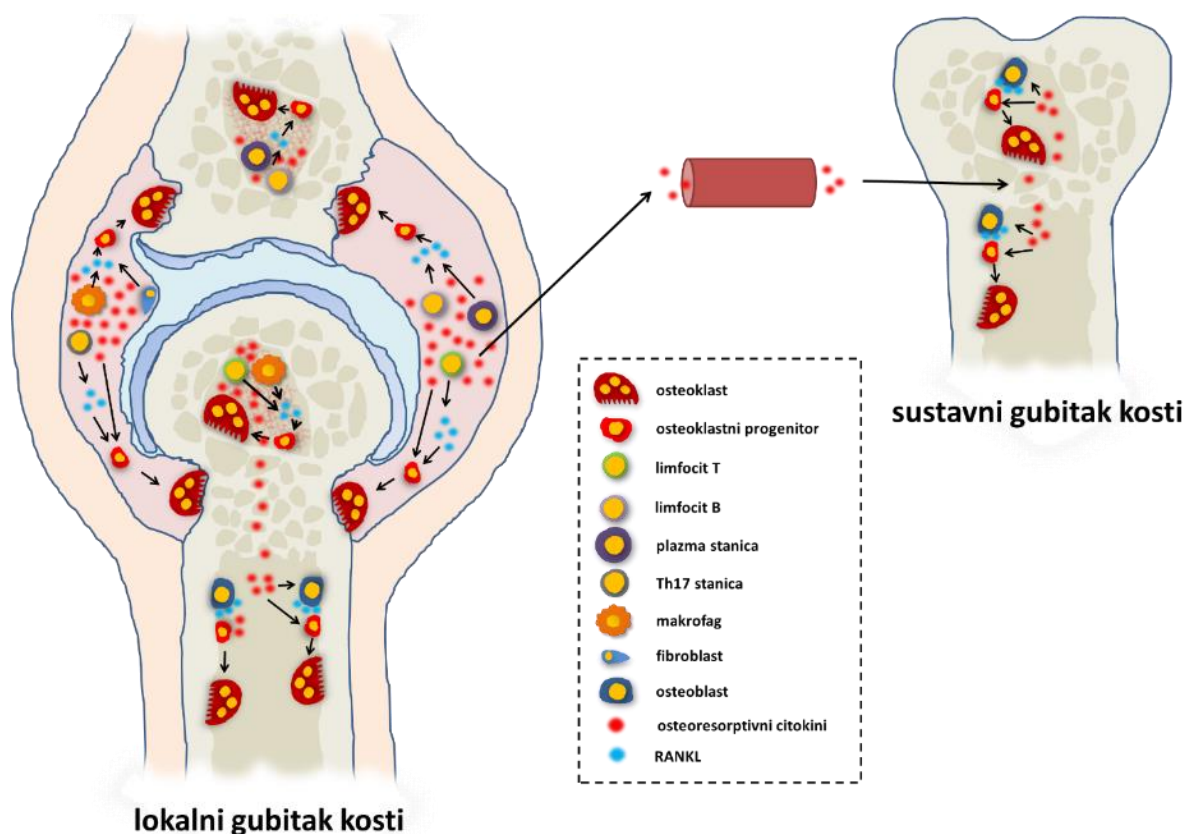
NSAID smanjuju bol i ukočenost u bolesnika koji boluju od RA. Ne koriste se kao prva linija terapije pošto nemaju utjecaj na dugoročni tijek ili razvoj erozivne bolesti. Iako je upotreba zajedno s MTX sigurna, trebaju se s oprezom koristiti s obzirom na rizik od gastrointestinalnih, kardiovaskularnih ili nefroloških nuspojava pri primjeni NSAID-a. Glukokortikoidi se mogu koristiti u tijekom kratkih razoblja, za egzacerbacije, dok se čeka razvoj odgovora na sporije djelujuće lijekove. Injekcije glukokortikoida u pojedine zglobove također su učinkovite. Međutim, iako dugoročno korištenje glukokortikoida smanjuje oštećenja zglobova, ono također rezultira osteoporozom i osjetljivošću na infekcije te se zbog toga ne preporučuje. U idealnom slučaju, NSAID i kortikosteroidi se koriste samo za kratkoročnu kontrolu bolesti, a DMARD su preferirana terapija (24).

U ranim fazama bolesti, ponekad se rade artroskopske ili otvorene sinovijektomije koje mogu usporiti uništenje pogođenih zglobova. Zahvaćeni zglobovi u kasnijoj bolesti mogu zahtijevati operacije zamjene zgloba, kao što je zamjena koljena, praćene s fizikalnom terapijom (25).

Uz intenzivnu terapiju, remisija se može ostvariti u 10% do 50% bolesnika koji boluju od RA, ovisno o tome kako se definira remisija i intenzitet terapije. Remisije su češće u muškaraca, nepušača, osoba mlađih od 40 godina, kod onih s kasnim nastupom bolesti (stariji od 65 godina), s kraćim trajanjem bolesti, s manjom aktivnošću bolesti, bez povišenih reaktanata akutne faze, te negativnih na RF ili ACPA (26).

## **1.2. Gubitak kosti u reumatoidnom artritisu**

Tradicionalni model patogeneze RA kao središnji događaj smatra upalu sinovije s hiperplazijom vaskularizacije, nakupljanjem makrofaga, plazma stanica, limfocita T i B, dendritičnih stanica, stanica NK i mastocita. Upaljena sinovija potom djeluje na susjedne strukture (zglobnu hrskavicu, kortikalnu kost i podležecu koštanu srž) te dovodi do tipičnih znakova i simptoma RA (bolovi u zglobovima, ukočenost, otekline i strukturalne promjene). Međutim, ovaj sinovijo-centrični model bolesti je izmijenjen nakon saznanja da se bolest širi i izvan upaljene sinovije te uključuje druge anatomske odjeljke. Kao posljedica upale i pojačanog stvaranja proupalnih citokina, razvija se lokalno i sustavno oštećenje kosti. U RA možemo razlikovati tri oblika oštećenja kosti: lokalne koštane erozije, periartikularni gubitak kosti i generaliziranu osteoporozu (Slika 2) (27).



**Slika 2. Gubitak kosti u reumatoidnom artritisu.** Gubitak kosti u reumatoidnom artritisu izazvan je složenom interakcijom imunskih i koštanih stanica. Imunosne stanice, uključujući limfocite T i B, makrofage, neutrofile, dendritične stanice stanice NK infiltriraju reumatoidnu sinoviju koja tijekom kroničnog upalnog stanja djeluje na susjedna tkiva, uzrokujući oštećenje zgloba. Ove stanice urođene i stečene imunosti snažno potiču diferencijaciju osteoklastnih progenitora proizvodnjom proupalnih citokina koji djeluju osteoresorptivno i liganda receptora za aktivator jezgrenog čimbenika  $\kappa B$  (RANKL, prema engl. *receptor activator of nuclear factor- $\kappa B$  ligand*). Uz to, sinovijalni fibroblasti i osteoblasti pridonose diferencijaciji osteoklasta u upalnim stanjima. Panus je hiperplazirani dio sinovije koji je bogat osteoklastima, dobro prožiljen te uništava kost, dok enzimi izlučeni iz neutrofila, sinovijocita i hondrocita razgrađuju hrskavicu. Zreli osteoklasti, kao izravni uzročnici gubitka kosti, aktivniji su i na lokalnoj i na sustavnoj razini, što rezultira subhondralnim i periartikularnim gubitkom kosti te sustavnom osteoporozom. Modificirano prema Flegar D, Šućur A, Markotić A, Kovačić N, Grčević D. Osteoporosis in the View of Osteoimmunology: Common Feature Underlined by Different Pathogenic Mechanisms. *Period Biol.* 2015;117(1).

### 1.2.1. Lokalni gubitak kosti

Lokalne koštane erozije su najznačajniji oblik gubitka kosti u RA, a nastaju u području subhondralne kosti, odnosno u prostoru između zglobne hrskavice, mjesta pripajanja sinovijalne ovojnice na periost i podležeće kosti. Koštane erozije posljedica su razaranja kosti osteoklastima, čija je diferencijacija iz monocitno/makrofagne linije na mjestu doticaja panusa i kosti potaknuta proupalnim citokinima iz sinovije. Diferencijacija i aktivacija osteoklasta dovodi i do prekida tanke barijere između sinovijalnog odjeljka i odjeljka koštane srži, omogućujući njihovu izravnu komunikaciju, što su potvrdila radiološka i histopatološka istraživanja. Iako su se brojna istraživanja fokusirala na sinovijalno tkivo i tekućinu s obzirom da su to razmjerno lako dostupni uzorci, primjena modernih radioloških pretraga, primjerice MR, otkrila je da se promjene koštane srži uz zglob mogu pojaviti i prije nego što se pojavila komunikacija sa sinovijom. Te promjene se na MR očituju smanjenjem masnog tkiva i nakupljanjem vode (edem koštane srži), a histopatološki zamjenom masnog tkiva upalnim tkivom u kojem dominiraju limfociti (osteitis). Suvremene imunohistokemijske tehnike su pokazale infiltrate zrelih limfocita B i aktiviranih limfocita T, uz plazma stanice, makrofage i hiperplaziju vaskularizacije – nalaz sličan onom u upaljenoj sinoviji. Te stanice su smještene uz trabekularnu kost, gdje je nađen veći broj osteoklasta. U RA je nađen pojačan izražaj proupalnih citokina (kao što su TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-8) i u koštanoj srži, pokazujući izravni učinak upale na razvoj erozivnog oštećenja trabekularne i susjedne kortikalne kosti, odnosno da sam osteitis uzrokuje periartikularnu osteopeniju. S druge strane, ovu periartikularnu osteopeniju dodatno potiče sinovitis, difuzijom velike količine proosteoklastogenih citokina preko Haversovih i Volkmannovih kanala. Periartikularni gubitak kosti tipično zahvaća trabekularnu kost u metafizama kosti zahvaćenog zgloba, rani je radiološki znak RA, javlja se i prije pojave lokalnih koštanih erozija, a povezan je i s jačinom kasnijeg oštećenja samog zgloba (28).

### 1.2.2. Sustavni gubitak kosti

Pored lokalnog gubitka koštane mase, RA često prati i sustavni gubitak. Taj opći gubitak kosti obično postaje izraženiji duljim trajanjem bolesti te korelira s njenom težinom. Opći gubitak kosti se manifestira kao smanjena mineralna gustoća koštanog tkiva (BMD, prema engl. *bone mineral density*) s povećanim rizikom od prijeloma kosti, te može doprinositi deformacijama. Iako se osteoporoza u početku opisivala poglavito kao posljedica smanjene pokretnosti i/ili terapije glukokortikoidima u već inače rizičnoj skupini žena starije dobi, novije studije pokazuju da je sustavna osteopenija prije svega rezultat kronične upale i sustavno povišene



razine proupalnih citokina koji aktiviraju osteoklaste te je prisutna i u drugim kroničnim upalnim stanjima nevezanim za kosti - upalnim bolestima crijeva, celijakiji, cističnoj fibrozi i kroničnoj opstruktivnoj plućnoj bolesti. Tako RA povećava rizik od prijeloma kuka, kralježnice, zapešća te nadlaktične kosti za oko 30%, neovisno o BMD i terapiji glukokortikoidima. Oko 25% bolesnika koji boluju od RA u ranoj fazi ima i osteopeniju, a oko 10% ima osteoporozu čak i prije započinjanja liječenja te njen intenzitet može poslužiti kao prediktor većeg oštećenja zglobova. Osim intenziteta kronične upale, čimbenici koji pridonose razvoju osteoporoze su trajanje bolesti, starosti bolesnika, neuhranjenost, nedostatak vitamina, nepokretnost i terapija (prije svega glukokortikoidi) (29).

### 1.2.3. Seronegativne spondiloartropatije

Poremećaji zglobne strukture, koštane erozije, periartikularni i sustavni gubitak kosti su obilježja RA, ali se također pojavljuju i u spondiloartropatijama te erozivnom obliku osteoartritisa. Stoga, upalni artritis obuhvaćaju heterogenu skupinu zajedničkih poremećaja koje karakterizira kronična upalna reakcija te lokalno oštećenje zgloba i kosti, ali i opći gubitak koštane mase. Seronegativne spondiloartropatije, kao što su psorijatični artritis (PsA), ankilozantni spondilitis, reaktivni artritis te artritis povezan s upalnim bolestima crijeva, dijele sličnosti s nekim od lokalnih nalaza kod RA, iako distalni zglobovi i aksijalni skelet također mogu biti zahvaćeni. Karakteristično je da su zglobovi obično asimetrično zahvaćeni, te, uz proksimalne, mogu biti zahvaćeni i distalni, što nije uobičajeno u RA. Upala zahvaća enteze, za koje se smatra da su mjesto početka bolesti te u kojima može doći do kalcifikacije i okoštavanja. Uz napredovanje upale, erozije kostiju i gubitak koštane mase najprije se javljaju uz mjesta vezanja zahvaćenih tetiva i ligamenata. Širenjem upale do sinovijalne ovojnice u kasnijoj bolesti, mogu se uočiti slične histološke promjene kao u RA sa stvaranjem panusa te nastankom erozija i u samom zglobu. No, za razliku od RA, lokalna upala potiče i kalcifikaciju te osifikaciju enteza i susjedne kosti. Stvaranje nove kosti na mjestima upale istraživanja su dovela u vezu sa smanjenim izražajem sklerostina, pojačanim izražajem transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ , prema engl. *transforming growth factor  $\beta$* ), koštanog morfogenetskog proteina 2 (BMP-2, prema engl. *bone morphogenetic protein 2*) i BMP-6 te pretpostavila da je ono posredovano aktivnošću mezenhimalnih periostealnih stanica i hondrocita, a neosjetljivo na inhibiciju TNF- $\alpha$  (30).

PsA je upalni artritis povezan s psorijazom. Isprva je bio smatran varijantom RA, no kasnije je utvrđeno da je zaseban klinički entitet. Obično je seronegativan, iako je nešto više od 10%

bolesnika koji boluju od psorijaze pozitivno na RF. Oko trećina razvije artritis nakon 30 godina psorijaze, a samo u oko 6% bolesnika artritis počinje prije psorijaze. PsA se češće javlja kao poliartritis, rjeđe kao oligoartritis, te zahvaća periferne, aksijalne zglobove, ili i jedne i druge. Ima više uzoraka afekcije zglobova, od kojih su neki relativno specifični za PsA. Bolest se u nekih bolesnika prezentira kombinacijom više uzoraka afekcije zglobova, odnosno oblika bolesti, te se uzorak afekcije također može mijenjati tijekom bolesti. PsA često prati entezitis, tenosinovitis i daktilitis. Također je prisutna i jutarnja ukočenost zglobova, koja u 50% bolesnika traje duže od 30 minuta. Asimetrična zahvaćenost je češći oblik bolesti, a distalni interfalangealni (DIP, prema engl. *distal interphalangeal*) zglobovi šake su zahvaćeni u oko 50% slučajeva, kao i kralješnica. Značajna razlika u odnosu na RA je zahvaćenost aksijalnog skeleta, uključujući sakroilijačne zglobove i lumbosakralnu kralješnicu, što je slično, no ne i istovjetno, ankilozantnom spondilitisu – zbog čega je PsA uvršten u spondiloartropatije. Najčešće korišteni kriteriji za dijagnosticiranje psorijatičnog artritisa su oni po Mollu i Wrightu, prema kojima je za postavljanje dijagnoze potrebna prisutnost tri kriterija u bolesnika: upalni artritis (periferni i/ili sakroileitis ili spondilitis), psorijaza, (obično) negativni reumatoidni faktor. U uzorku afekcije simetričnog poliartrisa, PsA i RA izgledaju slično i ponekad su teško raspoznatljivi zbog vrlo slične prezentacije: u 70-80% slučajeva zahvaćeni su isti zglobovi u obje bolesti, vrlo je čest simetrični sinovitis PIP i MCP zglobova ruku, a zglobovi su slične bolnosti i oteknuća (31).

Koštane lezije u PsA su velike paraartikularne erozije koštanog korteksa, no nejasno su ograničene u usporedbi s jasno ograničenim erozijama u RA, te su često povezane sa stvaranjem nove kosti. Sinovijalni infiltrat je manje celularan, a jače vaskulariziran u odnosu na RA. Sustavni gubitak kosti (osobito izražen u kralješnici) također je uočen u spondiloartropatijama, pa tako i u PsA, iako manje izraženo nego u RA. PsA je povezan s alelima HLA B27, molekule skupine glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (MHC, prema engl. *major histocompatibility complex*) klase I, u odnosu na HLA-DR (MHC II klasa) u RA. Također, bolest nije povezana s prisutnošću određenih protutijela te je seronegativnost jedan od dijagnostičkih kriterija. Upalni parametri, kao što je brzina SE, razina CRP-a ili serumskog amiloida A, su znatno niži u PsA u odnosu na RA. Stoga, zbog nedostatka dokaza uključenosti specifične imunosti, smatra se da je bolest prije svega autoinflamatorni poremećaj, za razliku od autoimunskog RA. Prva linija terapije su DMARD, kao MTX, te su podjednako učinkoviti kao u RA. TNF-inhibitori su također u uporabi, djeluju nešto bolje kod zahvaćenosti kralješnice i daktilitisa, te imaju nešto veću efikasnost u odnosu na primjenu u RA. Kao i RA, PsA nije benigna bolest te se vremenom oštećenja zglobova pojačavaju (32, 33).

### 1.3. Osteoklasti i gubitak kosti izazvan upalom

Osteoklasti su divovske multinuklearne stanice, promjera i do 200 $\mu$ m te po nekoliko desetaka jezgara, hematopoetskog podrijetla koje imaju jedinstvenu sposobnost velike resorpcije mineralizirane kosti, dentina i kalcificirane hrskavice. Pošto osteoklasti nastaju fuzijom stanica monocitno/makrofagne loze te im to omogućuje usmjerenje funkcije mnogo makrofagnih stanica u pogledu transporta iona, sekrecije proteina i vezikularnog transporta na ograničeno mjesto na kosti. Prekomjerna resorpcija kosti je isključivo posljedica povećane aktivacije osteoklasta, budući da je sposobnost makrofaga i fibroblasta da degradiraju kost vrlo slaba (34, 35).

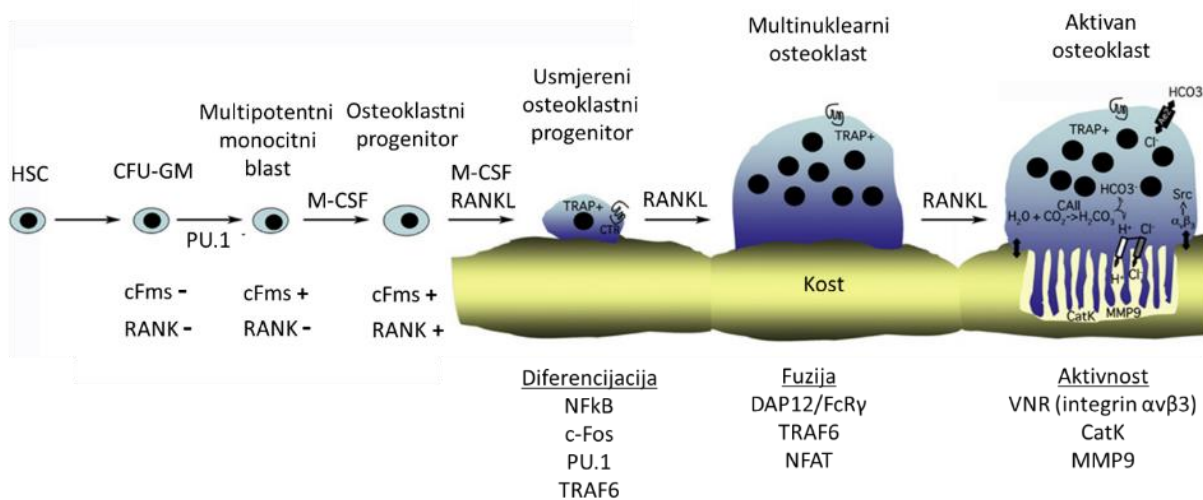
#### 1.3.1. Razvoj osteoklasta

Zreli osteoklasti izražavaju nekoliko relativno specifičnih proteina, kao što su kisela fosfataza otporna na tartarat (TRAP, prema engl. *tartrate-resistant acid phosphatase*), katepsin K (CatK, prema engl. *cathepsin K*), receptor za kalcitonin (CalcR, prema engl. *calcitonin receptor*), metaloproteinaza međustanične tvari 9 (MMP9, prema engl. *matrix metalloproteinase 9*), te različite integrine, osobito vitronektinski receptor (VNR, poznat i kao CD51/61 ili integrin  $\alpha\beta3$ ). Pomoću integrina, osteoklasti se snažno vežu za koštani matriks stvarajući prijanjajući prsten (engl. *sealing zone*), ograničavajući tako Howshipovu lakunu u kojoj održavaju kiseli okoliš potreban za rastvaranje matriksa. Osim spomenutog vitronektinskog receptora, izražavaju receptore i za druge međustanične proteine kao što su kolagen, osteopontin i koštani sijaloprotein (BSP, prema engl. *bone sialoprotein*) (36). Osteoklasti su relativno malobrojne stanice, a osim na mjestima intenzivne koštane pregradnje, nalaze se i s endostalne strane Haversovih kanala kortikalne i trabekularne kosti te na periostalnoj strani ispod periosta. Morfološki gledano, osteoklasti su polarizirane stanice koje imaju bazolateralnu stranu, koja je okrenuta od kosti, i specijaliziranu resorpcijsku površinu, koja je nabrana (engl. *ruffled border*) i priljubljena uz kost, a putem koje se odvija razgradnja kosti. Nakon prijanjanja, unutastanične promjene vode do polarizacije staničnih membrana, pri čemu se stvara prijanjajući prsten između nabrane resorpcijske površine i bazolateralne membrane osteoklasta. Nasuprot nabrane resorpcijske površine nalazi se sekrecijska domena, koja je s njom spojena mikrotubulima, a iz koje se egzocitozom izbacuje reapsorbirani materijal u izvanstanični prostor (37). Resorpcija zahtijeva promjene unutarstaničnog skeleta, uključujući stvaranje gustog aktinskog prstena,

proces koji inhibiraju bisfosfonati (38). Resorpcija koštanog matriksa odvija se u resorpcijskim lakunama. Nabrana resorpcijska površina nastaje stapanjem kiselih citoplazmatskih vakuola koje ispuštaju kiselinu u resorpcijsku lakunu i time započinju brzo rastvaranje kristala hidroksiapatita (39). ATP-aze koje se nalaze na nabranjnoj resorpcijskoj površini dodatno ubacuju protone u Howshipovu lakunu (40), koji nastaju disocijacijom iz  $H_2CO_3$  čije stvaranje je katalizirano pomoću enzima karboanhidraze. Ioni  $HCO_3^-$  se izbacuju u izvanstanični prostor pomoću izmjenjivača  $HCO_3^-/Cl^-$ , a kloridni ioni se pak ubacuju u resorpcijsku lakunu, pri čemu se stvara klorovodična kiselina i niski pH 4, potreban za rastvaranje mineraliziranog tkiva (41). Organski matriks razrađuju enzimi poput TRAP-a, CatK i MMP9. CatK je lizosomalna proteinaza koja može razgraditi kolagen tipa I. Uočeno je da miševi kojima nedostaje CatK mogu rastvoriti mineralizirani materijal, no ne mogu ukloniti kolagenski matriks (42). MMP9 ima također važnu ulogu u razgradnji kolagena, te miševi bez te metaloproteinaze imaju izrazitu osteopetrozu (43). Nakon resorpcije kosti, osteoklasti umiru apoptozom te ih ubrzo uklanjaju makrofagi, iako je sam *in vivo* mehanizam prestanka resorpcije i okidač za apoptozu zasad nepoznat (35).

Proces razgradnje kosti započinje novačenjem mononuklearnih progenitora na koštane površine (Slika 3). Najraniji korak u osteoklastogenezi je usmjeravanje hematopoetskog progenitora prema osteoklastnoj liniji aktivacijom transkripcijskog čimbenika PU.1 (44). Tako usmjereni progenitori uskoro počinju izražavati, cFms (poznat i kao CD115), receptor za čimbenik stimulacije kolonija makrofaga (M-CSF, prema engl. *macrophage colony-stimulating factor*), te nakon aktivacije ligandom počinju proliferirati. M-CSF je ključan pozitivni signal u ranoj diferencijaciji osteoklasta kojeg u RA izlučuju sinovijalni fibroblasti, makrofagi i limfociti T. M-CSF djeluje na više stadija osteoklastogeneze, uključujući proliferaciju, diferencijaciju i fuziju osteoklastnih progenitora (OCP, prema engl. *osteoclast progenitor*), a u kasnijim stadijima diferencijacije poboljšava sposobnost resorpcije kosti, no ne i preživljenje osteoklasta. Sljedeći korak prema sazrijevanju osteoklasta je ekspresija receptora aktivatora jezgrenog čimbenika  $\kappa B$  (RANK, prema engl. *receptor activator of nuclear factor- $\kappa B$  ligand*). RANK pripada nadobitelji TNF-receptora, a izražavaju ga stanice monocitno/makrofagne loze, ali i fibroblasti, limfociti T i B te dendritične stanice. Ligand RANK-a (RANKL, prema engl. *receptor activator of nuclear factor- $\kappa B$  ligand*) ključan je za stvaranje i stapanje multinuklearnih stanica. Glavni fiziološki izvor RANKL-a su osteociti i osteoblasti, no u patološkim stanjima ga mogu također znatno izražavati i sinovijalne stanice, aktivirani limfociti T, zreli limfociti B i stanice NK. Izražaj RANKL-a je, među ostalim, pojačan i djelovanjem proupalnih citokina. Miševi kojima nedostaje RANKL ili RANK nemaju osteoklaste te imaju

izrazitu osteopetrozu (45, 46). Vezanjem RANKL-a na RANK dolazi do aktivacije čimbenika povezanih s receptorima obitelji TNF (TRAF, prema engl. *TNF receptor associated factor*), uglavnom TRAF6, a potom i prepisivanja nekoliko transkripcijskih faktora koji su neophodni za osteoklastogenezu, uključujući aktivirani protein 1 (AP-1), jezgreni čimbenik  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B, prema engl. *nuclear factor  $\kappa$ B*) i jezgreni čimbenik aktiviranih limfocita T (NFAT, prema engl. *nuclear factor of activated T lymphocytes*). Većina signala naposljetku dovodi do aktivacije faktora NFAT, koji je nezamjenjiv i samodostatan za osteoklastogenezu, čak i kad nedostaje RANK (47). S druge strane, aktivacija NFAT ovisi o kalciju, stoga su molekule koje sadržavaju imunoreceptorske motive bazirane na tirozinu (ITAM, prema engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), kao što je DNAX-aktivirajući protein 12 (DAP 12, prema engl. *DNAX-activating protein 12*) i Fc-receptor- $\gamma$  (FcR- $\gamma$ ), neophodne za osteoklastogenezu te njihov nedostatak dovodi do osteopetroze. Aktivacija kinaza fosfolipaza C $\gamma$ , Syk i Tec su također nužne za oslobađanje kalcija regulirano kalcineurinom (48). Transkripcijski faktor AP-1 aktivira c-Fos koji je potreban za autoamplifikaciju NFAT i diferencijaciju osteoklasta, a aktivnost AP-1 u sinovijalnom tkivu bolesnika koji boluju od RA korelira s aktivnošću bolesti. Upareni receptor nalik imunoglobulinu A (PIR-A, prema engl. *paired immunoglobulin like receptor A*) i receptor povezan s osteoklastima (OSCAR, prema engl. *osteoclast associated receptor*) se združuju s FcR- $\gamma$  (49), dok se protein regulacije signala  $\beta$  1 (SIRP- $\beta$ 1, prema engl. *signal-regulatory protein  $\beta$ 1*) i receptor-okidač izražen na mijeloidnim stanicama 2 (TREM2, prema engl. *trigger receptor expressed by myeloid cells 2*) vežu za DAP12. No, ti se signali smatraju kostimulacijskim jer ne mogu samostalno inducirati osteoklastogenezu (50). Patološko pojačanje stvaranja osteoklasta i njihove aktivnosti uzrokuje gubitak koštane mase, posljedičnu bol, strukturne promjene i deformacije te ubrzava razvoj artritisa i drugih bolesti karakteriziranih gubitkom kosti izazvanim upalom.



**Slika 3. Pojednostavljeni prikaz razvoja osteoklasta.** HSC, hematopoetska matična stanica (prema engl. *hematopoietic stem cell*). CFU-GM, jedinica koja stvara kolinije granulocita i makrofaga (prema engl. *colony forming unit granulocyte macrophage*); DAP 12, DNAX-aktivirajući protein 12, prema engl. *DNAX-activating protein 12*; c-Fms, receptor za čimbenik stimulacije kolonija makrofaga, CD115; CatK, katepsin K, prema engl. *cathepsin K*; FcR- $\gamma$ , Fc-receptor- $\gamma$ ; MMP9, metaloproteinaza međustanične tvari 9, prema engl. *matrix metalloproteinase 9*; NFAT, jezgreni čimbenik aktiviranih limfocita T, prema engl. *nuclear factor of activated T lymphocytes*; NF $\kappa$ B, jezgreni čimbenik  $\kappa$ B, prema engl. *nuclear factor  $\kappa$ B*; M-CSF, čimbenik stimulacije kolonija makrofaga, prema engl. *macrophage colony-stimulating factor*; RANK, receptor aktivatora jezgrenog čimbenika  $\kappa$ B, prema engl. *receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B*; RANKL, ligand za RANK, prema engl. *receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand*; TRAF, čimbenik povezan s receptorima obitelji TNF, prema engl. *TNF receptor associated factor*; VNR, vitronektinski receptor. Modificirano prema Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y, Takayanagi H, Schett G, ur. *Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems*. 2. izd. 2015. Elsevier: Amsterdam.

### 1.3.2. Periferni osteoklastni progenitori

S obzirom na ključnu ulogu u osteolizi, osteoklasti i njihovi progenitori postali su predmet istraživanja upalne osteoresorpcije. Osteoklasti stvaraju erozije kosti tijekom perioda od nekoliko mjeseci do više godina, iako je životni vijek pojedinačnog osteoklasta samo 2 do 4 tjedna. Stoga je potrebno neprestano obnavljanje osteoklasta, odnosno dolazak novih progenitora kako bi se održala patološka resorpcija kosti (51). Pokazano je da monocitna

populacija periferne krvi sadrži 1-2% stanica sa sposobnošću diferencijacije *in vitro* u potpuno funkcionalne osteoklaste u prisutstvu M-CSF-a i RANKL-a. Istraživanja podupiru pretpostavku da cirkulirajući OCP, povećane učestalosti u artritičnih bolesnika, migriraju u područja zahvaćena upalom te se uz osteoklastogene uvjete potom se diferenciraju u osteoklasta koji stvaraju eroziju kosti. Karakterizaciju te subpopulacije osteoklastnih prekursora u perifernoj krvi postala je nužna kako bi se objasnili učinci sustavnih i lokalnih podražaja na njihovu aktivnost, mobilizaciju i diferencijaciju u zrele osteoklaste te preživljenje (52). Pošto se velika većina OCP nalazi u kosti, odnosno koštanoj srži, dosadašnja istraživanja su se mahom usredotočila na taj odjeljak, a relativno malobrojna istraživanja na OCP u perifernoj krvi su gotovo isključivo rađena na miševima. Tako su u miševa periferni OCP ipak relativno dobro definirani kao stanice fenotipa  $B220^-CD3^-NK1.1^-CD11b^+Ly6C^{hi}CD115^+CX3CR1^+$  (53). S obzirom na heterogenost monocitno/makrofagne linije te mali broj općeprihvaćenih markera ljudskih OCP, istraživanja su koristila različite biljege u nastojanju boljeg karakteriziranja te subpopulacije u perifernoj krvi. Korišteni su monocitni markeri, kao što su CD11, CD14, CD16 i CD51/61, kako bi se izdvojili ljudski periferni OCP i testirao njihov osteoklastogeni potencijal dodavanjem različitih citokina (uključujući RANKL, M-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17 i IL-32), sinovijalnih fibroblasta ili sinovijalne tekućine bolesnika koji boluju od artritisa (52).

Uočeno je da je osteoklastogeni potencijal stanica  $CD14^+$  veći u odnosu na stanice  $CD11b^+$  ili  $CD61^+$  te da imaju podjednak izražaj biljega CD16. Pod *in vitro* osteoklastogenim uvjetima, na monocitima  $CD14^+$  pojačava se izražaj biljega CD51/61 (nazvan i integrin  $\alpha\beta3$  ili vitronektinski receptor) i CD16 (Fc $\gamma$ III). Također je poznato da je udio subpopulacije  $CD14^{hi}CD16^+$  značajno povećan u bolesnika koji boluju od multiplog mijeloma, kojeg karakteriziraju osteolitična žarišta. Stanice  $CD14^+$  periferne krvi s jakim izražajem biljega RANK iskazuju veću sposobnost osteoklastogeneze od stanica  $CD14^+$  sa slabim izražajem biljega RANK, te su stanice fenotipa  $CD45^+CD14^+CD51/61^+CD115^+RANK^+$  utvrđene kao OCP u gigantocelularnim tumorima (54-57). Iako OCP izražavaju P2-integrine kao što su CD11b ili CD18, čini se da je izražaj biljega CD11b povezan s najranijim fazama diferencijacije osteoklasta. RANKL predstavlja signal-okidač koji suprimira izražaj biljega CD11b, odnosno P2-integrina, u zamjenu za pojačanje izražaja P3-integrina, kao što je CD14 (58).

Monociti se mogu podijeliti i na temelju izražaja CD16 u subpopulacije  $CD16^+$  i  $CD16^-$  koje se razlikuju po svom migracijskom obrascu, citokinskom profilu i usmjerenju diferencijacije. U fiziološkim uvjetima, OCP se većinom nalaze u subpopulaciji  $CD14^+CD16^-$  monocita periferne krvi, definiranih kao nezreli, tj. proliferirajući monociti ( $CD14^+CD16^-CD64^+CD33^+CD13^{lo}CD115^+$ ), koji su izrazito osteoklastogeni *in vitro*. Međutim, udio

subpopulacije CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> povećan je u upalnim stanjima, a zamjetan je i na mjestima upale. Periferna krv bolesnika koji boluju od PSA, osobito onih s erozijom kosti, sadrži značajno povećanu subpopulaciju OCP unutar populacije CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocita. Značajno povećanje udjela subpopulacije CD16<sup>+</sup> monocita u perifernoj krvi te njihovo nakupljanje u sinovijalnom tkivu također je primjećeno u RA. Ta subpopulacija monocita također izražava biljeg ljudske hrskavice gp-39 (mogući autoantigen u RA), ne izražava limfoidne markere (CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD20<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>), te slabo izražava i neke mijeloične biljege (CD33<sup>lo</sup>MHCII<sup>lo</sup>CD14<sup>lo</sup>). Međutim, stanice CD16<sup>-</sup> se također nakupljaju u reumatoidnoj sinoviji, a razlikuju se od stanica CD16<sup>+</sup> izražajem integrina CD51/61, koji je važan za migraciju OCP i povezan je sa sazrijevanjem osteoklasta. Opisani rezultati pokazuju da monociti CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> predstavljaju zreliju fazu u diferencijaciji osteoklasta u odnosu na subpopulacije CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> i CD14<sup>+</sup>CD16<sup>int</sup> (58-64). Iz radova nekoliko istraživačkih skupina zaključeno je da je populacija mononukleara negativna za limfocitne biljege (CD3 za limfocite T, CD19 za limfocite B, CD56 za stanice NK) te pozitivna za CD11b i CD14 obogaćena OCP u RA i psorijatičnom artritisu (65). Štoviše, radovi sugeriraju mogućnost da bi razlike u erozivnom fenotipu različitih oblika upalnih artritisa mogle biti rezultat plastičnosti ovih hematopoetskih monocitnih progenitora, ovisno o citokinskom i kemokinskom okruženju u koštanoj srži, cirkulaciji i sinoviji. Osteoklastogeni potencijal periferne krvi je identificiran kao biomarker erozivne bolesti u RA, psorijatičnom artritisu i drugim oblicima spondiloartropatija (52).



**Tablica 3. Izražaj površinskih staničnih biljega na ljudskim osteoklastnim progenitorima u perifernoj krvi**

Fenotip osteoklastnih progenitora	Izvor	Referenca
CD14 <sup>+</sup> ; CD11b <sup>+</sup> ; or CD61 <sup>+</sup>	krv	53
CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>-</sup> CD56 <sup>-</sup> CD14 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup>	krv	63
CD14 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> (intβ1 <sup>+</sup> intβ2 <sup>+</sup> intβ3 <sup>-</sup> )	krv	58
CD14 <sup>hi</sup> CD11b <sup>+</sup> CD51/61 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	krv (MM)	56
CD14 <sup>+</sup> RANK <sup>hi</sup> CD45 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup> CD51/61 <sup>+</sup> CD115 <sup>+</sup> RANK <sup>+</sup>	krv, srž (GCT)	57
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> (CD33 <sup>hi</sup> )CD115 <sup>lo</sup>	krv, sinovija (RA)	60
CD16 <sup>+</sup> (gp-39): CD3 <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD20 <sup>-</sup> CD56 <sup>-</sup> CD33 <sup>lo</sup> MHCII <sup>lo</sup> CD14 <sup>lo</sup>	krv, sinovija (RA)	65
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> DC-STAMP <sup>+</sup>	krv (PsA)	55
CD14 <sup>+</sup> (MHCII <sup>+</sup> )CD16 <sup>+</sup>	krv (PsA)	64

\* Karakterizacija osteoklastnih progenitora iz koštane srži, periferne krvi te sinovije utvrđivanjem membranskih biljega, u kontrolnim uzorcima i bolesnicima (koji boluju od multiplog mijeloma (MM), tumora kosti divovskih stanica (GCT, prema engl. giant cell tumor)) te kroničnim upalnim bolestima zglobova (psorijatični artritis (PsA), reumatoidni artritis (RA)). RANK, receptor aktivatora jezgrenog čimbenika-κB (prema engl. *receptor activator of nuclear factor κB*); int, integrin; DC-STAMP, transmembranski protein specifičan za dendritične stanice (prema engl. *dendritic cell-specific transmembrane protein*); gp-39, glikoprotein 39 ljudske hrskavic, mogući autoantigen u RA; MHC, glavni kompleks tkivne podudarnosti (prema engl. *major histocompatibility complex*). Modificirano prema Šućur A, Katavić V, Kelava T, Jajić Z, Kovačić N, Grčević D. Induction of osteoclast progenitors in inflammatory conditions: key to bone destruction in arthritis. *Int Orthop*. 2014;38(9):1893-903.

Iako je fenotip perifernih OCP proučavan u artritisa, funkcionalni odnosi cirkulirajućih progenitora u odnosu na progenitore u koštanoj srži i njihovo navođenje u upaljene zglobove, uglavnom upravljano kemokinskim signalima, nije jasno uspostavljeno. Kemokini i njihovi receptori reguliraju migraciju stanica, angiogenezu, staničnu proliferaciju, apoptozu te obranu domaćina od patogena. Ta superporodica proteina relativno male molekularne težine potiče interakcije putem receptora vezanih s G-proteinima, što posljedično izaziva promjenu citoskeleta, prijanjanje stanica, te usmjereno gibanje prema izvoru kemokina, odnosno u smjeru njegove rastuće koncentracije – kemotaksiju. Kemokini mogu biti podijeljeni u četiri skupine, ovisno o razmaku i redosljedu prvih cisteinskih (C) ostataka, a to su: CXC, CC, C i CX3C, pri čemu X predstavlja bilo koju drugu aminokiselinu. Većina interakcija se odvija preko CC- i CXC-kemokina, koji se ponekad nazivaju i glavni, dok se C i CX3C smatraju više sporednima (67, 68). Saznanja o izražaju kemokinskih receptora na OCP su relativno skromna i ograničena u pravilu samo na OCP u kostima i zrele osteoklaste, većinom u miševa. Ipak, izražaj kemokinskih receptora je ključan za selektivno privlačenje OCP na mjesta resorpcije koristi te kontinuiranu osteoresorpciju (52).

U miševa je tako utvrđen izražaj kemokinskih receptora CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4 te CX3CR1 na OCP iz koštane srži, za koje je ujedno pokazano da imaju ulogu u poticanju migracije OCP te stvaranja zrelih osteoklasta. U životinja s nedostatkom nekog od navedenih receptora, blokadom receptora *in vitro* ili neutralizacijom liganda *in vivo* uočeno je smanjenje stvaranja osteoklasta i posljedično manja osteoresorpcija s povećanom koštanom masom (35, 66, 69-74).

U ljudi, uočeno je da je CXCR4 snažno izražen na OCP u kosti i zrelim osteoklastima, što pokazuje da bi njegov ligand, CXCL12, mogao biti važan za kemotaksiju, diferencijaciju i preživljavanje ljudskih osteoklasta (75). Kemokinski receptori CCR1 i CCR5, na koje se veže monocitni upalni protein 1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ , prema engl. monocyte inflammatory protein 1 $\beta$ , CCL3), nađeni su na koštanim osteoklastnim preursorima, te mogu potaknuti stvaranje osteoklasta *in vitro* kada su stimulirani s CCL3 (76).

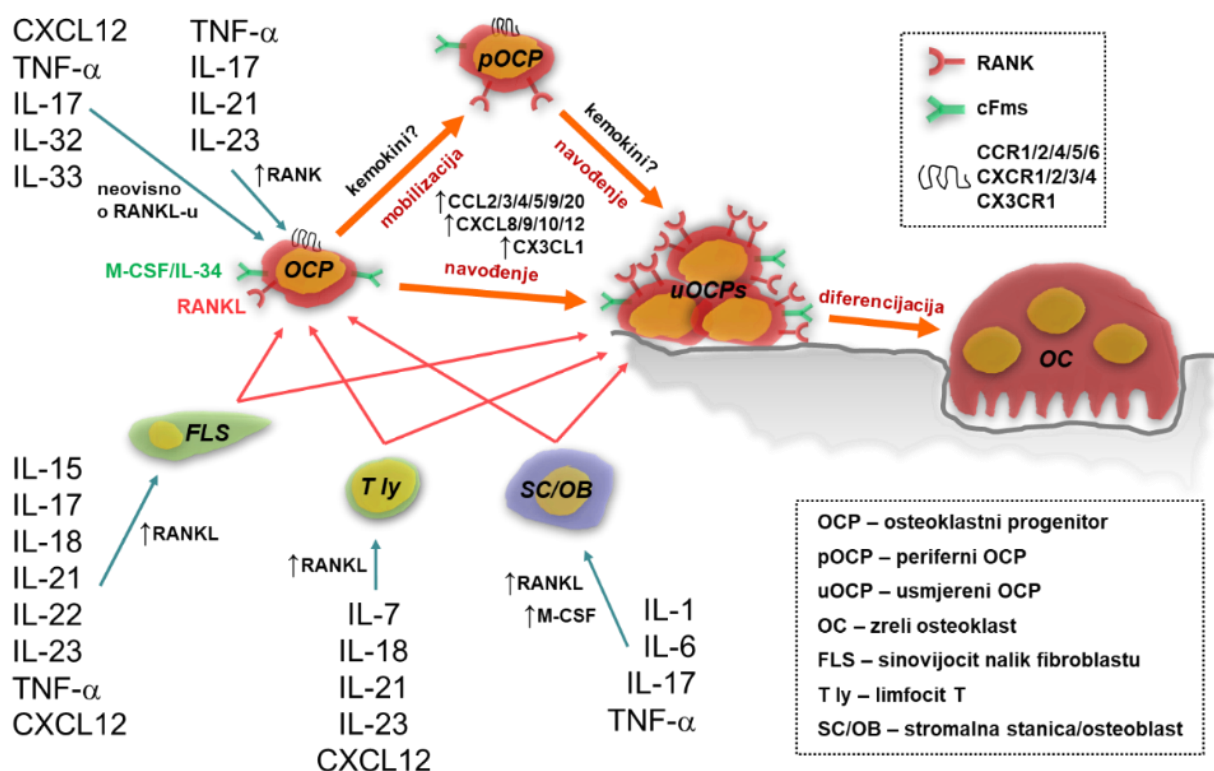
**Tablica 4. Poznate interakcije između kemokina i njihovih receptora na osteoklastnim progenitorima u koštanoj srži**

Kemokinski ligandi (alternativno ime)	Kemokinski receptori									
	CCR1	CCR2	CCR4	CCR5	CCR6	CXCR1	CXCR2	CXCR3	CXCR4	CX3CR1
CCL2 (MCP-1)		*	*							
CCL3 (MIP-1- $\alpha$ )	*		*	*						
CCL4 (MIP-1- $\beta$ )	*			*						
CCL5 (RANTES)	*	*	*	*						
CCL9 (MIP1- $\gamma$ )	*									
CCL20 (MIP3- $\alpha$ )					*					
CXCL8 (IL-8)						*	*			
CXCL9 (MIG)								*		
CXCL10 (IP10)								*		
CXCL12 (SDF-1)									*	
CX3CL1 (Fraktalkin)										*

\* Neki kemokini se vežu za samo jedan receptor, dok se neki vežu na više receptora. Također, neki receptori imaju samo jedan ligand, dok drugi receptori imaju više liganda. Prije standardne klasifikacije, kemokinima su davana različita imena koja su navedena u zagradi. MIG - monokin induciran putem IFN- $\gamma$  (prema engl. monokine induced by IFN- $\gamma$ ); MIP-1- $\alpha$ , upalni protein 1- $\alpha$  makrofaga (prema engl. macrophage inflammatory protein 1- $\alpha$ ); MIP-1- $\beta$  - upalni protein 1- $\beta$  makrofaga (prema engl. macrophage inflammatory protein 1- $\beta$ ); MIP-1- $\gamma$ , upalni protein 1- $\gamma$  makrofaga (prema engl. macrophage inflammatory peptide 1- $\gamma$ ); IP-10, protein 10 induciran putem IFN- $\gamma$  (prema engl. IFN- $\gamma$ -inducible protein 10); RANTES, protein reguliran aktivacijom, izražen i izlučivan iz limfocita T (prema engl. regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted); SDF-1 - čimbenik 1 stromalnih stanica (prema engl. stromal cell-derived factor 1); CXCL - kemokinski ligand s C-X-C motivom; CXCR - receptor za C-X-C kemokin; CCL - kemokinski ligand s C-C motivom; CCR - receptor za C-C kemokin; IL – interleukin.

### 1.3.3. Uloga proupalnih citokina u gubitku kosti izazvanom upalom

Tijekom upalne reakcije, stanice prirodnog i stečenog imuniteta proizvode različite medijatore koji autokrinom, parakrinom i endokrinom signalizacijom utječu na diferencijaciju, aktivnost i migraciju osteoklasta. Širok raspon proupalnih citokina (npr. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 i IL-17), kemokina, faktora rasta (VEGF, hipoksijom induciranog faktora), i apoptotičkih medijatora (Fas ligand, ligand povezan s TNF-om koji inducira apoptozu) je poremećenog, povišenog izražaja u artritisu (35, 52). Ti medijatori neposredno ili posredno, preko osovine RANK/RANKL sustava, promiču osteoklastogenezu (Slika 4).



**Slika 4. Poticanje aktivnosti osteoklastnih progenitora proosteoresorptivnim citokinima i kemokinima u artritisu.** Pojačana i kontinuirana osteoresorpcija može započeti pretjeranom stimulacijom osteoklastnih progenitora putem upalnih medijatora. Ti medijatori (većinom citokini i kemokini) su pojačano izraženi u artritisu te mogu snažno pojačati osteoklastogenezu bilo izravnim (na osteoklastne progenitore) ili neizravnim (na druge stanice u mikrookolišu - stromalne stanice, osteoblaste, limfocite T i sinovijalne fibroblaste) djelovanjem na izražaj RANK/RANKL-a. Tako nastali osteoklastni progenitori zatim ili izravno migriraju do mjesta osteoresorpcije ili se prvo otpuštaju u sustavnu cirkulaciju kao mirujući osteoklastni progenitori koji se onda navode u zahvaćene zglobove ili na koštanu površinu kemotaksijskim

medijatorima. Jednom kada prionu uz koštanu površinu, usmjereni osteoklastni progenitori sa visokim izražajem RANK-a se diferenciraju u zrele osteoklaste koji razgrađuju kost. Prikazani su samo najvažniji pozitivni regulatori diferencijacije osteoklasta u artritisu. IL, interleukin; TNF- $\alpha$ , čimbenik nekroze tumora  $\alpha$  (prema engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ); RANK, receptor aktivatora jegrenog čimbenika  $\kappa$ B (prema engl. *receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B*); RANKL, RANK ligand; M-CSF, čimbenik stimulacije kolonija makrofaga (prema engl. *macrophage colony-stimulating factor*); cFms, receptor za M-CSF; CCR, receptor za C-C kemokin; CXCR, receptor za C-X-C kemokin; CCL, kemokinski ligand s C-C motivom; CXCL, kemokinski ligand s C-X-C motivom. Modificirano prema Šućur A, Katavić V, Kelava T, Jajić Z, Kovačić N, Grčević D. Induction of osteoclast progenitors in inflammatory conditions: key to bone destruction in arthritis. *Int Orthop*. 2014;38(9):1893-903.

Pokazano je da čak i mali porast u jačini sustavne upale može izazvati osteoresorpciju, što dovodi do deformacija vezanih za artritis i povećanog rizika od fraktura. RANKL je izražen u RA u sinovijalnom tkivu te je povezan s povećanom diferencijacijom sinovijalnih makrofaga u upaljenim zglobovima u osteoklaste te posljedično stvaranje rubnih erozija (77). Dakle, istraživanje čimbenika koji promiču aktivnosti i diferencijaciju osteoklasta može pružiti uvid u događaje odgovorne za patološki gubitak kosti koji je prisutan u kroničnim bolestima zglobova. Promijenjen citokinski profil se smatra ključnim dijelom etiologije artritisa, pri čemu TNF- $\alpha$  ima glavnu ulogu u razaranju kosti u artritisu. Izlučuju ga aktivirani makrofagi, limfociti T, limfociti B, stanice NK, sinovijalnim fibroblasti, osteoblasti i osteoklasti, a povećava osteoklastogenezu putem različitih mehanizama. Vezanjem na TNF receptor 1 (TNFR1) i TNFR2 na osteoklastima. TNF- $\alpha$  povećava izražaj RANK-a, promičući na taj način osteoklastogenezu. Iako postoje indikacije za mogući izravan učinak TNF- $\alpha$  na diferencijaciju OCP, neovisno o RANK-u, takav učinak nije definitivno dokazan (78). TNF također djeluje na stromalne stanice koštane srži u kojima inducira ekspresiju M-CSF, pri čemu je taj učinak jači od djelovanja na same OCP. Nadalje, TNF- $\alpha$  snažno potiče izražaj proteina 1 povezanog s Dickkopfom (Dkk1, prema engl. *Dickkopf-related protein 1*), što pozitivno djeluje na osteoklastogenezu povećanjem izražaja RANKL-a. U modelu ljudskog TNF-transgeničnog miša, TNF- $\alpha$  povećava broj OCP CD11b<sup>+</sup> neovisno o RANKL-u, ali je za njihovu diferencijaciju u zrele osteoklaste ipak potreban RANKL. Važnost TNF- $\alpha$  u oštećenju kosti u artritisu je dokazana u nekoliko različitih mišjih modela artritisa i konačno je potvrđena u kliničkim studijama. Primjena pripravaka anti-TNF- $\alpha$  je trenutno najučinkovitija terapija u

liječenju koštanog oštećenja u RA, iako se smatra da je zaštitno djelovanje od gubitka kosti posljedica protuupalnog, a ne samo protuerozivnog djelovanja. *In vivo*, transgenični miševi s izražajem ljudskog TNF- $\alpha$  razvijaju teški artritis s kroničnom sinovijalnom upalom, destrukcijom hrskavice te sustavnim i lokalnim gubitkom kosti. U artritisu potaknutom kolagenom (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*), primjena TNF-neutralizirajućih protutijela smanjuje aktivnost bolesti i oštećenje kosti (79).

Lokalni i sustavni gubitak kosti uzrokovan TNF-om čini se ovisan o IL-1, ključnom nizvodnom efektoru učinka TNF- $\alpha$ . U zglobovima oboljelih od RA, aktivirani makrofagi i sinovijalni fibroblasti su glavni izvor IL-1. *In vitro* istraživanja su pokazala da IL-1 potiče fuziju OCP i produžuje preživljenje osteoklasta, te je također važan za njihovu aktivaciju. IL-1-transgenični miševi pokazuju gubitak kosti i razaranje hrskavice, a pojačan izražaj IL-1 dovodi do razvoja artritisa u miševa, dok nedostatak receptora za IL-1 štiti od razvoja artritisa. Unatoč tim *in vitro* i *in vivo* dokazima, ciljano djelovanje na IL-1-receptor u ljudi pomoću anakinre, antagonista receptora IL-1, nije ostvarilo zadovoljavajuće rezultate u liječenju RA (80). TNF- $\alpha$  pojačava i proizvodnju IL-34, citokina prisutnog u sinoviji i sinovijalnoj tekućini u RA, koji se veže na cFms. IL-34 djeluje kemotaksijski na OCP, potiče stvaranje i vijabilnost makrofaga neovisno o M-CSF-u te podržava osteoklastogenezu putem RANKL-a i u nedostatku M-CSF-a (81). Čini se da IL-2 djeluje sinergistički s TNF-om na osteoklastogenezu i dodatno potencira njegov učinak (82).

Poznato je da IL-6, u sprezi s TGF- $\beta$  i IL-1 potiče razvoj limfocita Th17, ključnih za razvoj upalnog artritisa te poticanje osteoresorpcije. IL-6 izražavaju sinovijalni fibroblasti, makrofagi i limfociti T u upalnim artritisa, a povišen je u serumu i sinovijalnoj tekućini bolesnika koji boluju od RA. IL-6 izravno pridonosi osteoresorpciji pojačavanjem oseoblastnog izražaja RANKL-a. Iako su neke *in vitro* studije pokazale inhibicijski učinak IL-6 na osteoklastogenezu, nije uzeta u obzir uloga drugih stanica i citokina u *in vivo* okolišu. *In vivo*, miševi kojima nedostaje IL-6 zaštićeni su od CIA i artritisa potaknutog adjuvansom, a primjena neutralizirajućeg protutijela koje se veže na receptor za IL-6 smanjuje aktivnost bolesti u CIA. Također, specifično protutijelo za IL-6R, tocilizumab, u ljudi učinkovito smanjuje aktivnost bolesti i radiološku progresiju te se koristi u kliničkoj praksi (83).

Glavni citokin limfocita Th17, IL-17, smatra se važnim stimulatorom osteoresorpcije. Prisutan je u sinovijalnoj tekućini bolesnika koji boluju od RA te ga ne luče samo limfociti Th17, već i druge stanice, poput mastocita, koje vjerojatno predstavljaju glavni izvor IL-17 u ljudskim upalnim artritisa. *In vitro*, IL-17 uglavnom neposredno stimulira osteoklastogenezu, pojačavajući izražaj RANKL-a na osteoblastima i fibroblastima te izražaj RANK-a na ljudskim

OCP. Također, IL-17 potiče izlučivanje proupalnih citokina, kao što su IL-6, IL-8, TNF i IL-1. Pokazano je i da IL-17 inducira osteoklastogenezu iz OCP u nedostatku osteoblasta ili RANKL-a. Neki snažni proupalni citokini izražavaju svoje učinke putem ili u sinergiji s IL-17. Na primjer, pokazano je da sustavno povišen IL-23 uzrokuje teški artritis osteoresorptivnog fenotipa putem proizvodnje IL-17 (84). IL-23 stimulira diferencijaciju ljudskih osteoklasta iz monocita periferne krvi pojačavajući izražaj RANK-a (85 L), a blokada IL-23 prigušuje CIA u miševa (86). IL-17 pojačava izražaj IL-32, koji stimulira proizvodnju TNF- $\alpha$  i IL-1 te potiče diferencijaciju ljudskih osteoklasta iz monocita periferne krvi neovisno o RANKL-u (87). Liječenje artritčnih miševa u modelu CIA protutijelom anti-IL-17 smanjuje zglobnu upalu, destrukciju kosti i koštane erozija. 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 RA (88).

INF- $\gamma$  je proizvod stanica urođene imunosti i limfocita T te je interferon tipa II. U mišjim kulturama makrofaga koštane srži, INF- $\gamma$  snažno inhibira osteoklastogenezu supresijom RANK-a, a u ljudskim OCP suprimira ekspresiju cFms. U modelima CIA i gubitku kosti izazvanom lipopolisaharidom, nedostatak receptora za IFN- $\gamma$  dovodi do pojačane diferencijacije osteoklasta i razgradnje kosti. Unatoč tome, primjena rekombinatnog IFN- $\gamma$  u miševa potiče diferencijaciju osteoklasta i erozije kosti. Ovi kontradiktorni podaci o *in vivo* ulozi IFN- $\gamma$  posljedica su razlika u modelima bolesti ili učinka IFN- $\gamma$  na različite vrste stanica. Primjerice, nedavna istraživanja su pokazala da IFN- $\gamma$  može direktno inhibirati diferencijaciju OCP, ali može i indirektno poticati osteoklastogenezu stimulirajući aktivaciju limfocita T te sekreciju proosteoklastogenih RANKL-a i TNF- $\alpha$ . INF- $\alpha$  i INF- $\beta$  pripadaju interferonima tipa I. 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 osteoklastogenezu (89).

Prekomjeran izražaj i nekih drugih citokina u upalnom artritisu također djeluje na OCP. IL-33 je izražen u RA, a količina u sinovijalnom odjeljku korelira s jačinom artritisa te, aktiviranjem mastocita, pojačava artritis izazvan antigenom u miševa. IL-33 potiče razvoj osteoklasta iz ljudskih monocita neovisno o RANKL-u te aktivira signalne putove MAP-kinaze, NF $\kappa$ B i Syk/PLC $\gamma$ . Međutim, u miševa je i *in vitro* i *in vivo* uočen inhibicijski učinak na osteoklastogenezu (90). Za IL-15 je pokazano da *in vitro* izravno potiče diferencijaciju osteoklasta iz matičnih hematopoetskih stanica miševa. Neutralizacija IL-15 koči razaranje kosti u CIA. Povišene razine IL-15 su otkrivene u sinoviji i sinovijalnoj tekućini u RA, dok je smanjena količina povezana s kliničkim poboljšanjem RA (91). IL-15 potiče stvaranje

osteoklasta kroz signalne putove MAP-kinaze i NF $\kappa$ B, aktiviranjem fosfolipaze D1 i regulirajući izražaj RANKL-a u sinovijalnim fibroblastima (92).

Osteoklastogeni učinak je uočen i za nekoliko drugih citokina, uglavnom pojačavanjem izražaja RANKL-a u limfocitima T ili sinoviocitima. IL-7 je povezan s većom aktivnošću bolesti i ima snažan kemotaksijski učinak na monocite, te se njegovom blokadom ublažavaju simptomi CIA. IL-7 potiče izlučivanje RANKL-a iz limfocita T, a neke studije sugeriraju i o RANKL-u neovisan učinak (93). IL-21 stimulira osteoklastogenezu poticanjem izlučivanja RANKL-a iz CD4<sup>+</sup> limfocita T te je povišenog izražaja u sinoviju, sinovijalnoj tekućin i serumu u RA (94). S druge strane, za neke je citokine zabilježeno da prvenstveno stimuliraju osteoklastogenezu kroz sinoviocite nalik fibroblastima. IL-18 povećava izlučivanje RANKL-a i proizvodnju M-CSF-a u sinovijalnim fibroblastima. Primijećeno je da pojačava kroničnu upalu u modelima eksperimentalnog artritisa te da djeluje i na sinovijalne limfocite T (80). Sličan mehanizam je uočen za IL-22, koji također potiče osteoklastogenezu u RA povećanjem izražaja RANKL-a u sinovijalnim fibroblastima, čak i bez djelovanja RANKL-a (95).

Neki citokini imaju inhibicijski učinak na osovinu RANKL/RANK, djelujući kao inhibitori osteoklastogeneze. Primjerice, IL-4 inhibira osteoklastogenezu neizravno, smanjujući izražaj RANKL-a iz stanica u sinoviji aktiviranih TNF-om, ali i izravno, neovisno o RANKL-u (96). Slično djeluje i IL-10, koji, osim smanjenja izražaja RANKL-a u susjednim stanicama potaknutim proupalnim citokinima, smanjuje i odgovor na RANKL u samim osteoklastima (98). Inhibicijsko djelovanje na osteoklastogenezu je predloženo i za IL-5, IL-12 i IL-13 (35). Za neke od proupalnih citokina za koje je nađeno da imaju i stimulirajuće i inhibirajuće djelovanje na osteoklastogenezu, primjerice IL-7, IL-23, i IL-6, pretpostavlja se da im učinak ovisi o specifičnim patofiziološkim uvjetima, odnosno razvojnoj fazi osteoklasta. Općenito, čini se da ti upalni citokini inhibiraju diferencijaciju osteoklasta u ranim fazama osteoklastogeneze poput nastanka OCP, dok u kasnijim fazama potiču RANKL-om induciranu osteoklastogenezu. U kroničnim upalnim stanjima ti upalni citokini pretežno djeluju proosteoklastogeno (35, 52).

#### **1.3.4. Uloga kemokina u gubitku kosti izazvanom upalom**

Dobro je poznato da kemokini upravljaju novačenjem i navođenjem imunskih stanica u RA i drugim upalnim reumatskim bolestima. Također se pretpostavlja da bi mogli biti uključeni u navođenje OCP u perifernoj krvi prema zahvaćenim zglobovima, s obzirom da stanice osteoklastne linije u koštanoj srži izražavaju kemokinske receptore (CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4 i CX3CR1) tijekom svojih različitih razvojnih



stadija. No, zasad je nedovoljno istražen doprinos kemotaksijskih signala u navođenju OCP i njihovoj diferencijaciji (98-104).

IL-8 (ili CXCL8) se veže na receptore CXCR1 i CXCR2, a proizvode ga i sami osteoklasti. Stimulira osteoklastogenezu i koštanu resorpciju neovisno o RANKL-u. Također ga luče određeni karcinomi, što rezultira osteolizom u metastatskoj bolesti. RANKL potiče proizvodnju IL-8 iz osteoklasta te je njegova uloga moguće važna i u fiziološkoj osteoklastogenezi (105).

CCL2 (ili MCP-1, prema engl. *monocyte chemoattractant protein 1*), ligand za receptor CCR2, snažno usmjerava migraciju monocita, stanica NK i limfocita T te koordinira upalni odgovor tijekom infekcije. Snažno ga luče osteoblasti stimulirani proupalnim citokinima. Izražaj CCL2 u mononuklearnim progenitorskim stanicama potaknut je RANKL-om, privlači OCP na mjesta resorpcije kosti i djeluje osteoklastogeno. CCL2 sposoban je samostalno diferencirati progenitore u zrele osteoklaste, koji međutim nisu resorpcijski aktivni bez dodatnog signala putem RANKL-a. Miševi s nedostatkom CCL2 pokazuju stanje nalik osteopetrozi, s vrlo oslabljenom koštanom resorpcijom, a normalnim stvaranjem kosti. Iako liječenje RA protutijelom usmjerenim na CCL2 nije pokazalo klinički učinak, istraživanja su pokazala da je razina CCL2 povezana s osteoklastogenim potencijalom stanica periferne krvi i aktivnošću bolesti (65, 106, 106)

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 neovisno o RANKL-u. Uz to, CCL3 potiče izlučivanje RANKL-a iz osteoblasta i stromalnih stanica koštane srži. CCL3 se veže na CCR1 na osteoklastima te potiče mobilnost, no inhibira njihovu resorptivnu aktivnost, a povezan je s osteolizom u multiplom mijelomu (99, 106).

CCL4 (ili MIP-1- $\beta$ , prema engl. *macrophage inflammatory protein 1- $\beta$* ) se veže na CCR5. Djeluje kao kemoatraktant stanica NK i monocita te je uočena interakcija s CCL3. Pokazano je da snažno djeluje na migraciju OCP iz koštane srži, no bez učinka na njihovu diferencijaciju i proliferaciju (100).

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 RA, osteoartritisa i osteomijelitisa. Osteoblasti koji luče CCL5 potiču osteoklastnu kemotaksiju pojačavajući izražaj kemokinskih receptora i migraciju stanica na mjesta resorpcije (100).

CCL9 (ili MIP-1- $\gamma$ , prema engl. *macrophage inflammatory peptide 1- $\gamma$* ), se veže na receptor CCR1 i stimulira funkciju osteoklasta. RANKL i proupalni citokini potiču izražaj CCR1-receptora i ujedno izlučivanje CCL9 iz osteoklasta (111).

CXCL9 (ili MIG, prema engl. *monokine induced by IFN- $\gamma$* ) se veže na receptor CXCR3 te je prije svega poznat kao kemoatraktant limfocita T čiji izražaj stimulira IFN- $\gamma$ . Međutim, uočeno je da je visoka razina CXCL9 povezana s diferencijacijom OCP iz koštane srži (102).

CXCL10 (ili IP-10, prema engl. *interferon- $\gamma$ -inducible protein 10*) također se veže za receptor CXCR3, djeluje proupalno i regulira imunski odgovor aktivacijom i novačenjem limfocita T, eozinofila, monocita i stanica NK. RANKL potiče izražaj CXCL10 na OCP, a CXCL10 pojačava izražaj RANKL-a u pomagačkim limfocitima T. CXCL10 potiče diferencijaciju osteoklasta u kokulturi OCP i CD4<sup>+</sup> limfocita T. U modelu CIA davanje neutralizirajućih protutijela anti-CXCL10 ublažava kliničke znakove bolesti i gubitak kosti (103).

CXCL12 (ili SDF-1, prema engl. *stromal cell-derived factor 1*) veže se na receptor CXCR4 te je pojačano izražen u vaskularnom endotelu i stromalnim stanicama koštane srži. CXCR4 izražavaju OCP, no ne i zreli osteoklasti. CXCL12 stoga iravno potiče rane faze razvoja osteoklasta, privlači ih na koštane površine, a osim toga može aktivirati limfocite T i sinovijalne fibroblaste te potaknuti ih na lučenje RANKL-a. Osteoklasti uzgajani uz dodatak CXCL12 pojačano razgrađuju kost i luče MMP9. Osteoklasti luče više CXCL12 kad su uzgajani na koštanom matriksu, a njegova moguća uloga je uočena i u stvaranju osteolitičkih žarišta u raznim neoplastičnim stanjima (105, 110, 111).

CCL20 je kemokin s povećanim izražajem u subhondralnoj kosti RA, te je također pokazano da izravno potiče ranu diferencijaciju osteoklasta te njihovu proliferaciju (112).

Okoliš koji djeluje na privlačenje, diferencijaciju i aktivnost osteoklasta vrlo je kompleksan, te brojni koraci jos nisu razjašnjeni, pogotovo veza perifernih i lokalnih progenitora specifičnih za pojedinu bolest, stoga bi razjašnjavanje te definiranje važnosti kemokinskih signala za migraciju i aktivaciju moglo pružiti uvid u nove prognostičke biljege ili terapijske pristupe.

## **2. HIPOTEZA**

Hipoteza ovog istraživanja je da u bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa dolazi do umnožavanja subpopulacije monocita u perifernoj krvi i sinovijalnoj tekućini koji, pod utjecajem proupalnih čimbenika, zadobivaju pojačanu sposobnost diferencijacije u zrele osteoklaste te čija brojnost i potencijal diferencijacije u osteoklaste pozitivno koreliraju s pokazateljima aktivnosti bolesti.

### 3. CILJEVI I SVRHA ISTRAŽIVANJA

Promjene u broju OCP u krvi i zahvaćenom zglobu bolesnika koji boluju od RA, kao i u njihovom fenotipu i funkcionalnoj aktivnosti, značajno pridonose oštećenju zglobova i osteodestrukciji, a praćenje tih parametara bi moglo imati dijagnostičku i prognostičku važnost.

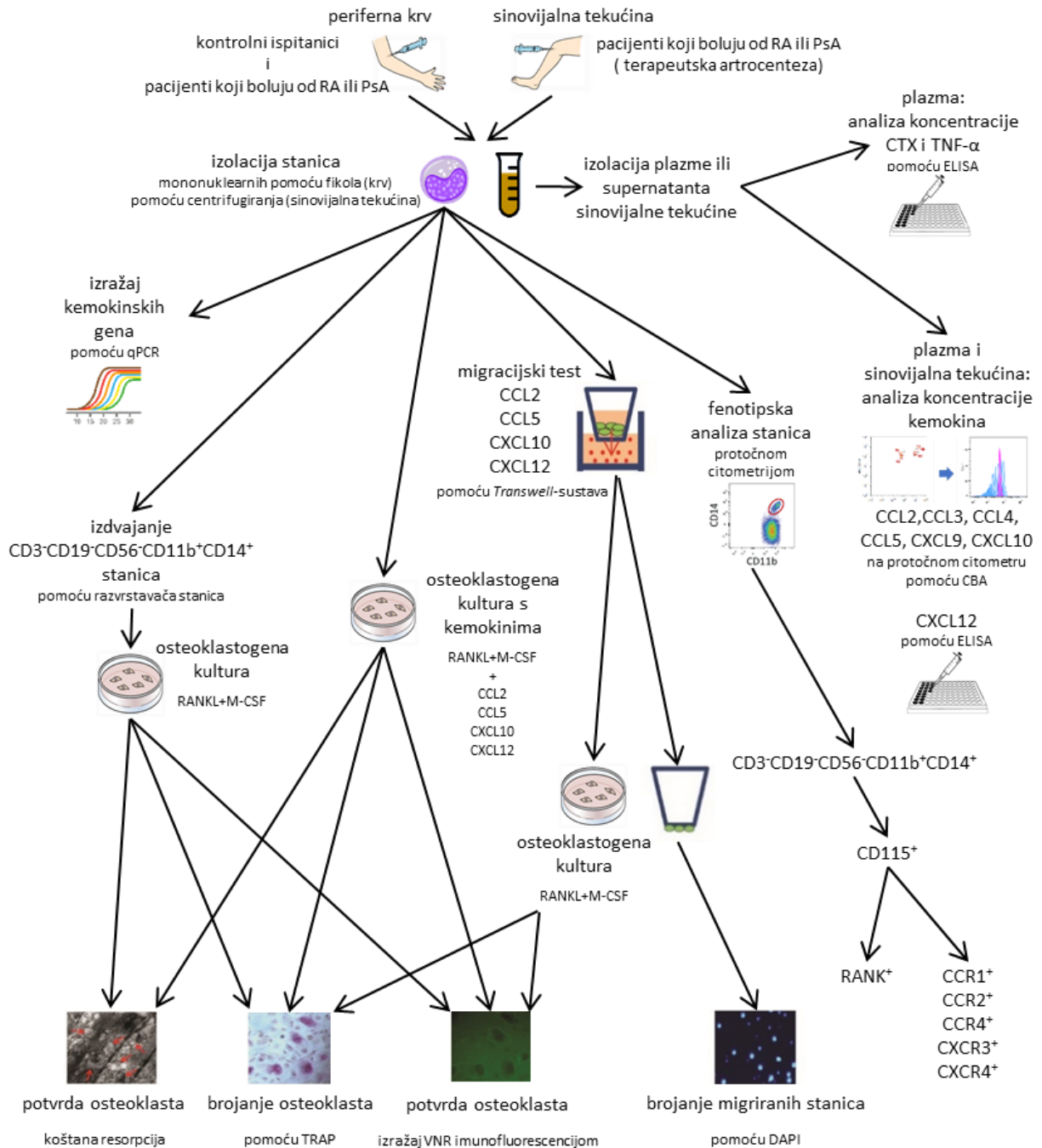
Stoga je svrha ovog istraživanja utvrditi fenotip, udio u populaciji monocita, potencijal diferencijacije u osteoklaste te mehanizme aktivacije OCP u perifernoj krvi i sinovijalnoj tekućini (SF, prema engl. *synovial fluid*) bolesnika koji boluju od artritisa u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika.

Specifični ciljevi predloženog istraživanja su:

- 1) utvrditi promjene u fenotipu i udjelu monocitne subpopulacije OCP te njihovog izražaja kemokinskih receptora u perifernoj krvi i SF bolesnika koji boluju od RA i PsA u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika;
- 2) utvrditi potencijal diferencijacije u osteoklaste izdvojene subpopulacije monocita iz periferne krvi i SF bolesnika koji boluju od RA u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika te potvrditi sposobnost koštane resorpcije diferenciranih stanica;
- 3) utvrditi promjene u izražaju kemokina u perifernoj krvi i SF u bolesnika koji boluju od RA u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika te ispitati osteoklastogene i kemotaksijske učinke kemokina na populaciju OCP;
- 4) analizirati dinamiku promjena udjela populacije OCP i njihovog izražaja kemokinskih receptora u bolesnika koji boluju od artritisa tijekom liječenja anti-TNF terapijom;
- 5) analizirati povezanost udjela i osteoklastogenog potencijala populacije OCP, izražaja kemokinskih receptora te razine kemokina s kliničkim parametrima i aktivnošću bolesti.

## 4. MATERIJALI I METODE

Pokusi su napravljeni u Laboratoriju za molekularnu imunologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, s ispod prikazanim hodogramom postupaka u laboratoriju (Slika 5).



**Slika 5. Hodogram laboratorijskih postupaka.** Uzorci krvi kontrolnih ispitanika, bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa (RA) ili psorijatičnog artritisa (PsA) su fikolirani kako bi se izdvojile mononuklearne stanice, te se ujedno prikupila plazma. Stanice iz uzoraka sinovijalne tekućine bolesnika koji boluju od RA ili PsA izdvojene su centrifugiranjem, a

supernatant je zadržan. Iz izdvojenih mononuklearnih stanica periferne krvi učinjena je fenotipizacija OCP (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>) pomoću protočnog citometra te je analiziran izražaj receptora za diferencijacijske čimbenike osteoklasta – receptora za čimbenik stimulacije kolonija makrofaga (M-CSF, prema engl. *macrophage colony-stimulating factor*) (CD115) i receptora za aktivator jezgrenog čimbenika κB (RANK, prema engl. receptor activator of nuclear κB) – te odabrane kemokinske receptore za ligande C-C i C-X-C motiva. OCP su razvrstavačem stanica izdvojeni, sađeni u osteoklastogene kulture s čimbenicima diferencijacije M-CSF i RANK ligandom (RANKL), a posljedično diferencirani zreli osteoklasti su prebrojani pomoću bojanja na kiselu fosfatazu otpornu na tartarat (TRAP, prema engl. *tartrate-resistant acid phosphatase*) te potvrđeni izražajem vitronektinskog receptora (VNR) i resorpcijom kosti. Nerazvrstane mononuklearne stanice su testirane posjeduju li svojstvo kemotaksije migracijskim testom s kemokinima pomoću Transwell sustava. Broj migriranih stanica kroz Transwell membranu prebrojan je bojanjem 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI, prema engl. 4',6-diamidino-2-phenylindole), a stanice koje su došle na dno donje komore nastavljene su uzgajati u osteoklastogenoj kulturi, te su diferencirani osteoklasti prebrojani bojanjem na TRAP i potvrđeni izražajem VNR-a. Kemokini su testirani i za osteoklastogene osobine kulturom nerazvrstane mononuklearne stanice s dodatkom kemokina u normalni diferencijacijski medij. Također je analiziran izražaj gena za kemokine iz mononuklearnih stanica. Koncentracije kemokinskih liganda izmjerene su u plazmi i sinovijalnoj tekućini pomoću metode za mjerenje koncentracije proteina na protočnom citometru (CBA, prema engl. *cytometric bead array*) ili kolorimetrijski imunoenzimski postupak (ELISA, prema engl. enzyme linked immunosorbent assay). Iz plazme je dodatno izmjerena i koncentracija čimbenika nekroze tumora α (TNF-α, prema engl. *tumor necrosis factor α*) i biljega koštane resorpcije C-terminalnog telopeptida kolagena tipa I (CTX, prema engl. *carboxy-terminal collagen crosslinks*).

#### **4.1. Bolesnici**

U istraživanje su uključeni bolesnici koji boluju od artritisa (RA, n=129 i PsA, n=53), zaprimljeni u Klinički bolnički centar “Sestre Milosrdnice”, Kliničku bolnicu “Sveti Duh” te Klinički bolnički centar “Zagreb”. Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom te ga je odobrio Odbor za etiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (urudžbeni broj 525-10/0255-15-3) na temelju prethodno odobrenje etičkih odbora sve tri

bolnice. Bolesnici su dali informirani pristanak za sudjelovanje u studiji. Kontrolni bolesnici (CTRL, prema engl. *control*; n=110) su bili zaprimljeni u iste bolnice zbog neupalne etiologije, bez prethodne povijesti zglobnih ili autoimunskih bolesti. Specijalisti reumatolozi postavljali su dijagnozu RA na temelju kriterija ACR 2010, dok je PsA dijagnosticiran prema kriteriju Molla i Wrighta (17, 115). Uzorci periferne krvi su uzeti tijekom rutinske kliničke obrade te obrađeni za daljnje analize. Od bolesnika su prikupljeni sljedeći klinički podaci: trajanje bolesti (u godinama), bolesnikova i liječnikova procjena aktivnosti bolesti (VAS), bolesnikova procjena boli i umora (VAS), broj bolnih zglobova (TJC, od ukupno 28), broj otečenih zglobova (SJC, od ukupno 28), brzina SE, koncentracija CRP, DAS28 (izračunat pomoću SE, Tablica 2), CDAI, koncentracije RF (određenog turbidimetrijom) i ACPA [određenog pomoću imunoenzimske metode (ELISA, prema engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)], te primjenjenu terapiju (klasični DMARD, NSAID, kortikosteroidi i/ili biološka terapija). Za neke analize bolesnici koji boluju od RA su grupirani na osnovu njihovog DAS28 u slučajevne teške (DAS28>5,1) i srednje/blage (DAS28 2,6-5,1) aktivnosti bolesti (20). Kohorti bolesnika s artritismom (n=24) uzet je uzorak sinovijalne tekućine (SF, prema engl. *synovial fluid*) tijekom terapijske artrocenteze. Manja kohorta bolesnika (n=9), predviđena za početak biološke terapije TNF inhibitorima (etanercept 50mg tjedno ili adalimumab 40mg svaka dva tjedna), uvrštena je u praćenje pri čemu su im se uzimali uzorci krvi neposredno prije početka biološke terapije te na početku 2., 4. i 6. mjeseca nakon početka.

## **4.2. Izolacija mononuklearnih stanica**

Uzorci krvi su uzeti između 9:30 i 11:30 sati. Mononuklearne stanice iz periferne krvi (PBMC, prema engl. *peripheral blood mononuclear cells*) i plazma su izdvojeni iz uzoraka perifne krvi centrifugiranjem (20 min na 600 g) na gradijentu medija Histopaque (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, SAD). Aspirirani uzorci SF su razdvojeni centrifugiranjem (5 min na 100 g) u acelularni supernatant i stanice. Uzorci plazme i SF su potom pohranjeni na -20°C do analize ELISA-om ili citometrijskom metodom za određivanje koncentracije proteina (CBA, prema engl. *cytometric bead array*), dok su PBMC i stanice iz SF odmah fenotipizirani protočnom citometrijom, sortirani za OCP, upotrebljeni za osteoklastogene kulture, testove migracije te je izolirana RNA.

## **4.3. Protočna citometrija**

Fenotipska karakterizacija OCP izvedena je na protočnom citometru Attune (Life Technologies, ABI, Carlsbad, CA, SAD), a podaci su analizirani pomoću programa FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, SAD). Broj stanica u suspenziji je određen brojanjem u Bürker-Türkovoj komorici korištenjem 0,05% tripanskog plavila kako bi isključili mrtve stanice. Stanice su potom obilježene koristeći kombinaciju komercijalno dostupnih monoklonalnih protutijela na limfoidne biljege [anti-CD3 fluorescein izotiocijanat (FITC, prema engl. *fluorescein isothiocyanate*) za limfocite T, anti-CD19 FITC za limfocite B i anti-CD56 FITC za NK stanice], mijeloidne biljege [anti-CD11b fikoeritrin-cijanin7 (PE-Cy7, prema engl. *phycoerythrin-cyanine7*) i anti-CD14 peridin-klorofil-cijanin5.5 (PerCP-Cy5.5, prema engl. *peridinin-chlorophyll-cyanine5.5*)], receptora na faktore osteoklastne diferencijacije [receptor za M-CSF (biotinilirani anti-CD115), RANK (anti-RANK PE)], te nekoliko kemokinskih receptora [anti-CCR1 alofikocijanin (APC, prema engl. *allophycocyanine*), anti-CCR2 PE, anti-CCR4 APC, anti-CXCR3 APC, anti-CXCR4 PE] (sva korištena protutijela su od eBiosciences, San Diego, CA, SAD). Suspenzije stanica i protutijela su inkubirane 40 min na ledu, nakon čega je suvišak nevezanih protutijela ispran medijom za protočnu citometriju [fiziološka otopina puferirana fosfatima (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*) s 2% fetalnog goveđeg seruma (FBS, prema engl. *fetal bovine serum*)]. U drugom koraku (za biotinilirani anti-CD115), stanice su bojane streptavidinom vezanim s fluoroforom APC-eFluor 780 novih 40 min na ledu, nakon čega su ponovno isprane u mediju za protočnu citometriju i resuspendirane za analizu. OCP su definirani kao dio monocitne subpopulacije s fenotipom CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> (52). Ta subpopulacija stanica je potom analizirana za izražaj CD115 i RANK-a, te iz rezultirajuće subpopulacije na izražaj kemokinskih receptora (CCR1, CCR2, CCR4, CXCR3 i CXCR4). Okviri za analizu su definirani korištenjem neoznačenih stanica te kontrolama obojanim kombinacijom protutijela u kojima nedostaje fluorofor za koga se određuje prag pozitivnosti (FMO, prema engl. *fluorescence minus one*).

#### **4.4. Razvrstavanje stanica**

Za fluorescencijom aktivirano razvrstavanje stanica (FACS, prema engl. *fluorescence-activated cell sorting*), mononuklearne stanice kontrolnih uzoraka i uzoraka bolesnika koji boluju od RASu označene na limfoidne (anti-CD3 FITC za limfocite T, anti-CD19 FITC za limfocite B, anti-CD56 FITC za stanice NK) i mijeloidne (anti-CD11b APC i anti-CD14 PE-Cy7) biljege te razvrstene koristeći BD FACSAria I (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, SAD). Označene stanice su propuštane kroz stroj brzinom od otprilike 5000 stanica/s, te su pojedinačne stanice



izdvojene iz ukupne stanične populacije na prikazu prednjeg (FSC, prema engl. *forward-scatter*) nasuprot postraničnog (SSC, prema engl. *side-scatter*) rasapa. Nakon toga su okvirima u programu izdvojene stanice negativne na limfoidne biljege, a slabo pozitivne na CD11b te su analizirane za izražaj CD14. Definirana populacija OCP (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>) je razvrstana u tubice za sakupljanje stanica u 2 mL minimalnog esencijalnog medija  $\alpha$  ( $\alpha$ -MEM, prema engl.  *$\alpha$ -minimal essential medium*) s 20% FBS te potom korištena za osteoklastogene kulture. Čistoća razvrstavanja je utvrđena ponovljenom analizom izdvojenih populacije te je konzistentno bila veća od 99%.

#### **4.5. Diferencijacija osteoklasta iz razvrstanih mononuklearnih stanica periferne krvi**

Razvrstani OCP su sađeni u pločice s 96 bunarića u gustoći od 10000 stanica po bunariću u 0,2 mL diferencijacijskog medija koji je sadržavao  $\alpha$ -MEM s 10% FBS, 100 U/mL penicilina te 100 U/mL streptomicina. Prva tri dana kulture dodano je 60 ng/mL rekombinantnog ljudskog (rh, prema engl. *recombinant human*) M-CSF (R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD) kako bi se stimulirala proliferacija stanica. Idućih 8-11 dana, diferencijacijski medij je nadopunjen s 100 ng/mL rhRANKL-a (R&D Systems) i 30 ng/mL rhM-CSF kako bi se stimulirala diferencijacija u zrele osteoklaste. Između 11. i 13. dana kulture, osteoklasti su prebrojani koristeći bojanje za TRAP.

#### **4.6. Test migracije**

Mononuklearne stanice su zasađene u gustoći od 10000 stanica po bunariću u pločice s 48 bunarića u 0.5 mL diferencijacijskog medija ( $\alpha$ -MEM/10% FBS) te preko noći inkubirane u kulturi s 35 ng/mL M-CSF. Neadherentne stanice, obogaćene OCP, su prikupljene za daljnje analize (65). S obzirom na raznolikost monocitno/makrofagne populacije periferne krvi, neadherentna frakcija dobivena nakon kratkotrajne inkubacije sastojala se od mješavine nezrelih monocita i limfocita (za razliku od mješavine limfocita i zrelijih monocita u adherentnoj frakciji). Limfociti su većinom uklonjeni u sljedećim promjenama medija. Neadherentna frakcija pokazala osteoklastogenijom od adherentne, koju karakterizira jaka proliferacija fibrocita (stimuliranih također M-CSF-om) te također zahtijeva manju manipulaciju stanicama, jednostavnija je za uzeti i daje reproducibilnije rezultate. Ta metoda je temeljito optimizirana u prethodnim pokusima, uzimajući prijašnja istraživanja u obzir (114).

Dio neadherentnih stanica je korišten za osteoklastogene kulture koje su dodatno tretirane dodavanjem kemokina. Te stanice su sađene u gustoći od 25000 stanica po bunariću i pločice s 96 bunarića u mediju  $\alpha$ -MEM/10% FBS s 100 ng/mL rhRANKL i 30 ng/mL rhM-CSF, te dodatkom 40 ng/mL CCL2, 10 ng/ml CCL5, 20 ng/mL CXCL10 ili 50 ng/mL CXCL12 (PeproTech, Rocky Hill, NJ, SAD). Pokusi su provedeni na uzorcima periferne krvi bolesnika koji boluju od RA (n=6-12 po testiranom kemokinu). Nakon 10 do 11 dana, stanice su obojane na TRAP kako bi se izbrojali osteoklasti.

Ostatak neadherentnih stanica je korišten za kulture s upotrebom *Transwell*-sustava. Stanice su zasade u gustoći od 50000 stanica po bunariću u pločice s 48 bunarića u  $\alpha$ -MEM/10% FBS s 100 ng/mL RANKL i 30 ng/mL M-CSF. Nakon 3 dana kulture, adherentne stanice su prikupljene pažljivim skidanjem s dna bunarića (nakon odstranjenja neadherentnih stanica) te su stavljane u gornje komorice *Transwell*-pločica s 24 bunarića (veličine pore membrane 8  $\mu$ m) (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, SAD) u gustoći od 10000 stanica po *Transwell*-membrani, u 0,1 mL  $\alpha$ -MEM/10% FBS. U donjim komoricama nalazilo se 0,5 mL  $\alpha$ -MEM/10% FBS uz 40 ng/mL CCL2, 10 ng/ml CCL5, 20 ng/mL CXCL10 ili 50 ng/mL CXCL12 (PeproTech). Nakon 3 sata inkubacije na 37°C uz 5% CO<sub>2</sub>, *Transwell*-membrane su uklonjene te im je gornja površina pažljivo isprana PBS-om, a preostale stanice uklonjene su pamučnim štapićem. Stanice koje su migrirale na donju stranu *Transwell*-membrane su fiksirane 4%-tnim paraformaldehidom te obojane 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI, prema engl. *4',6-diaminidino-2-phenylindole*). Stanice su prebrojane (2 bunarića po grupi, 5 središnjih polja po *Transwell*-membrani) na povećanju 200X koristeći invertni fluorescentni mikroskop (Axiovert 200, Carl Zeiss, AG, Oberkochen, Germany).

Stanice koje su prošle kroz *Transwell*-membranu u donju komoricu pločice nastavilo se uzgajati sljedećih 8 do 9 dana u  $\alpha$ -MEM/10% FBS uz 100 ng/mL RANKL i 30 ng/mL M-CSF. Na kraju kulture, pločice su obojane na TRAP kako bi se odredio broj osteoklasta.

#### **4.7. Identifikacija osteoklasta**

Broj osteoklasta diferenciranih *in vitro* je određen bojanjem na TRAP na kraju kulture, između 10. i 13. dana. Osteoklastogene kulture su uzgajane kao što je prethodno opisano. Stanice su potom fiksirane 4%-tnim paraformaldehidom kroz 10 minuta te potom obojane na TRAP koristeći komercijalno dostupan set kemikalija prema uputama proizvođača (Leukocyte acid phosphatase kit; Sigma-Aldrich Corp.). Osteoklasti su identificirani i brojani kao TRAP<sup>+</sup>

stanice s dvije ili više jezgara po stanici koristeći invertni svjetlosni mikroskop Axiovert 200 (Carl Zeiss, AG, Oberkochen, Germany) na 200X povećanju.

Izražaj VNR i testiranje koštane resorpcije su izvedeni usporedno s TRAP bojanjem kako bi se potvrdio identitet stanica, pošto TRAP nije apsolutno specifičan za osteoklaste (35).

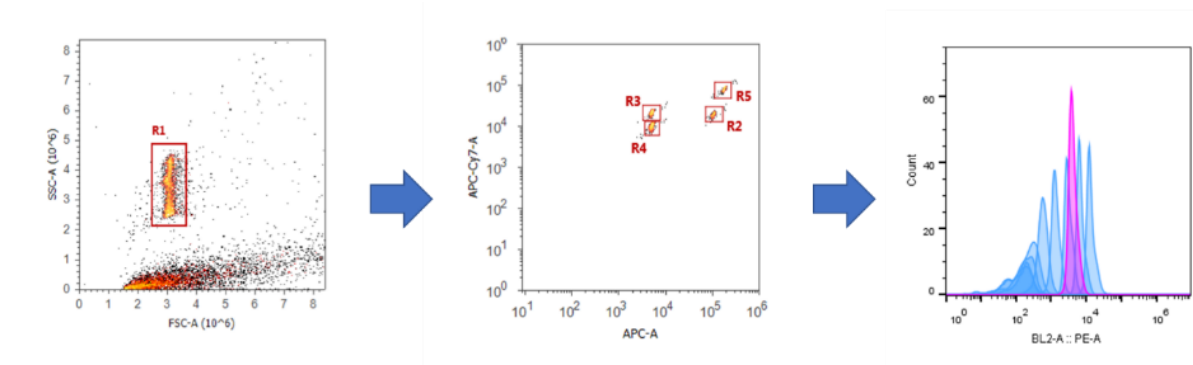
Za detekciju VNR, osteoklastogene kulture su uzgajane prema prethodno opisanom protokolu. Između 14. i 16. dana, stanice su fiksirane 4%-tnim paraformaldehidom 10 min. Fc receptori su blokirani inkubacijom uz 2%-tni goveđi serumski albumin (BSA, prema engl. *bovine serum albumin*) u PBS-u tijekom 30 minuta, kako bi se smanjilo nespecifično vezanje protutijela. Monoklonoalno biotinizirano protutijelo anti-CD51/61 (eBiosciences) je inkubirano 2 h pri razrijeđenju od 1:80 u puferu PBS/2%BSA. U drugom koraku, dodan je streptavidin vezan za FITC te inkubiran 1 h na sobnoj temperaturi u mraku. Jezgre stanica su obojane pomoću DAPI. Izražaj VNR je vizualiziran koristeći invertni fluorescentni mikroskop (Axiovert 200, Carl Zeiss) na 200X povećanju.

Za testiranje koštane resorpcije, stanice su zasađene na komadiće goveđe kortikalne kosti koristeći istovjetne uvjete kulture kao što je prethodno opisano. Između 16. i 18. dana kulture, stanice su fiksirane 4%-tnim paraformaldehidom 10 min na sobnoj temperaturi. Potom su obojane na TRAP koristeći komercijalno dostupan set kemikalija (Leukocyte acid phosphatase kit; Sigma-Aldrich Corp.). Stanice su zatim uklonjene sa komadića kosti sonikacijom 5 min u 0,25M NH<sub>4</sub>OH. Komadići kosti su potom bojani 2 min 1%-tnim toluidinskim modrilom u puferu 1% boraksa kako bi se bolje istaknule resorpcijske lakune koje su proučavane svjetlosnim mikroskopom (Axiovert 200, Carl Zeiss) na 200X povećanju.

#### **4.8. Citometrijska metoda određivanja koncentracije proteina**

Citometrijski set CBA (prema engl. *cytometric bead array*) je izveden koristeći komercijalni kit prema uputama proizvođača (Human Chemokine Kit, BD Biosciences, San Jose, CA, SAD) kako bi se izmjerile koncentracije kemokina CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, i CXCL10 u uzorcima periferne krvi i SF (Slika 6). Uzorci plazme i supernatanta SF su razrijeđeni 1:4 koristeći priređeni pufer za razrijeđivanje iz seta proizvođača. Reagens se sastoji od kuglica prekrivenih protutijelima specifičnim za svaki od traženih proteina te se pojedine vrste kuglica mogu razlikovati specifičnim uzorcima fluorescencije u dva fluorescentna kanala na protočnom citometru (APC nasuprot APC-Cy7 signal). Uzorci su potom isprani te inkubirani s detekcijskim reagensom. Koncentracija vezanog analita je utvrđena intenzitetom fluorescencije PE, koja ovisi o količini vezanih PE-konjugiranih protutijela na analite prethodno vezane na

kuglice. Nakon još jednom ispiranja, kompleksi kuglica, analita i detekcijskih protutijela su analizirani koristeći protočni citometar Attune (Life Technologies). Mjerenje i analiza koncentracija kemokina izvedena je koristeći program FCAP Array v3.0 (BD Biosciences), služeći se krivuljama standarda dobivenih iz podataka generiranih propuštanjem unaprijed pripremljenih količina kemokina u komercijalnom setu.



**Slika 6. Citometrijska metoda određivanja koncentracije proteina.** Komercijalni kit CBA (prema engl. *cytometric bead array*) funkcionira na temelju od kuglica prekrivenih protutijelima specifičnim za jedan od traženih proteina, a kuglice za različite proteine se mogu razlikovati specifičnim uzorcima fluorescencije u dva fluorescentna kanala na protočnom citometru (alofikocijanin (APC, prema engl. *allophycocyanin*) nasuprot APC-Cy7 signala). Nakon vezanja analita na kuglice, u drugom koraku se inkubiraju s detekcijskim reagensom. Koncentracija vezanog analita je utvrđena intenzitetom fluorescencije fikoeritrina (PE, prema engl. *phycoerythrin*), a koji ovisi o količini vezanih PE-konjugiranih protutijela na analite prethodno vezane na kuglice. Kompleksi kuglica, analita i detekcijskih protutijela su analiziraju koristeći protočni citometar. Plavim šiljcima su pokazani intenziteti fluorescencije serijskih razrjeđenja standarda, dok je ljubičasti šiljak intenzitet fluorescencije u uzorku. Mjerenje i analiza koncentracija kemokina izvedena je koristeći proizvođačev program, služeći se krivuljama standarda dobivenih iz podataka generiranih propuštanjem unaprijed pripremljenih količina kemokina u komercijalnom setu.

#### 4.9. Analiza izražaja gena

RNA je izolirana iz PBMC koristeći otopinu TRIzol (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) za izolaciju, nakon prethodnog ispiranja stanica PBS-om. Nakon dodavanja TRIzola, uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi tijekom 10 min, a potom centrifugirani brzinom od 12000 g tijekom 30 min na +4°C. Potom je u uzorke dodano 0.2 mL

kloroforma, uzorci su inkubirani 2 minute na +4°C te centrifugirani pri 10000 g tijekom 15 minuta na +4°C. Gornja, vodena faza je prenešena u novu epruvetu, na nju je dodano 0.5 mL izopropanola i inkubirana je tijekom 60 min na -20°C. Ponovnim centrifugiranjem pri 12000 g tijekom 15 minuta na +4°C je spušten dobiveni precipitat na dno epruvete, opran je 75%-tnim etanolom i centrifugiran brzinom od 7500 rpm tijekom 5 minuta na +4°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. Za lančanu reakciju polimeraze (PCR, prema engl. *polymerase chain reaction*), 1 µg RNA je preveden u komplementarnu DNA (cDNA, prema engl. *complementary DNA*) koristeći set kemikalija High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems). 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. cDNA je pohranjena na -20°C do daljnje analize. Količina cDNA koja odgovara 20 ng obrnuto prepisane RNA amplificirana je kvantitativnim PCR-om (qPCR, prema engl. *quantitative PCR*) u ABI Prism 7500 (Applied Biosystems) sustavu za detekciju sekvenci. TaqMan Assay sastoji se od para specifičnih početnica 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 početnica, a produljenjem početnica, DNA polimeraza cijepa probu i tako dovodi do odvajanja fluorescentne boje od NFQ i porasta fluorescencije. Analiziran je izražaj gena za CCL2 (hs00234140\_m1), CCL3 (hs00234142\_m1), CCL4 (hs99999148\_m1), CCL5 (hs00982282\_m1) te CXCL12 (hs02668440\_m1) koristeći komercijalno setove TaqMan Assay (Applied Biosystems) i TaqMan Gene Expression Master mix (Applied Biosystems) prema uputama proizvođača. Svaka reakcija je izvedena u duplikatu u 25 µL reakcijskog volumena. Smjesa je sadržavala: 0,25 µL cDNA; 0,25 U uracil N-glikozilaze (AmpErase; Applied Biosystems); po 200 nM početnica 5' i početnica 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. Relativne količine su izračunate koristeći krivulju standarda dobivenu analizom podataka šest serijskih razrjeđenja kalibracijskog uzorka (mononuklearne stanice periferne krvi kontrola). Prema krivulji standarda, relativne količine RNA za tražene gene su izračunate kao omjer količine traženog

gena normaliziran prema gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazi (GAPDH, prema engl. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) kao endogenoj kontroli.

#### **4.10. Kolorimetrijski imunoenzimski postupak ELISA**

Plazmatske koncentracije TNF- $\alpha$  (Quantikine High Sensitivity Immunoassay, R&D systems), CXCL12 (Quantikine Immunoassay, R&D systems), C-terminalnog telopeptida kolagena tipa I (CTX, prema engl. *carboxy-terminal collagen crosslinks*) (Immunodiagnostic Systems, Boldons, UK), te sinovijalne koncentracije RANKL-a (Quantikine Immunoassay, R&D systems) određene su imunoenzimatskom metodom prema uputama proizvođača. Ukratko, uzorci su prvo razrijeđeni 1:4 u PBS-u te zatim inkubirani 2-3 h na sobnoj temperaturi u pločicama s 96 bunarića koji su obloženi protutijelima na mjereni analit. Potom su pločice isprane tri puta otopinom 0,05% Tweena u PBS-u te inkubirane sljedećih 2 h u otopini protutijela na traženi analit, koja su vezana na hrenovu peroksidazu (HRP, prema engl. *horseradish peroxidase*) (za CXCL12 i RANKL), odnosno na alkalnu fosfatazu (AP, prema engl. *alkaline phosphatase*) (za TNF- $\alpha$  i CTX). Nakon toga su pločice ponovno isprane tri puta te je reakcija vezanja vizualizirana dodavanjem otopine supstrata (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) (za CXCL12 i RANKL) ili supstrata i pojačivača (nikotinamid adenin dinukletid fosfata i enzima pojačivača) (za TNF- $\alpha$  i CTX) uz inkubaciju idućih 15-30 minuta. Nakon što se boja razvila, reakcija je zaustavljena 10 mM klorovodičnom (CXCL12 i RANKL), odnosno 10 mM sumpornom kiselinom (TNF- $\alpha$  i CTX). Optička gustoća obojenja bunarića izmjerena je odmah po zaustavljanju reakcije pomoću optičkog čitača mikropločica (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD) na 450 nm (CXCL12 i RANKL), odnosno 490 nm (TNF- $\alpha$  i CTX). Titar svakog proteina određen je prema krivulji standarda dobivenoj očitanjem serijskih razrjeđenja standardnog uzorka poznate koncentracije, dobivenog u setu kemikalija.

#### **4.11. Statistička analiza**

Podaci su prikazani kao medijani s interkvartilnim rasponom (IQR, prema engl. *interquartile range*) za kontinuirane varijable (uključujući kliničke ljestvice, laboratorijske parametre, koncentracije proteina, brojeve stanica te udjele populacija) nakon testiranja normalnosti raspodjele D'Agostino-Pearsonovim testom ili kategorizirani za kategoričke varijable (uključujući spol, DAS28 subpopulacije te vrstu terapije). Statistička analiza razlike između skupina provedena je koristeći neparametrijski test Mann-Whitneyev (za usporedbe između dvije skupine), odnosno prvo test Kruskal-Wallisov nakon kojeg je slijedio test Mann-

Whitneyev (za višestruke usporedbe). Korelacije su napravljene pomoću korelacije ranga i Spearmanovog koeficijenta rho ( $\rho$ ) uz 95%-tni interval pouzdanosti (CI, prema engl. *confidence interval*). Analiza trenda je provedena na populacijskim udjelima tijekom anti-TNF terapije koristeći jednosmjernu analizu varijance (ANOVA, prema engl. *analysis of variance*) s polinomijalnom vrstom kontrasta te testiranjem za linearni trend. Višestruka logistička regresija je napravljena uzimajući udjel OCP (stanice CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>) u perifernoj krvi kao zavisnu varijablu. Parametri su uzimani u obzir kao nezavisne varijable ako je prethodna komparativna analiza između vrijednosti kontrola i RA pokazala značajnu razliku. Potom je izvršena temeljita pretraga kako bi se utvrdilo koje tri značajno različite nezavisne varijable rezultiraju s maksimalnim prilagođenim R<sup>2</sup>, izuzimajući pritom nedostajuće podatke iz analize po principu parova. 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% (Kovacic Lab Invest 2007). Statističke analize su učinjene pomoću programa MedCalc, verzije 9.4.2.0 (MedCalc Software, Ostend, Belgium). U svim testovima za razinu statističke značajnosti (vrijednost  $\alpha$ ) korišten je  $p < 0,05$ .

## 5. REZULTATI

Kako bi utvrdili promjene u fenotipu i brojnosti OCP, njihovom mehanizmu kemotaksije te povezanosti tih podataka s kliničkim parametrima i aktivnošću bolesti, u istraživanje su uvršteni bolesnici koji boluju od RA (n=129) i PsA (n=53) te kontrolni ispitanici (n=110). Bolesnici koji boluju od PsA su uvršteni kako ne bi samo utvrdili promjene u odnosu na kontrolne, zdrave, ispitanike, već i ispitali specifičnost tih promjena za RA u odnosu na PsA. Kod bolesnika koji boluju od PsA, glavna namjera je bila uvrštavanje što većeg broja bolesnika s kroničnim poliartritičnim simetričnim oblikom bolesti koji zahvaćanjem zglobova nalikuju RA. Usporedbom kliničkih parametara i aktivnošću bolesti, vidljivo je da su skupine ispunile taj naum (Tablica 5).

### **5.1. Bolesnici koji boluju od reumatoidnog artritisa imaju visoku aktivnost bolesti s povišenim upanim, osteoresorptivnim i autoimunskim pokazateljima**

Demografske i kliničke karakteristike ispitanika su pokazale da većina uvrštenih bolesnika u studiji koji boluju od RA imaju kroničnu aktivnu bolest (medijan DAS28 5,97 [4,99-6,71]; Tablica 5), sa više zahvaćenih zglobova i izraženom osteoresorpcijom (medijan CTX 0,38 pg/mL [0,26-0,49] u RA nasuprot 0,28 pg/mL [0,21-0,32] u kontrola). Većina bolesnika (n=90) je bila seropozitivna, s povišenim pokazateljima upale (SE i CRP). Iako su bolesnici bili pod terapijom (NSAID, DMARD, glukokortikoidi i/ili biološka terapija), DAS28 i ostali klinički parametri (SJC, TJC, CDAI) su ostali visoki, sugerirajući napredovanje bolesti. U usporedbi sa zdravim, kontrolnim ispitanicima, nije bilo značajne razlike u dobi (medijan dobi 65 [48-68] godina u kontrola nasuprot 65 [51-74] u RA) i spolu (broj muškaraca/žena 21/89 u kontrola nasuprot 15/114 u RA) između grupa.

Parametri bolesti su grupirani u varijable koje odražavaju intenzitet upale (CRP, SE i TNF- $\alpha$ ), razaranje zglobova/osteoresorpciju (CTX, SJC/TJC, CDAI) te autoimunosnu reakciju (RF, ACPA) te potom analizirani u odnosu na DAS28 kategorije kako bi se uočile razlike između pojedinih koncentracija aktivnosti bolesti (Slika 7). I koncentracija TNF- $\alpha$  i koncentracija RF je bila značajno povišena u teškoj bolesti (DAS28>5,1) u odnosu na kontrole i blagu/umjerenu bolest (DAS28 2,6-5,1). Plazmatski CTX, kao marker osteoresorpcije, nije rastao s težinom bolesti, što bi se moglo objasniti činjenicom da veći broj čimbenika utječe na pregradnju kosti osim same bolesti (bolesnikova dob, upotreba glukokortikoida, smanjena pokretljivost) (115).

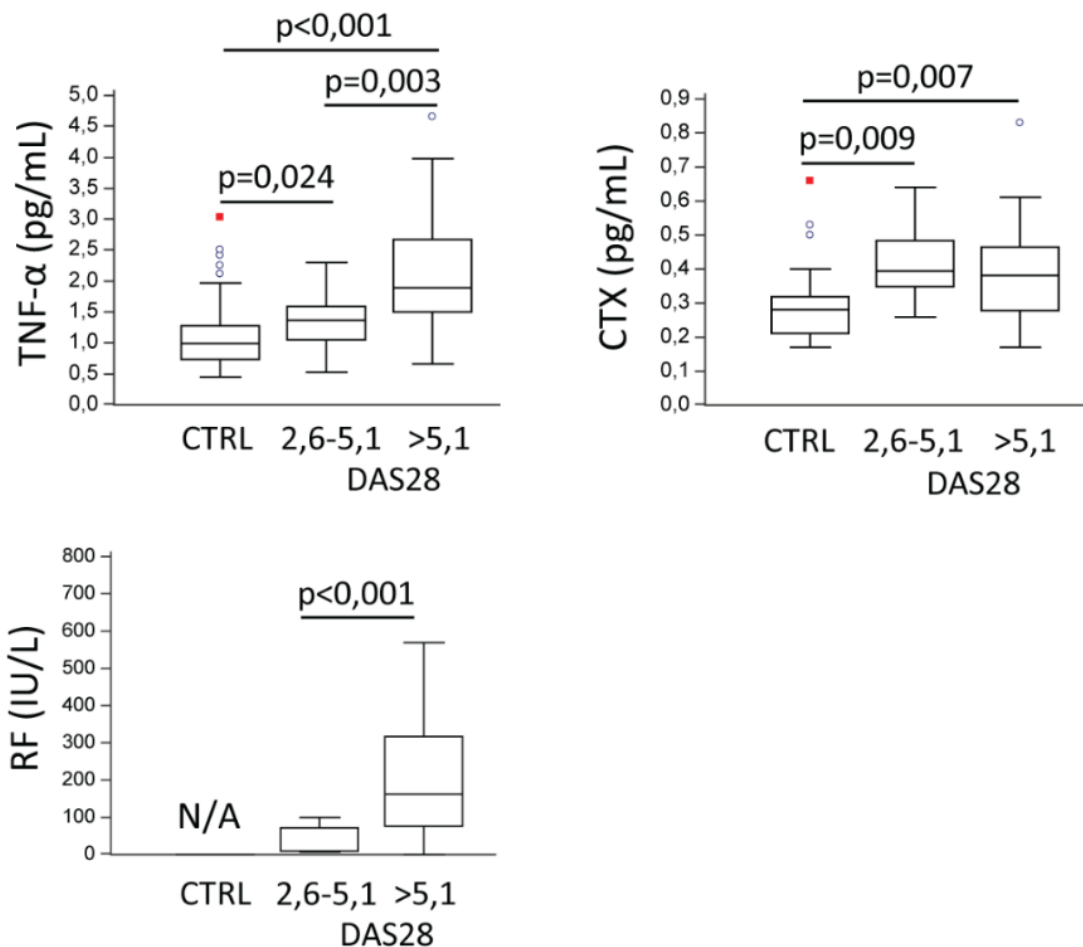


U odnosu na vrstu terapije, niže koncentracije CTX-a su uočene u bolesnika koji su uzimali DMARD (Slika 8).

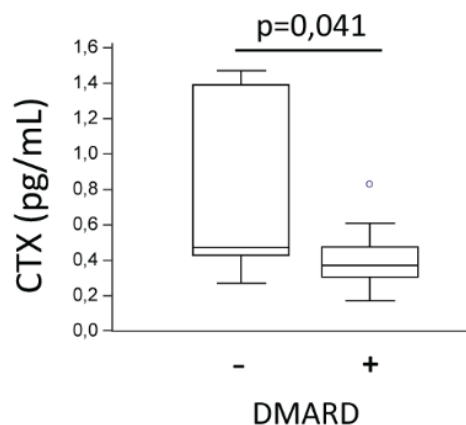
**Tablica 5. Demografske i kliničke karakteristike bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa i psorijatičnog artritisa**

	<b>RA (n=129)</b>	<b>PsA (n=53)</b>
<b>Dob (godina)</b>	65 [51-74]	56 [44-74]
<b>Spol (muški/ženski)</b>	15/114	24/29
<b>DAS28</b>	5,97 [4,99-6,71]	5,50 [4,05-6,78]
<b>DAS28 2,6-5,1 / DAS28 &gt;5,1 (%)</b>	25,0% / 75,0%	41,8% / 58,2%
<b>CDAI</b>	37,0 [24,0-44,1]	33,6 [14,0-52,1]
<b>Trajanje bolesti (godina)</b>	18,5 [9,0-29,0]	14,0 [8,0-30,0]
<b>SE (mm/h)</b>	27,5 [19,0-39,5]	14,5 [4,0-46,5]
<b>CRP (mg/L)</b>	11,9 [4,8-24,5]	2,7 [0,7-29,1]
<b>RF (IU/L)</b>	79,7 [15,0-239,0]	NP
<b>ACPA (EU/L)</b>	68,7 [2,2-270,8]	NP
<b>Broj bolnih zglobova (od 28)</b>	15 [8-22]	17 [3-26]
<b>Broj otečenih zglobova (od 28)</b>	7 [2-12]	6 [0-14]
<b>Aktivnost bolesti – liječnikova VAS procjena</b>	7,0 [5,5-8,8]	6,4 [4,7-9,0]
<b>Aktivnost bolesti – bolesnikova VAS procjena</b>	7,0 [5,0-8,8]	6,9 [4,9-8,2]

\* Vrijednosti su prikazane kao medijani s interkvartilnim rasponom, s izuzetkom kategorija DAS28. RA – reumatoidni artritis; PsA, psorijatični artritis; SE – brzina sedimentacije eritrocita; CRP – C-reaktivni protein, CDAI – klinički indeks aktivnosti bolesti, DAS28 – mjera aktivnosti bolest uključujući 28 zglobova (izračunat pomoću SE), VAS – procjena vizualnom mjerom (u cm), NSAID – nesteroidni protuupalni lijekovi, DMARD – antireumatski lijekovi koji modificiraju bolest, RF – reumatoidni faktor, ACPA – protutijela usmjerena na citrulinirane proteine, NP – nije primjenjivo.



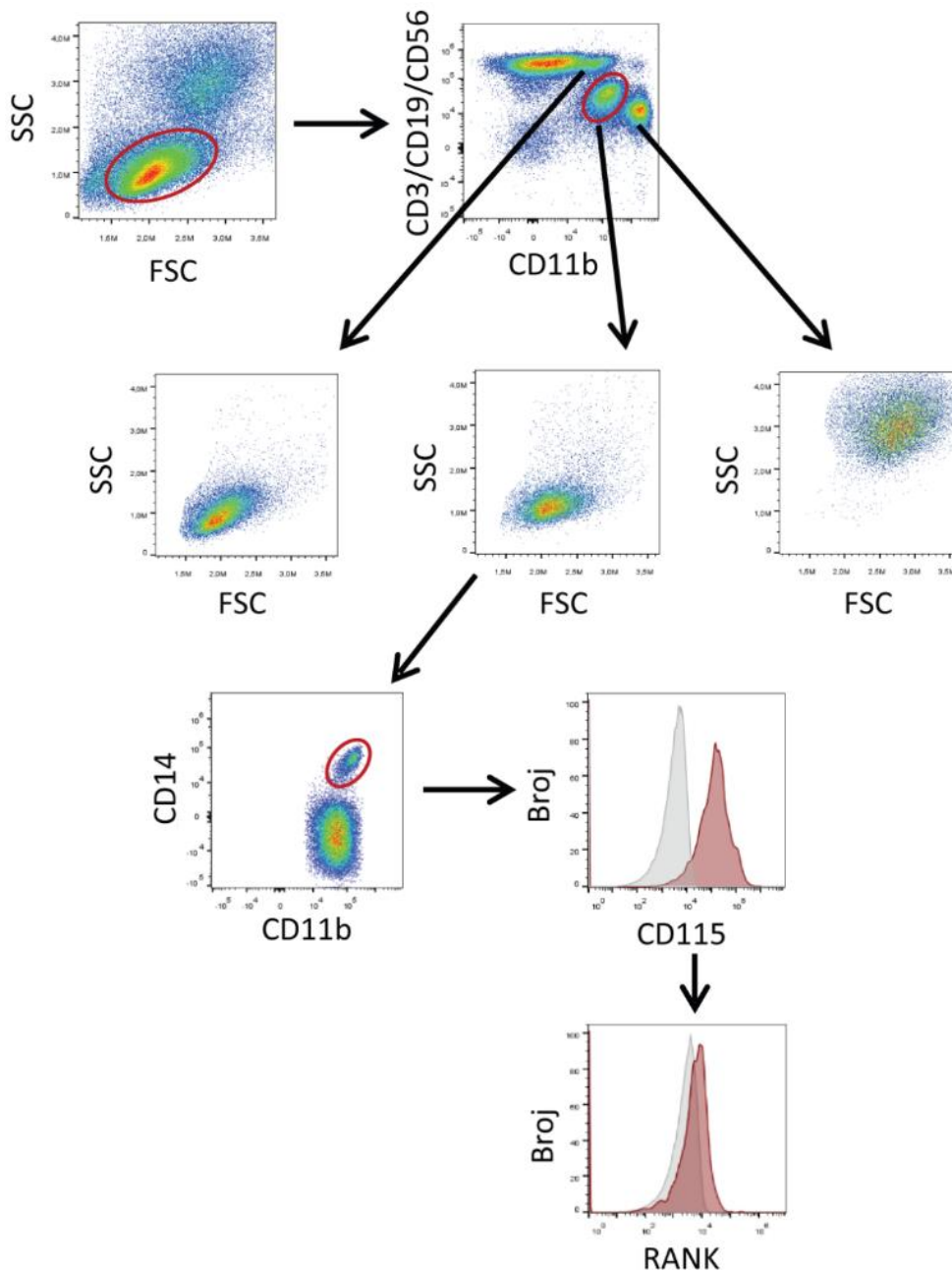
**Slika 7. Povišeni pokazatelji upale, osteoresorpcije i autoimunosti u bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa.** Plazmatske koncentracije čimbenika nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , prema engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ), C-terminalnog telopeptida kolagena tipa I (CTX, prema engl. *carboxy-terminal collagen crosslinks*), te reumatoidnog faktora (RF) u kontrolnih ispitanika (CTRL, prema engl. *control*) te bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa (RA), kategorizirani prema mjeri aktivnosti bolesti uključujući 28 zglobova (DAS28, prema engl. *Disease Activity Score including 28 joint count*) kao blagi/umjereni (DAS28 2,6-5,1) te teški (DAS28 >5,1) RA. Vrijednosti su prikazane kao medijani (središnja crta), s okvirima koji predstavljaju interkvartilni raspon (IQR, prema engl. *interquartile range*), vanjskim crtama koje predstavljaju 1,5X vrijednosti IQR te kvadratima ili krugovima koji predstavljaju vrijednosti koje odstupaju. Usporedbe između skupina učinjene su neparametrijskim Mann-Whitney testom, vrijednost  $p < 0,05$ . N/A – nije primjenjivo.



**Slika 8. Smanjena koštana resorpcija u bolesnika koji u terapiji reumatoidnog artritisa primaju antireumatske lijekove koji modificiraju bolest.** Plazmatske koncentracije C-terminalnog telopeptida kolagena tipa I (CTX, prema engl. *carboxy-terminal collagen crosslinks*) u odnosu na terapiju s antireumatskim lijekovima koji modificiraju bolest (DMARD, prema engl. *disease modifying anti-rheumatic drugs*) u bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa. Vrijednosti su prikazane kao medijani (središnja crta), s okvirima koji predstavljaju interkvartilni raspon (IQR, prema engl. *interquartile range*), vanjskim crtama koje predstavljaju 1,5X vrijednosti IQR te kvadratima ili krugovima koji predstavljaju vrijednosti koje odstupaju. Usporedbe između skupina učinjene su neparametrijskim Mann-Whitney testom, vrijednost  $p < 0,05$ .

## 5.2. Periferni osteoklastni progenitori bolesnika koji boluju od artritisa imaju specifične funkcionalne i fenotipske značajke

Na temelju prijašnjih radova naše istraživačke skupine (52, 65), PBMC kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od artritisa su analizirane protočnom citometrijom kako bi se odredio udio populacija OCP, postavljanjem okvira kao što prikazuje Slika 9. Ukratko, ukupna populacija PBMC, prikazana na točkastom grafikonu FSC nasuprot SSC, analizirana je prikazujući limfoidne markere nasuprot CD11b. Zatim je odabrana populacija negativna na limfoidne biljege ( $CD3^-CD19^-CD56^-$ ), koja izražava CD11b ( $CD11b^+$ ) umjerenim intenzitetom te je za nju potvrđeno da veličinom i granularnošću (prema parametrima FSC i SSC) odgovara monocitima (Environ Health Perspect 2010 Schneider). Ta populacija je potom dalje analizirana u odnosu na izražaj biljege CD14, te zatim CD115 i RANK. Stanice koje su izražavale CD11b velikim intenzitetom ( $CD11b^{++}$ ), ali nisu izražavale limfocitne biljege, odgovarale su granulocitima. Stanice pozitivne na limfoidne biljege, a negativne na CD11b odgovaraju limfocitima. Osim PBMC, stanice iz SF su također analizirane na sličan način kako bi se utvrdile razlike između sustavnih i lokalnih mijeloidnih populacija.



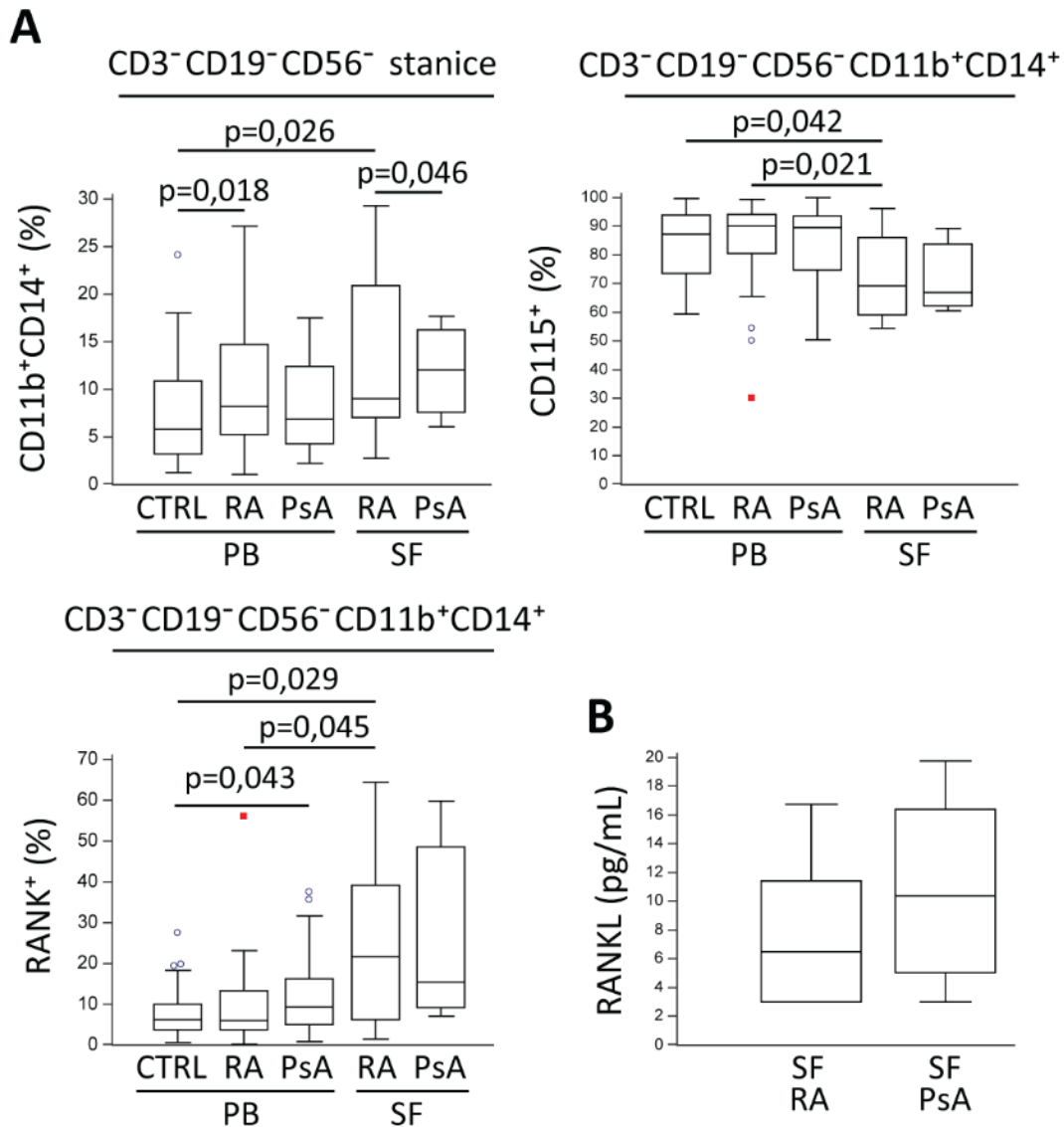
**Slika 9. Mononuklearne stanice periferne krvi su analizirane protočnom citometrijom.**

Udio osteoklastnih progenitora (OCP, prema engl. *osteoclast progenitors*) u populaciji mononuklearnih stanica periferne krvi analiziranoj protočnom citometrijom. Populacija OCP definirana je kao nelimfoidne ( $CD3^-CD19^-CD56^-$ ) stanice koje su dvostruko pozitivne za monocitne markere CD11b i CD14. Te stanice su dalje analizirane za izražaj receptora makrofagnog čimbenika poticanja kolonija (CD115) i receptor aktivatora jezgrenog čimbenika  $\kappa B$  (RANK, prema engl. receptor activator of nuclear factor- $\kappa B$ ). Pozitivni okviri za vrata su definirani koristeći nebojane stanice te kombinacijama protutijela konjugiranih fluoroforima u kojima je izostavljen analizirani fluorofor radi određivanja njegovog praga pozitivnosti (FMO, prema engl. *fluorescence minus one*).

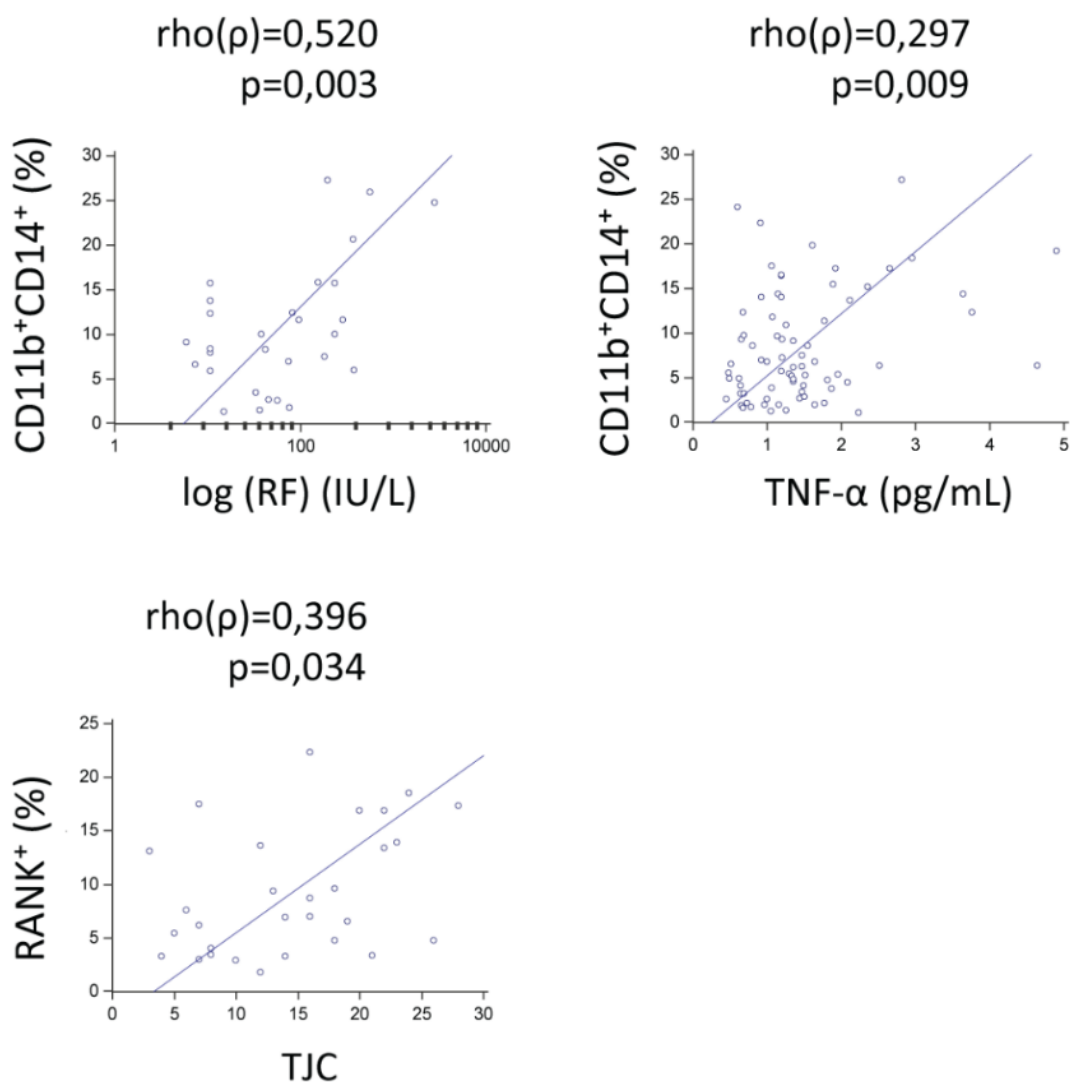
Uključivanje kohorte bolesnika koji boluju od RA sa značajnim udjelom visoke aktivnosti bolesti, odnosno kontinuiranom upalom i razaranjem zglobova, u ovom istraživanju omogućuje lakše i jasnije uočavanje subpopulacija OCP koje su specifično potaknute artritismom i čiji je udio različit u odnosu na kontrolne ispitanike. U analizi udjela tih subpopulacija, prvo su određene razlike između periferne krvi kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od RA. Udio dvostruko pozitivne (CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>; DP) subpopulacije monocita periferne krvi bila je značajno veći u bolesnika koji boluju od RA u odnosu na kontrole (Slika 10). U RA, udio tih stanica je pozitivno korelirao s plazmatskim koncentracijama TNF- $\alpha$  i RF, no ne i s razinom CTX (Slika 11).

Potom su analizirane razlike između cirkulacijskog i sinovijalnog odjeljka bolesnika koji boluju od RA, te je utvrđeno da nema značajne razlike u udjelima populacije DP-monocita između odjeljaka (Slika 10). Nije moguće dobiti kontrolne uzorke SF zdravih ispitanika zbog ograničene količine tekućine, malog broja stanica te etičke neprihvatljivosti, pa je udio DP-stanica u SF bolesnika uspoređen s uzorcima periferne krvi kontrolnih ispitanika. Udio DP-stanica u SF bio je značajno veći u odnosu na udio DP-stanica periferne krvi u kontrola, sugerirajući ekspanziju te populacije u artritismu.

Dalje je analiziran izražaj receptora za ključne osteoklastogene faktore na populaciji OCP-a – biljega CD115 i RANK. Međutim, izražaj tih biljega bio je podjednak na DP-stanicama periferne krvi kontrolnih ispitanika i bolesnika. Nadalje, izražaj biljega CD115 bio je niži u DP-stanicama SF u odnosu na perifernu krv bolesnika s artritismom, što bi se moglo objasniti odbacivanjem membranskih receptora uslijed djelovanja proupalnih medijatora. U literaturi je opisana takva negativna povratna sprega koja se temelji na odcjepljivanju receptora za proupalne medijatore s ciljem obuzdavanja prekomjerne reakcije u upaljenim tkivima (116). Udio RANK<sup>+</sup> DP-monocita, koji predstavljaju progenitore usmjerene u osteoklaste (35, 52), bio je povišen u SF naspram periferne krvi te je pozitivno korelirao s TJC (Slika 11).



**Slika 10. Povećani udio osteoklastnih progenitora u perifernoj krvi i sinovijalnoj tekućini bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa i psorijatičnog artritisa.** (A) Udio osteoklastnih progenitora i subpopulacija koje izražavaju receptor za čimbenik stimulacije kolonija makrofaga (CD115) i receptor aktivatora jezgrenog čimbenika  $\kappa$ B (RANK) u perifernoj krvi kontrola (CTRL, prema engl. *control*) i bolesnika koji boluju od artritisa (RA, reumatoidni artritis; PsA, psorijatični artritis), te uzorcima sinovijalne tekućine (SF, prema engl. *synovial fluid*; SF RA, SF PsA), analizirano protočnom citometrijom. (B) Koncentracija liganda RANK-a (RANKL) u SF artritinih bolesnika, mjereno imunoenzimskom metodom. Vrijednosti su prikazane kao medijani (središnja crta), s okvirima koji predstavljaju interkvartilni raspon (IQR, prema engl. *interquartile range*), vanjskim crtama koje predstavljaju 1,5X vrijednosti IQR te kvadratima ili krugovima koji predstavljaju vrijednosti koje odstupaju. Usporedbe između skupina učinjene su neparametrijskim Mann-Whitney testom, prikazane su vrijednosti  $p < 0,05$ .



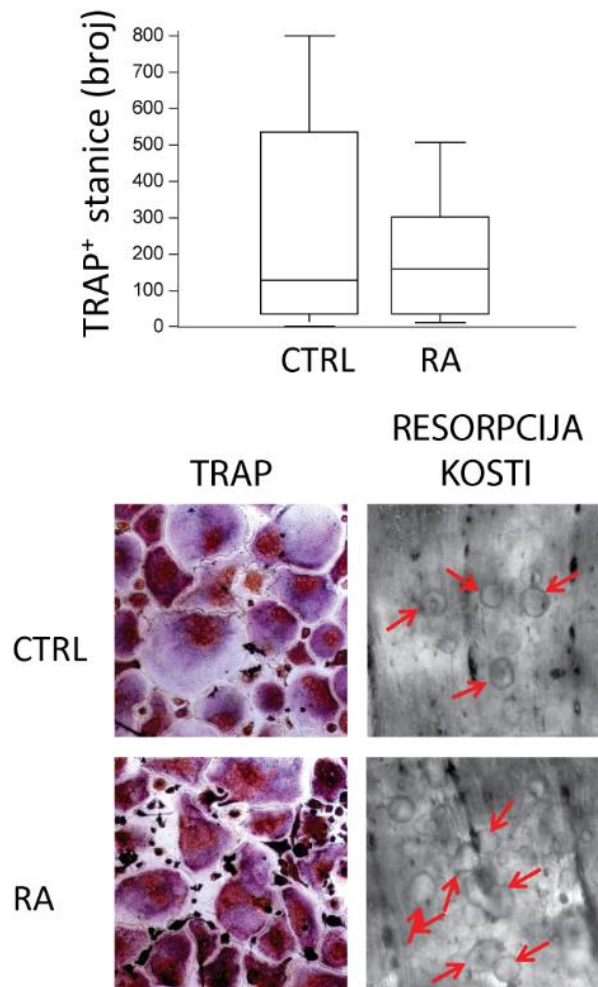
**Slika 11. Populacija osteoklastnih progenitora u reumatoidnom artritisu korelira s pokazateljima aktivnosti bolesti.** Povezanost udjela perifernih osteoklastnih progenitora (OCP, prema engl. *osteoclast progenitor*) s plazmatskim koncentracijama reumatoidnog faktora (RF) i čimbenika nekroze tumora (TNF- $\alpha$ , prema engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ); povezanost izražaja receptora za aktivator jezgrenog čimbenika  $\kappa$ B (RANK, prema engl. receptor activator of nuclear  $\kappa$ B) na OCP s brojem bolnih zglobova (TJC, prema engl. *tender joint count*). Korelacije su napravljene korelacijom ranga i Spearmanovim koeficijentom rho ( $\rho$ ).

U analizu je uključena i skupinu bolesnika koji boluju od PsA. U istraživanje su uvršteni bolesnici koji boluju od PsA sa zahvaćenim perifernim zglobovima. Takav oblik PsA nalikuje RA po osteodestruktivnom kroničnom upalnom poliartritisu, no gotovo uvijek je seronegativan s još nekim specifičnim patogenim i kliničkim značajkama.

Uključivanje te skupine bolesnika koji boluju od PsA imalo je za cilj utvrditi jesu li do sada uočene promjene specifične za RA, ili su pristune i u drugim oblicima artritisa. Osim toga, uključivanjem bolesnika koji boluju od PsA dobivena je još jedna skupina uzoraka SF za usporedbu, s obzirom da su kontrolni SF nedostupni. Udjeli osteoklastogenih subpopulacija su bili slični u PsA kao u RA. Iako povećanje udjela DP-monocita periferne krvi nije dostiglo statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne uzorke, udio tih stanica koje izražavaju RANK je bio značajno povišen u odnosu na kontrole (Slika 10A). U jednom od prethodnih radova naše grupe, već je uočeno da je poremećaj osovine RANKL/RANK specifično povezan s patogeneom PsA u odnosu na RA (65). No, razina RANKL-a u SF bolesnika koji boluju od PsA nije bila značajno povišena naspram RA ( $p=0,355$ ), moguće zbog malog broja uzoraka (Slika 10B).

Sljedeća skupina pokusa imala je za cilj potvrdu osteoklastogenog potencijala subpopulacije OCP, za koju je utvrđeno da je ekspanzirana u artritisu. Populacija DP-monocita periferne krvi imala je osteoklastogeni potencijal, s obzirom da su iz sortiranih stanica nakon stimulacije ključnim diferencijacijskim čimbenicima M-CSF-om i RANKL-om dobiveni potpuno funkcionalni osteoklasti koji su resorbirali kost (Slika 12). Test stvaranja resorptivnih jamica na pločicama goveđe kortikalne kosti smatra se defitivnom potvrdom razvoja zrelih osteoklasta (35), te u dostupnoj literaturi nije jasno pokazan za sortirane populacije DP-stanica. Ipak, populacija DP-stanica je stvorila podjednak broj diferenciranih TRAP<sup>+</sup> osteoklasta u uzorcima kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od RA, pri sađenju razvrstanih stanica u istoj gustoći. U skladu s tim je i nalaz podjednagog udjela DP-stanica periferne krvi koje su izražavale odgovarajuće receptore – CD115 (receptor za M-CSF) i RANK (receptor za RANKL) – između uzoraka kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od RA, sugerirajući na podjednak odgovor pri stimulaciji odgovarajućim ligandima (Slika 10).

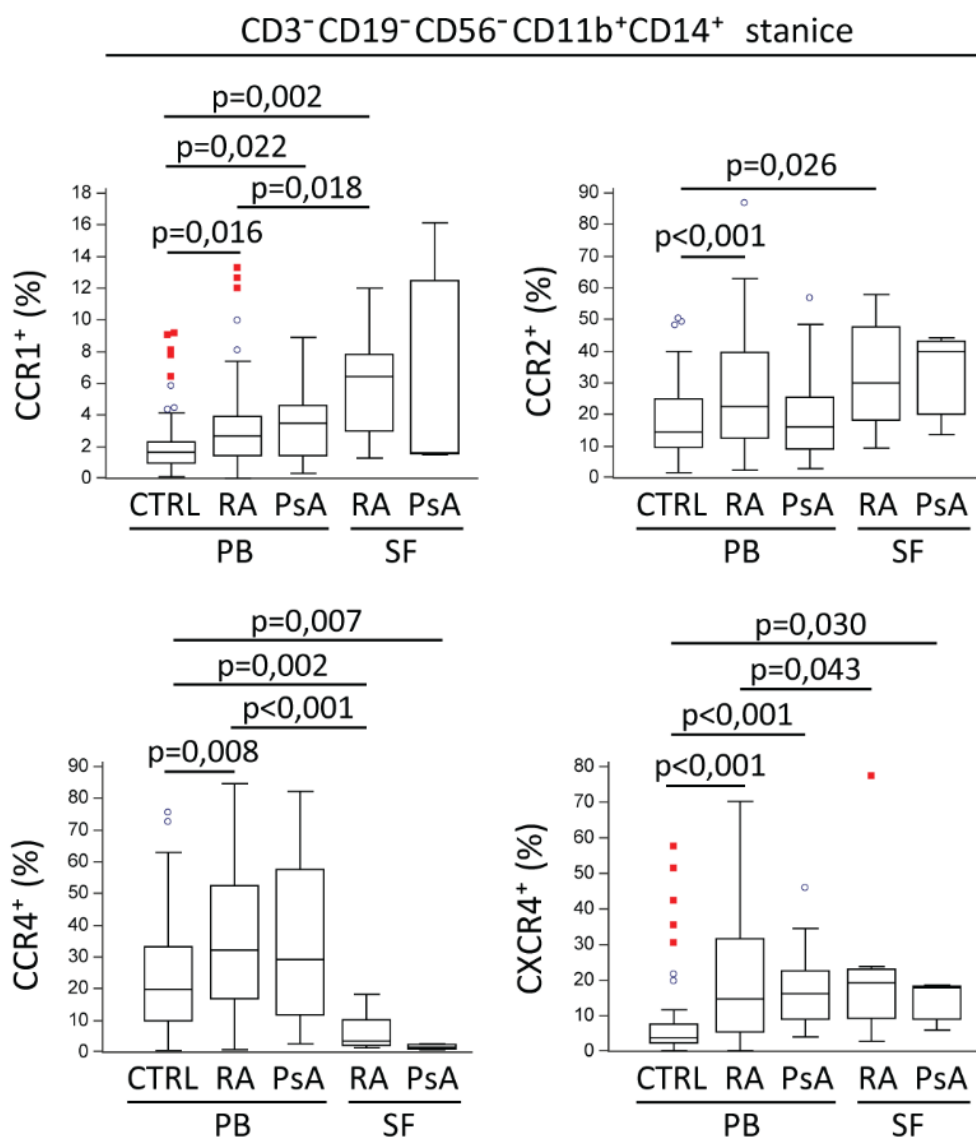




**Slika 12. Kvantifikacija, morfologija i osteoresorptivna aktivnost osteoklasta diferenciranih iz razvrstanih osteoklastnih progenitora periferne krvi u kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa.** Osteoklastogeni potencijal perifernih osteoklastnih progenitora periferne krvi u kontrolnih ispitanika (CTRL, prema engl. *control*) i bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa (RA) je ispitan *in vitro* poticanjem razvrstanih CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> stanica čimbenikom stimulacije kolonija makrofaga (60 ng/mL) te liganda receptora aktivatora jezgrenog čimbenika κB (100 ng/mL). Multinuklearne stanice pozitivne na kiselu fosfatazu otpornu na tartarat (TRAP, prema engl. *tartrate-resistant acid phosphatase*) su brojane kao osteoklasti. Osteoresorpcijska aktivnost je potvrđena testom resorpcije kosti pri istim uvjetima kulture. Zreli osteoklasti obojeni na TRAP i komadići goveđe kosti su fotografirani svjetlosnim mikroskopom na 200X povećanju. Crvene strelice ukazuju na resorpcijske lakune koje su u kosti stvorili osteoklasti. Vrijednosti su prikazane kao medijani (središnja crta), s okvirima koji predstavljaju interkvartilni raspon (IQR, prema engl. *interquartile range*), vanjskim crtama koje predstavljaju 1,5X vrijednosti IQR te kvadratima ili krugovima koji predstavljaju vrijednosti koje odstupaju. Usporedbe između skupina učinjene su neparametrijskim Mann-Whitney testom, prikazane su vrijednosti  $p < 0,05$ .

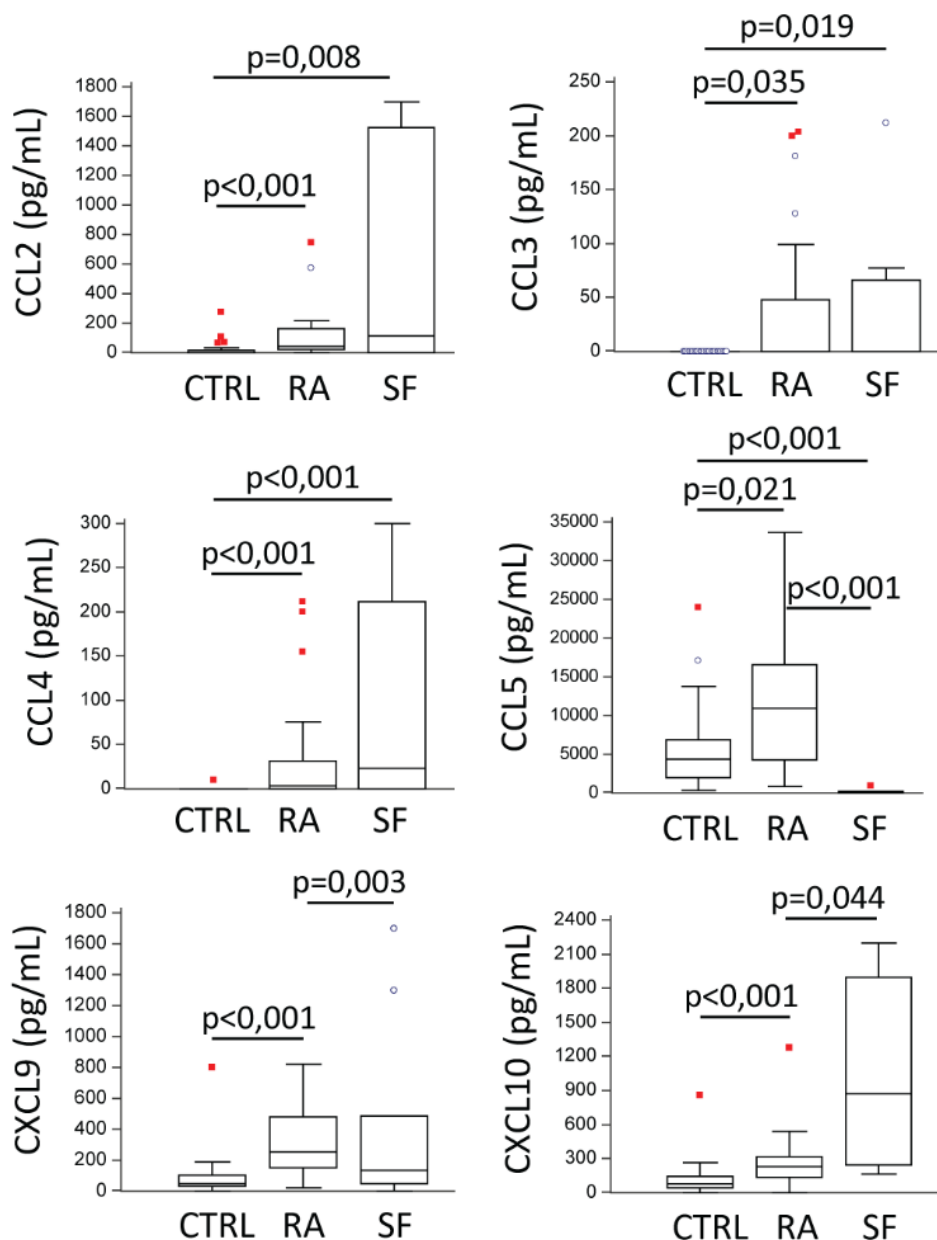
### **5.3. Periferni osteoklastni progenitori izražavaju kemokinske receptore te su izloženi povišenim plazmatskim koncentracijama kemokina**

Nakon funkcionalne potvrde osteoklastogenog potencijala stanica  $CD3^-CD19^-CD56^-CD11b^+CD14^+$ , ali bez povećanja u broju diferenciranih TRAP<sup>+</sup> osteoklasta u uzorcima RA nakon uzgajanja uz čimbenike M-CSF i RANKL, analiziran je izražaj kemokinskih receptora na tim stanicama. Pretpostavka je bila da bi pojačana osteoresorptivna aktivnost stanica OCP u artritisu mogla biti uzrokovana komplementarnim osteoklastogenim podražajima, prije svega kemokinskim signalima, koji nadopunjuju osteoklastogeno djelovanje faktora M-CSF i RANKL (52). Poznato je da monociti, koji uključuju i populaciju OCP, izražavaju različite kemokinske receptore, preko kojih se, nakon vezanja liganda, induciraju brojni stanični odgovori, uključujući migracija, proliferacija, diferencijacija i aktivacija (117). Detaljnom analizom populacije DP-monocita utvrđeni su povećani udjele subpopulacija koje izražavaju kemokinske receptore (CCR1, CCR2, CCR4, CXCR4) u uzorcima periferne krvi bolesnika koji boluju od RA kao i od PsA (CCR1, CXCR4) (Slika 13). Uz to, izražaj CCR1 i CXCR4 je bio značajno povišen u stanicama SF u odnosu na PBMC u bolesnika koji boluju od RA. Jedino je izražaj CCR4, koji ima jedinstvene ligande (CCL17 i CCL22) u odnosu na CCR1 i CCR2 (118), bio značajno snižen u SF naspram periferne krvi bolesnika koji boluju od RA.

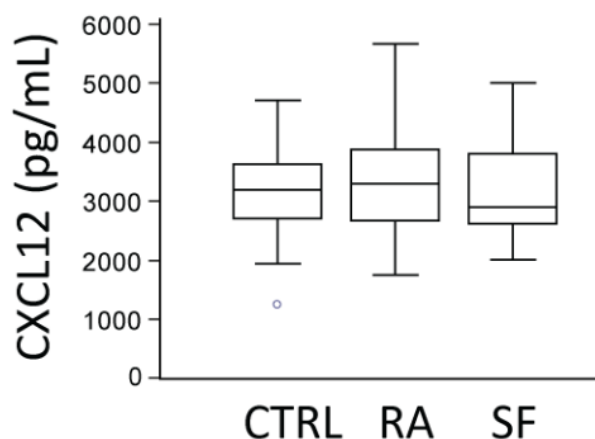


**Slika 13. Povećani izražaj kemokinskih receptora u plazmi i sinovijalnoj tekućini bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa i psorijatičnog artritisa.** Izražaj kemokinski receptora na osteoklastnim progenitorima (OCP, prema engl. *osteoclast progenitor*) u perifernoj krvi kontrola (CTRL, prema engl. *control*) i bolesnika koji boluju od artritisa (RA, reumatoidni artritis; PsA, psorijatični artritis), te uzorcima sinovijalne tekućine (SF, prema engl. *synovial fluid*; SF RA, SF PsA). Analiza je izvršena protočnom citometrijom, a pozitivni pragovi za vrata su definirani koristeći nebojane stanice te kombinacijama protutijela konjugiranih fluoroforima u kojima je izostavljen pojedini fluorofor. Vrijednosti su prikazane kao medijani (središnja crta), s okvirima koji predstavljaju interkvartilni raspon (IQR, prema engl. *interquartile range*), vanjskim crtama koje predstavljaju 1,5X vrijednosti IQR te kvadratima ili krugovima koji predstavljaju vrijednosti koje odstupaju. Usporedbe između skupina učinjene su neparametrijskim Mann-Whitney testom, prikazane su vrijednosti  $p < 0,05$ . CCR, receptor za C-C kemokin; CXCR, receptor za C-X-C kemokin.

Povećani izražaj kemokinskih receptora na stanicama OCP upućuje na zaključak da su ti progenitori pojačano osjetljivi na kemokinske signale odgovarajućih liganda. Stoga je u sljedećem nizu pokusa određen profil kemokina u plazmi i SF bolesnika koji boluju od RA koristeći set kemikalija u kojem su protutijela na kemokinske ligande konjugirana na metalne kuglice određenih veličina, što omogućava njihovo detektiranje protočnim citometrom (Slika 6). Koristeći komercijalni panel za ljudske kemokine (CBA Human Chemokine Kit), izmjerene su povišene razine liganda CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 i CXCL10 u uzorcima bolesnika koji boluju od RA u odnosu na uzorke kontrolnih ispitanika (Slika 14). Uz to je CXCL10 bio značajno povišen u SF naspram plazme bolesnika koji boluju od RA, sugerirajući kemotaksijski gradijent za migraciju stanica iz cirkulacije u sinovijalni odjeljak. Porast razine CCL2 i CCL4 u SF bolesnika koji boluju od RA bio je značajan u usporedbi s kontrolnom plazmom koja se može smatrati bazalnom razinom. Međutim, razlika nije bila značajna u odnosu na plazmu iz RA, vjerojatno zbog malog broja uzoraka SF i velike varijabilnosti (s dijelom mjerenja ispod razine detekcije CBA). S obzirom da nije bio dostupan u okviru prethodno opisanog seta kemikalija, CXCL12 je dodatno izmjeren postupkom ELISA, ali nisu utvrđene razlike između skupina analiziranih uzoraka (Slika 15).

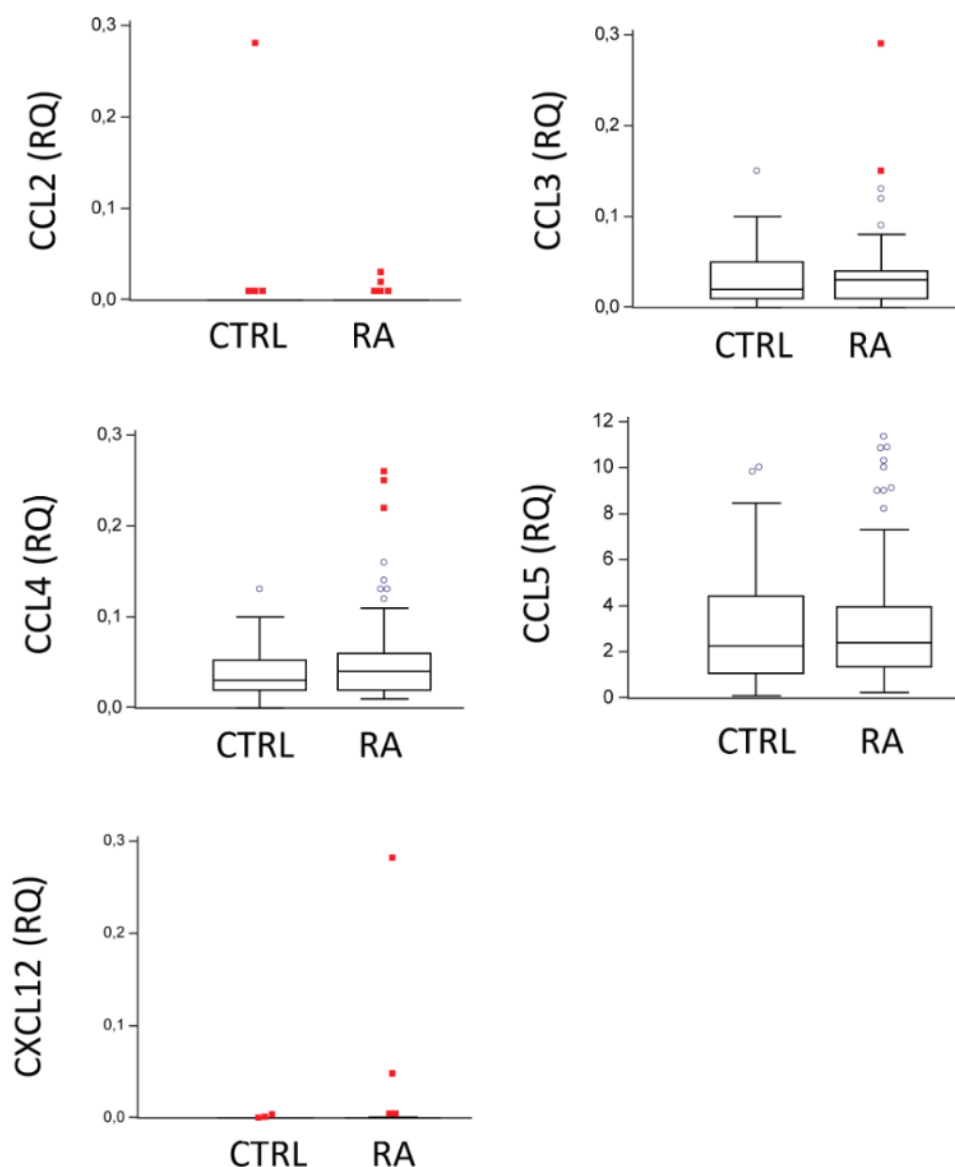


**Slika 14. Povećana koncentracija kemokina u plazmi i sinovijalnoj tekućini bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa.** Koncentracije kemokina u perifernoj krvi kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa (RA), te sinovijalne tekućine (SF, prema engl. *synovial fluid*) bolesnika koji boluju od RA, mjereno metodom za mjerenje koncentracije proteina protočnom citometrijom, koristeći komercijalni panel za ljudske kemokine. Vrijednosti su prikazane kao medijani (središnja crta), s okvirima koji predstavljaju interkvartilni raspon (IQR, prema engl. *interquartile range*), vanjskim crtama koje predstavljaju 1,5X vrijednosti IQR te kvadratima ili krugovima koji predstavljaju vrijednosti koje odstupaju. Usporedbe između skupina učinjene su neparametrijskim Mann-Whitney testom, prikazane su vrijednosti  $p < 0,05$ . CCL, kemokinski ligand s C-C motivom; CXCL, kemokinski ligand s C-X-C motivom.



**Slika 15. Nepromijenjena koncentracija CXCL12 u plazmi i sinovijalnoj tekućini bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa.** Koncentracije CXCL12 u perifernoj krvi kontrolnih ispitanika (CTRL, prema engl. *control*) te krvi i sinovijalne tekućine (SF, prema engl. *synovial fluid*) bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa (RA), mjereno imunoenzimatskom metodom. Vrijednosti su prikazane kao medijani (središnja crta), s okvirima koji predstavljaju interkvartilni raspon (IQR, prema engl. *interquartile range*), vanjskim crtama koje predstavljaju 1,5X vrijednosti IQR te kvadratima ili krugovima koji predstavljaju vrijednosti koje odstupaju. Usporedbe između skupina učinjene su neparametrijskim Mann-Whitney testom, prikazane su vrijednosti  $p < 0,05$ . CXCL, kemokinski ligand s C-X-C motivom.

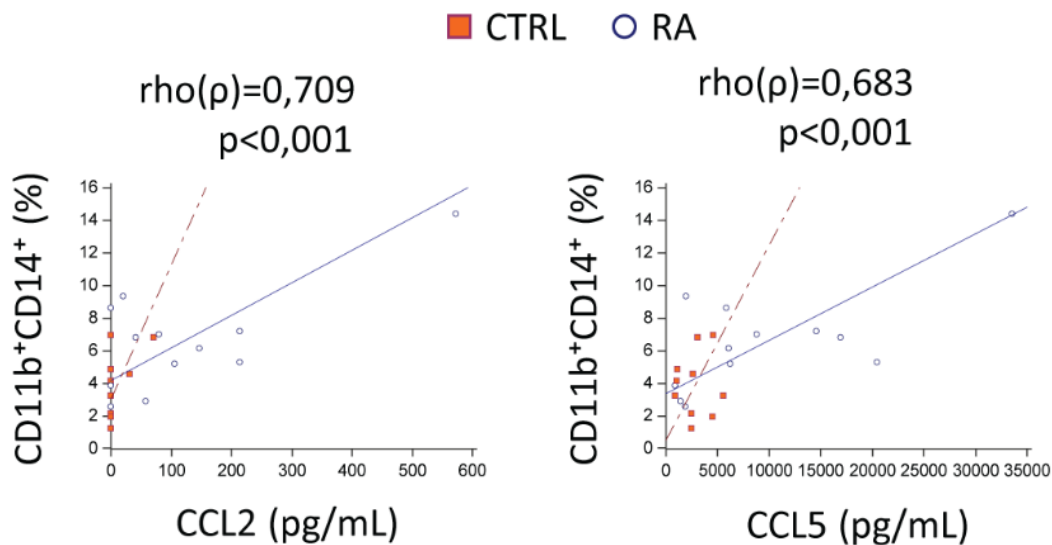
Nakon mjerenja kemokina u plazmi, postavlja se pitanje luče li kemokine same stanice u cirkulaciji ili su njihov izvor neka druga tkiva, primjerice sinovijalni odjeljak. Zbog toga je analiziran izražaj gena postupkom qPCR za pojedine kemokine u populaciji PBMC kontrolnih uzoraka i bolesnika. Te stanice su neizravno isključene kao izvor kemokina analizom njihovog genskoj izražaja (Slika 16). S iznimkom CCL5, koji je bio vrlo izražen i na proteinskoj i na genskoj razini, genski izražaj za druge kemokine bio je vrlo slab, što je vidljivo prema njihovoj relativnoj količini (koja odgovara broju ciklusa amplifikacije u kojem vrijednost fluorescencije prelazi prag). Također nije utvrđena razlika u izražaju analiziranih kemokina između skupina, sugerirajući da te kemokine ne proizvode PBMC, već druge stanice te da se oni potom izljevaju u cirkulaciju i imaju kemotaksijski učinak.



**Slika 16. Razina genskog izražaja kemokina u mononuklearnim stanicama periferne krvi bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa.** Analiza ekspresije kemokinskih gena u mononuklearnim stanicama periferne krvi kontrolnih ispitanika (CTRL, prema engl. *control*) i bolesnika koji boluju od RA. Analiza je napravljena kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze te je prikazana kao relativna količina RNA (RQ, prema engl. *relative quantity*). Vrijednosti su prikazane kao medijani (središnja crta), s okvirima koji predstavljaju interkvartilni raspon (IQR, prema engl. *interquartile range*), vanjskim crtama koje predstavljaju 1,5X vrijednosti IQR te kvadratima ili krugovima koji predstavljaju vrijednosti koje odstupaju. Usporedbe između skupina učinjene su neparametrijskim Mann-Whitney testom, prikazane su vrijednosti  $p < 0,05$ . CCL, kemokinski ligand s C-C motivom; CXCL, kemokinski ligand s C-X-C motivom.

#### 5.4. Razine kemokinskih receptora i liganda su povezane s kliničkim parametrima i ukazuju na njihovu biološku važnost u patogenezi i razvoju bolesti

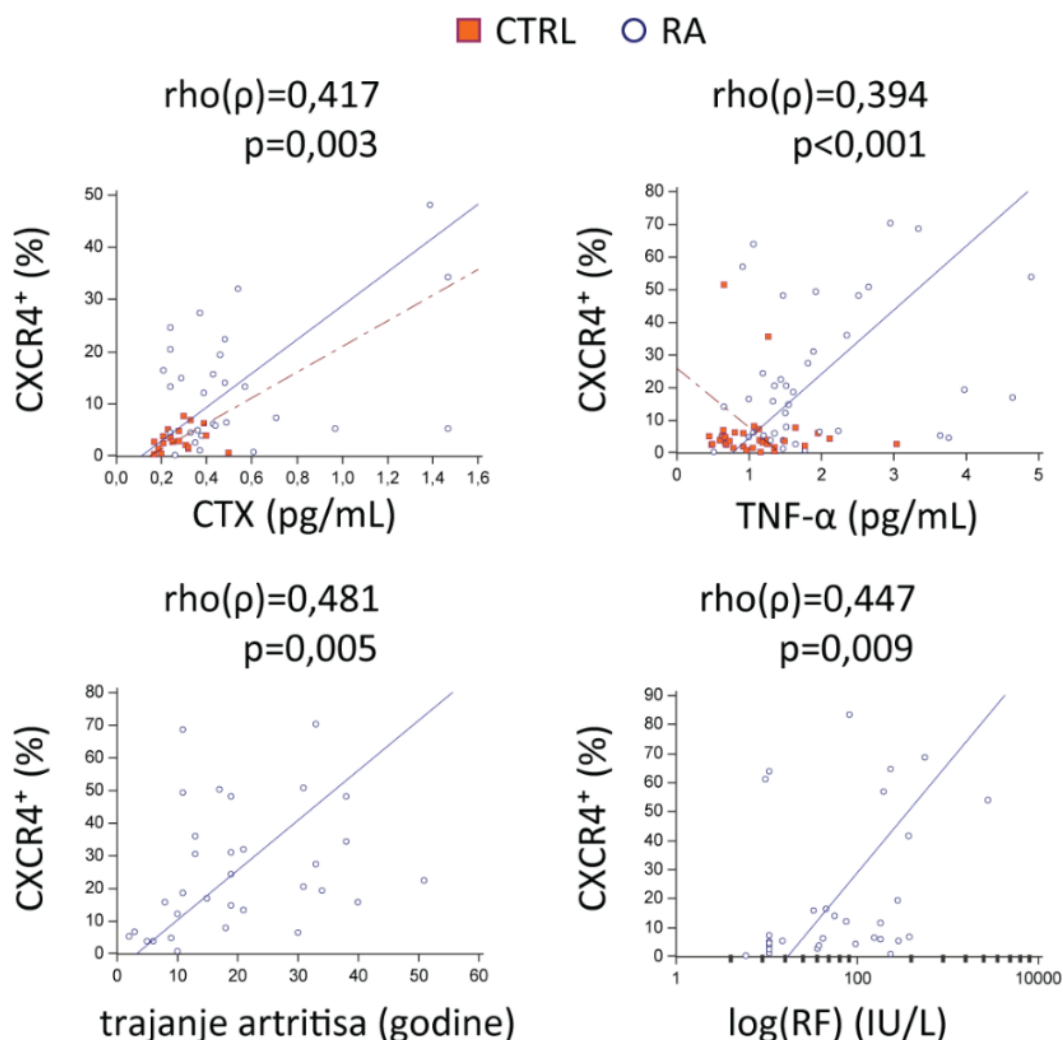
Do sada izneseni podaci su potvrdili povišene razine kemokina u bolesnika koji boluju od RA, što posljedično uzorkuje pojačanu migraciju stanica OCP koje izražavaju odgovarajuće receptore. Stoga je u nastavku analize proučena povezanost udjela populacija OCP i njihovog izražaja kemokinskih receptora s koncentracijama proupalnih medijatora i kliničkim parametrima bolesti. Udio DP-monocita periferne krvi je pozitivno korelirao s plazmatskim razinama CCL2 i CCL5 (Slika 17), a oba liganda su pozitivno korelirala s koncentracijom TNF- $\alpha$  ( $\rho=0,549$ ,  $p<0,001$  za CCL2,  $\rho=0,554$ ,  $p<0,001$  za CCL5). Uz to, izražaj receptora CCR1 i CCR4 na DP-stanicama je značajno korelirao s plazmatskim razinama odgovarajućih kemokinskih liganda ( $\rho=0,477$ ,  $p=0,006$  za CCR1 s CCL3;  $\rho=0,655$ ,  $p<0,001$  za CCR4 s CCL2;  $\rho=0,420$ ,  $p=0,010$  za CCR4 s CCL3). Osim ovih nalaza u RA, udio DP-monocita periferne krvi je pozitivno korelirao s brzinom SE u PsA ( $\rho=0,822$ ,  $p<0,001$ ).



**Slika 17. Povezanost udjela perifernih osteoklastnih progenitora s koncentracijama kemokinskih liganda.** Povezanost udjela osteoklastnih progenitora (OCP, prema engl. *osteoclast progenitor*) s plazmatskim koncentracijama kemokinskih liganda u kontrolnih ispitanika (CTRL, prema engl. *control*) i bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa (RA). Povezanost je ispitana koristeći korelaciju ranga te su prikazani Spearmanov koeficijent coefficient rho ( $\rho$ ) i p vrijednosti za sve podatke, uključujući i CTRL i RA, dok su linije trenda prikazane odvojeno – iscrtana crta za CTRL i puna crta za RA. CCL, kemokinski ligand s C-C motivom.

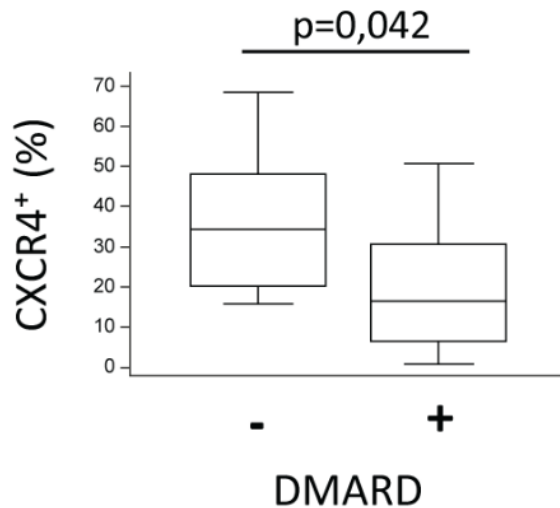


Od analiziranih kemokinskih receptora, izražaj CXCR4 na DP-stanicama je pokazao najznačajniju povezanost s upalnim parametrima i aktivnošću bolesti, uključujući koncentraciju TNF- $\alpha$  i RF, trajanje artritisa te osteoresorpciju (Slika 18).



**Slika 18. Povezanost koncentracije izražaja kemokinskih receptora na osteoklastnim progenitorima s parametrima aktivnosti bolesti.** Korelacija izražaja CXCR4 na OCP s trajanjem artritisa i plazmatskim koncentracijama čimbenika nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , prema engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) i reumatoidnog faktora (RF) u bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa (RA) te C-terminalnog telopeptida kolagena tipa I (CTX, prema engl. *carboxy-terminal collagen crosslinks*) u bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa (RA) i kontrolnih ispitanika (CTRL, prema engl. *control*). Povezanost je ispitana koristeći korelaciju ranga te su prikazani Spearmanov koeficijent coefficient rho ( $\rho$ ) i p vrijednosti za sve podatke, uključujući i CTRL i RA, dok su linije trenda prikazane odvojeno – iscrtana crta za CTRL i puna crta za RA. CXCR, receptor za C-X-C kemokin.

Osim toga, izražaj CXCR4 na DP-stanicama je bio značajno manji u bolesnika liječenih DMARD-ovima (Slika 19), za koje je prethodno pokazano da imaju također manju koštanu resorpciju (Slika 8). S obzirom na povezanost s kliničkim parametrima, udio te osteoklastogene subpopulacije PBMC koja izražava CXCR4 mogao bi poslužiti kao mogući indikator aktivnosti bolesti i odgovora na terapiju.



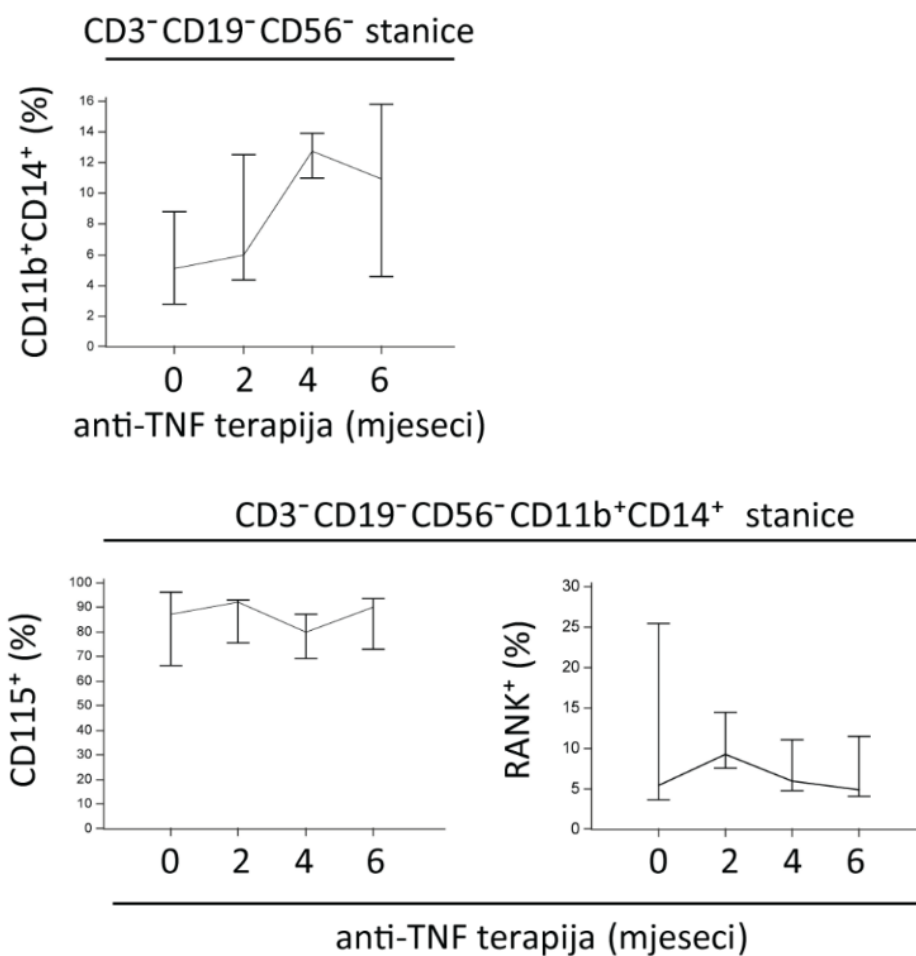
**Slika 19. Izražaj CXCR4 na osteoklastnim progenitorima u bolesnika sa ili bez terapije antireumatskim lijekovima koji modificiraju bolest.** Vrijednosti su prikazane kao medijani (središnja crta), s okvirima koji predstavljaju interkvartilni raspon (IQR, prema engl. *interquartile range*), vanjskim crtama koje predstavljaju 1,5X vrijednosti IQR te kvadratima ili krugovima koji predstavljaju vrijednosti koje odstupaju. Usporedbe između skupina učinjene su neparametrijskim Mann-Whitney testom, a prikazane su vrijednosti  $p < 0,05$ . DMARD, antireumatski lijekovi koji modificiraju bolest (prema engl. *disease modifying antirheumatic drugs*); CXCR, receptor za C-X-C kemokin.

Naposljetku, višestrukom logističkom regresijom je analiziran doprinos pojedinih varijabli u udjelu DP-stanica periferne krvi, kojom je utvrđeno da se 79% varijabilnosti udjela DP-populacije (prilagođeni  $R^2=0,790$ ) moglo predvidjeti iz vrijednosti dobivenih za CCL5, CXCL10 i CXCR4. Te varijable su statistički značajno predviđale udio DP-monocita ( $p < 0,001$ ), s učinkom na predviđanje po sljedećem poretku važnosti: CCL5 ( $\beta=0,527$ ,  $p < 0,0001$ ), CXCL10 ( $\beta=0,522$ ,  $p < 0,0001$ ) i CXCR4 ( $\beta=0,284$ ,  $p=0,015$ ).

## **5.5. Izražaj kemokinskih receptora je značajno promijenjen anti-TNF terapijom, sugerirajući ulogu kemokina u odgovoru na anti-TNF**

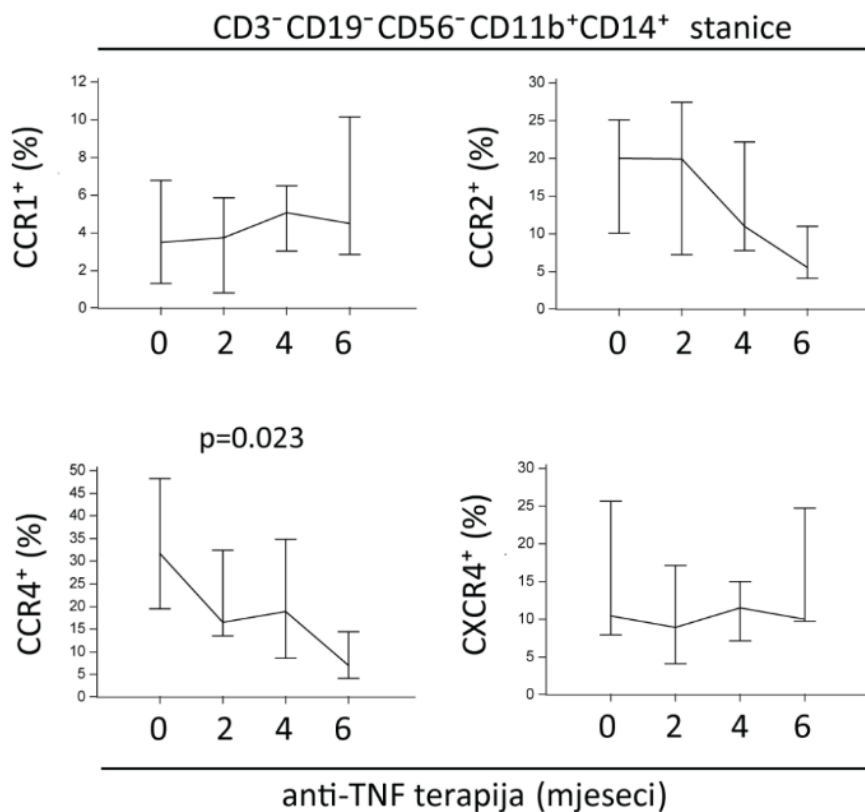
Ciljano terapijsko djelovanje na pojedine proupalne medijatore u smislu blokiranja njihovog djelovanja kako bi se suzbila upala, kao i posljedični lokalni i sustavni gubitak kosti, sve je prisutnije u terapiji upalnih artritisa. Preliminarni podaci u jednom od radova naše istraživačke grupe pokazali su pozitivnu korelaciju između udjela DP-monocita periferne krvi i DAS28 u PsA (n=4), kao i smanjenje obje varijable tijekom anti-TNF tretmana u dva od četiri bolesnika (52).

O ovom istraživanju, mala kohorta bolesnika (RA, n=4; PsA, n=5) je praćena 6 mjeseci nakon započinjanja s anti-TNF terapijom. Populacija PBMC je analizirana prema izražaju osteoklastnih biljega i kemokinskih receptora kao što je prethodno opisano (Slika 9). Ukupni udio DP-populacije u perifernoj krvi se nije smanjio tijekom biološke terapije, kao niti izražaj receptora za ključne diferencijacijske faktore osteoklasta – CD115 i RANK (Slika 20). Pojedinačne vrijednosti udjela različitih subpopulacija su bile izrazito varijabilne već u početnoj točki, što je moguće rezultat činjenice da su uvršteni bolesnici u kroničnoj fazi bolesti, koja je već trajala duže od 10 godina, te su prethodno liječeni različitim kombinacijama i dozama DMARD, NSAID i glukokortikoida.



**Slika 20. Udio osteoklastnih progenitora i njihov izražaj receptora za čimbenike diferencijacije u perifernoj krvi bolesnika koji boluju od artritisa tijekom anti-TNF terapije.** Udio osteoklastnih progenitora (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>) i njihov izražaj receptora za čimbenik stimulacije kolonija makrofaga (CD115) te receptora aktivatora jezgrenog čimbenika κB (RANK) u perifernoj krvi bolesnika koji boluju od reumatoidnog (RA) i psorijatičnog artritisa (PsA) neposredno prije (0), te 2, 4 i 6 mjeseci nakon početka anti-TNF terapije (etanercept 50 mg tjedno ili adalimumab 40 mg svaka 2 tjedna). Vrijednosti su prikazane kao medijani s interkvartilnim rasponom za svaku vremensku točku. Analiza trenda je provedena koristeći jednosmjernu analizu varijance (ANOVA, prema engl. *analysis of variance*) s polinomijalnom vrstom kontrasta te testiranjem za linearni trend, a prikazane su vrijednosti p < 0,05. TNF – čimbenik nekroze tumora (prema engl. *tumor necrosis factor*); CCR, receptor za C-C kemokin; CXCR, receptor za C-X-C kemokin.

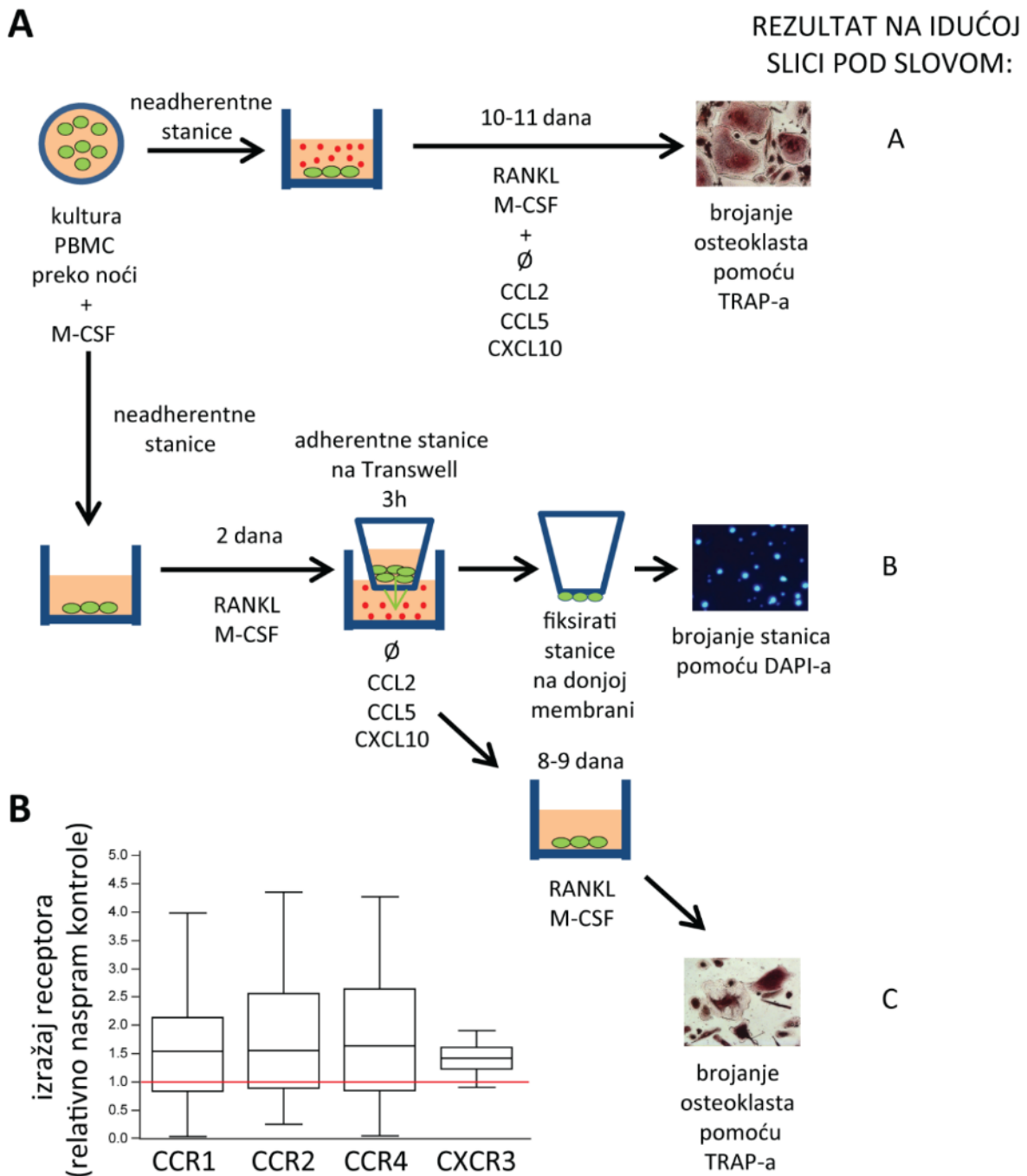
Za razliku od drugih analiziranih kemokinskih receptora, izražaj CCR4 na DP-monocitima je pokazao izraženu promjenu u odgovoru na anti-TNF terapiju, sa značajnim negativnim trendom tijekom anti-TNF terapije u bolesnika koji boluju od RA i PsA, sugerirajući mogućnost uporabe njegovog izražaja kao indikatora odgovora na terapiju (Slika 21). S obzirom da su prethodno prikazane povišene razine glavnih CCR4-liganda (CCL2, CCL3, CCL5) te značajna pozitivna korelacija izražaja CCR4 s CCL2 i CCL3 u RA, smanjenje izražaja CCR4 primjenom anti-TNF terapije moglo bi biti važno za smanjivanje osjetljivosti populacije OCP na kemokinski gradijent.



**Slika 21. Promjene izražaja kemokinskih receptora u perifernoj krvi bolesnika koji boluju od artritisa tijekom anti-TNF terapije.** Izražaj kemokinskih receptora na osteoklastnim progenitorima (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>) u perifernoj krvi bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa (RA) i psorijatičnog artritisa (PsA) neposredno prije (0), te 2, 4 i 6 mjeseci nakon početka anti-TNF terapije (etanercept 50 mg tjedno ili adalimumab 40 mg svaka 2 tjedna). Vrijednosti su prikazane kao medijani s interkvartilnim rasponom za svaku vremensku točku. Analiza trenda je provedena koristeći jednosmjernu analizu varijance (ANOVA, prema engl. *analysis of variance*) s polinomijalnom vrstom kontrasta te testiranjem za linearni trend, a prikazane su vrijednosti p < 0,05. TNF – čimbenik nekroze tumora (prema engl. *tumor necrosis factor*); CCR, receptor za C-C kemokin; CXCR, receptor za C-X-C kemokin.

## 5.6. Funkcionalna *in vitro* potvrda osteoklastogenog i kemotaksijskog učinka kemokina na periferne osteoklastne progenitore

Iz prethodnih rezultata moguće je pretpostaviti da kemokini djeluju izravno na populaciju OCP, koja izražava kemokinske receptore. Stoga su u zadnjem nizu pokusa istraženi kemotaksijski i osteoklastogeni učinci kemokina na monocite periferne krvi u funkcionalnom *in vitro* modelu. Izdvojene PBMC iz pojedinačnih uzoraka su prvo inkubirane uz djelovanje M-CSF-a preko noći, a potom su neadherentne stanice pokupljene i podijeljene u dvije skupine – jedna je uzgajana u uvjetima osteoklastogene kulture kako bi se dokazali izravni osteoklastogeni učinci kemokina, a druga je stavljena na *Transwell*-sustav za kulturu stanica kako bi se ispitala kemotaksija populacije OCP prema kemokinskom gradijentu (Slika 22). Taj migracijski test je dalje analiziran po broju privučenih stanica te njihovom osteoklastogenom potencijalu. Za ove pokuse izabrani su CCL2, CCL5 i CXCL10 na temelju rezultata analize izražaja receptora, odnosno koncentracije odgovarajućih liganda u perifernoj krvi (Slika 13 i Slika 14). Osim povećanog izražaja kemokinskih receptora CCR1, CCR2 i CCR4 (koji vežu CCL2 i CCL5), povećan je bio i izražaj CXCR3 (receptora za CXCL10) u uzorcima bolesnika koji boluju od RA u odnosu na zdrave ispitanike (medijan 43,1% [33,3-54,2] u kontrola naspram 61,5% [53,3-69,2] u RA,  $p=0,009$ ). CCL2 je izabran zbog povišenog izražaja svojih receptora, CCR2 i CCR4, na populaciji OCP; povišene razine u krvi, kao i indikacije dodatnog porasta u SF; s dodatnim razlogom što je kemokin koji privlači samo monocite (118). CCL5 je izabran zbog također povišenog izražaja receptora na OCP (CCR1, CCR2 i CCR4), te je bio dodatno zanimljiv zbog povišene razine u krvi, no snižene u SF, što je sugeriralo njegovu ulogu u mobilizaciji progenitora iz koštane srži, no ne i navođenja u zglobove (121). CXCL10 je izabran jer je osim povećanog izražaja receptora CXCR3 na OCP, jedini imao i značajni pozitivni gradijent iz krvi RA u SF te je ujedno kemokin koji neselektivno privlači i mijeloidnu i limfoidnu lozu (72). Unatoč nepovećanoj razini u plazmi RA i SF, CXCL12 je ipak testiran u *in vitro* migracijskom testu zbog povećanog izražaja CXCR4 receptora te njegovom osobitom povezanošću s parametrima bolesti (Slika 18). No, učinci na osteoklastogenezu ili kemotaksiju su bili zanemarivi ili odsutni (medijan 1,31 [1,21-1,38] za omjer broja osteoklasta u kulturi tretiranoj CXCL12 naspram netretirane kulture,  $p=0,106$ ; 0,97 [0,77-1,56] za omjer migriranih stanica u *Transwell*-sustavu tretiranom CXCL12 naspram netretiranom sustavu,  $p=1,000$ ).

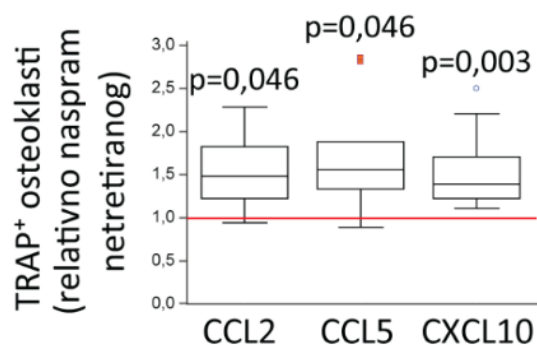
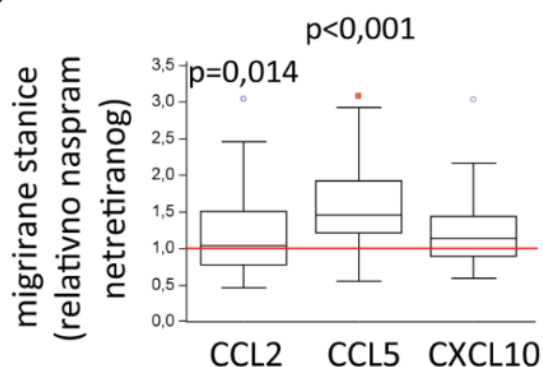
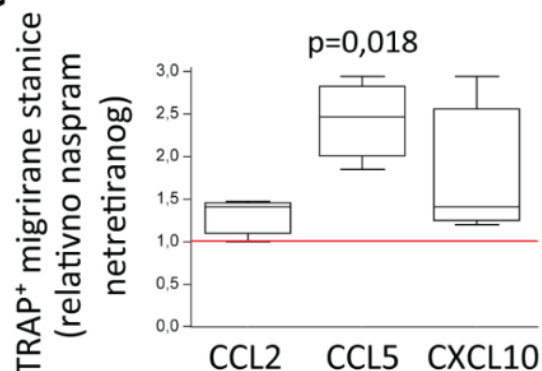


**Slika 22. Shematski prikaza pokusnog dizajna i relativni izražaj kemokinskih receptora na osteoklastnim progenitorima.** (A) Shematski prikaz pokusnog dizajna. Osteoklastogeni i kemotaksijski učinci kemokina su ispitani na neadherentnim stanicama koje su prikupljene iz kulture nakon prekonnočne inkubacije mononuklearnih stanica periferne krvi s 35 ng/mL čimbenika stimulacije makrofagnih kolonija (M-CSF, prema engl. *macrophage colony-stimulating factor*). Za osteoklastogene kulture, stanice su dalje uzgajane s M-CSF-om (30 ng/mL) i ligandom receptora aktivatora jezgrenog čimbenika  $\kappa$ B (RANKL, prema engl. *receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand*; 100 ng/mL), bez kemokina ili s dodatkom CCL2 (40 ng/mL), CCL5 (10 ng/mL) ili CXCL10 (20 ng/mL). Multinuklearne stanice pozitivne za

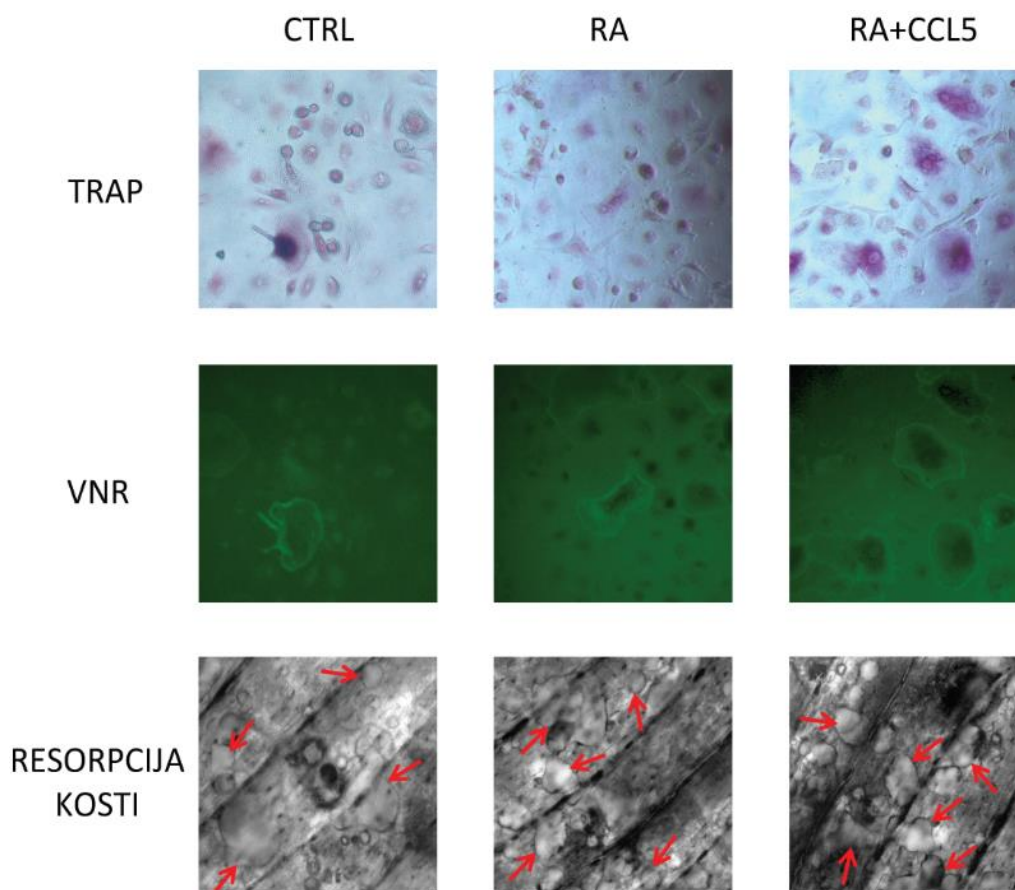
kiselu fosfatazu otpornu na tartarat (TRAP, prema engl. *tartrate-resistant acid phosphatase*) su brojane kao zreli osteoklasti. Za migracijski test, stanice su prvo uzgajane 3 dana s M-CSF-om i RANKL-om, a zatim prenesene na Transwell sustav za kulturu s primjenom kemokinskog gradijenta (CCL2, CCL5 ili CXCL10). Stanice koje su migrirale kroz membranu Transwella su prebrojane nakon bojanja 4'6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI, prema engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*). Stanice su potom diferencirane dodavanjem M-CSF-a i RANKL-a te su prebrojani TRAP<sup>+</sup> osteoklasti. (B) Relativni izražaj kemokinskih receptora na osteoklastnim progenitorima (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>) u perifernoj krvi uzoraka iz RA u odnosu na vrijednost medijana kontrolnih (zdravih) ispitanika, mjereno protočnom citometrijom. Vrijednosti su prikazane kao medijani (središnja crta), s okvirima koji predstavljaju interkvartilni raspon (IQR, prema engl. *interquartile range*), vanjskim crtama koje predstavljaju 1,5X vrijednosti IQR. Crvena vodoravna crta prikazuje relativnu vrijednost medijana kontrolnih ispitanika. CCR, receptor za C-C kemokin; CXCR, receptor za C-X-C kemokin, CCL, kemokinski ligand s C-C motivom; CXCL, kemokinski ligand s C-X-C motivom.

S obzirom na značajno jači izražaj kemokinskih receptora u uzorcima bolesnika u odnosu na kontrole, očekivala se velika osjetljivost i značajan biološki odgovor monocita periferne krvi na kemokinsko djelovanje u RA (Slika 23). Kemokini CCL2, CCL5 i CXCL10 su pokazali uočljivi osteoklastogeni i kemotaksijski učinak. Svi ispitani kemokini pokazali su podjednak izravni učinak na osteoklastogenezu (koncentracije kemokina su bile uzete kao središnja vrijednost raspona minimalne do maksimalne koncentracije koje navodi proizvođač) te su potaknuli diferencijaciju podjednakog broja TRAP<sup>+</sup> osteoklasta (Slika 23A). Uz izražaj enzima TRAP, identitet i funkcionalna sposobnost osteoklasta je dodatno potvrđen izražajem VNR te koštanom resorpcijom (Slika 24). CCL5 je pokazao najsnažniji kemotaksijski učinak od testiranih kemokina, privlačeći najveći broj stanica u migracijskom testu (Slika 23B). Uz to, te migrirane stanice su posjedovale veći osteoklastogeni potencijal uz stimulaciju M-CSF-om i RANKL-om u usporedbi s kontrolom te stanicama privučenim gradijentom CCL2 ili CXCL10 (Slika 23C). Ti rezultati upućuju na zaključak da kemokinski signali ne samo stimuliraju kemotaksiju populacije OCP, već djeluju sinergistički s RANKL-om i M-CSF-om kako bi potaknuli njihovu diferencijaciju u zrele osteoklaste. To je u skladu s novijim radovima koji su pokazali da u brojnim bolestima, posebice upalnim, komplemetarni osteoklastogeni čimbenici nadopunjavaju klasični put aktivacije osteoklasta i potiču njihovu diferencijaciju (122).



**A****B****C**

**Slika 23. Osteoklastogeni i kemotaksijski učinci kemokina na periferne osteoklastne progenitore u reumatoidnom artritisu.** (A) Relativni broj TRAP<sup>+</sup> osteoklasta nastalih kemokinskim tretmanom u odnosu na vlastitu kontrolu (bez primjene kemokina). (B) Relativni broj stanica koje su migrirale kroz membranu Transwella u odnosu na vlastitu kontrolu migracijskog testa (bez kemokina). (C) Relativni broj TRAP<sup>+</sup> nastalih od stanica koje su migrirale u donju komoru Transwell sustava u odnosu na vlastitu kontrolu (bez kemokina). Vrijednosti su prikazane kao medijani (središnja crta), s okvirima koji predstavljaju interkvartilni raspon (IQR, prema engl. *interquartile range*), vanjskim crtama koje predstavljaju 1,5X vrijednosti IQR te kvadratima ili krugovima koji predstavljaju vrijednosti koje odstupaju. Crvene vodoravne crte prikazuju relativnu vrijednost vlastite kontrole (bez kemokina). Usporedbe između skupina učinjene su neparametrijskim Mann-Whitney testom, prikazane su vrijednosti  $p < 0,05$ . CCR, receptor za C-C kemokin; CXCR, receptor za C-X-C kemokin, CCL, kemokinski ligand s C-C motivom; CXCL, kemokinski ligand s C-X-C motivom.



**Slika 24.** Osteoklasti diferencirani iz mononuklearnih stanica periferne krvi izražavaju biljege specifične za zrele osteoklaste. Diferencijacija osteoklasta potaknuta je čimbenikom stimulacije makrofagnih kolonija (M-CSF, prema engl. *macrophage colony-stimulating factor*) i ligandom receptora aktivatora jezgrenog čimbenika  $\kappa$ B (RANKL, prema engl. *receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand*). Kako bi se potvrdilo da su diferencirane stanice zreli, funkcionalni osteoklasti, paralelno je uzgajan set kultura koji je potom obojan na kiselu fosfatazu otpornu na tartarat (TRAP, prema engl. *tartrate-resistant acid phosphatase*) i vitronektinski receptor (VNR). Funkcionalna sposobnost diferenciranih osteoklasta da resorbiraju kost je potvrđena istim uvjetima osteoklastogene kulture izvedene na komadićima goveđe kosti. Prikazane su reprezentativne slike osteoklastogenih kultura mononuklearnih stanica periferne krvi kontrolnih ispitanika (CTRL, prema engl. *control*) i bolesnika s reumatoidnim artritisom (RA) te dodatno stanica iz RA u kulturi potaknutoj kemokinom CCL5 (10 ng/mL). Reprezentativni zreli TRAP<sup>+</sup> osteoklasti i komadići goveđe kosti su fotografirani na svjetlosnom mikroskopu, pri 200X povećanju. Crvene strelice ukazuju na resorpcijske lakune koje su u kosti stvorili osteoklasti. Izražaj VNR je fotografiran koristeći fluorescentni mikroskop, također pri 200X povećanju.

## 6. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je usporediti fenotip, udio i diferencijacijski potencijal populacije OCP u perifernoj krvi i sinovijalnoj tekućini pacijenata koji boluju od RA u odnosu na zdrave ispitanike te definirati važnost kemokinskih signala za migraciju i aktivaciju stanica OCP.

### 6.1. Bolesnici i pokazatelji aktivnosti bolesti

U istraživanje je uključena kohorta pacijenata koji boluju od RA s teškim oblikom bolesti u kroničnoj fazi, s visokom aktivnošću bolesti prema vrijednosti DAS28 te trajanjem bolesti preko 10 godina. Osim povišenih mjera aktivnosti bolesti (DAS28 i CDAI), slabi uspjeh u kontroli bolesti potvrđivali su i visoki upalni (SE, CRP, TNF- $\alpha$ ), autoimunosni (RA, ACPA) te klinički parametri (broj bolnih i broj otečenih zglobova), unatoč činjenici da su svi bolesnici bili na pojedinačnoj ili kombiniranoj terapiji NSAID, DMARD, glukokortikoidima i biološkim lijekovima. Dosadašnji radovi pokazuju da uspješna terapija u RA, neovisno o kojem točnu lijeku je riječ, odnosno kojim mehanizmom djeluje, uvijek ima za rezultat smanjenu infiltraciju mononuklearnih stanica u sinoviju te posljedično smanjenje njene upale. Od svih stanica, naj snažnija i najkonzistentnija povezanost s uspješnosti terapije je uočena s brojem monocita/makrofaga, čije smanjenje broja je povezano s kliničkim poboljšanjem u svim vrstama terapije (123). S obzirom da se OCP nalaze u monocitno/makrofagnoj populaciji, pretpostavka je bila da bi uvrštavanje bolesnika s aktivnom bolešću, s kontinuiranom upalom i razaranjem zglobova, omogućilo lakše i jasnije uočavanje promjena u fenotipu, udjelu, diferencijacijskom potencijalu i aktivnosti populacije OCP u RA.

Istraživanja su utvrdila da plazmatska koncentracija CTX oslikava oštećenje koštanog i hrskavičnog tkiva te da je vrlo dobar prediktivni biljeg bolesti u RA, čija izmjerena razina korelira s jačinom radiografskog oštećenja u idućih nekoliko godina. No, većina istraživanja se usredotočila na mjerenje razine CTX-a u ranom RA, gdje je utvrđen kao osjetljiviji parametar za mjerenje oštećenja zglobova od SE ili CRP (124). U pacijenata s visokom aktivnošću bolesti, CTX, kao biljeg koštane resorpcije, nije bio povišen u odnosu na blagu/umjerenu aktivnost bolesti, vjerojatno uslijed kombinacije nekoliko čimbenika u tih bolesnika – starije dobi te posljedičnim fiziološkim smanjenjem koštane pregradnje, manje pokretljivosti uvjetovane većim i jačim zahvaćanjem zglobova, te većim udjelom bolesnika na terapiji glukokortikoidima, koji imaju inhibicijsko djelovanje na osteoresorpciju (115). Nadalje, ti bolesnici obično primaju i veće doze DMARD-a, a za koje je uočeno da su jedina vrsta terapije

koja je bila značajno povezana s nižom razinom CTX-a. Istraživanja pokazuju da visoke doze MTX, koji pripada u DMARD, mogu smanjiti proliferaciju stromalnih stanica koštane srži i njihovu diferencijaciju te posljedično broj osteoblasta, što može dovesti do smanjenja koštane mase, usred neravnoteže stvaranja i resorpcije kosti (125). No, doze korištene u terapiji RA su obično znatno manje te više dolazi do izražaja imunosupresijski i imunomodulacijski učinak MTX koji bi, preko smanjenja lučenja RANKL-a i proupalnih citokina iz imunskih stanica, mogao smanjiti koštanu resorpciju. Osim toga, čini se da MTX izravno smanjuje osjetljivost osteoklasta na RANKL (126).

## **6.2. Fenotipske i funkcionalne značajke osteoklastnih progenitora**

Biljezi populacije ranih OCP u ljudi su znatno slabije istraženi u odnosu na miševе. Iako je izražaj RANK-a karakterističan za stanice usmjerene u osteoklaste, studije pokazuju da je populacija takvih stanica izrazito malobrojna u krvi, sa slabim izražajem biljega (57). Nadalje, opetovano je pokazano kako je moguće uzgojiti osteoklaste iz različitih subpopulacija RANK<sup>+</sup> monocita periferne krvi, koji su puno brojniji, te upravo ti OCP u raniji stadijima razvoja predstavljaju glavni izvor stanica s osteoklastogenim potencijalom periferne krvi. No, još uvijek nisu definirani specifični biljezi OCP u ranijim stadijima razvoja, osobito u populaciji perifernih ljudskih monocita (53). U ovom istraživanju, DP-populacija (CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>) monocita periferne krvi je odabrana kao temeljna populacija za analize fenotipa i brojnosti u skladu s najčešće korištenim biljezima za identifikaciju populacije obogaćene stanicama OCP u artritisu (52). Protočnometrijskom analizom uočeno je da stanice koje srednjim intenzitetom izražavaju biljeg CD11b (CD11b<sup>+</sup>) označavaju osteoklastogenu populaciju OCP periferne krvi, dok jako pozitivne stanice (CD11b<sup>++</sup>) gotovo isključivo odgovaraju granulocitima, koji nisu osteoklastogeni (35). Ta populacija je bila umjereno, ali značajno, povećana u bolesnika koji boluju od RA. Mogući razlozi zašto nije bila izrazitije ekspanzirana mogli bi biti u tome što su bolesnici većinom na kontinuiranoj terapiji, često kombiniranoj, koja djeluje imunosupresivno i imunomodulacijski te posljedično umanjuje poticaj za mobilizaciju i aktivaciju progenitora (127). Istraživanja ukazuju na dodatno uvećanje te populacije u neliječenih pacijenata (128-130). DP-populacija je očekivano korelirala s plazmatskom razinom TNF- $\alpha$  koji potiče proliferaciju i aktivaciju mijeloidne loze, što se, među ostalim, očituje povećanjem izražaja integrina CD11b te TLR-receptora CD14 (131). Međutim, DP-populacija nije korelirala s plazmatskom razinom CTX, što bi se moglo objasniti njenom ranom fazom u razvoju do zrelog osteoklasta, jer ne sadrži isključivo stanice usmjerene u osteoklaste te kao takva nije izravni

efektor koštane resorpcije. Za daljnju maturaciju osteoklasta ključan je mikrookoliš u zahvaćenom zglobu, odnosno lokalna razina proosteoklastogenih medijatora, pri čemu osobito prisutnost RANKL-a (35). Za razliku od RA, udio DP-populacije u PsA nije bio značajno povišen u odnosu na kontrolnu skupinu. No, udio subpopulacije koja izražava RANK bio je značajno povišen, s indikacijom povišenog RANKL-a. To je u skladu s rezultatima prijašnjih istraživanja koja povezuju patogenezu PsA s poremećajem RANKL/RANK osovine, s obzirom na povećanu koncentraciju RANKL-a u SF te povećanog izražaja RANK-a na PBMC (65, 132, 133).

Dosadašnji radovi su pokazali prisutnost DP-populacije u sinoviji upaljenih zglobova u RA, te njihov osteoklastogeni potencijal (134), međutim bez usporedbe brojnosti ili detaljnije fenotipizacije. Dodatno povećanje DP-populacije u sinovijalnom punktu u odnosu na udio u perifernoj krvi upućuje na nakupljanje proučavane populacije u zahvaćenom zglobu. Etiopatogenetski značaj te pojave dodatno naglašava povišen izražaj RANK-a, biljega stanica usmjerenih u osteoklastnu lozu (35, 52). Ta pojava je očekivana s obzirom na dobro utvrđeni upalni mikrookoliš zahvaćenog zgloba, s obiljem proupalnih citokina koji, osim što izravno potiču osteoklastogenezu, povećavaju i izražaj RANK-a na OCP te izlučivanje RANKL-a iz susjednih stanica (122). Također, to dodatno potvrđuje da proučavane DP-stanice sadrže OCP koji su sposobni reagirati povećanjem izražaja RANK-a.

Uočeno sniženje izražaja CD115 na monocitima izdvojenim iz SF zahvaćenih zglobova u RA i PsA moglo bi se objasniti mehanizmom negativne povratne sprege kojom se upalna reakcija nastoji ublažiti. Mehanizam negativne povratne sprege u upali djeluje putem upalnih medijatora koji djeluju supresijski na osteoklastogenezu, uklanjanjem receptora CD115 sa stanične membrane, a što za posljedicu ima smanjeni izražaj RANK-a te općenito smanjenu aktivnost osteoklasta (116). Zbog slabijeg izražaja receptora CD115, populacija ranih OCP mogla bi biti slabije osjetljiva na M-CSF, koji je potreban u ranim fazama osteoklastogene diferencijacije. No, smanjeni izražaj biljega CD115 nije bio povezan sa smanjenjem izražaja RANK-a u populaciji DP-stanica izdvojenih iz SF, sugerirajući da se diferencijacija osteoklasta normalno nastavlja unatoč negativnoj povratnoj sprezi, koja je možda nadvladana velikom količinom drugih proupalnih osteoklastogenih signala. Tome u prilog govori i pozitivna korelacija broja RANK<sup>+</sup> DP-monocita u SF s brojem bolnih zglobova.

S obzirom na intenzivnu osteoresorpciju, očekivali bismo veći osteoklastogeni potencijal mononuklearnih stanica periferne krvi u RA u odnosu na kontrolne ispitanike ili neerozivni osteoartritis, kako je pokazano u nekim studijama (63, 128, 134). Međutim, diferencijaciji osteoklasta znatno pridonosi i prisutnost aktiviranih limfocita, pa sađenjem izdvojene

populacije OCP nema značajne razlike (135). Uspoređujući uzorke periferne krvi bolesnika i kontrolnih ispitanika, uočeno je da je izražaj receptora za ključne čimbenike diferencijacije osteoklasta – CD115 (receptor za M-CSF) i RANK (receptor za RANKL) – bio podjednak te sugerirao sličnu osjetljivost na diferencijacijske podražaje. Stoga nam rezultat podjednagog *in vitro* osteoklastogenog potencijala sortiranih DP-stanica periferne krvi nije neočekivan, uzimajući u obzir činjenicu da su stanice u obje grupe sađene u bunariće u istoj gustoći te da su uzgajane u osteoklastogenim kulturama koje se prema protokolu potiču upravo čimbenicima M-CSF i RANKL (35).

### **6.3. Izražaj kemokinskih receptora na osteoklastnim progenitorima**

Istraživanja upućuju da bi resorpcija vezana za zglobove u artritisu mogla biti rezultat privlačenja OCP, s obzirom da oni pripadaju monocitnoj lozi koja je podložna djelovanju kemotaksijskih signala. Također je utvrđen izražaj čitavog raspona kemokinski receptora na OCP (66, 69-74). U našem istraživanju, DP-populacija perifernih monocita, koja je pokazala veliki osteoklastogeni potencijal, osim što je bila značajno povećana u RA, imala je i značajno povišen izražaj kemokinskih receptora (CCR1, CCR2, CCR4, CXCR3, CXCR4).

Druga istraživanja su već utvrdila izražaj CCR1, CCR2, CCR4 u ljudskim OCP u perifernoj krvi. Stimulacija OCP RANKL-om *in vitro* znatno pojačava izražaj CCR4 te u nešto manjoj mjeri CCR2, dok nema utjecaja na izražaj CCR1 (66). No, uloga CCR1 čini se ključnom u kasnijim stadijima razvoja osteoklasta, pošto osteoklastogeneza izostaje u miševa s nedostatkom CCR1 na osteoklastima, prije svega zbog nemogućnosti fuzije mononuklearnih progenitora (69). Signalizacijom preko CCR2 moguće je potaknuti diferencijaciju osteoklasta i bez RANKL-a, iako bez dodatne stimulacije njime izostaje sposobnost resorpcije kosti (70). Izražaj CXCR3 do sada nije pokazan na ljudskim OCP, no njegova uloga smatra se ključnom za privlačenje monocita u osteolitička žarišta u karcinomima (103). Za CXCR4 je uočeno da je naj snažnije izražen u ranijim stadijima razvoja osteoklasta iz ljudskih perifernih OCP, te da njegov izražaj brzo i znatno opada diferencijacijom *in vitro* (72). Međutim, malobrojna istraživanja u ljudi nisu uspoređivala izražaj kemokinski receptora na OCP u RA u odnosu na kontrolne ispitanike, kao niti u sinovijalnoj tekućini. U ovom istraživanju, subpopulacija CXCR4<sup>+</sup> stanica je pokazala najveću povezanost s indikatorima težine bolesti, pozitivno korelirajući s razinom TNF- $\alpha$ , protutijela na vlastite antigene te CTX-om, te je bila dodatno umnožena u sinovijalnom odjeljku. Uz to, smanjenje izražaja CXCR4<sup>+</sup> na populaciji OCP bolesnika liječenih DMARD-ovima ukazuje na potencijalnu primjenu razine izražaja toga

receptora kao mogućeg indikatora aktivnosti bolesti i dobrog odgovora na terapiju. Bolesnici na terapiji DMARD-om su također imali manju koštanu resorpciju, koja bi mogla biti u vezi s izražajem CXCR4. Naime pokazano je da inaktivacija CXCR4 učinkovito ublažava simptome CIA u miševa ako se primijeni inhibitor CXCR4 između vremena imunizacije i pojave prvih simptoma (136). Nadalje, inhibicijom CXCR4 u mišjem modelu osteoartritisa bilo je moguće značajno smanjiti subhondralni gubitak kosti (137).

Povećani izražaj kemokinskih receptora CCR1 i CCR2 na DP-stanicama u bolesnika koji boluju od RA sugerira moguću važnost kemotaksije posredovane tim receptorima (putem liganda CCL2 i CCL4) za navođenje OCP u zglobove. CCR2, kojeg izražavaju limfoidne i mijeloidne stanice, je važan za novačenje stanica nekoliko različitih linija, uključujući novačenje monocita u zglobove (138, 139). Rezultati jedne *in vitro* studije sugeriraju mogućnost da bi blokada CCR1 mogla biti učinkovita u inhibiciji migracije monocita prema sinovijalnom odjeljku u RA (121). Udio populacija DP-stanica koje izražavaju CCR1 i CXCR4 bio je značajno dodatno povišen u sinovijalnom odjeljku u odnosu na krv u RA, sugerirajući nakupljanje tih stanica u upaljenim zglobovima i njihov značaj u razaranju zgloba, što je u skladu s već spomenutim studijama koje su pokazale pozitivni učinak blokade CCR1 ili CXCR4 na ublažavanje artritisa. Zanimljivo je da je sličan profil kemokinski receptora uočen i u PsA, sa značajno povećanim izražajem CCR1 i CXCR4 u perifernoj krvi bolesnika u odnosu na kontrole, dok dodatno povećanje u sinovijalnom punktu nije bilo značajno, vjerojatno zbog malog broja uzoraka. No, ovaj nalaz sugerira moguću sličnost u djelovanju kemokina u ove dvije bolesti, kao i potencijal za pronalazak zajedničkog terapijskog pristupa. Izražaj CXCR4 u sinoviji je povezan s aktivnošću bolesti i oštećenjem kostiju i zglobova u bolesnika koji boluju od RA (140), a također je povezan s aktivnošću limfocita T u RA (147). Među DP-stanicama SF, subpopulacija koja izražava CCR4 bila je snižena i u RA i u PsA, sugerirajući da CCR4 nije važan za nakupljanje monocita u zglobove zahvaćene artritismom, za razliku od njegove važnosti za nakupljanje limfocita T (141).

#### **6.4. Koncentracije kemokinskih liganda**

Da bi dalje potvrdili značaj interakcije kemokinskih receptora i liganda za nakupljanje osteoklastnih progenitora u zahvaćenim zglobovima, nakon određivanja profila receptora određene su i razine nekih od njihovih liganda (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL12). Također je višestrukom logističkom regresijom pokazano da izražaj receptora i kemokina, posebice CCL5 i CXCL10, značajno pridonosi povećanju udjela DP-stanica. U

prethodnim istraživanjima brojni su kemokini implicirani u koštanoj resorpciji, odnosno poticanju migracije, diferencijacije te aktivnosti osteoklasta i njihovih progenitora (98-104). CCL2, CCL4 i CXCL10 imali su povišene razine u plazmi s tendencijom dodatnog porasta u SF, sugerirajući da ih proizvode stanice unutar sinovijalnog odjeljka, od kuda bi se ti kemokini prelijevali u cirkulaciju proporcionalno intenzitetu bolesti, odnosno lučenju upalnih medijatora (142). Jedno novije istraživanje potvrđuje ovakav nalaz gradijenta za CCL2, s povećanom razinom u plazmi te dodatnim povećanjem u SF bolesnika koji boluju od RA u odnosu na kontrole (143). No, iako je CCL2 ključan u kemotaksiji monocita, anti-CCL2 terapija je ispitana u kliničkom okruženju te nije polučila ikakvo kliničko ili imunohistološko poboljšanje u bolesnika koji boluju od RA (144). To bi mogla biti posljedica velike redundacije u funkciji kemokinskih liganda i njegovih receptora (118). Za CCL4 je nađeno da je povećanog genskog izražaja u krvi i sinoviji bolesnika koji boluju od RA, što je u skladu s našim nalazom (143). Međutim, zanimljivo je da je povećani izražaj CCL4 u krvi doveden u vezu s lošim odgovorom na terapiju (145). Plazmatske koncentracije CXCL10 su ustanovljene kao dobar prediktor aktivnosti bolesti u ranom RA (146). CXCL10 je trenutno u drugoj fazi kliničkog ispitivanja za primjenu u RA, a prvi rezultati pokazuju nešto bolju učinkovitost od anti-TNF terapije (147). CXCL9 i CCL3 su također bili povišeni u plazmi, no bez dodatnog povišenja u SF, što govori protiv mogućnosti da sudjeluju u kemotaksiji OCP prema zahvaćenim zglobovima. CXCL9, koji dijeli zajednički CXCR3 receptor s CXCL10, doveden je isto tako u vezu s aktivnošću bolesti, te je nađeno da povećanje i smanjenje njegove razine prati istovjetne promjene u aktivnosti bolesti, no sam mehanizam, kao i glavna populacija stanica na koju djeluje u RA ja zasad nepoznata (148). Slična općenita veza ustanovljena je i za CCL3, bez jasnije uzročno-posljedične veze, odnosno mehanizma (149).

Iako je CXCL12, jedini CXCR4 ligand, također impliciran u patogenezi nekoliko poremećaja koštanog sustava, uključujući RA (104), nismo našli razliku u razinama CXCL12 između SF i plazme u RA, kao ni razliku naspram kontrolnih ispitanika što također ne podržava njegovu ulogu u kemotaksiji OCP u zahvaćene zglobove u RA. Iako su neke studije pokazale veću plazmatsku i sinovijalnu koncentraciju CXCL12 u RA, rađene su na bolesnicima koji većinom nisu imali dugogodišnju bolest (140, 150, 151). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem su moguća indikacija da je CXCL12, kao već spomenuti CXCL9 i CXCL10, bolji biomarker ranije bolesti.

CCL5 je bio niži u SF naspram plazme u RA *in vivo*, prije sugerirajući važnost njegovog učinka za sustavnu mobilizaciju mijeloidnih stanica u cirkulaciju nego njihovo nakupljanje u sinovijalnom odjeljku. Tome u prilog govori istraživanje koje je utvrdilo da je CCL2, a ne



CCL5 ključan za privlačenje monocita u sinovijalni odjeljak, lokalnu upalu i razaranje hrskavice, pošto miševi kojima nedostaje CCL5 nisu zaštićeni od razvoja artritisa, dok oni s nedostatkom CCL2 jesu (152). TNF- $\alpha$  bi mogao imati ulogu u RA poticanjem lučenja kemokina CCL2 i CCL5 s obzirom da je njegova koncentracija korelirala s udjelom DP-populacije. Uz to, CCL2 i CCL5 su pozitivno korelirali i s DP-stanicama periferne krvi i s razinom TNF- $\alpha$  te su prethodna istraživanja utvrdila poticajni učinak TNF- $\alpha$  na izlučivanje oba kemokina (153, 154).

### **6.5. Ograničenje studije**

Iako bi usporedba sinovijalnog odjeljka između kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od RA pružila bolji uvid u promjene razina kemokinskih receptora i liganda koje su povezane s artritismom, nismo bili u mogućnosti prikupiti kontrolne SF zbog malog volumena tekućine i broja stanica u zdravim sinovijalnim zglobovima. Osim toga, aspiracija SF u pacijenata koji boluju od artritisa je učinjena iz terapijskih razloga, dok aspiracija SF u zdravih ispitanika nije opravdana niti etična zbog boli, neugode, kao i rizika oštećenja zglobnih tkiva, infekcije i disfunkcije zgloba (155). S druge strane, sustavno povišena razina kemokina zabilježena u perifernoj krvi, osim što je povezana s intenzitetom lokalne bolesti, stvara proupalno stanje koje posreduje sustavne učinke artritisa, uključujući aktivaciju stanica mijeloidne loze i sustavni gubitak kosti (156). Uz to, mogućnost mjerenja parametara bolesti iz periferne krvi je klinički relevantno u slučajevima kada aspiracija SF nije moguća zbog tehničkih problema ili nedostatka dovoljno velikog izljeva. Stoga, razine kemokina u perifernoj mogu poslužiti kao biomarkeri bolesti koji su lakše i češće dostupni od sinovijalne tekućine (157). Tijekom prošlih godina, brojne studije su također potvrdile ovaj model uzimanja perifernih monocita kao prikladan za proučavanje poremećaja i bolesti koje zahvaćaju koštani sustav (158).

### **6.6. Periferni osteoklastni progenitori tijekom anti-TNF terapije**

U bolesnika s vrlo visokom aktivnošću bolesti, koji su seropozitivni te imaju znakove oštećenja zglobova, preporučeno je razmotriti uvođenje biološke terapije u slučaju neuspjeha terapijom klasičnim DMARD (159). Često primjenjivana je anti-TNF terapija, koja nije uspješna u 20-40% pacijenata, a za koju trenutno ne postoji dobar prediktor odgovora, koji bi bio poželjan s obzirom na nuspojave i cijenu (160). S obzirom da biološka anti-TNF terapija izravno djeluje na jedan od ključnih proupalnih citokina s ciljem suzbijanja upale, ali i posljedičnog lokalnog i sustavnog gubitka kosti, analiziran je njen utjecaj na fenotip populacije OCP tijekom terapije. Učinci terapije na aktivnost bolesti najizraženiji su u prva dva mjeseca, s manjim dodatnim

poboljšanjem do četvrtog mjeseca, te praktički stabilizacije učinka do šestog mjeseca terapije, stoga su uzete te vremenske točke i period za praćenje kohorte pacijenata koji boluju od RA i PsA (161). Udio DP-stanica se nije umanjio tijekom terapije, što bi se moglo pripisati već prisutnom učinku dugogodišnje, često kombinirane terapije, u tih pacijenata. Iako je izražaj receptora uključujući za diferencijacijske čimbenike, CD115 i RANK, ostao nepromijenjen tijekom praćenja, udio poulacije OCP koji izražava CCR4 značajno se smanjio tijekom anti-TNF terapije u RA i PsA. Sličan trend je uočen i za CCR2, iako nije bio značajan, pri čemu je mogući problem bio mali broj uzoraka i velika varijabilnost između pacijenata. Jedno prijašnje istraživanje je već ukazalo na moguće smanjenje CCR2 na limfocitima T prilikom primjene anti-TNF terapije (153). Postoji nekoliko funkcionalnih veza između TNF- $\alpha$  i učinaka kemokina koju mogu biti modulirane blokadom TNF-a. Te veze uključuju vaskularnu aktivaciju koja potiče adheziju leukocita i kemotaksiju, kao i TNF-om inducirano lučenje kemokina iz lokalnih stanica i infiltrirajućih upalnih stanica (121). Promjena profila kemokinskih receptora tijekom anti-TNF terapije, uočena u ovom radu, mogla bi smanjiti osjetljivost stanica OCP na kemokinske signale te ponuditi nove ciljeve za kontrolu napretka bolesti. U tom kontekstu se osobito istaknuo CCR4, za koji je već pokazano da pozitivno korelira s razinama svojih liganda (CCL2 i CCL3), koji su također povišeni u RA.

## 6.7. Osteoklastogeni učinak kemokina

Utvrđen je izravan osteoklastogeni učinak nekoliko kemokina na periferne OCP Iako su genetski pokusi u miševa te primarne kulture ljudskih stanica pomogle definirati regulaciju diferencijacije osteoklasta u fiziološkim uvjetima, alternativni putovi poticaja diferencijacije osteoklasta, osobito u bolesnika koji boluju od upalnih bolesti, nisu jasni. Nije definirano koji osteoklastogeni učinak proupalnih medijatora – izravno osteoklastogeno djelovanje na progenitore, ovisno ili neovisno o RANK/RANKL osovini, ili neizravno putem stanica u mikrookolišu progenitora – ima ključan utjecaj, kao ni koji su ključni medijatori te patološke osteoklastogeneze (162). Osim što pružaju signal za kemotaksiju, kemokini mogu djelovati aditivno na stimulaciju M-CSF/RANKL-om kako bi potaknuli diferencijaciju osteoklasta. Za pokuse su izabrani kemokini CCL2, CCL5 i CXCL10 na temelju njihovih razina u krvi i SF te izražaja njihovih receptora u bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike. CXCL12 je testiran na temelju snažne povezanosti izražaja receptora CXCR4 s parametrima bolesti, iako sam nije bio povišen u RA. U *in vitro* uvjetima ovog rada, uočen je povećan broj diferenciranih osteoklasta prilikom tretmana ligandima CCL2, CCL5 i CXCL10, za koje je potvrđeno da resorbiraju kost. Istraživanja na izdvojenim monocitima periferne krvi ljudi u različitim sustavima *in vitro*

kulture ukazala su na izravan osteoklastogeni učinak nekoliko kemokina, uključujući CCL2 i CCL5, kroz autokrine i parakrine petlje (163, 164). Važnost CCL2 je pokazana istraživanjem u kojem je diferencijacija osteoklasta iz ljudskih PBMC potaknuta isključivom primjenom CCL2, no takvi osteoklasti su bili nesposobni resorbirati kost bez poticaja RANKL-om (66). CCL2 je ključan za fuziju osteoklasta, te njegova potpuna blokada protutijelom u miševa inhibira osteoklastogenezu (165). Do sada nije jasno istražen učinak CCL5 na diferencijaciju OCP. Miševi s nedostatkom CCL5 pokazuju gubitak koštane mase, no, iako rezultati upućuju na povećanu aktivnost osteoklasta i smanjenu osteoblasta, mehanizam trenutno nije jasan (166). S druge strane, CCL5 je povezan s aktivacijom osteoklasta u ortodontskom pomicanju zubi (167). CXCL10 je povezan s diferencijacijom osteoklasta, te osteoklasti tijekom sazrijevanja izlučuju sve više CXCL10 koji se čini da ima ulogu u fuziji i nastanku zrelih multinuklearnih stanica (72). Iako još nedovoljno istražen u osteoklastogenezi, rezultati dosadašnjih istraživanja impliciraju važnost za preživljenje ranih stadija osteoklasta, dok u kasnijim fazama taj kemokin potiče njihovu aktivnost (104). Osim izravnog osteoklastogenog učinka, kemokini bi mogli biti uključeni i u diferencijaciju osteoklasta posredovanu ACPA-om (168). Ovi nekanonski putovi diferencijacije osteoklasta su osobito važni u upalnom okruženju, kada kemokini, kao i proupalni citokini (TNF- $\alpha$  i IL-1), zamjenjuju RANKL i M-CSF kako bi se pojačala diferencijacija osteoklasta (112). U nekim životinjskim modelima gubitka kosti izazvanog upalom, nije uočena povišena razina RANKL-a, što objašnjava zašto blokada kanonskog puta diferencijacije osteoklasta posredovane M-CSF/RANKL-om nije imala klinički zamjetljiv utjecaj (122).

## 6.8. Kemotaksijski učinak kemokina

Značaj kemokina za privlačenje imunosnih stanica, kao i njihova povezanost s upalnim bolestima, uključujući RA, je dobro poznat. Međutim njihov kemotaksijski učinak na periferne OCP u ljudi je slabo proučen. CCL5 je pokazao najjači kemotaksijski učinak na OCP *in vitro*, a stanice koje su migrirale pod utjecajem CCL5 posjedovale su ujedno i veći osteoklastogeni potencijal u odnosu na stanice privučene gradijentom CCL2 ili CXCL10. CCL5 je do sada u biologiji kosti najviše istraživan u ortodontskom pomicanju zubi, gdje se čini kao ključan kemokin koji snažno privlači OCP (167, 169), što je potvrđeno *in vitro*. CXCL10 je do sada samo impliciran u lokalnoj kemotaksiji osteoklasta zbog njegove važnosti za fuziju, iako sam učinak do sada nije bio pokusno potvrđen (72). U istraživanju na mišjim monocitima, CCL2 kojeg su lučile stanice ljudskog karcinoma prostate snažno je potaknuo kemotaksiju monocita koji su se potom diferencirali u osteoklaste (170). U *in vitro* pokusima, CXCL12 nije pokazao

značajni osteoklastogeni ili kemotaksijski učinak. Istraživanja koja su proučavala kemotaksijski učinak CXCL12 su se usredotočila na OCP iz koštane srži, a ne periferne krvi (171, 172). Stoga, u sustavnoj cirkulaciji, uloga CXCL12/CXCR4 osovini u RA čini se da ovisi o modulaciji receptora, a ne liganda.

Signalizacija kemokinima smatra se važnom u patogenezi RA te su razni kemokini, zajedno s pripadajućim receptorima, povezani s infiltracijom leukocita u upaljenu sinoviju (173). Unatoč ogromnim naporima da se identificiraju abnormalnosti imunološkog sustava u RA, još uvijek nije uspostavljena jasna veza između specifičnih populacija imunskih stanica i aktivnosti bolesti, osobito u kontekstu stanica urođene imunosti. Većina istraživanja se do sada bavilo specifičnom imunošću, osobito CD4<sup>+</sup> limfocitima T kao ključnim efektorima (174). Značajni izražaj kemokinskih receptora na monocitima periferne krvi, tj. specifično na populaciji OCP, mogao bi biti osobito važan za patogenezu RA s obzirom da kemokini potiču nekoliko staničnih odgovora koji su ključni za razaranje kosti. To uključuje pojačanu angigenezu koja dovodi do hipervaskularizacije sinovije, pojačano novačenje imunskih stanica i osteoklastnih progenitora, ali i njihovu proliferaciju i aktivnost (118, 175). Iako se puno zna o kemokinskim ligandima i receptorima u RA, terapija blokadom nije polučila očekivane rezultate te očito zahtijeva više znanja o specifičnim ulogama kemokina u bolesti te interakcijama s raznim stanicama. Relevantne subpopulacije mijeloidnih stanica, kao ishodišta osteoklasta, mogle bi biti heterogenije nego što se trenutno smatra, s jedinstvenim biljezima populacije OCP u različitim oblicima artritisa (122, 176).

## 6.9. Zaključak

Zaključno, imunofenotipizacijom kemokinskih receptora na OCP, te analizom *in vivo* kemokinskog profila, kao i njihovih *in vitro* učinaka, ovaj rad je pridodao razumijevanju složene mreže upale u RA. Rezultati prikazuju ulogu kemokina kao snažnih proupalnih, kemotaksijskih te osteoklastogenih čimbenika koji bi mogli biti važni za sustavno poticanje OCP i njihove mobilizacije te potom migracije i navođenja u zahvaćena tkiva s konačnim *in situ* sazrijevanjem. Uz to, rad je identificirao subpopulacije OCP s izražajem kemokinskih receptora, koje su posljedično osjetljive na kemokinski gradijent, te time pojašnjava lokalni kao i sustavni gubitak kosti utvrđen u RA. Novi uvidi u migraciju i funkcionalna svojstva OCP u odgovoru na kemokinske signale mogli bi otvoriti vrata učinkovitijim terapijskim pristupima u RA.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Udio OCP je značajno povećan u perifernoj krvi bolesnika koji boluju od RA te korelira s plazmatskim koncentracijama TNF- $\alpha$ , RF, CCL2 i CCL5.
2. U odnosu na krv, udio stanica RANK<sup>+</sup> je povećan u sinovijalnoj tekućini bolesnika koji boluju od RA i korelira s brojem bolnih zglobova.
3. Bolesnici koji boluju od PsA razlikuju se od zdrave kontrolne skupine po većem udjelu stanica RANK<sup>+</sup> unutar populacije OCP.
4. Populacija OCP u artritisu pojačano izražava kemokinske receptore CCR1, CCR2, CCR4, CXCR3 i CXCR4.
5. Višestrukom logističkom regresijom utvrđeno je da varijabilnost udjela OCP predviđaju koncentracije CCL5 i CXCL10 te izražaj CXCR4, tim poretkom važnosti.
6. Bolesnici koji boluju od RA imali su povišene koncentracije kemokinskih liganda CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 i CXCL10 u krvi, sa značajnim povećanjem CXCL10 u SF u odnosu na krv.
7. Udio perifernih monocita CXCR4<sup>+</sup> korelira s koncentracijama TNF- $\alpha$ , CTX i RF, te je smanjen u pacijenata liječenih DMARD terapijom.
8. Udio subpopulacije OCP koja izražava CCR4 pokazuje značajan negativan trend tijekom anti-TNF terapije.
9. Kemokinski ligandi CCL2, CCL5 i CXCL10 imaju slične osteoklastogene učinke *in vitro*, s tim da CCL5 pokazuje najveći kemotaksijski učinak na populaciju OCP u migracijskom testu.

## 8. SAŽETAK

Reumatoidni artritis (RA) je kronična bolest zglobova obilježena trajnom upalom i razaranjem zglobova. Mehanizmi koji dovode do oštećenja zglobova uključuju diferencijaciju i aktivaciju osteoklasta. Monocitna populacija stanica periferne krvi sadrži osteoklastne progenitore (OCP, prema engl. osteoclast progenitors) koji pridonose osteoresorpciji u upalnim artritima pod utjecajem raznih citokina i kemokina.

Cilj ovog rada bio je usporediti fenotip, udio i diferencijacijski potencijal populacije OCP u perifernoj krvi i sinovijalnoj tekućini bolesnika koji boluju od RA i psorijatičnog artritisa (PsA) u usporedbi s zdravim kontrolama te definirati važnost kemokinskih signala za migraciju i aktivaciju populacije OCP.

Rezultati su pokazali da je populacija OCP značajno povećana u perifernoj krvi u RA te korelira s koncentracijama TNF- $\alpha$ , reumatoidnog faktora, CCL2 i CCL5. U odnosu na krv, subpopulacija RANK<sup>+</sup> je povećana u sinovijalnoj tekućini i korelirala s brojem bolnih zglobova. Bolesnici koji boluju od PsA su se razlikovali od kontrolne skupine po većem udjelu stanica RANK<sup>+</sup>, no ne i udjelom same populacije OCP. Populacija OCP u artritisu ima povećan izražaj kemokinskih receptora CCR1, CCR2, CCR4, CXCR3 i CXCR4. Istovremeno, bolesnici koji boluju od RA imaju povišene koncentracije kemokinskih liganda CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 i CXCL10 u krvi, sa značajnim povećanjem CXCL10 u sinovijalnoj tekućini u odnosu na krv. Subpopulacija OCP CXCR4<sup>+</sup> korelira s koncentracijama TNF- $\alpha$ , markerom koštane resorpcije i RF, te je smanjena u bolesnika na DMARD-terapiji. Udio populacije OCP CCR4<sup>+</sup> pokazuje značajan negativan trend tijekom anti-TNF terapije. Ligandi CCL2, CCL5 i CXCL10 imaju slične osteoklastogene učinke, s tim da CCL5 pokazuje najveći kemotaksijski učinak na populaciju OCP.

Zaključno, ovaj rad identificira učinke odabranih kemokina na poticanje perifernih stanica OCP, njihovu migraciju u zahvaćene zglobove i sazrijevanje u funkcionalne osteoklaste. Nova saznanja o migracijskim i funkcionalnim svojstvima populacije OCP mogla bi uputiti na učinkovitije terapijske pristupe u RA.

## 9. SUMMARY

Phenotypic and functional characterization of osteoclast progenitors in patients suffering from rheumatoid arthritis

Alan Šučur

2017

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic joint disease marked by persistent inflammation and joint destruction. The mechanisms leading to joint destruction involve differentiation and activation of osteoclasts. Peripheral blood (PB) monocyte pool contains osteoclast progenitors (OCP) which contribute to osteoresorption in inflammatory arthritides, and are influenced by cytokine and chemokine milieu.

This work aimed to compare the phenotype, frequency and differentiation potential of OCPs in the peripheral blood and synovial fluid of patients suffering from RA and psoriatic arthritis (PsA) to those of healthy *controls* and to define importance of chemokine signals for migration and activation of OCPs.

The results showed that the OCP population was moderately enlarged among PB cells in RA and correlated with levels of TNF- $\alpha$ , rheumatoid factor, CCL2 and CCL5. Compared to PB, RANK+ subpopulation was expanded in SF and correlated with the number of tender joints. PsA patients could be distinguished by increased RANK expression rather than total OCP population. OCPs from arthritic patients had higher expression of CCR1, CCR2, CCR4, CXCR3 and CXCR4. In parallel, RA patients had increased levels of CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 and CXCL10, with significant elevation in SF vs PB for CXCL10. Subset expressing CXCR4 positively correlated with TNF- $\alpha$ , bone resorption marker and rheumatoid factor, and was reduced in patients treated with DMARD. CCR4+ subset showed significant negative trend during anti-TNF treatment. CCL2, CCL5 and CXCL10 had similar osteoclastogenic effects, with CCL5 showing greatest chemotactic action on OCPs.

In conclusion, this work identified effects of selected chemokines on stimulation of OCP mobilization, tissue homing and maturation. Novel insights into migratory behaviors and functional properties of circulatory OCPs in response to chemotactic signals could open ways to new therapeutic targets in RA.

## 10. LITERATURA

1. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016;22;388(10055):2023-2038.
2. Carmona L, Cross M, Williams B, Lassere M, March L. Rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010 Dec;24(6):733-45.
3. Cutolo M, Kitis GD, van Riel PL. Burden of disease in treated rheumatoid arthritis patients: going beyond the joint. *Semin Arthritis Rheum*. 2014;43(4):479-88.
4. Raza K, Falciani F, Curnow SJ, Ross EJ, Lee CY, Akbar AN, i sur. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(4):R784-95.
5. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011 Dec 8;365(23):2205-19.
6. Jorgensen C, Djouad F, Bouffi C, Mrugala D, Noël D. Multipotent mesenchymal stromal cells in articular diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2008;22(2):269-84.
7. Harre U, Lang SC, Pfeifle R, Rombouts Y, Frühbeißer S, Amara K, i sur. Glycosylation of immunoglobulin G determines osteoclast differentiation and bone loss. *Nat Commun*. 2015;6:6651.
8. Furuzawa-Carballeda J, Vargas-Rojas MI, Cabral AR. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmun Rev*. 2007;6(3):169-75.
9. Lundy SK, Sarkar S, Tesmer LA, Fox DA. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(1):202.
10. Cutolo M, Lahita RG. Estrogens and arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2005;31(1):19-27, vii.
11. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*. 2002;11;416(6881):603-7.
12. Colmegna I, Diaz-Borjon A, Fujii H, Schaefer L, Goronzy JJ, Weyand CM. Defective proliferative capacity and accelerated telomeric loss of hematopoietic progenitor cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(4):990-1000.
13. van der Helm-van Mil AH, Huizinga TW, de Vries RR, Toes RE. Emerging patterns of risk factor make-up enable subclassification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56(6):1728-35.



14. Bottini N, Vang T, Cucca F, Mustelin T. Role of PTPN22 in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. *Semin Immunol.* 2006;18(4):207-13.
15. Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, Zhang M, Frampton C, James J, i sur. Determinants of red blood cell methotrexate polyglutamate concentrations in rheumatoid arthritis patients receiving long-term methotrexate treatment. *Arthritis Rheum.* 2009;60(8):2248-56.
16. Linde L, Sørensen J, Østergaard M, Hørslev-Petersen K, Rasmussen C, Jensen DV, i sur. What factors influence the health status of patients with rheumatoid arthritis measured by the SF-12v2 Health Survey and the Health Assessment Questionnaire? *J Rheumatol.* 2009;36(10):2183-9.
17. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, i sur. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010;62(9):2569-81.
18. Verheul MK, Fearon U, Trouw LA, Veale DJ. Biomarkers for rheumatoid and psoriatic arthritis. *Clin Immunol.* 2015;161(1):2-10.
19. Grainger AJ, Rowbotham EL. Rheumatoid arthritis. *Semin usculoskelet Radiol.* 2013;17(1):69-73.
20. Anderson J, Caplan L, Yazdany J, Robbins ML, Neogi T, Michaud Ki sur. Rheumatoid arthritis disease activity measures: American College of Rheumatology recommendations for use in clinical practice. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2012;64(5):640-7.
21. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2016;388(10055):2023-2038
22. de Vries-Bouwstra J, Le Cessie S, Allaart C, Breedveld F, Huizinga T. Using predicted disease outcome to provide differentiated treatment of early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2006;33(9):1747-53.
23. Tvette IF, Natvig B, Gåsemyr J, Meland N, Røine M, Klemp M. Comparing Effects of Biologic Agents in Treating Patients with Rheumatoid Arthritis: A Multiple Treatment Comparison Regression Analysis. *PLoS One.* 2015;10(9):e0137258.
24. Ruoff G. Rheumatoid arthritis: early treatment with corticosteroids and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Fam Pract.* 2014;63(2 Suppl):S27-30.
25. Metsios GS, Stavropoulos-Kalinoglou A, Kitas GD. The role of exercise in the management of rheumatoid arthritis. *Expert Rev Clin Immunol.* 2015;11(10):1121-30.

26. Davis JM 3rd, Matteson EL; American College of Rheumatology.; European League Against Rheumatism.. My treatment approach to rheumatoid arthritis. *Mayo Clin Proc.* 2012;87(7):659-73.
27. Kleyer A, Schett G. Arthritis and bone loss: a hen and egg story. *Curr Opin Rheumatol.* 2014;26(1):80-4.
28. Deal C. Bone loss in rheumatoid arthritis: systemic, periarticular, and focal. *Curr Rheumatol Rep.* 2012;14(3):231-7.
29. Dimitroulas T, Nikas SN, Trontzas P, Kitis GD. Biologic therapies and systemic bone loss in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2013;12(10):958-66.
30. Zochling J, Smith EU. Seronegative spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2010;24(6):747-56.
31. Veale DJ, Fearon U. What makes psoriatic and rheumatoid arthritis so different? *RMD Open.* 2015;1(1):e000025.
32. Barnas JL, Ritchlin CT. Etiology and Pathogenesis of Psoriatic Arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2015;41(4):643-63.
33. Ogdie A, Schwartzman S, Eder L, Maharaj AB, Zisman D, Raychaudhuri SP, i sur. Comprehensive treatment of psoriatic arthritis: managing comorbidities and extraarticular manifestations. *J Rheumatol.* 2014;41(11):2315-22.
34. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science.* 2000;289(5484):1504-8.
35. Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y, Takayanagi H, Schett G, ur. *Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems.* 2. izd. 2015. Elsevier: Amsterdam
36. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet.* 2003;4(8):638-49.
37. Väänänen HK, Horton M. The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J Cell Sci.* 1995;108 ( Pt 8):2729-32.
38. Chellaiah MA. Regulation of podosomes by integrin alphavbeta3 and Rho GTPase-facilitated phosphoinositide signaling. *Eur J Cell Biol.* 2006;85(3-4):311-7.
39. Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science.* 1989;245(4920):855-7.
40. Li YP, Chen W, Liang Y, Li E, Stashenko P. Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. *Nat Genet.* 1999;23(4):447-51.

41. Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res.* 1988;175(2):266-76.
42. Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, Moritz JD, Schu P, von Figura K. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(23):13453-8.
43. Engsig MT, Chen QJ, Vu TH, Pedersen AC, Therkildsen B, Lund LR, i sur. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol.* 2000;151(4):879-89.
44. Tondravi MM, McKercher SR, Anderson K, Erdmann JM, Quiroz M, Maki R, Teitelbaum SL. Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature.* 1997;386(6620):81-4.
45. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, i sur. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.* 1999 Sep 15;13(18):2412-24.
46. Xiong J, Piemontese M, Onal M, Campbell J, Goellner JJ, Dusevich V, i sur. Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone. *PLoS One.* 2015;10(9):e0138189.
47. Matsuo K, Galson DL, Zhao C, Peng L, Laplace C, Wang KZ, i sur. Nuclear factor of activated T-cells (NFAT)rescues osteoclastogenesis in precursors lacking c-Fos. *J Biol Chem.* 2004;279(25):26475-80.
48. Mócsai A, Humphrey MB, Van Ziffle JA, Hu Y, Burghardt A, Spusta SC, Majumdar S, Lanier LL, Lowell CA, Nakamura MC. The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor gamma-chain (FcRgamma) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(16):6158-63.
49. Kim N, Takami M, Rho J, Josien R, Choi Y. A novel member of the leukocyte receptor complex regulates osteoclast differentiation. *J Exp Med.* 2002;195(2):201-9.
50. Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, i sur. Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature.* 2004;428(6984):758-63.
51. Flegar D, Šučur A, Markotic A, Kovačić N, Grčević D. Osteoporosis in the View of Osteoimmunology: Common Feature Underlined by Different Pathogenic Mechanisms. *Period Biol.* 2015;117(1).

52. Šučur A, Katavić V, Kelava T, Jajić Z, Kovačić N, Grčević D. Induction of osteoclast progenitors in inflammatory conditions: key to bone destruction in arthritis. *Int Orthop.* 2014;38(9):1893-903.
53. Jacome-Galarza CE, Lee SK, Lorenzo JA, Aguila HL. Identification, characterization, and isolation of a common progenitor for osteoclasts, macrophages, and dendritic cells from murine bone marrow and periphery. *J Bone Miner Res.* 2013;28(5):1203-13.
54. Husheem M, Nyman JK, Vääräniemi J, Vaananen HK, Hentunen TA. Characterization of circulating human osteoclast progenitors: development of in vitro resorption assay. *Calcif Tissue Int.* 2005;76(3):222-30.
55. Chiu YH, Mensah KA, Schwarz EM, Ju Y, Takahata M, Feng C, i sur. Regulation of human osteoclast development by dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP). *J Bone Miner Res.* 2012;27(1):79-92.
56. Petitprez V, Royer B, Desoutter J, Guiheneuf E, Rigolle A, Marolleau JP, i sur. CD14+ CD16+ monocytes rather than CD14+ CD51/61+ monocytes are a potential cytological marker of circulating osteoclast precursors in multiple myeloma. A preliminary study. *Int J Lab Hematol.* 2015;37(1):29-35.
57. Atkins GJ, Kostakis P, Vincent C, Farrugia AN, Houchins JP, Findlay DM, i sur. RANK Expression as a cell surface marker of human osteoclast precursors in peripheral blood, bone marrow, and giant cell tumors of bone. *J Bone Miner Res.* 2006;21(9):1339-49.
58. Park-Min KH, Lee EY, Moskowitz NK, Lim E, Lee SK, Lorenzo JA, i sur. Negative regulation of osteoclast precursor differentiation by CD11b and  $\beta 2$  integrin B-cell lymphoma 6 signaling. *J Bone Miner Res.* 2013; 28 (1): 135-49.
59. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003;19(1):71-82.
60. Komano Y, Nanki T, Hayashida K, Taniguchi K, Miyasaka N. Identification of a human peripheral blood monocyte subset that differentiates into osteoclasts. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(5):R152.
61. Chiu YG, Shao T, Feng C, Mensah KA, Thullen M, Schwarz EM, Ritchlin CT. CD16 (FcR $\gamma$ III) as a potential marker of osteoclast precursors in psoriatic arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(1):R14.
62. Lari R, Kitchener PD, Hamilton JA. The proliferative human monocyte subpopulation contains osteoclast precursors. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(1):R23.

63. Baeten D, Boots AM, Steenbakkers PG, Elewaut D, Bos E, Verheijden GF, i sur. Human cartilage gp-39+,CD16+ monocytes in peripheral blood and synovium: correlation with joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(6):1233-43.
64. Chiu YG, Shao T, Feng C, Mensah KA, Thullen M, Schwarz EM, Ritchlin CT. CD16 (FcRgammaIII) as a potential marker of osteoclast precursors in psoriatic arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(1):R14.
65. Ikić M, Jajić Z, Lazić E, Ivčević S, Grubišić F, Marušić A, Kovačić N, Grčević D. Association of systemic and intra-articular osteoclastogenic potential, pro-inflammatory mediators and disease activity with the form of inflammatory arthritis. *Int Orthop.* 2014;38(1):183-92.
66. Kim MS, Magno CL, Day CJ, Morrison NA. Induction of chemokines and chemokine receptors CCR2b and CCR4 in authentic human osteoclasts differentiated with RANKL and osteoclast like cells differentiated by MCP-1 and RANTES. *J Cell Biochem.* 2006;97(3):512-8.
67. Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med.* 2001;250(2):91-104.
68. Horuk R. Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12(4):313-35.
69. Hoshino A, Iimura T, Ueha S, Hanada S, Maruoka Y, Mayahara M, i sur. Deficiency of chemokine receptor CCR1 causes osteopenia due to impaired functions of osteoclasts and osteoblasts. *J Biol Chem.* 2010;285(37):28826-37.
70. Khan UA, Hashimi SM, Bakr MM, Forwood MR, Morrison NA. CCL2 and CCR2 are Essential for the Formation of Osteoclasts and Foreign Body Giant Cells. *J Cell Biochem.* 2016;117(2):382-9.
71. Khan UA, Hashimi SM, Khan S, Quan J, Bakr MM, Forwood MR, i sur. Differential expression of chemokines, chemokine receptors and proteinases by foreign body giant cells (FBGCs) and osteoclasts. *J Cell Biochem.* 2014;115(7):1290-8.
72. Grassi F, Piacentini A, Cristino S, Toneguzzi S, Cavallo C, Facchini A, i sur. Human osteoclasts express different CXC chemokines depending on cell culture substrate: molecular and immunocytochemical evidence of high levels of CXCL10 and CXCL12. *Histochem Cell Biol.* 2003;120(5):391-400.
73. Xing Q, de Vos P, Faas MM, Ye Q, Ren Y. LPS promotes pre-osteoclast activity by up-regulating CXCR4 via TLR-4. *J Dent Res.* 2011;90(2):157-62.

74. Han KH, Ryu JW, Lim KE, Lee SH, Kim Y, Hwang CS, Choi JY, Han KO. Vascular expression of the chemokine CX3CL1 promotes osteoclast recruitment and exacerbates bone resorption in an irradiated murine model. *Bone*. 2014;61:91-101.
75. Wright LM, Maloney W, Yu X, Kindle L, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Stromal cell-derived factor-1 binding to its chemokine receptor CXCR4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment, development and survival of human osteoclasts. *Bone*. 2005;36(5):840-53.
76. Oba Y, Lee JW, Ehrlich LA, Chung HY, Jelinek DF, Callander NS, Horuk R, Choi SJ, Roodman GD. MIP-1alpha utilizes both CCR1 and CCR5 to induce osteoclast formation and increase adhesion of myeloma cells to marrow stromal cells. *Exp Hematol*. 2005;33(3):272-8.
77. Dickerson TJ, Suzuki E, Stanecki C, Shin HS, Qui H, Adamopoulos IE. Rheumatoid and pyrophosphate arthritis synovial fibroblasts induce osteoclastogenesis independently of RANKL, TNF and IL-6. *J Autoimmun*. 2012;39(4):369-76.
78. Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Kohara H, Yoshimatsu M, Takano-Yamamoto T. Immunological reaction in TNF- $\alpha$ -mediated osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:181849.
79. Sabokbar A, Mahoney DJ, Hemingway F, Athanasou NA. Non-Canonical (RANKL-Independent) Pathways of Osteoclast Differentiation and Their Role in Musculoskeletal Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016;51(1):16-26.
80. Dai SM, Nishioka K, Yudoh K. Interleukin (IL) 18 stimulates osteoclast formation through synovial T cells in rheumatoid arthritis: comparison with IL1 beta and tumour necrosis factor alpha. *Ann Rheum Dis*. 2004;63(11):1379-86.
81. Hwang SJ, Choi B, Kang SS, Chang JH, Kim YG, Chung YH, et al. Interleukin-34 produced by human fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis supports osteoclastogenesis. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(1):R14.
82. Wiwanitkit V. Effect of interleukin-2 and tumor necrosis factor-alpha on osteopontin: molecular function and biological process. *Pediatr Int*. 2008;50(2):213-5.
83. Wong PK, Quinn JM, Sims NA, van Nieuwenhuijze A, Campbell IK, Wicks IP. Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(1):158-68.

84. Adamopoulos IE, Chao CC, Geissler R, Laface D, Blumenschein W, Iwakura Y, McClanahan T, Bowman EP. Interleukin-17A upregulates receptor activator of NF-kappaB on osteoclast precursors. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(1):R29.
85. Chen L, Wei XQ, Evans B, Jiang W, Aeschlimann D. IL-23 promotes osteoclast formation by up-regulation of receptor activator of NF-kappaB (RANK) expression in myeloid precursor cells. *Eur J Immunol.* 2008;38(10):2845-54.
86. Yago T, Nanke Y, Kawamoto M, Furuya T, Kobashigawa T, Kamatani N, Kotake S. IL-23 induces human osteoclastogenesis via IL-17 in vitro, and anti-IL-23 antibody attenuates collagen-induced arthritis in rats. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(5):R96.
87. Moon YM, Yoon BY, Her YM, Oh HJ, Lee JS, Kim KW, i sur. IL-32 and IL-17 interact and have the potential to aggravate osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(6):R246.
88. Roeleveld DM, Koenders MI. The role of the Th17 cytokines IL-17 and IL-22 in Rheumatoid Arthritis pathogenesis and developments in cytokine immunotherapy. *Cytokine.* 2015;74(1):101-7.
89. Xiong Q, Zhang L, Ge W, Tang P. The roles of interferons in osteoclasts and osteoclastogenesis. *Joint Bone Spine.* 2016;83(3):276-81.
90. Mun SH, Ko NY, Kim HS, Kim JW, Kim DK, Kim AR, i sur. Interleukin-33 stimulates formation of functional osteoclasts from human CD14(+) monocytes. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(22):3883-92.
91. Takeda H, Kikuchi T, Soboku K, Okabe I, Mizutani H, Mitani A, Ishihara Y, Noguchi T. Effect of IL-15 and natural killer cells on osteoclasts and osteoblasts in a mouse coculture. *Inflammation.* 2014;37(3):657-69.
92. Park MK, Her YM, Cho ML, Oh HJ, Park EM, Kwok SK, i sur. IL-15 promotes osteoclastogenesis via the PLD pathway in rheumatoid arthritis. *Immunol Lett.* 2011;139(1-2):42-51.
93. Weitzmann MN, Cenci S, Rifas L, Brown C, Pacifici R. Interleukin-7 stimulates osteoclast formation by up-regulating the T-cell production of soluble osteoclastogenic cytokines. *Blood.* 2000;96(5):1873-8.
94. Kwok SK, Cho ML, Park MK, Oh HJ, Park JS, Her YM, i sur. Interleukin-21 promotes osteoclastogenesis in humans with rheumatoid arthritis and in mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64(3):740-51.
95. Kim KW, Kim HR, Park JY, Park JS, Oh HJ, Woo YJ, Park MK, Cho ML, Lee SH. Interleukin-22 promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis through

- induction of RANKL in human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2012;64(4):1015-23.
96. Fujii T, Kitaura H, Kimura K, Hakami ZW, Takano-Yamamoto T. IL-4 inhibits TNF- $\alpha$ -mediated osteoclast formation by inhibition of RANKL expression in TNF- $\alpha$ -activated stromal cells and direct inhibition of TNF- $\alpha$ -activated osteoclast precursors via a T-cell-independent mechanism *in vivo*. *Bone.* 2012;51(4):771-80.
97. Mohamed SG, Sugiyama E, Shinoda K, Taki H, Hounoki H, Abdel-Aziz HO, *i sur.* Interleukin-10 inhibits RANKL-mediated expression of NFATc1 in part via suppression of c-Fos and c-Jun in RAW264.7 cells and mouse bone marrow cells. *Bone.* 2007;41(4):592-602.
98. Siddiqui JA, Partridge NC. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein 1 and Parathyroid Hormone Action on Bone. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017;8:49.
99. Dapunt U, Maurer S, Giese T, Gaida MM, Hänsch GM. The macrophage inflammatory proteins MIP1 $\alpha$  (CCL3) and MIP2 $\alpha$  (CXCL2) in implant-associated osteomyelitis: linking inflammation to bone degradation. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:728619.
100. Xuan W, Feng X, Qian C, Peng L, Shi Y, Xu L, *i sur.* Osteoclast differentiation gene expression profiling reveals chemokine CCL4 mediates RANKL-induced osteoclast migration and invasion via PI3K pathway. *Cell Biochem Funct.* 2017;35(3):171-177.
101. Niwa T, Mizukoshi K, Azuma Y, Kashimata M, Shibutani T. Fundamental study of osteoclast chemotaxis toward chemoattractants expressed in periodontitis. *J Periodontal Res.* 2013;48(6):773-80.
102. Kwak HB, Lee SW, Jin HM, Ha H, Lee SH, Takeshita S, Tanaka S, Kim HM, Kim HH, Lee ZH. Monokine induced by interferon-gamma is induced by receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and is involved in osteoclast adhesion and migration. *Blood.* 2005;105(7):2963-9.
103. Lee JH, Kim HN, Kim KO, Jin WJ, Lee S, Kim HH, Ha H, Lee ZH. CXCL10 promotes osteolytic bone metastasis by enhancing cancer outgrowth and osteoclastogenesis. *Cancer Res.* 2012;72(13):3175-86.
104. Gronthos S, Zannettino AC. The role of the chemokine CXCL12 in osteoclastogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2007;18(3):108-13.
105. Bendre MS, Margulies AG, Walser B, Akel NS, Bhattacharya S, Skinner RA, *i sur.* Tumor-derived interleukin-8 stimulates osteolysis independent of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand pathway. *Cancer Res.* 2005;65(23):11001-9.



106. Liou LB, Tsai WP, Chang CJ, Chao WJ, Chen MH. Blood monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and adapted disease activity Score28-MCP-1: favorable indicators for rheumatoid arthritis activity. *PLoS One*. 2013;8(1):e55346.
107. Sul OJ, Ke K, Kim WK, Kim SH, Lee SC, Kim HJ, i sur. Absence of MCP-1 leads to elevated bone mass via impaired actin ring formation. *J Cell Physiol*. 2012;227(4):1619-27.
108. Taddei SR, Queiroz-Junior CM, Moura AP, Andrade I Jr, Garlet GP, Proudfoot AE, Teixeira MM, da Silva TA. The effect of CCL3 and CCR1 in bone remodeling induced by mechanical loading during orthodontic tooth movement in mice. *Bone*. 2013;52(1):259-67.
109. Lean JM, Murphy C, Fuller K, Chambers TJ. CCL9/MIP-1gamma and its receptor CCR1 are the major chemokine ligand/receptor species expressed by osteoclasts. *J Cell Biochem*. 2002;87(4):386-93.
110. Kim HR, Kim KW, Kim BM, Jung HG, Cho ML, Lee SH. Reciprocal activation of CD4+ T cells and synovial fibroblasts by stromal cell-derived factor 1 promotes RANKL expression and osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(3):538-48.
111. Hirbe AC, Rubin J, Uluçkan O, Morgan EA, Eagleton MC, Prior JL, i sur. Disruption of CXCR4 enhances osteoclastogenesis and tumor growth in bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Aug 28;104(35):14062-7.
112. Lisignoli G, Piacentini A, Cristino S, Grassi F, Cavallo C, Cattini L, i surd. CCL20 chemokine induces both osteoblast proliferation and osteoclast differentiation: Increased levels of CCL20 are expressed in subchondral bone tissue of rheumatoid arthritis patients. *J Cell Physiol*. 2007;210(3):798-806.
113. Moll JM, Wright V. Psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 1973;3(1):55-78.
114. Colucci S, Brunetti G, Cantatore FP, Oranger A, Mori G, Quarta L, i sur. Lymphocytes and synovial fluid fibroblasts support osteoclastogenesis through RANKL, TNFalpha, and IL-7 in an in vitro model derived from human psoriatic arthritis. *J Pathol*. 2007;212(1):47-55.
115. Wisłowska M, Jakubicz D, Stepień K, Cicha M. Serum concentrations of formation (PINP) and resorption (Ctx) bone turnover markers in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2009;29(12):1403-9.

116. Ivashkiv LB, Zhao B, Park-Min KH, Takami M. Feedback inhibition of osteoclastogenesis during inflammation by IL-10, M-CSF receptor shedding, and induction of IRF8. *Ann N Y Acad Sci.* 2011 Nov;1237:88-94.
117. Sandblad KG, Jones P, Kostalla MJ, Linton L, Glise H, Winqvist O. Chemokine receptor expression on monocytes from healthy individuals. *Clin Immunol.* 2015;161(2):348-53.
118. Szekanecz Z, Koch AE. Successes and failures of chemokine-pathway targeting in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(1):5-13.
119. Asquith DL, Bryce SA, Nibbs RJ. Targeting cell migration in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2015;27(2):204-11.
120. Nanki T. Treatment for rheumatoid arthritis by chemokine blockade. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi.* 2016;39(3):172-80.
121. Lebre MC, Vergunst CE, Choi IY, Aarrass S, Oliveira AS, Wyant T. Why CCR2 and CCR5 blockade failed and why CCR1 blockade might still be effective in the treatment of rheumatoid arthritis. *PLoS One.* 2011;6(7):e21772.
122. Adamopoulos IE, Mellins ED. Alternative pathways of osteoclastogenesis in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(3):189-94.
123. Romão VC, Canhão H, Fonseca JE. Old drugs, old problems: where do we stand in prediction of rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate and other synthetic DMARDs? *BMC Med.* 2013;11:17.
124. Mc Ardle A, Flatley B, Pennington SR, FitzGerald O. Early biomarkers of joint damage in rheumatoid and psoriatic arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:141.
125. Uehara R, Suzuki Y, Ichikawa Y. Methotrexate (MTX) inhibits osteoblastic differentiation in vitro: possible mechanism of MTX osteopathy. *J Rheumatol.* 2001;28(2):251-6.
126. Świerkot J, Gruszecka K, Matuszewska A, Wiland P. Assessment of the Effect of Methotrexate Therapy on Bone Metabolism in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2015;63(5):397-404.
127. Aeberli D, Kamgang R, Balani D. Regulation of peripheral classical and non-classical monocytes on infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *RMD Open.* 2016;2:e000079.
128. Nanke Y, Kobashigawa T, Yago T, Kawamoto M, Yamanaka H, Kotake S. RANK Expression and Osteoclastogenesis in Human Monocytes in Peripheral Blood from Rheumatoid Arthritis Patients. *Biomed Res Int.* 2016;2016:4874195.

129. Revu S, Neregård P, af Klint E, Korotkova M, Catrina AI. Synovial membrane immunohistology in early-untreated rheumatoid arthritis reveals high expression of catabolic bone markers that is modulated by methotrexate. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(6):R205.
130. Hensvold AH, Joshua V, Li W, Larkin M, Qureshi F, Israelsson L, i sur. Serum RANKL levels associate with anti-citrullinated protein antibodies in early untreated rheumatoid arthritis and are modulated following methotrexate. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:239.
131. 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(1):13-9.
132. Ritchlin CT, Haas-Smith SA, Li P, Hicks DG, Schwarz EM. Mechanisms of TNF- $\alpha$ - and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *J Clin Invest.* 2003;111(6):821-31.
133. Dalbeth N, Pool B, Smith T, Callon KE, Lobo M, Taylor WJ, i sur. Circulating mediators of bone remodeling in psoriatic arthritis: implications for disordered osteoclastogenesis and bone erosion. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(4):R164.
134. Fujikawa Y, Sabokbar A, Neale S, Athanasou NA. Human osteoclast formation and bone resorption by monocytes and synovial macrophages in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1996;55(11):816-22.
135. Nose M, Yamazaki H, Hagino H, Morio Y, Hayashi S, Teshima R. Comparison of osteoclast precursors in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis and osteoporosis patients. *J Bone Miner Metab.* 2009;27(1):57-65.
136. Matthys P, Hatse S, Vermeire K, Wuyts A, Bridger G, Henson GW, i sur. AMD3100, a potent and specific antagonist of the stromal cell-derived factor-1 chemokine receptor CXCR4, inhibits autoimmune joint inflammation in IFN- $\gamma$  receptor-deficient mice. *J Immunol.* 2001;167(8):4686-92.
137. Dong Y, Liu H, Zhang X, Xu F, Qin L, Cheng P, Huang H, Guo F, Yang Q, Chen A. Inhibition of SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 Signalling in Subchondral Bone Attenuates Post-Traumatic Osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2016;17(6).
138. Talbot J, Bianchini FJ, Nascimento DC, Oliveira RD, Souto FO, Pinto LG, i sur. CCR2 Expression in Neutrophils Plays a Critical Role in Their Migration Into the Joints in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(7):1751-9.

139. Brühl H, Cihak J, Plachý J, Kunz-Schughart L, Niedermeier M, Denzel A, i sur. Targeting of Gr-1+, CCR2+ monocytes in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007;56(9):2975-85.
140. Kanbe K, Chiba J, Inoue Y, Taguchi M, Yabuki A. SDF-1 and CXCR4 in synovium are associated with disease activity and bone and joint destruction in patients with rheumatoid arthritis treated with golimumab. *Mod Rheumatol.* 2016;26(1):46-50.
141. Flytlie HA, Hvid M, Lindgreen E, Kofod-Olsen E, Petersen EL, Jørgensen A, i sur. Expression of MDC/CCL22 and its receptor CCR4 in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis. *Cytokine.* 2010;49(1):24-9.
142. Pandya JM, Lundell AC, Andersson K, Nordström I, Theander E, Rudin A. Blood chemokine profile in untreated early rheumatoid arthritis: CXCL10 as a disease activity marker. *Arthritis Res Ther.* 2017 Feb 2;19(1):20.
143. Zhang L, Yu M, Deng J, Lv X, Liu J, Xiao Y, i sur. Chemokine Signaling Pathway Involved in CCL2 Expression in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Yonsei Med J.* 2015;56(4):1134-42.
144. Haringman JJ, Gerlag DM, Smeets TJ, Baeten D, van den Bosch F, Bresnihan B, i sur. A randomized controlled trial with an anti-CCL2 (anti-monocyte chemoattractant protein 1) monoclonal antibody in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(8):2387-92.
145. Oliveira RD, Fontana V, Junta CM, Marques MM, Macedo C, Rassi DM, i sur. Differential gene expression profiles may differentiate responder and nonresponder patients with rheumatoid arthritis for methotrexate (MTX) monotherapy and MTX plus tumor necrosis factor inhibitor combined therapy. *J Rheumatol.* 2012;39(8):1524-32.
146. Han BK, Kuzin I, Gaughan JP, Olsen NJ, Bottaro A. Baseline CXCL10 and CXCL13 levels are predictive biomarkers for tumor necrosis factor inhibitor therapy in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis: a pilot, prospective study. *Arthritis Res Ther.* 2016;18:93.
147. Yellin M, Paliienko I, Balanescu A, Ter-Vartanian S, Tseluyko V, Xu LA, i sur. A phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled study evaluating the efficacy and safety of MDX-1100, a fully human anti-CXCL10 monoclonal antibody, in combination with methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64(6):1730-9.

148. Kuan WP, Tam LS, Wong CK, Ko FW, Li T, Zhu T, i sur. CXCL 9 and CXCL 10 as Sensitive markers of disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2010;37(2):257-64.
149. Kasama T, Isojima S, Umemura M, Tsukamoto H, Tokunaga T, Furuya H, i sur. Serum macrophage migration inhibitory factor levels are correlated with response to tocilizumab therapy in patients with heumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2014 Mar;34(3):429-33.
150. Hansen IB, Ellingsen T, Hornung N, Poulsen JH, Lottenburger T, Stengaard-Pedersen K. Plasma level of CXC-chemokine CXCL12 is increased in rheumatoid arthritis and is independent of disease activity and methotrexate treatment. *J Rheumatol.* 2006;33(9):1754-9.
151. Grassi F, Cristino S, Toneguzzi S, Piacentini A, Facchini A, Lisignoli G. CXCL12 chemokine up-regulates bone resorption and MMP-9 release by human osteoclasts: CXCL12 levels are increased in synovial and bone tissue of rheumatoid arthritis patients. *J Cell Physiol.* 2004;199(2):244-51.
152. Raghu H, Lepus CM, Wang Q, Wong HH, Lingampalli N, Oliviero F, i sur. CCL2/CCR2, but not CCL5/CCR5, mediates monocyte recruitment, inflammation and cartilage destruction in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(5):914-922.
153. Xia L, Lu J, Xiao W. Blockage of TNF- $\alpha$  by infliximab reduces CCL2 and CCR2 levels in patients with rheumatoid arthritis. *J Investig Med.* 2011;59(6):961-3.
154. Hirano F, Komura K, Fukawa E, Makino I. Tumor necrosis factor alpha(TNF-alpha)-induced RANTES chemokine expression via activation of NF-kappaB and p38 MAP kinase: roles of TNF-alpha in alcoholic liver diseases. *J Hepatol.* 2003;38(4):483-9.
155. Hui AY, McCarty WJ, Masuda K, Firestein GS, Sah RL. A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2012;4(1):15-37.
156. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(6):429-42.
157. Robinson WH, Mao R. Biomarkers to guide clinical therapeutics in rheumatology? *Curr Opin Rheumatol.* 2016;28(2):168-75.
158. Zhou Y, Deng HW, Shen H. Circulating monocytes: an appropriate model for bone-related study. *Osteoporos Int.* 2015;26(11):2561-72.

159. Smolen JS, Breedveld FC, Burmester GR, Bykerk V, Dougados M, Emery P, i sur. Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis*. 2016 Jan;75(1):3-15.
160. Seymour HE, Worsley A, Smith JM, Thomas SH. Anti-TNF agents for rheumatoid arthritis. *Br J Clin Pharmacol*. 2001;51(3):201-8.
161. Barrera P, van der Maas A, van Ede AE, Kiemeny BA, Laan RF, van de Putte LB, i sur. Drug survival, efficacy and toxicity of monotherapy with a fully human anti-tumour necrosis factor-alpha antibody compared with methotrexate in long-standing rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2002;41(4):430-9.
162. Adamopoulos IE. Autoimmune or Autoinflammatory? Bad to the Bone. *Int J Clin Rheumtol*. 2015;10(1):5-7.
163. Miyamoto K, Ninomiya K, Sonoda KH, Miyauchi Y, Hoshi H, Iwasaki R, i sur. MCP-1 expressed by osteoclasts stimulates osteoclastogenesis in anautocrine/paracrine manner. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Jun 5;383(3):373-7.
164. Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2004;19(12):2065-77.
165. 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 NFkappaB ligand for bone resorption. *J Biol Chem*. 2006 Jan 13;281(2):1274-85.
166. Wintges K, Beil FT, Albers J, Jeschke A, Schweizer M, Claass B, i sur. Impaired bone formation and increased osteoclastogenesis in mice lacking chemokine (C-C motif) ligand 5 (Ccl5). *J Bone Miner Res*. 2013;28(10):2070-80.
167. Andrade I Jr, Taddei SR, Garlet GP, Garlet TP, Teixeira AL, Silva TA, Teixeira MM. CCR5 down-regulates osteoclast function in orthodontic tooth movement. *J Dent Res*. 2009;88(11):1037-41.
168. Krishnamurthy A, Joshua V, Haj Hensvold A, Jin T, Sun M, Vivar N, i sur. Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(4):721-9.

169. Niwa T, Mizukoshi K, Azuma Y, Kashimata M, Shibutani T. Fundamental study of osteoclast chemotaxis toward chemoattractants expressed in periodontitis. *J Periodontal Res.* 2013 Dec;48(6):773-80.
170. Mizutani K, Sud S, McGregor NA, Martinovski G, Rice BT, Craig MJ, et al. The chemokine CCL2 increases prostate tumor growth and bone metastasis through macrophage and osteoclast recruitment. *Neoplasia.* 2009;11(11):1235-42.
171. Wright LM, Maloney W, Yu X, Kindle L, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Stromal cell-derived factor-1 binding to its chemokine receptor CXCR4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment, development and survival of human osteoclasts. *Bone.* 2005;36(5):840-53.
172. Zhang Q, Guo R, Schwarz EM, Boyce BF, Xing L. TNF inhibits production of stromal cell-derived factor 1 by bone stromal cells and increases osteoclast precursor mobilization from bone marrow to peripheral blood. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(2):R37.
173. Braun T, Zwerina J. Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(4):235.
174. Nagafuchi Y, Shoda H, Sumitomo S, Nakachi S, Kato R, Tsuchida Y, et al. Immunophenotyping of rheumatoid arthritis reveals a linkage between HLA-DRB1 genotype, CXCR4 expression on memory CD4(+) T cells, and disease activity. *Sci Rep.* 2016;6:29338.
175. Galliera E, Locati M, Mantovani A, Corsi MM. Chemokines and bone remodeling. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2008;21(3):485-91.
176. Adamopoulos IE. Autoimmune or Autoinflammatory? Bad to the Bone. *Int J Clin Rheumatol.* 2015;10(1):5-7.

## 11. ŽIVOTOPIS

Alan Šućur rođen je 3.7.1987. u Zagrebu, gdje je završio Osnovnu školu „Alojzije Stepinac“ i V. prirodoslovno-matematičku gimnaziju. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao je 2005. te diplomirao 2011. godine s odličnim prosjekom. Pripravnički staž obavljao je 2011.-2012.g., nakon kojeg je položio stručni državni ispit te stekao odobrenje za samostalni rad. Od 2012. radi kao asistent na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu gdje aktivno sudjeluje u nastavnom programu seminara i vježbi, a sudjeluje i u nastavi fiziologije i imunologije na studiju medicine na engleskom jeziku. Istodobno radi na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, u Laboratoriju za molekularnu imunologiju, na projektima pod mentorstvom prof. dr. sc. Danke Grčević (projekt COPERA Hrvatske zaklade za znanost), a kao suradnik sudjeluje na projektu prof.dr.sc. Nataše Kovačić (projekt MEFRA Hrvatske zaklade za znanost). Poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2012. te završava 2015. godine. Prvi je autor na tri rada indeksiranih u Current Contents, koautor na također tri rada u Current Contents, te još koautor dva rada u ostalim međunarodno indeksiranim časopisima. Tajnik je Hrvatskog imunološkog društva i predstavnik za jugoistočnu Europu Doctors Against Forced Organ Harvesting. Primao je stipendije Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa (2005.-2008.) te Grada Zagreba (2008.-2011.), nagrađen je Dekanovom nagradom (2011.), prvom nagradom Hrvatskom imunološkog društva za prezentaciju rada (2014.) i prvom nagradom na Danu doktorata Medicinskog fakulteta u Zagrebu (2015.), a dobitnik je i dvije Akademske mobilnosti Sveučilišta u Zagrebu (2015. i 2016.) te Potpore doktorandima Sveučilišta u Zagrebu (2015.).

### POPIS PUBLIKACIJA AUTORA

1. **Sucur A**, Jajic Z, Artukovic M, Ikić Matijasević M, Anić B, Flegar D, i sur. Chemokine signals are crucial for enhanced homing and differentiation of circulating osteoclast progenitor cells. **Arthritis Res Ther.** 2017;19(1):142.
2. **Sucur A**, Gajović S. Nobel Peace Prize nomination for Doctors Against Forced Organ Harvesting (DAFOH) - a recognition of upholding ethical practices in medicine. **Croat Med J.** 2016;57(3):219-22.
3. Ikić Matijasević M, Flegar D, Kovačić N, Katavić V, Kelava T, **Sucur A**, i sur. Increased chemotaxis and activity of circulatory myeloid progenitor cells may contribute to enhanced osteoclastogenesis and bone loss in the C57BL/6 mouse model of collagen-induced arthritis. **Clin Exp Immunol.** 2016;186(3):321-335.



4. Mitrovic S, Kelava T, **Sucur A**, Grcevic D. Levels of Selected Aqueous Humor Mediators (IL-10, IL-17, CCL2, VEGF, FasL) in Diabetic Cataract. **Ocul Immunol Inflamm.** 2016;24(2):159-66.
5. Flegar D, **Sucur A**, Markotic A, Kovačić N, Grčević D. Osteoporosis in the View of Osteoimmunology: Common Feature Underlined by Different Pathogenic Mechanisms. **Period Biol.** 2015;117(1).
6. Kuzmac S, Grcevic D, **Sucur A**, Ivcevic S, Katavic V. Acute hematopoietic stress in mice is followed by enhanced osteoclast maturation in the bone marrow microenvironment. **Exp Hematol.** 2014;42(11):966-75.
7. **Sucur A**, Katavic V, Kelava T, Jajic Z, Kovacic N, Grčević D. Induction of osteoclast progenitors in inflammatory conditions: key to bone destruction in arthritis. **Int Orthop.** 2014;38(9):1893-903.
8. Kelava T, **Sucur A**, Kuzmac S, Katavic V. Interactions between bone and immune systems: A focus on the role of inflammation in bone resorption and fracture healing. **Period Biol.** 2014;116(1):45-52.